

# Bulletin et Mémoires de l'Académie royale de Médecine de Belgique

Séance publique du 22 octobre 2011

*Y. Carlier*

**Globalization of Chagas disease  
(American trypanosomiasis) : the situation  
in Europe and Belgium**

*E. Pays*

**Dialogue moléculaire entre trypanosomes  
africains et l'homme**

\*  
\* \*

Séance publique du 26 novembre 2011

*A. Albert*

**Eloge académique du Professeur R. Limet,  
membre titulaire**

*P. Delaere*

**La création d'une transplantation trachéale  
vascularisée**

*J. Lerut*

**Liver transplantation or Starzl's legacy.  
A look backward, a look forward**

\*  
\* \*

Séance publique du 17 décembre 2011

*P. A. Barrow*

**New Viral Pathogens from Wildlife**

*D. Onions*

**Massively Parallel Sequencing :  
A New Tool in Virus Discovery and Vaccine Safety**

\*  
\* \*

VOLUME 166/ANNÉE 2011

N<sup>os</sup> 10bis-11-12

PÉRIODIQUE MENSUEL  
NE PARAISSANT PAS EN AOÛT

PALAIS DES ACADEMIES  
1000 BRUXELLES



Séance publique du 22 octobre 2011

---



## SÉANCE PUBLIQUE DU 22 OCTOBRE 2011

---

Au Bureau : M. A. Ferrant, Secrétaire perpétuel, MM. W.J. Malaisse et J.-B. Otte, premier et second vice-présidents.

Sont présents :

MM. Ch. Chalant, P.-J. Kestens, P. Vanderhoeft, J.E. Dumont, A. Burny, J.-J. Vanderhaeghen, M. Wéry, membres honoraires ;

MM. H. Kulbertus, M. Lamy, J. Brotchi, G. Fillet, L. Angenot, R. Lauwerys, J. Frühling, G. Rorive, J. Boniver, J.-C. Schoevaerds, M<sup>me</sup> F. Portaels, MM. G. Meulemans, E. Pays, L. Hue, J.-M. Boeynaems, L. Delattre, J.-F. Beckers, B. Van den Eynde, Y. Pirson, R. Kramp, M<sup>me</sup> D. Balériaux, MM. J.D. Born, J. Nève, M<sup>me</sup> F. Meunier, membres titulaires ;

MM. J. Content, R. Vanwijck, S. Louryan, Y. Carlier, P. Lekeux, A. Albert, B. Lengelé, Ch. Delloye, G. Casimir, D. Giet, E. Constant, O. Feron, M. Hamoir, R. Reding, F. Lemaigre, L. Willems, J.-C. Renauld, membres ordinaires.

\*  
\*   \*

M. P.-P. Pastoret, Président ; MM. E.H. Betz, J. Bonnal, L. Molle, P. Dumont, Th. Godfraind, M. Lechat, J. van der Stricht, M. Abramow, Ch. van Ypersele, P. Lefèbvre, A. Dresse, membres honoraires ; M. Th. de Barsy, M<sup>me</sup> J.-A. Stiennon-Heuson, MM. M. Goldman, J. Melin, P. Van Cangh, membres titulaires ; J. Libert, J. Crommen, F. Houssiau, J.O. Defraigne, J.-C. Pector, J. Klastersky, Ch. Delloye, M<sup>me</sup> I. Salmon, membres ordinaires, ont exprimé leurs regrets de ne pouvoir assister à la séance.

\*  
\*   \*



## Lectures

### I

# GLOBALIZATION OF CHAGAS DISEASE (AMERICAN TRYPANOSOMIASIS) : THE SITUATION IN EUROPE AND BELGIUM

par

Y. CARLIER (U.L.B.), membre ordinaire

## 1. Infection with *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease

Chagas disease (American trypanosomiasis) is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Both the extracellular form of the parasite (called “trypomastigote”), susceptible to diffuse in the whole body, and its intracellular form (called “amastigote”), required for its division, are present in humans. This infection is endemic in Latin America, where 25% of population would be at risk of infection. Ten million people are estimated to be infected in 21 countries, with an incidence of 20,000 new cases per year. One to three millions of infected people suffer from cardiac and digestive clinical forms of chronic Chagas disease, responsible of 11,000 deaths per year (1).

The parasite can be transmitted by insect vectors (*Hemiptera reduvidae*, such as *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, etc.) by making contact between their parasite-contaminated feces with break in the skin, the eyes or the mouth. This mode of transmission has been significantly reduced by the programmes of vector control developed in many of the endemic countries. A second transmission mode is the transfusion of infected blood, equally decreasing through the blood bank control. Another transmission mode, which is increasingly important in relation to the regression of the latter two, is the congenital transmission, occurring in 1 to 12% of acutely as well as chronically infected pregnant women (2). Transmission can also occur by oral route, through food or drink contaminated with parasites (mainly eliminated by vectors), and after transplantation of infected organs (1).

Chagas disease can present acute or chronic clinical phases. The acute phase lasts 30 to 60 days and is frequently asymptomatic and undiagnosed. However some signs can indicate parasite entrance in case of vector contamination, such as the Romaña’s sign (unilateral oedema of the upper and lower eyelids) or the cutaneous chagoma. Some non-specific and self-limited symptoms, such as fever, enlarged lymph nodes, hepatomegaly and oedema can also appear. Cardiac and/or neurological alterations are mainly observed in case of co-infection with HIV. Such acute phase evolves spontaneously toward either a rapid aggravation (often associated with active myocarditis), leading up to death (over all in children under two years), or the indeterminate chronic phase in 90% of cases. The latter is asymptomatic and can last

throughout whole life. However, 30 to 40% of such infected subjects can develop, 10 to 20 years later, cardiac and/or digestive clinical forms of Chagas disease. The chronic chagasic myocarditis associates arrhythmias, cardiac failure and thromboembolism. Its evolution is irreversible and often results in sudden death or congestive cardiac failure. Chagas disease is the main cause of cardiovascular death in Latin America. The chronic disease also induces enlargements of oesophagus (megaoesophagus) and colon (megacolon). The mechanisms on such lesions involve destructions of muscular cells and of the autonomous nervous system of heart and digestive tube (1).

The laboratory diagnosis of *T. cruzi* infection in the acute phase is based on parasitological tests, such as microscopic examination of fresh blood, thick blood smears stained with Giemsa, or blood centrifuged in heparinized capillary tubes. Multiplication of parasites from blood samples can also be obtained by hemoculture and xenodiagnosis (the patient is bitten by uninfected *reduvidae* insects of which intestinal content is examined 30, 60 and 90 days later). Immunological tests are useful for the diagnosis of the chronic phase. Standard serological tests, such as immunofluorescence, ELISA or indirect hemagglutination, as well as rapid immunochromatographic tests can be used. Molecular diagnosis based on PCR and qPCR (amplifying *T. cruzi* kinetoplastic or satellite nuclear DNA) are also available (1).

The treatment of *T. cruzi* infection uses two drugs : benznidazol (5 to 7 mg/kg/day, given during two months) and nifurtimox (8-10 mg/kg/day given during two months). Such drugs are available through World Health Organization (WHO). They induce side effects in 30% of patients (allergic dermatitis, digestive problems, peripheral polyneuritis and rarely neutropenia). Both drugs are active overall during the acute phase (in 100% of children below 1 year, and in 60 to 70% of adult patients). In chronic phase, 50 to 60% of patients with infection evolving from less than 10 years and much less of those infected from a longer time can be effectively cured. The etiological treatment of patients in the indeterminate phase reduces the frequency and the severity of the cardiac clinical form (1).

## 2. Historical milestones of Chagas disease

In 1909, Carlos Chagas, a Brazilian MD (Minas Gerais, Brazil) discovered the parasite, the insect vector, described the human infection and its parasitological diagnosis (unique case in the history of medicine). From 1930 to 1950, the disease is mainly studied in Argentina by Salvator Mazza and Cecilio Romaña, and the clinical aspects of chagasic cardiopathy are detailed. In the 1970s-1980s, massive migrations of farmers toward the Latin American cities lead to an urbanization of the disease (with urban transmission by vectors and blood transfusion). From the 1990s, important programmes aiming to control transmission by vectors and blood transfusion are launched in collaboration with the Pan American Health Organization (PAHO) (against *T. infestans*, in 1991, through the South cone initiative ; against *R. prolixus* in 1997, with the Andean and Central America initiatives ; in 2004, with the Amazonian initiative) (3). From the 2000s,



congenital infection begins to be controlled. A consensus on the strategy to be applied has been defined through an international meeting organized in 2002 by ULB and UMSS with the help of the Belgian cooperation, and validated in 2004 by WHO/PAHO (4, 5). In 2007, WHO and PAHO, in a historical meeting in Geneva, considered the important changes having occurred in the epidemiology of *T. cruzi* infection/Chagas disease. They acknowledged its reduced incidence in endemic countries and its extension toward non-endemic areas (see below), i.e. its recent globalization and launched an additional initiative to deal with Chagas disease in non- endemic countries (6).

### **3. Epidemiological evolution of Chagas disease in Latin American endemic countries**

Since the 1990s, a constant decrease of prevalence of infection and incidence in children and young adults is observed in countries applying the recommended vector control programmes and improvement of blood banks. The number of infected subjects has decreased from 18 million in 1980 to 10 million in 2009. During the same period, the annual incidence has been also reduced from 700,000 to 20,000 cases and the mortality from more than 45,000 to 11,000 per year. Interruption of vector transmission by *T. infestans* and blood transfusion transmission is acknowledged in Uruguay, Chile, Brazil and partially in Argentina (1). Countries of Central America (Belize, Costa Rica, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, and Panama) have received the certification of the interruption of the vector transmission by *R. prolixus*. The prevalence of *T. cruzi* infection in pregnant women, as well as the incidence of congenital infection in areas where vector transmission has been controlled have also decreased significantly (as e.g. in Cochabamba, Bolivia, from a prevalence of 28% in 1992 to 16% in 2006, and an incidence of 1.4% to 0.3% in the same period ; 2, 7).

### **4. *T. cruzi* infection and Chagas disease in non-endemic countries**

In the last decades, important migration flows were observed from Latin America towards North America (United States-US- and Canada), the Western Pacific region (Australia and Japan), and, more recently, to Europe, and particularly Spain (8). The main challenges of the occurrence of such infection in non-endemic countries are the management of infected subjects, the prevention of transmission by blood transfusion and organ transplantation, and the control of congenital infection.

Presently in US, the number of infected subjects is estimated to be 300,200 (over 22,850,000 Latin American migrants) with 30,000-45,000 cardiomyopathies and 63 to 315 congenital cases per year. More than 5,000 infected blood donors have been detected since 2007, when a screening test for Chagas disease has been approved by FDA and recommended to the American blood banking industry. Some cases of Chagas disease associated with blood transfusion have been reported. Insect vectors susceptible to transmit *T. cruzi* are present in US and active in the enzootic cycle involving wild and

domestic animals (mainly dogs). Some cases of vector transmission in human have been reported in Texas, California, Tennessee and Louisiana (9, 10).

The question of the presence of vectors susceptible to transmit *T. cruzi* in the old world has been raised. Analysis of available data indicate that potential vectors (such as *Triatoma rubrofasciata* and others, present in Latin America) are encountered in various harbours of the African coast and mainly in harbours and cities of India and other countries of South-East Asia. Contacts between such insects and humans have been documented in Vietnam, India and Thailand. However, these insects are not harbouring infective parasites, since, up to now there are no infected humans or animals in such areas. They have been probably brought with goods transiting by the maritime commercial routes (11).

### **5. *T. cruzi* infection and Chagas disease in Europe**

From the beginning of 1980s, there were only sporadic publications on cases of transmission by blood transfusion, congenital route and laboratory accidents, and in some infected tourists and adopted children in Europe. A considerable increase in the number of reported cases is noted from the beginning of 2000s, mainly in Spain, when important migrations between Latin America and Europe occurred for economic hardship, tightening of visa regimes in US (after 2001), appeal to dual nationality (for migrants having European ancestors). A feminization of such migration, relevant for congenital transmission, was also observed. In 2009, WHO launched a network of European experts on Chagas disease in order to exchange information and experience and define a common strategy for the epidemiological surveillance of *T. cruzi* infection (12, 13).

In 2008, 4,180,000 Latin American migrant people from endemic countries lived in Europe (i.e. 11% of all migrants). However, this does not include undocumented migrants, those having acquired an European citizenship, and children adopted by European families. The Latin American nationalities with the greatest presence in Europe are the Brazilian (mainly in Portugal), Ecuadorian, Colombian, Bolivian (mainly in Spain), Peruvian, Surinamese (mainly in the Netherlands) (13).

Who has analysed the data of countries with more than 400 cases of Chagas disease in 2009 : Belgium, France, Germany, Italy, Netherlands, Portugal, Spain, Switzerland and United Kingdom (UK). The diagnosed cases for all these countries were only 4,290 (89% in Spain), i.e. 1.3‰ of migrants from endemic countries, whereas the expected cases were estimated to be 68,000 to 123,000, i.e. 1.8 to 2.8‰ of such migrants (according to the distribution of migrants per nationality and the known prevalence of *T. cruzi* infection in the respective countries). The Latin American nationalities with the greatest number of infected people were : Bolivian, Ecuadorian, Argentinean, Brazilian, and Colombian. The estimated numbers of newborns with congenital Chagas disease were 20 to 184 per year (i.e. an incidence of 0 to 3‰ pregnancies in migrant women from endemic

countries, 90% being in Spain). The index of underdiagnosis of *T. cruzi* infection was 94 to 96% (99% in Netherlands, Portugal and UK). The reasons for such underdiagnosis are likely related to the fact that :

- 1) most European health professionals have little or no experience with the detection and management of Chagas disease ;
- 2) the access to specialized laboratory diagnosis for the community at risk is very limited, since only few institutions offer such screening ;
- 3) the diagnosis of chronic phase is usually delayed as most patients remain asymptomatic for many years. The European countries with *T. cruzi* infection/ Chagas disease are classified in three groups :
  - a) Spain with more than 50,000 cases (75% of all expected cases in Europe) ;
  - b) France, Italia and UK, with 2.000 to 12.000 expected cases ;
  - c) Belgium, Germany, the Netherlands, Portugal and Switzerland, with 700 to 2000 expected cases (13).

Some directives of the European Commission mention the exclusion of Chagas disease carriers for donation of blood (2004), tissue and cells (2006). In agreement with such European Union directives, Spain and France have implemented mandatory screening of Latin American blood donors, and Italia and UK have prohibited blood donation by migrants from endemic countries (their country of origin being recorded by questionnaire). Protocols in Spain (Valencia and Cataluña) have been established to screen pregnant women from Latin America in order to control congenital infection (12, 13).

## 6. *T. cruzi* infection and Chagas disease in Belgium

The serodiagnosis of *T. cruzi* infection is performed in two Belgian centres :

- 1) the Institute of Tropical Medicine (ITG) in Antwerp (M. Van Esbroeck, E. Bottieau), by ELISA ;
- 2) the Laboratory of Parasitology of the Erasmus Hospital (ULB) in Brussels (C. Truyens, Y. Carlier) by immunofluorescence and ELISA (this lab also performs *T. cruzi*-specific PCR and qPCR).

From 01/01/1999 to 12/31/2010 (12 years), both centres have performed *T. cruzi* serology for 1939 patients, from which 48 were detected positive (2.5%), i.e. about four positive patients per year. From these 48 patients, 23 lived in Belgium and 25 lived in other European countries (Netherlands, Luxembourg, France, Italia, Sweden, Norway) and were referred to ULB/ITG laboratories for serodiagnosis. Comparison of data obtained for periods of four years indicated a relative stability in the number of *T. cruzi*-specific serology asked by Belgian MD, and a significant increase in the proportion of patients displaying positive serodiagnosis in the last four years period (about five to six per year) compared to the previous periods (Fig. 1). The analysis of individual data available for the 23 infected patients living in Belgium showed that most were migrants from Latin

America (21/23, 91.3%), and only two were Belgians having made multiple stays in various Latin American countries. The countries of origin of migrant infected patients were mainly Brazil (41%), Bolivia (29%) and Ecuador (18%). Approximately one third of infected patients (32%) displayed a symptomatic chronic Chagas disease (cardiac : 50% ; digestive with megaesophagus : 17% ; cardiac and digestive : 33%).

A survey performed in the maternity ward of the Saint-Pierre Hospital (Brussels), from April 2007 to February 2010 (Dabiri C., Ronsenberg S., Barlow P., Truyens C., Vandenberg O. and Carlier Y.) showed that among 8926 births, 473 were from Latin American mothers (5.3%). Surprisingly, 74% of them were undocumented. The countries of origin of such mothers were mainly Brazil (63%) and Ecuador (28%). Less than 2% came from other Latin American countries (1.5% from Bolivia). Only one mother was detected seropositive for *T. cruzi* (1/418, 0.24%). This mother was Brazilian and suffered from a megaesophagus treated surgically in Brazil. Her newborn and siblings were not infected (according to parasitological, PCR and serological investigations). Beside this case at the Saint-Pierre Hospital, three other neonates of *T. cruzi*-infected mothers have been also studied in other maternity wards and shown free of *T. cruzi* infection.

