

Conflits d'intérêts

A Lausanne, nous avons un laboratoire moderne avec divers instruments dont:

- le système de culture automatisée **BD-Kiestra**
- le MALDI-TOF **Bruker**
- les systèmes d'antibiogramme miniaturisé **Vitek**
- les automates d'hémocultures **BD-FX blood**
- les systèmes PCRs **ABI, Cobas, LIAT, GenXpert**
-

Relations actuelles avec l'industrie

- Research agreement avec **BD (USA)** → Phoenix / BD-Kiestra
- Memre du Scientific advisory board of «**Resistell**»
- Research agreement avec **Resistell**
- Co-fondateur de **JeuPRO** (jeu Krobs & jeu MyKrobs)

Chlamydiae

Avec le mot "Chlamydiae", j'entends ici les chlamydia et les bactéries apparentées aux chlamydia

Chlamydia pneumoniae	Chlamydia psittaci	Parachlamydia acanthamoebae	Rhachlamydia helvetica
-----------------------------	---------------------------	------------------------------------	-------------------------------

www.krobs.ch & www.mykrobs.ch

Chlamydiae (env 600 nm)

Considéré comme des virus à l'époque
 → Vacuoles = «inclusions»
 → Division = «réplication»

Inclusion

Greub, unpublished

Chlamydiae

Bactéries intracellulaires strictes

Deux stades de développement:

- Elementary bodies
- Reticulate bodies

EB RB
 500 nm

Aberrant bodies

Croxatto & Greub, Microbiology 2010

Corps aberrants

induits par certains antibiotiques

Scherler A, Jacquier N, Kebbi-Beghdadi C, Greub G. Microorganisms. 2020 Jan 9;8(1):89

Le peptidoglycan

Les *Chlamydia* possèdent du peptidoglycan, impliqué dans la division

← BETA-LACTAMES

PHOSPHOMYCINE

← VANCOMYCINE

Division chez *Escherichia coli*

Escherichia coli

mykrabs.ch

rod = bacille

FtsZ (Z-Ring)

FtsZ (analogue de tubuline), impliquée dans la division
 MreB (analogue d'actine), impliquée avec RodZ dans la forme d'*E. coli*

Très peu de bactéries se divisent sans la protéine FtsZ
 Même les chloroplastes utilisent FtsZ

Chlamydiae:
 division binaire sans FtsZ

(Bender and Emsw, 2010)

Waddlia chondrophila: division

Escherichia coli

Waddlia

FtsZ (Z-Ring)

MreB = homologue d'actine, capable de polymériser
 AmiA = amidases (remodelage du peptidoglycan)

RodZ: interaction avec MreB chez *E. coli*

RodZ localisé précocement au niveau du septum chez *Waddlia*

RodZ peut recruter MreB

Joanne Salje et al. Mol Cell 2011

Chlamydia: division binaire

RodZ

A
 B

Jacquier et al Nature Comm 2014
 Frandi et al. Nature Comm 2014
 Jacquier et al. Biology & Chemistry 2015
 Jacquier et al FEMS Microbiol Rev 2015

Le divisome pourrait être une cible thérapeutique utile

Car certaines *Chlamydia* sont des pathogènes majeurs:

- *Chlamydia psittaci*
- *Chlamydia trachomatis*
- *Chlamydia pneumoniae*


Et des évidences supportent le rôle pathogène de certaines bactéries apparentées aux chlamydia:

- *Waddlia chondrophila*
- *Parachlamydia acanthamoebae*

Et seuls la doxycycline, les quinolones et les macrolides sont efficaces sur les chlamydiae ...

Genre *Chlamydia*

Chlamydia psittaci Psittacose



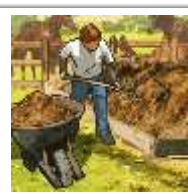
Local Newspaper as a Diagnostic Aid for Psittacosis: A Case Report

The first edition (8-10 June 2007) of the local newspaper reported an outbreak of psittacosis in an elderly female in a public park in Lanzarote, Spain. On 10 June, a 65-year-old man visited his family doctor because of a 10-day history of fever, cough and fatigue. The doctor's clinical examination was normal and the patient suspect contact for his symptoms. Four days after the lower respiratory tract was approached. Gram-negative, non-fermenting, acid fast organism was identified, which was followed by clinical improvement.

Senn & Greub. Clin Infect Dis 2008

Genre *Chlamydia*

Chlamydia psittaci Psittacose



www.mykrobs.ch


Clinical Microbiology and Infection

A new acute and zoonotic throat infection from an old avian pathogen, *Chlamydia psittaci*

Polkinghorne & Greub. Clin Microbiol Infect 2017

Genre *Chlamydia*

Chlamydia pneumoniae Pneumonie atypique
Asthme



Epidémie de Taiwan (Grayston et al. 1983)
Puis rare ...

