



HAL
open science

Microfluidique papier pour le diagnostic de terrain : préparation d'échantillon et multiplexage

Pierre Garneret

► **To cite this version:**

Pierre Garneret. Microfluidique papier pour le diagnostic de terrain : préparation d'échantillon et multiplexage. Mécanique [physics]. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLET072 . tel-03174261

HAL Id: tel-03174261

<https://pastel.hal.science/tel-03174261v1>

Submitted on 19 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'ESPCI PARIS

**Microfluidique papier pour le diagnostic de terrain :
préparation d'échantillon et multiplexage.**

Soutenue par

Pierre GARNERET

Le 05 décembre 2019

Ecole doctorale n° 391

**Sciences Mécaniques,
Acoustique, Electronique et
Robotique de Paris**

Spécialité

Mécanique

Composition du jury :

Martine, BEN AMAR Professeur des universités, ENS - UPMC	<i>Président</i>
Julien, REBOUD Senior Lecturer, Glasgow University	<i>Rapporteur</i>
Vincent, SENEZ Directeur de recherche, Institut pour la recherche sur le cancer de Lille (IRCL) - CNRS	<i>Rapporteur</i>
Ariel, LINDNER Directeur de recherche, CRI Université de Paris - INSERM	<i>Examineur</i>
Patrick, TABELING Professeur émérite, ESPCI PARIS	<i>Directeur de thèse</i>

Remerciements

Ces trois années passées au sein du laboratoire MMN ont été riches, passionnantes et intenses. Merci à la première génération qui m'a accueilli et si bien intégré dans l'équipe : Loïc, Marie, Jules, Benjamin, Joshua et bien sûr Laura qui a su me transmettre la passion nécessaire pour continuer le projet qu'elle avait commencé.

Un grand merci aux générations suivantes qui ont su entretenir ce climat unique de camaraderie propre au MMN : Elian, Marine, Margaux, Gustavo, Hubert, Alexandre, Etienne, Franck, Marc, Marjan... Merci pour ces beaux projets (clip, théâtre, ski...) menés ensemble, qui ont rendu la vie au labo trépidante. Votre disponibilité et votre aide (spéciale dédicace à Elian) auront été un véritable atout pour ce projet.

Merci à toute l'équipe de la CIBU, à l'Institut Pasteur avec qui j'ai eu la chance de travailler. L'humour, la bonne humeur des MOT-men, et votre disponibilité (spéciale dédicace à Damien), ont rendu cette collaboration joyeuse et efficace. Merci à l'aide précieuse d'Aurélia au quotidien, ainsi qu'au suivi et aux conseils indispensables de Jessica. Merci enfin à Jean-Claude pour ses conseils et son accompagnement serein.

Un remerciement très particulier à Etienne Coz, avec qui j'ai partagé ce sujet de recherche. Véritable confident scientifique durant ces deux dernières années, notre ping pong à idée perpétuel et la complémentarité de nos compétences a fait de ce projet une véritable aventure d'équipe. Ingénieur, il a su cadrer, formaliser bon nombre des idées farfelues sortant de mon cerveau d'apprenti biologiste. Enfin, son travail expérimental a participé grandement aux derniers résultats, obtenus durant la période de rédaction de ce manuscrit. Je remercie aussi Harry, Shubham, Aurélien et Miguel, qui m'ont beaucoup aidé durant leurs stages de recherche.

Un très grand merci à Fabrice Monti, co-directeur de cette thèse, qui a suivi semaine après semaine les péripéties du projet à l'occasion de ces fameuses réunions du mercredi matin. Une véritable intimité s'est formée entre nous (dis moi si je me trompe tout de même...). Tu as su me guider sur tous les plans : scientifique, technique mais aussi au niveau de l'organisation, de la motivation. Merci pour ton dévouement, ta volonté et ta confiance.

Enfin, merci à Patrick Tabeling, directeur de cette thèse, et du laboratoire hors du commun dans lequel j'ai passé ces trois années. Il m'a offert un environnement de travail idéal, des conseils avisés et une grande liberté d'action. J'ai une grande admiration pour la

manière dont vous avez construit et mené le laboratoire MMN. Un grand merci aussi pour votre jeunesse et votre audace, qui nous ont permis de réaliser des projets fous comme le clip musical du MMN lab, ou la pièce de théâtre du petit monde. J'en garderai un souvenir inoubliable.

Ces trois années resteront à jamais dans ma mémoire, ainsi que vous tous.

(we are the MMN lab, the team is strong and bonded)

Table des matières

Introduction	5
1 Etat de l'art : test d'amplification sur papier	11
1.1 Les amplifications isothermes : la biologie moléculaire du terrain.	13
1.2 La microfluidique papier : un support idéal.	25
1.3 État de l'art des tests de détections d'acides nucléiques sur papier.	32
2 Adapter la rt-LAMP au papier	47
2.1 Matériels et méthodes	48
2.2 Le problème critique de la biocompatibilité LAMP/papier	59
2.3 Optimiser la biologie moléculaire de la réaction LAMP sur papier	63
2.4 Multiplexer et quantifier grâce à la microfluidique papier	73
3 Détecter plusieurs cibles sur un même disque : multiplexer la rt-LAMP.	79
3.1 Matériels et méthodes	81
3.2 Adapter la (rt-)LAMP QUASR sur papier	85
3.3 Développement du multiplexage QUASR.	90
3.4 Multiplexer les rt-LAMP QUASR Zika, Dengue et Chikungunya sur papier.	95
4 Analyser un échantillon sur le terrain : dispositif papier pour le diagnostic multiplex des arbovirus Zika, Dengue et Chikungunya.	107
4.1 Matériels et méthodes	108
4.2 Stocker les réactifs dans le papier	114
4.3 Extraction et répartition de l'ARN sur un système papier multiplexé.	125
5 Dispositif papier pour le diagnostic multiplex de pathogènes vétérinaires : étude préliminaire.	141
5.1 Matériels et méthodes	143
5.2 Design d'amorces (rt-)LAMP pour le diagnostic du coryza.	143
Conclusion et perspectives	153
6 Annexes	171

Introduction

LA santé publique, définie par l'OMS comme "la science et l'art de prévenir les maladies, de prolonger la vie et d'améliorer la santé physique et mentale à un niveau individuel et collectif" [1], met en jeu des problématiques à la fois préventives (contrôler et éviter l'apparition des maladies) et curatives (traiter de manière appropriée les patients). Dans ces deux problématiques, la notion de diagnostic est primordiale

Le diagnostic, identification d'une maladie, se situe ainsi à la croisée entre médecine des populations et médecine individuelle. Ceci est bien illustré dans le cadre des maladies infectieuses : à l'échelle de la population, recenser les diagnostics permet de connaître l'évolution du nombre et de la localisation des cas, pour agir de manière préventive et enrayer l'expansion d'une épidémie ; à l'échelle d'un patient, le diagnostic de l'agent infectieux permet d'administrer le traitement approprié.

Les Objectifs de Développement Durable des Nations Unies. En 2015, en écho à la publication des objectifs de développement durables de l'ONU, un état des lieux approfondi de la santé publique mondiale a été publié par l'OMS. Un chapitre entier est dédié aux maladies infectieuses, où il est mentionné à de nombreuses reprises l'importance d'un diagnostic rapide et facile d'accès pour combattre les infections principales :

Hépatite C : *"The lack of simple and affordable diagnostics pose barriers to implementing scalable public health programmes"*

VIH : *"Lack of awareness of HIV status is often the main reason for low coverage with ARVs, which requires easy access and high utilization of HIV testing for all relevant population groups."*

Infections sexuellement transmissibles : *"There is a growing need for rapid diagnostic tests to augment syndromic management and detect asymptomatic infections, particularly in women."*

L'importance des tests de terrain. Ces maladies infectieuses sont majoritairement présentes dans des zones à faible ressources et pour lesquelles l'accès à des centres de diagnostic est limité. Ainsi apparaît-il un besoin pour des tests de diagnostic *Point of care* (ou POC - au chevet du patient), pour diagnostiquer de manière fiable, les maladies infectieuses, en l'absence de laboratoire. L'OMS a défini des caractéristiques requises pour

de tels tests résumées par l'acronyme ASSURED : A affordable ; S sensitive ; S specific ; U user-friendly ; R rapid & robust ; E equipment-free ; D deliverable.

Aujourd'hui, pour diagnostiquer les maladies infectieuses, deux principaux types de tests existent, les tests ELISA et les tests PCR.

Test ELISA : Une des principales manières de détecter la présence d'un pathogène dans un échantillon, est la méthode ELISA, développée par Engvall and Perlmann en 1971. Cette technique immunologique, basée sur l'affinité spécifique entre un anticorps et un antigène, a été adaptée pour le terrain dans les années 90 sous la forme de tests bandelettes immunochromatographiques [2]. Cependant leur sensibilité et spécificité, ne sont pas optimales, et la lecture des tests sur le terrain est parfois complexe.

Test PCR : L'autre méthode majeure de diagnostic consiste à détecter une séquence génétique du pathogène par la méthode PCR, adaptée au diagnostic dans les années 90 [3]. Cette méthode de biologie moléculaire est très sensible et spécifique, mais ne peut être réalisée facilement hors d'un laboratoire. Elle nécessite en effet plusieurs étapes de pipetage, et un appareil coûteux (thermocycleur).

Adapter le test PCR au terrain. Pouvoir réaliser des tests PCR à bas coût sur le terrain serait très intéressant. En effet, pour la majorité des infections, cette méthode est la plus fiable, c'est le *Gold Standard*. Les dispositifs de "terrain" existant sont cependant très coûteux ($\sim 20000\text{€}$ pour la machine + $\sim 100\text{€}$ par test pour le Cepheid de *GenXpert*). Grâce à la microfluidique – science des micro-systèmes et de la physique des fluides à l'échelle micrométrique – il est désormais possible de miniaturiser les volumes de fluides manipulés, de réaliser des "laboratoires sur puces" de quelques centimètres carré, dans lesquels des PCR sont réalisables (figure 1). Cette nouvelle technologie est en train de révolutionner le domaine des systèmes d'analyses, en accélérant les processus et diminuant les volumes nécessaires, ce qui réduit les coûts. Cependant, chaque microsystème coûte encore plusieurs dizaines d'euros et des appareils contrôlant l'injection des fluides sont nécessaires à son utilisation. Les puces microfluidiques classiques ne sont donc pas en mesure d'amener le test PCR au lit du patient, dans les zones à faibles ressources.

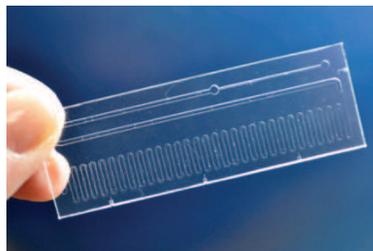


FIGURE 1 – Puce microfluidique permettant de réaliser une PCR pour la détection du virus de la grippe. Adapté de [4]

Les amplifications isothermes et la microfluidique papier, deux technologies prometteuses. L'amplification isotherme consiste à réaliser un test PCR à une température constante, évitant alors l'utilisation de thermocycleurs coûteux [5]. La microfluidique papier, quant à elle, utilise le papier, pour réaliser des microsystèmes dans lesquels le pompage des fluides se fait passivement par capillarité. Des réactions chimiques et biochimiques de détection peuvent avoir lieu au sein du papier. Cette technologie frugale, parfois qualifiée de "low-tech", apporte, à l'opposé des hautes technologies, une forte valeur au matériau millénaire qu'est le papier [6]. Depuis le milieu des années 2010, l'alliance de ces deux technologies apparaît très attractive pour réaliser des "tests PCR" sur le terrain [7].

Un cas récent : l'épidémie à virus Zika. En avril 2015, une épidémie à virus Zika débute au Brésil avec plus de 109 000 cas confirmés et 210 000 suspectés fin 2016 (PAHO/WHO, 2018, figure 2.b). Ce flavivirus est transmis principalement par les piqûres de moustiques du genre *Aedes*, également vecteurs des virus de la Dengue et du Chikungunya.

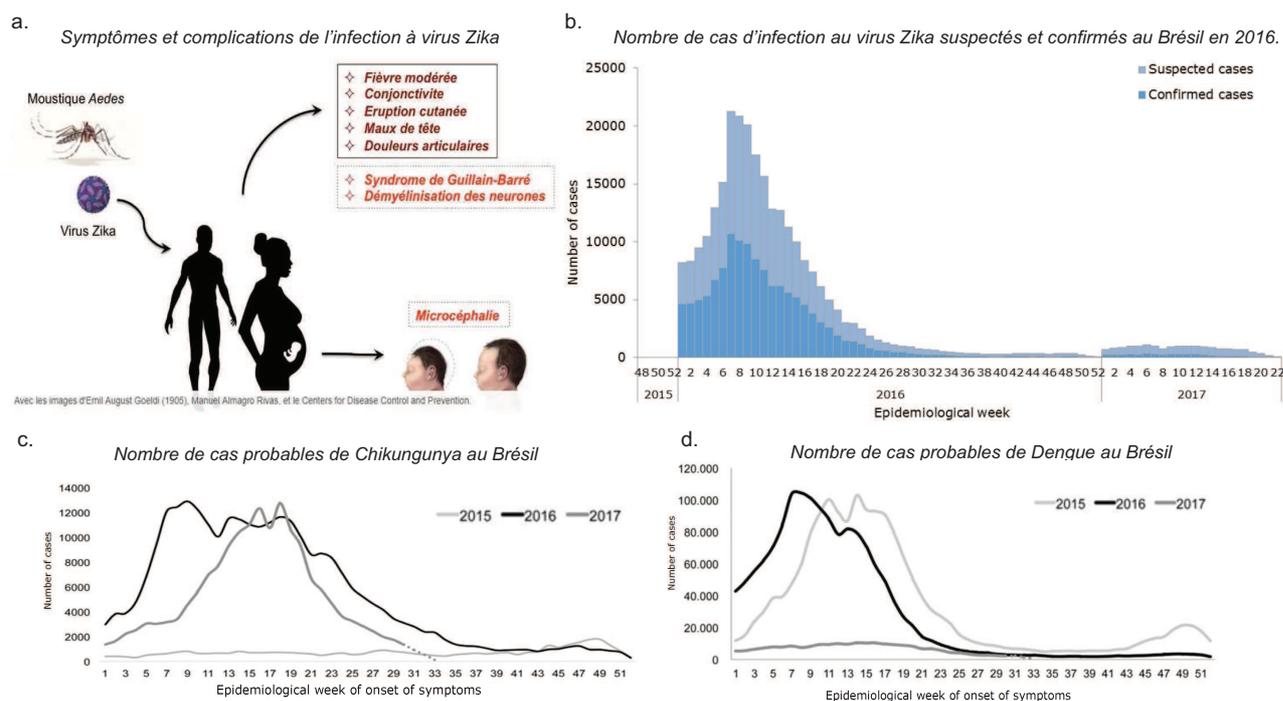


FIGURE 2 – Rappel sur l'épidémiologie des arbovirus au Brésil. (a) Schéma résumant les symptômes et complications de l'infection à virus Zika, adapté de *safarine-news.fr* (b) Nombre de cas de Zika recensés au Brésil durant l'épidémie (2016) (c) Nombre de cas probables d'infection au virus Chikungunya au Brésil entre 2015 et 2017 (d) Nombre de cas probables d'infection au virus de la Dengue au Brésil entre 2015 et 2017. ©Paho/WHO, 2017

En février 2016, l'épidémie atteint un pic, et des études établissent qu'un certain nombre de cas de microcéphalie recensés chez des nouveaux nés seraient dus à une infection congénitale au virus Zika transmise par la mère durant la grossesse [8]. L'infection au virus

Zika est aussi portée responsable de certains cas de syndrome de Guillain Barré [9]. Ces découvertes alarmantes amènent l'OMS à considérer l'épidémie de Zika et ses conséquences neurologiques comme "une urgence de santé publique de portée internationale (USPPI)" [10].

Dans le cadre du Brésil, la co-occurrence d'épidémies saisonnières des virus de la Dengue et du Chikungunya (figure 2.c et d) rendent difficile le diagnostic clinique, les symptômes étant similaires (fièvre, douleur articulaire...). Les recommandations conjointes de l'OPS (Organisation Panaméricaine de la Santé) et de l'OMS devant une suspicion d'arbovirose sont donc la réalisation en série des trois tests PCR détectant la Dengue, le virus Zika et le Chikungunya (figure 3)

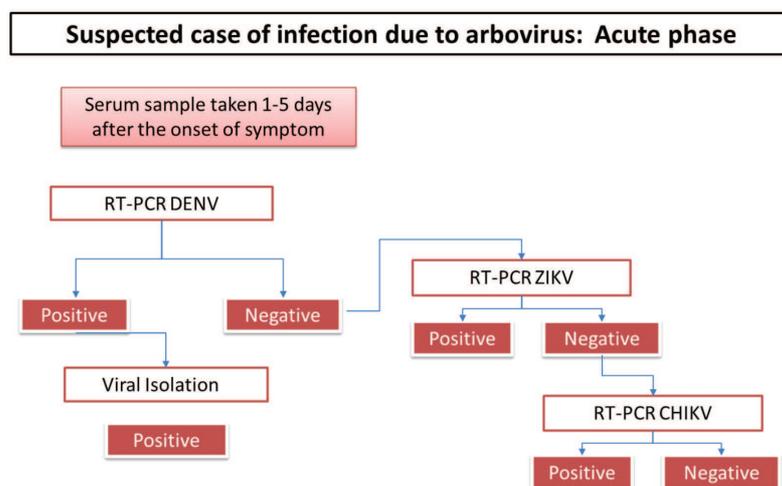


FIGURE 3 – Algorithme décisionnel préconisé par l'OPS et l'OMS en cas de suspicion d'infection à un arbovirus.

Des communications ultérieures de l'OMS au sujet de l'épidémie soulignent alors le besoin de tests de terrain spécifiques du virus Zika, associés à des tests des virus Dengue et Chikungunya [11]. En effet la réalisation des trois tests PCR n'est possible que dans des hôpitaux de ville spécialisés, et n'est donc pas envisageable sur l'ensemble du territoire. Des tests bandelettes immunochromatographiques sont développés mais ils possèdent deux inconvénients majeurs : ils manquent de spécificité pour faire la distinction entre les virus Zika et Dengue (deux flavivirus "cousins" sur le plan génétique), et leurs résultats peuvent être affectés par une infection ou une immunisation antérieure¹.

En résumé, l'OMS déclare : *"There is a strong interest and need for rapid and simple to use in vitro diagnostics (IVDs) for Zika virus infection at or near to the point of care"* [10]

1. OMS : "serological assays are subject to cross-reactivity especially in patients with prior flavivirus infection or immunization history" [11]

DEPUIS 2015, une collaboration entre le laboratoire MMN (Microsystèmes, MEMS et Nanostructures) de l'ESPCI et le laboratoire CIBU (Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence) de l'institut Pasteur, a pour but de développer des tests de terrain "type PCR", en associant leurs deux expertises respectives : microfluidique papier et amplification isotherme. L'équipe MMN a développé des méthodes de design et fabrication des systèmes microfluidiques papier, et la CIBU met au point des amplifications isothermes pour la détection des bactéries et virus émergents. Les premiers dispositifs d'amplification isothermes sur papier testés par Laura Magro en Guinée, lors de l'épidémie Ebola en 2014-2015, ont démontré qu'il était pertinent d'associer ces deux technologies [12].

C'est dans le cadre de cette collaboration, et suite au constat des récents besoins en tests de terrain pour les arbovirus Zika, Dengue et Chikungunya, que ce projet de thèse a vu le jour. Il a pour objectif de développer et coupler les technologies de microfluidique papier et d'amplification isotherme pour réaliser un test multiplexant la détection des trois pathogènes.

Nous décrirons dans un premier chapitre l'état de l'art de ces deux nouvelles technologies et les récents travaux menés pour les associer.

Le second chapitre décrira les travaux menés pour adapter le suivi en temps réel de l'amplification isotherme LAMP sur disque de papier, ouvrant la porte à des possibilités de quantification et des premiers tests de multiplexage.

Le troisième chapitre discutera du développement sur papier d'un multiplexage "haute densité", permettant de multiplier le nombre de test par disque en utilisant la méthode QUASR récemment développée [13].

Le quatrième chapitre traitera du développement des fonctionnalités propres au terrain : le stockage des réactifs, et la préparation de l'échantillon.

Enfin, une cinquième partie élargira le spectre des applications d'un tel test en dehors du diagnostic humain. Nous y traiterons du récent développement d'un projet de test sur papier pour le diagnostic vétérinaire.

Chapitre 1

Etat de l'art : test d'amplification sur papier

Contents

1.1 Les amplifications isothermes : la biologie moléculaire du terrain.	13
1.1.1 Biologie moléculaire des amplifications isothermes	13
1.1.2 Visualisation des produits d'amplification.	18
1.2 La microfluidique papier : un support idéal.	25
1.2.1 Propriétés physiques et chimiques.	25
1.2.2 Patterning et fabrication de systèmes microfluidiques en papier.	27
1.2.3 Fonctions microfluidiques sur papier	28
1.3 État de l'art des tests de détections d'acides nucléiques sur papier.	32
1.3.1 Préparer l'échantillon : extraction d'acides nucléiques sur papier.	32
1.3.2 Amplification d'acides nucléiques sur papier.	35
1.3.3 Détection de l'amplification sur papier.	37
1.3.4 Systèmes <i>sample-to-answer</i> .	39
1.3.5 développement d'un dispositif idéal de détection sur papier des virus Zika, Dengue et Chikungunya : objectifs et contraintes	45

La réaction en chaîne par polymérase ou PCR (pour *polymerase chain reaction*) est une méthode de biologie moléculaire inventée en 1986 [14]. Véritable révolution technologique, elle value rapidement le prix Nobel à son découvreur, Kary Mullis, en 1993. Cette technique, est toujours quotidiennement utilisée dans la majorité des laboratoires de biologie. Elle utilise une enzyme (la Taq polymérase), ainsi que des oligonucléotides spécifiques (les amorces) pour dupliquer une partie donnée d'un brin matrice : on parle alors d'amplification de l'ADN. La réaction procède par cycles successifs, contrôlés par la température du mélange réactionnel. La figure 1.1 en résume le principe :

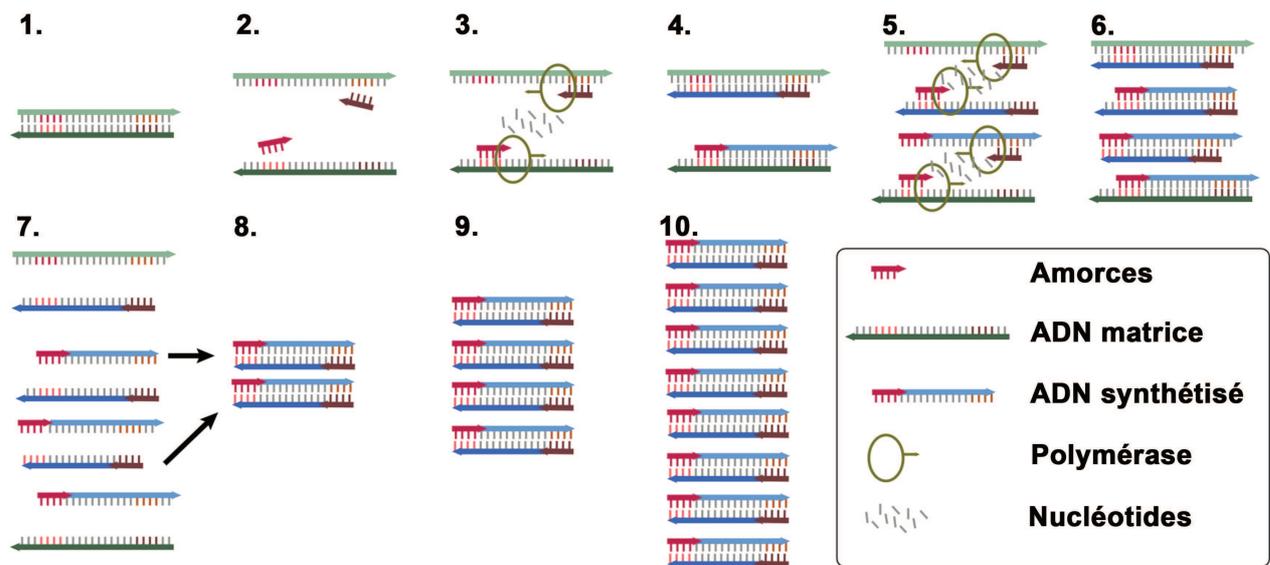


FIGURE 1.1 – Schéma illustrant les premières étapes d'une PCR. *Adapté de Wikipedia commons*

1. L'ADN double brin est mis en solution avec une polymérase, des nucléotides (A, T, G, et C) et les amorces : des oligonucléotides complémentaires de la zone à amplifier.
2. Le mélange est chauffé à 95°C (~15 secondes), entraînant la dénaturation de l'ADN double brin, puis refroidi à 60°C (~15 secondes), permettant l'hybridation des amorces sur les séquences cibles.
3. Le mélange est chauffé à 70°C (~30 secondes), La polymérase initie une copie de l'ADN à partir de l'extrémité 3' des amorces hybridées.
4. Deux brins d'ADN de la séquence cible sont alors synthétisés.
5. Le cycle reprend au début. A 95°C, les brins nouvellement synthétisés se dénaturent, a 60°C, les amorces s'hybrident et à 70°C, la polymérase initie une nouvelle copie de la séquence cible à partir de l'extrémité 3' des amorces.
6. La quantité de copie d'ADN est doublée, et le sera à chaque cycle par rapport au cycle précédent (étapes 7, 8, 9 et 10) entraînant une amplification exponentielle du nombre de copies.

Les applications de cette méthode sont multiples. La PCR permet notamment dans le cadre du diagnostic, de détecter la présence d'ADN ou d'ARN d'un pathogène donné (bactérie, virus, etc) dans un échantillon. En effet, en utilisant des amorces ciblant une séquence spécifique du pathogène, l'amplification sera signe de la présence de ce pathogène dans l'échantillon.

Cette méthode de détection est généralement la plus sensible et la plus spécifique, le *Gold standard*.

1.1 Les amplifications isothermes : la biologie moléculaire du terrain.

Comme évoqué en introduction, mettre en place un test PCR sur le terrain est complexe. Le récent développement des amplifications isothermes permet, en évitant les cycles de température, de s'affranchir de l'appareillage lourd et coûteux d'un thermocycleur.

Les amplifications isothermes, développées depuis le milieu des années 2000, procèdent, de manière similaire à la PCR, par amplification d'une séquence spécifique à l'aide d'une polymérase, et d'amorces. Leur différence principale réside dans le fait qu'elles ne sont pas composées d'une étape de dénaturation à 95°C de l'ADN double brin. La séparation des deux brins se fait alors par l'action d'une enzyme (souvent l'action de *strand displacement* d'une polymérase parfois combinée à une hélicase ou une recombinaise). De cette manière, les cycles de températures ne sont plus nécessaires.

Nous décrirons dans cette section les principes des amplifications isothermes les plus communes, ainsi que les différentes méthodes utilisées pour détecter et visualiser ces amplifications.

1.1.1 Biologie moléculaire des amplifications isothermes

Les principales amplifications isothermes sont développées : Recombinase polymerase amplification (RPA), Helicase dependant amplification (HDA), Rolling circle amplification (RCA), Strand displacement amplification (SDA) et Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Nous nous attarderons sur la méthode LAMP, la plus largement utilisée par les laboratoires, et étudiée en détail dans ces travaux de thèse.

Pour plus d'informations concernant les amplifications isothermes, le lecteur pourra se référer à la revue documentée de Angelika Niems et al. [5].

Recombinase polymerase Amplification (RPA).

La RPA est une méthode développée par Piepenburg et al. utilisant trois enzymes différentes : une polymérase à action de strand displacement (Bsu), une recombinaise

(*uvsX*) et des *single strand binding proteins* (*gp32*) [15]. Elle se déroule à 37°C.

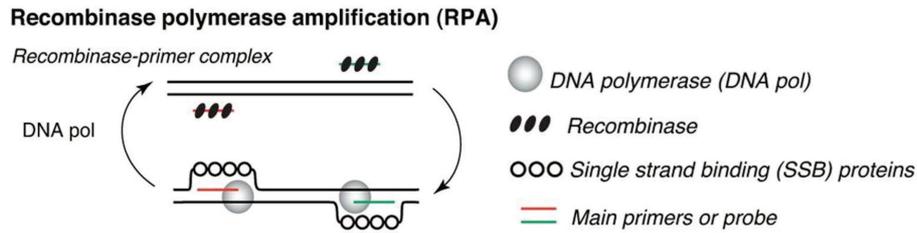


FIGURE 1.2 – Adapté de [5], Copyright © 2011 Elsevier

L'action des recombinaisons vont permettre aux amorces de s'hybrider à leurs séquences cibles, aidées par les SSB qui stabilisent la conformation simple brin de l'autre brin d'ADN. La polymérase peut alors amplifier l'ADN de la même manière qu'une PCR.

Helicase dependant Amplification (HDA).

La HDA est une méthode développée par M. Vincent et al. en utilisant là aussi un cocktail de trois enzymes : Une polymérase à action de strand displacement (exo- Klenow fragment), une hélicase (UvrD assisté par mutL), et des *single strand binding proteins* (T4 *gp32*) [16]. Elle se déroule à 55°C.

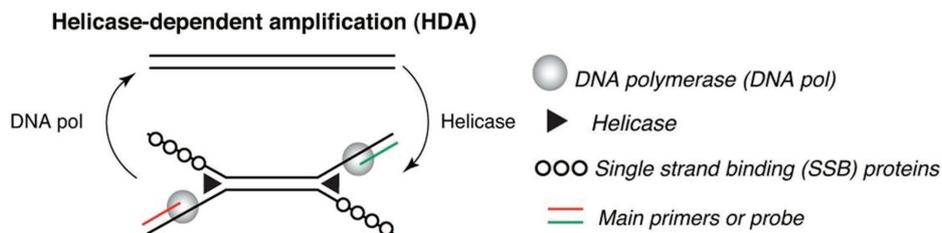


FIGURE 1.3 – Adapté de [5], Copyright © 2011 Elsevier

De manière très similaire au mécanisme physiologique de réplication de l'ADN, les hélicases vont séparer les deux brins, laissant les amorces s'hybrider et la polymérase peut ainsi élonger l'ADN à partir de leur extrémité 3'.

Rolling Circle Amplification (RCA).

La RCA est une méthode développée dans les années 1990 inspirée de la réplication des bactériophages *in vivo*. Elle est appliquée au début des années 2000 pour la détection d'acides nucléiques par Lizardi et al. puis Zhang et al. [17] [18]. Elle emploie généralement une ligase (T4 ligase) et une polymérase à action de strand displacement (Phy39) et se déroule à 65°C.

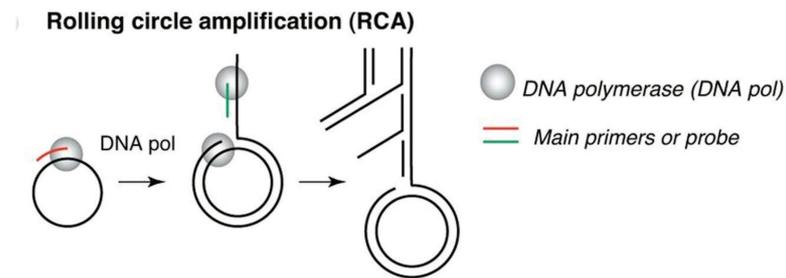


FIGURE 1.4 – Adapté de [5], Copyright © 2011 Elsevier

L'ADN circulaire fait ici office de sonde. Il est linéaire en début de réaction et n'est circularisé par la ligase qu'en présence de la séquence à détecter. Un fois circulaire, la polymérase et les amorces vont le copier un grand nombre de fois pour aboutir à un complexe d'ADN linéaire très ramifié (qualifié de "*Hyperbranched*"). Il est nécessaire de procéder en deux temps : la ligation d'abord, puis l'amplification en ajoutant l'enzyme polymérase et les amorces au mélange réactionnel.

Strand Displacement Amplification (SDA).

