Institut de Microbiologie — Lausanne

NEWSLETTER 2019

Institut universitaire de microbiologie
Rue du Bugnon 48
CH-1011 Lausanne

DANS CE NUMÉRO :

Utilisation des lignées cellulaires : avantage ou inconvénient ? 2

Détection de la rougeole par PCR 3

PCR Kingella 4

Analyse du génome de la nouvelle espèce Kingella negevensis 5

La recherche sur Waddlia, une bactérie apparentée aux chlamydia 6

L'imagerie d'infections fongiques 7

Développement d'une PCR rapide et semi-quantitative pour la détection de Pneumocystis jirovecii en premplacement de l'examen direct 8

Etude de la cible des échinocandines chez le champignon pathogène pour 'homme Pneumocystis jirovecii 9

Les virus géants 10

Interactions mentor-e/mentee, personne formatrice / stagiaire dans un domaine en constante évolution 11

Nouveau laboratoire de biosécurité BSL3 à l'Institut de Microbiologie 12

Automatisation 13

FAMH 14

Innovations 16

EDITORIAL GILBERT GREUB

La présente newsletter, résume les événements marquants en termes d'innovations de l'année 2017 et 2018. Elle présente également les changements majeurs dont l'automatisation de la bactériologie par un système BD Kiestra ainsi que la mise en place d'un nouveau laboratoire de biosécurité de niveau BSL3 à l'institut. Vous trouverez aussi divers développements dont les PCRs rougeole et Kingella.

Par ailleurs cette newsletter 2019 présente l'activité de certains groupes de recherches de notre institut, actifs dans les domaines de la mycologie, de la virologie et de la bactériologie.

Mentionnons également l'importance des relations entre techniciens-nes en analyse biomédicale et universitaires (biologistes, médecins) qui permettent d'offrir aux patients une grande variété de tests diagnostics, totalisant annuellement un chiffre d'affaires d'environ 18 millions de francs. Soulignons également l'importance des relations entre mentors et mentees à la fois dans le secteur diagnostic et dans le secteur recherche, secteur où notre institut est très impliqué avec de nombreux étudiants Ph.D., MD Ph.D. et postdoctorants-tes dont les travaux de qualité sont régulièrement sanctionnés par des prix et valorisés par des publications de haut niveau.

J'espère que ce numéro 2019 de la newsletter vous permettra de découvrir les activités effectuées au sein de notre institut dans les domaines du diagnostic, de la recherche et à l'interface (R&D).

Je vous souhaite une bonne lecture et de bonnes vacances d'été.

Lausanne,
le 15 juin 2019

UTILISATION DES LIGNÉES CELLULAIRES : AVANTAGE OU INCONVENIENT ?

Angela Ciuffi

« Les lignées cellulaires présentent des défauts dans les voies d'immunité innée»

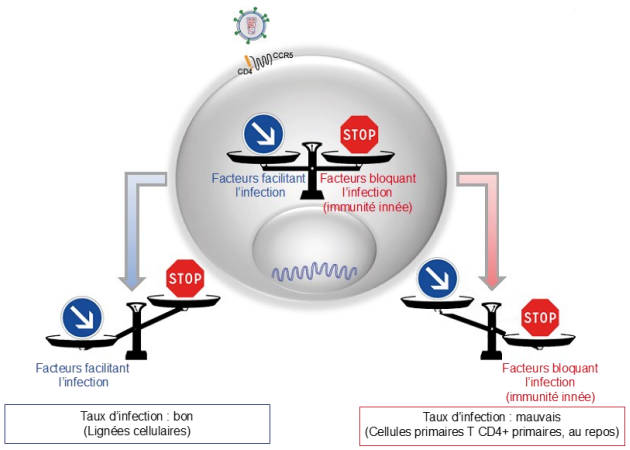
Les lignées cellulaires sont souvent utilisées en biologie expérimentale car elles offrent de nombreux avantages : quantité « illimitée » de cellules, reproductibilité, faciles à cultiver *in vitro*, bonne productivité. En virologie par exemple, ces cellules tumorales sont souvent utilisées comme modèle car elles sont généralement plus facilement infectables que des cellules primaires. C'est le cas des lignées lymphocytaires SupT1, Jurkat ou CEM couramment utilisées dans les modèles d'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). On oublie souvent que ces cellules sont tumorales, et que par conséquent, elles présentent certaines caractéristiques particulières en plus de leur capacité à se diviser : en effet, nous avons montré que la plupart de ces cellules tumorales présentaient un système de défense immunitaire déficient (1).

En effet, le succès de l'infection d'une cellule résulte d'un équilibre entre les protéines cellulaires nécessaires ou facilitant l'infection et les protéines cellulaires de défense de l'hôte (ou immunité innée) qui essaient de stopper l'infection (Figure, panel A). A l'aide d'analyses transcriptomiques, nous avons pu montré que les cellules primaires T CD4+ au repos différaient considérablement des cellules primaires T CD4+ activées et des lignées lymphocytaires, notamment au niveau des gènes impliqués dans les voies de l'immunité innée (Figure, panel B). C'est précisément grâce à la faible expression des gènes impliqués dans l'immunité innée que les lignées cellulaires sont plus susceptibles aux infections.

Il faut donc faire attention aux interprétations biologiques effectuées dans ces lignées cellulaires, car elles ne présentent pas les mêmes mécanismes de défense d'immunité innée que les cellules primaires.

Référence :
1) Rausell A, Muñoz M, Martinez R, Roger T, Telenti A and Ciuffi A, *Innate immune defects in HIV permissive cell lines*, Retrovirology (2016)

A



B

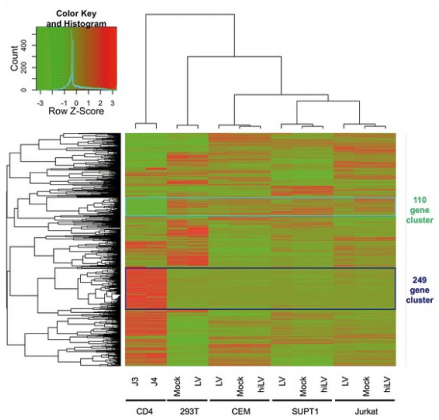


Figure : **Différences entre les lignées cellulaires et les cellules primaires.**

(A) Le succès d'une infection dépend de l'équilibre entre facteurs facilitant ou bloquant l'infection.

(B) Expression différentielle de 1473 gènes de l'immunité innée (lignes). Les gènes peu exprimés sont en vert et les gènes fortement exprimés sont en rouge. Nous avons identifié un set de gènes faiblement exprimé (rectangle bleu ciel : 110 gènes) et un set de gènes fortement exprimé (rectangle bleu foncé : 249 gènes) dans les cellules primaires T CD4 isolées de deux donneurs sains (CD4 : J3 et J4) par rapport aux lignées cellulaires (293T, CEM, SupT1, Jurkat – infectées ou non).

DETECTION DE LA ROUGEOLE PAR PCR

Katia Jaton et Gilbert Greub

La rougeole n'est pas spécifiquement une maladie d'enfance : elle peut survenir à tout âge. Avant l'introduction de la vaccination, elle touchait pratiquement chaque personne, généralement durant l'enfance, et cela dans le monde entier. Depuis l'introduction du vaccin, elle a fortement régressé et a même entièrement disparu (à l'exception de quelques cas importés) de nombreuses régions et continents, notamment du continent américain.