Au CHUV, 2 cas sur 10 ans:

- Tous deux non suspectés
- 1^{er}, découvert par une erreur de prescription

→ Myco sur le cardex infirmier

Senn, Jaton, Fitting and Greub. Clin Infect Dis 2011

Genre *Chlamydia*

Chlamydia pneumoniae Pneumonie atypique
Asthme



Table 1. Baseline Characteristics of Patients Identified With *C. pneumoniae*

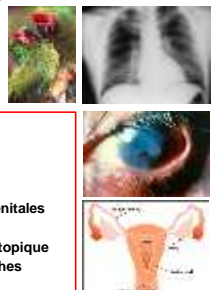
Mean (SD)	Age, y	Sex, %	Median (IQR)	Cough	Fever	SO ₂	Sputum	Capillar	ECG	Examination	Response	Response, %
22.2 (10.2)	22.2	50	10 (5-15)	80	10	95	100	100	100	100	100	100
22.2 (10.2)	22.2	50	10 (5-15)	80	10	95	100	100	100	100	100	100
22.2 (10.2)	22.2	50	10 (5-15)	80	10	95	100	100	100	100	100	100
22.2 (10.2)	22.2	50	10 (5-15)	80	10	95	100	100	100	100	100	100
22.2 (10.2)	22.2	50	10 (5-15)	80	10	95	100	100	100	100	100	100
22.2 (10.2)	22.2	50	10 (5-15)	80	10	95	100	100	100	100	100	100
22.2 (10.2)	22.2	50	10 (5-15)	80	10	95	100	100	100	100	100	100
22.2 (10.2)	22.2	50	10 (5-15)	80	10	95	100	100	100	100	100	100
22.2 (10.2)	22.2	50	10 (5-15)	80	10	95	100	100	100	100	100	100
22.2 (10.2)	22.2	50	10 (5-15)	80	10	95	100	100	100	100	100	100

Asner, Jaton, Kyrianiidou, Nowak & Greub. Clin Infect Dis 2014

Genre *Chlamydia*


Présentation clinique

Chlamydia trachomatis Trachome
→ cécité




Infections urogénitales
→ infertilité
→ grossesse ectopique
→ fausses couches

Trachome




Afrique sub-saharienne
Asie
Amérique centrale
Amérique du Sud

- ~ 150 millions: besoins d'antibiotiques
- ~ 500 millions de personnes à risque
- > 7 millions de personnes aveugles

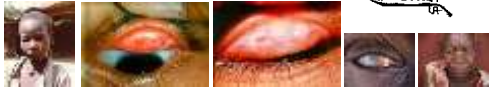


Source = O.M.S.

Trachome



La pente vers la cécité



Source = O.M.S.


Trachome au Soudan

***Chlamydia trachomatis*:**

- 35% de 96 enfants versus **0% de 91 adultes** ($p < 0.0001$)

Autres membres de l'ordre *Chlamydiales*

- 4.2% de 96 enfants versus 21.5% de 91 adultes ($p = 0.0003$)



Collaboration avec Talin Barisani:
Ghasemian E et al.
Sci Rep. 2018 May 9;8(1):7432.

Source = O.M.S.

Stratégie «SAFE»









S = surgery
A = azithromycin (antibiotic)
F = face (clean)
E = environment (clean)

Source = O.M.S.

Genre *Chlamydia*

Présentation clinique

<i>Chlamydia psittaci</i>	Psittacose		
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Pneumonie atypique Asthme		
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Trachome → cécité		


Infections urogénitales
→ infertilité
→ grossesse ectopique
→ fausses couches

Source = O.M.S.

Chlamydia trachomatis


Urétrite

- Ecoulement urétral éventuel
- Souvent asymptomatique
- Bactériologie négative



Cervicite

- Ecoulement vaginal
- Asymptomatique



Source = O.M.S.

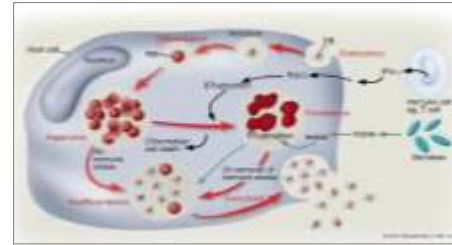
Chlamydia trachomatis



PID: Inflammation chronique au niveau du pelvis

Corps aberrants

Une forme de persistance induite par le manque de tryptophane
 Explique des récurrences
 Explique l'alternance d'inflammation/réplication
 → peu de réplication → peu d'inflammation → réplication → inflammation → ...