La SDA, est une méthode développée par Hellyer et al. en utilisant l'action combinée d'une polymérase à action de strand displacement (Bst) et d'une enzyme de restriction (par ex. BsoBI). Elle se déroule à 37°C.

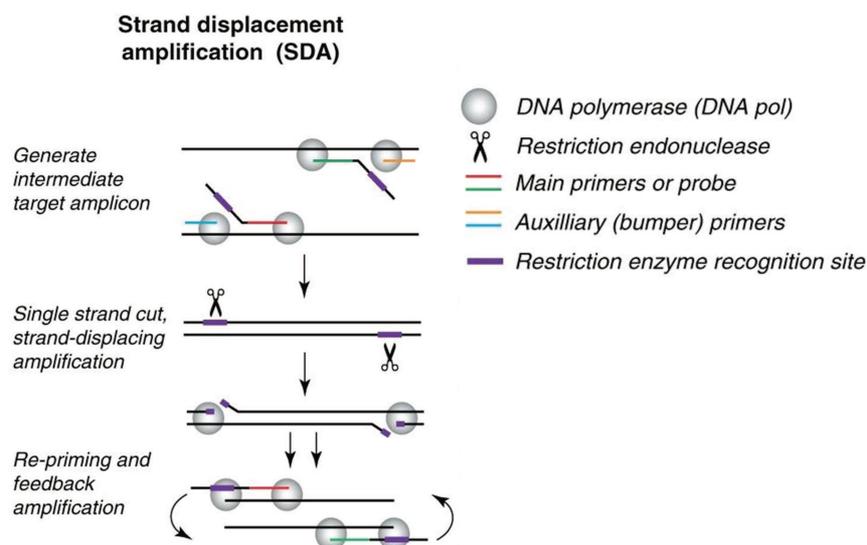


FIGURE 1.5 – Adapté de [5], Copyright © 2011 Elsevier

Deux couples d'amorces sont employés. Premièrement, des amorces internes modifiées possédant sur le brin en 5' la séquence de restriction de l'enzyme utilisée (non complémentaire de la cible) initient une première amplification. Elles sont déplacées par des

amorces externes situées de part et d'autre de ce premier amplicon. Les premiers amplicons contiennent alors la séquence de restriction, et sont donc clivés, initiant un nouveau site potentiel d'amplification. La réaction continue en alternant restriction et amplification.

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP).

La LAMP est une méthode développée par Notomi et al. [19]. Elle emploie une polymérase à action de strand displacement (Bst) et se déroule à 65°C. Deux générations de LAMP ont été développées, la première employant deux couples d'amorces (les amorces internes FIP/BIP et les amorces externes F2/B3), puis la suivante employant un couple supplémentaires (les amorces loop LF/LB).

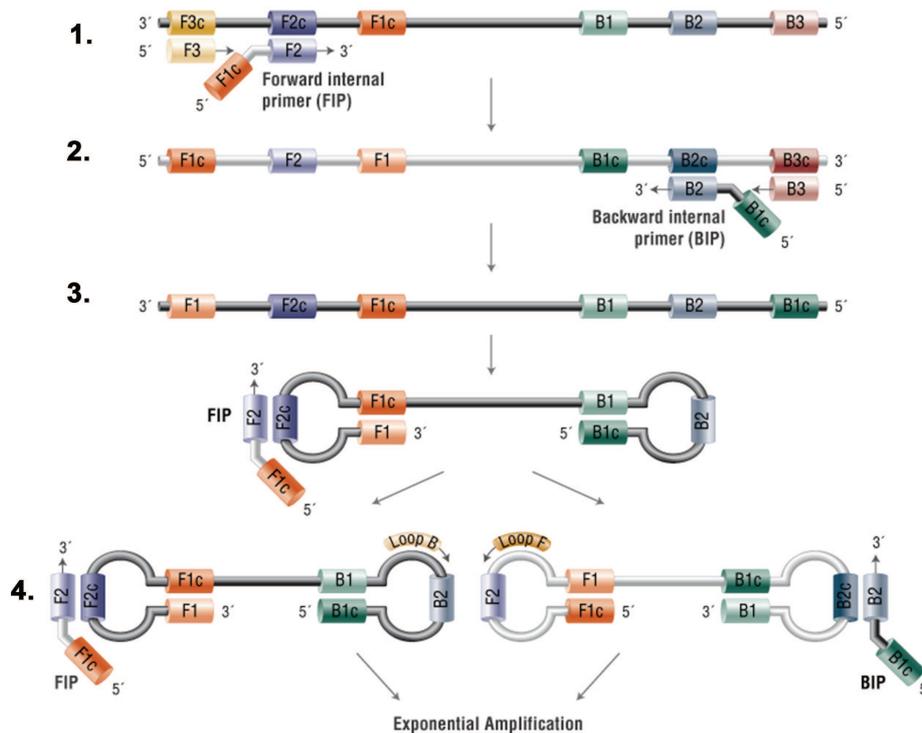


FIGURE 1.6 – Schéma résumant les premières étapes de la réaction LAMP. Copyright © *New England Biolab*.

Amorces externes et internes. Pour une zone spécifique à amplifier, six régions sont déterminées : F3 et B3, les plus externes, puis F2 et B2, intermédiaires et F1 et B1, les plus internes. On nomme F3c, B3c, etc les compléments inverses de F3, B3, etc présent sur le brin d'ADN opposé. Les amorces externes sont composées des séquences F3 et B3 (s'hybridant sur les séquences F3c et B3c de l'ADN cible). Les amorces internes (FIP/BIP) sont composées respectivement des séquences F2 et B2 auxquelles sont ajoutées en 5' les

compléments inverses des amorces F1 et B1 : F1c et B1c. Ainsi FIP est composé de F1c et F2 bout à bout et BIP est composé de B1c et B2 bout à bout.

Premières étapes d'amplification. Comme illustré en figure 1.6, les premières étapes d'amplification sont les suivantes :

1. La séquence F2 de l'amorce FIP s'hybride à F2c de la cible et initie une amplification. Le brin copié est ensuite déplacé par l'amplification initié par l'amorce F3.
2. Sur le premier amplicon, la séquence B2 de l'amorce BIP s'hybride à B2c et initie une amplification. Le brin copié est ensuite déplacé par l'amplification initié par l'amorce B3.
3. l'amplicon résultant des deux premières étapes, est la structure principale de la réaction LAMP. En effet, les modifications distales apportées par les séquences F1c et B1c des amorces FIP et BIP lui permettent d'adopter une conformation caractéristique en haltère ou *dumbbell structure*. L'amplicon peut s'hybrider sur lui même en formant des Loop entre ses propres séquences F1/F1C et B1/B1c.
4. A partir de cette configuration, plusieurs schémas d'amplifications sont possibles, partant des extrémités F1 et B1 de la *dumbbell structure* ou impliquant d'autres amorces FIP et BIP (décrites en détail par Notomi et al. [19]). Ces produits ne sont pas des copies identiques de la séquence cible, mais des structures de haut poids moléculaire, superposant des séquences de la *dumbbell structure*.

Enfin, dans une publication ultérieure, Notomi et ses collègues ont développé un couple additionnel d'amorces, les amorces Loop (LF et LB) [20]. Illustrées en doré dans l'étape 4 de la figure 1.6, LF et LB sont les compléments inverses des séquences situées entre resp. F2 et F1, et B2 et B1. Elles interviennent dans les étapes ultérieures d'amplifications et permettent d'accélérer la réaction (des explications détaillées du mécanisme des amorces Loop sont disponibles dans l'article suivant [20]).

Ce qu'il faut retenir

- Plusieurs méthodes d'amplifications isothermes ont été développées ces dernières années, utilisant des polymérases à action de *strand displacement*.
- Certaines utilisent des enzymes additionnelles pour séparer et stabiliser les brins d'ADN (RPA, HDA), d'autres des scénarios d'amplifications différents du scénario classique de la PCR et menant à des amplicons de haut poids moléculaire (RCA, LAMP). D'autres encore utilisent des nickases ou enzymes de restrictions pour créer des sites d'initiation d'amplification supplémentaires (SDA).

- Des tests de détection d'acides nucléiques utilisant la HDA, la SDA ou la LAMP ont été approuvés depuis quelques années par la FDA, autorité régulatrice américaine. En 2016, L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a réalisé une étude multicentrique validant l'utilité de la TB-LAMP, pour la détection du bacille de la tuberculose chez des patients atteints de tuberculose pulmonaire [21]. Ce premier succès prometteur, met en avant l'utilité et l'efficacité des amplifications isothermes dans le cadre du diagnostic de terrain.

1.1.2 Visualisation des produits d'amplification.

La visualisation des produits d'amplification est un paramètre déterminant. Sur le terrain, elle doit être simple, rapide et nécessiter peu d'équipement. Nous aborderons dans cette partie les différentes méthodes historiques développées pour visualiser les produits d'une amplification ainsi que les méthodes développées spécifiquement pour le terrain, simplifiant la lecture des amplifications isothermes.

La méthode de base : migration sur gel d'agarose.

L'électrophorèse des acides nucléiques sur gel d'agarose, est la méthode courante de visualisation des produits PCR en laboratoire. Les produits migrent et se séparent selon leur taille dans un gel d'agarose, on peut alors connaître la taille des amplicons en les visualisant grâce à un agent intercalant fluorescent. On observe en figure 1.7 les migrations sur gel des produits de HDA et RPA, très semblables à ceux d'une PCR classique, et celui caractéristique d'une amplification LAMP, bande montrant des produits de tailles variables allant jusqu'à un très haut poids moléculaire.

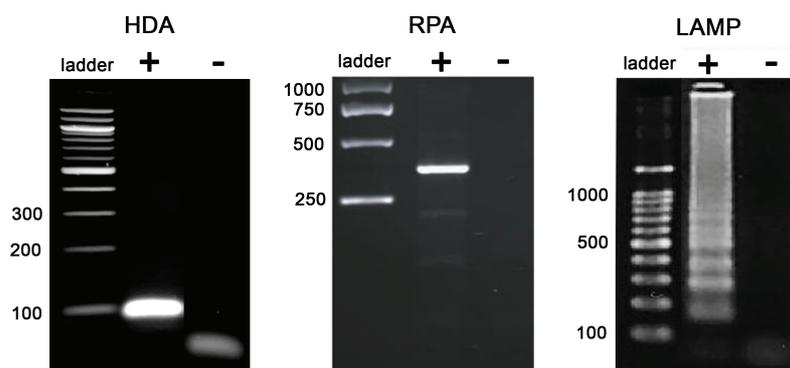


FIGURE 1.7 – Migration sur gel des produits d'amplification de HDA [16], RPA [15] et LAMP [19]

L'électrophorèse sur gel est bien valide en laboratoire mais son application sur le terrain est limitée. La fabrication du gel, le pipetage des produits d'amplification et le temps de migration la rendent peu adaptable. De plus, elle nécessite l'ouverture des tubes

post-amplification, ce qui représente un risque important de contamination des surfaces et des réactifs par des amplicons. Cela peut provoquer par la suite des faux positifs, si les amplicons contaminent les mélanges réactionnels ultérieurs.

Détection en tube : agents intercalants et produits secondaires d'amplification.

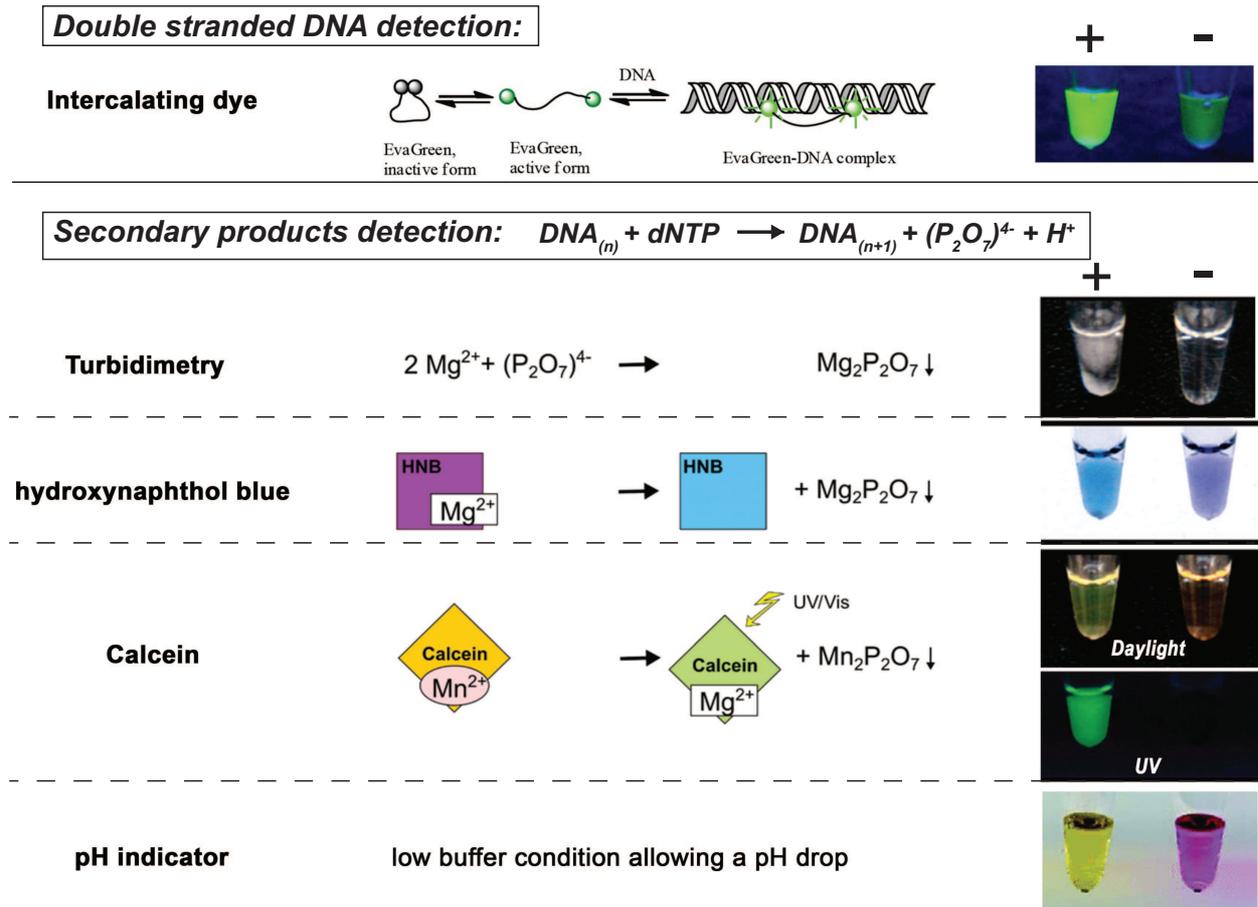


FIGURE 1.8 – Détection directe de l'amplification par agent intercalant, ou indirecte par les produits secondaires d'amplification. Adapté de [22] [23] Copyright Future Science et biotium.com

Agent intercalant : La méthode la plus répandue permettant de visualiser directement une amplification sans ouvrir le tube consiste à ajouter au mélange réactionnel un agent intercalant. Ces molécules ont une affinité spécifique pour l'ADN double brin, et se fixent à celui-ci. Cette fixation induit un changement de conformation de la molécule qui la rend fluorescent. Au cours de l'amplification, une grande quantité d'ADN double brin est synthétisée, les agents intercalants s'y fixent et deviennent fluorescents, et l'on peut alors suivre la cinétique de réaction en suivant l'évolution de l'intensité de fluorescence au cours du temps (cf figure 1.8).

Détection d'un produit secondaire d'amplification : le pyrophosphate. La synthèse d'ADN produit, pour chaque nucléotide ajouté, un ion pyrophosphate ($P_2O_7^{4-}$). L'augmentation de la concentration en $(P_2O_7)^{4-}$, témoin d'une amplification, peut être détectée de différentes manières :

- Turbidimétrie : Le magnésium présent dans le mélange réactionnel va se complexer aux ions pyrophosphates et former un précipité, donnant un aspect trouble blanchâtre au mélange réactionnel (cf figure 1.8). On peut alors suivre la réaction en mesurant en temps réel la turbidité du mélange réactionnel [24].
- Hydroxynaphthol blue : L'hydroxynaphthol blue (HNB), colorant azoïque utilisé dans le titrage des ions métalliques, peut être ajouté au mélange réactionnel et servir d'indicateur coloré de l'amplification. Complexé avec l'ion Mg^{2+} en début de réaction, il est de couleur violette. Lors de l'amplification, les ions $(P_2O_7)^{4-}$ nouvellement formés se complexent avec les ions Mg^{2+} , et non plus avec l'HNB, qui devient alors bleu. Ce changement de couleur du violet au bleu peut être mesuré par absorbance ou observé à l'œil nu et témoigne d'une amplification (cf figure 1.8).
- Calcéine : La calcéine est une autre molécule utilisée dans le titrage des ions métalliques (notamment l'ion Calcium Ca^{2+} en biologie cellulaire). Le complexe calcéine/magnésium (Mg^{2+}) est fortement fluorescent, à l'inverse, le complexe calcéine/manganèse (Mn^{2+}) est très peu fluorescent. L'ajout de calcéine et de l'ion Mn^{2+} en réaction permet de suivre la réaction de la manière suivante : en début de réaction, la calcéine, liée au Mn^{2+} n'est pas fluorescente. La synthèse d'ADN entraîne une augmentation de la concentration en $(P_2O_7)^{4-}$ dont une partie se lie au Mn^{2+} . Cette réaction déplete la calcéine en Mn^{2+} , qui se lie alors au Mg^{2+} et devient fortement fluorescente [25]. Ce signal intense, témoin de l'amplification, peut être observé à l'œil nu, avec ou sans excitation UV (cf figure 1.8).

Détection d'une variation de pH : Pour chaque nucléotide ajouté, un proton (provenant de l'hydroxyle en 3' du brin amorce) est aussi libéré. Dans des conditions de tampon appropriées, ce relargage de protons aboutit à une diminution du pH, que l'on peut détecter en utilisant un indicateur colorimétrique. Dans le cas du rouge phénol par exemple, l'amplification pourra être détectée par un changement de couleur de la solution du rouge au jaune, témoin de l'acidification du milieu réactionnel (cf figure 1.8).

N.B : Les méthodes de détections de produits secondaires (turbidimétrie, HNB, calcéine, et pH) ont été développées et utilisées principalement pour la LAMP. En effet, cette réaction produit 50 à 100 fois plus d'ADN qu'une PCR classique, multipliant par le même facteur la quantité de produits secondaires, et donc la puissance du signal observée [26] [27]. Dans l'optique d'une application de terrain, ces méthodes sont pertinentes car nécessitent peu d'instrumentation pour la lecture. Le changement de couleur de la LAMP

contenant du rouge phénol par exemple est facilement identifiable à l'œil nu.

Détection spécifique : sondes fluorescentes et latéral flow

Les méthodes abordées plus haut détectent la présence d'une amplification, d'une synthèse d'ADN, mais ne peuvent pas renseigner sur la nature de cette amplification, spécifique ou non spécifique. En effet, il arrive lors de certaines réactions d'amplification, que les amorces s'hybrident entre elles, forment des structures *hairpin* amplifiables, ou interagissent avec d'autres séquences, menant à une amplification non spécifique, c.-à-d. une synthèse d'ADN différente de l'amplicon ciblé.

Sondes fluorescentes pour la PCR. Des méthodes plus précises permettant de détecter spécifiquement les amplicons ont alors été développés, d'abord pour la PCR dans les années 1990. Elle sont basées sur la technique FRET (Fluorescence resonance energy transfert) [28]. Une des plus célèbre, la méthode "*Taqman*" tire parti de l'activité exonucléase 5'-3' de la Taq polymérase, pour cliver une sonde oligonucléotidique complémentaire de l'amplicon. Le clivage de cette sonde sépare les fluorophore et quencher qui lui sont associés, ce qui génère un signal fluorescent (cf figure 1.9.a).

Une autre méthode de détection spécifique développée à la même époque utilise l'ajout de "*molecular beacons*". Ce sont des oligonucléotides possédant fluorophore et quencher aux extrémités, dont la partie centrale s'hybride à l'amplicon et dont les régions 3' et 5' sont complémentaires de sorte qu'elle forment une structure Hairpin en solution. Lors de l'hybridation à l'amplicon, le fluorophore et le quencher sont séparés, ce qui génère un signal fluorescent (cf figure 1.9.b).

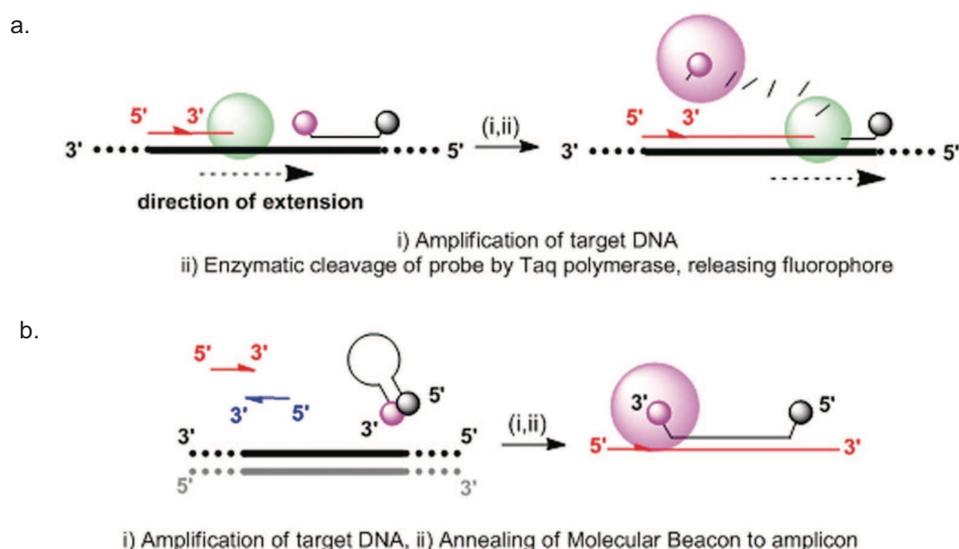


FIGURE 1.9 – Schéma des méthodes de détection spécifiques (a) Taqman et (b) Molecular beacon. Adapté de [29] *Copyright Oxford University Press.*

Sondes fluorescentes pour les amplifications isothermes. Des méthodes de détection spécifiques ont aussi été développées pour les amplifications isothermes. Une méthode inspirée de la méthode Taqman a notamment été appliquée à la RPA [15]. Dans le cas de la LAMP, la polymérase ne possède pas une activité exonucléase 5'-3' mais plutôt une activité de *strand displacement*, la méthode Taqman n'est donc pas applicable. Des molecular beacons mais aussi d'autres architectures basées sur des sondes FRET ont été développées ces dernières années. Nous les décrivons ici.

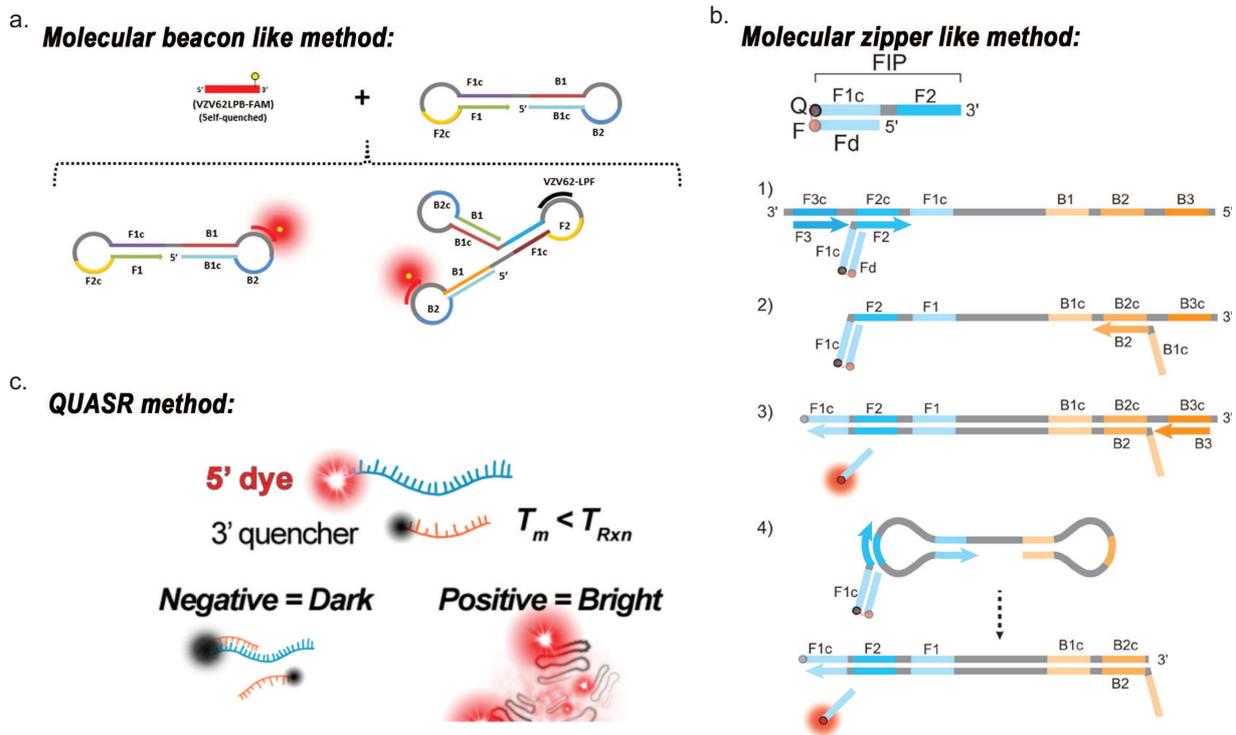


FIGURE 1.10 – Méthodes de détection spécifique des amplicons LAMP. (a) méthode type molecular beacon, adapté de [30], *Copyright Nature Publishing Group* (b) méthode type molecular zipper, adapté de [31] *Copyright Future Science* (c) méthode type QUASR, adapté de [13], *Copyright ACS*

Méthodes type "molecular beacon" : des molecular beacons ont été développés pour la détection d'amplicons LAMP [32]. Une des complexité du design réside dans le fait que ces structures doivent être hybridées de manière stable à l'amplicon à 65°C. Une autre alternative récemment développée par Gadkar et al. utilise des *self quenching probes* dont la structure secondaire induit un quenching en solution, et qui émettent un signal une fois fixée à l'amplicon LAMP [30] (figure 1.10.a)

Méthodes type "molecular zipper" : Développées d'abord pour la RCA par Yi et al., les "molecular zipper" tirent avantage de l'activité strand displacement de la polymérase [33]. Une des amorces impliquée dans l'amplification possède un fluorophore à son extrémité 5', et un quencher oligo y est associé. Durant l'amplification, la polymérase, en amplifiant la région 5' de l'amorce, va déplacer le quencher, ce qui génère un signal fluorescent.

les molecular zipper ont été associés aux amorces LF/LB et aux amorces FIP/BIP avec succès [34] [31] (figure 1.10.b). Un des avantages de cette méthode est la possibilité de suivre l'amplification en temps réel. Cependant, l'interaction amorce/quencher ralentit la réaction LAMP et peut la rendre moins sensible [13].

Méthodes type "QUASR" : une dernière méthode nommée "*Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporter*" (QUASR) a été développée récemment par Curtis et al. puis Ball et al. en 2016 [35] [13]. de même que pour les molecular zipper, une des amorces LF/LB ou FIP/BIP est utilisé comme sonde (amorce QUASR) et possède un fluorophore en 5'. Un oligo quencher est aussi utilisé mais il est court (~10nt) de sorte que sa température d'hybridation soit bien inférieure à 65°C. Ce quencher n'est donc pas hybridé durant la réaction. Si aucune amplification n'a lieu (ou une amplification non spécifique n'impliquant pas l'amorce QUASR), le quencher se réhybride à l'amorce QUASR en fin de réaction (à température ambiante) et aucun signal n'est généré. Mais si une amplification a lieu, Le quencher ne peut plus se réhybrider à l'amorce en fin de réaction, ce qui génère un signal fluorescent (figure 1.10.c). Cette méthode de détection n'affecte pas la sensibilité de la LAMP car le quencher n'interagit pas avec son amorce durant la réaction. Le signal n'est visible qu'en point final et ne peut donc pas être utilisé pour suivre la cinétique d'amplification.

Détection d'amplification via un test bandelette. les tests bandelettes ou *lateral flow tests* (LFT) peuvent être adaptés à la détection d'acide nucléique post-amplifications. En effet, des tests ELISA peuvent être adaptés à la détection d'amplicons si ces derniers sont modifiés à leurs extrémités.

En attachant fluorescéine et biotine aux extrémités 5' des amorces RPA, les amplicons peuvent alors être détectés par un test bandelette ELISA, spécifique de la fluorescéine et dont les particules d'or recouvertes de streptavidine vont lier la biotine (figure 1.11.a).

Pour la LAMP, les amorces LF et LB peuvent être marquées de la même manière (avec fluorescéine et biotine) et les amplicons possédant ces deux amorces seront retenus sur la ligne de détection du test bandelette et marqués par les particules d'or recouvertes de streptavidine (figure 1.11.b). Une variante plus spécifique développée par l'équipe de Linnes consiste à remplacer une des amorces Loop par une *strand displacement probe* dont l'extrémité 3' de l'oligo fluorescent est borgne [36].

L'avantage principal de ces méthodes est la facilité de lecture des tests bandelettes, déjà utilisés en routine sur le terrain. une ligne contrôle se colore en rouge et permet de valider le test, une seconde ligne test apparaît seulement en présence de la cible recherchée (figure 1.11.c). Il est cependant nécessaire d'ouvrir le tube post-amplification pour déposer le mélange sur la bandelette, ce qui peut provoquer des contaminations entre tests.

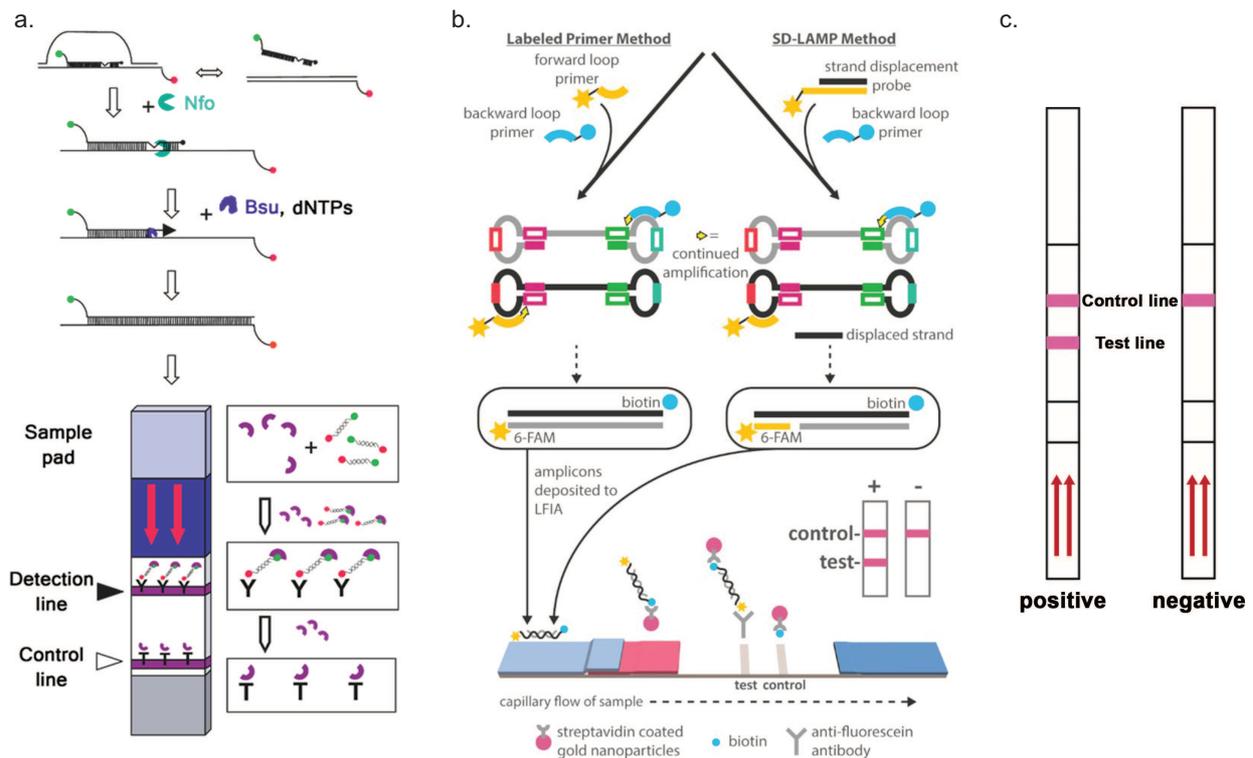


FIGURE 1.11 – Détection d'amplification via un test bandelette : (a) Schéma de détection par test bandelette d'une RPA. Adapté de [15] (b) Schéma de détection par test bandelette d'une LAMP. (c) Principe de lecture du test bandelette. Adapté de [36] *Copyright ACS*.

