

Transcript – Innovirology session 7.2 Méthodes émergentes dans le diagnostic bactérien à base de phage

Diapositive 1 :

L'utilisation de diagnostics basés sur le phage va au-delà du simple lysotypage et certaines techniques ont déjà des applications industrielles. Dans cette présentation, nous allons expliquer en détail certaines technologies utilisant des phages déjà utilisées pour détecter des agents pathogènes cliniques et alimentaires.

Diapositive 2 :

Ce tableau résume les méthodes diagnostiques basées sur les phages et disponibles dans le commerce. Celles-ci visent quatre agents pathogènes (*Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis* et *Staphylococcus aureus*). Ces outils utilisent cinq stratégies principales pour évaluer si les phages peuvent infecter avec succès l'hôte : 1. Amplification du phage, 2. Production du gène rapporteur, 3. Quantification de l'amplification de l'ADN génomique du phage, 4. Détection par MS de la production de protéines structurales du phage et 5. Dot blot membranaire.

Comme indiqué dans le tableau, chaque outil possède sa propre matrice d'échantillon distincte, son temps de détection et sa sensibilité. Les matrices vont des échantillons de sang aux cultures de cellules, le temps de détection peut encore être long (environ 48 heures), mais plusieurs méthodes ont des temps de détection beaucoup plus courts, jusqu'à 2 heures. La sensibilité finale peut atteindre 100 CFU / ml.

Ces paramètres montrent la vitesse et la sensibilité supérieures pouvant être obtenues avec les méthodes basées sur le phage, en comparaison aux méthodes traditionnelles utilisées jusqu'ici. Pour plus de détails sur ces outils, nous nous référons à l'article de Schofield et al.

Diapositive 3 :

Une autre aire d'application des méthodes diagnostiques basées sur le phage est la détection d'agents pathogènes dans l'industrie alimentaire. Cette industrie est soumise à des réglementations strictes en matière de qualité bactérienne afin de prévenir les intoxications alimentaires, pour lesquelles le risque augmente suite à l'augmentation des aliments prêts à consommer et de la mondialisation.

Néanmoins, les méthodes classiques d'évaluation de la qualité bactérienne des produits alimentaires sont souvent lentes et inefficaces, par exemple un comptage aérobie pour révéler des agents pathogènes peut prendre environ 72 heures. De telles méthodes de diagnostic lent entraînent une distribution retardée des produits alimentaires et des ingrédients finis, nécessitant une plus grande capacité de stockage, et provoquant une réponse plus lente aux éventuelles épidémies. De plus, ces techniques nécessitent souvent beaucoup de main-d'œuvre, sont opérateur-dépendantes et requièrent de nombreux consommables.

Le diagnostic basé sur les phages pourrait apporter des outils pour contourner certains de ces inconvénients et concevoir des procédures rapides, robustes et fiables pour détecter d'importants agents pathogènes d'origine alimentaire tels que *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* et *Listeria monocytogenes*.

Une telle procédure est la technologie VIDAS, qui a été utilisée pour concevoir un système automatisé de détection utilisant des protéines de phage recombinantes pour divers agents pathogènes.

Diapositive 4 :

Cette technologie utilise une protéine de phage recombinante fixée qui reconnaît spécifiquement l'agent pathogène ciblé. Ceci permet le piégeage de l'agent pathogène spécifique. Au cours d'une deuxième étape, un autre anticorps conjugué à une enzyme se lie à d'autres antigènes de la bactérie cible. Dans l'étape finale, cette enzyme libère un produit de réaction détectable et dont l'intensité peut être déterminée afin de quantifier le nombre de bactéries cibles présentes dans l'échantillon.

Diapositive 5 :

Cette stratégie est incorporée dans un strip unique comme représenté en haut à gauche, au milieu une représentation schématique est montrée. Après une première étape d'enrichissement d'environ 18-24 heures, l'échantillon est chargé dans la bande, après quoi une pointe contenant les anticorps à base de phage est utilisée pour collecter les cellules cibles potentielles. Les rainures consécutives sont utilisées pour laver les cellules non liées, ajouter l'anticorps secondaire et permettre la réaction enzymatique. Enfin, le produit de réaction est mesuré. Ce processus complet prend 48 minutes, en tant que telle, cette technique est plus rapide que les autres procédures, nécessite un travail moins intense et diminue les consommables.

Diapositive 6 :

A côté de cette technique, d'autres technologies sont en cours de développement. Celles-ci peuvent dépendre de l'amplification du phage ou de phages rapporteurs, ces deux principes ont déjà été abordés dans le sujet précédent. D'autres options sont la mesure de la libération de marqueurs bactériens liés à une infection (comme la libération de l'ATP après la lyse cellulaire) ou l'utilisation de phages comme composant d'affinité dans les dispositifs biosensors. Pour plus de détails sur ces options, nous nous référons à l'article de Schmelcher et Loessner.

Diapositive 7 :

Un composant de phage qui peut être utilisé pour détecter et reconnaître des bactéries Gram positives sont les sites de liaison de la paroi cellulaire des endolysines. L'article discuté ici montre l'optimisation d'une librairie composée de protéines de fusion entre les rapporteurs fluorescents et les domaines de liaison de la paroi cellulaire de différentes classes d'endolysines ciblant *Listeria*. Une fois établie, cette librairie peut détecter et différencier des souches spécifiques de *Listeria*, pour cela, l'affinité de liaison de ces protéines de fusion aux différentes souches est déterminée. Ensuite, ces protéines de fusion possédant de grandes affinité et spécificité peuvent être mélangées avec des cultures hétérogènes pour observer les différentes souches présentes.

Diapositive 8 :

Pour ceux qui souhaitent en savoir plus sur les méthodes diagnostiques basées sur les phages, nous nous référons aux articles suivants. Le lien lance un film sur la technologie VIDAS.