Même durant les années sans épidémie, la Suisse enregistre une cinquantaine de cas de rougeole par an. En cas d'épidémie, ce chiffre peut grimper jusqu'à 2000. Dans les pays industrialisés, la mortalité liée à la rougeole concerne actuellement 1 à 3 personnes sur 10 000 malades. Dans les pays en voie de développement, elle touche souvent 300 à 500 personnes sur 10 000 malades, voire parfois davantage.

Cette progression vers l'élimination de la rougeole a été interrompue en 2016 par un quasi doublement du nombre de cas, tendance qui se poursuit actuellement due à une couverture vaccinale insuffisante.

Développement et performance :

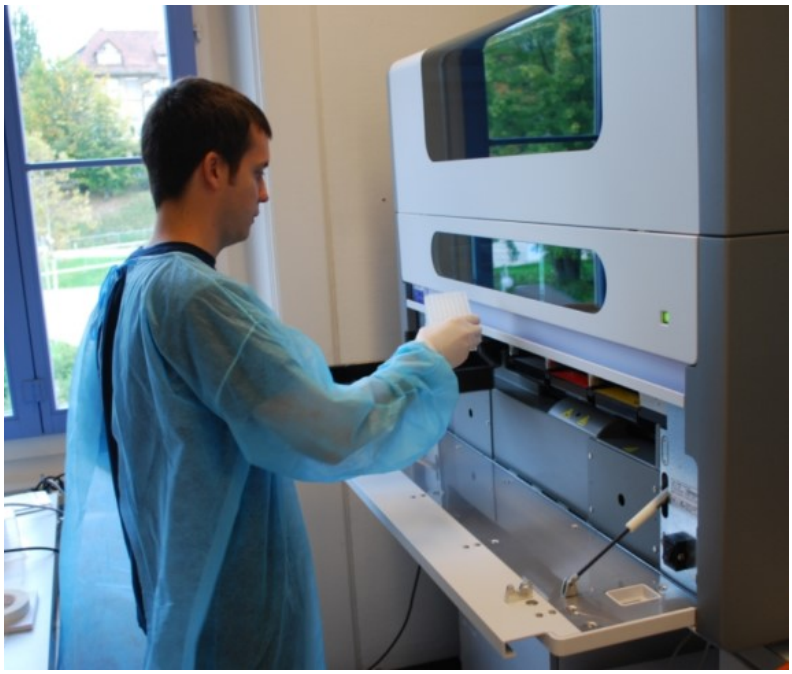
Pour ces raisons épidémiologiques nous avons décidé d'implémenter à Lausanne dans notre laboratoire la PCR rougeole, jusqu'à présent effectuée aux HUG de Genève. Ce transfert de technologie a pu être rapidement effectué grâce à l'aide des HUG et nous proposons cette PCR en temps réel depuis le 1er mai 2017. Cette PCR est basée sur la publication de El Mubarak (1) et al, avec quelques modifications. Elle est basée sur une amplification en temps réel du gène codant pour les protéines nucléiques de ce virus (MV nucleoprotein). Nous avons ensuite testé cette PCR rétrospectivement sur des prélèvements cliniques positifs et négatifs ainsi que sur des contrôles de qualité externes européens. Nous avons eu 100% de concordance avec les résultats des HUG ainsi qu'avec les résultats de l'organisme de contrôle européen de Glasgow (QCMD).

Ce test est effectué principalement sur les **frottis de gorge**.

Références :

1) Mubarak et al. *Development of a semi-quantitative real-time RT-PCR for the detection of measles virus.* Journal of Clinical Virology 32 (2005) 313-317.

« La PCR rougeole, un outil nécessaire vu l'augmentation récente du nombre de cas»



PCR KINGELLA

Katia Jaton et Gilbert Greub

« Une nouvelle PCR duplex pour la détection de Kingella Kingae»

Détection de *Kingella kingae*

Kingella kingae est une bactérie commensale des voies respiratoires supérieures dont la première niche se situe au niveau de l'oropharynx. Il existe plusieurs espèces de *Kingella* mais *K. kingae* est le plus fréquemment signalé comme cause d'endocardite, de pneumonie, de septicémies et d'infection ostéo-articulaires surtout chez les jeunes enfants. Cette bactérie Gram négative est inclue dans le groupe HACEK (germes à croissance lente responsables d'endocardite). Le diagnostic d'une infection ostéo-articulaire est difficile à poser car cette bactérie pousse très difficilement. Le faible inoculum bactérien des prélèvements d'origine ostéo-articulaire explique également pourquoi les cultures demeurent généralement négatives.

Nous avons mis au point une « PCR en temps réel » ciblant 2 gènes particuliers :
i) le gène *rtx*A qui code pour un facteur important de la virulence, une cytotoxine nommée Rtx (Repeats in toxin). Cette toxine est une protéine riche en aspartate et glycine situés dans la partie C-terminale de la protéine et qui facilitent son export hors de la cellule bactérienne.
ii) le gène *cpn60* qui code pour la protéine chaperonne Cpn60 (60 kDa) aussi appelée Hsp60. Les protéines chaperonnes sont importantes car elles protègent les protéines de chocs thermiques (heat shock proteins) et jouent un rôle important dans l'organisation spatiale, la conformation et la stabilité des protéines qu'elles protègent.

Développement et performance :

Nous avons fait un développement conforme à notre système R&D, avec une optimisation des paramètres des 2 PCR, puis la mise au point d'une PCR duplex c'est-à-dire ciblant les 2 gènes lors de la même réaction. Une évaluation de la spécificité a également été conduite. Puis une évaluation rétrospective a été effectuée démontrant 100% de concordance avec les résultats de PCR effectuées par le laboratoire à qui nous sous-traitions auparavant ces prélèvements.

Type de prélèvement :

Ce test peut être effectué sur les **liquides articulaires et les échantillons d'os**, de patients susceptibles (principalement les enfants) d'avoir une infection ostéo-articulaire due à ce germe. Il a également été démontré que la détection de *K. kingae,* dans les **frottis oropharyngés** d'enfant avec une clinique suggestive, était prédictif d'une infection ostéo-articulaire. (1).

Références :

1) Ceroni et al, *Detection of Kingella kingae osteoarticular infections in children by oropharyngeal swab PCR.* Pediatrics. 2013 Jan;131 (1):e230-5. doi: 10.1542