Ce qu'il faut retenir

- La détection et la visualisation des amplifications isothermes sur le terrain peut se faire de manière non spécifique. Soit en détectant l'ADN double brin (via un intercalant), soit pour la LAMP en détectant des produits secondaires d'amplification, ce qui permet d'obtenir un signal puissant et visible à l'oeil nu (Calcéine, indicateur pH colorimétrique).
- Des méthodes spécifiques basées sur la technique FRET ont été développées, notamment pour la LAMP (molecular zipper et QUASR). Ces méthodes produisent un fort signal fluorescent et sont spécifiques de l'amplicon, permettant d'éliminer les faux positifs. Elles sont donc particulièrement adaptées au terrain.
- Enfin, le couplage à un test bandelette détectant spécifiquement les amplicons est possible, ce qui permet une détection simple et visuelle sur le terrain, mais nécessite l'ouverture des tubes post-amplification.

1.2 La microfluidique papier : un support idéal.

De manière concomitante aux amplifications isothermes s'est développée dans les années 2000 une technologie nouvelle dans le domaine de la microfluidique : la microfluidique papier. L'idée principale est d'utiliser le papier comme matériau pour construire des systèmes microfluidiques. Les premières contributions, réalisées par Georges Whitesides ont prouvé que le papier pouvait être *patterné* en zones hydrophiles et hydrophobes, formant des canaux microfluidiques dans lesquels les fluides circulent par capillarité [37]. Cela permet de réaliser des systèmes d'analyse à très bas coût, faisant de la microfluidique papier un candidat idéal pour la réalisation de tests de terrain. La figure 1.12 illustre un des premiers dispositifs d'analyse permettant le dosage du glucose et de l'albumine urinaire.

Ces nouvelles fonctionnalités microfluidiques font du papier, peu cher et largement disponible, le matériau idéal pour la construction de systèmes d'analyses de terrain, les μ PAD (*microfluidics paper analysis devices*). Dans cette section seront développés les méthodes de fabrications, atouts et fonctions de tels systèmes.

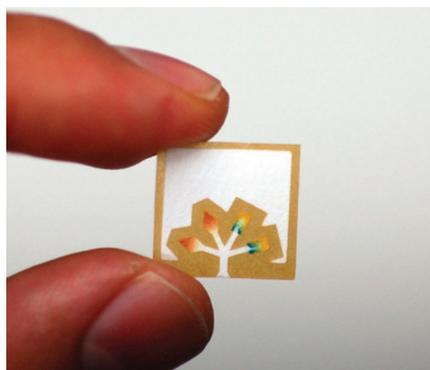


FIGURE 1.12 – Photographie d'un système microfluidique papier pour l'analyse de la BSA et du glucose urinaire, Adapté de [6] *Copyright ACS*.

1.2.1 Propriétés physiques et chimiques.

Le terme "papier" fait référence à différents matériaux. Définissant à l'origine la feuille de cellulose, il englobe à présent un grand nombre de membrane et filtre de différentes compositions. Dans les sciences analytiques, le papier a été développé sous plusieurs formats : papier pH, papier chromatographique pour la séparation de composés chimiques, papier filtres, bandelettes de nitrocellulose *lateral flow test* (LFT) pour les tests urinaires et tests de grossesse[26], *Dried Blood Spots* (DBS) pour les tests sanguins du nouveau né, ainsi que pour la collecte et la conservation d'échantillons biologiques [38].

Propriétés physiques. Tous ces substrats ont en commun une structure hydrophile poreuse, responsable de deux principales fonctions : filtration et pompe capillaire. Les premiers exemples de μ PAD utilisent du papier chromatographique. Cet enchevêtrement désordonné de fibre de cellulose est complexe, et forme des pores de taille variable, typiquement entre 5 et 20 μm [39][40].

Certains papiers, composés d'un matériau différent de la cellulose, possèdent des propriétés physiques plus contrôlées. Ainsi, les fibres de verre (dont le diamètre des fibres est contrôlable) ne gonfle pas au contact d'un liquide (figure 1.13.c). De même, les membranes de Polyethersulfone (PES) possèdent une surface bien définie et des tailles de pores régulières et contrôlées, de 0.03 à 8 μm (figure 1.13.d).

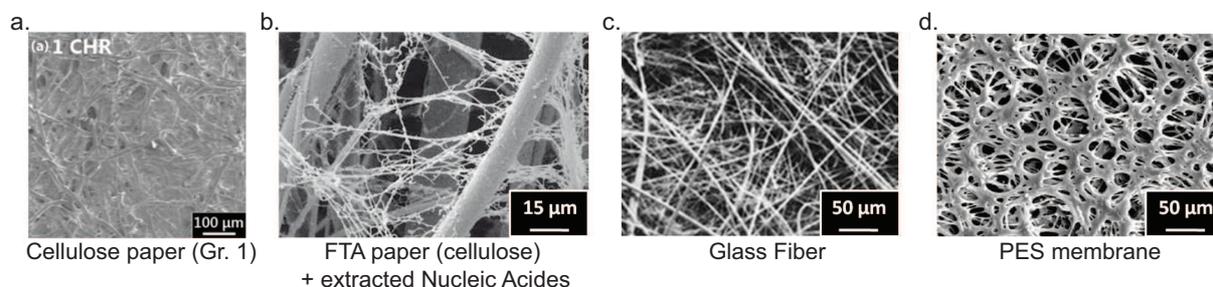


FIGURE 1.13 – Images MEB de divers papiers : (a) Papier chromatographique, adapté de [40] (b) Papier FTA et ADN capturé (avec l'aimable autorisation de GE Healthcare) (c) Fibre de verre (avec l'aimable autorisation de Sterlitech Corp.) (d) Membrane de PES (avec l'aimable autorisation de Sterlitech Corp.)

Modification chimique, traitement de surface Ces fibres peuvent être traitées chimiquement, la papier FTA en étant un bon exemple. Formé de fibres de celluloses traitées par différents agents de lyse, ce papier permet l'extraction et la conservation d'acides nucléiques à partir d'échantillons de sang séchés (DBS) [31] (figure 1.13.b).

Des molécules peuvent être immobilisées au sein du papier. Deux revues disponibles dans la littérature traitent ce sujet dans le détail [41] [42]. L'immobilisation simple par adsorption, interaction hydrophile ou liaison hydrogène peut être utilisée. Des réactions chimiques, menant à des cross-linkings ou des liaisons covalentes plus ciblées peuvent aussi être réalisées (figure 1.14.b) et permettent un contrôle plus fin de la localisation et du sens des biomolécules fixées. Les différents types de réactions impliquant les groupe hydroxyles des fibres de cellulose sont montrés en figure 1.14.c. Une imprimante à jet d'encre contenant des biomolécules d'intérêt (ADN, enzymes, anticorps) peut être employée pour traiter avec précision les surfaces du papier [43] [44].

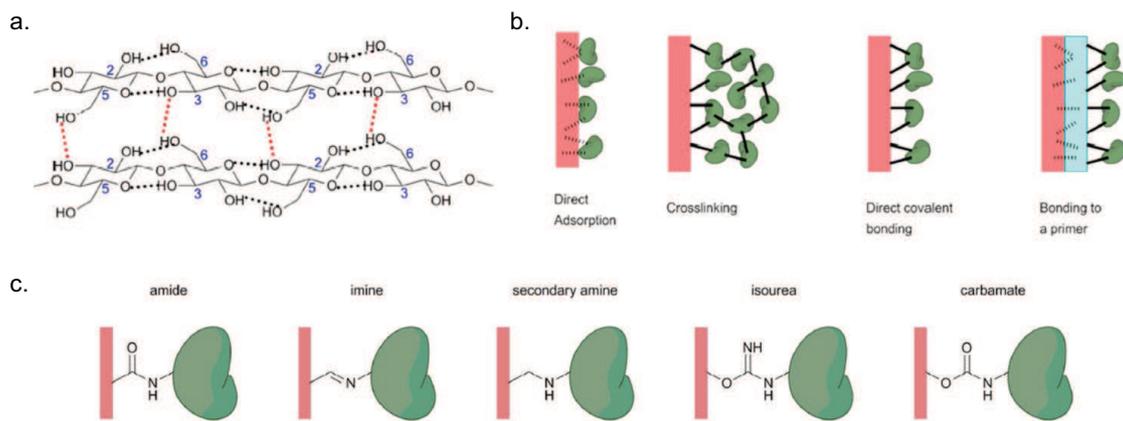


FIGURE 1.14 – Modifications chimiques de la cellulose (a) Structure moléculaire de la cellulose (b) Différentes stratégies d'immobilisation de biomolécules sur cellulose (c) Différentes liaisons covalentes possibles entre les fibres de cellulose et une biomolécule. Adapté de [42] *Copyright RSC*

La question de la biocompatibilité. La fibre de cellulose, composée de sucres, est souvent considérée comme "biocompatible" du fait qu'elle n'induit pas la destruction ou l'inhibition franche des molécules biologiques à son contact. Cependant la présence de nombreux groupe hydroxyles, peuvent provoquer l'adsorption non contrôlée de molécules biologiques à sa surface, d'autant plus importante que sa structure poreuse, possède un rapport surface/volume élevé. Ces effets d'adsorption dans le papier peuvent alors inhiber des réactions biochimiques en déplaçant le milieu réactionnel en un des composés nécessaires. Des exemples dans le cas des amplifications isothermes seront abordés dans la suite du manuscrit.

1.2.2 Patterning et fabrication de systèmes microfluidiques en papier.

La fabrication d'un système microfluidique papier consiste à "*patternner*" sur une feuille de papier, les motifs qui composent les canaux et chambres du futur système.

La patterning est réalisé par différentes techniques, comme la photolithographie [37] [45], le traitement par plasma [46], l'impression [47] [48] [49], le etching [50] ou la découpe [51] [52]. Ces techniques diffèrent par leur résolution spatiale, leur coût et leur simplicité d'utilisation [53], l'impression à la cire étant probablement la plus populaire d'entre-elles. la figure 1.15.c en illustre le mode opératoire. Les motifs de la future puce sont imprimés sur la feuille de papier à l'aide d'une imprimante commerciale utilisant une encre composée de cire. La feuille est ensuite déposée quelques minutes sur une plaque chauffante, la cire fond et pénètre l'épaisseur de la feuille, créant alors des barrières hydrophobes, parois des futurs canaux microfluidiques (figure 1.15.b). L'intégralité du processus de fabrication dure environ 5 minutes et est facile à réaliser. La résolution spatiale est de l'ordre du

millimètre. La figure 1.15.d illustre un μ PAD à deux dimensions (2D- μ PAD) réalisé avec cette technique, permettant le multiplexage de trois analyses sur un même échantillon. En empilant et pliant à la manière d'origamis, différentes couches de papier, des μ PAD à trois dimensions (3D- μ PAD) sont réalisés, permettant un flux de liquide dans le plan des feuilles mais aussi verticalement, d'une couche à une autre (figure 1.15.e). En pratique les jonctions entre les couches sont rendues stables par un adhésif double face ou de la poudre de cellulose. Ces 3D- μ PAD sont simples à réaliser et permettent de gérer les écoulement de fluides avec un certain niveau de complexité, comme l'illustre la figure 1.15.e, dont les quatre couches empilées permettent une répartition multiplexée des quatre fluides colorés.

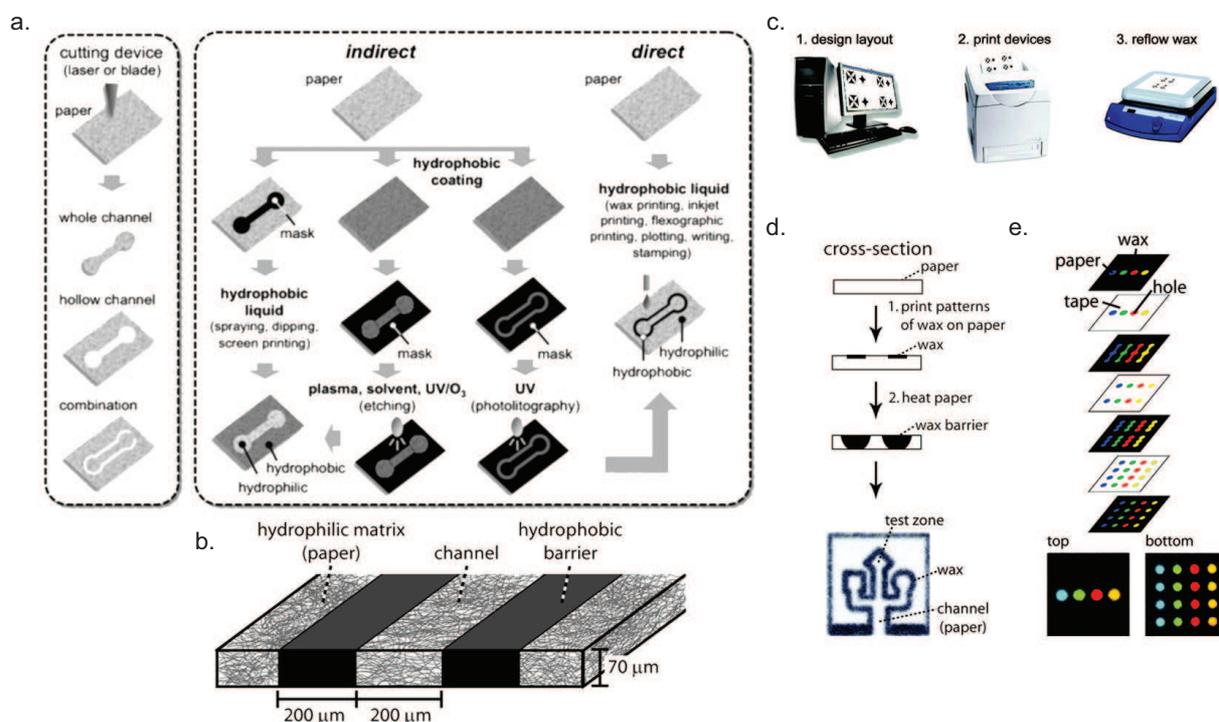


FIGURE 1.15 – Patterning et fabrication de systèmes microfluidiques papiers : (a) Différents modes de fabrication possibles. Adapté de [54] *Copyright WILEY-VCH Verlag GmbH Co* (b) Illustration d'un canal microfluidique en papier. Adapté de [6] *Copyright ACS* (c) Processus simple et rapide de l'impression à la cire, adapté de [48] *Copyright ACS* (d) 2D- μ PAD [6] (e) 3D- μ PAD [48]

1.2.3 Fonctions microfluidiques sur papier

Le papier est un support intégrant de multiples fonctionnalités :

1. Transport : Du fait de sa structure poreuse, les forces capillaires permettent au papier de transporter des fluides. Des travaux précédents ont démontré que la loi de

Lucas-Washburn [55] décrit quantitativement le transport d'une solution aqueuse dans un canal droit en papier hydrophile [56] [57] [58]. Cette loi stipule que la vitesse d'écoulement varie comme la racine carrée du temps. Le liquide imbibe donc rapidement le canal durant les premières secondes, puis sa vitesse de migration diminue peu à peu, limitant en pratique la longueur d'un canal droit à 4-5 cm. Cette contrainte peut cependant être contournée en utilisant des géométries de canaux s'élargissant au fur du trajet et permettant alors un débit constant [59].

2. Filtration : La dimension des pores variant de la centaine de nanomètres à la dizaine de micromètres permet la filtration de particules supérieures à une taille donnée. Cette fonction peut être utilisée notamment pour filtrer les matrices biologiques comme le sang [60]. Les interactions de surfaces jouent aussi un rôle dans ces processus de filtration, en adsorbant différentiellement les composés d'un mélange, ce qui a mené à l'utilisation historique du papier comme milieu séparateur de chromatographie. Certaines interactions, permettant la purification d'ADN à partir d'un échantillon seront développées dans la suite du manuscrit
3. Stockage : Le stockage de composés, est crucial pour permettre l'utilisation des systèmes d'analyses hors du laboratoire [61] [38] [62]. L'armature poreuse du papier protège et facilite la lyophilisation des mélanges réactionnels, qui peuvent être déposés et séchés localement en différents endroits du dispositif [63] [64].
4. Concentration : S'ils sont exposés à l'air, les liquides circulants dans le papier, sont sujets à l'évaporation. Cet effet provoque des flux additionnels permettant notamment de concentrer des analytes (figure 1.16.a et b) ou de les déplacer à un endroit donné du dispositif (figure 1.16.c) [65] [66]. Dans les cas où l'évaporation n'est pas désirée, les systèmes papier sont recouverts et scellés par un film adhésif [37] [67] [68].

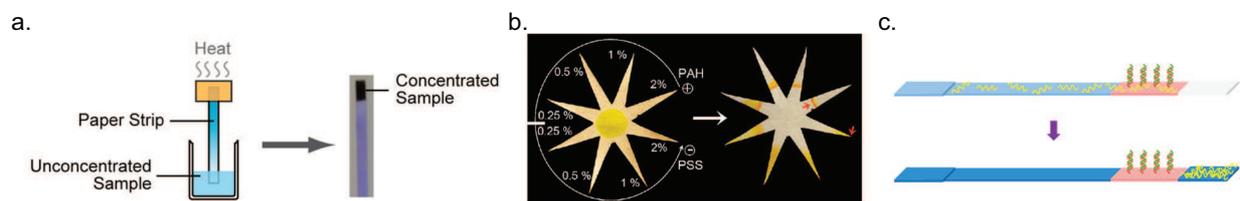


FIGURE 1.16 – Concentration sur papier : (a) Principe de la concentration par évaporation, adapté de [65], *Copyright ACS* (b) localisation différentielle en fonction de la chimie de surface du papier [69] *Copyright ACS* (c) Un lateral flow pour la concentration d'un ADN spécifique par rapport au bruit de fond des autres ADN en solution, adapté de [66] *Copyright ACS*.

5. Actuation, valves : Une des caractéristiques essentielles au contrôle des écoulements dans un microsystème est l'actuation, ou l'utilisation de valves. Le simple pliage d'une couche sur une autre dans un 3D- μ PAD, permet d'initier un flux et fait ainsi

office de valve. Le découpage d'une partie du système peut quant à lui permettre l'arrêt de l'écoulement.

D'autres méthodes d'actuations plus sophistiquées ont été développées, en utilisant par exemple des composés dissolubles entre deux canaux (cf figure 1.17.a) [70]. Le "pont" imbibé a alors une durée de vie limitée. Des traitements du papier plus ou moins hydrophobes, modifiant la vitesse de migration du fluide peuvent être employés pour contrôler l'arrivée séquentielles de différents composés (cf figure 1.17.b) [71]. Une fonction de valve peut aussi être basée sur un déplacement mécanique, due à l'imbibition et au gonflement d'une des partie du système. La valve repose sur un pilier connecté à un réservoir qui se gonfle d'eau et déplace l'extrémité d'un canal papier, permettant un "on-switch", un "off-switch" ou un "diversion-switch" (cf figure 1.17.c). Un autre dispositif tire partie de la déformabilité du papier, en utilisant un dispositif multicouche dont les épaisseurs de papier sont séparées par des espaces vides. En pressant ces endroits avec la pointe d'un stylo, les couches sont mises en contact, le réseau suivant est ouvert (cf figure 1.17.d).

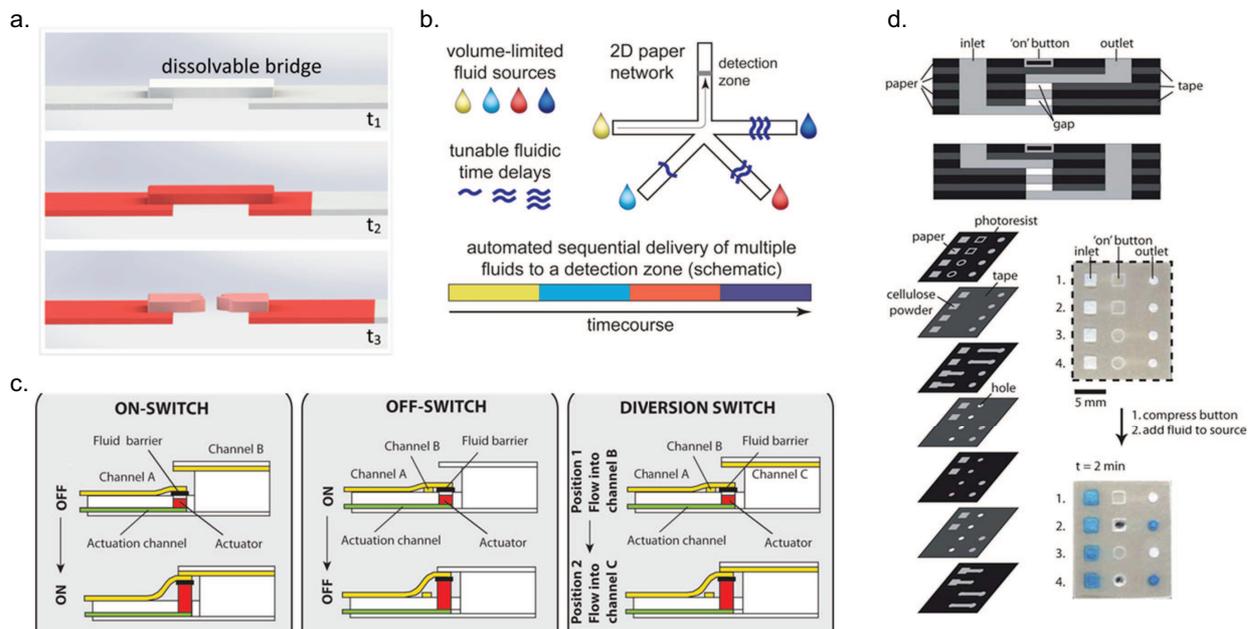


FIGURE 1.17 – Fonctions de valves sur papier : (a) Stop-flow par la dissolution d'un pont, adapté de [70], *Copyright ACS*. (b) Contrôle de l'arrivée séquentiels des fluides, adapté de [71], *Copyright RSC*. (c) Valves mécaniques par gonflement, adapté de [72] *Copyright RSC*. (d) Valves basées sur la déformation du papier par une pointe de stylo, adapté de [73] *Copyright RSC*.

6. Multiplexage : le multiplexage consiste à réaliser simultanément plusieurs analyses sur un même échantillon. Dans le cadre du diagnostic, des infections à différents pathogènes peuvent donner des tableaux cliniques similaires, rendant pertinent l'analyse multiplexée des pathogènes suspectés. De l'équivalent papier d'une plaque

multipuits (figure 1.18.a) aux géométries 2D (figure 1.18.b et c) et 3D (figure 1.18.d, e et f), la microfluidique papier permet un multiplexage important en un nombre minimal d'étapes de pipetage.

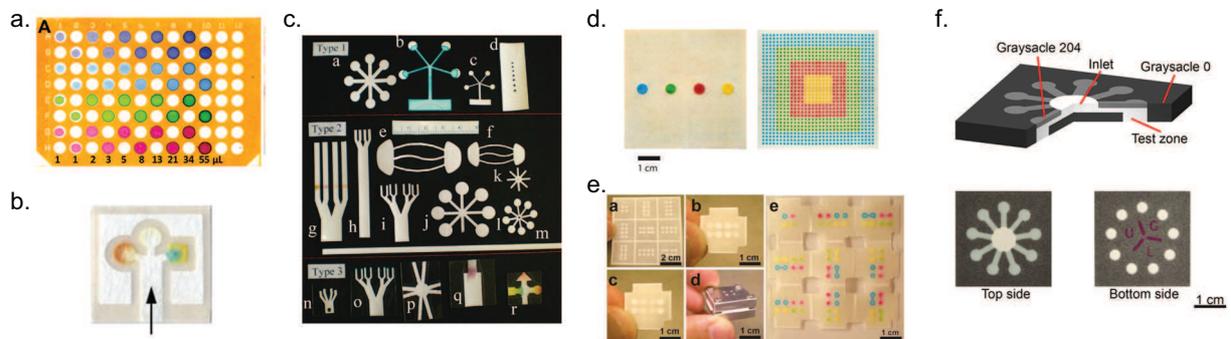


FIGURE 1.18 – Multiplexage sur papier : (a) Micropuits sur une feuille de papier par contrastes hydrophile/hydrophobe, adapté de [74], *Copyright ACS*. (b) Multiplex papier en deux dimensions pour les mesures simultanées de glycosurie et protéinurie, adapté de [37], *Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH Co.* (c) Différents designs de parallélisation, adapté de [51], *Copyright ACS*. (d) dispositif multicouche pour la réhydratation de 1024 zones de réactions, adapté de [75], *Copyright National Academy of Sciences, USA*. (e) Dispositif Origami, adapté de [76], *Copyright ACS*. (f) 3D- μ PAD désigné dans une unique couche de papier par impression de différentes épaisseurs de cire, adapté de [77], *Copyright Springer*.

Ce qu'il faut retenir

- Le patterning du papier permet la fabrication de dispositifs microfluidiques d'analyse à bas coût utilisant la pompe capillaire pour guider les écoulements.
- Plusieurs matériaux peuvent être utilisés (cellulose, fibre de verre, PES...). Leur propriétés sont différentes et peuvent être modifiées par des traitements ou greffages chimiques.
- Des fonctions complexes comme la filtration, la concentration des analytes, l'actuation (par pliage notamment), et le multiplexage sont réalisables sur papier.

1.3 État de l'art des tests de détections d'acides nucléiques sur papier.

Comme abordé plus haut, les amplifications isothermes sont des méthodes de détections d'acides nucléiques rapides, sensibles, spécifiques et nécessitant peu d'équipement (une plaque chauffante) pour être mises en place. La technologie papier, quant à elle, permet la fabrication de systèmes d'analyses à bas coût pouvant réaliser des fonctions complexes (filtration, concentration, multiplexage, etc)

L'association de ces deux nouvelles technologies, apparaît alors comme une solution idéale pour la réalisation de dispositifs de diagnostics adaptés au terrain, et possédant toutes les caractéristiques ASSURED évoquées en introduction.

La réalisation de tests de détections d'acides nucléiques sur des dispositifs papier implique trois étapes principales : (1) préparer l'échantillon (c.-à-d. extraire les acides nucléiques), (2) réaliser une réaction d'amplification isotherme sur papier, et enfin (3) visualiser sur papier la présence ou l'absence d'amplification. Dans l'idéal, ces trois étapes doivent se faire de manière simple et en utilisant un appareillage limité.

Dans cette section, nous décrirons les travaux antérieurs concernant l'extraction d'acide nucléiques, l'amplification isotherme et la visualisation de cette amplification sur papier, ainsi que les dispositifs intégrant ces trois étapes.

1.3.1 Préparer l'échantillon : extraction d'acides nucléiques sur papier.

Les réactions d'amplifications sont inhibées ou ralenties en présence d'échantillons biologiques. Les inhibiteurs présents dans les matrices biologiques (hémoglobine, immunoglobulines...) interfèrent négativement avec la polymérase et limitent son activité [78]. Il est donc nécessaire d'extraire, de purifier les acides nucléiques présents dans un échantillon avant de les amplifier.

En laboratoire. La méthode la plus utilisée en laboratoire est l'extraction en phase solide sur colonne de silice. Elle se déroule en trois étapes :

1. Lyse et capture : L'échantillon à purifier est mélangé à un tampon de lyse et capture, contenant notamment de l'éthanol et des sels dits chaotropiques (le plus souvent du thiocyanate de guanidinium), il est ensuite passé à travers la colonne de silice, possédant une affinité forte et sélective pour les acides nucléiques dans ces conditions chimiques. L'ADN et l'ARN se fixent à la silice et le reste de l'échantillon est *flushé* par centrifugation.
2. Rincage : Des tampons composés majoritairement d'éthanol sont passés à travers

la colonne pour rincer les débris cellulaires et les inhibiteurs restant, sans décrocher les acides nucléiques.

3. **Elution** : Un tampon d'élution aqueux hypo-osmotique (Tris-EDTA buffer, pH 8,1), est passée à travers la colonne. Dans ces conditions, l'affinité entre la silice et les acides nucléiques est levée. L'ADN/ARN se décroche, est élué avec le tampon et récupéré dans un tube. Il peut être dosé ensuite.

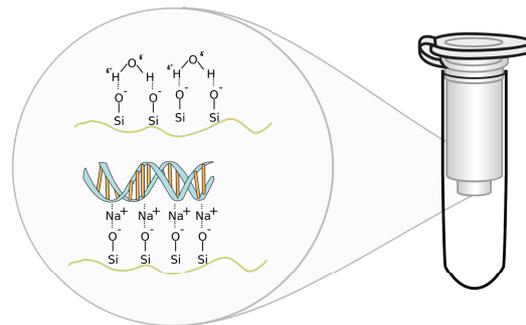


FIGURE 1.19 – Schéma d'une colonne de silice, pour la capture des acides nucléiques.

Sur papier. Plusieurs méthodes d'extraction d'acides nucléiques ont été développées sur papier, dont la plupart s'inspirent de l'extraction sur colonne décrite plus haut. Nous décrivons ici les quatre méthodes principales :

- **Extraction en phase solide sur fibre de verre** : Développée par McFall et al., cette méthode utilise l'affinité réversible entre l'ADN et la silice (composant majoritaire de la fibre de verre), et capture ainsi les acides nucléiques d'un échantillon sanguin sur un disque de fibre de verre (Fusion5, *Whatman*). Plutôt que d'utiliser une colonne et une centrifugeuse, McFall pose le disque de capture sur un pad absorbant et se sert de la force capillaire pour faire passer l'échantillon et le tampon de rinçage à travers le disque [79] (figure 1.20.a). Un origami multicouche pliable utilisant des tampons séchés au préalable dans différents disques permet, sur le même principe de réaliser une extraction d'ADN sur le terrain [80] (figure 1.20.c).
- **Extraction grâce au chitosan** : Le chitosan est un polysaccharide possédant une affinité réversible pour l'ADN liée au pH. À un pH inférieur à 6,5, le chitosan, chargé positivement va se lier aux acides nucléiques. À un pH supérieur à 6,5, le chitosan change son état d'ionisation et perd son affinité à l'ADN.

Un exemple d'extraction sur papier grâce au chitosan, est fourni par Byrnes et al. [81], dans lequel du chitosan est immobilisé sur une bandelette de fibre de verre (figure 1.20.b). L'échantillon est déposée sur la bandelette, puis migre par l'ajout de tampon supplémentaire à pH acide. On observe alors la concentration de l'ADN dans la zone de la bandelette où est fixé le chitosan (marqué par fluorescence sur la figure), en ajoutant par la suite un tampon basique, l'ADN est élué et l'ADN se

décroche et migre en aval du dispositif.

- Précipitation et filtration : Une autre méthode développée par Rodriguez et al. utilise une membrane de polyethersulfone possédant des pores de 200nm comme filtre physique pour retenir un précipitat d'ARN [82]. L'échantillon est au préalable mélangé à un tampon contenant entre autre un co-précipitant de l'ARN (RNA Glyco-blue, *Invitrogen*). Un disque de PES posé sur un pad absorbant filtre le lysat et retient l'ARN précipité. Cette méthode est aussi applicable à la capture d'ADN [67].
- Filtration inverse : Une dernière méthode développée par Kaarj et al. utilise le principe inverse. Elle consiste à faire migrer un échantillon sur une bandelette de cellulose, possédant une taille de pore de quelques microns [83]. Les débris cellulaire et macrolécules migrent peu et restent piégées à l'extrémité proximale de la bandelette. Les petites molécules, comme les ARN viraux dans ce cas, migrent et se retrouvent à l'autre extrémité, où ils peuvent être isolés.