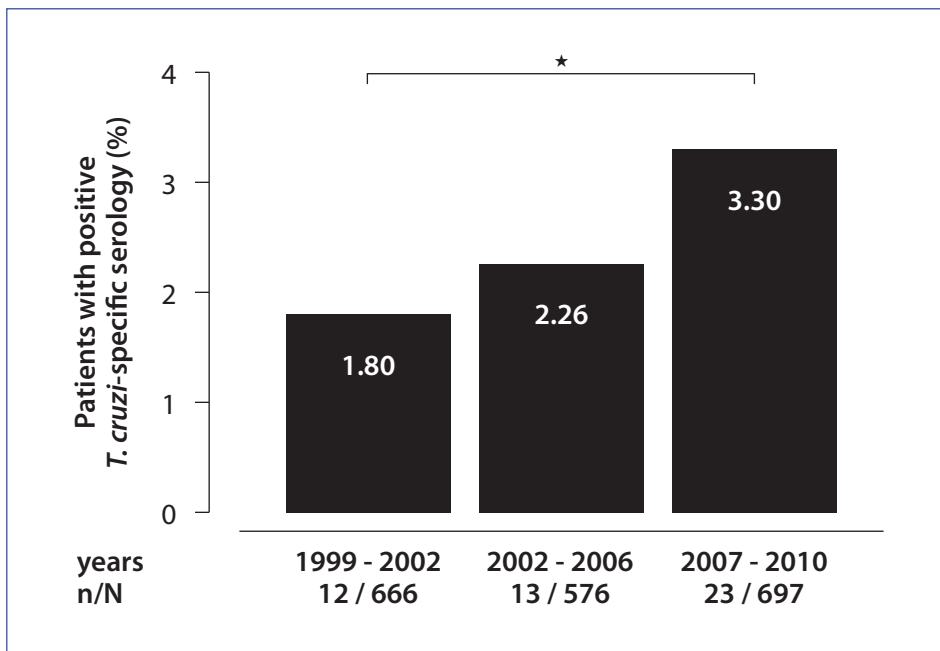


Fig. 1

*T. cruzi*-specific serodiagnosis performed at ITG and ULB from 1999 to 2010 (n= number of positive serodiagnosis ; N= total number of serodiagnosis ; \* =  $p < 0.05$ )

The data mentioned above are of limited scope. A more realistic estimate of expected cases of *T. cruzi* infection in Belgium can be obtained considering the number of Latin American migrants, their nationalities and the mean prevalence of *T. cruzi* infection in endemic countries. In 2009, 28,880 Latin American migrants were officially registered in Belgium (all regions) (National Register, DGSIE, Brussels, Belgium). The number of undocumented Latin American migrants could be reasonably estimated to 50%, i.e. 14,440. The adopted Latin American children were 490 in 2009, i.e. a total of 43,810 Latin American migrants. Considering the prevalences of *T. cruzi* infection in endemic countries (1.6-2.1% ; 14), the number of cases of infection in Belgium could be estimated to 683 to 921 (including 218 to 295 cases of cardiac and/or digestive Chagas disease). However, considering the mean prevalence of 3.3% observed in the last period of ULB/ITG laboratory studies (see above), the estimated number of infected people increases to 1,446 (with 463 cases of cardiac and digestive Chagas disease). The numbers of Latin American blood donors in Brussels and Wallonia in 2008 was 389 (D. Sondag, O. Bertrand, Service du sang, Croix Rouge, Belgium), i.e. 6 to 13 potentially infected blood donors (considering the prevalences of 1.6% and 3.3%, respectively). An estimation of pregnant women and newborns infected with *T. cruzi* could also be performed for all Belgian regions. In 2009, 722 Latin American pregnant women gave birth to live newborns. The numbers of infected mothers were estimated being 12 to 24, according to the calculation mode indicated above, with 0 to 1 congenitally infected neonates per year, considering maternal-foetal transmission rates of 5 to 10% (2).

So, in Belgium, there is various cases of *T. cruzi* infection (asymptomatic indeterminate, as well as cardiac and digestive clinical forms of Chagas disease), with an estimate of 700 to 1500 expected cases in migrants coming from endemic areas. However, as far as we know up to now, there is no case report of *T. cruzi* infection due to local blood transfusion, organ transplantation or maternal-foetal transmission.

## 7. Conclusion

These data indicate an urgent need in Europe and Belgium :

- 1) to reinforce teaching on *T. cruzi* infection and Chagas disease (in the frame of courses of Medical Parasitology, Infectious Diseases and/or Tropical Medicine) ;
- 2) to train health professionals to detect cases and to take care of the existing cases (creating specific task forces in hospitals) ;
- 3) to implement screening programmes of target populations (with focus on migrants without legal residency permit having potential difficulty in accessing care). A greater involvement of European and Belgian health authorities in controlling Chagas disease would be highly desirable. Based on legislation or protocols already used in Spain and France (European surveillance), regulations on blood and organ donation, and control of congenital infection should be implemented.

## SUMMARY

*Trypanosoma cruzi*, the protozoan agent of Chagas disease infects ten million people in Latin America where it is the main cause of cardiac failure. It is transmitted by insect vectors in endemic areas, and also congenitally, by transfusion of infected blood, transplantation of infected organs and oral route in both endemic and non-endemic areas. Since the 1990s, a constant decrease of incidence of infection is observed in Latin America, where vector control programmes and improvement of blood banks have been implemented. However, the important migration flows in the last decades for economic reasons have brought considerable numbers of Latin American subjects infected with *T. cruzi*, in US, Europe, Japan and Australia. Such globalization of *T. cruzi* infection/Chagas disease has been confirmed in an WHO historical meeting in 2007, emphasizing the importance of a wise management of such patients and the need of implementing control measures in blood banks, transplantation centres and maternities of involved countries in non-endemic areas. This paper considers these elements and the present situation of Chagas disease in Europe and Belgium.

## RÉSUMÉ

*Trypanosoma cruzi*, le protozoaire agent de la maladie de Chagas, infecte dix millions de personnes en Amérique latine où il est une cause majeure d'insuffisance cardiaque. Il est transmis par des insectes vecteurs en zone endémique, et également par voie congénitale, transfusion sanguine, transplantation d'organe et voie orale, en zones endémique et non endémique. On assiste depuis les années 1990 à une diminution constante de l'incidence de cette infection en Amérique latine, suite à la mise en place de programmes de lutte anti-vectorielle et de contrôle des banques de sang. Cependant les migrations importantes, pour raisons économiques, de ces dernières décennies, ont amené un nombre considérable de sujets latino-américains infectés par *T. cruzi* aux USA, en Europe, au Japon et en Australie. Cette « mondialisation » de l'infection à *T. cruzi*/maladie de Chagas a été confirmée lors d'une réunion historique à l'OMS en 2007, soulignant l'importance d'une prise en charge avisée de ces patients et la nécessité de mettre en place des mesures de contrôle dans les banques de sang, les centres de transplantation et les maternités des pays concernés dans les zones non endémiques. Le présent exposé envisage ces éléments et la situation actuelle de la maladie de Chagas en Europe et en Belgique.

## BIBLIOGRAPHY

1. RASSI A. Jr, RASSI A., MARIN-NETO J.A., *Chagas disease*, Lancet.375 :1388-402, 2010.
2. CARLIER Y., TRUYENS C., *Maternal-fetal transmission of Trypanosoma cruzi*. In : TELLERIA J., TIBAYRENC M., *American trypanosomiasis-Chagas disease. One hundred years of research*, UK, USA, Elsevier, 539-581, 2010.
3. ARAUJO-JORGE T.C. de, TELLERIA J., RIOS-DALENZ J., *History of the discovery of American trypanosomiasis (Chagas disease)*. In : TELLERIA J., TIBAYRENC M., *American trypanosomiasis-Chagas disease. One hundred years of research*, UK, USA, Elsevier, 18-23, 2010.
4. PAHO (Pan American Health Organization) and CLAP (Latin American Center for Perinatology and Human Development). *Consultation on congenital Chagas disease, its epidemiology and management*. Available on line : <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dch-chagas-congenita-2004.htm>.
5. CARLIER Y., TORRICO F., SOSA-ESTANI S., RUSSOMANDO G., LUQUETTI A., FREILIJ H., ALBAJAR VINAS P., *Congenital Chagas disease : Recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women*, PLoS. Negl. Trop. Dis, 5 :e1250, 2011.
6. WHA (World Health Assembly), *Chagas disease : control and elimination. Resolutions and decisions*. In : Sixty-third WHA, Geneva, 17–21 May 2010, annexes (WHA63/2010/REC/1), resolution WHA63.20 :39–42. Available on line : [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA63-REC1/WHA63\\_REC1-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63-REC1/WHA63_REC1-en.pdf).
7. TORRICO F., ALONSO VEGA C., BILLOT C., TRUYENS C., CARLIER Y., *Relaciones materno-fetales en la infeccion con T. cruzi y la implementacion de un programa nacional de deteccion y tratamiento de Chagas congenito en Bolivia*, Enf. Emerg. 9 : 9-16, 2007.
8. SCHMUNIS G.A., YADON Z.E., *Chagas disease : a Latin American health problem becoming a world health problem*, Acta Tropica, 2010, 115 :14-21.
9. BERN C., MONTGOMERY S.P., *An estimate of the burden of Chagas disease in the United States*, Clin. Inf. Diseases, 49 :e52-e54, 2009.
10. BUEKENS P., ALMENDARES O., CARLIER Y., DUMONTEIL E., EBERHARD M., GAMBOA-LEON R., JAMES M., PADILLA N., WESSON D., XIONG X., *Mother-to-child transmission of Chagas disease in North America : why don't we do more ?*, Matern. Child. Health J., 3 :283-286, 2008.
11. SCHOFIELD C.J., GRIJALVA M.J., DIOTALUTI L., *Distribution de los vectores de la enfermedad de Chagas en paises "no endemicos" : la posibilidad de transmision vectorial fuera de America Latina*, Enf. Emerg. 11 (Supl 1) :20-27, 2009.
12. ALBAJAR-VINAS P., JANNIN J., *The hidden Chagas disease burden in Europe*, Euro Surveill., 16(38) : pii19975, 2011. Available online : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19975>.
13. BASILE L., JANS A.J.M., CARLIER Y., SALAMANCA D.D., ANGHEBEN A., BARTOLONI A., SEIXAS J., VAN GOOL T., CANAVATE C., FLORES-CHAVEZ M., JACKSON Y., CHIODINI P.L., ALBAJAR-VINAS P. (Working group on Chagas disease), *Chagas disease in European countries : the challenge of a surveillance system*, Euro Surveill., 16(37) :pii19968, 2011. Available on line : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19968>.
14. PAHO (Pan American Health Organization)/OPS (Organizacion Panamericana de la Salud), *Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Americas*, OPS/HDM/CD/425-06, 2006.

(Laboratoire de Parasitologie – Faculté de Médecine – U.L.B.).

\*  
\* \*

## Discussion

*M. M. Lamy.* – En matière de transfusion sanguine et de transplantation d'organes, quelles règles préconisez-vous ? Sérologie, cela implique, pour la Belgique, des échantillons sanguins vers Anvers ou Bruxelles ? Quel est le délai de réponse des laboratoires ? En transplantation d'organe, on est en effet parfois assez pressé par le temps.

*M. Y. Carlier.* – Réaliser une sérologie pour *T. cruzi* chez tout donneur de sang ou d'organe, originaire de ou ayant séjourné en Amérique latine, est une mesure facile à prendre. Ces sérologies sont effectivement disponibles à l'ULB et à l'ITG. Ces tests sont réalisés en quelques heures (ELISA) et, en prévenant le laboratoire de l'urgence, il est possible d'obtenir ce résultat plus rapidement.

*M. L. Hue.* – Connaît-on le mode d'action des deux médicaments utilisés dans le traitement de la maladie de Chagas ?

*M. Y. Carlier.* – Le(s) mode(s) d'action du benznidazole et du nifurtimox étai(en)t peu connu(s) jusqu'il y a peu. On pensait que le benznidazole agissait sur l'ADN parasitaire, en empêchant la synthèse protéinique et en augmentant la phagocytose et la production de cytokines, et que le nifurtimox agissait par la production de radicaux libres (anions super oxydes et oxyde niriq). Récemment il a été montré que ces deux médicaments nitrohétérocycliques étaient des promédicaments transformés par une nitroréductase parasitaire de type 1 (absente des cellules de l'hôte) et produisant ainsi des métabolites toxiques pour le parasite, sans génération de superoxydes.

*M. J.-C. Schoevaerds.* – La migration vectorielle dans le monde a-t-elle été influencée par la lutte antivectorielle dans les pays d'Amérique latine, qui a abaissé le taux d'infection vectorielle en Amérique latine ? Ou est-ce que cette migration est une pure constatation actuelle ? Y-a-t-il eu des cas d'infection en phase « aiguë » constatés en Belgique ?

*M. Y. Carlier.* – Non, les migrations vectorielles en Afrique et en Asie sont le fait du commerce maritime à partir de l'Amérique latine et ne sont pas en rapport avec la diminution des vecteurs dans ce continent. Il n'y a pas encore, à ma connaissance, eu de cas d'infection aiguë constatée en Belgique (par transfusion sanguine ou par voie congénitale).

*M. A. Albert.* – Vous avez évoqué l'œdème oculaire comme un des premiers signes de la maladie de Chagas. S'agit-il d'un signe lié à la transmission vectorielle ? Pourriez-vous élaborer sur ce point ?

*M. Y. Carlier.* – L'œdème oculaire bipalbréal unilatéral, appelé signe de Romaña, est en effet un signe d'entrée du parasite par voie vectorielle. Il est lié à la réaction inflammatoire provoquée au contact de l'œil par les déjections du vecteur associées au parasite. Cet œdème peut également être observé au cours du contact oculaire avec des déjections d'insectes sans parasite. Dans ce cas la durée de l'œdème est moindre.



*M. G. Casimir.* – Est-il pensable de réaliser un test de dépistage néonatal avec une bonne sensibilité, par exemple sur papier GUTHRIE ?

*M. Y. Carlier.* – Le dépistage néonatal d'une infection à *T. cruzi* à partir d'une goutte de sang prélevée sur papier filtre n'est pas possible. Les anticorps détectés seront ceux provenant de la mère et pas ceux du nouveau-né. Par ailleurs les essais de PCR que nous avons réalisés pour rechercher de l'ADN parasitaire sur ce type de matériel ont échoué, les concentrations d'ADN parasitaire présentes dans les prélèvements étant beaucoup trop faibles. Par contre ce dépistage pourrait tout à fait permettre de dépister les mères séropositives pour *T. cruzi*, ce qui devrait conduire à la recherche du parasite chez leurs nouveau-nés par d'autres techniques.

\*

\* \*

## II

**DIALOGUE MOLÉCULAIRE ENTRE TRYPANOSOMES  
AFRICAINS ET L'HOMME**

par

E. PAYS (U.L.B.), membre titulaire

**1. Introduction**

Le trypanosome africain (prototype : *Trypanosoma brucei brucei*) est un protozoaire flagellé véhiculé par des diptères communément appelés mouches tsé-tsé, et capable d'infecter de nombreux mammifères suite au repas sanguin pris sur ces mammifères par des mouches infectées. Ce parasite est un véritable fléau pour l'Afrique, car il est responsable d'une maladie sévère appelée nagana, qui décime le bétail et prive donc le continent d'une source importante de nourriture et d'aide à l'agriculture. Étonnamment, *T. b. brucei* est inoffensif pour l'homme, car le sérum humain contient un facteur, appelé facteur trypanolytique, capable de tuer très efficacement le parasite. Cette caractéristique est partagée par quelques grands singes africains, dont le gorille, et reflète vraisemblablement la sélection évolutive nécessaire d'un système d'immunité innée pour échapper à un important parasite endémique. En réponse à cette défense, deux clones de *T. b. brucei*, présentés comme des sous-espèces, *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*, ont appris à résister au facteur trypanolytique et sont donc capables d'infecter l'homme. C'est ainsi que *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense* provoquent la maladie du sommeil, respectivement en Afrique orientale et occidentale. Encore aujourd'hui, plusieurs dizaines de milliers de personnes meurent chaque année de cette maladie.

**2. Identification du facteur trypanolytique humain (références 1, 2)**

La nature du facteur trypanolytique a été intensivement recherchée et c'est par une approche indirecte que cette question a finalement été résolue. En 1998 nous avons montré que la résistance de *T. b. rhodesiense* était assurée par une protéine appelée SRA (pour « Serum Resistance-Associated »), dérivée d'un antigène majeur de surface du parasite appelé VSG (pour « Variant Surface Glycoprotein »), suite à la délétion de boucles peptidiques normalement exposées par cet antigène. La simple insertion du gène de SRA dans le génome de *T. b. brucei* suffit à transformer le parasite en pathogène potentiel pour l'homme, démontrant que SRA seul permet au trypanosome de résister au facteur trypanolytique du sérum humain. L'analyse effectuée sur le mécanisme de cette résistance nous a permis de conclure que SRA neutralisait le facteur trypanolytique par interaction forte avec ce facteur. L'utilisation de la protéine SRA recombinante pour purifier le facteur a conduit à identifier ce dernier comme étant l'apolipoprotéine

L1 (apoL1), une protéine de fonction inconnue mais associée à une sous-fraction des HDLs du sang humain.

### 3. Mécanisme de trypanolyse (références 2-5)

En accord avec les propriétés du sérum humain, la protéine apoL1 recombinante s'est avérée capable de tuer efficacement *T. b. brucei*, mais non *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense* ou des lignées transgéniques de *T. b. brucei* exprimant SRA. De plus, le phénotype de la trypanolyse par l'apoL1 est apparu identique à celui observé avec le sérum humain : dans les deux cas le parasite manifeste un gonflement progressif et considérable du lysosome. Le mécanisme sous-jacent à cet effet a pu être décortiqué. L'apoL1 possède un domaine capable de former des pores ioniques dans diverses membranes cellulaires. Suite à son internalisation avec les particules d'HDL, l'apoL1 est dirigée vers la membrane du lysosome où le domaine formateur de pores s'insère pour déclencher un passage incontrôlable d'ions chlorure depuis le cytoplasme vers le lysosome du parasite. Etant donné que ce flux ionique s'accompagne d'un transport d'eau, le lysosome subit un gonflement osmotique continu jusqu'à la mort de la cellule.