Beauchamp K et al. J Clin Investigation

Complications des PID

Infertilité tubaire:
 - 50% des causes d'infertilité
 - risque augmenté
 (OR=6 après une infection et OR=17 après 2 infections)

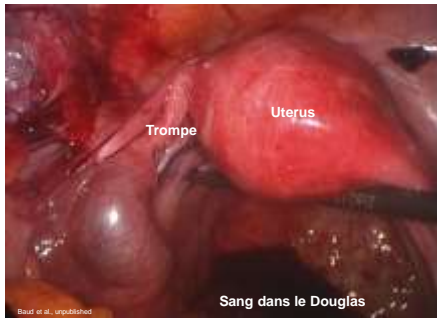


Complications des PID

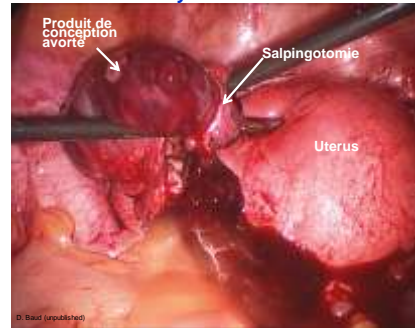
Grossesse extra-utérine
 - 43% dues à *C. trachomatis*
 - jusqu'à 10% de mortalité
 - PID = risque accru de 7-10x



Grossesse extra-utérine



Chlamydia trachomatis



Fausses couches et *C. trachomatis*

Association entre IgG anti-*C. trachomatis* et fausses couches

Lausanne:
 15.2% IgG dans le groupe fausses couches
 7.3 % chez les contrôles, p=0.018
 OR 2.3 (95% CI 1.1-4.9) en analyse multivariée

PCR *C. trachomatis*:
 6 dans groupe fausses couches & 2 chez les contrôles, p<0.05

Wikin et al. Am J Obst Gyn 1992
 Quinn et al. Am J Obstet Gynecol 1997
 Puchelka et al. Adv Med Sci 2009
 Baud et al. 2007 Eur Med Res
 Baud et al. Eco 10/16/15/20/2011

Puchelka et al. Adv Med Sci 2009
 Rastogi et al. Br J Biomed Sci 2000
 Sengul et al. Eur Microb 20/2011

Dépistage de *Chlamydia trachomatis*

Test pré-natal

www.mykrobs.ch

PCR en temps réel

Copy number per 5 µl	Number of samples
<10	15
10-10 ¹	20
10 ¹ -10 ²	30
10 ² -10 ³	22
>10 ³	5

Jaton, Bille and Greub 2006

Cibler le plasmide cryptique pour accroître la sensibilité du test
 - Risque de délétion -

Délétion de 377 bp dans le plasmide cryptique

***C. trachomatis* B mutant suédois:**

- Echappe au diagnostic
- Pas de gènes en plus
- Facteurs de virulence préservés

Seth-Smith et al. 2009

Unemo et al. 2010

Mutants suédois et finlandais

In 2010

- Årevidalen 10% (Nov-Dec 2008)
- Örebro 10% (Oct-Dec 2008)
- Malmö 26% (Feb-Mar 2007)
- Hälsjöland 10% (Oct 2008-Nov 2007)
- Källnäs 22% (Dec 2008-Jan 2007)
- Skåne 14% (Nov 2008-March 2007)
- Stockholm 22% (Jan-Feb 2007)
- Norrköping 10% (Nov 2008-Feb 2007)
- Uppsala 10% (Jan 2008+Feb 2007)
- Jönköping 14% (Dec 2008-Jan 2007)
- Björkinge 7% (Nov 2008+Feb 2007)

In 2019

A Finnish mutant spread to Norway in summer 2019

Herrmann, et al.

TB Johansen et al. Euro Surveill. 2019 Oct 17; 24(42)

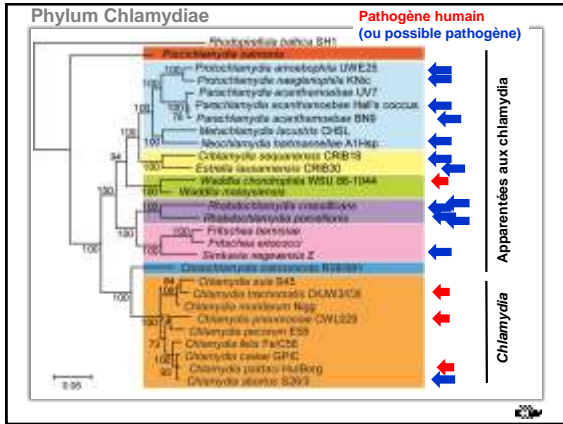
Chlamydia trachomatis

En résumé

- Fréquent
- Souvent asymptomatique
- Inflammation chronique
- Infertilité, grossesse extra-utérine et fausse couche

Complications majeures

Pression de sélection des tests diagnostiques suffisante pour faire évoluer une bactérie ...
Besoin de 2 cibles pour les PCRs



Pourquoi étudier les nouvelles chlamydiae

1. Pathogènes émergents

Fausses couches
Avortements, infertilité
Pneumonie, bronchites
...