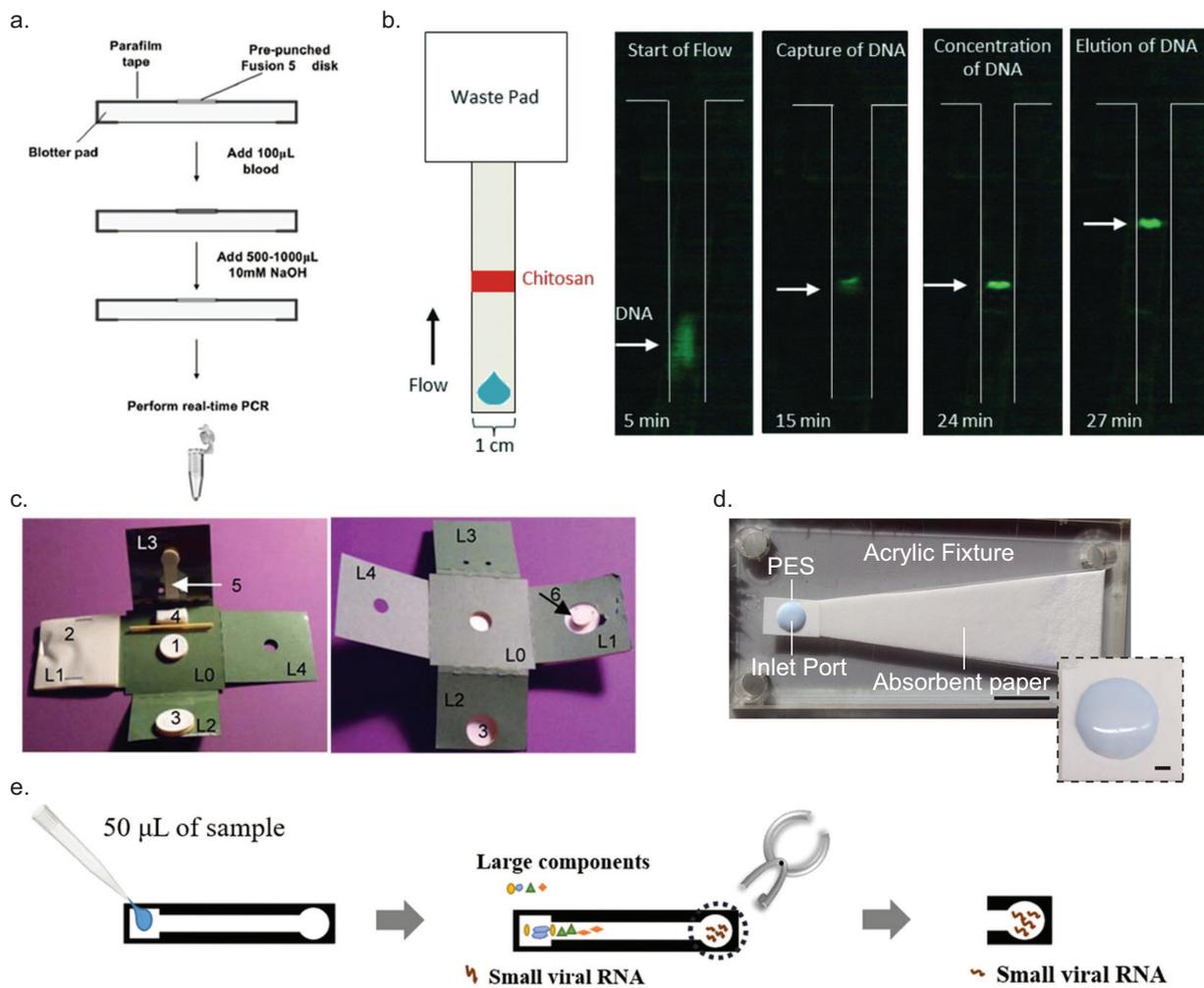


FIGURE 1.20 – Préparation d'échantillon sur papier : (a) Capture sur fibre de verre par la technique FINA, adapté de [79] *Copyright American Society for Microbiology*. (b) Capture médiée par le chitosan, adapté de [81], *Copyright RSC*. (c) Capture sur fibre de verre intégrée sur un origami, adaptée de [80], *Copyright RSC*. (d) Précipitation et capture sur PES, adapté de [82], *Copyright ACS*. (e) Extraction par filtration inverse, adapté de [83] *Copyright NPG*.

1.3.2 Amplification d'acides nucléiques sur papier.

Réaliser une réaction biologique dans un système papier requiert une bonne compatibilité entre la réaction et le papier utilisé. Dans le cadre des amplifications isothermes, différentes RPA, HDA et LAMP ont été réalisées par Rohrman et al. et Linnes et al. sur différents types de papier [84] [85].

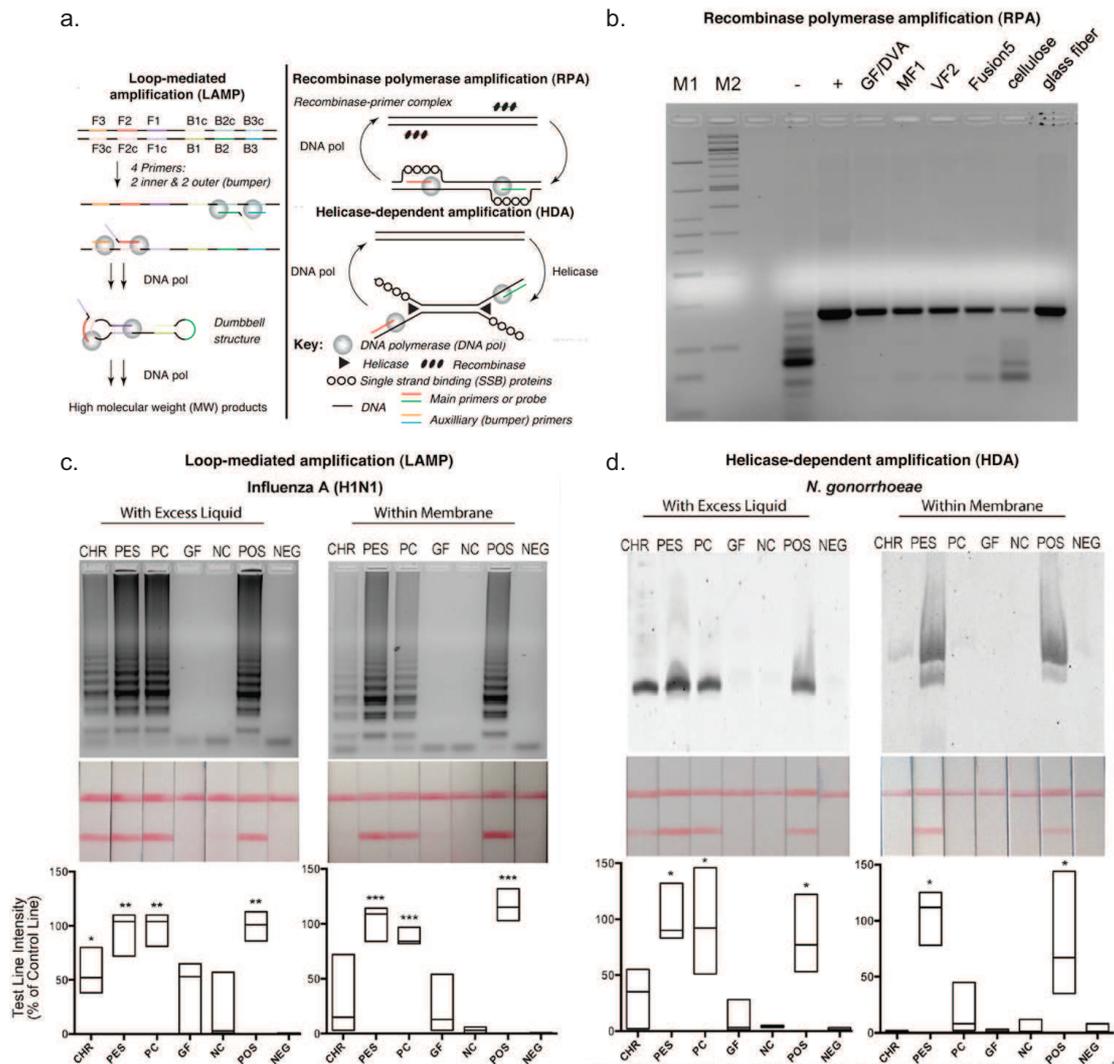


FIGURE 1.21 – Amplifications isothermes sur papiers non traités : (a) rappel des principes de RPA, HDA et LAMP, adapté de [5], *Copyright Elsevier*. (b) Comparaison de différents supports papiers pour la RPA, adapté de [84], *Copyright RSC*. (c)(d) Comparaisons de différents supports papiers pour la LAMP et la HDA, adapté de [85], *Copyright Springer*.

Papiers non traités.

- Recombinase Polymerase Amplification (RPA) : Les fibres de verres testées par Rohrman (figure 1.21.b) possèdent une bonne compatibilité (GF/DVA, MF1, VF2, glass fiber = GFCP), la fibre de cellulose semble moins compatible, on observe des amplifications de différentes tailles sur le gel.
- Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) : La LAMP a été testée par Linnes dans deux configurations, avec excès de liquide réactionnel ou dans l'épaisseur de la membrane, pour distinguer l'inhibition franche et le manque de compatibilité. En comparant les cinq types de papiers : cellulose (CHR), polyethersulfone (PES), polycarbonate (PC), Fibre de verre (GF) et nitrocellulose (NC), la LAMP semble se dérouler seulement dans les trois premiers, cellulose, PES et PC, et pré-

férentiellement dans le PES (figure 1.21.c).

- Helicase Dependent amplification (HDA) : Les mêmes tests réalisés pour la HDA, montrent des résultats proches avec une amplification présente dans la cellulose, PES et PC, et particulièrement en PES lorsque la réaction est confinée dans la membrane (figure 1.21.d).

La question des fibres de verre. Les fibres de verres semblent au vu de ces résultats compatibles avec la RPA mais pas avec les LAMP et HDA. Ce résultat paradoxal vient probablement du type de fibre utilisé. En effet toutes les fibres utilisées par Rohrman et al. possèdent des *coating* au PVA et PVP, employés lors de la fabrication, ayant potentiellement un impact sur les phénomènes d'adsorption et la biocompatibilité qui en découle. A l'inverse l'étude de Linnes et al. utilise la fibre de verre pure GF/F, sans *coating*. Ce point sera abordé par des expériences dans la suite du manuscrit (chapitre 2).

Traitement du papier. Les papiers peuvent être traités pour les rendre plus compatibles avec la réaction d'amplification. Des blockages à la BSA de fibres de cellulose et fibres de verre sont notamment reportés [86] [87], ainsi que des traitements dégradants les RNase tel que le RNasecure pour permettre la détection d'ARN [87].

Stockage des réactifs d'amplification. L'utilisation d'un dispositif sur le terrain requiert le stockage des réactifs sous une forme facilement transportable. un grand nombre de publications présentant des dispositifs papier de terrain utilisent des mélanges réactionnels frais devant être conservés dans un congélateur à proximité de l'utilisateur [82] [88] [89]. Certains travaux reportent le séchage ou la lyophilisation de mélanges réactionnels au sein du papier [90] [12] [86] [91]. Cette étape clé de l'intégration du test sera abordée plus en détail dans le chapitre 4.

1.3.3 Détection de l'amplification sur papier.

La détection de l'amplification sur un dispositif papier, peut se faire selon différentes manières, dont certaines sont empruntées à la détection en tube (section 1.1.2). D'autres ont été développées spécialement dans le cadre de la microfluidique papier. Nous décrivons toutes ces méthodes ici.

Adaptation de méthodes utilisées en tubes.

Détection non spécifique des produits d'amplifications. Des méthodes non spécifiques (décrites en section 1.1.2) ont été appliquées au dispositifs papiers, notamment la détection via des agents intercalants [89] [86], via la calcéine [88] et la variation de pH suivie par un indicateur coloré [83].

Couplage à un lateral-flow test. La détection par migration des amplicons dans un test bandelette type *lateral flow* a aussi été utilisée, pour la RPA comme pour la LAMP [84] [82] [91]. Dans ce cas, une action supplémentaire de l'utilisateur est nécessaire en fin d'amplification pour mettre en contact le mélange réactionnel et le lateral flow test.

Méthodes développées sur papier.

Des méthodes de détections ont été développées spécialement sur papier en tirant parti des fonctionnalités du matériau.

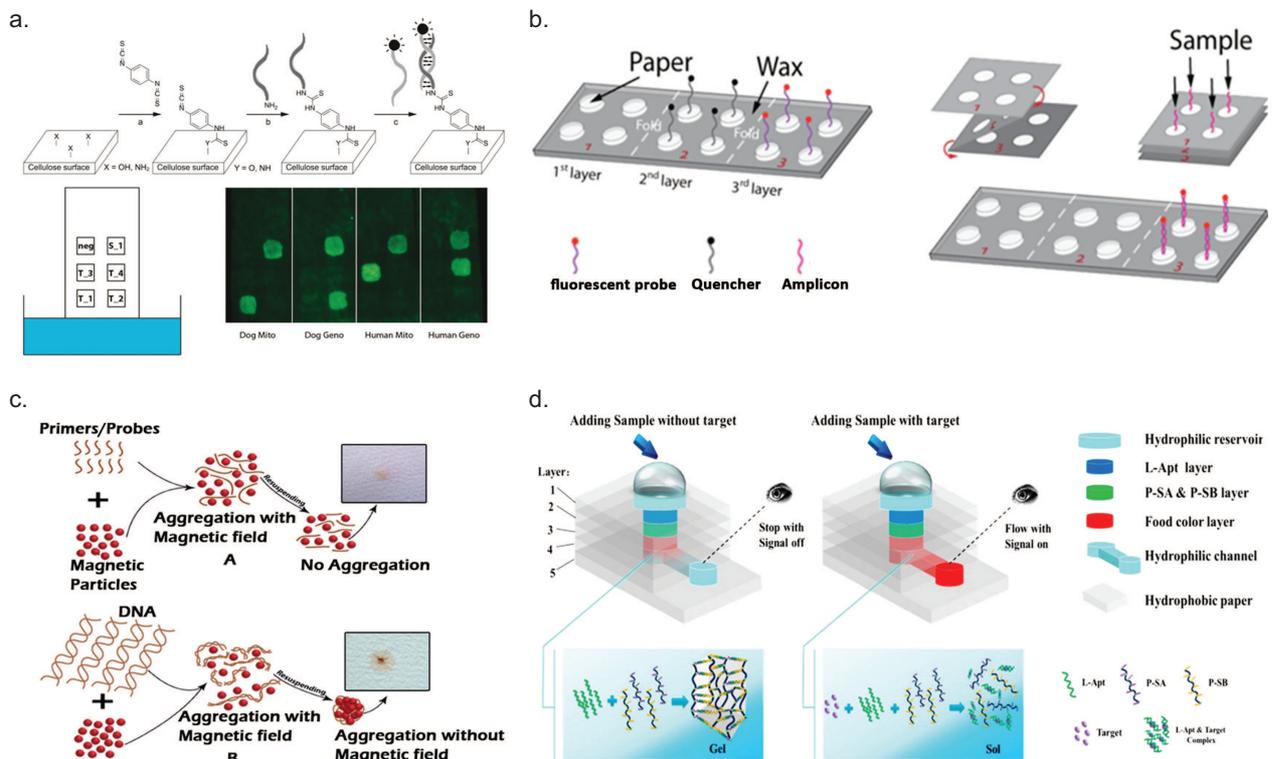


FIGURE 1.22 – Détection des amplifications sur papier : (a) Détection multiplexée sur papier buvard par greffage de différents oligonucléotides sondes, adapté de [92], *Copyright ACS*. (b) Origami pour un test d'hybridation compétitif, adapté de [93], *Copyright ACS*. (c) Détection par filtration d'un précipité ADN/bille magnétique, adapté de [94], *Copyright RSC*. (d) Valve stop-flow formée par un complexe aptamère/hydrogel sélectif, adapté de [95], *Copyright ACS*.

Un greffage spécifique d'oligonucléotides sondes a été réalisé par Araujo et al. et permet de détecter la présence d'amplicons labellés de manière fluorescente [92]. Les produits d'amplification migrent dans une carte à la manière d'un lateral flow, où sont fixés au préalable les sondes spécifiques de chaque amplicon (figure 1.22.a). Les zones fluorescentes indiquent laquelle des amplifications a eu lieu.

Les possibilités de pliage du papier sont mises à profit dans un système développé par Scida et al., où un test d'hybridation compétitif est mis en place entre les amplicons et des quenchers pour une même sonde fluorescente (figure 1.22.b) [93]. Les quenchers se

trouvent sur une couche distincte des sondes. Ces épaisseurs sont mises en contact au démarrage du test et la présence d'amplicon empêche le quenching. A l'inverse, l'absence d'amplicon induit un quenching de la sonde.

La fonction de filtre du papier a été employée dans le développement d'une méthode de détection d'amplification couplée à des billes magnétiques. En présence d'un champ magnétique, les ADN double brins issus de l'amplification s'agrègent aux billes et forment un complexe visible à l'oeil nu par un tache lorsqu'il est déposé sur un papier filtre en cellulose (figure 1.22.c) [94].

Une dernière méthode développée par Wei et al. utilise un complexe d'ADN aptamères et d'hydrogel, dont la perméabilité dépend de la présence de la cible de l'aptamère (figure 1.22.d). En l'absence de la cible, le gel ne laisse pas passer l'échantillon. En présence de la cible, l'aptamère se détache du gel, perméabilisant celui-ci, et l'échantillon peut alors passer à travers le gel, visualisé dans les couches inférieures par un colorant. Ce type de vanne stop-flow a été développée pour la détection d'analytes chimiques (cocaïne, adénosine, Pb^{2+}) via des aptamères spécifiques de ces cibles mais elle pourrait être facilement adaptée à la détection d'amplicon [95].

Ce qu'il faut retenir.

- La détection d'amplifications sur dispositif papier peut se faire en adaptant les méthodes développées pour les réactions en tube : agents intercalants, calcéine, couplage à un test bandelette, etc...
- Un certain nombre d'innovations utilisent des propriétés propres au papier (greffage local d'oligo, fonction de filtre, etc) pour intégrer la détection d'acide nucléiques sur μ PAD.

1.3.4 Systèmes *sample-to-answer*.

Après avoir abordé les trois étapes de préparation d'échantillon, d'amplification et de détection séparément, on décrit dans cette section les travaux cherchant à rassembler ces trois fonctions dans un même dispositif pour réaliser un test de terrain.

Systèmes hybrides microchip/papier.

Des systèmes hybrides puce/papier ont d'abord été développés, pour lesquels le contrôle des flux ne se fait pas par capillarité mais via une pompe externe.

Un des premiers système hybride développé intègre un disque de FTA dans une puce en PMMA. l'échantillon passe à travers le disque qui capture l'ADN. La membrane est rincée puis un mélange réactionnel LAMP est injecté dans la puce et un thermocouple fixé à sa base permet l'amplification. (figure 1.23.a) [96].

Un système proche développé par Gan et al. utilise un disque de Fusion5 inséré dans une puce en PDMS et PMMA, pour capturer l'ADN d'un échantillon puis réaliser une amplification par PCR *in situ* (figure 1.23.c) [97].

Un dernier dispositif est basé sur l'insertion d'un disque de FTA dans un capillaire. L'aspiration d'une goutte de sang dans le capillaire de verre vient imbibber le disque de FTA. Puis celui-ci est rincé par un train de différentes gouttes chargées dans le capillaire à l'avance et poussées par une pipette à travers le disque. Un mélange réactionnel LAMP imbibe finalement le papier et permet une amplification (figure 1.23.b) [98].

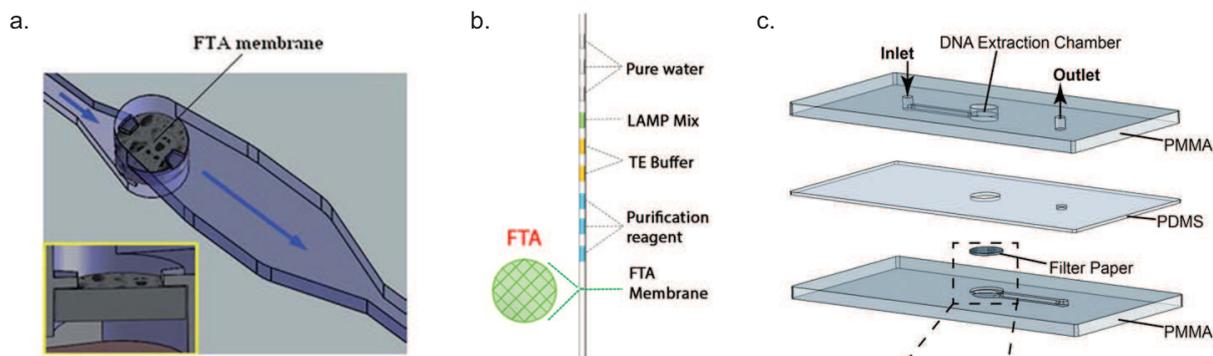


FIGURE 1.23 – Systèmes hybrides microchip/papier : (a) Puce microfluidique contenant un disque FTA permettant la capture et une réaction LAMP, adapté de [96], *Copyright RSC*. (b) Capillaire contenant un disque de FTA, adapté de [98], *Copyright ACS*. (c) Puce en PMMA contenant un disque de Fusion5, pour la capture et une PCR *in situ*, adapté de [97], *Copyright RSC*.

Systèmes papiers *sample-to-answer*.

Ces dernières années, des dispositifs d'amplification isotherme sur papier permettant la détection spécifique d'acides nucléiques à partir de matrices complexes (sang, urine, plasma, etc) ont été développés.

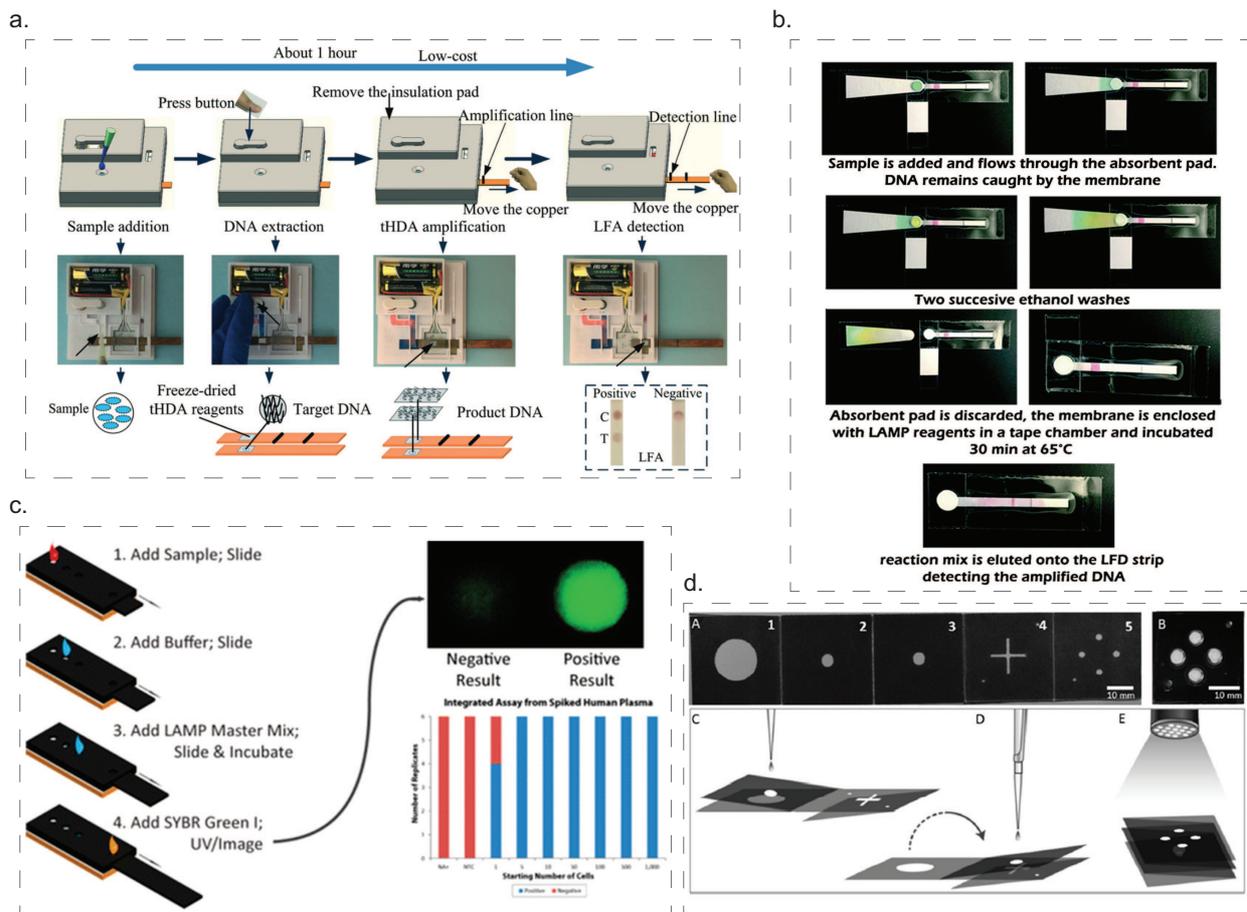


FIGURE 1.24 – systèmes papiers sample to answer : (a) Boîtier intégré permettant la capture et l'amplification HDA, adapté de [99], Copyright RSC. (b) Système en papier + adhésif pour la capture et l'amplification LAMP sur PES, adapté de [67], Copyright RSC. (c) Paper machine, disque de FTA glissant de chambre en chambre, adapté de [89], Copyright ACS. (d) Origami pour la capture et la détection multiplexée, adapté de [88], Copyright Wiley

Le premier dispositif développée par Connely et al. dans l'équipe de Georges Whitesides est la "paper machine" [89]. Le principe repose sur une disque de FTA, glissant de chambre en chambre (sliding chip), tour à tour utilisé pour capturer les acides nucléiques d'un échantillon de plasma, puis les amplifier, et enfin les détecter par l'addition d'un intercalant en fin de réaction (figure 1.24.c). Cette première preuve de concept a popularisé l'idée du couplage microfluidique papier/amplification isotherme.

Un autre dispositif constitué de papier et de film adhésif a été développé par Rodriguez et al. dans l'équipe de Catherine Klapperich [67]. L'échantillon est filtré par un disque de PES, l'ADN/ARN précipite et est retenu sur la membrane. Après rinçage, les réactifs LAMP sont ajoutés sur le disque et l'amplification a lieu. En fin d'amplification, le contact entre le disque et une bandelette *lateral flow* permet la détection des produits d'amplification (figure 1.24.b).

En intégrant plusieurs fonctions, notamment une valve en papier, dans un boîtier actionné par des boutons poussoirs et une languette, l'équipe de Feng Xu a mis au point un

dispositif, permettant la capture, l'amplification par HDA, et la visualisation sur bandelette d'ADN cible de Salmonelle [99]. Dans un effort d'intégration, le dispositif de chauffage et les réactifs de capture et d'amplification sont pré-stockés dans le boîtier (figure 1.24.a).

Enfin, un dernier dispositif développé par Xu et Reboud dans l'équipe de Johnathan Cooper, permet en utilisant un origami, de capturer, puis d'éluer les acides nucléiques dans plusieurs zones réactionnelles, et ainsi de réaliser en parallèle plusieurs tests, de multiplexer la détection de plusieurs pathogènes (ici différentes souches de malaria) (figure 1.24.d).

Les caractéristiques principales, avantages et inconvénients des dispositifs d'amplification isotherme sur papier publiés à ce jour sont résumés dans la table 1.1.

Ref.	Dispositif			Préparation d'échantillon			Amplification			Détection	
	Type	Papier	Etapes	O/N	Pathogène	Matrice	Type	LOD	Stockage	Type	Outil
Rorhman 2012 [84]	Disc + LFT	GFCP glass fiber	6	NON	HIV (DNA)	∅	RPA	1/μL	OUI	Lateral Flow	visual
Cordray 2015 [100]	Disc + LFT	GFCP glass fiber	8	NON	Plasmodium (DNA)	∅	RPA	5/μL	OUI	Lateral Flow	visual
Connelly 2015 [89]	Sliding disc	FTA cellulose	4	OUI	E. Coli (DNA)	Plasma	LAMP	0,5/μL	NON	Intercalant	phone camera
Rodriguez 2015 [82]	Disc + LFT	PES	12	OUI	H1N1 (RNA)	écouvillon nasal	rt-LAMP	10 ³ /μL	NON	Lateral Flow	visual
Rodriguez 2016 [67]	Disc + LFT	PES	10	OUI	HPV (DNA)	frotti cervical	LAMP	100/μL	NON	Lateral Flow	visual
Choi 2016 [101]	Disc + LFT	glass fiber	4	NON	Dengue (DNA)	∅	LAMP	3.10 ³ /μL	NON	Lateral Flow	visual
Shetty 2016 [86]	zone test	Chr. 1 cellulose	3	NON	M.Tuberculosis (DNA)	∅	HDA	25/μL	OUI	Intercalant	laboratory camera
Xu 2016 [88]	origami	cellulose + glass fiber	5	OUI	Plasmodium (DNA)	Sang	LAMP	5/μL	NON	Calcéine	phone camera
Magro 2017 [12]	zones test	Chr. 1 cellulose	5	NON	Ebola (RNA)	∅	rt-RPA	100/μL	OUI	exokit (taqman)	laboratory camera
Tang 2017 [99]	sliding disc	Fusion5 glass fiber	5	OUI	Salmonelle (DNA)	lait, oeufs	HDA	10/μL	OUI	Lateral Flow	visual
Reboud 2019 [91]	Origami + LFT	cellulose + glass fiber	6	OUI	Plasmodium (DNA)	Sang	LAMP	10/μL	OUI	Lateral Flow	visual

TABLE 1.1 – Tableau récapitulant les caractéristiques des systèmes d'amplification isotherme sur papier.

Un certain nombre des dispositifs papier n'intègrent pas la préparation de l'échantillon, ce qui limite fortement leur utilité sur le terrain [84] [100] [101] [86] [12]. Une capture des acides nucléiques sur colonne serait alors nécessaire, ajoutant une dizaine d'étapes et requérant un laboratoire et des opérateurs expérimentés.

Le seul dispositif permettant la capture d'ARN est celui développé en 2015 par Rodriguez et al. [82]. Cependant, sa limite de détection est assez levée ($10^3/\mu\text{L}$) et il ne permet ni le multiplexage ni le stockage des réactifs LAMP.

Les récents travaux de Xu et Reboud ont mené au développement d'un dispositif permettant la capture d'ADN, et le multiplexage. La dernière version du dispositif, intègre une puce en PMMA dans laquelle les réactifs LAMP sont lyophilisés [91]. Ces travaux sont, avec ceux de Tang et al. [99], les plus avancés car ils cumulent préparation d'échantillon, et stockage des réactifs d'amplification.

Ce qu'il faut retenir

- Le couplage entre microfluidique papier et amplification isotherme est très prometteur pour le développement de nouveaux tests de terrain. Un grand nombre de travaux à ce sujet ont été réalisés ces dernières années.
- La préparation d'échantillon, le plus souvent une capture de l'ADN/ARN peut se faire sur papier, notamment en exploitant l'affinité des acides nucléiques pour la fibre de verre.
- Les amplifications isothermes sont généralement compatibles avec la cellulose et certaines fibres de verres. Ces compatibilités peuvent être encore améliorées par un traitement préalable du papier (blocage à la BSA par exemple).
- Enfin, les différentes méthodes de détections en tubes sont généralement transposables au papier, et certains travaux ont développé des méthodes spécifiques aux μPADs , en greffant notamment des sondes oligonucléotidiques sur la fibre de cellulose [93] [92], ou en y associant d'autres matériaux (billes magnétiques, hydrogel, etc) [95] [94].
- Des dispositifs papiers intégrant la préparation et l'amplification ont été développés, et s'approchent des caractéristiques idéales. Cependant à ce jour, aucun dispositif n'intègre capture d'ARN, multiplexage et stockage des réactifs, ce dont nous avons besoin pour la détection multiplexée sur le terrain des arbovirus Dengue, Zika et Chikungunya.