Le mécanisme par lequel les particules d'HDL porteuses d'apoL1 sont avidement capturées par le trypanosome a également été élucidé. En plus de l'apoL1, les particules d'HDL trypanolytiques contiennent une autre protéine spécifiquement humaine, qui résulte de la duplication du gène de l'haptoglobine (Hp) et est très similaire à cette protéine (« Haptoglobin-related protein » ou Hpr). Comme l'Hp, Hpr forme un complexe avec l'hémoglobine (Hb). Nous avons découvert que *T. brucei* possède un récepteur de surface de haute affinité pour le complexe Hp-Hb, de manière à capturer efficacement la molécule d'hème contenue dans l'Hb. L'acquisition de l'hème permet à *T. brucei* d'alimenter des hémoprotéines qui lui confèrent une certaine résistance au stress oxydatif des macrophages. Or, le récepteur Hp-Hb du trypanosome ne discrimine pas du tout entre les complexes Hp-Hb et Hpr-Hb. Par conséquent, la présence d'Hpr-Hb dans les particules d'HDL trypanolytiques entraîne leur fixation rapide au récepteur du parasite, suivie de leur internalisation par endocytose. C'est ainsi que l'apoL1 est efficacement ciblée vers le lysosome par le parasite lui-même.

### 4. Mécanismes de résistance parasitaire au facteur trypanolytique (références 1,2,4,6)

Dans le cas de *T. b. rhodesiense*, le mécanisme d'adaptation à l'homme est extrêmement simple : ce parasite a construit un antidote (SRA) pour inhiber la toxicité de l'apoL1 par interaction directe avec cette protéine. On a pu aisément reconstituer le processus ayant conduit à l'apparition de SRA. En effet, SRA n'est rien d'autre qu'une forme de VSG tronquée suite à la délétion d'un fragment du gène. Le gène de SRA est d'ailleurs présent à proximité du gène de VSG dans une même unité de transcription polygénique, appelée site d'expression VSG. Le trypanosome possède une vingtaine de sites d'expression de

ce type, mais un seul de ces sites est transcrit à tout moment et le choix de l'unique site actif change au cours du temps. SRA n'est présent que dans un seul des sites d'expression VSG. Par conséquent, en présence de sérum humain, le parasite est forcé d'utiliser en permanence un seul de ses multiples sites d'expression VSG pour transcrire le gène de VSG, car la nécessité d'exprimer SRA pour survivre lui impose de sélectionner le site qui contient le gène SRA. Etant donné que les sites d'expression VSG sont le siège de multiples et fréquentes recombinaisons de l'ADN de façon à assurer une variation continue des antigènes de surface, des accidents du type de celui observé dans le gène SRA, c'est-à-dire la délétion d'un fragment d'ADN, ne sont pas rares. On peut donc supposer que SRA résulte d'un accident de recombinaison lors du processus de variation antigénique, et que l'avantage conféré par l'expression du gène accidenté a conduit à sa sélection à côté du gène de VSG normal. Le VSG anormal codé par le gène SRA n'étant plus capable de fonctionner comme antigène de surface, est envoyé vers le lysosome pour dégradation. C'est donc par une différence radicale du processus de trafic intracellulaire par rapport à celui du VSG que SRA peut rencontrer l'apoL1, qui pénètre dans le parasite par endocytose et est également dirigé vers le lysosome. Les deux protéines s'associent donc dans le compartiment endocyttaire du parasite par des voies différentes.

Connaissant les détails moléculaires de l'interaction entre SRA et l'apoL1, nous avons construit au laboratoire des mutants de l'apoL1 incapables d'interagir avec SRA. Comme attendu, n'étant plus neutralisés par SRA, ces mutants d'apoL1 parviennent à tuer efficacement *T. b. rhodesiense*. Notre recherche a donc permis le développement d'un nouvel outil thérapeutique pour tuer un pathogène humain.

Étant donné son rôle capital dans l'adaptation du parasite à l'homme, SRA peut être considérée comme le marqueur spécifique de *T. b. rhodesiense*. Il n'est donc pas surprenant que cette protéine soit devenue l'outil absolu de diagnostic de ce parasite. Jusqu'ici il semble que SRA soit la seule différence moléculaire distinguant *T. b. rhodesiense* de *T. b. brucei*.

En ce qui concerne *T. b. gambiense*, le mécanisme de résistance apparaît complètement différent de celui utilisé par *T. b. rhodesiense*. En effet, chez *T. b. gambiense*, SRA est totalement absente. De plus, la résistance de *T. b. gambiense* au sérum humain est constitutive, tandis que chez *T. b. rhodesiense*, l'expression de SRA nécessite l'activation transcriptionnelle d'un site d'expression VSG particulier parmi vingt candidats, et impose donc une sélection parmi les trypanosomes. Jusqu'ici le mécanisme à l'œuvre chez *T. b. gambiense* n'est pas compris, mais nous avons récemment identifié la protéine de *T. b. gambiense* responsable de la résistance. Ce travail est toujours en cours.

## **5. Evolution humaine pour contrecarrer la résistance du parasite (références 6-9)**

Chez l'homme et les grands singes africains, l'apparition de l'apoL1 a résulté de la duplication d'un gène présent dans une famille multigénique. Chez l'homme, la famille

des gènes apoL contient six membres, et chez d'autres mammifères ce nombre est très variable. L'événement-clé dans la génération de l'apoL1 a été l'addition en tête du gène d'une courte séquence codant pour un peptide signal permettant la sécrétion de la protéine dans le sérum. Chez l'homme ou d'autres mammifères, aucun autre membre de la famille des apoLs n'est connu pour être sécrété, et la fonction originelle des apoLs est donc intracellulaire. La similitude structurelle et fonctionnelle des apoLs avec les membres de la famille des protéines apoptotiques Bcl-2 nous a conduits à proposer que les apoLs contrôlent la mort cellulaire, particulièrement en conditions inflammatoires. L'originalité de l'homme a donc consisté à envoyer un membre de la famille des apoLs dans le sérum, où cette protéine peut rencontrer des parasites extracellulaires comme les trypanosomes africains et y exercer sa fonction liée à la mort cellulaire.

L'importance de l'apoL1 pour la résistance aux trypanosomes a été récemment illustrée par l'étude d'un patient indien trouvé sévèrement infecté par *Trypanosoma evansi*. Ce parasite est très proche de *T. b. brucei*, mais il est capable de croître en dehors de l'Afrique suite à son affranchissement de l'insecte vecteur. *T. evansi* est normalement trouvé uniquement dans le bétail où il provoque une maladie appelée surra. Nous avons découvert que le patient infecté par *T. evansi* était un mutant naturel dépourvu d'apoL1 suite à la présence de mutations ponctuelles invalidant les deux allèles du gène. L'apoL1 est donc absolument nécessaire pour résister aux trypanosomes apparentés à *T. brucei*, et il est vraisemblable qu'en Inde de nombreuses personnes en contact avec le bétail soient en risque de contracter la trypanosomiase parce qu'elles seraient dépourvues d'apoL1 suite à des mutations du gène.

Sur le continent africain, le gène de l'apoL1 a connu une évolution particulièrement intéressante. A notre grande surprise, nous avons découvert que des mutants naturels de l'apoL1, similaires à ceux que nous avons générés au laboratoire pour tuer *T. b. rhodesiense*, ont bel et bien été sélectionnés en Afrique. Même à l'état hétérozygote, ces mutants confèrent la protection de l'homme contre le parasite. Cependant, à l'état homozygote ces mutations sont associées à un haut risque de développer l'insuffisance rénale terminale. La fréquence élevée des mutants d'apoL1 chez les Américains d'origine africaine récente semble suffisante pour expliquer la forte probabilité de cette population à développer la maladie rénale. Il semble donc qu'avec l'âge, la présence des mutants de l'apoL1 entraîne une dégénérescence progressive des reins. Les raisons de ce processus sont maintenant à l'étude.

Au vu de ces observations, il semblerait que l'avantage sélectif procuré par la présence des mutations de l'apoL1 (résistance à *T. b. rhodesiense*) ait été supérieur au problème progressivement causé aux reins (insuffisance terminale). Cette situation ressemble étonnamment à la sélection de mutants d'Hb provoquant l'anémie falciforme à l'état homozygote. A l'état hétérozygote ou homozygote, ces mutants permettent en effet à l'homme de résister à la malaria, une autre maladie parasitaire du continent africain, due au protozoaire *Plasmodium*.

## 6. Perspectives

L'étude du facteur trypanolytique du sérum humain a permis de découvrir le dynamisme étonnant du dialogue moléculaire entre homme et parasite : suite à l'invention de l'apoL1, deux variants du parasite sont parvenus à échapper à cette défense, mais de nombreux humains ont déjà acquis des mutations dans le gène de l'apoL1 qui leur permettent de se protéger d'au moins un de ces deux variants. On ignore si des mutations naturelles de l'apoL1 permettent aussi à certaines personnes de résister à *T. b. gambiense*, mais nous savons que ceci est possible, car au laboratoire nous avons généré des formes d'apoL qui tuent tous les trypanosomes africains, y compris *T. b. gambiense*. En principe, du bétail transgénique exprimant ces formes d'apoL devrait être complètement résistant aux trypanosomes en zones d'endémie. Il n'est pas besoin de souligner le bénéfice considérable que l'Afrique pourrait retirer de cette perspective. Outre l'apport énorme en termes de nutrition et de facilitation de l'agriculture, un tel cheptel serait aussi capable de bloquer efficacement la transmission des parasites à l'homme.

## RÉSUMÉ

L'origine évolutive de l'homme sur le continent africain lui a imposé la nécessité de résister aux parasites endémiques, en particulier les trypanosomes de l'espèce *Trypanosoma brucei*. C'est pourquoi le sérum humain est pourvu d'un système d'immunité innée très efficace contre *T. brucei*, ainsi que l'a observé A. Laveran dès 1902. Cependant deux clones de *T. brucei*, nommés *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*, sont parvenus à déjouer cette défense, ce qui leur permet d'infecter l'homme où ils provoquent la maladie du sommeil. Nous avons identifié le gène conférant à *T. b. rhodesiense* la capacité de résister à l'activité trypanolytique du sérum humain, ce qui nous a conduits à découvrir que le facteur trypanolytique est l'apolipoprotéine L1 (apoL1). Cette protéine sérique spécifiquement humaine est associée à des particules d'HDL qui contiennent aussi une autre protéine humaine appelée « haptoglobine-related protein » (Hpr). Suite à la fixation d'hémoglobine (Hb) sur l'Hpr, les particules d'HDL porteuses d'apoL1 sont avidement capturées par le trypanosome via leur attachement à un récepteur de surface pour le complexe Hpr-Hb. Après endocytose, l'apoL1 tue le parasite en générant des canaux anioniques dans sa membrane lysosomiale. Au laboratoire, nous avons construit des mutants d'apoL1 qui ne sont plus neutralisés par la protéine de résistance de *T. b. rhodesiense*, et qui donc tuent ce parasite. De façon inattendue, nous avons récemment découvert que des mutants similaires existent dans la nature : chez des Africains et Américains d'origine africaine, ces mutations protègent contre l'infection par *T. b. rhodesiense* même à l'état hétérozygote, mais le prix à payer est une fréquence particulièrement élevée de développement d'insuffisance rénale à l'état homozygote. La sélection naturelle des mutations de l'apoL1, en dépit de leur caractère délétère pour les reins, souligne à quel point la lutte contre les trypanosomes a été importante pour l'évolution de l'espèce humaine. Le mécanisme par lequel l'apoL1 mutée provoque l'insuffisance rénale est à l'étude.

## SUMMARY

The evolutionary origin of Man in the African continent has imposed the requirement to resist endemic parasites, in particular African trypanosomes (prototype: *Trypanosoma brucei*). Therefore, human serum is provided with an efficient system of innate immunity against these parasites, as discovered by A. Laveran in 1902. However, two *T. brucei* clones, termed *T. b. rhodesiense* and *T. b. gambiense*, managed to escape this immunity system, enabling them to grow in humans where they cause sleeping sickness. We have identified the gene allowing *T. b. rhodesiense* to resist trypanolysis by human serum, which led

us to discover that the trypanolytic factor is apolipoprotein L1 (apoL1). ApoL1 is a human-specific serum protein bound to HDL particles that also contain another human-specific protein termed « haptoglobin-related protein » (Hpr). Following the binding of hemoglobin (Hb) to Hpr, the apoL1-bearing HDL particles are avidly taken up by the trypanosome through their binding to a parasite surface receptor for the Hp-Hb complex. After endocytosis apoL1 kills the parasite by generating anionic pores in the lysosomal membrane. In our laboratory, mutant versions of apoL1 have been constructed, which are no longer neutralized by the resistance protein of *T. b. rhodesiense* and are therefore able to kill this human pathogen. Unexpectedly, we have recently discovered that similar mutants do actually exist in nature : in Africans and Americans of recent African origin, even a single allele of these mutants allows protection against infection by *T. b. rhodesiense*, but the price to pay is a high frequency of end-stage renal disease when doubly allelic. The evidence of natural selection of these apoL1 mutations despite their deleterious potential for kidneys highlights the importance of the resistance to trypanosomes in the evolution of Man. The mechanism by which mutant apoL1 triggers end-stage renal disease is currently studied.

## BIBLIOGRAPHIE

1. XONG H.V., VANHAMME L., CHAMECK M., CHIMFWEMBE C.E., VAN DEN ABEELE J., PAYS A., VAN MEIRVENNE N., HAMERS R., DE BAETSELIER P., PAYS E., *A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in Trypanosoma rhodesiense*, Cell 95 : 839-46, 1998.
2. VANHAMME L., PATURIAUX-HANOCQ F., POELVOORDE P., NOLAN D.P., LINS L., VAN DEN ABEELE J., PAYS A., TEBABI P., XONG H.V., JACQUET A., MOGUILLEVSKY N., DIEU M., KANE J.P., DE BAETSELIER P., BRASSEUR R., PAYS E., *Apolipoprotein L-1 is the trypanosome lytic factor of human serum*, Nature 422 :83-7, 2003.
3. PEREZ-MORGA D., VANHOLLEBEKE B., PATURIAUX-HANOCQ F., NOLAN D.P., LINS L., HOMBLE F., VANHAMME L., TEBABI P., PAYS A., POELVOORDE P., JACQUET A., BRASSEUR R., PAYS E., *Apolipoprotein L-1 promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes*, Science 309 :469-72, 2005.
4. PAYS E., VANHOLLEBEKE B., VANHAMME L., PATURIAUX-HANOCQ F., NOLAN D.P., PEREZ-MORGA D., *The trypanolytic factor of human serum*, Nature Reviews Microbiol. 4 :477-86, 2006.
5. VANHOLLEBEKE B., DEMUYLDER G., NIELSEN M.J., PAYS A., TEBABI P., DIEU M., RAES M., MOESTRUP S.K., PAYS E., *A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to Trypanosoma brucei in humans*, Science 320 :677-81, 2008.
6. LECORDIER L., VANHOLLEBEKE B., POELVOORDE P., TEBABI P., ANDRIS F., LINS L., PAYS E., *C-terminal mutants of apolipoprotein L-1 efficiently kill both Trypanosoma brucei brucei and Trypanosoma brucei rhodesiense*, PLoS Pathog. 5 :e1000685, 2009.
7. VANHOLLEBEKE B., PAYS E., *The function of apolipoproteins L*. Cell., Mol. Life Sci. 63 :1937-44, 2006.
8. VANHOLLEBEKE B., TRUC P., POELVOORDE P., PAYS A., JOSHI P.P., KATTI R., JANNIN J.G., PAYS E., *Human Trypanosoma evansi infection linked to a lack of apolipoprotein L-1*, New Engl. J. Med. 355 :2752-6, 2006.
9. GENOVESE G., FRIEDMAN D.J., ROSS M.D., LECORDIER L., UZUREAU P., FREEDMAN B.I., BOWDEN D.W., LANGFELD C.D., OLEKSYK T.K., KNOB A.U., BERNHARDY A., HICKS P.J., APPEL G.B., NELSON G.W., VANHOLLEBEKE B., WINKLER C.A., KOPP J.B., PAYS E., POLLAK M.R., *Association of trypanolytic apoL1 variants with kidney disease in African-Americans*, Science 329 :841-5, 2010.

(Laboratoire de Parasitologie moléculaire – IBMM – U.L.B.).

\*  
\* \*

## Discussion

*M. Y. Carlier.* – A-t-on une idée du timing de l'apparition du terme évolutif de la résistance à *T.b. rhodesiense* ?

*M. E. Pays.* – Certainement très récent, mais je ne me risquerais pas à donner plus de précisions.

*M. J.E. Dumont.* – Superbe histoire. Félicitations. Deux questions : Apol 1 est-il exprimé dans le rein ? Quel est le rôle de Apol 1 dans HDL ?

*M. E. Pays.* – L'apoL1 est notamment exprimée dans les podocytes. Quant à son association aux HDL, elle est vraisemblablement liée à l'interaction fonctionnelle probable des apoLs avec des lipides, car ces protéines semblent jouer un rôle dans l'autophagie, qui n'est rien d'autre que la génération de membranes lipidiques.

*M. Y. Pirson.* – Vous avez en partie répondu à ma question en parlant de l'utilisation éventuelle d'Apol 1 recombinante. En tant que néphrologue, je suis bien sûr très intéressé par votre observation du rôle défavorable de ce mutant de l'Apol 1 sur la progression de l'insuffisance rénale chronique. Sachant que ce rôle a été mis en évidence dans des cohortes de patients ayant des néphropathies très diverses (vasculaire, HIV, diabétique), son élucidation pourrait déboucher sur une riposte thérapeutique valable pour de très nombreux patients atteints de néphropathies progressant vers le stade terminal, et, partant, avoir un impact significatif en santé publique. Comment voyez-vous la suite des études dans ce domaine ?

*M. E. Pays.* – S'il s'avérait que la maladie résulte des mutations dans la forme sérique de l'Apol1, on pourrait envisager une thérapie basée sur l'injection d'apoL1 recombinante non mutée, car la maladie requiert la présence de deux allèles mutés et est donc récessive.

*M. F. Lemaigre.* – Comment se fait-il que le récepteur au Hpr ne suscite pas de réaction immunitaire chez l'hôte ?

*M. E. Pays.* – Cette question s'applique à tous les récepteurs de surface du parasite. Le trypanosome arrive à protéger tous ses récepteurs contre la réaction immunitaire de l'hôte. Une des stratégies utilisées est la séquestration des récepteurs dans un repli membranaire inaccessible aux cellules du système immunitaire. Pour le récepteur de la transferrine, nous avons décrit une certaine forme de variation antigénique liée à celle du VSG, l'antigène variable principal. Pour le récepteur Hp-Hb, nous n'en savons pas plus.