ANALYSE DU GÉNOME DE LA NOUVELLE ESPÈCE *KINGELLA NEGEVENSIS*

Onya Opota, Sacha Laurent et Gilbert Greub

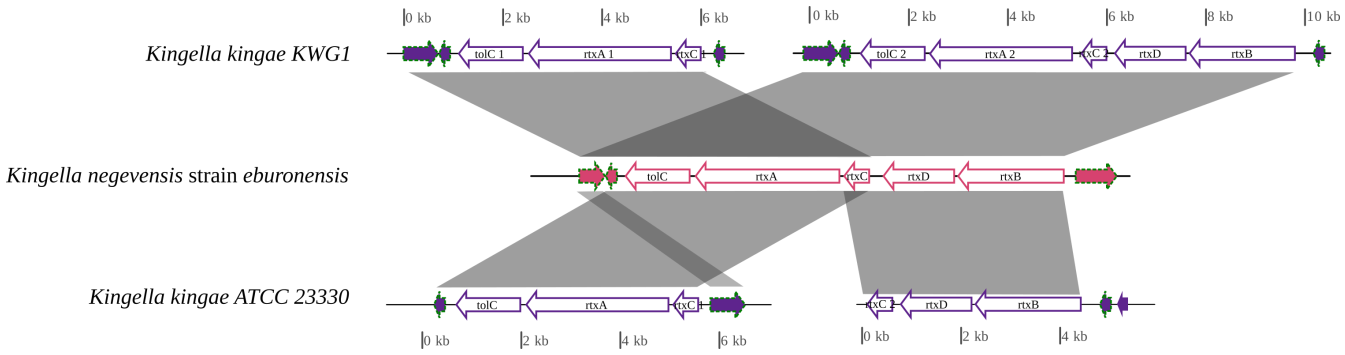
Le coccobaccille Gram négatif *Kingella kingae* revêt une importance médicale particulière puisqu'il peut être à l'origine d'infections juvéniles provoquant des ostéo-arthrites, des endocardites et des septicémies. La toxine Rtx, dont le gène est l'une des deux cibles du diagnostic moléculaire réalisé dans notre institut, joue un rôle important dans la pathogénicité de ce germe. Après un diagnostic incertain par MALDI-TOF d'un germe comme appartenant au genre *Kingella*, la double PCR utilisée pour diagnostiquer *K. kingae* sur ce même germe fut positive pour le gène codant pour la toxine Rtx mais négatif pour celui codant pour la chaperonne Cpn60. Ces résultats intrigants ont motivé un séquençage complet de cette souche, qui fut réalisé avec le MiSeq (Illumina) disponible dans notre institut. L'analyse bioinformatique du génome de cette souche et la comparaison avec les autres espèces du genre *Kingella* ont conclu qu'elle appartenait à une nouvelle espèce du genre *Kingella*, nommée *Kingella negevensis*. L'analyse des facteurs de virulence de notre souche détermina, qu'en plus de l'ensemble de l'opéron permettant la synthèse et l'export de la toxine Rtx, que des gènes permettant la synthèse de capsules polysaccharides et d'adhésines étaient présents, ainsi qu'un système de sécrétion de type V. L'analyse bioinformatique permet ainsi de suspecter que le pouvoir pathogène de *K. negevensis* est similaire à celui de *K. kingae*. L'identification et la détection de facteurs de virulence grâce au séquençage de haut débit effectué lors de l'évaluation de ce cas est un bon exemple du rôle que ces nouvelles technologies peuvent jouer dans un institut de diagnostic.

«Kingella negevensis, une nouvelle espèce dont le rôle pathogène est probablement similaire à celui de K. Kingae»

Références :

1) A, Ceroni D, Ferey S, Emonet S, Schrenzel J. *Avez vous pensé à K. kingae ?* Revue Médicale Suisse

2) Opota O, Laurent S, Pillonel T, Léger M, Trachsel S, Prod'hom G, Katia J, Greub G. *Genomics of the new species Kingella negevensis: diagnostic issues and identification of a locus encoding a RTX toxin*, Microbes and Infections.



La recherche sur Waddlia, une bactérie apparentée aux chlamydia

Gilbert Greub

« Waddlia, un nouvel agent de fausses couches»

Waddlia chondrophila est une bactérie apparentée aux chlamydia dont le rôle dans la fausse couche a été suggéré par plusieurs travaux effectués au sein du groupe du Prof. G. Greub (1, 2). Depuis, la disponibilité du génome nous a permis d'étudier, de manière extensive, la division de cette bactérie (3-5) ainsi que la régulation de l'expression des gènes (6-7). De plus, des modèles animaux ont permis de renforcer la suspicion de l'importance du rôle de Waddlia comme agent infectieux de fausse couche, d'une part, et d'infection respiratoire, d'autre part (8-9) Plus récemment, une étude clinique a également suggéré un possible rôle de *Waddlia* dans l'infertilité d'origine tubaire (10). Dans ce contexte des tests diagnostiques sont mis à disposition des médecins, tests qui incluent une PCR en temps réel (10) et une sérologie de type ELISA (11-12). Cette PCR est disponible à des fins diagnostiques au sein de notre laboratoire accrédité. De plus, un effort a été effectué afin de déterminer quels antibiotiques se révèlent particulièrement efficaces sur ce germe. De manière intéressante, contrairement aux chlamydia, très bien étudiés, *Waddlia* se révèle être totalement résistant aux quinolones en raison de mutations ponctuelles au niveau des gènes codant pour la DNA gyrase et la topoisomérase. (13)

Références :

1) D Baud, V Thomas, A Arafa, L Regan, G Greub. *Waddlia chondrophila, a potential agent of human fetal death.* Emerging infectious diseases 2007

2) Baud D, Goy G, Osterheld MC, Borel N, Vial Y, Pospischil A, Greub G. *Waddlia chondrophila: from bovine abortion to human miscarriage*. Clin. Infec Dis. 2011 Jun 15;32(12):1469-71

3) Jacquier N[1], Frandi A[2], Pillonel T[1], Viollier PH, Greub G[1]. *Cell wall precursors are required to organize the chlamydial division septum*. Nat Commun. 2014

4) Frandi A[1], Jacquier N[2], Théraulaz L[1], Greub G[2], Viollier PH[1]. *FtsZ-independent septal recruitment and function of cell wall remodelling enzymes in chlamydial pathogens.* Nat Commun. 2014

5) Jacquier N[1], Frandi A[2], Viollier PH[3], Greub G[4]. *Disassembly of a Medial Transenvelope Structure by Antibiotics during Intracellular Division*. Chem Biol. 2015

6) De Barsy M[1], Frandi A[2], Panis G[2], Théraulaz L[2], Pillonel T[1], Greub G[1], Viollier PH[2]. *Regulatory (pan-)genome of an obligate intracellular pathogen in the PVC superphylum*. ISME J. 2016

7) Barsy M, Herrgott L, Martin V, Pillonel T, Viollier PH, Greub G. *Identification of new DNA-associated proteins from Waddlia chondrophila*. Sci Rep. 2019 Mar 20;9(1):4885. doi: 10.1038/s41598-019-40732-1.

8) Vasilevsky S[1], Stojanov M[1], Greub G[2], Baud D[1] *Chlamydial polymorphic membrane proteins: regulation, function and potential vaccine candidates.* Virulence. 2016

9) Pilloux L[1], Casson N[1], Sommer K[2], Klos A[2], Stehle JC[3], Pusztaszeri M[4], Greub G[5]. *Severe pneumonia due to Parachlamydia acanthamoebae following intranasal inoculation: a mice model.* Microbes Infect. 2015

10) Verweij SP[1], Kebbi-Beghdadi C[2], Land JA[3], Ouburg S[4], Morré SA[5], Greub G[6]. *Waddlia chondrophila and Chlamydia trachomatis antibodies in screening infertile women for tubal pathology.* Microbes Infect. 201 5

11) Goy G[1], Croxatto A, Posfay-Barbe KM, Gervaix A, Greub G. *Development of a real-time PCR for the specific detection of Waddlia chondrophila in clinical samples.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009

12) Lienard J[1], Croxatto A[1], Gervaix A[2], Posfay-Barbe K[2], Baud D[3], Kebbi-Beghdadi C[1], Greub G[1]. *Undressing of Waddlia chondrophila to enrich its outer membrane proteins to develop a new species-specific ELISA*. New Microbes New Infect. 2014

13) Kebbi-Beghdadi C, Lienard J, Uyttebroeck F, Baud D, Riederer BM, Greub G. *Identification of immunogenic proteins of Waddlia chondrophila.* PLoS One. 2012;7(1):e28605.