1.3.5 développement d'un dispositif idéal de détection sur papier des virus Zika, Dengue et Chikungunya : objectifs et contraintes

L'objectif du travail de thèse est de développer un dispositif d'amplification isotherme sur papier permettant la détection sur le terrain des trois virus à ARN Dengue, Zika et Chikungunya. Les caractéristiques de ce dispositif doivent s'approcher des critères ASSURED :

AFFORDABLE : Le papier est un matériau très peu cher. Les polymérases des amplifications isothermes représenteront la majorité du coût du dispositif (0.8 € pour une LAMP par ex.), sachant que ce prix pourrait être grandement abaissé en cas de production massive.

SENSITIVE/SPECIFIC : Les sensibilités et spécificités des amplifications isothermes en tube sont excellentes (équivalentes à la PCR). Un des objectifs de thèse est de conserver les mêmes sensibilité et spécificité lorsque la réaction se déroule au sein du papier (cf. chapitre 2).

USER-FRIENDLY : Le multiplexage est ici la clé pour réaliser la détection de plusieurs pathogènes sur un dispositif facile d'utilisation. Nous nous appuyerons sur des travaux réalisés par Laura Magro au sein du laboratoire sur des μ PAD multicouches, permettant de répartir un même échantillon dans différentes zones de test (cf. chapitre 2). Nous nous pencherons aussi sur un multiplexage haute densité, en tentant de réaliser plusieurs amplifications isothermes dans un même disque (cf. chapitre 3).

RAPID/ROBUST : Les amplifications isothermes sont plus rapides que la PCR et moins sensibles aux inhibiteurs. On vérifiera que les variations des conditions de test (variation de température d'amplification, présence d'inhibiteurs résiduels) n'empêchent pas le bon fonctionnement du dispositif. On cherchera à développer un test permettant une détection en moins d'1h (cf. chapitre 2).

EQUIPMENT-FREE : Le dispositif doit intégrer la préparation d'échantillon pour éviter une extraction en amont. De plus la détection de l'amplification doit se faire de manière simple, avec un signal puissant détectable idéalement à l'œil nu, ou avec une simple caméra de smart-phone (cf. chapitre 4).

DELIVERABLE TO END-USER : La microfluidique papier permet de réaliser des dispositifs légers, mais le stockage des réactifs (idéalement sous forme lyophilisée/séchée) sera nécessaire pour pouvoir les transporter facilement (cf. chapitre 4).

Chapitre 2

Adapter la rt-LAMP au papier

Contents

2.1	Matériels et méthodes	48
2.1.1	Provenance, extraction et dosages des ARN/ADN cibles	48
2.1.2	Design et choix des amorces LAMP	49
2.1.3	Mélange réactionnel	50
2.1.4	(rt-)LAMP en tube	52
2.1.5	Traitement du papier	53
2.1.6	Construction des puces de test	53
2.1.7	(rt-)LAMP sur papier	54
2.1.8	Précautions importantes	55
2.1.9	Dispositif expérimental	56
2.1.10	Analyse des résultats	56
2.2	Le problème critique de la biocompatibilité LAMP/papier . .	59
2.2.1	Conserver un agent intercalant fonctionnel.	59
2.3	Optimiser la biologie moléculaire de la réaction LAMP sur papier	63
2.3.1	Comparaison des deux enzymes polymérase disponibles.	63
2.3.2	Comparaison des différentes transcriptases inverses pour la rt- LAMP	64
2.3.3	Influence de la température	66
2.3.4	Influence de la concentration en amorces	68
2.3.5	Influence des concentrations en MgSO ₄ et dNTPs	69
2.4	Multiplexer et quantifier grâce à la microfluidique papier . .	73
2.4.1	Multiplexer les réactions sur un 3D- μ PAD.	73
2.4.2	Quantification par la LAMP sur papier : vers un test quantitatif de terrain.	75

LES méthodes d'amplification isotherme et la microfluidique papier, décrites dans le chapitre précédent, sont deux technologies véritablement adaptées au terrain. L'objectif du travail de thèse est de réussir à coupler ces deux technologies, pour réaliser un test de diagnostic idéal, pouvant être utilisé au chevet du patient. Les travaux précédents menés par Laura Magro au laboratoire (en partenariat avec la CIBU, et le laboratoire de Pierre Lafaye à l'Institut Pasteur) ont montré qu'il était possible de réaliser une amplification isotherme RPA sur un disque de cellulose, permettant la détection d'ARN du virus Ebola en Guinée [12].

Le succès de ce premier prototype, justifiant notre ambition d'allier les deux technologies, était cependant terni par deux observations : la sensibilité et la spécificité du test n'étaient pas encore idéales (resp. 90% et 60,8%), et le test était réalisé sur des ARN purifiés au préalable et non sur des échantillons réels.

En vu de développer un système de diagnostic multiplex pour les virus Zika, Dengue et Chikungunya, nos collaborateurs de la CIBU ont mis au point deux méthodes d'amplification isotherme pour la détection de ces trois cibles : Une méthode rt-RPA et une méthode rt-LAMP. Leurs résultats montrent de meilleures limites de détection pour la rt-LAMP en ce qui concerne les virus Zika et Chikungunya (figure en annexe 6.1). Pour la détection de Dengue, la méthode rt-LAMP pan-sérotype (permettant de détecter les quatre sérotypes en un seul test), publiée par Teoh et al. [102], est là aussi plus sensible que la rt-RPA pan-sérotype développée par l'équipe.

Nous nous tournons donc vers l'amplification isotherme rt-LAMP. Le laboratoire ayant principalement utilisé la rt-RPA, n'avait pas réalisé de LAMP sur papier jusqu'alors.

Dans ce chapitre, une méthode permettant de réaliser la (rt-)LAMP sur des disques de papier est développée, menant à une première démonstration du multiplexage et de la quantification sur un système papier.

2.1 Matériels et méthodes

2.1.1 Provenance, extraction et dosages des ARN/ADN cibles

Les ADN bactériens utilisés comme *template* dans les réactions LAMP ont été extraits à la CIBU selon le protocole d'extraction de référence de l'équipe, QiaAmp DNA Mini Kit (*Qiagen*, Hilden, Germany). Les bactéries issues de souches cliniques et environnementales de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, et *Streptococcus pneumoniae* proviennent de la Collection de l'Institut Pasteur. Les ARN viraux utilisés comme *template* dans les réactions LAMP ZIKV, DENV et CHIKV proviennent de virus cultivés par l'équipe, dont l'ARN est extrait à l'aide du kit Nucléospin 96 virus (*Macherey Nagel*) selon le

protocole du fabricant.

Dans le cas du virus Ebola, des transcrits ARN sont synthétisés *in vitro* à partir de plasmides linéarisés contenant des séquences d'EBOV (*GeneCust*), en utilisant le kit T7 RiboMax (*Promega*). Après un traitement DNase turbo (*Ambion*), les transcrits sont purifiés en utilisant le Rneasy mini kit (*Qiagen*), et quantifiés avec l'instrument Qubit (*Life Technologies*)

Les dosages des ARN et ADN viraux et bactériens ont été réalisés par (RT)q-PCR, suivant les protocoles de la CIBU, en utilisant des ARN/ADN de concentrations connues ou un plasmide de référence pour réaliser la gamme de quantification.

2.1.2 Design et choix des amorces LAMP

Les étapes générales du design d'amorces LAMP sont les suivantes :

1. Le choix des potentiels gènes cibles est réalisé pour chaque pathogène, en se basant sur une revue approfondie de la littérature.
2. Un alignement de tous les génomes cibles disponibles sur la database Genbank est réalisé et on sélectionne les régions conservées des gènes cibles.
3. Le logiciel LAMP explorer software (*Premier Biosoft*) est utilisé pour le design des amorces. 10 jeux d'amorces sont proposés par le logiciel.
4. On pré-sélectionne trois ou quatre de ces jeux d'amorces selon les critères suivants :
 - *Région amplifiée* : Sélectionner des jeux d'amorces amplifiant différentes zones de la séquence cible.
 - *Primers blast optimal* : Un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est réalisé en ligne sur la plateforme NCBI¹ avec les amorces F3 et B3 encadrant la région amplifiée. L'algorithme BLAST va chercher dans la base de données ADN/ARN, des séquences qui pourraient être amplifiées par notre couple d'amorces. On s'assure qu'il détecte le maximum de séquences du pathogène d'intérêt et qu'il ne détecte pas d'autre séquence.
5. Les jeux d'amorces sélectionnés sont commandés et testés expérimentalement en utilisant le protocole standard de la CIBU (table 2.1.c). On compare les limites de détection, les cinétiques et les spécificités de ces jeux d'amorces.

Plusieurs jeux d'amorces (rt-)LAMP sont utilisés dans la suite du manuscrit :

- Trois jeux d'amorces détectant respectivement *S. enterica*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, ont été sélectionnés par Jessica Vanhomwegen à la CIBU à partir de 26 jeux présélectionnés *in silico*. Les séquences sont reportées en annexe 6.3.
- Pour la détection du Virus Zika, du Virus Chikungunya et du Sigmavirus, des jeux d'amorces ont été développés et validés par la CIBU (à partir de 20 à 30 jeux présélectionnés pour chaque cible). Les séquences sont reportées en annexe 6.5

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

- Enfin, pour la détection du virus de la dengue, nous utiliserons des designs déjà publiés dans la littérature. Quatre jeux d’amorces sérotype-spécifiques [103], testés et validés en tube à la CIBU, détectent respectivement les virus de DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4; et un jeu de neuf amorces, permet la détection pan-sérotype des virus de la Dengue [102]. Les séquences sont reportées en annexe 6.4

2.1.3 Mélange réactionnel

Différents protocoles de réaction LAMP ont été utilisés durant ces travaux de thèse. Ces protocoles sont adaptés à partir de trois sources : les recommandations des deux fournisseurs commerciaux *New England Biolabs* (enzyme Bst et associées), et *OptiGene* (enzyme GspSSD et associées), ainsi que les protocoles LAMP développés à la CIBU. Nous présentons en table 2.1 les compositions des quatre principaux mélanges réactionnels utilisés durant ces travaux.

Les protocoles *NEB* et *OptiGene* sont sensiblement identiques. Quelques paramètres varient cependant. Les quantités de MgSO₄ et dNTPs recommandées sont inférieures dans le protocole *OptiGene* : 3-6 mM de MgSO₄ pour *OptiGene* contre 6-8 mM pour *NEB* et 0.4-1 mM de chaque dNTPs pour *OptiGene* contre 1.4 mM pour *NEB*. Enfin, les concentrations standards recommandées en primers FIP/BIP et LF/LB sont inférieures dans le protocole *OptiGene* comme récapitulé dans la table 2.2.

Des mélanges d’amorces 10X seront réalisés au préalable contenant les 6 amorces mélangées à une concentration 10 fois supérieure à la concentration finale de réaction.

Les agents intercalants SYTO9 et SYTO82 sont utilisés dans la plupart des réactions LAMP à une concentration allant de 0,5 à 1 μ M. Il a été montré précédemment que ces molécules possédaient un ratio signal/bruit plus élevé que d’autres intercalants couramment utilisés (SYBR Green, Eva Green, SYTO-13) [104]. On visualise le SYTO9 dans le canal FAM et le SYTO82 dans le canal Texas Red du microscope.

NEB : Warmstart LAMP kit				
Reagents	Concentration initiale	Concentration finale	Volume 1 rxn (µL)	Volume 9 rxn (µL)
H ₂ O			3.80	34.20
Warmstart 2X Master Mix	2.00	1.00	10.00	90.00
Intercalating Dye (µM)	50.00	0.50	0.20	1.80
Primer Mix (X)	10.00	1.00	2.00	18.00
échantillon			4.00	36.00
TOTAL			20.00	180

NEB : protocole (rt-)LAMP				
Reagents	Concentration initiale	Concentration finale	Volume 1 rxn (µL)	Volume 9 rxn (µL)
H ₂ O			1.68	15.08
dNTPs (mM)	10.00	1.40	2.80	25.20
10X Isothermal Buffer	10.00	1.00	2.00	18.00
MgSO ₄ (mM)	50.00	6.00	2.40	21.60
Betain (M)	5.00	1.00	4.00	36.00
Intercalating Dye (µM)	50.00	0.50	0.20	1.80
Primer Mix (X)	10.00	1.00	2.00	18.00
Bst 2.0 WS(U/µL)	8.00	0.32	0.80	7.20
AMV-RT (U/µL)*	8.00	0.05	0.13	1.13
échantillon			4.00	36.00
TOTAL			20.00	180

OptiGene : ISO004 LAMP kit				
Reagents	Concentration initiale	Concentration finale	Volume 1 rxn (µL)	Volume 9 rxn (µL)
H ₂ O			1.80	16.20
ISO004 Master Mix	1.67	1.00	12.00	108.00
Intercalating Dye (µM)	50.00	0.50	0.20	1.80
Primer Mix (X)	10.00	1.00	2.00	18.00
échantillon			4.00	36.00
TOTAL			20.00	180

OptiGene : protocole (rt-)LAMP				
Reagents	Concentration initiale	Concentration finale	Volume 1 rxn (µL)	Volume 9 rxn (µL)
H ₂ O			4.28	38.48
dNTPs (mM)	10.00	0.40	0.80	7.20
10X iBuffer5	10.00	1.00	2.00	18.00
MgSO ₄ (mM)	50.00	4.00	1.60	14.40
Betain (M)	5.00	1.00	4.00	36.00
Intercalating Dye (µM)	50.00	0.50	0.20	1.80
Primer Mix (X)	10.00	1.00	2.00	18.00
GspSSD (U/µL)	8.00	0.40	1.00	9.00
AMV-RT (U/µL)*	8.00	0.05	0.13	1.13
échantillon			4.00	36.00
TOTAL			20.00	180

TABLE 2.1 – tables des quatre principaux protocoles de réaction (rt-)LAMP utilisés dans la suite du manuscrit.

Amorce	Concentration NEB	Concentration OptiGene
Forward outer primer (F3)	0,2 µM	0,2 µM
Backward outer primer (B3)	0,2 µM	0,2 µM
Forward inner primer (FIP)	1,6 µM	0,8 µM
Backward inner primer (BIP)	1,6 µM	0,8 µM
Forward loop primer (LF)	0,8 µM	0,4 µM
Backward loop primer (LB)	0,8 µM	0,4 µM

TABLE 2.2 – table des concentrations recommandées pour chaque amorce, par *NEB* et *OptiGene*.

2.1.4 (rt-)LAMP en tube

Les (rt-)LAMP en tube sont réalisées à la CIBU, les mélanges réactionnels préparés en pièce PCR (*RNase-free*) et l'amplification réalisée à l'aide d'un appareil GénieIII (*OptiGene*). Le protocole couramment utilisé est celui du kit ISO004 2.1.c, auquel on ajoute 0.05U/ μ L d'AMV-RT pour une rt-LAMP. Des (rt-)LAMP en tube seront réalisés durant le travail de thèse pour designer de nouveaux jeux d'amorces et pour comparer les résultats des réactions tubes et papiers. Le protocole standard de l'appareil Genie III comprend une amplification à 65°C pendant 30 min (figure 2.1.b), suivi d'une phase de fusion (*anneal*) durant laquelle la température d'hybridation des produits d'amplification est mesurée (figure 2.1.c). Cette température d'hybridation est caractéristique des amplicons, et permet de comparer les produits d'amplification entre eux et de détecter de potentiels faux positifs.

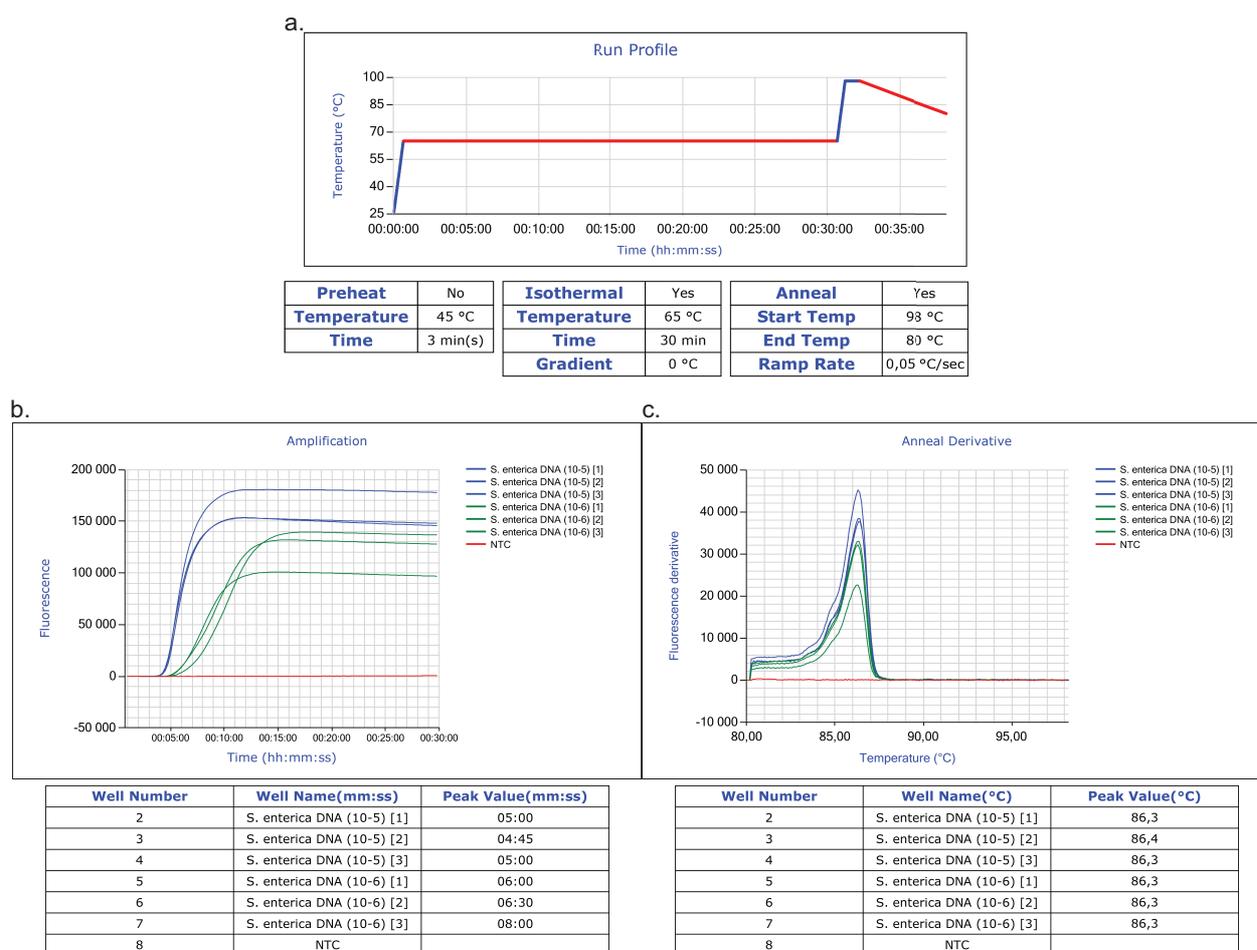


FIGURE 2.1 – LAMP en tube et mesures types sur l'appareil Genie III. (a) Description du protocole de chauffe réalisé par le Genie III pour une (rt-)LAMP en tube. (b) LAMP *S. enterica*, ADN de *S. enterica*, dilutions successives. Suivi de la réaction en temps réel par agent intercalant, et tableau des valeurs pic de dérivées premières. (c) Dérivée première de la courbe de fusion.

2.1.5 Traitement du papier

Traitement des disques de GF : La majorité des réactions LAMP décrites par la suite sont réalisées au sein d'un disque fibre de verre "GF" de marque *Whatman*. Les disques mesurant 5,5mm de diamètre ont été découpés à la perceuse en début de thèse, puis à l'aide d'une graveuse laser selon les paramètres en annexes table 6.2. Ils peuvent contenir 18 μ L de mélange réactionnel.

Ces disques sont traités selon le protocole suivant pour les rendre compatibles avec la réaction LAMP :

1. Incuber les disques toute la nuit dans une solution *RNase-free* contenant 0,5% BSA et 0,05% Tween20.
 2. Effectuer trois rincages de 15 minutes à l'eau *RNase-free*.
 3. Faire sécher les disques à 80°C durant 45 minutes (en posant les boites de pétri sur une plaque chauffante)
- *N.B. : Le séchage a aussi pour action de chauffer les papiers à une température favorisant l'inactivation des DNase et RNase. En effet les papiers utilisés sont commercialisés pour réaliser des tests immunologiques et ne sont donc pas garantis sans DNase ni RNase. Une de nos préoccupations principales dans l'élaboration de ces nouvelles méthodes est donc d'atteindre un niveau de qualité des papiers aussi proche que possible du DNase/RNase free, nous permettant de réaliser des amplifications d'ADN et d'ARN de manière reproductible.*

2.1.6 Construction des puces de test

La majorité des (rt-)LAMP sur papier seront réalisées en déposant le mélange réactionnel "frais" (c.-à-d. non lyophilisé) sur des disques de GF, disposés dans une puce de test en polypropylène. Ces puces (pouvant contenir 8 disques) sont en quelque sorte l'équivalent des barrettes de 8 tubes, et nous permettent de réaliser des tests en parallèle pour optimiser la (rt-)LAMP sur papier.

En plus des disques de GF évoqués en section précédente, les plaques de polypropylène et le film adhésif PCR sont découpés selon les dimensions décrites en figure 2.2 (paramètres de graveuse laser disponibles en annexe 6.2)

Les disques de GF sont insérés dans la puce en polypropylène, fermée de part et d'autre grâce au film adhésif PCR, comme illustré par la figure 2.3

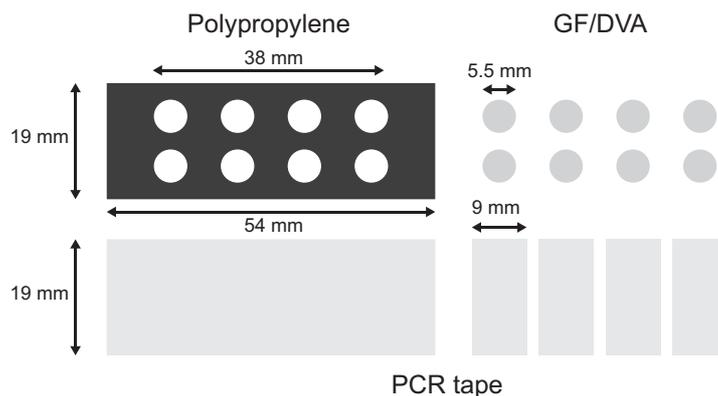


FIGURE 2.2 – Dimensions des différents composants utilisés pour réaliser les puces expérimentales

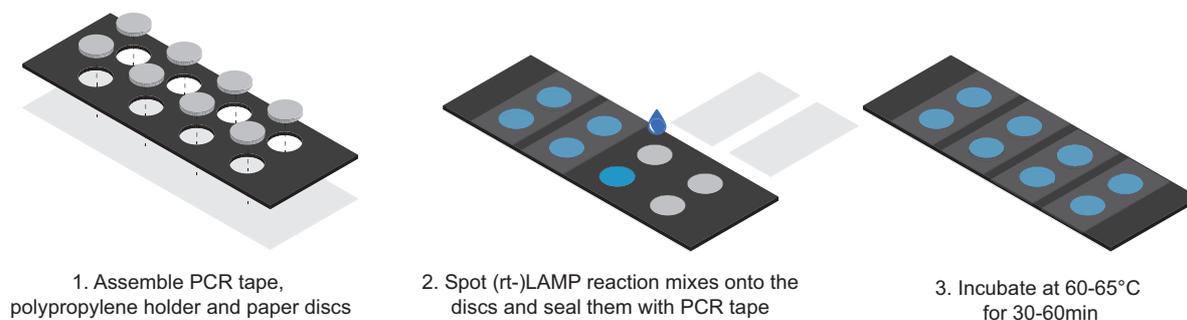


FIGURE 2.3 – Etapes de fabrication des puces expérimentales.

2.1.7 (rt-)LAMP sur papier

Les puces tests sont fabriquées et les mélanges réactionnels préparés en tube sur glace comme indiqué dans les sections précédentes. On dépose ensuite 18 μL de mélange réactionnel par disque. La puce est scellée au film adhésif PCR et déposée sur une plaque chauffante (60-65°C) pendant 60 min (figure 2.3). *Pour palier aux erreurs de précision et pertes de volume durant les pipetages, 20 μL de mélange réactionnel sont préparés pour chaque disque, bien que l'on pipette seulement 18 μL par disque.*

Dans le cadre du développement d'un test de terrain, on souhaite un temps de détection inférieur à 45 minutes. La plupart des réactions (rt-)LAMP sont rapides et permettent une détection en moins de 30 minutes. La durée d'amplification au laboratoire est cependant fixée à 60 minutes. En effet l'apparition d'amplifications non spécifiques dans les dernières 15 minutes, nous renseignent sur la robustesse et la spécificité de la réaction. Pour deux réactions à limite de détection et vitesse identique, on préférera celle ne montrant pas d'amplification non spécifique durant les 60 minutes de réaction.

2.1.8 Précautions importantes

Le fait que le test (rt-)LAMP soit composé de 6 amorces rend la détection très spécifique en théorie, car elle cible 6 séquences du pathogène (contre deux pour une PCR classique). Cependant, dans certaines de nos expériences, des amplifications non-spécifiques ont eu lieu. En effet, la (rt-)LAMP sur papier, mal maîtrisée, peut mener à un taux élevé de faux positifs, et ce principalement pour trois raisons :

- Un mauvais design des amorces, qui vont s'hybrider entre elles et former des boucles ou dimères, propices à une amplification non spécifique.
 - La réaction LAMP produit un très grand nombre d'amplicons (environ 50 fois plus qu'une PCR classique [26]). Si l'espace de travail ou un réactif est contaminé par la présence d'amplicons provenant d'une amplification antérieure, cela risque de provoquer des faux positifs.
 - Enfin, dans notre cas, l'adaptation de la réaction LAMP sur un disque de papier *a priori* non adapté aux réactions de biologie moléculaire, rend plus complexe le bon déroulement de la réaction.
- *N.B. : Les premières réactions LAMP sur papier montraient de nombreuses amplifications non spécifiques. Tout au long du travail de thèse, nous nous sommes efforcés de raffiner le protocole employé (traitement des papiers, mélange réactionnel, etc) et les précautions accordées à la manipulation des différents composants des puces de tests. Cela nous a permis d'obtenir des résultats reproductibles et de diminuer considérablement le taux d'amplifications non spécifiques.*

Certaines précautions et bonnes pratiques développées au laboratoire et adaptées des protocoles de la CIBU sont recommandées ci-dessous :

- Avant toute expérience, on nettoie la paillasse et les pinces au *Surfa'safe* et *RNAse AWAY*.
- De même, les plaques de polypropylène et les trois pinces de manipulation sont rincées au *Surfa'safe* et *RNAse AWAY*, puis abondamment rincées à l'éthanol pour éliminer les traces de *RNAse AWAY*. On laisse à tremper les plaques de polypropylène et les pinces dans un bain d'éthanol en attendant leur utilisation.
- Le montage de la puce se fait en manipulant la plaque et le film adhésif PCR avec les deux premières pinces.
- La troisième pince est utilisée uniquement pour manipuler les disques de GF et les insérer dans la puce.
- Lors du pipetage des mélanges réactionnels sur les disques, on pipette d'abord les contrôles négatifs, que l'on scelle avec le film adhésif PCR, avant de pipeter les mélanges réactionnels contenant de l'ADN/ARN *template*.

- Le contact entre la puce et la plaque chauffante doit être parfait, pour garantir un bon chauffage des disques.

2.1.9 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental se compose d'une plaque chauffante et d'un microscope Leica Z16 APO possédant deux cubes optiques. Ces deux cubes optiques permettent respectivement d'imager les fluorophores FAM et Texas Red. Les expressions "canal FAM" et "canal Texas Red" seront utilisées dans la suite du manuscrit pour leur faire référence. Une boîte adaptée aux dimensions du système et imprimée à l'imprimante 3D assure l'étanchéité lumineuse.

Les images sont enregistrées avec une caméra Hamamatsu EM-CCD C900-13, à 0,1Hz (une image toutes les dix secondes) durant soixante minutes. Les paramètres de la caméra sont les suivants : Gain = 3 GainEM = 120 Temps d'exposition = 30ms

Un boîtier trigger EG RetD vision delays generator, coordonne l'ouverture du shutter de la lampe et l'acquisition de la caméra, pour éviter l'exposition continue des disques et le bleaching des fluorophores en réaction.

Un thermo-cycleur muni d'une plaque adaptée est utilisé comme plaque chauffante pour le contrôle précis de la température. Dans les expériences réalisées en dehors du laboratoire, on utilisera une plaque chauffante de laboratoire.

2.1.10 Analyse des résultats

Analyse d'image

L'analyse d'image des amplifications en temps réel se fait dans un premier temps sur imageJ grâce à un algorithme en langage IJM (ImageJ Macro). L'intensité de la lampe varie au cours du temps, et son éclairage n'est pas homogène. Pour pouvoir comparer les intensités des disques en tous points du champ de vision de la caméra, on traite les images comme détaillé ci-dessous :

1. Correction de la variation d'intensité lumineuse au cours du temps : l'utilisateur choisit une zone "background" ne contenant pas de disque. L'intensité de cette zone pour chaque image sert à normaliser les intensité de chaque image au cours du temps.
2. Correction de l'homogénéité du champ d'illumination : l'intensité lumineuse est plus forte au centre et plus faible aux coins du champ d'illumination. Chaque image est donc divisée par une image standard du champ d'illumination pour corriger l'inhomogénéité de celui-ci.
3. Enfin, l'utilisateur sélectionne les disques à analyser, et ImageJ renvoie l'intensité moyenne de chaque disque pour chaque image.