*M. J.-J. Vanderhaeghen.* – Félicitations. Votre travail est fantastique. Y-a-t-il une biochimie connue expliquant l'atteinte sélective des centres du sommeil du cerveau par le trypanosome ?

*M. E. Pays.* – À ma connaissance, le ciblage intracérébral du trypanosome n'est pas spécifique. Les troubles du sommeil ne représentent pas la seule pathologie de la phase terminale de la maladie du sommeil.



*M. G. Casimir.* – Vous avez montré l'importance de la sécrétion de l'Apo1. Existe-t-il d'autres exemples de sécrétions de protéines endoplasmiques et quel est le mécanisme de ce processus ?

*M. E. Pays.* – A ma connaissance, la présence d'un peptide hydrophobe N-terminal est suffisante pour convertir une protéine cytoplasmique en protéine sécrétée. Concernant l'apoL1 l'acquisition de ce peptide s'est produite lors d'une duplication récente d'un gène d'apoL.

*M. M. Lamy.* – Grand merci pour votre exposé que j'ai trouvé prodigieux ! J'aimerais savoir si la formation de pores ioniques par les Apo1 et les Bcl-2 intervient dans le processus de mort cellulaire programmée.

*M. E. Pays.* – Bien que les protéines Bcl-2 soient bien connues pour contrôler la mort cellulaire et soient énormément étudiées, je ne pense pas que leur capacité à générer des pores ioniques ait été mise en relation claire avec leur fonction biologique. Ces protéines créent des mégapores qui assurent le passage de macromolécules à travers des membranes intracellulaires (comme le passage de cytochrome C à travers la membrane mitochondriale), mais la formation de ces mégapores dépend de l'oligomérisation des protéines, et leur relation éventuelle avec les pores ioniques n'est pas évidente.

\*

\* \*

## Présentation d'ouvrage

La parole est ensuite donnée à M. le Pr S. Louryan pour une présentation d'ouvrage intitulée : « Imagerie des méninges », sous la direction de Stéphane Louryan et Marc Lemort. (Montpellier, 2010, Sauramps médical, 145 pages). L'ouvrage correspond aux textes du 23<sup>e</sup> cours d'imagerie du Pont d'Oye (Habay-la-Neuve, Belgique), sous l'égide du Collège d'Enseignement Post-Universitaire de Radiologie (CEPUR).

Il s'exprime en ces termes : « Le thème peut paraître inhabituel. Cependant, il s'inscrit bien dans le cadre devenu classique de cet enseignement : le sujet abordé est transdisciplinaire, n'est pas directement lié à une méthode particulière d'exploration et permet d'aborder des pathologies de diverses natures.

En consultant la littérature, on constate vite que peu de synthèses sont consacrées aux méninges, et que les notions véhiculées à leur propos sont parfois confuses, et de temps à autre obsolètes. Il est donc probable que le présent opuscule réponde à un certain nombre de questions que se posent ses lecteurs potentiels, praticiens hospitaliers mais aussi radiologistes domiciliaires.

Après un survol anatomique et embryologique, agrémenté par des notions d'anatomie comparée, les diverses familles de pathologies sont successivement abordées, comme les méningites, les tumeurs primitives ou secondaires, les lésions traumatiques, les anomalies vasculaires, sans oublier les techniques modernes d'exploration du liquide cérébro-spinal et de son transit ».

\*  
\* \*

Le Secrétaire perpétuel prononce son discours d'entrée : « Monsieur le premier Vice-président, chères Collègues, chers Collègues, je vous remercie de m'avoir confié le mandat prestigieux de Secrétaire perpétuel pour cinq ans, mais avec la prise en charge d'une matière qui reste en perpétuel traitement.

Mon premier contact avec l'Académie date de 1997, lorsque M. Ch. van Ypersele me demande de présenter un travail à cette Compagnie – j'étais déjà Chef de service, mais je n'avais jamais entendu parler de l'Académie dans mon milieu professionnel – j'en avais par contre entendu parler dans des réunions de famille, où comme junior j'ouvrais mes oreilles aux récits des parents et des oncles et tantes. J'ai alors été accepté parmi vous en 2000, puis j'ai été admis au Bureau suite à un appel de M. Th. de Barys, avec à la barre un grand Président, M. L. Hue, qui a stimulé mon intérêt pour les activités de l'Académie, et qui m'a mené confortablement à l'élection à ce poste.

J'ai alors bénéficié, et je bénéficie encore, de la guidance de M. J. Frühling, dont je ne ferai qu'un éloge limité ce jour, une séance d'hommage lui étant réservée le 28 avril 2012. Personnellement, je lui suis reconnaissant de m'avoir confié une Compagnie en ordre parfait, avec une transmission des devoirs qui se fait avec ouverture et transparence. M. J. Frühling connaît la Compagnie mieux que sa poche, il y a mis toute son énergie, et je crains l'amputer de quelques fibres de son cœur.

Je prends un train en marche, avec des projets ambitieux qui devraient mener à une meilleure visibilité de l'Académie pour nos responsables politiques, pour la jeunesse, et pour le monde médical au sens large. Dans cet ordre d'idées, le renouvellement du site internet et de la bureautique sont en vue. Vous aurez compris que ces projets sont initiés par le Bureau sortant. J'espère que la réforme des Statuts améliorera encore la représentativité de nos pairs au sein de l'Académie.

*In fine*, comme organe indépendant de consultation et d'enseignement, nous devrions avoir l'occasion d'avoir plus d'impact dans les débats de société qui impliquent les sciences médicales et la promotion de ces sciences.

Pour ceci j'espère, avec notre coordinateur administratif, M. Buchet, une collaboration et une disponibilité de vous tous, même si cette disponibilité est mise à mal par des occupations scientifiques et cliniques, le poids desquelles pèse manifestement plus dans une carrière que l'appartenance à l'Académie.

Pour ma part, je réserverai une large partie de mes disponibilités à cette Académie, et je termine cette allocution par une citation de Winston Churchill : *On vit de ce que l'on obtient, on construit sa vie sur ce que l'on donne.*

Je vous remercie de votre attention.

\*  
\* \*

Aux communications du Bureau, le Secrétaire perpétuel annonce deux Prix qui nous ont été transmis par le F.N.R.S., notamment :

- L'annonce par M<sup>me</sup> le Dr Ir. V. Halloin, Secrétaire générale du F.R.S. – F.N.R.S. du « Prix SCIBB 2012 » récompensant une thèse de doctorat portant sur une étude originale concernant de nouveaux aspects, concepts et/ou applications dans le domaine des industries chimiques. Prix d'un montant de 4.000 euros. Les candidatures doivent parvenir au FNRS pour le 1<sup>er</sup> mars 2012.
- de même, l'annonce des « Prix Lambertine Lacroix 2012 » récompensant deux chercheurs : l'un pour son travail de recherches cliniques en cancérologie ; l'autre pour son travail de recherche clinique sur les affections cardio-vasculaires. Le montant de chaque Prix est de 15.000 euros. Candidatures à faire parvenir au FNRS pour le 1<sup>er</sup> mars 2012.

Il annonce ensuite la parution du numéro 10-11-12 du volume 165/Année 2010 qui a été envoyé précédemment aux membres et est soumis à l'approbation de l'Assemblée, qui l'approuve.

Il mentionne la publication éventuelle des « Proceedings of the Belgian Royal Academies of Medicine », en collaboration avec la K.A.G.B.

\*  
\* \*



Séance publique du 26 novembre 2011

---



## SÉANCE PUBLIQUE DU 26 NOVEMBRE 2011

---

Au Bureau : M. P.-P. Pastoret, Président ; MM. A. Ferrant, Secrétaire perpétuel et W.J. Malaisse premier vice-président.

Sont présents :

MM. Ch. Chalant, T. Godfraind, P.-J. Kestens, P. Vanderhoeft, J.-J. Vanderhaeghen, A. Dresse, M. Wéry, membres honoraires ;

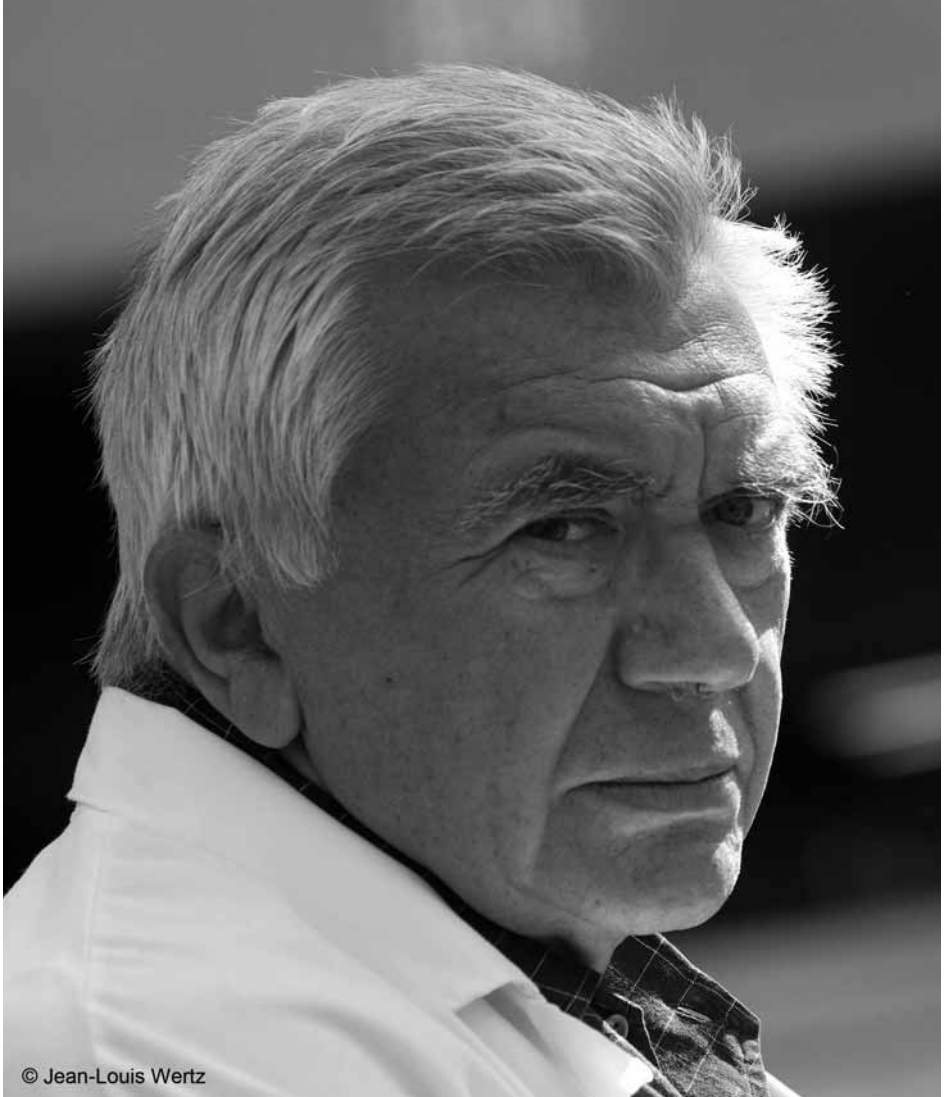
MM. M. Lamy, J. Brotchi, L. Angenot, G. Rousseau, J. Fissette, M. Goldman, J. Frühling, J. Boniver, J.-C. Schoevaerds, L. Hue, J.-M. Boeynaems, L. Delattre, J.-F. Beckers, J. Melin, B. Van den Eynde, P. Van Cangh, M<sup>me</sup> D. Balériaux, MM. J. Nève, J.-C. Henquin, A. Scheen, J.-L. Balligand, M<sup>me</sup> Fr. Meunier, membres titulaires ;

MM. R. Vanwijck, J.-O. Defraigne, D. Lison, S. Louryan, E. Sokal, M<sup>me</sup> J. Fontaine, MM. A. Albert, P. Maquet, B. Lengelé, Ch. Delloye, P. Gianello, G. Casimir, P. Coulie, M<sup>me</sup> A. Noël, MM. O. Feron, M. Hamoir, R. Reding, membres ordinaires.

\*  
\* \*

MM. E.H. Betz, J. Bonnal, L. Molle, P. Dumont, A. Govaerts, J. van der Stricht, M. Abramow, Ch. van Ypersele de Strihou, P. Lefèbvre, membres honoraires ; J.-B. Otte, G. Fillet, U. Gaspard, Th. de Barys, G. Rorive, M<sup>me</sup> F. Portaels, Y. Pirson, membres titulaires ; J. Crommen, J.-C. Pector, Y. Carlier, J. Klustersky, D. Giet, M<sup>me</sup> I. Salmon, membres ordinaires, ont exprimé leurs regrets de ne pouvoir assister à la séance.

\*  
\* \*



Professeur Raymond LIMET  
(1943-2011)



L'éloge académique du regretté Confrère le Professeur Raymond Limet, membre titulaire, est prononcé par le Professeur A. Albert, membre ordinaire.

## ÉLOGE ACADÉMIQUE DU PROFESSEUR R. LIMET

par

A. ALBERT, membre ordinaire

Monsieur le Président,  
Monsieur le Secrétaire perpétuel,  
Madame, Mesdames et Messieurs,  
Chers Collègues,

Raymond Limet, membre titulaire de notre Compagnie, est décédé le mercredi 15 juin 2011. Il n'avait que soixante-huit ans. Professeur émérite de chirurgie cardio-vasculaire et thoracique à l'Université de Liège, il a marqué de son empreinte la discipline chirurgicale liégeoise, belge et internationale. Avec cette disparition, l'Académie royale de Médecine de Belgique perd l'un de ses membres les plus éminents et les plus fidèles.

Raymond Limet est né le 9 mars 1943 à Flémalle dans cette vallée industrielle de la Meuse, fleuron de la sidérurgie et de la métallurgie wallonne qui fit le renom de notre pays et qui connaît aujourd'hui les difficultés de la crise internationale. Issu d'une famille modeste d'artisans, il affectionnait particulièrement son terroir où la vie quotidienne était dure et exigeante, ce qui le marqua pour le reste de sa vie. Il perd son père très jeune, poussant sa maman, pour laquelle il garda toute sa vie une admiration sans bornes, à venir s'installer au centre de Liège.

Après de brillantes humanités classiques au Collège Saint-Servais de Liège, il entreprend des études de médecine à l'Université de Liège. Particulièrement doué, il est dès le début de ses candidatures enrôlé comme élève-assistant dans le service de physiologie du Professeur Jean Lecomte qui le marqua par sa rigueur méthodologique et son intégrité scientifique. Il poursuivit d'ailleurs durant plusieurs années ses activités de recherche en collaboration avec le laboratoire du Professeur Lecomte, s'intéressant surtout au système orthosympathique.

Il est proclamé Docteur en Médecine en 1968 avec la plus grande distinction et poursuit alors une spécialisation en chirurgie, après avoir pensé à s'orienter vers la psychiatrie, domaine émergent à l'époque. Raymond Limet avait perçu dès le début de sa spécialisation les potentialités énormes de la chirurgie cardiaque, discipline qui connaissait un développement spectaculaire grâce à l'audace de certains chirurgiens, à l'émergence de nouvelles techniques opératoires conjuguées à des avancées scientifiques déterminantes.

Comme le relève son ami, le Professeur Raphaël Suy (K.U. Leuven), dans son article « A history of cardiac surgery in Belgium », l'Ecole liégeoise de chirurgie avait connu des heures de gloire jusqu'en 1963, notamment avec les Professeurs Louis Christophe, David Honoré, Jacques Dalem et Jacques Fourny. Cette équipe réalisait la première excision de coarctation aortique suivie d'une anastomose bout à bout en 1951. L'équipe bénéficia aussi largement de l'aide de la Fondation cardiaque « Princesse Liliane », notamment pour l'introduction de l'hypothermie et de la circulation extra-corporelle en chirurgie à cœur ouvert.

Elève du Professeur David Honoré, Raymond Limet fut envoyé par ce dernier au Baylor College of Medicine de Houston (Texas) dans le service du célèbre Professeur Michael E. DeBakey pour y poursuivre sa spécialisation. Il y travailla une première année, de 1969 à 1970, en laboratoire comme « Research Associate » et ensuite y retourna une seconde année en clinique, de 1973 à 1974, comme « Clinical Fellow » afin de s'aguerrir aux nouvelles techniques de chirurgie cardiaque. Agréé entre-temps spécialiste en chirurgie générale à l'Université de Liège, il poursuivit son expérience nord-américaine à l'Institut de Cardiologie de Montréal où, durant un an, de 1974 à 1975, il travailla dans le service de chirurgie thoracique des Professeurs Pierre et Claude Grondin avec lesquels il se lia d'amitié.

Fort de sa formation dans les grands centres de chirurgie cardiaque Outre-Atlantique, et de retour au pays, il défendit sa thèse de doctorat en sciences biomédicales expérimentales intitulée « *Mise en évidence d'un contrôle réflexe de la circulation coronaire* », thématique qu'il avait initiée dans le service du Professeur Lecomte. Quatre ans plus tard, il soutint sa thèse d'Agrégation de l'Enseignement Supérieur sur « *L'angine de Prinzmetal* », angor provoqué par un trouble de l'innervation des vaisseaux coronaires.

On peut affirmer que c'est dans les années 70, sous l'impulsion du Professeur David Honoré et de son jeune chargé de cours associé Raymond Limet, que la chirurgie cardiaque liégeoise retrouva son lustre d'antan. Le 3 mai 1976, avec l'aide des frères Grondin de Montréal, Raymond Limet, alors âgé de trente-trois, réalise le premier pontage aorto-coronaire, ouvrant ainsi à la population liégeoise des possibilités de traitements chirurgicaux lourds et spécialisés qui les obligeaient auparavant à se déplacer à Bruxelles ou à l'étranger. Une nouvelle étape est franchie le 9 février 1983 avec la première greffe cardiaque à Liège, ce qui resta pour lui le moment marquant de sa carrière clinique. Il allait avoir quarante ans. Toutefois, Raymond Limet estimait que « la médecine n'est pas une épreuve d'athlétisme avec des records à battre. Ce serait malsain de se profiler en fonction de ses prouesses ! » Il n'empêche qu'aujourd'hui plus de 30.000 patients ont été opérés dans le service de chirurgie cardio-thoracique que dirigea Raymond Limet de 1983 à 2008 et qu'a repris notre Collègue Jean-Olivier Defraigne.