14) Goy G, Greub G. *Antibiotic susceptibility of Waddlia chondrophila in Acanthamoeba castellanii amoebae*. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Jun;53(6):2663-6.

L'IMAGERIE D'INFECTIONS FONGIQUES

Stéphane Dorsaz, Alix Coste, D. Sanglard

Candida albicans est l'un des principaux pathogènes fongiques causant diverses maladies chez l'homme. Ces maladies sont bénignes si elles se manifestent sur les tissus superficiels mais elles peuvent être mortelles, si *C. albicans* atteint les organes vitaux, notamment chez des patients immunodéprimés. L'efficacité des médicaments qui permettent de lutter contre les infections fongiques est limitée puisque 40 à 60% des patients infectés peuvent encore mourir lors d'infections invasives. Il existe donc un besoin d'approches thérapeutiques nouvelles. Ceci nécessite l'acquisition d'une connaissance approfondie des agents pathogènes fongiques et de leur pathogenèse.

L'un des aspects clés de nos recherches est de pouvoir entreprendre des expérimentations animales pour tester de nouveaux médicaments ou pour suivre le sort de l'infection au fil du temps avec et sans traitement. Le développement de technologies d'imagerie *in vivo* non-invasives est un élément important dans les approches d'expérimentation animale.

Nous avons utilisé dans notre laboratoire la bioluminescence émise par une luciférase de luciole (firefly) exprimée chez *C. albicans* infectant des souris (1). Cette luciférase a été modifiée pour émettre une lumière dans les longueurs d'ondes élevées (600-700 nm) ainsi que pour améliorer la stabilité de la protéine dans les conditions d'infection. En utilisant un équipement d'imagerie multimodale à haute résolution, nous avons suivi des infections à *C. albicans* par la capture de

bioluminescence dans un modèle de souris (Fig. 1). Le système testé est très sensible et permet la détection d'un petit nombre de cellules de *C. albicans* chez l'animal infecté (par exemple 200 cellules par rein). Il est également possible de suivre l'évolution d'une infection au cours du temps sans recourir au sacrifice des souris (1).

Enfin, des traitements antifongiques ont été testés par bioluminescence. Nos expériences ont constamment montré que cette technologie pouvait être utilisée comme une lecture des charges fongiques et donc de l'évolution de l'infection. En conclusion, notre expérience dans l'imagerie d'infections à *C. albicans* par bioluminescence a été positive et sert maintenant de base solide à nos projets de recherche.

« Nous suivons les infections à C. albicans par la capture de bioluminescence »

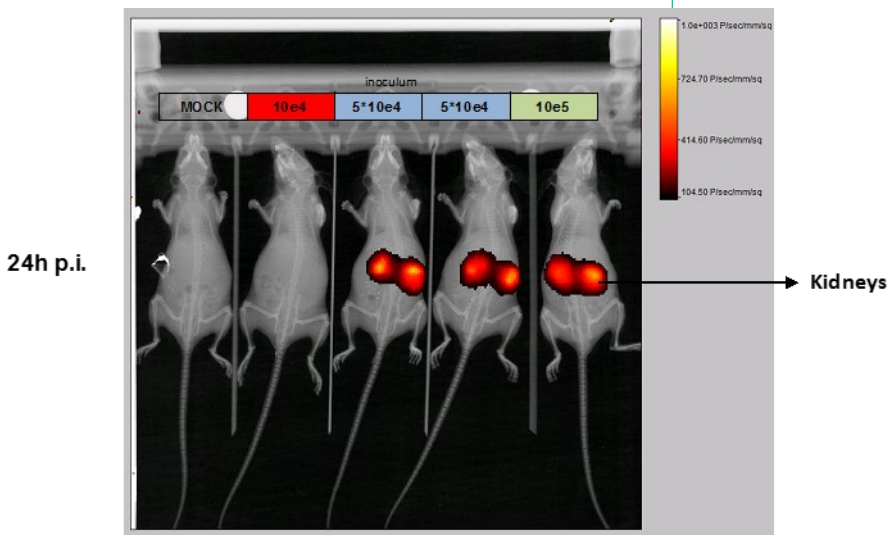


Figure 1 : Bioluminescence de *C. albicans* chez la souris. Les souris ont été infectées par différentes doses (indiquées dans les rectangles colorés) par voie intraveineuse. La souris "mock" n'est pas infectée. A noter que la dose de 10^4 cellules ne permet pas d'établir une infection. La capture d'images a été réalisée 24 h après l'infection (24 p.i.) en 2 temps par X-rays et par capture de lumière. Les 2 images sont ensuite superposées pour situer le foyer infectieux dans le corps de l'animal. Une échelle de luminescence (photons/sec/mm^2) permet de quantifier les signaux émis par *C. albicans*.

Références :

1) Dorsaz, S., Coste, A.T., Sanglard, D. (2017). *Red-shifted firefly luciferase optimized for Candida albicans in vivo bioluminescence imaging.* Frontiers in Microbiology (in-press).

Développement d'une PCR rapide et semi-quantitative pour la détection de Pneumocystis jirovecii en remplacement de l'examen direct

René Brouillet, Jean-Gaël Diserens, Alix T. Coste, Frédéric Lamoth, Philippe Hauser, Gilbert Greub and Katia Jaton.

« Mieux interpréter les résultats grâce à la notion de quantité »

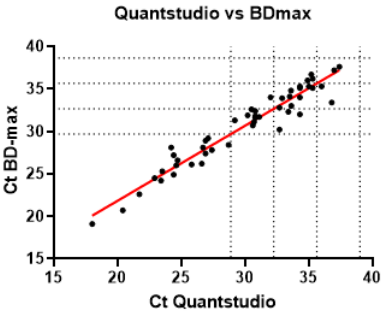
Situation:

Pneumocystis jirovecii (PCJ) est un agent pathogène opportuniste causant des infections chez les patients immunosupprimés. Le diagnostic conventionnel est effectué sur des échantillons respiratoires par microscopie. Cependant, la PCR présente une sensibilité plus élevée et permet une quantification précise. Au CHUV, nous avons développé une RT-PCR quantitative sur notre plateforme moléculaire qui permet de corréler le nombre de copies d'ADN de PCJ à la signification clinique (P # 2194, ECCMID 13-16 AVRIL 2019 AMSTERDAM, PAYS-BAS). Cependant, notre plateforme a un TAT de 4 heures et est ouverte 5/7 jours par semaine. Nous avons donc décidé de transférer cette PCR maison sur le système rapide BD MAXTM (BD Diagnostics) qui donne des résultats en 90 minutes, 7 jours sur 7. Cette première étape permettait d'obtenir un résultat rapide mais seulement qualitatif (positif ou négatif) et la quantification était ensuite donnée le jour ouvrable suivant par la PCR sur notre plateforme.

La deuxième étape a consisté à extrapoler la quantité de PCJ à partir du Ct (cycle threshold) obtenu sur le BD MAXTM afin de donner aux cliniciens un résultat quantitatif permettant ainsi d'interpréter immédiatement la relevance clinique du test.