Analyse des courbes d'amplification

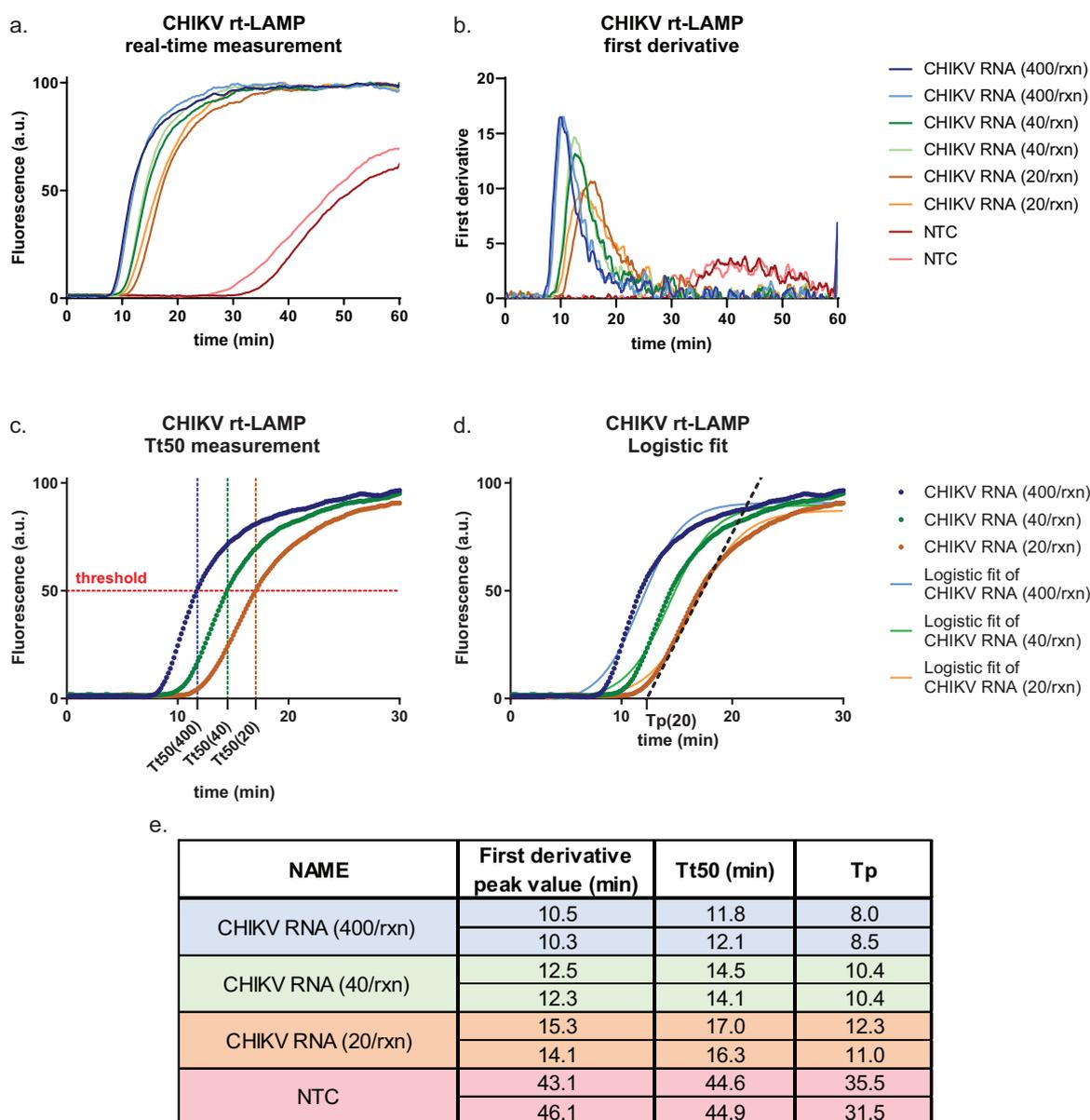


FIGURE 2.4 – rt-LAMP Chikungunya à différentes concentration en ARN template. (a) Suivi en temps réel des cinétiques d'amplification. (b) Dérivée première extraite du suivi en temps réel (c) Illustration de la méthode de mesure du Tt50 (d) modélisation logistique des courbes d'amplification et illustration du Tp (e) Table des paramètres chiffrés utilisables pour appréhender la cinétique d'amplification.

Traitement des données Une moyenne glissante est réalisée sur les données issues de l'analyse d'image, pour diminuer le bruit. On normalise les maxima des courbes d'amplifications de manière à mieux visualiser les cinétiques de réactions. On ne procède pas à la normalisation dans trois cas :

- Le signal produit par l'amplification est anormalement faible (<50% de la moyenne

des maxima)

- La courbe n'a pas un profil typique, en S (similaire à celui d'une fonction sigmoïde)
- La courbe est un contrôle négatif. Les amplifications non spécifiques ayant lieu dans les contrôles négatifs n'ont pas toujours le profil typique d'une amplification LAMP. On décide de n'en normaliser aucune.

Graphiques Les graphiques sont réalisés sur le logiciel *GraphPad Prism*. La figure 2.4 montre un graphique type d'une expérience réalisée sur une puce test. Chaque condition (dont un contrôle négatif) est réalisée en duplicat. Le signal traité est montré en fig. 2.4.a. Les cinétiques de réaction peuvent être directement observées sur ce graphique.

Analyse Différentes analyses sont possibles à partir de ces courbes d'amplification. On cherche à extraire un paramètre permettant la comparaison de deux amplifications. Trois méthodes sont décrites dans la littérature

1. La dérivée première de chaque courbe (figure 2.4.b) permet d'obtenir le "temps de pic", de chaque courbe d'amplification (temps auquel la vitesse d'amplification est maximale). On peut ensuite comparer ces "temps de pic", reflétant la cinétique d'amplification.
2. La notion de *Time threshold* (Tt) est développée dans le premier article paru traitant de LAMP quantitative (ou qLAMP) [105]. Le Tt est le temps auquel le signal mesuré dépasse un seuil d'intensité défini à l'avance (le *threshold*). On définit le Tt50 (*Time threshold 50*), comme étant pour chaque courbe le temps auquel l'intensité atteint la moitié de sa valeur maximale (figure 2.4.c). On utilisera un algorithme Matlab permettant d'extrapoler le Tt50 de chaque courbe expérimentale.
3. Les courbes d'amplification peuvent être modélisées par une fonction logistique de formule

$$y(t) = \frac{A}{1 + \exp(h(m - t))}$$

Les courbes modélisées sont représentées en figure 2.4.d. On trace la tangente à la courbe au point $t = m$ d'équation :

$$y_2(t) = at + b$$

avec

$$a = \frac{Ah}{4} \quad \text{et} \quad b = A \frac{2 - hm}{4}$$

On définit le T_p (*time to positivity*) comme la valeur pour laquelle $y_2(t) = 0$ [106].

On a donc

$$T_p = -\frac{b}{a}$$

La table en figure 2.4.e résume les valeurs de pic de dérivée première, les T_{t50} et les T_p de chaque courbe. Ces trois paramètres peuvent être utilisés pour comparer les cinétiques d'amplifications entre elles. Leur valeur est d'autant plus grande que l'amplification est tardive.

Du fait du bruit présent sur les mesures de certaines expériences, l'extrapolation des pics de dérivée première et la modélisation des courbes logistiques peut s'avérer complexe. On utilisera donc le T_{t50} pour comparer les cinétiques de réaction dans la suite du manuscrit. Si des duplicats ou triplicats sont réalisés, on comparera les moyennes des T_{t50} de chaque condition (mT_{t50}). On considère comme déterminante une différence de T_{t50} supérieure à 5 minutes.

2.2 Le problème critique de la biocompatibilité LAMP/papier

Nous développons dans cette section une méthode permettant de réaliser pour la première fois le suivi en temps réel d'une réaction LAMP au sein d'un disque de fibre de verre.

2.2.1 Conserver un agent intercalant fonctionnel.

Les premières amplifications isothermes sur papier réalisées au laboratoire sont des rt-RPA. Ces rt-RPA utilisent les réactifs d'un kit "exokit". Le mix réactionnel contient, en plus de la polymérase et de la recombinaise, une exonucléase, et une sonde spécifique comparable à une sonde Taqman. Cette dernière s'hybride avec l'amplicon en cas d'amplification, et est clivée dans un second temps, le fluorophore se séparant du quencher. On peut ainsi suivre en temps réel l'amplification RPA.

Dans le but de comparer et d'optimiser sur papier les différents paramètres influant sur la réaction (rt-)LAMP, nous cherchons à suivre en temps réel l'amplification (rt-)LAMP. Des systèmes utilisant des sondes spécifiques seraient envisageables, mais nous tentons dans un premier temps une méthode plus simple : utiliser un agent intercalant. Cette méthode existe couramment en tube (figure 2.1). Sa transposition au papier exige des mises au point décrites dans les sections suivantes.

Limiter l'interaction entre agent intercalant et papier.

Les travaux préliminaires effectués sous la supervision de Laura Magro suggéraient que l'agent intercalant *EvaGreen* interagissait de manière différente sur différents papiers [107].

De plus, il a été montré par Lo et al. que différents agents intercalants réagissaient de manière opposée sur un même papier en cellulose [108]. Ainsi, l'intensité de fluorescence de l'intercalant Propidione Iodine, est plus intense dans les disques positifs (contenant de l'ADN amplifié) mais l'intercalant *U-Safe* est moins intense dans les disques positifs. Il semble donc difficile de prédire sur un papier donné la réaction d'un agent intercalant en présence d'ADN.

On étudie sur trois type de papiers différents, un papier en cellulose (Gr.1) un papier en fibre de verre (GF/F) et un en polyethersulfone (PES-22 μ m *Millipore*), le comportement de deux agents intercalants ("LAMP fluorescent Dye" de *NEB* et le SYTO82). Les papiers en cellulose et en fibre de verre sont couramment utilisés en microfluidique papier et reportés comme supports d'amplification [84] [89]. On étudie le comportement du polyethersulfone car il est reporté par Linnes et al. comme étant adapté aux amplifications isotherme LAMP [85].

Pour ce faire, on réalise des mélanges réactionnels de LAMP (table 2.1.c), contenant l'un des deux des agents intercalants, auquel on ajoute ou non 200ng/ μ L d'ADN de sperme de saumon, pour simuler une amplification. On dépose ces deux types de mélanges réactionnels sur les trois papiers et on compare leur fluorescence due à l'intercalant (canal FAM pour le "LAMP fluorescent dye" de *NEB* et canal Texas Red pour le SYTO82). On réalise une troisième expérience identique sans agent intercalant pour soustraire à chaque mesure l'auto-fluorescence de chaque papier. On ne réalise donc ici pas d'amplification LAMP, on étudie simplement le comportement de l'agent intercalant dans un mélange réactionnel LAMP avec ou sans ADN.

Dans le papier en cellulose, on observe un fort signal fluorescent, dans les contrôles positifs comme dans les contrôles négatifs. Une interaction entre l'intercalant et la fibre de cellulose pourrait expliquer ce phénomène [107].

Dans la fibre de verre, on observe un fort signal fluorescent dans les disques contrôles positifs mais pas dans les disques contrôles négatifs. Les agents intercalants interagissent donc principalement avec l'ADN double brin (présent dans les disques contrôles positifs mais pas dans les disques contrôles négatifs).

Enfin dans les disques de PES, l'intensité de fluorescence est environ deux fois plus élevée et semble plus forte dans les disques contrôles négatifs. Ce résultat paradoxal pourrait s'expliquer par une forte interaction entre les molécules de polyethersulfone et les agents intercalants, diminuée par la présence d'ADN.

Parmi ces différents papiers, la fibre de verre semble donc la plus adaptée à l'usage d'un agent intercalant. Tous les autres agents intercalants testés jusqu'à présent : SYBRGreen, EVAGreen et SYTO9 montrent un comportement semblable. On utilisera par la suite préférentiellement SYTO9 dans le canal FAM et SYTO82 dans le canal Texas Red [104].

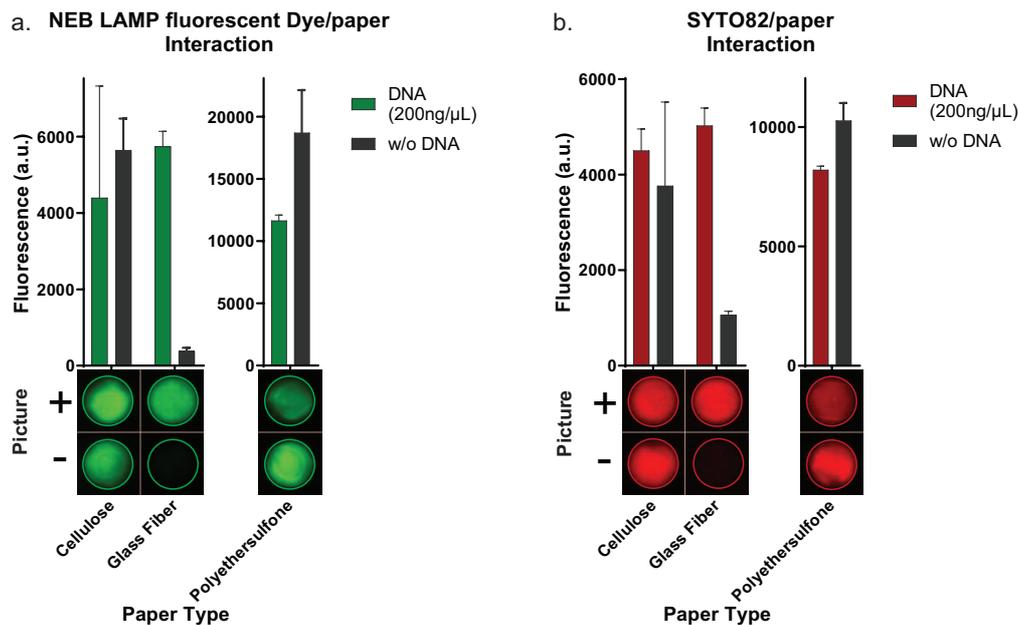


FIGURE 2.5 – Interaction agent intercalant/papier pour cellulose, fibre de verre et Polyethersulfone. Mélange réactionnel de LAMP S. enterica, avec ou sans ADN de sperme de saumon (200ng/μL). (a) Intercalant *NEB*, Mesure d'intensité dans le canal FAM, corrigée par rapport à la mesure sans agent intercalant (autofluorescence du papier). images associées. (b) Intercalant SYTO82, Mesure d'intensité dans le canal Texas Red, corrigée par rapport à la mesure sans agent intercalant (autofluorescence du papier). images associées.

Limiter l'interaction entre agent intercalant et film adhésif PCR.

Dans un second temps, nous évaluons l'interaction entre l'agent intercalant et les différents films adhésifs PCR disponibles au laboratoire. En effet, selon le dispositif expérimental décrit en section 2.1.6, les disques de papier sont couverts de part et d'autre par un film adhésif PCR, qui est donc en contact direct avec le mélange réactionnel. Nous réalisons une série de contrôles négatifs LAMP en tube en trempant un film adhésif PCR différent dans chaque tube, pour évaluer la potentielle interaction entre le film adhésif et l'agent intercalant.

On observe que le contact des films adhésifs Biomérieux, Greiner EasySeal et ThermalSeal durant la réaction provoque une fluorescence, probablement due à une interaction avec l'agent intercalant. Les films Eppendorf PCR et greiner ViewSeal ne présentent cet effet.

On choisira donc le film adhésif Greiner ViewSeal pour les expériences futures.

- *N.B. L'utilisation du film adhésif Thermal Seal durant une partie des expériences de la thèse a créé un bruit de fond sur un grand nombre d'expériences, dont voici un exemple ci dessous, ou l'on compare une LAMP recouverte de ThermalSeal à une LAMP recouverte de Greiner ViewSeal.*

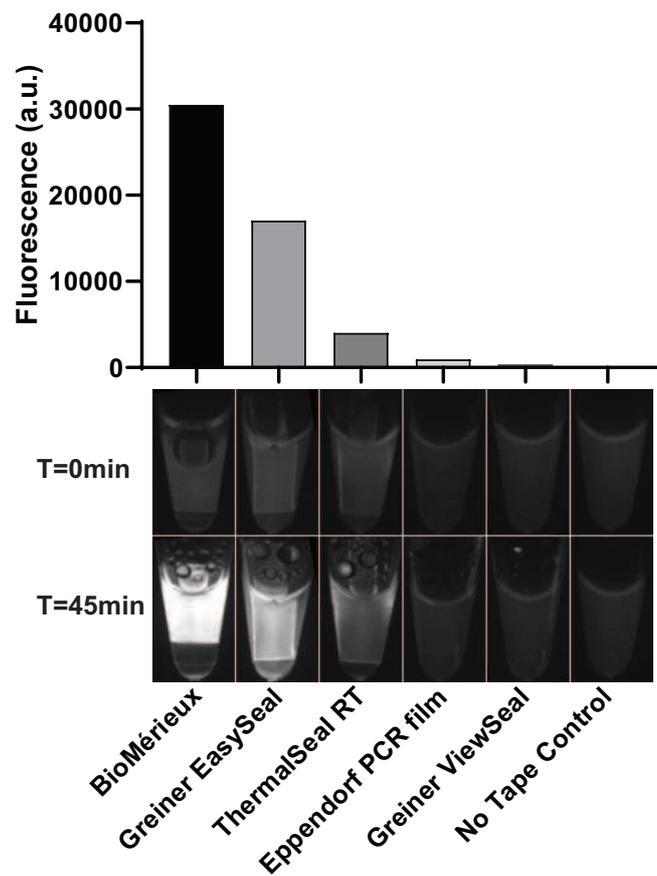


FIGURE 2.6 – LAMP *S. enterica*, contrôles négatifs réalisés dans des tubes contenant différents films adhésifs PCR.

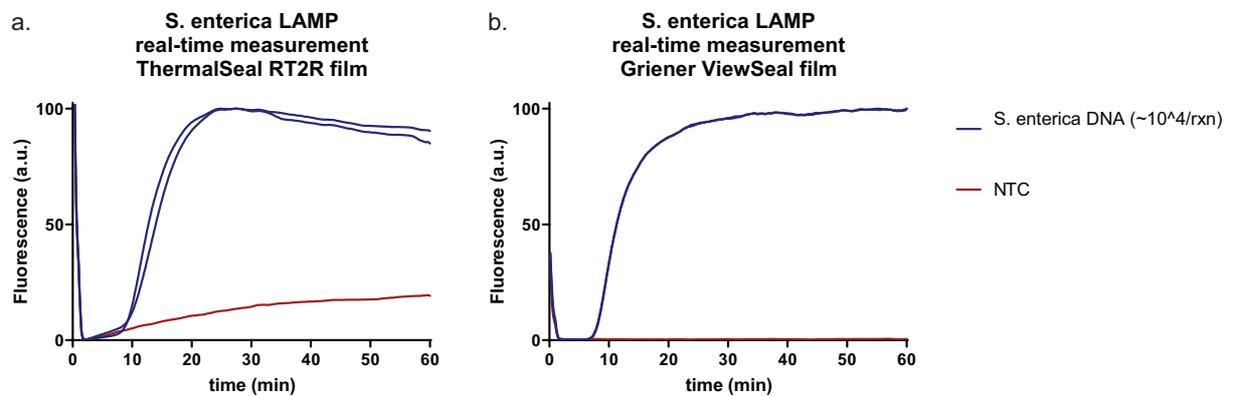


FIGURE 2.7 – LAMP *S. enterica*, Comparaison entre deux types de film pour couvrir la puce : ThermalSeal RT2R et Greiner ViewSeal.

2.3 Optimiser la biologie moléculaire de la réaction LAMP sur papier

Après avoir réalisé une réaction LAMP basique sur le GF, on souhaite y adapter la rt-LAMP et obtenir des performances optimales, c.-à-d. les mêmes performances qu'en tube.

On étudie dans cette section les paramètres bio-chimiques influant sur la spécificité et la sensibilité de la réaction (rt-)LAMP sur papier, et définissons les conditions optimales.

2.3.1 Comparaison des deux enzymes polymérases disponibles.

Deux principaux fournisseurs (*NEB* et *OptiGene*) proposent des kits et enzymes pour la réaction (rt-)LAMP. Nous testons donc à la fois leurs kits "tout en un" et leurs protocoles utilisant les enzymes vendues séparément (Les protocoles réalisés sont consignés en table 2.1).

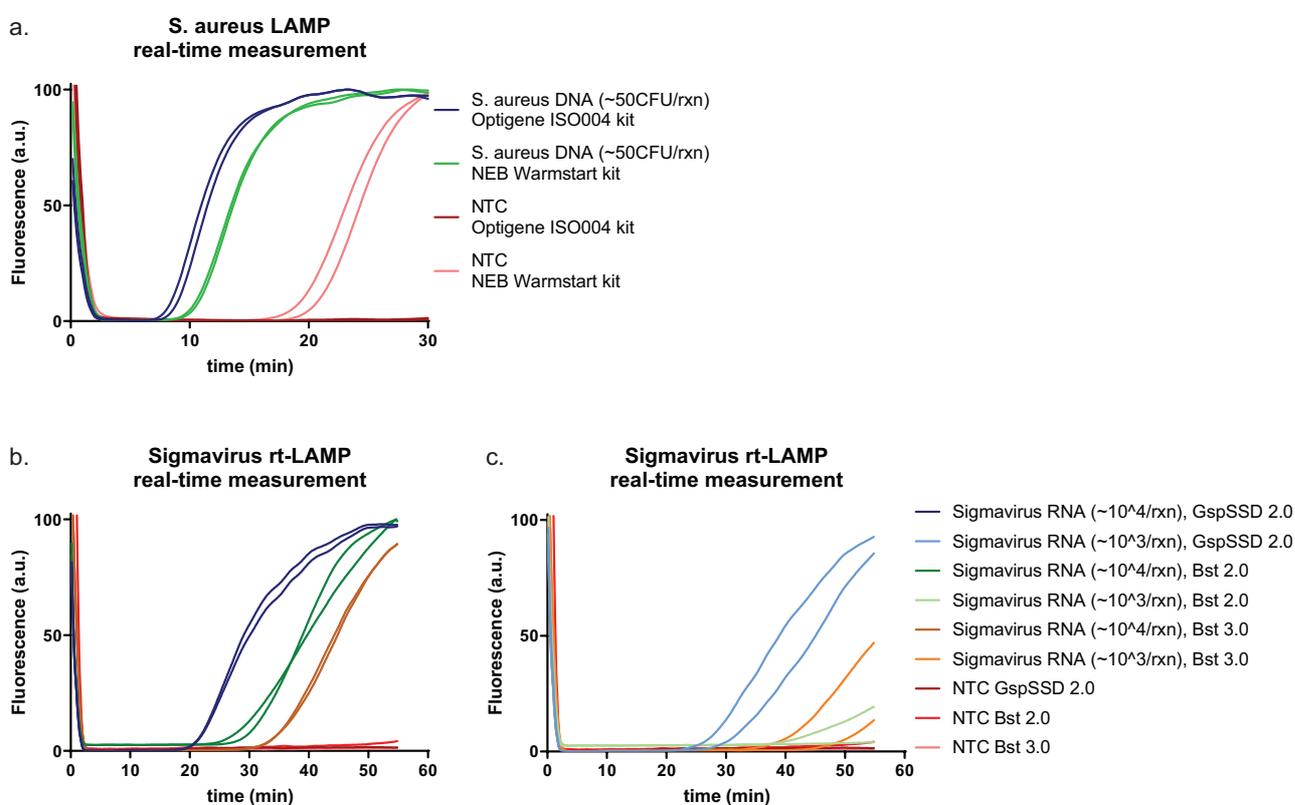


FIGURE 2.8 – Comparaison des kits et enzymes *NEB* et *OptiGene* (a) LAMP *Staphylococcus aureus*, comparaisons des kits "tout-en-un" de LAMP (b) rt-LAMP *Sigmavirus*, comparaison des protocoles utilisant les réactifs séparément.

Kits "tout en un". La cinétique d'amplification est plus rapide pour le kit LAMP *OptiGene* ($mTt50 = 11,0$ min) que pour le kit LAMP *NEB* ($mTt50 = 13,6$ min). On observe la présence d'amplifications non spécifiques aux alentours de 20 min pour les deux contrôles négatifs du kit LAMP *NEB*.

Enzymes séparées. Les enzymes GspSSD, Bst2.0 et Bst3.0 sont comparées en utilisant les protocoles des fournisseurs.

A une concentration en ARN de 10^4 brins/ μ L, la cinétique d'amplification est plus rapide pour la rt-LAMP GspSSD 2.0 ($mTt50 = 29,6$ min) que pour les rt-LAMP Bst 2.0 et 3.0 ($mTt50$ resp. de 39,3 et 44,5 min).

A une concentration en ARN de 10^3 brins/ μ L, on observe une amplification pour la rt-LAMP GspSSD 2.0 ($mTt50 = 42,0$ min) mais pas d'amplifications complètes pour les rt-LAMP Bst 2.0 et 3.0.

La rt-LAMP GspSSD 2.0, est, dans nos conditions expérimentales, plus rapide et plus sensible que les rt-LAMP Bst.

Les nombreuses LAMP réalisées grâce au kit *NEB*, et enzymes Bst au début du travail de thèse, montrent une plus forte susceptibilité aux amplifications non spécifiques. Au vu des articles de la littérature utilisant les réactifs *NEB* sur papier avec succès [85] [89] [67], il semble probable qu'en changeant les conditions de réactions (température, préparation du papier, concentration en réactifs, etc) nous soyons en mesure d'obtenir de meilleurs résultats.

Cependant pour des raisons de temps de développement, nous conserverons dans la suite du manuscrit l'utilisation des réactifs et des protocoles *OptiGene*, en utilisant la polymérase GspSSD 2.0.

Bien que le kit LAMP "tout-en-un" soit privilégié par nos collaborateurs de la CIBU pour sa rapidité d'utilisation, il ne permet pas de faire varier les concentrations en réactifs du mélange réactionnel de (rt-)LAMP. Nous privilégierons donc l'utilisation du protocole détaillé en mélangeant les réactifs un à un, pour optimiser spécifiquement leur concentration dans le cadre de la (rt-)LAMP sur papier.

2.3.2 Comparaison des différentes transcriptases inverses pour la rt-LAMP

Pour le protocole de rt-LAMP sur papier, deux transcriptases inverses sont comparées : une AMV-RT (*Roche*) et l'Opti-RT, recommandée par le service d'*OptiGene* pour sa thermostabilité. Nous comparons ces deux enzymes en rt-LAMP.

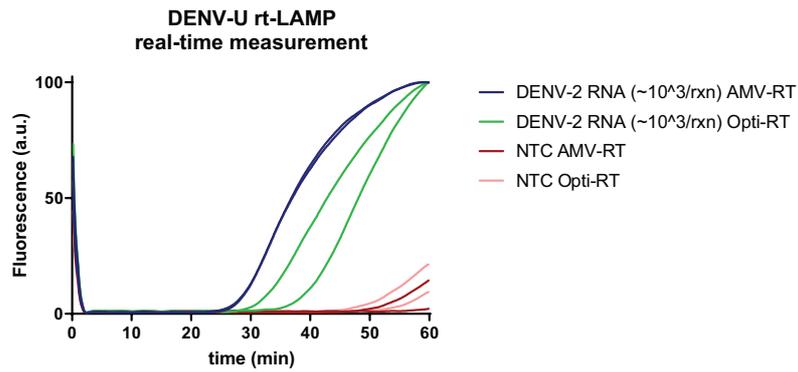


FIGURE 2.9 – rt-LAMP DENV-U, AMV-RT (Roche) ou Opti-RT

On observe que la cinétique d'amplification de la rt-LAMP contenant l'AMV-RT (*Roche*) est plus rapide que celle contenant l'Opti-RT ($mTt50$ de 36,9 min pour AMV-RT contre 45,5 min pour l'Opti-RT).

Nous choisissons donc l'AMV-RT (Roche) comme transcriptase inverse pour les rt-LAMP dans la suite du manuscrit.

2.3.3 Influence de la température

La température d'amplification est reportée comme un paramètre déterminant par les différents fournisseurs [109] [110]. Elle fait souvent l'objet d'optimisations dans la littérature [111] [112].

D'après les recommandations, les amorces sont désignées de manière à ce que la température d'hybridation (T_m) des séquences F2/B2 soit comprises entre 60°C et 65°C [19]. La T_m des séquences F1c/B1c doit être légèrement supérieure, de manière à ce que les structures loop formées par les amorces FIP/BIP, essentielles à la réaction LAMP, se forment immédiatement après leur libération. De même la température d'hybridation des séquences F3/B3 est choisie légèrement inférieure à celle de F2/B2 pour s'assurer que la synthèse entamée par FIP/BIP précède celle de F3/B3.

Les températures d'hybridations calculées selon les conditions salines de réactions et les concentrations respectives des amorces ZIKV, CHIKV et DENV-U sont disponibles en table 2.3 et confirment bien pour la tendance : $T_{m_{F3/B3}} < T_{m_{F2/B2}} < T_{m_{F1c/B1c}}$ ².

	F2	B2	F3	B3	F1c	B1c	LF	LB
ZIKV	62.9	62.7	60.7	60.5	67.4	66.5	63.4	63.5
CHIKV	62.1	59.4	60.4	60.6	67	68.8	63.3	63.3
DENV-U/2	62.9	62.7	62.1	63.6	67.4	66.5	∅	59.9

TABLE 2.3 – Températures d'hybridation (°C) des séquences composant les amorces des LAMP ZIKV, CHIKV et DENV-U dans le cas de l'amplification de DENV-2. Les séquences sont classées de la gauche vers la droite selon la chronologie de la réaction LAMP.

Nous faisons alors varier la température de réaction pour ces trois rt-LAMP. Nous estimons la température à l'équilibre au sein du papier durant la réaction (rt-)LAMP à la température de la plaque chauffante. (*ici j'aimerais bien un petit argument de physique estimant que le transfert thermique sur les 800µm du papier imbibé d'eau et collé à la plaque chauffante est quasi-total*)

On réalise trois rt-LAMP selon les températures suivantes : 60°C, 65°C et 70°C

Pour la rt-LAMP ZIKV, les cinétiques d'amplifications sont proches pour les trois températures, légèrement plus lente pour 70°C (mTt_{50} de 15,7 min, 15,5 et 18,3 pour resp. 60°C, 65°C et 70°C).

Pour la rt-LAMP CHIKV, la cinétique d'amplification à 70°C est plus lente (mTt_{50} de 25,1 min vs resp. 19,1 min et 18,1 min pour 60°C et 65°C). La faible T_m de la séquence B2 (59,8°C) pourrait expliquer ce ralentissement lorsque la température lui est supérieure est de 10°C.

Pour la rt-LAMP DENV-U, la cinétique d'amplification d'ARN de DENV-2 est plus rapide à 65°C (mTt_{50} de 26,0 min contre 29,7 et 32,3 min pour resp. 60°C et 70°C). Les T_m de F3 et B3, légèrement plus élevées que ceux des amorces ZIKV et CHIKV,

2. IDT primer analyser : <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

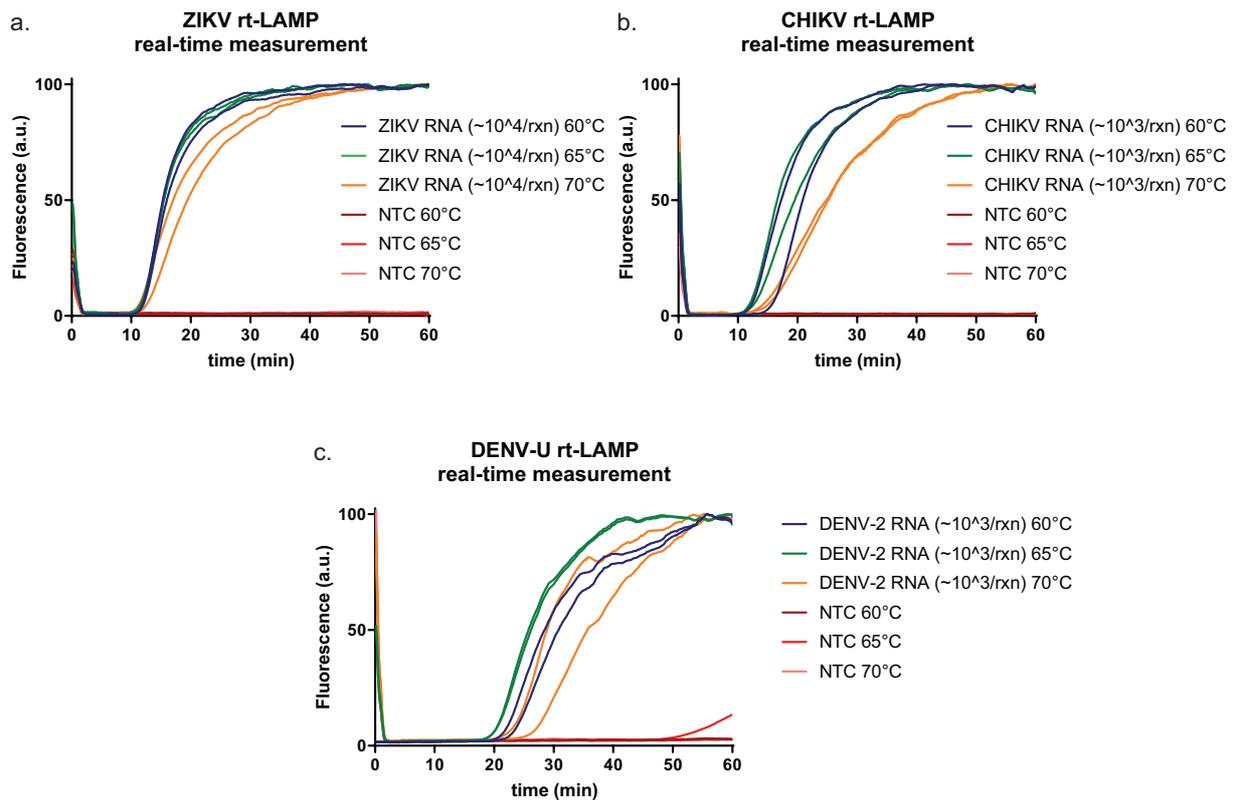


FIGURE 2.10 – Variation de la température d’amplification, Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82. (a) rt-LAMP ZIKV (b) rt-LAMP CHIKV (c) rt-LAMP DENV-U

pourraient expliquer le ralentissement à 60°C. En effet, si la majorité des amorces F3/B3 est hybridée, alors il est possible qu’une partie de l’amplification ne se déroule pas selon le schéma classique via la *dumbbell structure*, mais de manière analogue à une PCR, en formant un amplicon standard entre F3 et B3. Cela ralentit alors la réaction qui doit sa rapidité à la *dumbbell structure*. Le ralentissement de la réaction à plus haute température pourrait être dû à l’hybridation diminuée des séquences F2/B2 et LB. Une autre hypothèse permettant d’expliquer le ralentissement des trois réactions à plus haute température serait la baisse d’activité des enzymes rétro-transcriptase et polymérase au dessus de 65°C.