Tout au long de sa carrière académique, Raymond Limet n'a cessé de promouvoir des activités de recherche de haut niveau, notamment sur le rôle des radicaux libres en ischémie-reperfusion, l'étude des antioxydants, les effets préventifs des interventions

carotidiennes, l'action des antiagrégants plaquettaires sur la perméabilité des pontages aorto-coronaires, pour n'en citer que quelques-unes.

Son domaine de prédilection cependant fut toujours l'étude des anévrismes de l'aorte abdominale qui contribue encore aujourd'hui à la réputation du service, grâce aux travaux du Professeur Natzli Sakalihan. Après avoir analysé l'histoire naturelle de la croissance et du taux de rupture d'anévrisme de l'aorte abdominale chez les patients non opérés, ainsi que les facteurs génétiques prédisposant à cette affection, il s'est attaché à déterminer les concentrations des macromolécules dans la matrice extracellulaire aortique, en l'occurrence l'élastine et le collagène, et ce en collaboration avec notre regretté Collègue Charles Lapière et le Professeur Betty Nusgens. Parmi les enzymes susceptibles d'attaquer ces macromolécules, les métalloprotéases MMP2 et MMP9 ont été identifiées. Aujourd'hui ces études sur l'anévrisme de l'aorte abdominale se poursuivent avec succès grâce à l'utilisation des nouvelles techniques de l'imagerie médicale.

Ces travaux de recherche pour lesquels Raymond Limet a su s'entourer de collaborateurs fidèles et compétents, Jean-Olivier Defraigne, Guy Dekoster, Quentin Désiron, Etienne Creemers, Thierry Grenade, Philippe Kolh, Marc Radermecker, Natzli Sakalihan et Hendrick Van Damme, ont conduit à plus de 600 articles scientifiques, la plupart dans des revues prestigieuses. Parallèlement à ces recherches scientifiques, Raymond Limet et ses collaborateurs n'ont cessé de contribuer sous de multiples aspects à l'amélioration des techniques opératoires. Notons enfin qu'il redynamisa le CREDEC (Centre de Recherche Expérimentale du Département de Chirurgie) et qu'il présida durant plusieurs années aux destinées du centre de recherche multidisciplinaire « Hémoliège », regroupant physiologistes, chirurgiens et mathématiciens s'intéressant à la modélisation des circulations systémique et pulmonaire et à celle du couplage ventriculo-artériel.

Raymond Limet est aussi titulaire de nombreuses distinctions scientifiques et honorifiques, notamment celles de Commandeur de l'Ordre de la Couronne et d'Officier de l'Ordre du Mérite du Grand-Duché de Luxembourg. Il présida la Société royale belge de Chirurgie de 1996-1997 et la Société de Chirurgie vasculaire de langue française de 2002-2003, mais il fut aussi membre fondateur de la Société Belge de Chirurgie vasculaire et de la Société belge de Chirurgie cardio-thoracique. En 2002, Raymond Limet plébiscité par ses Collègues fut nommé Doyen de la Faculté de Médecine. Il me fit à l'époque le grand honneur de l'assister en qualité de Vice-Doyen dans cette mission. Il occupa cette fonction jusqu'en 2005. A ce moment et pour la première fois de sa carrière, il dut renoncer à un mandat pour des raisons de santé.

Le 27 juin 1992, Raymond Limet est invité à cette tribune de l'Académie royale de Médecine pour y faire une communication originale sur le thème « Détermination du taux d'expansion et de l'incidence de rupture des anévrismes de l'aorte abdominale ». Il est nommé membre correspondant de la troisième Section de la Compagnie la même année. En 1994, il donne une deuxième lecture devant les académiciens, intitulée « Le

rôle de la chirurgie carotidienne dans la prévention de l'infarctus cérébral ». Il devient membre titulaire de la Compagnie en 1997, peu de temps après la disparition en 1996 de son mentor liégeois, le Professeur David Honoré. Enfin, en 2008, à l'aube de sa retraite, il soumet une dernière communication à l'Académie, intitulée « Regards modernes sur une pathologie millénaire : les anévrysmes de l'aorte abdominale », une sorte de testament scientifique, médical et clinique que malheureusement la maladie qui le minait ne lui permit pas de présenter.

Malgré ses activités débordantes, Raymond Limet a toujours fait de la relation avec ses patients une priorité absolue. Ne répétait-il pas « Il faut écouter le patient » ? Sa simplicité et son contact chaleureux et réconfortant le rendaient adulé par sa nombreuse patientèle. Cette popularité fut consacrée peu avant son admission à la retraite par le prix populaire du « scientifique liégeois de l'année 2007 », prix dont il était très fier. Il fut admis à la retraite le 30 septembre 2008, trois mois à peine après le décès, à l'âge de 99 ans, de son maître, le Professeur DeBakey, et peu de temps avant la disparition de son autre maître, le Professeur Pierre Grondin. Malheureusement, si Raymond Limet avait une préoccupation quasi obsessionnelle pour ses patients, il ne trouva pas ou plutôt ne prit pas le temps de se soigner lui-même. Atteint de diabète, il dû endurer toutes les complications liées à cette maladie et celles-ci lui furent fatales à un âge où il aurait pu aspirer à une retraite heureuse et paisible.

Raymond Limet laissera le souvenir d'un éminent chirurgien, d'un scientifique créatif et justement ambitieux, d'un chef de service entreprenant et visionnaire, d'un médecin à l'écoute de ses patients. Liégeois dans l'âme, il aimait montrer à ses visiteurs étrangers la Meuse, ce fleuve qu'il considérait comme « le poumon, la clarté et le cœur de la Cité ardente ». Travailleur acharné, il méprisait l'oisiveté et la passivité. Dans les auditoriums de médecine, son entrée suffisait à taire le moindre chuchotement et imposait le respect, laissant aux milliers d'étudiants qu'il a formés le souvenir d'un de ces enseignants qui ont marqué le curriculum. Peu loquace, son verbe était précis et parfois virulent. D'un naturel autoritaire, Raymond Limet n'hésitait pas à « trancher dans le vif » et revenait rarement sur ses décisions, au risque de heurter parfois certains Collègues. Pourtant, au fond de lui-même, Raymond Limet, grand passionné de musique classique, d'histoire et de lecture, était un humaniste, un homme bon, humble, généreux et fidèle en amitié. Ses collaborateurs, ses Collègues et ses amis se rappelleront toujours le modeste bureau qu'il occupait au CHU et où il arborait fièrement, d'un côté la photo du Professeur DeBakey, et de l'autre, celle de sa maman.

A Anny, sa compagne, à ses filles Anne, Isabelle et Marjolaine, à son beau-fils Thierry, à sa petite-fille Louise, que sa mort prématurée empêcha de connaître et d'aimer, à ses proches collaborateurs déjà cités, à ses amis ici présents, l'Académie présente ses condoléances émues. Elle rend hommage à Raymond Limet, Confrère, Collègue et membre titulaire disparu.

\*  
\* \*

## Lectures

### I

## LA CRÉATION D'UNE TRANSPLANTATION TRACHÉALE VASCULARISÉE

par

P. DELAERE (K.U.L. – UZ Leuven)<sup>1</sup> (\*)

### RÉSUMÉ

Cette conférence porte sur l'élaboration d'un programme clinique fondé sur la recherche. Le problème clinique que nous avons choisi d'étudier a été transféré au laboratoire, où la faisabilité de la transplantation trachéale a été démontrée, et nous sommes parvenus à répercuter les résultats sur le patient. Nos études ont abouti au premier cas d'allo-transplantation trachéale vascularisée, qui a été publié cette année dans le « New England Journal of Medicine ». Nos travaux ont débuté en 1990 par l'identification d'anomalies laryngo-trachéales qui étaient impossibles à réparer. Nous sommes partis de l'hypothèse que la solution à la réparation problématique des anomalies laryngo-trachéales peut être trouvée dans la nécessité de disposer de tissus de réparation présentant les caractéristiques combinées d'irrigation sanguine, de support cartilagineux et de revêtement muqueux. Ces caractéristiques des tissus résident également dans les voies respiratoires d'origine. La trachée est composée d'une trachée cartilagineuse de forme convexe et d'une trachée membraneuse postérieure aplatie. La trachée membraneuse contient le muscle trachéal, qui a pour fonction d'éviter un prolapsus de la trachée membraneuse dans le chenal respiratoire. La trachée cartilagineuse, qui forme le chenal respiratoire est constituée d'anneaux cartilagineux incomplets. Les ligaments intercartilagineux sont nécessaires pour faire en sorte que le sang irrigue l'épithélium respiratoire. Le cartilage ne permet pas l'intégration des vaisseaux sanguins et est alimenté par diffusion à partir des vaisseaux sanguins environnants. Il s'agit de l'irrigation sanguine segmentaire de la trachée. Il est important de se rendre compte que les vaisseaux sanguins de la trachée sont trop petits pour l'anastomose microvasculaire, ce qui rend impossible la transplantation directe de la trachée avec une restauration de l'irrigation sanguine. Cet obstacle à la restauration de l'irrigation sanguine est un problème majeur. Nos travaux ont été axés sur des tentatives d'améliorer la vascularisation.

Le premier domaine que nous avons pu étudier a été le concept de l'autotransplantation trachéale. L'autotransplantation trachéale est basée sur la revascularisation orthotopique de la paroi trachéale. L'autotransplantation trachéale peut être introduite dans la

<sup>1</sup> Invité par le Bureau en vertu de l'article 15 §3 du Règlement.

situation clinique pour réparer l'anomalie après la résection de la tumeur des cordes vocales. Les quatre centimètres supérieurs de la trachée cartilagineuse peuvent être utilisés pour réparer l'anomalie après la revascularisation orthotopique à l'aide d'un lambeau de fascia. Le tissu optimal pour l'enveloppe trachéale est fourni par le lambeau de l'avant-bras radial qui peut être transplanté vers le cou sur l'artère et la veine radiales. Le fascia peut alors être enveloppé autour des quatre centimètres supérieurs de la trachée cartilagineuse, et les vaisseaux radiaux peuvent être suturés sur les vaisseaux du cou par microchirurgie.

Après deux semaines, le segment revascularisé de la trachée peut être utilisé pour restaurer l'anomalie laryngée complexe après ablation de la tumeur. L'autotransplantation trachéale s'est révélée possible sur le pédicule vasculaire nouvellement créé, qui est composé de l'artère et la veine radiales. Pour le moment, nous avons un groupe d'environ soixante patients qui ont subi une autotransplantation trachéale. Notre expérience en matière d'autotransplantation trachéale nous a conduits à effectuer des recherches dans le domaine de l'allogreffe trachéale. Notre laboratoire a mené des expérimentations dans le domaine de l'allogreffe trachéale. Nous avons découvert que les allogreffes trachéales pouvaient se revasculariser dans la position hétérotopique chez les lapins immunodéprimés. Dans l'allogreffe trachéale, le segment transplanté est complètement avasculaire, et une revascularisation dans la position hétérotopique sera dès lors nécessaire. La revascularisation en dehors des voies aériennes est garantie parce que l'immobilité de la transplantation est extrêmement importante. Avec de tels antécédents expérimentaux, nous étions prêts à franchir le pas de l'allogreffe trachéale clinique pour réparer les défauts trachéaux post-traumatiques de long segment. Le premier patient était une femme de cinquante-cinq ans qui avait été impliquée dans un accident de voiture vingt-cinq ans avant la présentation. Nous avons tenté de revasculariser une allogreffe trachéale de huit centimètres de long dans l'avant-bras de la receveuse. Toutefois, la trachée membraneuse a présenté une nécrose parce que le muscle trachéal n'a pas permis une revascularisation rapide de la muqueuse. La nécrose de la trachée membraneuse a été inattendue et s'est avérée être, à première vue, un événement décevant. Néanmoins, ce facteur est apparu comme une opportunité d'un retrait ultérieur de la médication immunosuppressive. De plus, la création d'une anomalie circonferentielle n'est pas nécessaire en cas de sténose d'un long segment. Après incision de la sténose, une partie postérieure demeure, de sorte que la transplantation de la trachée cartilagineuse est suffisante pour la restauration du chenal respiratoire. Ce concept de transplantation de la trachée cartilagineuse sera une opération sûre pour le patient et permettra de supprimer la médication immunosuppressive.

### **En conclusion**

Nos recherches sur la revascularisation trachéale ont conduit au concept d'autotransplantation et d'allogreffe trachéale vascularisées de la trachée cartilagineuse.

Ces nouvelles possibilités peuvent soulager les patients souffrant d'importantes anomalies du tractus laryngo-trachéal. Nos études actuelles portent sur la guérison après la suppression de la médication immunosuppressive et nous continuerons à communiquer objectivement sur cet aspect important.

### SUMMARY

Reconstruction of long-segment tracheal defects requires a vascularized allograft. We report successful tracheal allotransplantation after indirect revascularization of the graft in a heterotopic position. Immunosuppressive therapy was administered before the operation, and the allograft was wrapped in the recipient's forearm fascia. Once revascularization was achieved, the mucosal lining was replaced progressively with buccal mucosa from the recipient. At four months, the tracheal chimera was fully lined with mucosa, which consisted of respiratory epithelium from the donor and buccal mucosa from the recipient. After withdrawal of immunosuppressive therapy, the tracheal allograft was moved to its correct anatomical position with an intact blood supply. No treatment-limiting adverse effects occurred.

\*

\* \*

N.B. : Cette lecture a été publiée en langue anglaise in NEJM, 362, 2 January 14, 2010.  
Nous ne reproduisons que les résumés.

\*

\* \*

## Discussion

*M. M. Goldman.* – Congratulations for this nice presentation of impressive results. I am wondering whether your losses of allografts could be caused by chronic rejection elicited by the indirect pathway of allorecognition which can be triggered by recipient's endothelium. Did you look for biomarkers of anti-donor immune reactivity, specially did you monitor the possible development of anti-donor HLA antibodies ? My second question relates to the recent report on the use of stem cells for tracheal reconstruction. How do you consider this new approach ?

*M. P. Delaere.* – No, we didn't look for biomarkers. As to the tissue engineering approach : the main criticism is that the blood supply is not restored. We consider blood supply restoration as the most important factor in tracheal reconstruction and transplantation. I don't think avascular allotransplants and synthetic prosthesis soaked for some days in bone marrow cells will have a great future in tracheal replacement.

*M. P. Vanderhoeft.* – Interesting work on a difficult problem ! How do the patients breathe during the three-four months necessary to prepare the forearm transplant ? Does the absence of ciliary movements for clearing the new trachea cause stagnation ?

*M. P. Delaere.* – During allotransplant revascularization and prefabrication, the patients are functioning with an airway stent or with a tracheal cannula.

Respiratory epithelium is preferable because of its clearance capacity. An airway covered over a certain length with a buccal mucosal lining will not give major complications ; the patients will be able to clear these surfaces by coughing.

*M. B. Lengelé.* – Je souhaite d'abord vous féliciter pour ce magnifique travail et mettre en exergue pour les membres de la Compagnie l'intelligence et la subtilité technique de vos interventions menées sur des patients présentant des problèmes de la plus grande complexité. Votre présentation appelle deux questions : vous arrêtez le traitement immunosuppresseur lorsque l'épithélium tracheal du donneur est remplacé par une régénération épithéliale issue du receveur. Comment pouvez-vous évaluer cliniquement que ce remplacement s'est opéré complètement afin d'éviter le rejet du segment intermédiaire que vous avez observé chez certains de vos malades ? Vu cette incertitude, ne pensez-vous pas qu'alternativement à un arrêt complet de l'immunosuppression, il faudrait envisager une corticothérapie continue à basses doses, telle celle recommandée en allotransplantation de tissus composites pour éviter les rejets chroniques ?

*M. P. Delaere.* – At this time, our major research topic is to determine how to optimally withdraw the immunosuppressants without loss of airway lumen. This may be obtained with graft repopulation by recipient respiratory epithelium and recipient blood vessels at the anastomotic sites. The middle part of the transplant may keep its viability if we succeed in introducing recipient blood vessels into the submucosal space of the transplant in combination with full thickness buccal mucosa grafts. A slow and gradual withdrawal of immunosuppressants after one year seems to be possible.

\*

\* \*



## II

### LIVER TRANSPLANTATION OR STARZL'S LEGACY. A LOOK BACKWARD, A LOOK FORWARD

par

J. LERUT (U.C.L.)<sup>1</sup>

#### 1. Introduction

Although the first successful liver transplantation (LT) was done in March 1963, it took about twenty years to develop a surgical procedure that would be applicable safely in humans. When the concept of replacing a diseased liver by a new one was put forward, this procedure was called 'the impossible operation' The worldwide tenth attempt of human LT in a 1.5 year young infant suffering from biliary atresia complicated with hepatocellular cancer finally succeeded. This patient died 400 days later due to tumour recurrence... the stage for an incredible medico-surgical adventure was set ! (1)

During the developmental phase of liver transplantation the UCL team of digestive surgery under the lead of Prof. P.-J.Kestens played an important pionnering role. Firstly the methodology of liver preservation in the large animal was worked out in the laboratory for experimental surgery and secondly this knowledge was afterwards transferred into the clinical arena. Indeed on February 18, 1969 this team realized at the University hospitals St.-Pierre in Leuven one of the first adult liver transplantations in Europe followed shortly thereafter by the first pediatric liver transplantation in continental Europe by Prof. J.B. Otte. The programme was restarted in 1984 after the transfer to the University hospitals Saint Luc in Woluwe. Up to December 2011, almost 1900 liver transplantations have been realized.