Des outils diagnostiques aux études cliniques et modèles animaux

Pilloux, LeRoy, Brunel, Roger & Greub
Plos One 2016

Pourquoi étudier les nouvelles chlamydiae

1. Pathogènes émergents

Fausses couches
Avortements, infertilité
Pneumonie, bronchites
...

2. Organisme modèle pour étudier les Chlamydia

Stades de développement
Division
Facteurs de transcription
Persistance
Système de secretion de Type III
...

Pourquoi étudier les nouvelles chlamydiae

1. Pathogènes émergents

Fausses couches
Avortements, infertilité
Pneumonie, bronchites
...

2. Organisme modèle pour étudier les Chlamydia

Stades de développement
Division
Facteurs de transcription
Persistance
Système de secretion de Type III
...

3. Comprendre l'évolution des Chlamydiae

Génomes plus large que les *Chlamydia* sp.
Compétences absentes chez les *Chlamydia* sp.:

- catalase
- CRISPR
- transporteur NAD-ADP
- système conjugatif
- ...

Longue histoire de parasitisme intracellulaire
Implication dans la biogénèse des chloroplastes
...



Importance vétérinaire

Isolé de fœtus de bovin avorté (USA)
Dilbeck et al. J. Clin. Microbiol 1990

Isolé d'un autre fœtus bovin en Allemagne
Henning et al. Vet Microbiol 2002

Etude sérologique → rôle de Waddlia dans l'avortement des bovins
Dilbeck-Robertson et al. J.Vet.Diagn.Invest 2003

Inoculation de Waddlia à un fœtus bovin cause sa mort
Dilbeck-Robertson et al. J.Vet.Diagn.Invest 2003

→ **Avortements chez les bovins**

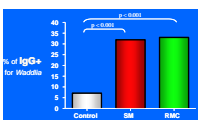
Importance médicale

Sérologie (Londres)
Faussees couches 32.7% (88/269)
Contrôles 7.1% (12/169)

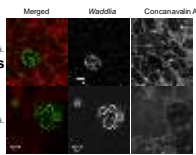
Baud, Thomas, Arafa, Regan and Greub, Emerg Infect Dis, 2007

Sérologie (Lausanne)
 Baud, Goy, Osterheld, Croxatto, Borel, Vial, Pospischil and Greub, Emerg Infect Dis, 2014

Présence de *Waddlia* dans le placenta documentée par immunohistochimie +/- PCR
 Baud, Goy, Osterheld, Borel, Vial, Pospischil and Greub, Clin Infect Dis, 2011.
 Baud, Goy, Osterheld, Croxatto, Borel, Vial Pospischil and Greub, Emerg Infect Dis, 2014



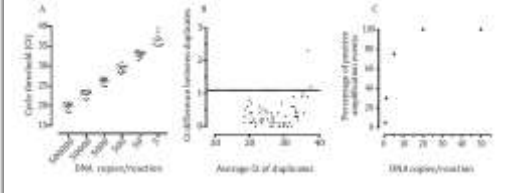
Croissance dans les cellules endométriales
 Kebbi, Cisse and Greub, Microbes & Infection 2011



Diagnostic

PCR en temps réel
 Goy G, Croxatto A, Postfay-Barbe KM, Gervaix A, Greub G, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009

Pan-chlamydiales PCR
 Lienard J, Croxatto A, Aebly S, Jaton K, Postfay-Barbe K, Gervaix A, Greub G, J Clin Microbiol, 2011, Jul;49(7):2637-42.



Diagnostic

PCR en temps réel
 Goy G, Croxatto A, Postfay-Barbe KM, Gervaix A, Greub G, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009

Pan-chlamydiales PCR
 Lienard J, Croxatto A, Aebly S, Jaton K, Postfay-Barbe K, Gervaix A, Greub G, J Clin Microbiol, 2011, Jul;49(7):2637-42.

Immunofluorescence (cross-réactions)
 Casson N, Entenza JM, Greub G, J Clin Microbiol, 2007;45(1):234-6.
 Corsaro D, Greub G, Clin Microbiol Rev, 2006;19(2):283-97.

