

## **PHÉLIX PHAGE TEST : Une façon révolutionnaire de détecter les bactéries intracellulaires et une réponse aux personnes malades non diagnostiquées**

### **Que sont les bactériophages ?**

Les phages appartiennent à la forme de vie la plus simple et la plus primitive (les virus). Ils sont extraordinairement spécifiques de l'hôte bactérien qu'ils infectent pour se propager. Ils peuvent infecter rapidement leur hôte et insérer son matériel génétique dans leur hôte. Par conséquent, ils produisent un grand nombre de copies qui peuvent infecter davantage (et dans certains cas décimer) la bactérie responsable de l'infection. Ils peuvent également rendre les bactéries vulnérables aux traitements classiques en modifiant leur matériel génétique. Plus important encore, les bactériophages peuvent avoir une capacité de destruction. Les phages sont si petits qu'ils peuvent pénétrer et éventuellement perturber les biofilms bactériens. Ces biofilms constituent une barrière majeure employée par les bactéries contre les antibiotiques et contribuent donc de façon importante à la résistance aux antibiotiques. La capacité des phages à pénétrer les biofilms leur permet de se propager à des niveaux élevés dans les centres localisés d'infection bactérienne et de détruire les bactéries qui s'y trouvent, pour produire un effet thérapeutique puissant, mais très localisé. Les bactériophages sont omniprésents et font partie de l'écosystème naturel des cycles de vie et de réplication des bactéries. Nous avons décidé de nous concentrer sur les bactériophages comme cible pour la détection directe d'une infection, car ils sont spécifiques et plus nombreux que la population bactérienne pathogène.

### **Pourquoi utiliser les bactériophages comme outil de diagnostic ?**

Les infections transmises par les tiques augmentent à l'échelle mondiale - la maladie de Lyme est l'une des infections à transmission vectorielle les plus répandues aux États-Unis et en Europe et atteint des niveaux épidémiques (Kugeler et al. 2015 ; Sykes et al. 2014). Alors que la plupart des tiques ont la capacité de transmettre un certain nombre d'agents pathogènes qui causent la maladie humaine, la maladie de Lyme est la maladie transmise par les tiques la plus connue et est causée par des bactéries du genre *Borrelia* ; typiquement *Borrelia burgdorferi* qui sont des bactéries spirochètes Gram négatif. Les borrelies sont divisées en différentes espèces; parmi les plus communes figurent *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis* et *B. miyamotoi* nouvellement identifié. Le taux d'échec global élevé des tests liés aux infections transmises par les tiques (ICT) souligne la nécessité d'adopter de nouvelles approches, c.-à-d. de ne pas se fier à la sérologie et aux tests à deux niveaux.

Les tests basés sur la PCR sont de plus en plus souvent utilisés en milieu clinique et ils présentent plusieurs avantages distincts par rapport à la sérologie. Ils détectent directement la présence d'agents infectieux. Contrairement à la sérologie, elles ne dépendent pas du développement d'anticorps, qui peut prendre plusieurs semaines, et d'ailleurs tous les patients ne sont pas en mesure de les développer. Néanmoins, le test PCR a aussi ses limites : Les tests d'ADN ne font pas de distinction entre les organismes vivants et les organismes morts. Le concept est que nous ne cherchons plus la bactérie, mais son bactériophage obligatoire, qui cherche à trouver la bactérie pour survivre. Le matériel génétique du bactériophage est spécifique aux bactéries auxquelles il est associé. Cela signifie que les différentes espèces de bactéries auront des bactériophages différents.

Les bactériophages ne sont présents que sur les infections bactériennes actives; par conséquent, un test basé sur les phages est une preuve directe d'une infection active. Le goulot d'étranglement actuel dans la détection de *Borrelia* par PCRs est leur faible sensibilité. Nous avons développé une méthode directe et spécifique, plus sensible. Notre méthode de détection (brevetée par Phelix R&D et Leicester University, WO2018083491A1) consiste à cibler la présence de prophages en surnombre dans le cycle lysogénique des bactéries. Plus précisément, une façon d'augmenter la sensibilité d'un test PCR est d'augmenter le nombre de cibles PCR. Contrairement aux méthodes PCR actuelles du diagnostic de Lyme qui amplifient les régions d'ADN génomique bactérien qui n'ont qu'une copie dans chaque bactérie (comme le gène d'ARNr 16S bactérien, le gène *RecA* et la région intergénique 5S-23S), nous proposons un test PCR plus sensible, basé sur le phage pour détecter la maladie de Lyme et la fièvre récurrente causée par *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Pour ce faire, nous ciblons une séquence d'ADN de phage spécifique à toutes les espèces de *Borrelia* : Maladie de Lyme et fièvre récurrente. Nos projets actuels basés sur les phages se concentrent maintenant sur une série d'autres bactéries connues pour être impliquées dans les infections bactériennes chroniques telles que *Rickettsia*, *Bartonella*, *Sutterella* et *Mycoplasma*. Les bactériophages pourraient devenir un outil de diagnostic basé sur le principe que s'il y a des phages, c'est parce qu'il y a des bactéries vivantes. Les phages sont dans la circulation sanguine à la recherche de bactéries, car s'ils ne les trouvent pas, ils mourront. Et ils sont beaucoup plus nombreux que les bactéries (il y a 10 à 100 bactériophages par bactérie). Cette approche offre une sensibilité accrue due au fait qu'il y a beaucoup plus de phages circulants que de bactéries, donc elle est précise et plus sensible que les tests PCR conventionnels