Méthodes :

Une étude prospective sur 247 échantillons respiratoires a été réalisée pour comparer les deux systèmes de PCR cad 1) PCR home made sur la plateforme IMU où la quantification se fait sur une droite de régression en fonction du Ct (nombres de copies / ml) et 2) la PCR sur le système BD MAXTM où la quantification se fait grâce à l'extrapolation du Ct obtenu et extrapolé sur le Ct de la plateforme.



cp/ml	Ct Quantstudio	Ct BDmax
100	39	38.63
1000	35.63	35.65
10000	32.25	32.66
100000	28.87	29.68

Résultats :

Sur 247 échantillons, 8 n'ont pas été pris en compte dans notre analyse en raison de problèmes techniques sur l'une ou l'autre des plateformes. Sur les 239 échantillons restants, 18 n'étaient pas concordants en raison de très faibles quantités d'ADN (valeur de Ct élevée) ne correspondant pas à une quantité cliniquement significative de PCJ. Sur les 49 positifs sur les deux plates-formes, une bonne corrélation (R2 = 0,93) des valeurs de Ct entre les deux systèmes a été observée avec une différence moyenne de 0,68 ± 1,3 Ct (système BD MAXTM Ct - plate-forme moléculaire Ct).

Conclusion :

Ces résultats nous permettent d'extrapoler le nombre de copies de l'ADN PCJ pour une valeur Ct donnée obtenue avec le système rapide BD MAXTM, permettant ainsi aux cliniciens d'interpréter un résultat positif en fonction de la situation clinique. Nos résultats sont commentés selon le tableau ci-dessous.

Ct	Copies/ml	commentaire
≥ 35	≤ 10^e3	Faible quantité (≤ 10^e3). Colonisation probable. Situation clinique à évaluer.
35-32.5	10^e3 – 10^e4	Quantité moyenne de copies/ml (≤10^e4 copies/ml). Interprétation difficile. Situation clinique à évaluer.
< 32.5	> 10^e4	Quantité significative de copies (>10E4 copies/ml) parlant en faveur d'une infection.

En raison de ces résultats, l'examen direct pour PCJ a été arrêté et remplacé par le système de PCR rapide 7/7 jours.

ETUDE DE LA CIBLE DES ÉCHINOCANDINES CHEZ LE CHAMPIGNON PATHOGÈNE POUR L'HOMME *PNEUMOCYSTIS JIROVECII*

Amanda Luraschi et Philippe Hauser

Pneumocystis jirovecii est un champignon causant des pneumonies potentiellement fatales chez les individus immunocompromis (PCP, *Pneumocystis* pneumonia). La recherche sur ce pathogène est compliquée par l'absence de méthode de culture *in vitro*. Néanmoins, grâce aux techniques de séquençage à haut débit, nous sommes parvenu à séquencer et assembler son génome à partir de la flore microbienne présente dans les poumons d'un patient infecté par *P. jirovecii* (Cissé, Pagni, Hauser. mBio 4: e00428-12, 2012). La séquence de ce génome ouvre de nouveaux axes de recherche. L'un de ceux que nous suivons actuellement est la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Ceci est crucial car *P. jirovecii* semble développer une résistance au traitement le plus efficace qui est actuellement disponible, le Bactrim. Notre approche présente l'avantage que les cibles qui sont celles à inhiber sont étudiées, et non plus celles des espèces cousines de *Pneumocystis* qui infectent les modèles animaux de la maladie. Récemment, nous avons identifié la cible des échinocandines, la sous-unité catalytique de la 1,3-β glucane synthase. Le gène codant pour cette sous-unité a été exprimé dans une souche de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dont le même gène a été préalablement supprimé. L'expression du gène de *P. jirovecii* a restauré le phénotype sauvage à la souche, prouvant la fonction de ce gène (Figure; Luraschi, Cissé, Pagni, Hauser. J. Euk. Microbiol. doi:10.1111/jeu.12385, 2016). Nous utilisons actuellement cette souche complémentée afin d'étudier la sensibilité de l'enzyme de *P. jirovecii* aux échinocandines. Ceci permettra d'évaluer si ces antifongiques pourraient être utiles pour traiter les pneumonies à *Pneumocystis*.

« La caspofongine est-elle une alternative pour traiter la PCP ?»

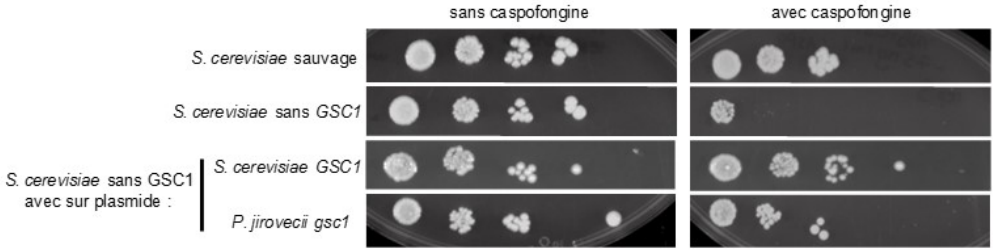


Figure :
Démonstration de la fonction du gène codant pour la sous-unité catalytique de la 1,3-b glucane synthase (GSC1) de *P. jirovecii* par complémentation fonctionnelle chez *S. cerevisiae*. Des échantillons de dilutions de dix en dix d'une culture de chaque souche ont été déposés sur un milieu de croissance sans et avec l'échinocandine caspofongine. Le phénotype d'hyper-sensibilité de la souche de *S. cerevisiae* sans gène GSC1 est corrigé par l'expression sur un plasmide du gène GSC1 de *P. jirovecii*.

LES VIRUS GÉANTS

Gilbert Greub et Stefan Kunz

« Lausannevirus et Cedratvirus lausannenis ; deux virus géants découverts à Lausanne»

Par hasard, un virus géant à été découvert par notre équipe à Lausanne et appelé par conséquent Lausannevirus.

En 2017, les travaux sur le Lausannevirus ont permis, notamment, de découvrir l'importance des endonucléases dans la capacité de Lausannevirus à proliférer en présence d'un compétiteur, en l'occurrence une bactérie intracellulaire découverte également à Lausanne et appelée *Estrella lausannensis*. Ces endonucléases virales se sont retrouvées mutées à plusieurs reprises dans différentes cocultures du Lausannevirus effectué en présence de cette bactérie Estrella. Ces travaux ont également montrés que d'une manière surprenante, le Lausannevirus peut avoir deux types de comportements :

- une réplication lytique extrêmement rapide, conduisant à la lyse cellulaire précoce et à des titres viraux élevés, de l'ordre de 10^6 virus par millilitre.
- Un virus plutôt latent, aboutissant à un titre de, seulement 10^2 virus par millilitre.

Ces « Set point » rappellent, de manière étonnante, la capacité réplicative extrêmement importante de certains virus à haut pouvoir pathogène, d'une part, dont par exemple le virus de la grippe. D'autre part, la forme latente typique de certains virus dont l'agent de la mononucléose infectieuse (Epstein-Barr) qui se retrouve souvent en moins grande quantité et latent.

Les travaux sur Lausannevirus ont également permis de découvrir la possibilité de traiter et inactiver ce virus grâce à un antibiotique agissant sur la voie de synthèse des folates (2). Notons que ce médicament avec effet antifolate efficace in vitro sur Lausannevirus, le Proguanil, est utilisé comme traitement pour la malaria et pourrait être utilisé si un jour, un cas d'infection à Lausannevirus venait à être documenté.