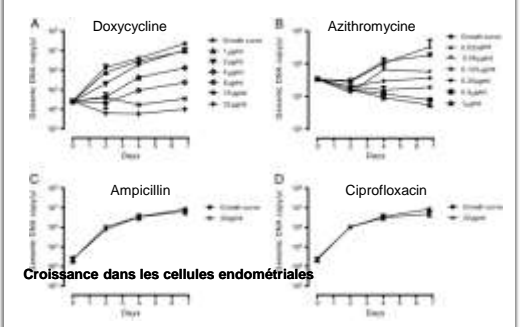
Protéines immunogéniques
 Kebbi-Beghdadi C, Lienard J, Uytendroek F, Baud D, Riederer BM, Greub G, PLoS One, 2012;7(1):e28605.

ELISA
 Lienard J, Croxatto A, Gervaix A, Postfay-Barbe K, Baud D, Kebbi-Beghdadi C, Greub G, New Microbes New Infect, 2014

Immunohistochimie
 Borel N, Casson N, Entenza JM, Kaiser C, Pospischil A, Greub G, J Med Microbiol, 2009;58(Pt 7):863-6.

Culture cellulaire
 Kebbi-Beghdadi C, Balista C, Greub G, FEMS Immunol Med Microbiol, 2011.
 Kebbi-Beghdadi C, Cisse O, Greub G, Microbes Infect, 2011;13(6):566-74.
 Kebbi-Beghdadi C, Fattou M, Greub G, Microbes Infect, 2015;17(11-12):749-54.

Traitement



Croissance dans les cellules endométriales

Beta-lactamases
Corps aberrants

SNPs dans le QRDR
Des gènes *gyrA* & *parC*

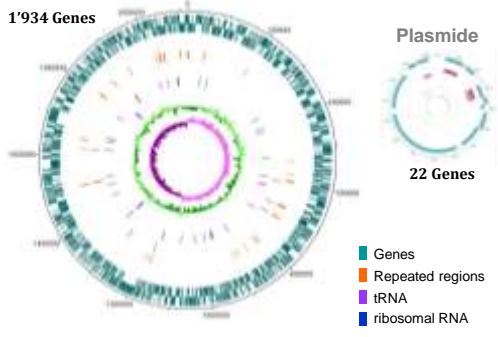
Goy G and Greub G. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2009, Bertelli et al Plos One 2010.

***Waddlia* : chromosome avec 2'116'324 bp**

1'934 Genes

Plasmide

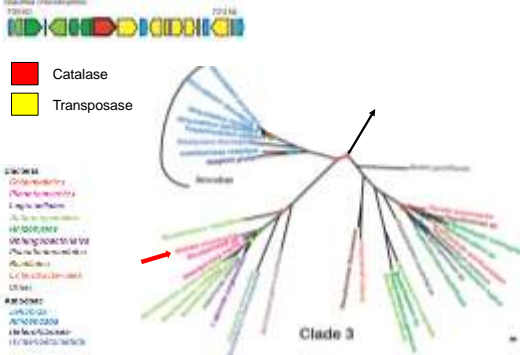
22 Genes



■ Genes
 ■ Repeated regions
 ■ tRNA
 ■ ribosomal RNA

Bertelli C, Collyn F, Croxatto A, Rückert C, Polkinghorne A, Kebbi-Beghdadi C, Goetsmann A, Vaughan L, Greub G. PLOS One 2010

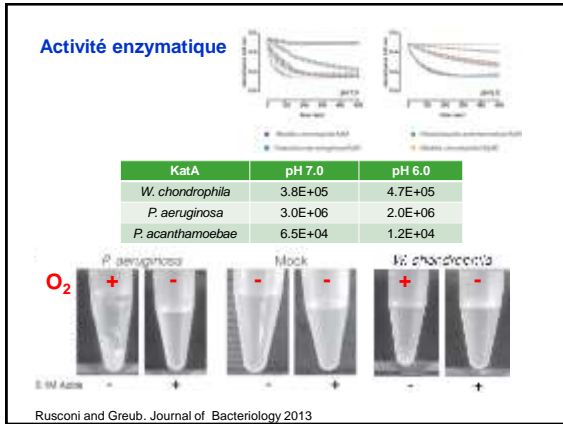
Catalase chez diverses chlamydiae



■ Catalase
 ■ Transposase

Clade 3

Rusconi and Greub, Journal of Bacteriology 2013



Waddlia résiste à Acanthamoeba

Legionella & Acanthamoeba

Amibes se nourrissent de bactéries ...
 Certaines bactéries (comme la légionnelle) à évoluer
 Pour résister aux amibes