Malgré les variations de temps de réaction, on remarque pour ces trois rt-LAMP une amplification spécifique, sur une plage de 10°C. Cette robustesse est un argument fort en faveur d’une application d’un test LAMP sur le terrain, le système de chauffe n’ayant pas besoin d’être extrêmement précis.

Étant donné que la température de 65°C est optimale pour les trois réactions, elle est conservée dans la suite du manuscrit.

2.3.4 Influence de la concentration en amorces

Les recommandations d'*OptiGene* proposent deux concentrations d'amorces de LAMP. La concentration standard recommandée pour les amorces F3/B3, FIP/BIP et LF/LB est respectivement 0,2 μM , 0,8 μM et 0,4 μM . Cependant, *OptiGene* mentionne la possibilité d'utiliser des amorces plus concentrées (respectivement 0,2 μM , 2 μM et 1 μM) pour accélérer la cinétique de réaction. Nous comparons ces deux concentrations en amorces, tout d'abord en tube grâce à une LAMP felis herpesvirus (figure 2.11.a), puis sur papier grâce à une rt-LAMP CHIKV (figure 2.11.b).

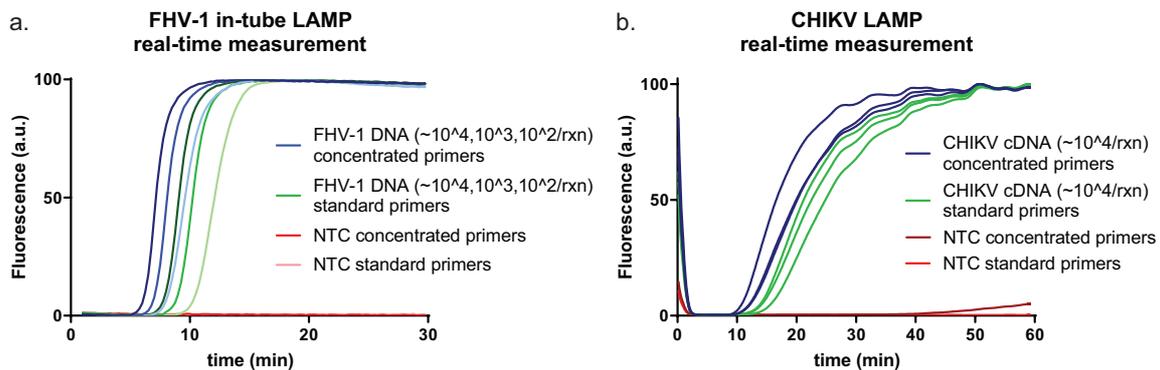


FIGURE 2.11 – Variations des concentrations en primers, primers concentrés (0,2 μM F3/B3, 2 μM FIP/BIP, 1 μM LF/LB) ou concentration standard (0,2 μM F3/B3, 0,8 μM FIP/BIP, 0,4 μM LF/LB)(a) LAMP FHV-1 en tube, ADN de FHV-1. Suivi de la réaction en temps réel par SYBRGreen. La nuance foncée symbolise 10⁴, la nuance intermédiaire 10³ et la nuance claire 10² brins d'ADN cible par réaction. (b) rt-LAMP CHIKV, ARN de CHIKV, Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82.

La concentration en amorces semble influencer sur la cinétique de réaction, en tube comme sur papier. En présence d'amorces FIP/BIP et LF/LB plus concentrées, la réaction est plus rapide qu'avec une concentration standard. (différence de $mTt50$ d'environ deux minutes pour les réactions en tube, et de 4 minutes pour les réactions sur papier)

Pour plus de simplicité, notamment lors de réalisation des duplex QUASR dans un seul disque réactionnel, nous conservons la concentration standard en amorces (0,2 μM F3/B3, 0,8 μM FIP/BIP, 0,4 μM LF/LB). Cependant, les expériences réalisées suggèrent qu'une concentration plus élevée en amorces FIP/BIP et LF/LB permet d'accélérer l'amplification. Ce paramètre pourrait être exploité plus tard dans le développement du test, pour le rendre plus rapide.

2.3.5 Influence des concentrations en MgSO₄ et dNTPs

MgSO₄ et dNTPs sont les deux réactifs dont les concentrations sont à optimiser pour chaque (rt-)LAMP selon les recommandations *OptiGene* [113] (entre 3 et 6 mM pour MgSO₄ et entre 0,4 et 1 mM pour dNTPs).

L'ion Mg²⁺ du MgSO₄ est un cofacteur enzymatique de la polymérase et intervient comme intermédiaire d'oxydoréduction dans la synthèse d'ADN. Les dNTPs sont les quatre types de nucléotides qui vont être successivement ajoutés par l'enzyme à l'extrémité 3' du brin en cours de synthèse. Cette réaction chimique d'ajout d'un nucléotide à l'extrémité 3' d'un brin d'ADN est représentée de manière simplifiée en figure 2.12.a. Le groupe hydroxyle à l'extrémité 3' du brin amorce effectue une attaque nucléophile sur l'atome de phosphate le plus interne du dNTP. Un pont phosphodiester est ainsi formé entre le brin amorce et le nucléotide nouvellement ajouté. On observe dans le même temps la libération d'un ion pyrophosphate restant qui, en conditions physiologiques, est hydrolysé par une pyrophosphatase. Cet ion Pyrophosphate est à l'origine de la détection par turbidimétrie, par la calcéine ou l'Hydroxynaphtol Blue, décrit au chapitre 1

La figure 2.12.b illustre plus précisément le rôle des ions magnésium dans la catalyse de la réaction [114]. Les acides aminés du site actif de l'enzyme (entourés en violet) vont chélater deux Mg²⁺. Le premier (entouré en bleu) va stabiliser temporairement le O⁻ en 3' du brin amorce (entouré en vert), permettant l'attaque nucléophile de celui-ci sur le phosphate alpha du dNTP. Le second Mg²⁺ (entouré en orange) aide à la stabilisation du Pyrophosphate (entouré en rouge) qui va être libéré à chaque ajout de dNTP.

L'ion Mg²⁺ interagit aussi avec les phosphates chargés négativement du squelette de sucre des brins d'ADN. Cela a pour effet de diminuer la répulsion entre les différents brins d'ADN et donc la température d'hybridation des amorces [115] [116]. Enfin, l'ion magnésium se complexe aussi avec les phosphates des dNTPs libres en solution [117].

On comprend que les concentrations relatives en MgSO₄ et dNTPs vont avoir un impact sur la réaction d'amplification, par différents mécanismes. Nous faisons donc varier expérimentalement les concentrations de ces deux réactifs et observons les variations des cinétiques d'amplification (figure 2.13).

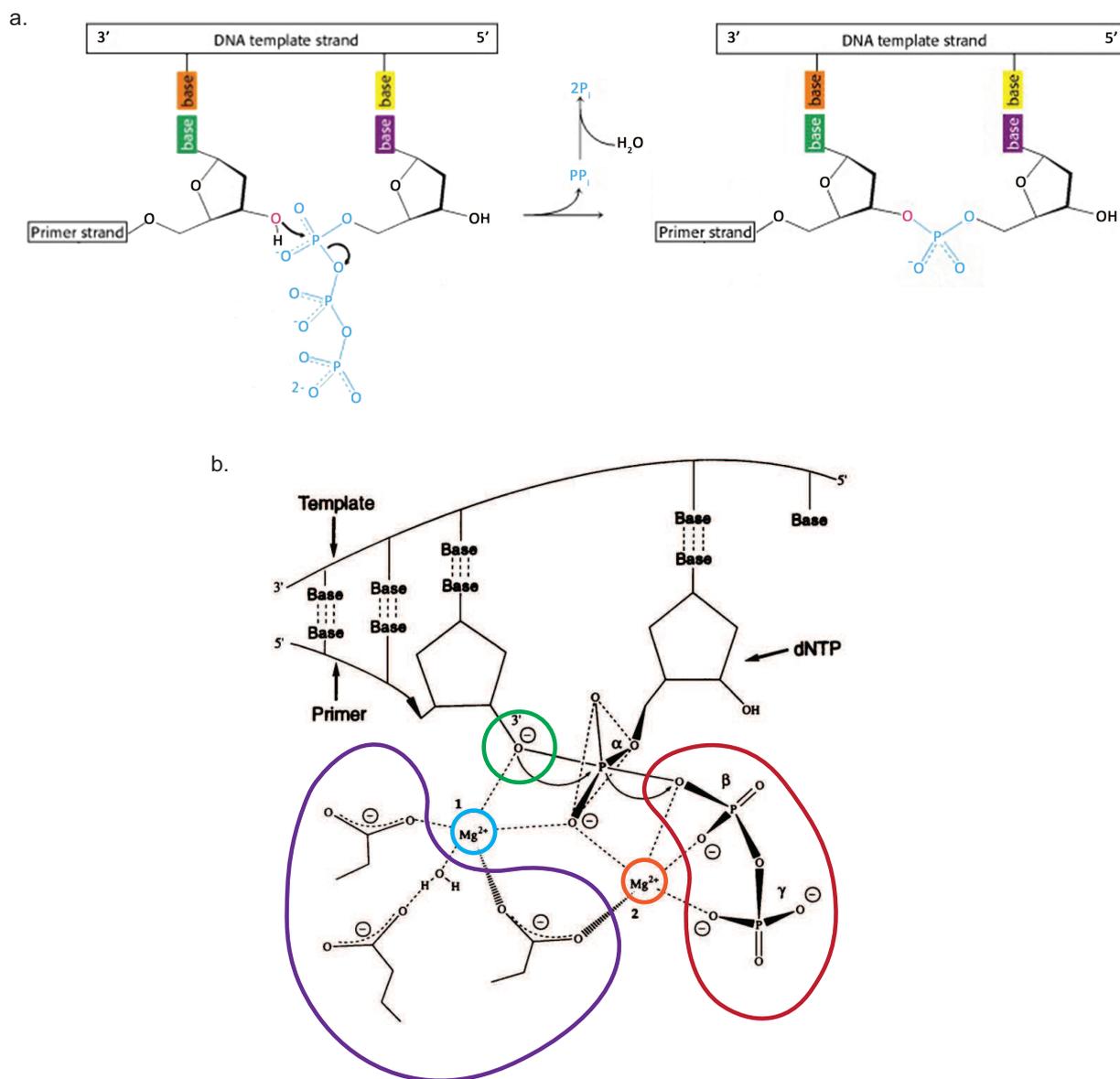


FIGURE 2.12 – Rappel à propos de la réaction de polymérisation de l'ADN (a) Schéma résumant la réaction chimique catalysée par une polymérase, permettant l'addition d'un nucléotide à l'extrémité 3' d'un brin amorce extrait de [118] Copyright © 2002, W. H. Freeman and Company. (b) Illustration du rôle des deux ions Mg^{2+} dans la réaction d'ajout d'un nucléotide. Adapté de [114]

A 3 mM de $MgSO_4$, on observe une corrélation entre la concentration en dNTPs et la cinétique de réaction (figure 2.13.a). Plus la concentration de dNTPs est élevée plus la réaction est lente (mTt_{50} de 12,1 min et 19,7 min pour resp. 0,4 mM et 0,7 mM de chaque dNTP). Pour 1 mM de chaque dNTPs, l'amplification démarre tardivement aux alentours de 40 min et n'atteint pas sa phase de plateau en 60 min. On pourrait expliquer ce phénomène par l'interaction entre les dNTPs libres en solution et le Mg^{2+} . les dNTPs complexent une partie des Mg^{2+} et limitent donc la quantité d'ions Mg^{2+} disponibles

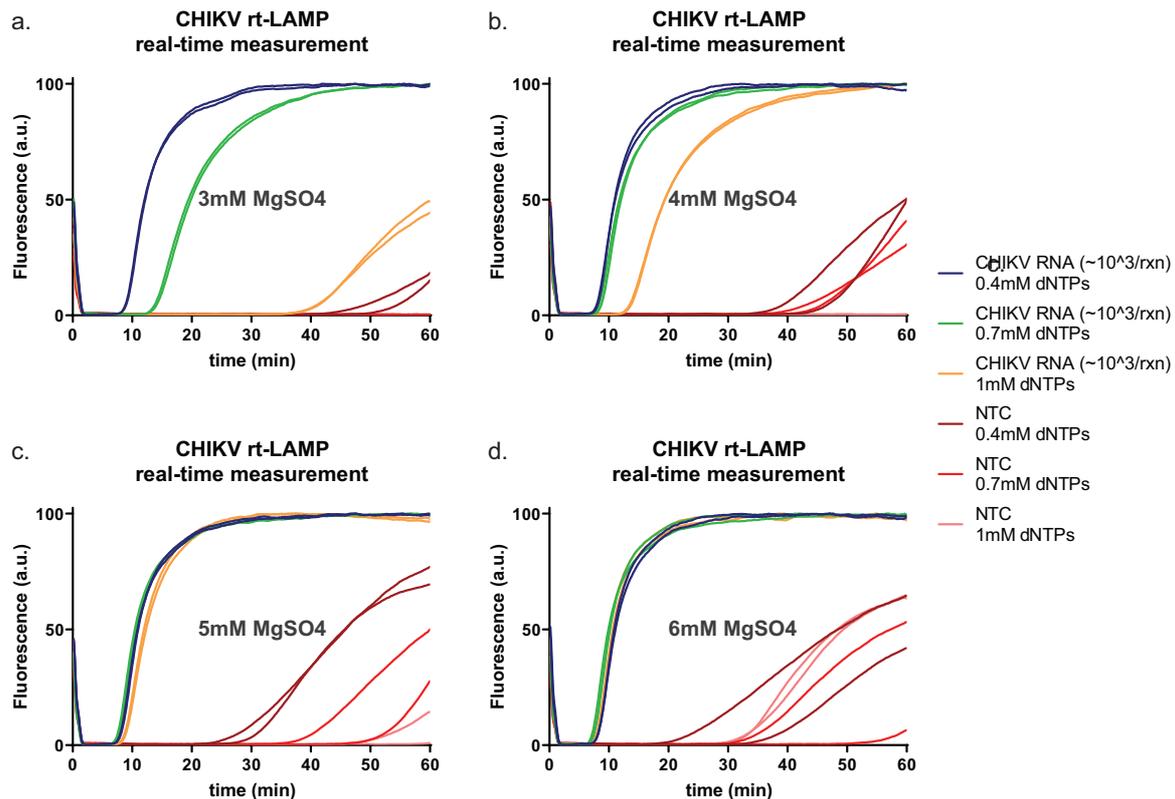


FIGURE 2.13 – rt-LAMP Chikungunya, Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82. variations des concentrations en dNTPs et MgSO₄ (a) 3 mM de MgSO₄, 0,4-0,7-1 mM de chaque dNTPs (b) 4 mM de MgSO₄, 0,4-0,7-1 mM de chaque dNTPs (c) 5 mM de MgSO₄, 0,4-0,7-1 mM de chaque dNTPs (d) 6 mM de MgSO₄, 0,4-0,7-1 mM de chaque dNTPs

au site actif de la polymérase. A 1 mM de chaque dNTPs (4 mM au total), les dNTPs complexent la majorité des ions Mg²⁺ et la réaction est très fortement inhibée. On observe un début d'amplification non spécifique à 50 min pour la concentration 0,4 mM dNTPs.

A 4 mM de MgSO₄, on observe toujours une réaction plus lente lorsque la concentration de chaque dNTPs est de 1 mM ($mTt_{50} = 19,4$ min vs 11,0 et 11,9 min pour resp. 0,4 et 0,7 mM). Pour les concentrations plus basses (0,4 et 0,7 mM de chaque dNTPs), on observe l'apparition d'amplifications non spécifiques dans les réactions de contrôles négatifs (figure 2.13.b). Ceci s'expliquerait à l'inverse par une plus forte concentration en Mg²⁺ au niveau du site actif de la polymérase (car moins déplété par les dNTPs), augmentant l'activité mais diminuant la spécificité de l'enzyme.

A 5 mM de MgSO₄, La concentration en dNTPs entre 0,4 et 1 mM de chaque n'a plus d'effet sur la cinétique de réaction des contrôles positifs (mTt_{50} de 11,0 min, 10,6 min et 12,2 min pour resp. 0,4 mM 0,7mM et 1mM de chaque dNTPs). Cependant, l'apparition d'amplifications non spécifiques dans les contrôles négatifs est plus précoces encore pour 0,4 et 0,7 mM de dNTPs (figure 2.13.c). On note que l'apparition d'amplifications non

spécifiques est plus rapide pour 0,4 mM que pour 0,7 mM, ce qui s'expliquerait par une moindre interaction entre les ions Mg^{2+} et les dNTPs et donc une plus grande concentration de Mg^{2+} au site actif de l'enzyme, diminuant plus fortement la spécificité de la polymérase. On note enfin la tardive amplification non spécifique pour l'un des duplicats à 1 mM de dNTPs.

A 6 mM de $MgSO_4$, les mêmes effets, sont visibles ($mTt50$ de 11,0 min, 10,0 min et 10,3 min pour resp. 0,4 mM 0,7 mM et 1 mM de chaque dNTPs). Les amplifications spécifiques sont plus précoces encore et ce pour les trois concentrations en dNTPs (figure 2.13.d).

Nous pouvons tirer plusieurs conclusions de cette série d'expérience.

- A basse concentration en $MgSO_4$ (3 et 4 mM), Il semble que la concentration en dNTPs agisse de manière importante sur la cinétique d'amplification des tests positifs. Plus la concentration en dNTPs est importante, plus l'amplification est lente. Cela pourrait s'expliquer par l'interaction entre les dNTPs libres et le Mg^{2+} en solution, diminuant la concentration de Mg^{2+} effective au site actif de la polymérase.
- A forte concentration en $MgSO_4$ (5 et 6 mM), cet effet s'amenuise, et l'on observe l'apparition d'amplifications non spécifiques dans les contrôles négatifs. Cela pourrait s'expliquer à l'inverse par la trop forte concentration en Mg^{2+} au site actif de l'enzyme diminuant la sensibilité de la réaction.

Le même type d'expérience est réalisé pour les rt-LAMP ZIKV et DENV-U. On détermine expérimentalement les concentrations optimales suivantes : 3 mM de $MgSO_4$ et 0,4 mM de chaque dNTPs pour la rt-LAMP CHIKV; 4 mM de $MgSO_4$ et 0,4 mM de chaque dNTPs pour les rt-LAMPs ZIKV et DENV-U.

2.4 Multiplexer et quantifier grâce à la microfluidique papier

L'adaptation de la réaction LAMP au papier et son suivi en temps réel offre des applications directes. Nous démontrons dans cette sections les possibilités de multiplexage des tests sur un système papier ainsi que les premiers pas vers un dispositif de LAMP quantitative (qLAMP) sur papier.

2.4.1 Multiplexer les réactions sur un 3D- μ PAD.

Par l'empilement de plusieurs couches de papier, des systèmes microfluidiques en 3 dimensions (3D- μ PAD) permettent en un pipetage de répartir un échantillon dans 4 zones test, et ainsi de réaliser 4 tests en parallèle : c'est le multiplexage (cf. section 1.2.3).

Mode opératoire. La figure 2.14 décrit le protocole de fabrication de puces permettant le multiplexage de quatre tests. (1) On assemble les disques et la feuille de polypropylène de la même manière que pour la fabrication de puce test puis (2) le mélange réactionnel est lyophilisé dans chaque disque, contenant des amorces différentes (Le processus de lyophilisation sera détaillé et discuté dans le chapitre 4). (3) On assemble la deuxième couche de la puce qui consiste en une croix de répartition en fibre de verre (Std 17, *Whatman*) formant quatre canaux. Le dispositif est prêt à l'usage et peut être réhydraté par l'échantillon. Deux multiplex papier ont été réalisés au laboratoire, pour la détection respective de bactéries et virus.

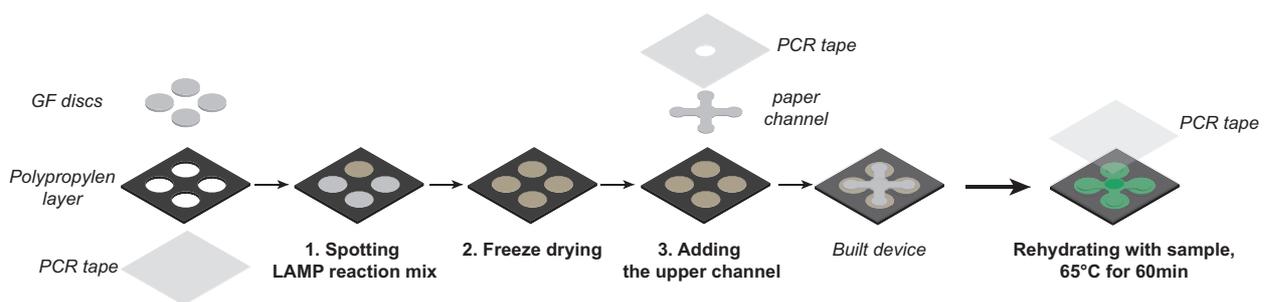


FIGURE 2.14 – Protocole de construction des puces multiplex

Multiplex bactérien : *Staphylocoque aureus*, *Salmonella enterica*, *Streptococcus pneumoniae*. Le projet Child's play, initié par la CIBU, a permis la mise au point de trois jeux d'amorces LAMP pour la détection des bactéries *S. aureus*, *S. enterica* et *S. pneumoniae*. Ces trois bactéries sont les principales responsables des bactériémies fébriles chez l'enfant en zone tropicale. Un premier triplex LAMP sur papier a été développé, en

utilisant le dispositif décrit ci-dessus. La figure 2.15.a montre trois dispositifs testés avec chacun des ADN bactériens. On peut observer une réponse spécifique de chaque zone test. Un quatrième disque non utilisé ici servira à la mise au point d'un contrôle positif (sujet abordé dans le chapitre 4).

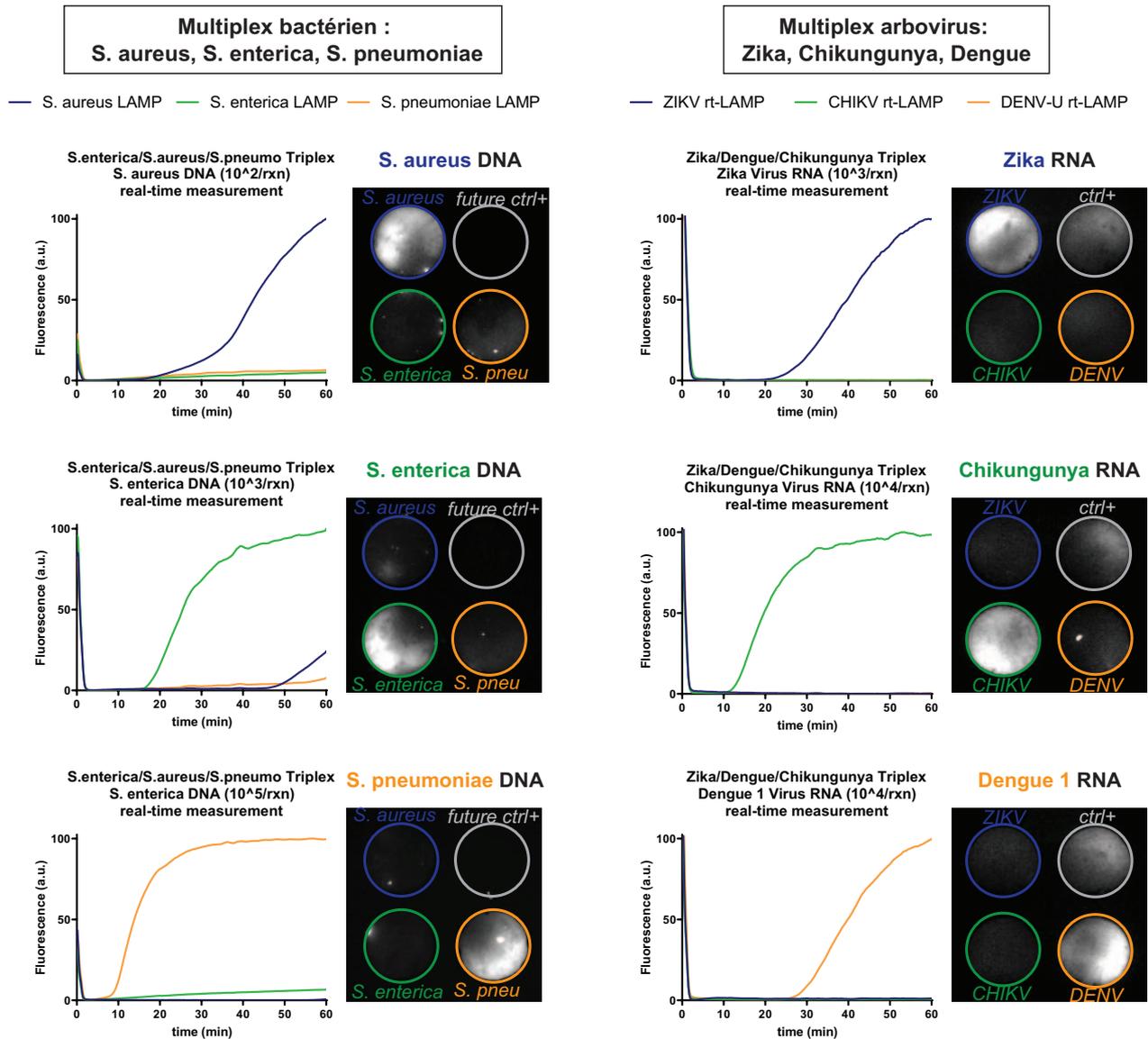


FIGURE 2.15 – Exemple de deux tests multiplexés réalisés, un triplex bactérien *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* et *Streptococcus pneumoniae* et un triplex d'arbovirus Zika, Chikungunya, Dengue. (a) Triplex bactérien, ADN de *S. aureus*, *S. enterica* et *S. pneumoniae*, Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82, image des dispositifs à $t=50$ min. (b) Triplex arbovirus, ARN de Zika, Chikungunya, Dengue 1, Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82, image des dispositifs à $t=60$ min.

Multiplex arbovirus : Zika, Chikungunya, Dengue. Un triplex rt-LAMP développé pour les trois arbovirus Zika, Dengue et Chikungunya est réalisé sur le même modèle. On observe là-aussi une réponse spécifique de chaque zone test (figure 2.15.b). Une

LAMP GAPDH est lyophilisée dans un quatrième disque en tant que contrôle positif (signal faible dû à la faible concentration en ADN humain dans les extraits testés).

Ainsi, un premier type de multiplexage est démontré ici. On peut le qualifier de "multiplexage physique", pour lequel un même échantillon est réparti dans des zones test différentes. Ce type de multiplexage, possède une limite due à la longueur raisonnable des canaux microfluidiques papier. La distance parcourue par le fluide variant comme la racine carré du temps (cf. *loi de Lucas-Washburn* section 1.2.3), la taille de l'arbre de répartition est donc limitée à 3-4 cm, si l'on désire une vitesse de remplissage de quelques secondes. En pratique le "multiplexage physique" de plus d'une dizaine de test est donc complexe [107]. La méthode QUASR (cf. section 1.1.2), permet de dépasser cette limite en multiplexant plusieurs réactions LAMP dans un seul disque. Elle sera développée sur papier dans le chapitre 3.

2.4.2 Quantification par la LAMP sur papier : vers un test quantitatif de terrain.

La cinétique de la réaction LAMP en tube est liée à la concentration en ADN cible. De la même manière que dans une PCR, plus la concentration initiale est forte, plus rapide sera la réaction. Cette propriété a été rapportée dans de nombreux travaux et mise à profit pour réaliser des LAMP quantitatives (qLAMP) [105] [119].

Pour explorer la qLAMP sur papier, des dilutions en cascade (1/10) d'ADN de *S. enterica* sont réalisées et on compare leurs cinétiques d'amplification LAMP dans la figure 2.16. Les cinétiques d'amplifications LAMP sur papier sont elles aussi corrélées linéairement au log de la concentration initiale en ADN cible (figure 2.16.b).

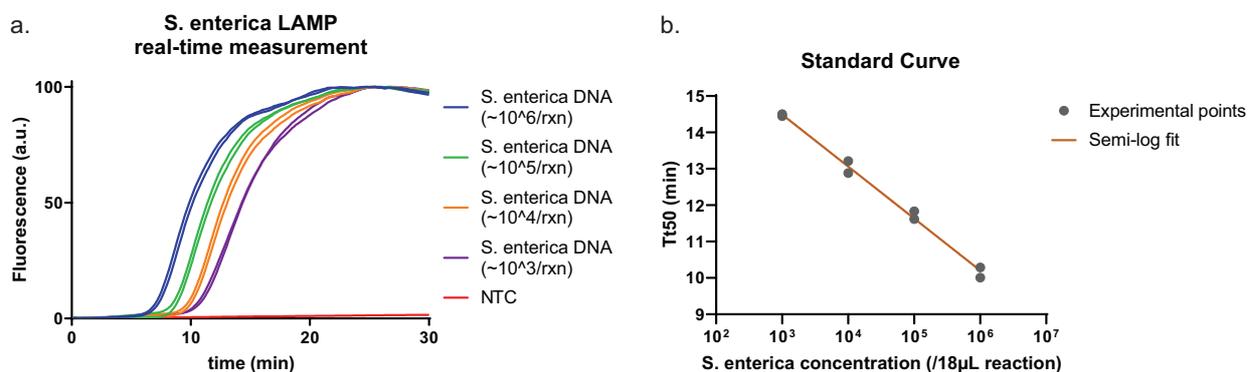


FIGURE 2.16 – qLAMP *S. enterica*. (a) LAMP *S. enterica*, ADN de *S. enterica* dilué en cascade. Suivi de la réaction en temps réel par SYTO9. (b) Compilation des Tt50 et tracé d'une courbe de calibration ; $y = -1,43 \cdot \log(x) + 18,78$ ($R^2=0,99$).

Pour une qLAMP comme pour une qPCR, il faut lors de chaque test lancer une série d'amplifications de concentrations connues permettant d'extrapoler la concentration en

ADN cible de l'échantillon. Implémenter un tel dispositif sur un système papier serait possible par l'ajout d'un circuit séparé, réhydratant une série de zones tests dans lesquels des concentrations d'ADN connues sont lyophilisées.

La figure 2.17.a décrit un dispositif papier dans lequel cinq disques (entourés en bleu) contiennent de l'ADN cible en concentration connue en plus du mélange réactionnel LAMP lyophilisé (un contrôle négatif, et quatre points de gamme). La réhydratation du système se fait en deux temps (figure 2.17.c). Le disque test (en vert) avec l'échantillon à quantifier, puis les cinq disques de gamme (en bleu) avec un buffer de réhydratation pur. Une courbe de calibration peut ensuite être établie grâce aux cinq disques de gamme et la concentration d'ADN dans le disque test peut être extrapolée.