Organ preservation, immunosuppression and peri-operative care were all the time improved and allograft rejection was controlled more easily by better and more powerful immunosuppressive drugs. The introduction of the calcineurin inhibitor (CNI) cyclosporine A, developed by Borel, raised the three years survival after LT to an unexpected 70% !

The National Institute of Health Consensus development Conference (CC) in June 1983 reported about the worldwide LT experience comprising 540 patients. LT was not only considered as 'a promising alternative to current therapy in the management of late phase of several forms of serious liver diseases' but the CC also recognized the therapeutic potential of LT, on the condition to restrict the procedure to well selected patients (1). The ideal liver transplant candidate in 1984 should comply to ten conditions (table 1) and ten absolute and five relative contraindications (table 2). If one would take

<sup>1</sup> Invité par le Bureau en vertu de l'article 15 §3 du Règlement.

into account all these criteria virtually no patient would nowadays be accepted as a liver transplant candidate ! The numbers of transplants done since the CC have grown exponentially. Today almost 200.000 LT have been done worldwide. The development of LT during the last three decades has been amazing mainly due to the fact that almost all medical and surgical contraindications to the procedure have been eliminated (1,2). A look into the future is also warranted in order define its future place in today's medicine.

**Table 1 : The ten conditions to be ideal LT candidate at the 1984 NIH Consensus Conference**

Young patient < 50 years.  
 No viral infection.  
 No alcohol and drug abuse.  
 Normal vessel state.  
 No infection.  
 No (advanced) malignancy.  
 No cardiopulmonary or renal disease.  
 No prior abdominal surgery.  
 Ability to accept the procedure or understand its nature.  
 Ability to accept its costs.

**Table 2. The ten absolute and five relative contraindications to LT at the 1984 NIH Consensus Conference**

ABSOLUTE :

Portal vein thrombosis.  
 Severe hypoxemia due to right to left shunts (HPS).  
 Sepsis outside the hepatobiliary (HB) system.  
 Primary malignant disease outside the HB system.  
 Metastatic HB malignancy.  
 Active alcoholism.  
 Advanced cardiopulmonary or renal disease.  
 HBS Ag and HBe Ag positive state.  
 Age > 55 years.  
 Inability to accept the procedure or understand its nature and/or its costs.

RELATIVE

Intrahepatic or biliary sepsis.  
 Advanced alcoholic liver disease in the abstinent alcoholic.  
 Age > 50 years.  
 HBS Ag positive state.  
 Prior abdominal surgery especially in the right upper quadrant.  
 Portal hypertension surgery.

## **2. The Past : The Ten Absolute Contraindications to LT**

### *2.1. Splanchnic venous thrombosis*

Splanchnic venous thrombosis and portal hypertension surgery are both part of the natural evolution of cirrhosis. Intra-operative mortality of LT when these conditions are present reached about 50% ; peri-operative blood product use was very high and post-LT morbidity was almost prohibitive. Several technical advances have been made to overcome this problem. Eversion thrombectomy allows to solve the problem in a majority of patients. If not possible, a free iliac interposition graft between the allograft portal vein and the superior mesenteric vein is necessary. Sometimes it is possible to connect the allograft portal vein to a collateral vein. In case of extended splanchnic thrombosis cavo-portal hemi-transposition or combined liver-intestinal transplantation are the last resorts to cope with this situation (3).

### *2.2. Hepatopulmonary syndrome (HPS)*

HPS defined as a  $pO_2 < 70$  mmHg in upright position is present in up to 20% of cirrhotic patients. Even in cases where oxygen saturation is below 50 mmHg, this situation can be reversed by a successful LT. The post-transplant recovery is usually more complicated, necessitating adapted respiratory care. The pre-transplant level of the baseline macro-aggregated albumin shunt fraction may indicate the limits of correctability following LT (1).

### *2.3. Sepsis outside the hepatobiliary system*

Active extra-hepatic infection compromises outcome of LT. Transplantation can however be performed successfully if the infection is confined to eg. the lungs or ascites and doesn't cause hemodynamic stability (1). One has always to question how far one may go as post-transplant care is usually much more prolonged and expensive.

### *2.4. Primary malignant disease outside the hepatobiliary system*

Based on embryologic developmental theory, Starzl advocated the 'en block or cluster transplant' to treat extended hepatobiliary malignancies and even liver metastases from neuro-endocrine tumours. Although initial success was promising, long-term results were and remain disappointing (1,4,5).

Pre-LT malignancies or presenting malignancies discovered incidentally during the LT-procedure, are no contra-indication anymore to LT as showed by the larger Kings' College experience.

Metastatic hepatobiliary malignancy is slowly but surely becoming a valuable indication for LT. Excellent results have been obtained in children transplanted because of hepatoblastoma after successful chemotherapeutic treatment of hepatic and thoracic tumour involvement. Similar excellent long-term results have been obtained for

epithelioid hemangio-endothelioma. Some centres even propose in the latter group a sequential or simultaneous hepatopulmonary transplantation (5).

The place of LT in the treatment of neuro-endocrine tumours with hepatic involvement is in continuous evolution. Excellent results can be obtained in selected young (<50 yrs) patients after R0 resection of the primary tumour preceding the transplant procedure for more than six months. If the primary lesion has a favorable tumour biology (as expressed by a Ki67 index of < 5 to 10%) and has also a portal vein drainage, results are significantly improved (6).

It is evident that all oncologic liver recipients will take profit from an adapted immunosuppression. Minimization of IS and use of the m-TOR inhibitor rapamycine are of importance in this context. Rapamycin is an immunosuppressant drug having anti-tumour activity based on its anti-angiogenic properties.

The most recent development in the field of LT is the treatment of metastatic colorectal malignancy. The Oslo-SECA (SECONDARY CANCER) study indicates that LT definitively will obtain a valid place in the treatment of metastases on the condition that adapted chemotherapy and immunosuppression complete the transplant procedure. Preliminary results obtained in these (desperate) cases show a beneficial (up to 50%) patient 5-year survival after LT (7).

### *2.5. Alcohol abuse*

LT in active alcoholic patients has always been discussed heavily within the medical community (1). The 'six month abstinence rule' is not generally accepted and some French groups even advocate LT in case of severe acute alcoholic hepatitis (8).

### *2.6. Drug abuse*

Although also heavily debated, some groups as eg. in New York showed that LT can be successfully done in recipients on methadone maintenance.

Both 'abuser' groups need of course a particularly tight follow-up scheme during pre- as well as post-transplant period. It is of utmost importance in these potential patients to take into consideration the familial, professional and social context (1).

### *2.7. Advanced cardiopulmonary disease*

Two staged cardiac and liver transplant surgery is reported more and more frequently (1). Several case reports have been published about simultaneous liver and heart transplantation in the context of familial amyloid polyneuropathy (FAP) and hemochromatosis and also about simultaneous LT and coronary, arrhythmia and valvular surgery. These surgeries are complex and translate a major interest in both cardiovascular and liver diseases of the transplant centre.

### *2.8. Viral infections*

Viral cirrhosis was for a long-time considered to be an absolute contra-indication to LT because of the universal recurrence of the disease in the liver allograft (9).

Since the landmark paper of Samuel in 1993, it has been clearly shown that adequate antiviral prophylaxis using specific anti-HBs antibodies protects the allograft from reinfection. These results have even been further improved by combining nucleoside and nucleotide analogues and immunoglobulins. This combination was able to reduce the incidence of allograft reinfection rate from 100 to 5%. HBV recipients seem moreover to gain some immunologic advantage as immunoglobulins have a tolerogenic effect on dendritic cells.

### *2.9. Age*

More and more transplants are done in patients aged over 65 and even 70 years (1). The initial Pittsburgh results have now been confirmed by most transplant centres.

### *2.10. Inability to accept or understand the procedure*

LT has been applied to all levels of society. Successful LT has been reported in Down syndrome recipients and in drug abusers. Adequate preparation by the medical, paramedical and clinical coordinator teams is of utmost importance in these difficult constellations.

## **3. Relative contra-indications (1)**

### *3.1. Intra-hepatic or biliary sepsis*

Chronic biliary infection is frequent in Caroli's disease, primary and secondary sclerosing cholangitis. Because the infection is usually confined to the liver, outcome of LT transplantation is excellent as it takes away the source of the infection. LT is especially valuable in these patients as it improves dramatically the quality of life of these patients.

### *3.2. Advanced liver disease in abstinent alcoholic patients*

The introduced MELD liver allocation system aims at reducing liver waitlist mortality by transplanting sicker patients more rapidly. Abstinent alcoholics frequently belong to the sickest patient groups. It is nowadays admitted that LT is a very good indication in such patients on the condition the recipient is abstinent and remains compliant. If alcohol re-consumption is avoided, alcoholic cirrhosis can be considered as one of the best indications not only for LT, but also to judge the effect of IS withdrawal, as this is the only disease that doesn't recur in the allograft.

### 3.3. *Previous abdominal surgery*

Many transplant recipients underwent previous abdominal and right upper quadrant surgery. As these interventions compromise the transplant procedure exploratory or staging laparotomies, as well as unnecessary cholecystectomies and cyst fenestrations, should be avoided. The latter interventions really transform the transplant procedure into a nightmare !

Interventional radiology such as TIPSS procedure should be preferred in potential liver recipients instead of portal hypertension surgery. In case portal hypertension surgery is necessary, meso-caval or spleno-renal shunts are the preferred options leaving intact the hilar region.

### 3.4. *HIV infection*

Successful HAART therapies allow nowadays HIV patients to come to LT. The indication for LT relates usually to their HCV and/or HBV co-infection. These patients are at higher post-LT infectious risk ; particular attention should be given to the interaction between anti-viral drugs and calcineurin inhibitors.

### 3.5. *Positive HBS Ag Status (see above)*

## 4. **The Future**

Continuous refinement of the MELD allocation system will improve the management of the waiting list (10). Alternative techniques of adult split and living donor LT will cross-fertilize each other and allow to expand the allograft pools, this both in Western and Eastern world.

As there will always be more potential recipients than donors, many research areas will open in the field of artificial tissue engineering and regenerative medicine.

Pre-emptive transplantation will further allow to improve results especially in the case of metabolic and cystic liver diseases.

The inevitable progress in the medical treatment of viral diseases will switch the importance of LT to hepatobiliary oncology (4-7). Vascular tumour, advanced hepatocellular cancer, cholangiocellular cancer, neuro-endocrine and colorectal liver metastases will progressively become the more important part of indications of LT in the 21st century.

Combined organ transplantation will also become more frequent as many liver diseases are accompanied by a renal functional impairment. Nowadays already 15% of all liver recipients have a combined hepato-renal transplantation.

As the peri-transplant care will further improve results, transplant teams should focus more and more on late morbidity and mortality. The majority of long-term survivors

die nowadays from infectious, cardiovascular and tumour diseases whilst having a functional graft. This mortality is directly related to the strength of the maintenance immunosuppression. Minimization or even withdrawal immunosuppressive protocols should become 'the' priority in (organ) transplantation (11,12). Unfortunately tolerance protocols are frequently based on a trial and error approach as good markers to predict tolerance are not yet available (13). As the liver is the immunoprivileged organ by excellence, liver recipients should be in the forefront of this research.

## 5. Conclusion

In 1964 and 1969, Starzl published two landmark books 'Experience in renal transplantation' and 'Experience in hepatic transplantation'. The liver book dealt only with 29 (!) LT, comprising one xenograft. Since this publication, progress has been enormous. All but one (nl. active sepsis outside the biliary system) contraindications to the procedure have been eliminated and more than 200.000 patients have been transplanted, many of them with an excellent long-term success. Indeed Starzl's legacy has been an enormous one, which transformed medicine and surgery ! As less contra-indications remain valid, more and more patients will be transplanted in the future. Progresses in immunology will allow, without any doubt in a near future, to an immunosuppressive free state of many recipients, guaranteeing them an excellent quality of life and a similar survival expectancy as non-transplanted patients !

## RÉSUMÉ

Depuis la première transplantation hépatique (TRH) réussie en 1963 par Starzl, d'énormes progrès ont été faits dans ce domaine de la médecine. L'auteur retourne aux recommandations émises lors de la Conférence de Consensus de NIH en 1983 afin de démontrer les progrès réalisés durant quatre décades. En effet, de nos jours, quasi aucune des ces indications et contre-indications ne restent valables. Malgré l'extension continue des indications, les résultats de la TRH ne font que s'améliorer. Les médecins de transplantation doivent à partir de maintenant se concentrer sur l'obtention d'un statut sans immunosuppression (c'est-à-dire de tolérance) afin de consolider les bons résultats obtenus à long terme.

## SUMMARY

Since the first successful liver transplantation (LT) in 1963 by Starzl, enormous progresses have been made in this field of medicine. The author looks back at the recommendations put forward at the 1983 NIH Consensus conference on liver transplantation in order to show the enormous progresses that have been made in his field during the last four decades. Today almost none of the original indications and contra-indications remain in place. Despite the extension of indications, results of LT continuously improved. The attention of the transplant physicians should from now onwards be focused on the achievement of an immunosuppressive free (or tolerant) status in order to further consolidate the excellent obtained long-term results.

## BIBLIOGRAPHY

1. STARZL T.E., DEMETRIS A.J., *Liver Transplantation Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago, USA 1990.*
2. LERUT J., CICCARELLI O., ROGGEN F., LATERRE P.F., DANSE E., GOFFETTE P., *et al.*, *Cavo-caval adult liver transplantation and retransplantation without veno-venous bypass and without porta-caval shunting : a prospective feasibility study in adult liver transplantation*, *Transplantation* 1740-1745,2003.
3. LERUT J., MAZZA D., VAN LEEUW V., LATERRE P.F., DONATACCIO M. DE VILLE DE GOYET J., *et al.*, *Adult Liver transplantation and abnormalities of splanchnic veins : experience in 53 patients*, *Transplant Int.* 10,125-132a,1997.
4. LERUT J., CICCARELLI O., JULLIARD O., LANNOY V., GOFFETTE P., *Hepatocellular cancer and liver transplantation : a western experience in : Multidisciplinary Treatment of Hepatocellular Carcinoma*, Thieme Verlag Eds : Vauthey, Brouquet in press 2011.
5. LERUT J., WEBER M., ORLANDO G., DUTKOWSKI P., *Vascular and rare liver tumors : A good indication for liver transplantation ?*, *J. Hepatol.* 47,466-475,200.
6. BONACCORSI-RIANI E., APESTEGUI C., MOURET-JOURET A., SEMPOUX C., GOFFETTE P., CICCARELLI O., *et al.*, *Liver transplantation and neuroendocrine tumours : lessons from a single centre experience and from the literature review*, *Transplant Int* 23 : 668-678, 2010.
7. FOSS A., ADAM R., DUELAND S., *Liver transplantation for colorectal metastases : revisiting the concept*, *Transplant Int.* 23 :679-685,2011.
8. MATHURI P., *Is alcoholic hepatitis an indication for transplantation ? Current management and outcomes*, *Liver Transpl.*11 :S21-, 2005.
9. LERUT J., DONATACCIO M., CICCARELLI O., LATERRE P.F., CORNU CH, JAMART J., *et al.*, *Liver transplantation and HBV-related disease : adequate immuno-prophylaxis and delta co-infection as major determinants of long-term prognosis*, *J. Hepatol.* 30,706-714,1998.
10. METSELAAR H.J, LERUT J., KAZEMIER G., *The true merits of liver allocation according to MELD scores :survival after transplantation tells only one side of the story*, *Transplant Int*, 201110.
11. LERUT J., *Avoiding steroids in solid organ transplantation*, *Transplant Int.* 16, 213-224,2003.
12. LERUT J., MATHYS J., LEMAIRE J., VANTHUYNE V., TALPE S., CICCARELLI O., *et al.*, *Tacrolimus monotherapy in liver transplantation :one-year results of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study*, *Ann. Surg.* 248 : 956-967, 2008.
13. LERUT J., SANCHEZ-FUEYO A., *An appraisal of tolerance in liver transplantation*, *Am. J. Transplant* 6,1774-1780,2006.

*(Department of Abdominal and Transplantation Surgery – Cliniques Universitaires St-Luc – U.C.L.).*

\*  
\*   \*



## Discussion

*M. P.-J. Kestens.* – Je félicite le Professeur Jan Lerut pour son exposé qui nous a fait revivre l'épopée de la transplantation du foie dont Tom Starzl, aux Etats-Unis, a été, incontestablement le principal pionnier. Son long exposé se voulait exhaustif. Je m'étonne cependant et je regrette qu'il n'ait pas jugé utile de mentionner que le 18/02/1969, à l'hôpital universitaire St-Pierre (U.C.L.), à Leuven, a été pratiqué, avec succès, la première transplantation de foie chez l'homme en Europe continentale. Il s'agissait d'un homme de 42 ans, cirrhotique, chez qui une anastomose porto-cave avait été faite ; elle avait été suivie d'une encéphalopathie grave. Après la greffe, le patient s'est réveillé rapidement (il était en sub-coma avant l'intervention), la fonction hépatique est revenue à la normale au bout de quelques jours et l'ictère a totalement disparu vers le 25<sup>e</sup> jour postopératoire. Malheureusement, le patient est décédé 36 jours après la greffe, d'une broncho-pneumonie foudroyante due au virus de l'influenza. Cette réussite faisait suite à des expériences chez le chien, réalisées au laboratoire du Pr Mc Dermott au Massachusetts Hospital (Harvard University-Boston-U.S.A.) où un système de perfusion sanguine du foie par l'artère hépatique et la veine porte, avait été développé.

Cette technique avait été reproduite au Laboratoire de Chirurgie Expérimentale (Prs J. Morelle et J.J. Haxhe). Avec l'aide d'une équipe (Pr. Mikaeloff et collègues) de l'Université de Lyon – France, douze chiens avaient subi une transplantation hétérotopique du foie, après perfusion de l'organe, prélevé chez un chien donneur, pendant une durée allant jusqu'à six heures : onze chiens ont survécu pendant dix jours en moyenne, le décès étant dû au rejet (absence de traitement par des immunodépresseurs). Cette technique de perfusion, préalable à la greffe, a été utilisée afin de conserver de manière optimale le foie du donneur (patient en état de mort cérébrale).