➔ **Chlamydiae résistants aux amibes**

Conclusion

Role of amoebae

- Widespread reservoir
- Replicative niche
- 'Trojan horse'
- 'Protective armour'
- 'Training ground' to select virulence traits
- 'Evolutionary crib' in which to adapt to macrophages
- Gene exchange between amoebal symbionts/pathogens
- Tool with which to recover new amoebae-resisting members of the *Chlamydiales*

Greub; Clin Microbiol Infect 2009

Waddlia résiste aussi aux macrophages

Macrophage (ConA)
Waddlia chondrophila

Goy, Croxatto & Greub, Microbes and Infection 2009

Waddlia se localise au niveau du réticulum endoplasmique

Live *Waddlia* 2hr

Live *Waddlia* 8hr

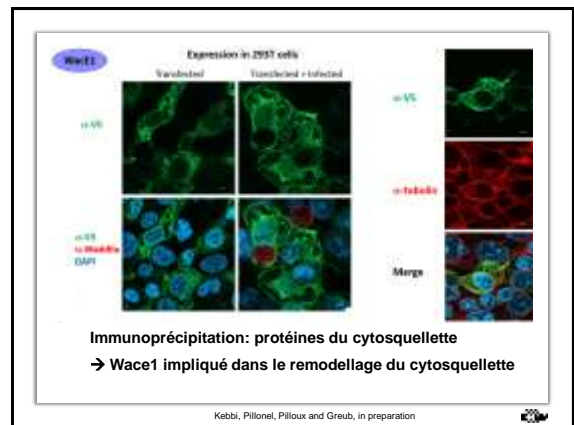
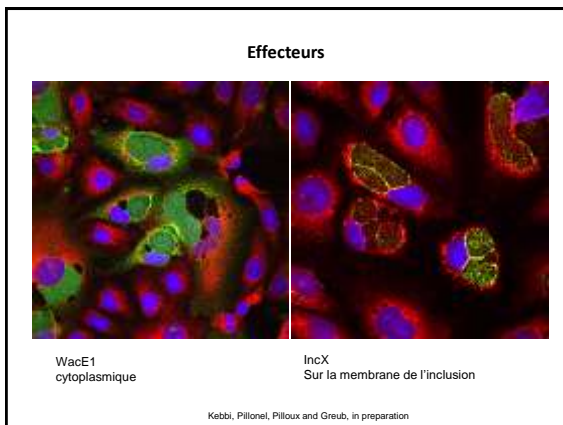
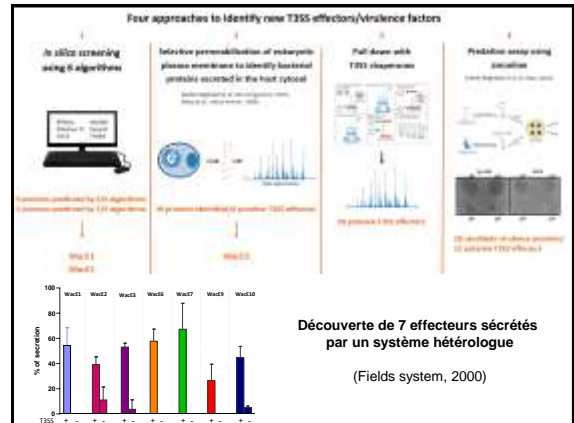
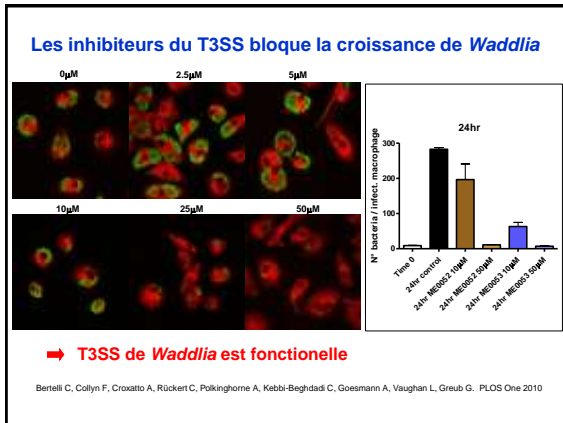
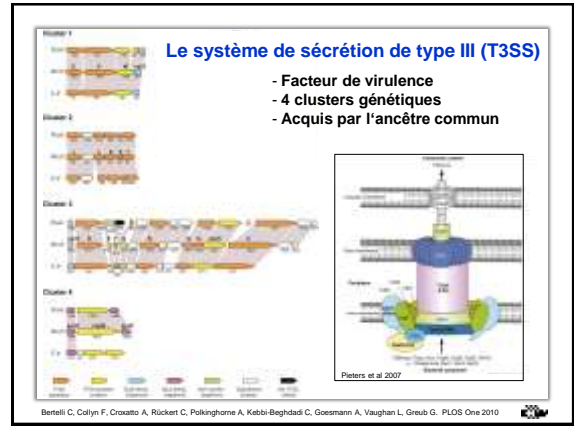
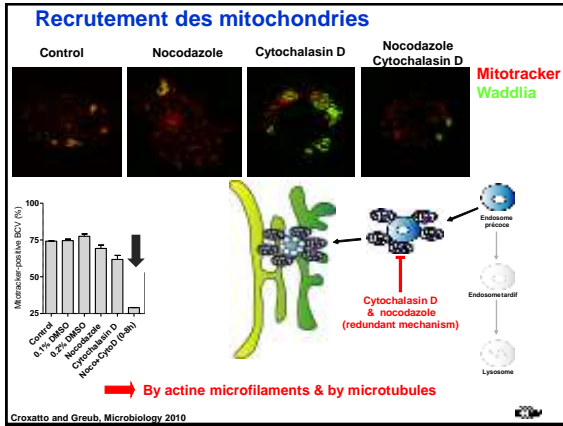
GM130 (Golgi)
 Calnexin (ER)
 DAPI (Noyau et bactéries)