qui sont souvent négatifs en raison de la faible concentration bactérienne dans le sang. Il s'agit également d'un test DIRECT, qui met en évidence le matériel génétique bactérien propre à l'organisme, contrairement à tous les tests indirects existants (test ELISA, Western BLOT, LTT/ELISPOT). Deuxièmement, elle permet de différencier les différents sous-types de bactéries (*B. burgdorferi* s.l., *B. miyamotoi*, ...), ainsi que les fièvres récurrentes. Enfin, ce test est aussi le meilleur choix pour la détection précoce (rappelons que les anticorps ont besoin de plusieurs semaines pour se manifester...).

### **Qu'est-ce que le test Phelix Phage ?**

Le test Phelix Phage (brevet n° WO2018083491A1) est réalisé sur du sang total, mais peut également être utilisé pour tout autre matériel suspecté de contenir un agent pathogène donné (biopsie, liquide de ponction d'une articulation gonflée, liquide céphalorachidien ou directement sur les tiques). La toute première étape consiste à extraire l'ADN à l'aide d'une méthode manuelle spécifique pour assurer la meilleure récupération possible de l'ADN pathogène. L'ADN extrait subit la qPCR en utilisant des amorces et des sondes brevetées pour une détection de phage spécifique. Les fragments amplifiés sont ensuite analysés par séquençage afin de confirmer la positivité de l'échantillon (c'est-à-dire d'écarter la possibilité de faux positifs). Cette technique est maintenant appliquée pour la toute première fois pour la détection de *Borrelia* (*B. burgdorferi* s.l. et éventuellement *B. miyamotoi*, *B. hermsii*, *B. duttonii*, etc). Cette technique est actuellement testée pour d'autres maladies transmises par les tiques (*Bartonella*, *Rickettsia*, etc.). Afin d'améliorer encore le dosage, nous testons présentement la même procédure sur des échantillons d'urine et de la salive. Dans cette optique, tous les patients reçoivent, dans le kit de test, 2 tubes EDTA pour le sang total ainsi qu'un récipient pour la première urine du matin et un pour la salive. Notre objectif est de comparer la sensibilité du test entre le sang et l'urine ou la salive et si cet essai est concluant, il permettra un test sur l'urine et/ou sur la salive et donc de contourner la prise de sang invasive, permettant un test plus facile pour tous les patients et particulièrement les enfants. Le prix du test comprend et soutient cette recherche et ce développement continu.

### **Interprétation**

Il est important d'analyser le résultat du test dans le contexte clinique de la personne testée. Le résultat du test de Phage PCR est rapporté comme positif ou négatif. Dans certains cas, elle peut également être signalée comme "borderline", ce qui signifie que seuls de petits fragments d'ADN ont été trouvés (à la suite d'une augmentation de l'apoptose, de la résolution d'une infection, etc). Un résultat positif signifie qu'au moment du test, le patient avait les *Borrelia* présent dans son corps. Un résultat positif en l'absence de symptômes suggère que, malgré la présence de bactéries, le système immunitaire semble contrôler la situation. Dans le cas d'un test positif après un diagnostic sérologique récent ou antérieur, il est important de discuter de la possibilité d'un syndrome post-lyme tardif ou d'une forme chronique de borréliose. Un résultat négatif signifie qu'au moment du test et dans un échantillon donné, la présence de *Borrelia* n'a pas été mise en évidence. Il est important de se rappeler qu'à un stade avancé, le nombre de bactéries est très faible et le plus souvent elles sont cachées dans les tissus; par conséquent, le nombre de phages en circulation sera également faible. Il est conseillé de refaire le test au moment où l'on constate l'aggravation des symptômes. Rappelez-vous que les tiques transportent et transmettent de nombreux autres agents pathogènes (*Bartonella*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, etc.) qui présentent tous des symptômes très similaires. Ainsi, un test *Borrelia* négatif avec des symptômes persistants pourrait suggérer la présence d'autres pathogènes. Enfin, il est également important de se rappeler qu'à des stades avancés, les symptômes reflètent des dysrégulations immunitaires et gastro-intestinales profondes dues à une ou plusieurs maladies à transmission vectorielle non traitées auparavant. L'inflammation chronique et les infections de bas grade sont les complications résultant de maladies à transmission vectorielle découvertes et doivent donc être traitées en plus de la recherche de la présence d'un pathogène spécifique.

**Références :** Cette nouvelle approche a été présentée lors de plusieurs conférences internationales :

1. Conférence à l'ILADS Paris 2017 : Dr Louis Teulières
2. Affiche à ILADS Paris 2017 : M. Jinyu Shan (Université de Leicester)
3. Conférence à la Conférence sur les pathologies chroniques Anvers 2018 : Dr Louis Teulières
4. Conférence à la Conférence internationale Lyme Madrid 2018 : Dr Louis Teulières
5. Conférence à l'ILADS Chicago 2018 : Dr Louis Teulières
6. Affiche à ILADS Chicago 2018 : M. Jinyu Shan (Université de Leicester)
7. Conférence à la Crypto-Infections Conference Dublin 2019 : Dr Jinyu Shan (Université de Leicester)