Le laboratoire de recherche sur les virus géants a également découvert un autre virus gigantesque, appelé *Cedratvirus lausannensis*. Ce virus, appartenant à la famille des pithoviridae se caractérise par une structure ressemblant à un citron avec deux petites ouvertures à chaque bout. Le génome de ce virus géant, qui contient près de 6 mille paires de base d'ADN, présente une biologie inhabituelle, puisqu'il est capable de se répliquer dans des fabriques de virus intra-cytoplasmiques, contrairement aux virus habituels qui se répliquent au niveau des noyaux cellulaires. Notons que ces virus en forme d''amphores ont la capacité de se multiplier extrêmement rapidement conduisant à la lyse de leurs hôtes, l'amibe du genre *Acanthamoeba* en moins de 24 heures.

Le groupe sur les virus géants, codirigé par les professeurs S. Kunz et G. Greub, vise à mieux comprendre la biologie de ces virus, leurs évolutions ainsi que leurs rôles possible pathogènes.

Références :

1) Bertelli C, Mueller L, Thomas V, Pillonel T, Jacquier N, Greub G. *Cedratvirus lausannensis - digging into Pithoviridae diversity*. Genome Biol Evol. 2017 Jun 1

2) Mueller L, Bertelli C, Pillonel T, Salamin N, Greub G. *One Year Genome Evolution of Lausannevirus in Allopatric versus Sympatric Conditions.* Environ Microbiol. 2017 Oct;19

3) Mueller L, Hauser PM, Gauye F, Greub G. *Lausannevirus Encodes a Functional Dihydrofolate Reductase Susceptible to Proguanil.* Antimicrob Agents Chemother. 2017 Mar 24

4) Mueller L, Baud D, Bertelli C, Greub G. *Lausannevirus seroprevalence among asymptomatic young adults*. Intervirology. 2013

5) Thomas V, Bertelli C, Collyn F, Casson N, Telenti A, Goesmann A, Croxatto A, Greub G. *Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets.*Environ Microbiol. 2011 Jun

Interactions mentor-e/ mentee, personne formatrice/ stagiaire dans un domaine en constante évolution

Onya Opota et Gilbert Greub

Bien ancrée dans son époque, la microbiologie clinique connaît de nombreuses (r)-évolutions technologiques. De nouvelles approchent, de nouvelles méthodes et de nouveaux instruments voient ainsi le jour à un rythme très soutenu en parallèle de l'émergence et du renforcement de questions de management et de gestion des ressources humaines associées elles aussi à des évolutions sociétales.

Acquérir et maintenir les connaissances et les compétences dans ces différents domaines tout en anticipant les changements à venir est un défi à la fois pour les responsables de laboratoire et pour l'ensemble des collaborateurs et collaboratrices.

La formation représente une occasion unique d'adapter les profils des générations futures à ces défis.

En microbiologie clinique comme dans beaucoup d'autres domaine, et ce quelque soit le corps de métier (équipes universitaires, équipes techniques, support administratif ou logistique), la formation s'appuie largement sur le mentoring et le compagnonnage ; c'est à dire sur un duo formé par une personne expérimentée et une personne nouvelle dans le domaine.

Les interactions au sein de ce duo (mentor-e/mentee, formateur-trice/stagiaire), sont donc essentielles.

En nous appuyant sur la littérature existante, sur des entretiens et questionnaires qualitatifs avec des pair-e-s et des collègues ainsi que sur nos expériences propres nous avons voulu proposer une revue ouvrant une réflexion sur certains aspects pouvant contribuer à une relation mentor-e/ mentee, formateur-trice/ stagiaire fructueuse.

Nous y discutons cinq éléments qui ont émergés comme importants pour le/ la mentor-e : la responsabilité, le positionnement, la vision, la crédibilité scientifique et la crédibilité morale. Cinq éléments ont également été discutés pour le/la mentee : la créativité, la flexibilité, l'énergie, la responsabilité et l'autoévaluation.

Cette revue souligne l'importance de la crédibilité scientifique et éthique des tuteurs et tutrices ainsi que l'importance des valeurs humaines et sociales telles que la solidarité, l'égalité des chances, l'équité, la bienveillance, le respect et l'empathie dans les domaines et propose des exemples spécifiques à la microbiologie clinique et aussi dans le domaine des maladies infectieuses dans leur intention d'une interaction fructueuse. Cette revue disponible dans son intégralité dans le journal « Clinical Microbiology and Infection » vise à la fois les microbiologistes et les personnes évoluant plus largement dans le domaine scientifique et médical.

Références :

1) Opota O, Greub G. *Mentor-mentee relationship in clinical microbiology*. Clin Microbiiol Infect 2017 July.

Figure : Nuage de mots présentant certaines qualités attendues de mentor-e-s (panel supérieur) et de mentees (panel inférieur) ; résultat d'une enquête qualitative pour laquelle des collaborateurs des laboratoires de microbiologie diagnostique, des cliniciens dans le domaine des maladies infectieuses et des chercheurs du service de microbiologie du CHUV à Lausanne ont été invités à définir par trois mots les qualités principales requises pour un-e mentor-e et pour un mentee. Résultats de quarante questionnaires provenant de tous les corps de métiers de ces domaine et à la fois de personnes expérimentées, de personnes récemment diplômées et de personnes en formation.

« Le but de l'éducation est de transformer les miroirs en fenêtres (Sidney J. Harris)»

Nouveau laboratoire de biosécurité BSL3 à l'Institut de Microbiologie

K. Jaton et Gilbert Greub

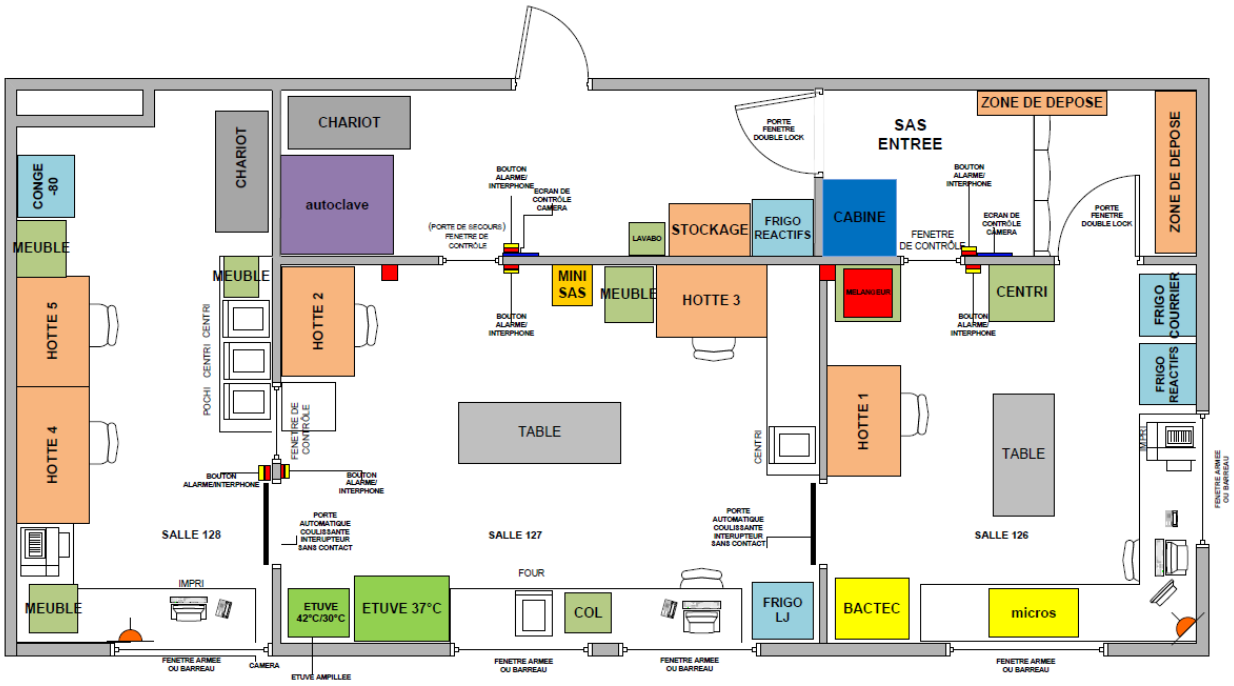
« De nouvelles infrastructures pour le diagnostic des mycobactéries et des fièvres hémorragiques »