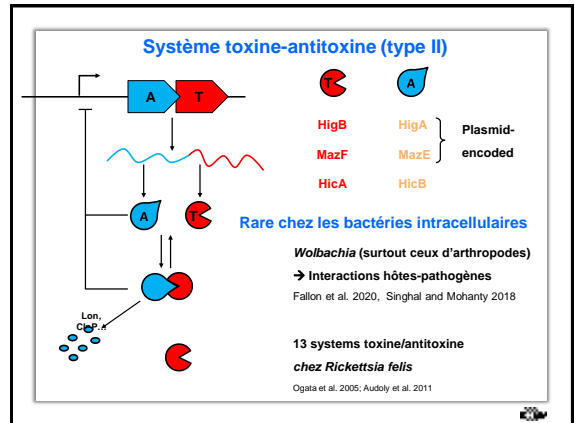
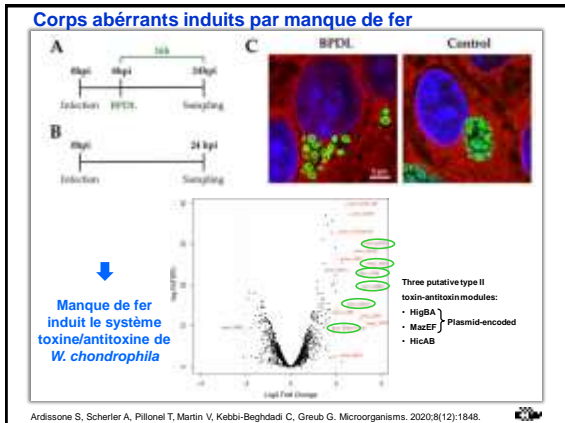
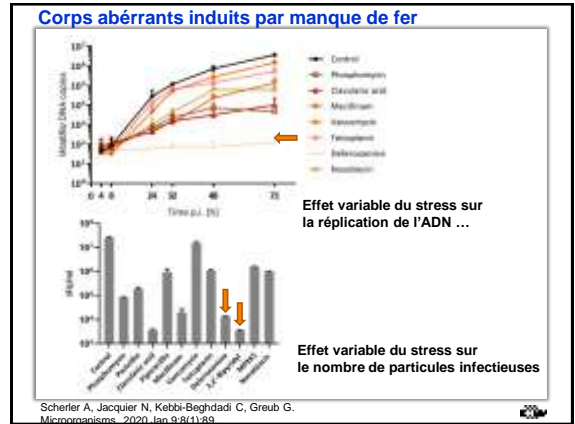
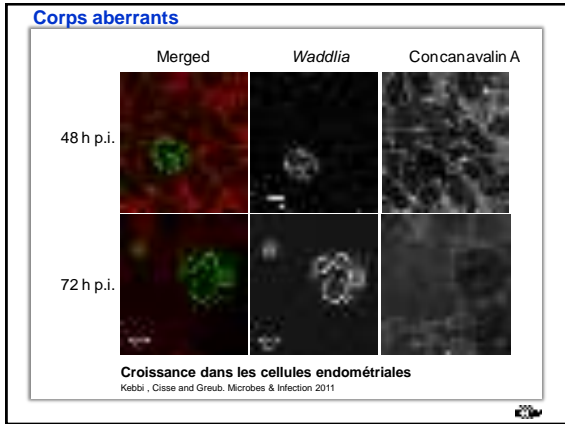
Croxatto & Greub, Microbiology 2010