*M. M. J. Lerut.* – En effet il y eu du travail de pionnier fait par votre équipe à Leuven dans le domaine de la transplantation en faisant la première greffe hépatique en Belgique chez un adulte et, je pense, la première greffe en Europe chez un enfant. Je n'ai pas mentionné ceci en particulier dans mon exposé. Celui-ci a en effet été construit sur la publication originale apparue dans *Hepatology* et reprenant les contre-indications de la transplantation telles que formulées par la Consensus Conférence de 1983 !

*M. M. Goldman.* – Félicitations pour cette magnifique leçon dont j'espère que les jeunes médecins qui s'investissent en transplantation bénéficieront également. Ma question porte sur les aspects économiques de la greffe hépatique. Disposez-vous de données sur le coût – bénéfice de la transplantation hépatique ?

*M. M. J. Lerut.* – Je vous remercie d'abord pour ce compliment ! Faire des études sur les répercussions économiques de la transplantation hépatique est une matière très difficile puisque, presque à chaque année, l'impact des différents paramètres à prendre en considération sur les finances varie énormément. Les Hollandais, spécialistes reconnus en matière d'économie de la santé, on fait quelques études. L'étude la plus récente a porté sur l'impact des donneurs à cœur non

battant sur les coûts de la transplantation hépatique... et, en effet, on a constaté que la durée d'hospitalisation – et donc les frais – ont augmenté considérablement suite à l'apparition d'une morbidité importante. Nous avons fait aux Cliniques Saint-Luc le même constat, doublement des durées d'hospitalisation depuis l'introduction du système d'allocation MELD et l'utilisation de donneurs de moins bonne qualité.

\*  
\* \*

### Présentation d'ouvrage

La parole est ensuite donnée à M. le Pr W.J. Malaisse pour une présentation d'ouvrage intitulée : « The metabolic syndrome of w3-depleted rats : dietary changes in lipid fatty acid pattern without changes in total lipid content ». Il s'exprime en ces termes : « L'ouvrage présenté correspond à un Supplementum du Journal intitulé « Metabolic and Functional Research on Diabetes ». Publié en 2011, ce Supplementum représente, comme indiqué dans un avant-propos, une manifestation d'appréciation, d'estime et de gratitude au Professeur Yvon A. Carpentier à l'occasion de son 65<sup>e</sup> anniversaire. Rédigé en langue anglaise, ce Supplementum de quatre-vingt pages, dont le Professeur Willy J. Malaisse est le rédacteur invité Editor, comporte une série de quinze articles illustrés par trente-sept figures et trente-sept tableaux. Sous le titre général de « The metabolic syndrome of w3-depleted rats : dietary changes in lipid fatty acid pattern without changes in total lipid content », cet ouvrage concerne les modifications métaboliques observées dans des rats carencés en acides polyinsaturés omega-3, suite à l'exposition à un régime à base d'huile de soja, et ensuite exposés à des régimes à base d'huile de lin, de poisson ou de tournesol afin d'assurer la réplétion tissulaire en acides omega-3. Cette étude porte notamment sur la composition des lipides du jejunum, du caecum, du foie, des hématies, du cerveau et du tissu adipeux. Il porte également sur d'autres paramètres tels que la prise alimentaire, le gain pondéral, la glycémie, l'insulinémie et la résistance à l'insuline. Ces données sont d'un intérêt évident dans la perspective des modalités nutritionnelles en vue de la correction d'un déficit en acides omega-3 chez les sujets présentant une telle carence. Suite à la publication de ce Supplementum, ses deux auteurs seniors ont du reste été invités à contribuer, dans des ouvrages distincts, à deux chapitres portant sur le même thème ».

\*  
\* \*

## Communications du Bureau

Aux communications du Bureau, le Secrétaire perpétuel annonce un Prix qui nous a été transmis par M<sup>me</sup> le Dr Ir. V. Halloin, du F.N.R.S., du « Prix scientifique McKinsey & Company 2012 » destiné à un doctorant, dans les deux dernières années de son doctorat, qui pourra prouver la pertinence sociale et économique de sa thèse ou l'applicabilité concrète de celle-ci. Le doctorat doit être réalisé dans le domaine des sciences exactes, des sciences appliquées, des sciences sociales, économiques ou de gestion, ou des sciences biomédicales.

Prix d'un montant de 5.000 euros. Les candidatures doivent parvenir au FNRS pour le 1<sup>er</sup> octobre 2012.

Il signale que le Pr W.J. Malaisse a reçu le 28 septembre 2011, au cours d'une cérémonie à Mbuji-Mayi (RD Congo), des mains de Mgr Kasanda, Président du Conseil d'Administration de l'Université de Mbuji-Mayi, les insignes et diplôme de Docteur Honoris Causa de l'Université de Mbuji-Mayi.

De même, il a reçu le 24 octobre, au cours d'une cérémonie tenue à Maringa (Brésil), des mains du Recteur et Président du Conseil Universitaire, le diplôme de Docteur Honoris Causa de l'Universidade Estadual de Maringa.

\*  
\* \*

## Comité secret

L'Académie se forme en « Comité secret », et prend connaissance du résultat des votes intervenus pour le renouvellement du Bureau pour l'exercice 2012.

### Composition du Bureau d'Administration pour l'exercice 2012 :

Président : M. MALAISSE Willy,  
Professeur émérite de l'Université libre de Bruxelles ;

Premier vice-président :  
M. OTTE Jean-Bernard,  
Professeur émérite à l'Université catholique de Louvain ;

Second vice-président :  
M. BONIVER Jacques,  
Professeur émérite à la Faculté de Médecine de l'U.Lg. ;

Premier assesseur du Secrétaire perpétuel :  
M. ANGENOT Luc,  
Professeur ordinaire à l'Université de Liège ;

Second assesseur du Secrétaire perpétuel :  
M. BOEYNAEMS Jean-Marie,  
Professeur ordinaire de l'Université libre de Bruxelles ;

Délégué des membres ordinaires :

M. CASIMIR Georges,  
Professeur ordinaire de l'Université libre de Bruxelles ;

Suppléant du Délégué des membres ordinaires :

M. COULIE Pierre,  
Professeur ordinaire à l'Université catholique de Louvain ;

Fait partie du Bureau comme Secrétaire perpétuel :

M. FERRANT Augustin,  
Professeur émérite à l'Université catholique de Louvain.

\*

\* \*

Questions de Concours ordinaires pour la période 2012-2013 :

Question posée par la troisième Section :

« On demande de nouvelles recherches pour la prise en charge anesthésique et chirurgicale du nouveau-né. »

Question posée par la sixième Section :

« On demande de nouvelles recherches sur la diversité et l'ontogenèse des pepsinogènes chez les ruminants. »

\*

\* \*

Séance publique du 17 décembre 2011

---



## SÉANCE PUBLIQUE DU 17 DÉCEMBRE 2011

---

Au Bureau : M. P.-P. Pastoret, Président ; MM. A. Ferrant, Secrétaire perpétuel, W.J. Malaisse, premier vice-président.

Sont présents :

MM. Ch. Chalant, Th. Godfraind, P.-J. Kestens, P. Vanderhoeft, J.-J. Vanderhaeghen, A. Dresse, M. Wéry, membres honoraires ;

MM. M. Lamy, J. Brotchi, W.J. Malaisse, L. Angenot, G. Rousseau, J. Fissette, M. Goldman, J. Boniver, J.-C. Schoevaerds, L. Hue, J.-M. Boeynaems, L. Delattre, J.-F. Beckers, J. Melin, B. Van den Eynde, P.J. Van Cangh, M<sup>me</sup> D. Balériaux, MM. J. Nève, J.-C. Henquin, A. Scheen, J.-L. Balligand, M<sup>me</sup> Fr. Meunier, membres titulaires ;

MM. R. Vanwijck, J.-O. Defraigne, D. Lison, S. Louryan, E. Sokal, M<sup>me</sup> J. Fontaine, MM. A. Albert, P. Maquet, B. Lengelé, Ch. Delloye, P. Gianello, G. Casimir, P. Coulie, M<sup>me</sup> A. Noël, MM. O. Feron, M. Hamoir, R. Reding, membres ordinaires.

\*  
\* \*

MM. J. Frühling, Secrétaire perpétuel honoraire ; E.H. Betz, J. Bonnal, L. Molle, Ch. de Duve, P. Dumont, M. Lechat, J. van der Stricht, Ch. van Ypersele, P. Lefèbvre, A. Dresse, membres honoraires ; L. Angenot, G. Rousseau, U. Gaspard, J.-C. Schoevaerds, L. Delattre, J. Melin, Y. Pirson, membres titulaires ; S. Louryan, J.-C. Pector, Y. Carlier, M. Crommelinck, Ch. Delloye, M. Hamoir, F. Lemaigre, M<sup>me</sup> I. Salmon, membres ordinaires, ont exprimé leurs regrets de ne pouvoir assister à la séance.

\*  
\* \*





**DISCOURS D'ACCUEIL**

par

le Pr P.-P. PASTORET,  
Président de l'Académie royale de Médecine de Belgique

Monsieur le Secrétaire perpétuel,  
Chers conférenciers invités,  
Chers Confrères,  
Mesdames, Messieurs,

Le monde des virus est vaste et fort complexe. Certains ont auparavant estimé que le nombre d'espèces virales était de l'ordre de 5000, ce qui est largement sous-estimé. Parmi les 1415 agents pathogènes recensés chez l'homme, figurent 217 virus et prions. Le nombre d'espèces virales identifiées chez l'homme est un bon indicateur de l'étendue du monde des virus. De 175 agents responsables d'infections émergentes chez l'homme, 132, c'est-à-dire 75 %, sont zoonotiques, dont la majorité d'entre-eux trouvent leur source dans la faune sauvage, ce qui souligne le rôle de celle-ci comme origine potentielle de nouvelles maladies émergentes, notamment l'origine virale.

Une des premières caractéristiques des virus est leur extrême variabilité, particulièrement celle des virus à ARN, polysegmentés ou non, du fait de l'absence de mécanisme de correction lors de la copie de l'acide nucléique. Cette variabilité est sous-tendue par un taux de mutations exceptionnellement élevé. Ce taux exceptionnel de mutations conduit à la formation de populations de quasi-espèces.

Ces deux facteurs, la place de la faune sauvage comme réservoir potentiel d'infections et la variabilité des virus, expliquent en grande partie l'émergence de nouvelles infections ou la réémergence d'infections déjà connues. D'autre part, du fait d'autres facteurs complémentaires, certaines maladies étendent leur aire d'extension comme, très récemment, la fièvre catarrhale ovine due au sérotype 8 en Europe du Nord.

Si certaines maladies virales émergent, réémergent ou s'étendent, d'autres disparaissent. Le meilleur exemple récent est celui de la peste bovine. L'éradication de la peste bovine a été officiellement déclarée cette année (2011) par l'Organisation mondiale de la Santé animale (OIE) et la FAO, maladie éradiquée grâce à la vaccination systématique du bétail. Il s'agit de la deuxième maladie animale éradiquée après la variole humaine. Cette année 2011 est donc une année faste pour la santé animale et la médecine vétérinaire.

La peste bovine a joué un rôle considérable dans l'évolution des sciences médicales en général et de la microbiologie en particulier. La peste bovine a notablement contribué à la conceptualisation des agents infectieux.

Friedrich Löffler et Pavil Frösch démontrèrent les premiers en 1897 qu'une infection animale, la fièvre aphteuse, était provoquée par un virus filtrable et non par une bactérie. En 1902, Maurice Nicolle et Mustafa Adil-Bey démontrèrent que la peste bovine était également provoquée par un virus ; ce qui fut une réelle surprise parce que la peste humaine était d'origine bactérienne. Le virus responsable de la peste bovine est un Morbillivirus très proche du virus responsable de la rougeole chez l'homme.

En plus de cette découverte fondamentale, de nombreux scientifiques réputés de cette même époque ont contribué à nos connaissances sur la peste bovine. C'est ainsi qu'à l'occasion de l'épizootie qui frappa l'Afrique du Sud à la fin du 19<sup>e</sup> siècle, les Allemands envoyèrent dans la région Robert Koch et Paul Kohlstock pour y étudier la maladie et sa prévention, alors qu'en France, l'Institut Pasteur de Paris dépêchait de son côté Jules Bordet, un de nos anciens Présidents, et Jan Danysz, qui allaient travailler avec un jeune vétérinaire suisse, Arnold Theiler.

En 1920, la peste bovine s'invita à nouveau accidentellement en Belgique. Cette réapparition de la peste bovine en Europe, d'où elle avait été éliminée, mit en évidence la nécessité d'une collaboration internationale afin de lutter contre les principales maladies contagieuses des animaux domestiques et sauvages. Cet accident fut dès lors à l'origine de la création de l'Office international des Epizooties (OIE), actuellement Organisation mondiale de la Santé animale.

Pour en revenir à notre réunion d'aujourd'hui, nous avons la chance d'accueillir deux conférenciers étrangers, que je remercie pour leur disponibilité et leur venue.

Le Professeur Paul Barrow de l'Université de Nottingham, nous entretiendra du rôle de la faune sauvage comme réservoir potentiel de maladies virales émergentes, zoonotiques ou épizootiques.

Le Professeur David Onions, qui a fait la plus grande part de sa carrière à l'Université de Glasgow, nous décrira les techniques actuelles mises en œuvre pour partir à la découverte de nouveaux virus, notamment des contaminants éventuels de vaccins. Il s'agit véritablement de virologie prédictive.

D'avance je les remercie pour leurs interventions et je leur passe dès à présent la parole. Je vous remercie pour votre attention.

\*  
\*   \*  
\*   \*

## Lectures

### I

## NEW VIRAL PATHOGENS FROM WILDLIFE

par

P. A. BARROW (University of Nottingham – G.B.)<sup>1</sup> et coll.<sup>2</sup>

### 1. Background

Many of the problems associated with the emergence of new pathogens and re-emergence of infections arise directly or indirectly from human population pressure. Human global population has risen from under three billion in 1950 to just over six billion in 2002 and is expected to peak at close to nine billion in 2050. This causes huge pressures on the environment and biodiversity to say nothing of political pressures associated with land use, water shortage etc...

Increasing human numbers has a number of effects which result in an increase in contact between man and new and old viruses. These include changes in land use, climatic changes and increased trade and travel and are compounded by natural microbial evolution.

#### 1.2. *Changes in land use*

The global economy is changing with many more people in previously developing countries having an increasing standard of living. This is followed by an expectation for an increasingly meat-rich diet. Thus an estimate of global meat production shows an increase from 70 million tonnes in 1961 to 280 million tonnes in 2009 with the greatest proportionate increases being seen with poultry (x9 fold increase) and pigs (x4 fold increase). The biggest increases regionally are in Asia (increase of 160% during the last ten years) and South America (50%). This has enormous consequences for land use since more livestock requires more land which results in increasing deforestation. It is estimated that, since 1947, 50% of the world's forests have been lost with a further estimate of 10% remaining by 2030 with the biggest current losses taking place in Africa, South America and South-East Asia. This results in increases in contact between both livestock (and their herdsman) and wildlife or arthropod vectors for which wild animals are their normal hosts. It is appreciated that logging is also a major cause of this although this frequently results in changes of use to agriculture following logging.

<sup>1</sup> Invité par le Bureau en vertu de l'article 15 §32 du Règlement.

<sup>2</sup> A. Abu-Median.

This has historically resulted in increases in infections by alphaviruses causing O'nyong-nyong and Chikungunya fever from primates with *Aedes* mosquitoes mediating transmission, Marburg and Ebola virus also from primates and increased exposure to Lyssaviruses from a variety of bat species.

### 1.2. Climate change

Increased human activity causing deforestation, livestock rearing and pollution all contribute to climate change. There are many well-publicised examples of this and several well-studied examples of infectious disease changing their distribution as a result of this. Thus, the spread of Bluetongue serotype 8 into northern Europe has resulted from the increased range of the midge vector *Culicoides imicola* and the establishment of new vectors, *C. obsoletus* and *C. pulicaris* where these have overlapped with *C. imicola*.

### 1.3. Trade and human movement

Increasing trade in animal products, animals themselves and humans has resulted in transfer of some vectors to new ranges with a wider distribution well beyond their original range. Thus the mosquito *Aedes albopictus* is found associated with human dwellings more than other mosquitoes and has spread recently from South East Asia to South and North America, Southern Europe and parts of Africa. The spread of West Nile virus to North America may have been associated with this change. This vector is also able to transmit dengue, yellow fever and Chikungunya so this is of concern since Chikungunya has been reported in Italy.

### 1.4. Microbial evolution

This might be thought of as divorced from human activity. However, evolution can take place in livestock hosts as has recently occurred with the H1N1/09 influenza strain.

## 2. Recent developments

In the last ten years the amount of viral nucleic acid sequence generated has increased tenfold with most increases amongst the retroviridae, orthomyxoviridae, flaviviridae and other ssRNA viruses.

The search for new viruses has employed a variety of methods including

- (1) monoplex assays (PCR),
- (2) multiplex assays (PCR in which <5-7 different viruses can be detected simultaneously, with identification by sequencing or by mass-spectroscopy,
- (3) microarray (many pathogens detectable simultaneously with identification of new types followed by sequencing and
- (4) high through-put sequencing following amplification from tissues or tissue culture.

We have concentrated on the use of microarrays, both in the construction of a veterinary virus array, sponsored by Defra, UK and in the development of different array formats for surveillance of wild life for bacterial and viral infections, supported by the EU FP7. The advantages are that

- (1) single samples can be screened for many viruses or other pathogens in a single operation,
- (2) hundreds of tests can be run in parallel,
- (3) it is relevant to microbial evolution and to the identification of pathogens with new artificially constructed genotypes (bioterrorism),
- (4) it can be used to discover new viruses.