Le laboratoire de l'Institut de Microbiologie BSL3 n'était plus aux normes et notre dérogation actuelle ne sera pas reconduite. Il a donc été décidé par l'Institut de Microbiologie et la Direction générale du CHUV de mettre aux normes ce laboratoire « BSL3 » qui est le seul laboratoire de diagnostic de ce type sur la cité hospitalière. Dans ce laboratoire sont effectués principalement les cultures des mycobactéries (tuberculose), dont les souches multi résistantes (M(X)DR-TBC) que nous détectons de plus en plus. De plus l'Institut de Microbiologie fait partie du réseau de laboratoires régionaux susceptibles d'effectuer l'analyse de pathogènes rares voire dangereux non effectués par les laboratoires publics ou privés (p.ex anthrax). Lors de la crise EBOLA, nous avons pu effectué les analyses de laboratoire de base pour les éventuels patients hospitalisés au CHUV avec une présentation clinique suggestive d'une fièvre hémorragique virale, c'est à dire, hématologie de base, tests hépatiques, créatinine, test de coagulation, ainsi que quelques tests rapides de microbiologie.

Ces éléments ont été décisifs dans la décision d'implémenter un vrai laboratoire BSL3 pour le diagnostic sur la cité hospitalière au sein de l'Institut de microbiologie afin d'offrir des moyens diagnostiques modernes pour le diagnostic de la tuberculose et diverses analyses spéciales liées à la détection d'agents pathogènes dangereux (Germes multi résistants, germes de niveau 3, recherche d'anthrax, de la tularémie, de la peste, etc.).

Ces travaux très conséquents ont commencés en 2018 et s'achèvent ces jours.

Les responsables de cette mise à niveau pour l'Institut sont le Prof. Gilbert Greub, Directeur de l'Institut, la Dre Katia Jaton, responsable des laboratoires de diagnostic moléculaire, des mycobactéries et du laboratoire régional biosécurité, M. René Brouillet, TAB chef d'unité, M. Miguel Munoz, TAB chef d'unité et M. Gregory Gonzalez, TAB mycobactéries.



AUTOMATISATION

A. Croxatto, G. Prod'hom et Gilbert Greub

Les laboratoires de bactériologie et d'épidémiologie hospitalière du centre hospitalier universitaire vaudois (CHUV) ont été doté d'un système automatisé en 2017. Le système BD Kiestra de l'entreprise Becton Dickinson (BD) a été choisi à la fin d'un processus d'appel d'offre impliquant deux fournisseurs. En plus de l'acquisition d'une chaine d'automatisation, le CHUV et BD ont signé un contrat de partenariat et de recherche et développement de nouveaux outils automatisés et d'intelligence artificielle pour le diagnostic microbiologique. Les travaux préalablement réalisés par le CHUV et ce partenariat vont renforcer la reconnaissance du CHUV sur la scène internationale comme centre de référence dans le domaine de l'automatisation en bactériologie. Le système d'automatisation a été installé en août 2017. Après une phase de formation, de paramétrages et de tests de vérification, les premiers prélèvements ont été mis en production en novembre 2017.

Une montée en puissance graduelle a permis de mettre en production plus de 90% de tous les prélèvements en février 2018. Les laboratoires de bactériologie et d'épidémiologie hospitalières ont actuellement consolidés et optimisés ce système automatisé, notamment avec la mise en place d'une toute nouvelle organisation opérationnelle afin d'adapter les flux de travail analytiques à l'automatisation. Cette optimisation de l'automatisation a permis d'augmenter la qualité et la productivité, permettant ainsi d'absorber l'augmentation du volume d'échantillons à traiter. L'automatisation devrait également à terme améliorer le temps de rendu des résultats. Ainsi, l'automatisation de la culture microbienne devrait permettre une meilleure prise en charge des patients souffrant de maladies infectieuses.

« L'automatisation a permis d'augmenter la qualité et la productivité »

FAMH

Katia Jaton

FAMH
DIE MEDIZINISCHEN LABORATORIEN DER SCHWEIZ
LES LABORATOIRES MÉDICAUX DE SUISSE
I LABORATORI MEDICI DELLA SVIZZERA
THE MEDICAL LABORATORIES OF SWITZERLAND

FOEDERATIO
ANALYTICORUM
MEDICINALIUM
HELVETICORUM

« Association des laboratoires médicaux de Suisse »

Pour rappel, la FAMH est l'Association des laboratoires médicaux de Suisse qui groupe les spécialistes en médecine de laboratoire privés et publics exerçant leur profession en Suisse. La FAMH contribue aux bons soins médicaux par le maintien et la promotion de laboratoires médicaux efficaces, répartis à travers toute la Suisse. La FAMH contribue également de manière très active au domaine important des normes spécifiques au secteur, entre autres, dans les domaines de la qualité (contrôle de qualité) et de l'éthique. De plus afin de garantir la qualité dans les laboratoires d'analyses médicales et dans un esprit d'uniformisation pour l'ensemble de la Suisse, il a été créé un cycle de formation postgraduée interdisciplinaire d'une durée minimum de 4 ans pour les branches spécialisées que sont la Chimie clinique, l'Hématologie, la Microbiologie médicale, l'Immunologie clinique et la Génétique. Le titre obtenu est appelé Spécialiste FAMH en Médecine de laboratoire. Le dernier programme de formation postgraduée a été approuvé par le Sénat de l'Académie Suisse des Sciences Médicales (ASSM) le 5.11.2012.

La FAMH est également très active dans la formation continue des spécialistes en médecine de laboratoire.

Le comité de la FAMH

Le comité de la FAMH se compose de 7 à 9 membres. Les membres du Comité de la FAMH et le président doivent exercer dans le domaine de la biologie médicale. Le comité de la FAMH est élu par l'assemble générale pour 4 ans. Les activités du Comité de la FAMH sont décrites dans les statuts de l'Association (**www.famh.ch**).

Actuellement la Dre Katia Jaton représente l'Institut de Microbiologie au sein du comité de la FMH.

Les autres membres du comité sont : Dr. med. Hans Siegrist, Président, ADMED, La Chaux-de-Fond ; Prof. Med. Lorenzo Alberio, Vice-Président, Hématologie, CHUV ; Dr ès sc nat André Deom, Trésorier Dr. med. Willi Conrad, Membre du comité, Bio-Analytica AG, Lucerne ; Dr. sc.nat. Franco Keller, Membre du comité, EOLAB, Bellinzona ; Nils Oyo, Membre du comité, Synlab AG, Lucerne; Prof. Dr.méd. Nicolas Vuilleumier, Membre du comité, Service de médecine de laboratoire HUG.