Waddlia se localise au niveau du réticulum endoplasmique

Croxatto & Greub, Microbiology 2010

Co-localisation avec les mitochondries





Système toxine-antitoxine chez les *Chamydiales*

Sur le plasmide	Sur le chromosome
<i>Waddlia chondrophila</i> (15.6 kb) 2 TA modules • HigBA • MazEF	<i>Waddlia chondrophila</i> (2.1 Mb) 5 TA modules

TOXINES UTILES POUR COLONISER DIVERSES NICHES

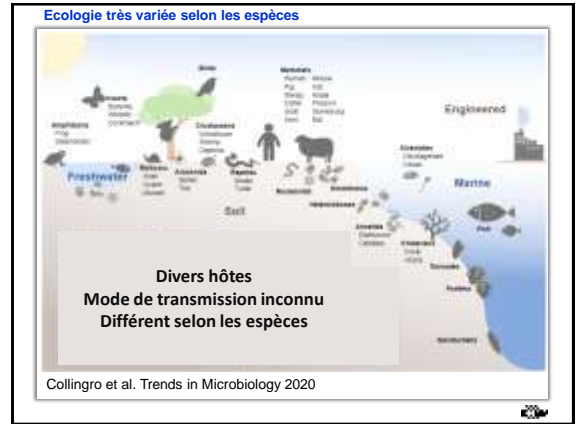
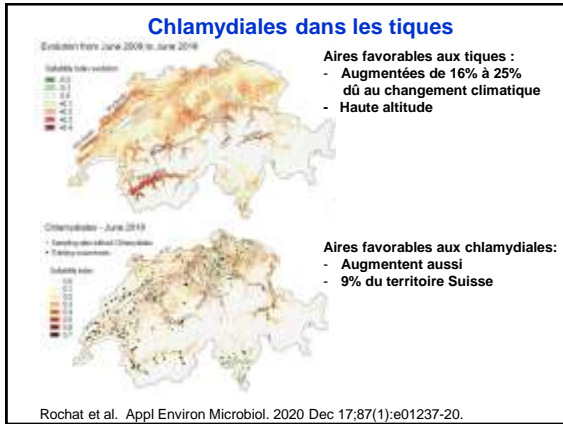
Symbiose protectrice de *Pseudomonas entomophila* (pédérine du Staphylin)

F.M. Jiggins Science 332, 185 (2011)

Ardissone et al, in preparation

Trouver des nouvelles chlamydiae au sein des arthropodes

<i>Rhodochlamydia porcellionis</i>	<i>Porcellio scaber</i> (terrestrial isopod) Kostanjsek et al., 2003
<i>Fritschea bemisiae</i> <i>Fritschea eriococci</i> (<i>Simkaniaceae</i>)	<i>Bemisia tabaci</i> (whitefly) Everett et al 2005
<i>Rhodochlamydia crassiflans</i>	<i>Blatta orientalis</i> (cockroach) Corsaro et al., 2007
<i>Rhodochlamydiaceae</i> , <i>Parachlamydiaceae</i> New family level lineages	<i>Ixodes ricinus</i> (ticks) Croxatto et al. 2014 Pilloux et al 2016 Rochat et al 2020
<i>Rhodochlamydiaceae</i>	<i>Spinturnix</i> (ectoparasites of bats) Thievent et al, 2021



Conclusions

Waddlia: fausses couches chez l'humain, avortements chez les bovins, ...

Parachlamydia: bronchites, pneumonies

➔ **Diagnostic**
Epidemiologie
Modèle animal

Biologie des chlamydiae

- Nouveaux traitements
- Histoire évolutive

➔ **Génomique**
Protéomique
Biologie cellulaire

Remerciements

Greub group

Postdocs
Silvia Ardissonne
David Baud*
Claire Bertelli*
Antony Croxatto*
Nicolas Jacquier
Carole Kebbi
Linda Muller*
Trestan Pillonel
(* in clinic / diagnostics now)

PhD students
Christèle Aubry
Firuz Bayramova*
Nicola Casson*
Geneviève Goy
Thomas Kozusnik
Julia Lienard*
Ludovic Pilloux*
Brigida Rusconi*
Auréli Scherler*
Giti Ghazi Soltani
(* previous PhD students)

Lab technician
Sébastien Aeby

Collaborations

Lausanne
Katia Jaton
Onya Opota
René Brouillet et al.

National/International
Steven Ball
Nicole Borel
Ugo Cenci
Ken Fields
Johannes Hegemann
Servaas Morré
Mirja Puollakainen
Didier Raoult
Loyd Vaughan
Patrick Viollier
 ...