Many major viral pathogens are known to be associated with wild animal reservoirs. These include flaviviridae (causing various haemorrhagic fevers, arboviruses [=vector borne]), arenaviridae (Lassa fever and other haemorrhagic fevers), bunyaviridae (Rift Valley Fever and other haemorrhagic fevers, arboviruses), filoviridae (Ebola and Marburg virus, arboviruses), alphaviruses (Chikungunya, O'nyong-nyong, Semlike forest virus, arboviruses), henipaviruses (Hendra and Nipah virus, arboviruses), orbiviruses (Bluetongue, African horse sickness etc, arboviruses).

Epidemiological analysis over many years is increasingly revealing rodents, bats and primates to be major sources of infection for man and ungulates for livestock. We will review some recent interesting examples of isolation of new viruses from wild animals and from man.

**Flaviruses.** These are positive ss RNA viruses and include the agents of West Nile Fever, Dengue Fever, Yellow Fever, Tick-borne encephalitis and several other encephalites. With the exceptions of yellow fever and dengue, human infection is generally incidental since viral titres in man are generally too low for further transmission.

West Nile fever was first observed as an encephalitis in New York and first thought to be St Louis encephalitis until Tracey MacNamara found it to be a new virus which was also causing deaths in endemic and exotic birds (in Bronx Zoo). Although human-to-human transmission has been demonstrated mosquitoes were thought to be the reason for introduction into the US. Many other mammalian, avian and reptilian species are susceptible.

Dengue exists in a human or sylvatic cycle across the tropical regions of the globe. Several serotypes are found in primates, including the new DENV-2 serotype which is distinct from endemic strains and produces a mild disease in man. There are concerns over the spread of the *A. albopictus* mosquito vector into sub-tropical areas across the globe and which can transmit this virus.

**Bats.** The Chiroptera are the most diverse group of mammals after rodents. They are widespread and highly mobile. Several species in South-East Asia are able to spread into Northern Australia as a result of cyclones and the close proximity of islands in the Indonesian archipelago. Many flaviviruses, bunyaviruses, rhabdoviruses and reoviruses can be isolated from them which can be transmitted to man or livestock. The SARS virus, identified as a coronavirus by microarray (Zsiazek *et al.*, 2003), has recently been

isolated from bats in Southern China suggesting that they may be the real reservoir for infection of civet cats, racoons and ultimately man. The fruit bat *Pteropus giganteus* is found in Bangladesh and India and spreads Nipah to man via the cups that are used for collecting raw date palm syrup, at which the animals feed. Although a number of flaviviruses have been isolated from bats, the recently identified GB viruses have not been. These have been isolated from cases of hepatitis in man. The GBV-A virus has been isolated from new world primates but are not known to infect man. GBV-C has been isolated from man in many parts of the world and from chimpanzees. Recently a related but distinct serotype GBV-D has been isolated from bat sera in Bangladesh and identified by pyrosequencing (Epstein *et al.*, 2010).

Orbiviruses are found in bats throughout S. E Asia and northern Australia. Large scale testing in Australia has shown infection with orbiviruses including Bluetongue, Wallal, Warrego viruses etc. A new virus has been isolated from pooled *Culex* samples using subtractive hybridization with Bluetongue virus as the driver thereby enriching unique sequences. On the basis of the polymerase and inner core protein amino acid sequence this was identified as a new orbivirus, christened Stretch Lagoon virus (Cowled *et al.*, 2009).

**Rodents.** These are the largest group of mammals with more than 2,200 species and they act as hosts for many viruses, including Henipaviruses, Filoviruses, Flaviviruses, Bunyaviruses and Arenaviruses. The most well known arenavirus is the Lymphocytic Choriomeningitis virus (LCMV). Others include Lassa and other newer viruses isolated from rodents including Merio Walk, Mopeia and Mobala viruses which have not been known to infect man. However, a newly identified arenavirus, the Lujo virus, identified as new by pyrosequencing on the basis of the polymerase, glycoprotein and nucleoprotein sequence and has been identified as the cause of a haemorrhagic fever with deaths in Southern Africa (Briese *et al.*, 2009). The index case has contact with mice and the virus is now being sought in local rodents. The novelty of these as discrete virus taxa requires some thought given the fluid nature of their genomes.

**Ungulates.** Deer are reservoirs for a number of viruses for livestock including the orbiviruses. *Ixodes scapularis* is important as a vector of Lyme disease, babesiosis, anaplasmosis and Powassan disease. Use of multiplex PCR has revealed mixed infections with *Anaplasma* and *Borrelia*, or *Anaplasma*, *Borrelia* and *Babesia* (Tokarz *et al.*, 2010). This has considerable implications for epidemiology and intervention.

### 3. Work by our group

We have developed a microarray for veterinary viruses as a consortium funded by Defra (Biochip, <http://www.bio-chip.co.uk/>). This is based on 2,884 probes covering 36 virus families and 308 viruses. A bespoke piece of software (DetectiV) has also been developed to assist in analysis (Watson *et al.*, 2007). The array was originally on a glass slide platform but a recent trend has been to focus on groups of pathogens. A tube array (Alere) format is thus now being used to study the isolation of new serotypes of Bluetongue. The combination of generic and specific oligos allows the identification of a new virus as an orbivirus, for example, and as an untyped bluetongue virus and

the new serotype can then be sequenced to detect the development of new variants. An alternative approach might be to use an array of random sequence oligonucleotides. However, the software and preliminary calibration required for this approach rules it out as a viable proposition.

The tube format is being extended as part of the EU FP7-funded consortium project (Wildtech, <http://www.wildtechproject.com/wildtech/>) one of the arrays which is being developed covers a mixture of pathogens including Hantaviruses, *Francisella*, *Mycobacterium*, *Toxoplasma*, *Yersinia* and Bluetongue. The interaction between these pathogens in mixed infection is being studied.

#### 4. Conclusions

We face many problems associated with population and other pressures with unforeseen effects of infectious disease – transmission of old and new pathogens to man and his livestock. However, man is an ingenious animal and, when faced with impending crises, he generally makes the appropriate, if belated, response. Identification of the scale of the problem in terms of what viruses are present in wild animals, how far they are transmitted to man and his livestock and the extent to which viral evolution is occurring is the first stage in management of this as a problem.

#### BIBLIOGRAPHY

1. BRIESE T., PAESKA J.T., MCMULLAN L.K., HUTCHISON S.K., STREET C., PALACIOS G., KHRISOVA M.L., WEYER J., SWANEPOOL R., EGHOLM M., NICHOL S. and LIPKIN W.I., *Genetic detection and characterisation of Lujon virus, a new hemorrhagic fever associated arenavirus from Southern Africa*, PLOS Pathogens 5 : e1000455, 2009.
2. COWLED C., PALAIOS G., MELVILLE L., WEIR R., WALSH S., DAVIS S., GUBALA A., LIPKIN W.I., BRIESE T. and BOYLE D., *Genetic and epidemiological characterisation of Stretch Lagoon virus orbivirus, a novel orbivirus isolated from Culex and Aedes mosquitoes in northern Australia*, Journal of General Microbiology 90 : 1433-1439, 2009.
3. EPSTEIN J.E., QUAN P.-L., BRIESE T., STREET C., JABADO O., CONLAN S., KHAN S. A., VERDUGO D., HOSSAIN M.J., HUTCHISON S.K., EGHOLM M., LUBY S.P., DASZAK P. and LIPKIN W. I., *Identification of GBV-D, a novel GB-like flavivirus from old world frugivorous bats (Pteropus giganteus) in Bangladesh*, PLOS Pathogens, 6 : e1000972, 2010.
4. TOKARZ R., JAIN K., BENNETT A., BRIESE T. and LIPKIN W.I., *Assessment of polymicrobial infections in ticks in New York State. Vector borne and Zoonotic Diseases*. 10 :217-221, 2010.
5. WATSON M., DUKES M., ABU-MEDIAN A., KING D.P. and BRITTON P., *DetectiV : visualisation, normalisation and significance testing for pathogens –detection microarray data*. Genome Biology, 8 : R190, 2007.
6. ZSIAZEK T.G., *et al.*, (26 Authors), *A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome*, New England Journal of Medicine, 348 : 1953-1966, 2003.

*(School of Veterinary Medicine and Science University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, Leicestershire, UK).*

\*  
\* \*

## II

### MASSIVELY PARALLEL SEQUENCING : A NEW TOOL IN VIRUS DISCOVERY AND VACCINE SAFETY

par

D. ONIONS (University of Glasgow – G.B)<sup>1</sup> (\*)

The majority of new pharmaceutical products entering the market are complex biological entities like monoclonal antibodies, recombinant proteins and vaccines. These products are produced in living cells with the attendant risks associated with contamination by viruses and other adventitious agents. In the last two years rotavirus vaccines have been found to be contaminated with porcine circoviruses and fermenters producing Cerezyme, used to treat Gaucher's disease, became contaminated with a vesivirus. In both cases, the viruses were derived from raw materials, porcine trypsin and bovine serum respectively, and neither virus was detected by conventional quality control measures of the raw materials.

The second source of potential contamination comes from the cell substrates which may harbour latent viruses. This is of most concern in development of vaccines where there is a move to use cell lines which may be tumourogenic in immunosuppressed animals. Since the cause of the tumourogenic transformation may not be known, there are concerns that these cells may have been transformed by oncogenic viruses. This problem is illustrated by the drive to develop vaccines for pandemic influenza.

Vaccination remains the principal means of control for seasonal influenza virus infections and is the core strategy in pandemic influenza virus preparedness. The vast majority of influenza vaccines are produced in embryonated eggs, using decades-old technology, with one egg resulting in one vaccine dose. While egg produced vaccines have a long history of safety there are issues of bioburden using this production system and a very small proportion of vaccinees have an allergic reaction to egg protein (Coop *et al.* 2008 ; Zeiger *et al.*, 2002). The logistics of egg production require a six month lead time before vaccine production can begin and this inflexibility is one of the factors that can lead to vaccine shortages, as occurred in the 2004-05 season.

To provide for the increasing demand for seasonal influenza vaccines and to develop the production flexibility required for pandemic influenza preparedness, attention has turned to cell based production methods. These have systems have several advantages including, being permissive for a wider range of strains than eggs, rapid scalability, more antigenic fidelity of the vaccine virus to field strains (Robertson *et al.*, 1995) and the ability to exhaustively test cell banks for contaminating adventitious agents prior to production. However there have been concerns about potential virus contamination of the novel cell used to produce influenza vaccines.

<sup>1</sup> Invité par le Bureau en vertu de l'article 15 §3 du Règlement.



The safety of these vaccines, and other biological products, depends on testing raw material for free viruses (virions) and testing the cell substrate for latent as well as replicating viruses. In the latter case the virus may only be revealed by the presence of a latency associated transcript.

Massively parallel sequencing is a powerful new method to detect adventitious viruses that does not depend on prior assumptions of the types of viruses that may be present and is, therefore, able to detect viruses missed by other methods like degenerate or, family specific, PCRs (Onions and Kolman 2010). For example, Palacios *et al.* (2008) identified a new arenavirus in a transplant recipient, using unbiased high-throughput sequencing, after it had eluded detection by PCR and microarray strategies.

MP-Seq methods simultaneously analyse around a million different sequences each 300 to 400 base pairs (bp) long. In general about 750,000 reads are usable and the long read length is critical for identifying new viruses. While the sequencing is elegant, it is the bioinformatics that is critical for the detection of viruses, particularly ones that are novel. To detect viral sequences in the transcriptome, one has to identify a few viral transcripts amidst ~16, 000 to 20,000 cellular transcripts. The starting point is to detect matches against a curated viral database containing over 900,000 different sequences. However, a proportion of the initial matches are “false hits” because some viruses have incorporated cellular sequences into their genomes by recombination and the “hit” is really to those cellular sequences. For instance, bovine viral diarrhoea virus (BVDV) undergoes recombination with cellular RNA during the transition from a non-cytopathic to a cytopathic virus and acquires cellular, ubiquitin pathway, sequences. To exclude these false hits the first round viral hits are re-screened against all sequences in the nucleotide database (excluding viruses) and those with a better quality score against the nucleotide dataset are excluded. The remaining hits are scaffolded against their matched sequence in the database and contiguous sequences (contigs) are constructed from all the sequences in the analysis, not just those matching the viral database. This process ensures that the hit is not just to a repetitive region a problem that is significant when using arrays to detect viral sequences.

Using these methods, we have been able to demonstrate the presence of a nodavirus, in about 1 in 100 insect cells from a line used to produce biological products (Onions *et al.* 2011). This virus was already known to be present and its sequence was in the database. In order to test the robustness of the algorithm, this sequence and all other insect nodavirus sequences were removed from the database. The virus was still identifiable by low level homology to distantly related fish viruses and by analysing the contigs we were able to completely reconstruct the entire genome of the virus.

Similarly using these methods we identified the expression of a novel retrovirus in Vero cells a line that is widely used in vaccine manufacture (Onions *et al.*, 2011). When applied to raw materials like serum, MP-Seq methods uncovered new viruses present at high titre that had been missed by other techniques. These have included novel parvoviruses (Allendar *et al.*, 2001 ; Onions and Kolman 2010) kobuviruses and noroviruses (Onions *et al.*, 2011 ; Onions 2011).

In conclusion, MP-Seq methods have ushered in a new phase of virus discovery and has provided the tools to ensure the highest level of biosafety for the next generation of therapeutic products.

## SUMMARY

The introduction of new sequencing technologies is revolutionizing virus discovery and providing a new means to demonstrate the safety of vaccines. Since these methods do not depend on prior assumptions of the types of viruses that may be present, they have detected viruses missed by other methods like degenerate or, family specific, PCRs. We have used massively parallel sequencing (MP-Seq) to detect new viruses in bovine serum and in the faeces of animals. When applied to sequencing the transcriptome, MP-Seq can reveal latent or silent infections. While the sequencing technology is impressive, it is bioinformatics that is the key to its successful application.

## BIBLIOGRAPHY

1. ALLANDER T., EMERSON S.U., ENGLE R.E., PURCELL R.H., BUKH J., *A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2001 Sep. 25 ;98(20) :11609-14. Epub. Sep. 18, 2001.
2. COOP C.A., BALANON S.K., WHITE K.M., WHISMAN B.A., RATHKOPF M.M., *Anaphylaxis from the influenza virus vaccine*, Int. Arch. Allergy Immunol. 2008 ;146(1) :85-8. Epub. Dec 14, 2007.
3. ONIONS D., COTE C., LOVE B., TOMS B., KODURI S., ARMSTRONG A., CHANG A., KOLMAN J., *Ensuring the safety of vaccine cell substrates by massively parallel sequencing of the transcriptome*, Vaccine, 2011 Sep. 22 ;29(41) :7117-21. Epub. Jun 7, 2011.
4. ONIONS D., KOLMAN J., *Massively parallel sequencing, a new method for detecting adventitious agents*, Biologicals, 2010 May ;38(3) :377-80. Epub. Mar 24, 2010.
5. ONIONS D., *overview of technologies to detect adventitious agents*, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology November/December vol. 65 n°6 654-659, 2011.
6. PALACIOS G., DRUCE J., DU L., TRAN T., BIRCH C., BRIESE T., CONLAN S., QUAN P.L., HUI J., MARSHALL J., SIMONS J.F., EGHOLM M., PADDOCK C.D., SHIEH W.J., GOLDSMITH C.S., ZAKI S.R., CATTON M., LIPKIN W.I., *A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases*, N. Engl. J. Med. Mar 6 ;358(10) :988-9, 2008.
7. ROBERTSON J.S., COOK P., ATTWELL A.M., WILLIAMS S.P., *Replicative advantage in tissue culture of egg-adapted influenza virus over tissue-culture derived virus : implications for vaccine manufacture*, Vaccine 13 :1583-8, 1995.
8. ZEIGER R.S., *Current issues with influenza vaccination in egg allergy*. J. Allergy Clin. Immunol. 110 :834-40, 2002.

(Phd MedSci. DVMS(hon) FRSE CSO BioReliance/SAFC).

\*  
\* \*

La séance fut clôturée par une réception qui se déroula ensuite à partir de 12h15.

\*  
\* \*

## TABLE DES MATIÈRES

---

### Séance publique du 22 octobre 2011

#### Lectures

Globalization of Chagas disease (American trypanosomiasis) : the situation in Europe and Belgium, par Y. Carlier (U.L.B.), membre ordinaire ..... 347

Discussion ..... 356

Dialogue moléculaire entre trypanosomes africains et l'homme, par E. Pays (U.L.B.), membre titulaire ..... 358

Discussion ..... 364

\*

\* \*

Présentation d'ouvrage..... 366

Discours d'entrée du Secrétaire perpétuel Pr. A. Ferrant ..... 366

Communications du Bureau et correspondance ..... 367

\*

\* \*

Comité secret :

Election des Présidents et Secrétaires des Sections pour l'année 2012 ..... 368

\*

\* \*

### Séance publique du 26 novembre 2011

Eloge académique du Professeur R. Limet, membre titulaire, par le Pr A. Albert, membre ordinaire ..... 373

#### Lectures

La création d'une transplantation trachéale vascularisée, par P. Delaere (K.U.L.), invité..... 377

Discussion ..... 380

Liver transplantation or Starzl's legacy. A look backward, a look forward,  
par J. Lerut (U.C.L.), invité ..... 381

Discussion ..... 389

\*  
\* \*

Présentation d'ouvrage ..... 390

Communications du Bureau et correspondance ..... 391

Comité secret :

Renouvellement du Bureau pour l'exercice 2012 ..... 391

Questions de concours ordinaires (période 2012-2013 ..... 392

\*  
\* \*

### **Séance publique du 17 décembre 2011**

#### **Lectures**

Discours d'accueil, par le Pr P.-P. Pastoret,  
Président de l'Académie royale de Médecine de Belgique ..... 397

New Viral Pathogens from Wildlife,  
par P. Barrow (University of Nottingham – G.B.), invité, et coll ..... 399

Massively Parallel Sequencing : A New Tool in Virus Discovery and Vaccine  
Safety, par D. Onions, (University of Glasgow – G.B.), invité ..... 404

\*  
\* \*