Le comité d'experts de la FAMH

Pour l'exécution et la supervision de la formation, la FAMH constitue un Comité d'experts qui se compose d'une délégation de chacune des 5 sociétés scientifiques (SSH, SSCC, SSAI, SSM, SSGM), ainsi que d'un représentant de la FAMH et de la FMH (fédération de médecins suisses). La présidence et la vice-présidence du Comité d'experts incombent à la FAMH. Actuellement la présidence du comité d'expert est assurée par le Prof. Alberio Lorenzo, Prof. Associé et Médecin Chef en Hématologie du CHUV.

Chaque société scientifique élit 4 membres ordinaires possédant un titre FAMH et qui travaillent dans un laboratoire. Ces 4 membres délégués fonctionnent entre autres comme expert dans leur branche de spécialisation lors des examens d'admission et finaux, et ils assurent le rôle de représentants officiels de leurs sociétés respectives au sein du comité d'experts. Leurs tâches consistent (liste non exhaustive) à 1) évaluer les dossiers de candidature pour l'examen d'admission, 2) évaluer les candidats dans le cadre de l'examen d'admission, 3) apprécier les demandes des candidats quant à l'aménagement individuel de leur formation postgraduée, 4) assurer la coordination des cours du tronc commun 5) assurer l'attribution du titre 6) prendre des mesures et/ou sanctions en cas de non-observation de l'obligation de suivre une formation continue.

Actuellement au CHUV sont dans le comité d'expert :

Prof Alberio Lorenzo pour l'hématologie et Président du Comité d'expert
Dr. Katia Jaton pour la Microbiologie
Dr. Vincent Aubert pour l'Immunologie clinique
Dr. Olivier Boulat pour la Chimie Clinique

En 2019, le CHUV est donc bien représenté au niveau de la FAMH.

N'hésitez pas à contacter Katia Jaton pour toutes questions relatives à la FAMH, surtout en lien avec la formation FAMH en microbiologie.

8ème Journée de formation en microbiologie diagnostique

Organisée par K. Jaton, J. Schrenzel et G. Greub
Sponsorisée par Axonlab, Becton Dickinson, Sensàsion, Bühlmann et Debiopharm

Mardi 1 octobre 2019, de 09h00 à 17h00
Musée olympique, Quai d'Ouchy 1 - 1006 Lausanne

Cette formation est reconnue avec ??? crédits par la FAMH («formation élargie»)

	09h00	**INTRODUCTION**	Gilbert Greub, Lausanne
PATHOGENES EMERGENTS	09h15	Diagnostic des virus émergeants	Manuel Schibler, Genève
	09h40	Questions & discussion	
	09h45	Pathogènes émergents : les défis pour l'hôpital (en terme de biosécurité et de contrôle de l'infection)	Laurence Senn, Lausanne
	10h10	Questions & discussion	
	10h35	☕	
NOUVELLES TECHNOLOGIES	11h00	Nouveaux outils en microbiologie diagnostique : les mycobactéries	Onya Opota, Lausanne
	11h25	Questions & discussion	
	11h30	Senseurs nanoplasmiques et microfluidiques : le futur des tests rapides?	Hatice Altug, EPFL Lausanne
	11h55	Questions & discussion	
	12h00	Importance de la bioinformatique en microbiologie Diagnostique	Aitana Lebrand, SIB Lausanne
	12h25	Questions & discussion	
	12h30	🍽	
INFECTIONS SEXUELLEMENT TRANSMISES	14h15	Chlamydia trachomatis de A à Z	Gilbert Greub, Lausanne
	14h40	Questions & discussion	
	14h45	Syphilis : quels tests diagnostiques ?	Alix Coste, Lausanne
	15h10	Questions & discussion	
	15h15	☕	
INFECTIONS PEDIATRIQUES	16h00	Importance du diagnostic microbiologique : L'exemple de Streptococcus pyogenes	Klara Posfay– Barbe, Genève
	16h25	Questions & discussion	
	16h30	La métagénomique chez les patients avec mucoviscidose	Sandra Asner, Lausanne
	16h55	Questions & discussion	
	17h00	**CONCLUSION**	Jacques Schrenzel, Genève Katia Jaton, Lausanne

Axonlab connecting ideas · BD · SENSÀSION · BÜHLMANN · Debiopharm

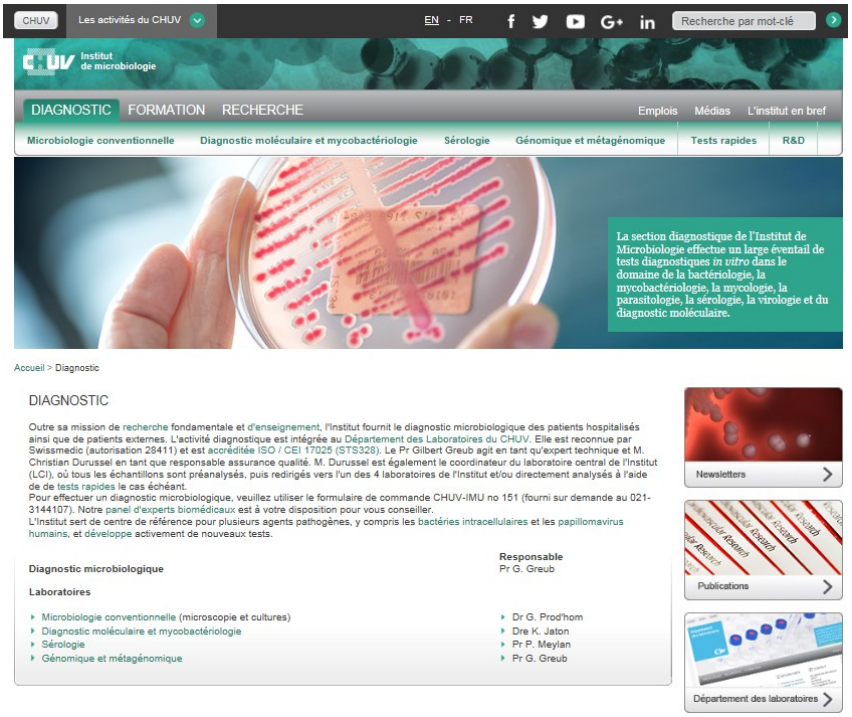
Inscription préalable OBLIGATOIRE (avant le 2 septembre 2019) par mail à imu.secretariat@chuv.ch

PROJET

INNOVATIONS EN MICROBIOLOGIE DIAGNOSTIQUE

Le développement de la microbiologie diagnostique fait partie des objectifs de nos laboratoires de microbiologie puisque c'est grâce à une activité en recherche et développement continue que des prestations de fiabilités élevées peuvent être proposées par nos différents laboratoires de microbiologie diagnostique. Cette innovation et ces efforts de recherche et développement permettent également d'accroître l'efficience grâce à une automatisation accrue et à une amélioration des processus. Enfin, la plupart de ces innovations ne sont possibles que grâce aux compétences de nos universitaires en biologie et en médecine, permettant de proposer des prestations uniques en Suisse, modernes, de haute qualité, valorisées par des publications internationales. Enfin, notons que l'innovation en microbiologie diagnostique n'est possible que grâce à la proximité de nombreux chercheurs actifs en sciences fondamentales, qui augmentent localement, au sein de l'Institut de microbiologie, les compétences et le savoir-faire.

« Assurer des prestations de qualité, innover et favoriser le rayonnement de l'institution ! »

Vous trouverez cette newsletter ainsi que les précédents numéros sur notre site internet à l'adresse ci-dessous.

http://www.chuv.ch/microbiologie