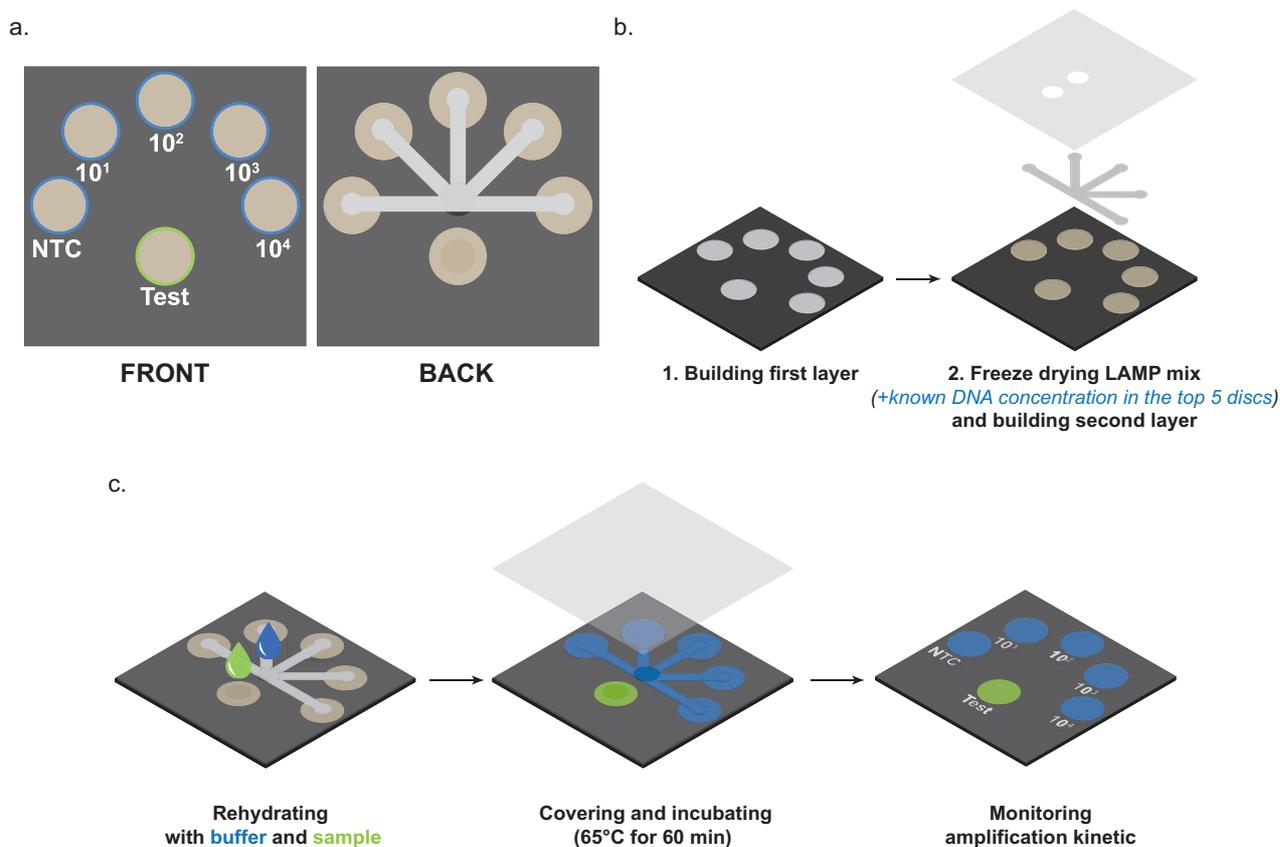


FIGURE 2.17 – Schéma d'un dispositif de terrain de qLAMP sur papier. (a) Vues de face et de dos du dispositif (b) Protocole de fabrication (c) Principe d'utilisation.

Un tel dispositif permettant la quantification serait réalisable. On pourrait cependant lui opposer le fait que le coût du test serait multiplié par six, car les réactions de gammes sont nécessaire à chaque test. Regrouper différents échantillons pour une même gamme (comme cela est fait dans les plaques PCR) résoud ce problème mais rend le test moins immédiat, lui retire son caractère "à la demande".

Une étude récemment menée à la CIBU par Jessica Vanhomwegen et Aurelia Kwaziborski a aussi démontré la possibilité de réaliser sur le terrain, une LAMP semi-quantitative.

L'idée n'est pas de connaître la concentration exacte en la comparant à une gamme de concentration connue réalisée en parallèle, mais de déterminer si la concentration en ADN cible dans l'échantillon est au dessus ou au dessous d'un certain seuil. Ici, un ordre de grandeur de la cinétique de réaction suffit (par ex. T_{t50} supérieur ou inférieur à 5 minutes). Une LAMP détectant tous les géotypes du virus de l'hépatite B (HBV) a été développée et leurs résultats démontrent qu'il est possible de classer grâce à la cinétique d'amplification LAMP les échantillons selon trois seuils : 15 IU/mL ; 2000 IU/mL et 20000 IU/mL. Ces seuils, en addition à d'autres paramètres (notamment l'état du foie, en dosant ASAT et ALAT) font partie des critères cliniques permettant de prendre la décision de traiter le patient ou non par une thérapie anti-virale.

De plus, dans le cas de la transmission mère-enfant (représentant plus de 60% des pathologies du foie liées à HBV) cette mesure permet aussi de savoir si une femme enceinte est à risque de transmettre le virus à son enfant. Si sa charge virale est trop élevée (>20000 IU/mL) il est nécessaire de traiter la patiente avec des anti-viraux, car l'injection vaccinale néonatale ne suffira pas à protéger le nouveau né.

Sur papier, un tel test semi-quantitatif, serait facilement réalisable, et coûterait moins cher qu'un dispositif quantitatif. Il permettrait alors une approche semi-quantitative au chevet du patient.

Ce qu'il faut retenir

- Nous avons adapté la rt-LAMP au papier avec succès. L'utilisation d'une fibre de verre (GF) permet de s'affranchir des interactions rencontrées entre cellulose et agent intercalant, et ainsi pouvoir suivre la cinétique d'amplification au cours du temps.
- Nous avons déterminé les paramètres principaux influençant la sensibilité et la spécificité d'une réaction LAMP : type d'enzyme, température de réaction, concentration en amorces, $MgSO_4$ et dNTPs ... Ces paramètres peuvent être interdépendants (exemple des concentrations en Mg^{2+} et dNTPs).
- Des premiers système microfluidique papier ont été réalisés, permettant le multiplexage "physique" des réactions LAMP, et ce pour deux triplex : un triplex bactérien *S. aureus*, *S. enterica* et *S. pneumoniae* ; et le triplex du projet principal de thèse pour les arbovirus Zika, Dengue et Chikungunya.
- Le suivi en temps réel des réactions nous a permis de démontrer la quantitativité de la réaction LAMP sur papier. Nous proposons un concept de dispositif dans lequel une gamme de réaction est réalisée en parallèle d'une réaction test en deux pipetages, ce qui amènerait le quantitatif sur le terrain.

- Notre travail sur la rt-LAMP laisse à penser que d'autres réactions de biologie moléculaire sont adaptables au papier. Les derniers travaux de Keith Pardee montrant qu'il est possible sur du papier de réaliser des réactions complexes de biologie synthétique, incluant la régulation, l'expression de gènes et la transcription de protéines en dehors des cellules (*cell-free synthetic biology*) [90] confirment cette hypothèse. Ainsi, les protocoles développés ici pourraient servir pour d'autres applications et méthodes de détection.

Chapitre 3

Détecter plusieurs cibles sur un même disque : multiplexer la rt-LAMP.

Contents

3.1	Matériels et méthodes	81
3.1.1	Design des amorces QUASR	81
3.1.2	Mélange réactionnel	83
3.1.3	Analyse des résultats	84
3.2	Adapter la (rt-)LAMP QUASR sur papier	85
3.2.1	Spécificité de la (rt-)LAMP QUASR.	85
3.2.2	A propos du quencher.	89
3.2.3	Intensité du signal QUASR.	89
3.3	Développement du multiplexage QUASR.	90
3.3.1	Première preuve de concept d'un duplex QUASR.	91
3.3.2	QUASR bicolore.	92
3.3.3	Evaluation des sensibilité/spécificité de la méthode QUASR.	93
3.4	Multiplexer les rt-LAMP QUASR Zika, Dengue et Chikungunya sur papier.	95
3.4.1	Spécificité des rt-LAMP QUASR DENV-U, ZIKV et CHIKV.	95
3.4.2	Appariement des duplex QUASR.	97
3.4.3	Ajout d'un contrôle : le problème des doubles positifs	98
3.4.4	Réalisation du multiplex QUASR.	104

APRÈS avoir adapté la réaction rt-LAMP au papier, nous nous sommes penchés sur le mode de lecture du test. En effet, dans le cas d'un dispositif de terrain, il est essentiel que la lecture du test soit facile et nécessite peu de matériel. La puissance du signal fournie par l'agent intercalant est difficile à observer à l'œil nu ou avec une simple caméra de smartphone.

Plusieurs méthodes alternatives (décrites au chapitre 1 en section 1.1.2 page 23) ont été testées pour améliorer l'intensité du signal et faciliter la lecture du test, notamment l'utilisation de la calcéine et de méthodes colorimétriques (crystal violet, pH..). Ces méthodes, tout comme l'agent intercalant, renseignent sur la présence ou l'absence d'amplification mais ne renseignent pas sur le type de cible amplifiée. Il est donc impossible de différencier une amplification standard d'une amplification non spécifique. Sur le terrain, les conditions ne sont pas aussi contrôlées et reproductibles qu'en laboratoire. Des variations de température d'amplification, de conservation des réactifs pourraient affecter la spécificité de la réaction. La mise en place d'une méthode de détection sélective est donc intéressante.

Parmi les méthodes de détections sélectives, employant pour la plupart des sondes oligonucléotidiques et la technique FRET (cf section 1.1.2) nous avons choisi d'adapter la méthode QUASR récemment publiée [13]. Les principaux avantages de cette méthode sont les suivants :

- Comme précisé plus haut, elle est plus spécifique que les méthodes "classiques" (intercalants, calcéine ou turbidimétrie). Son signal n'est associé qu'à l'implication d'une seule des six amorces dans l'amplification. Si l'amorce QUASR est bien choisie, cela permet d'éviter des faux positifs.
- Le signal produit est intense et peut être visualisé à l'œil nu, ou avec une simple caméra de smartphone.
- La détection est spécifique, ce qui diminue le risque de faux positif.
- Le signal produit peut être observé "à froid" plusieurs jours après avoir réalisé le test. C'est un argument en faveur de la simplicité d'utilisation sur le terrain.
- Enfin et surtout, la méthode permet de multiplexer plusieurs réactions dans un même tube, en associant chaque réaction à un fluorophore différent. On pourrait donc dépasser les capacités de multiplexage "physique".

Dans ce chapitre, nous adaptons pour la première fois sur papier la méthode de détection QUASR, récemment développée en tube. Nous démontrons, grâce à cette méthode, la faisabilité du multiplexage sur un même disque et développons un test multiplex QUASR Zika/Dengue/Chikungunya sur papier.

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Design des amorces QUASR

Principe. Le protocole de design des amorces QUASR est adapté de la publication de Ball et al. [13].

Pour un jeu d'amorce LAMP donné, on sélectionne l'amorce QUASR la plus appropriée, en se basant sur deux critères :

- Parmi les amorces FIP, BIP, LF et LB, on recherche celle qui est la moins susceptible d'être impliquée dans une amplification non spécifique (due à la formation de boucles au sein de l'amorce ou à l'hybridation des amorces entre elles).
- L'amorce QUASR doit pouvoir s'hybrider avec un quencher à basse température.

Étapes d'analyse. Les logiciels *Multiple Primer Analyser* de ThermoFisher Scientific¹ et *UNAFold Tool* de Integrated DNA Technologies² sont utilisés l'un après l'autre pour déterminer l'amorce la plus appropriée parmi les quatre amorces FIP/BIP et LF/LB d'un jeu donné.

1. Le logiciel *Multiple Primer Analyser* est employé pour rechercher les homo et hétéro-dimères formés entre les amorces d'un jeu. Parmi les quatre amorces FIP/BIP et LF/LB, on rejette toute amorce formant des dimères amplifiables, c.-à-d. impliquant plus de 4 nucléotides à l'extrémité 3' d'une des amorces. De tels dimères pourraient être à l'origine d'amplifications non spécifiques.
2. Le logiciel *UNAFold Tool* (paramètres par défauts, excepté la concentration en Mg^{2+} fixée à 4mM) est utilisé pour rechercher les boucles formées par les amorces. On rejette toute amorce formant une boucle amplifiable, c.-à-d. impliquant des nucléotides à l'extrémité 3' de l'amorce.
3. Enfin, on évalue grâce à *UNAFold Tool* l'adaptabilité des amorces à la méthode QUASR. Parmi les candidats restant, les amorces ne formant pas de boucle impliquant la partie 5' et possédant une T_m supérieure à 45°C, sont sélectionnées. L'hybridation entre l'amorce QUASR et son quencher, ne sera ainsi pas entravée par la formation d'une boucle à la partie 5' de l'amorce.

Cas de la rt-LAMP CHIKV : La figure 3.1 illustre la démarche pour le jeu d'amorces de la rt-LAMP CHIKV. Le logiciel *Multiple Primer Analyser* détecte un hétéro-dimère amplifiable entre les amorces B3 et FIP. Le logiciel *UNAFold Tool* détecte deux boucles

1. <https://www.thermoFisher.com/fr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>

2. <https://eu.idtdna.com/UNAFold%3F>

amplifiables pour les amorces FIP et BIP. On rejette alors les amorces FIP et BIP. Les deux amorces restantes, LF et LB forment des boucles à leur partie 5', dont les T_m sont respectivement 45,1°C et 40,8°C. On choisit donc l'amorce LB, dont la boucle a la plus basse T_m , comme amorce QUASR.

1. Multiple Primer Analyser Tool :

CHIKV_FIP with CHIKV B3
 5-GGCCGCTTTAGCTGTTCTGACCA TACGAAGTACACCAG->
 ||||| |||||
 <-AGACTCTGAGAATGGTACGA-5

2. UNAFold Tool :

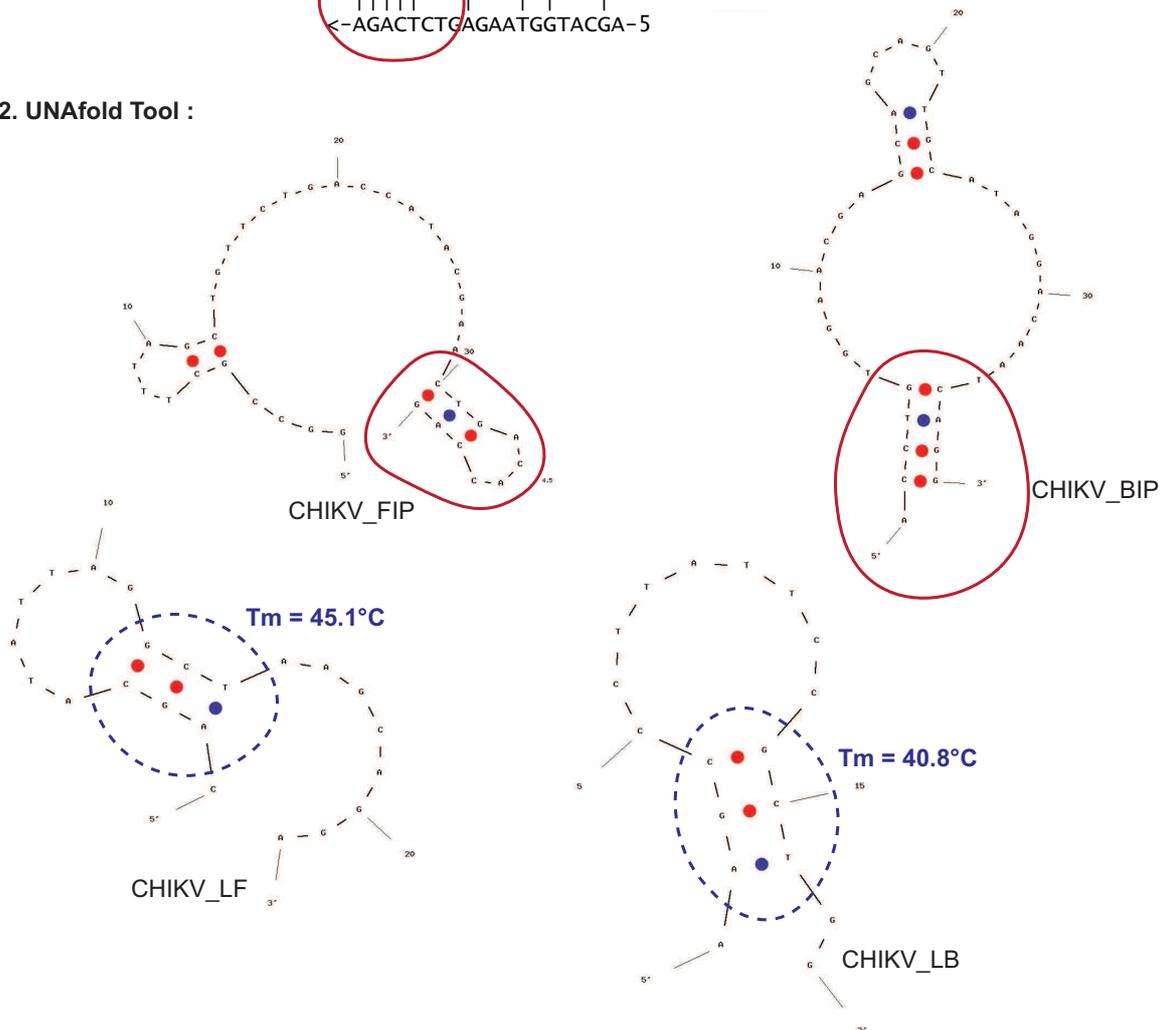


FIGURE 3.1 – Sélection de l'amorce QUASR de la LAMP CHIKV grâce aux logiciels *Multiple Primer Analyser* de Thermofisher Scientific et *UNAFold Tool* de Integrated DNA Technologies. En rouge sont entourés les dimères et boucles amplifiables, en pointillé bleu, les boucles impliquant la partie 5' des amorces, associées à leur T_m .

Quenchers La longueur des quenchers est déterminée en fonction de leur T_m avec les amorces QUASR (par le logiciel *OligoAnalyser Tool*³). On design par défaut un quencher

3. Integrated DNA technologies website : <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer/>

composé de 10 nt, qui sera raccourci en 5' si besoin jusqu'à avoir une T_m inférieure à 40°C.

Dans les faits on se procure systématiquement des brins quencher de 10bp car c'est la plus petite taille d'oligos modifiés que l'on peut commander chez le fournisseur *Integrated DNA Technologies*. On modifie simplement l'extrémité 5' du quencher de manière à former des *mismatches* avec l'amorce QUASR.

Exemple : Pour le quencher de la LAMP QUASR DENV-3, le complément inverse des 10 premiers nucléotides désigné par défaut possède une T_m de 50°C. On lui préfère un quencher de 8 nucléotide seulement, possédant une T_m de 36°C. On commande alors un quencher de 10 nucléotide, dont les deux dernières bases à l'extrémité 5' sont identiques aux bases de l'amorce QUASR. Elles ne participent pas à l'hybridation entre le primer et le quencher, ce qui permet d'obtenir un T_m bas.

F/ACGACGGAGCTACAGGCAGAAGAAGTCAGGCCCAAA	DENV-3/FIP-FAM
	
Q/TGCTGCCTGC	DENV-3/FIP-quencher

Couple fluorophore/quencher Les amorces QUASR modifiées en 5' par l'ajout d'un fluorophore doivent être associées à des quenchers correspondants à la gamme de longueur d'onde d'émission du fluorophore (par ex. Iowa Black® FQ dans le cas d'un fluorophore FAM, et Iowa Black® RQ dans le cas d'un fluorophore Texas Red).

Remarque. Les amorces F3 et B3 ne sont pas sélectionnées comme amorces QUASR car elles ne sont pas impliquées dans l'amplification de la structure *dumbbell*, qui produit la majeure partie des amplicons. De plus, leur concentration dans le mélange réactionnel est plus faible, ce qui diminuerait le signal QUASR.

Durant le travail de thèse, plusieurs amorces QUASR ont été désignées, et sont répertoriées en annexe 6.9.

3.1.2 Mélange réactionnel

Les protocoles de mélanges réactionnels sont identiques à ceux des (rt-)LAMP avec agent intercalant. L'amorce QUASR remplace son homologue dans le mélange d'amorce et on ajoute le quencher à une concentration 1,5x supérieure à celle de son amorce QUASR (0,6 μM pour les quenchers LF/LB et 1,2 μM pour les quenchers FIP/BIP).

3.1.3 Analyse des résultats

Analyse des mesures QUASR

Une image est acquise à 20°C, avant de lancer la réaction (à $t = 0$ min) et une image est acquise à 20°C, après l'amplification (à $t = 60$ min). On pré-traite les images comme mentionné en section 2.1.10. L'analyse d'image des (rt-)LAMP QUASR se fait par soustraction de l'intensité moyenne du disque au temps t_0 à l'intensité moyenne du disque au temps final, par défaut t_{60} . La figure 3.2 illustre la manière dont les données sont traitées.

On présentera donc en général l'intensité $I(t_{60})-I(t_0)$ (figure 3.2.a,b,c), qui représente le signal généré par la sonde QUASR, et les images des disques à t_{60} associée à la couleur du fluorophore QUASR utilisé (figure 3.2.d).

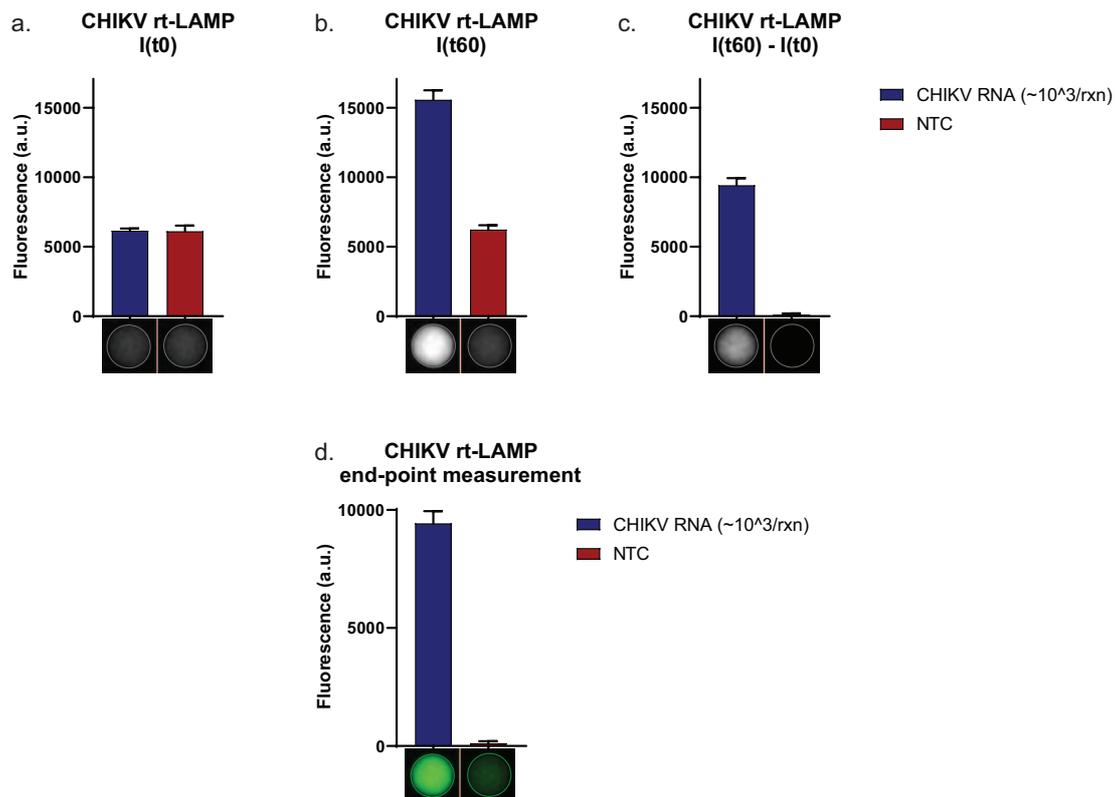


FIGURE 3.2 – rt-LAMP chikungunya (a) Intensité moyenne et image à t_0 (b) Intensité moyenne et image à t_{60} (c) soustraction de t_0 à t_{60} et soustraction des images. (d) Présentation du même résultat suivant la charte du manuscrit : Graphique représentant la soustraction des intensités $t_{60}-t_0$, accolé à l'image d'un des disques à t_{60} , coloré selon le fluorophore QUASR utilisé.

3.2 Adapter la (rt-)LAMP QUASR sur papier

Nous adaptons dans cette section la (rt-)LAMP QUASR sur papier, et étudions les propriétés principales de cette nouvelle méthode de détection.

Suivant le protocole décrit en section 3.1.1, on sélectionne les amorces QUASR les plus appropriés pour les jeux d'amorces ZIKV, CHIKV, DENV-U et les quatre jeux DENV sérotype-spécifiques. On en déduit le quencher correspondant, de 10nt par défaut, adaptable en fonction de la température d'hybridation (c.f. 3.1.1). Les amorces et quencher utilisés sont rassemblés en table 3.1.

Species	QUASR Primer	Sequence	Quencher sequence
DENV-1	LB	<u>F</u> /ATGAGACCAATGTTGCTGT	TTGGTCTCAT/ <u>Q</u>
DENV-2	BIP	<u>F</u> /CAAACGAGATGGGTTTCTGGATTGCTGGGTTGTAATGCTT	ATCTCGTTTG/ <u>Q</u>
DENV-3	FIP	<u>F</u> /ACGACGGAGCTACAGGCAGAAAGAAGTCAAGCCCAAA	TCCGTCGT/ <u>Q</u>
DENV-4	LB	<u>F</u> /CTGTACCGCTGGCATATTG	ACGCGTACAG/ <u>Q</u>
DENV	LB	<u>F</u> /CAGAGATCCTGCTGTCTC	GGATCTCTG/ <u>Q</u>
CHIKV	LB	<u>F</u> /AAGCCCTTATTCCGCTGG	ATAAGGGCTT/ <u>Q</u>
ZIKV	FIP	<u>F</u> /TTGCAITGCCACCGCATAGTACAGTGGAGGTACAG	GGACATGCAA/ <u>Q</u>

TABLE 3.1 – Liste des amorces QUASR choisies et des quencher associés pour les rt-LAMP DENV spécifiques, DENV universelle, CHIKV et ZIKV. les "F/" symbolisent la place du fluorophore en 5' de l'amorce choisie. Les "/Q" symbolisent la place du quencher en 3' du brin quencher

Preuve de concept. Les premières expériences se feront en LAMP en utilisant l'ADNc de ZIKV, DENV et CHIKV, pour plus de simplicité. En figure 3.3, une LAMP CHIKV QUASR est réalisée. le primer CHIKV LB est associé à un fluorophores FAM et on ajoute un quencher au mélange d'amorces. Deux mesures dans le canal de fluorescence FAM, à 0 minutes (t_0) et à 60 minutes (t_{60}), sont réalisées lorsque la plaque est à 20°C (figure 3.3.b et d) et on ajoute aussi au mélange réactionnel un intercalant SYTO82, permettant de suivre la réaction en temps réel dans le canal Texas Red (figure 3.3.a et c). Le signal fluorescent observé dans le canal FAM pour le disque contrôle positif indique que la réaction d'amplification a eu lieu, impliquant l'amorce LB. Cette première expérience démontre la faisabilité de la méthode QUASR sur papier.

Les caractéristiques de la (rt-)LAMP QUASR sur papier sont étudiées, et font l'objet des sous-sections suivantes.

3.2.1 Spécificité de la (rt-)LAMP QUASR.

Cas de la rt-LAMP CHIKV QUASR. La spécificité d'une LAMP QUASR dépend de l'implication de l'amorce QUASR dans une éventuelle amplification non spécifique. Le protocole décrit en section 3.1.1 nous permet de sélectionner *in silico* l'amorce la

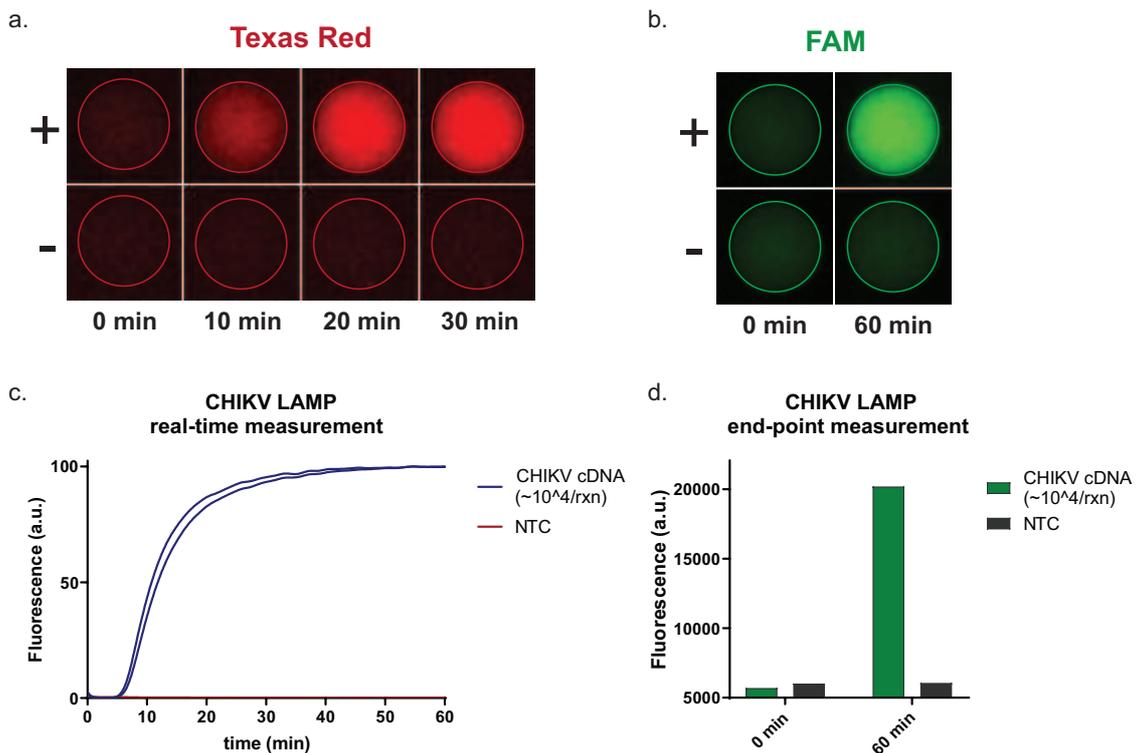


FIGURE 3.3 – LAMP CHIKV, cDNA CHIKV, (a) et (c) images et uivi de la réaction en temps réel par SYTO82 (b) et (d) Images et mesure QUASR FAM en point final.

plus "sûre". La figure 3.1 résume les démarches réalisées pour choisir l'amorce QUASR de la rt-LAMP CHIKV. Pour ce jeu, l'amorce LB semble être la plus appropriée. Au contraire, l'amorce FIP semble être peu appropriée car formant des dimères et des boucles amplifiables. Pour vérifier ces hypothèse, on compare expérimentalement les deux amorces CHIKV QUASR, LB et FIP.

Dans les conditions standard, les deux rt-LAMP CHIKV QUASR sont comparables (figure 3.4.a et b.), La cinétique d'amplification est comparable (mTt_{50} de 22,4 min et 22,9 min), on n'observe pas d'amplification non spécifique en SYTO82 comme en mesure QUASR.

L'expérience précédente est répétée en fixant la concentration en MgSO₄ à 6mM. De cette manière, on cherche à provoquer des amplifications non spécifiques dans les contrôles négatifs, et observer l'implication des amorces QUASR dans ces amplifications non spécifiques. Des amplifications non spécifiques ont lieu dans les contrôles négatifs, deux pour la rt-LAMP QUASR-LB, et une sur deux pour la rt-LAMP QUASR-FIP (figure 3.4.c). La mesure QUASR ne montre aucun signal dans les deux disques contrôle négatifs de rt-LAMP QUASR-LB, signe que l'amorce LB n'a pas été impliquées dans les amplifications non spécifiques. on observe cependant un fort signal QUASR dans le disque contrôle

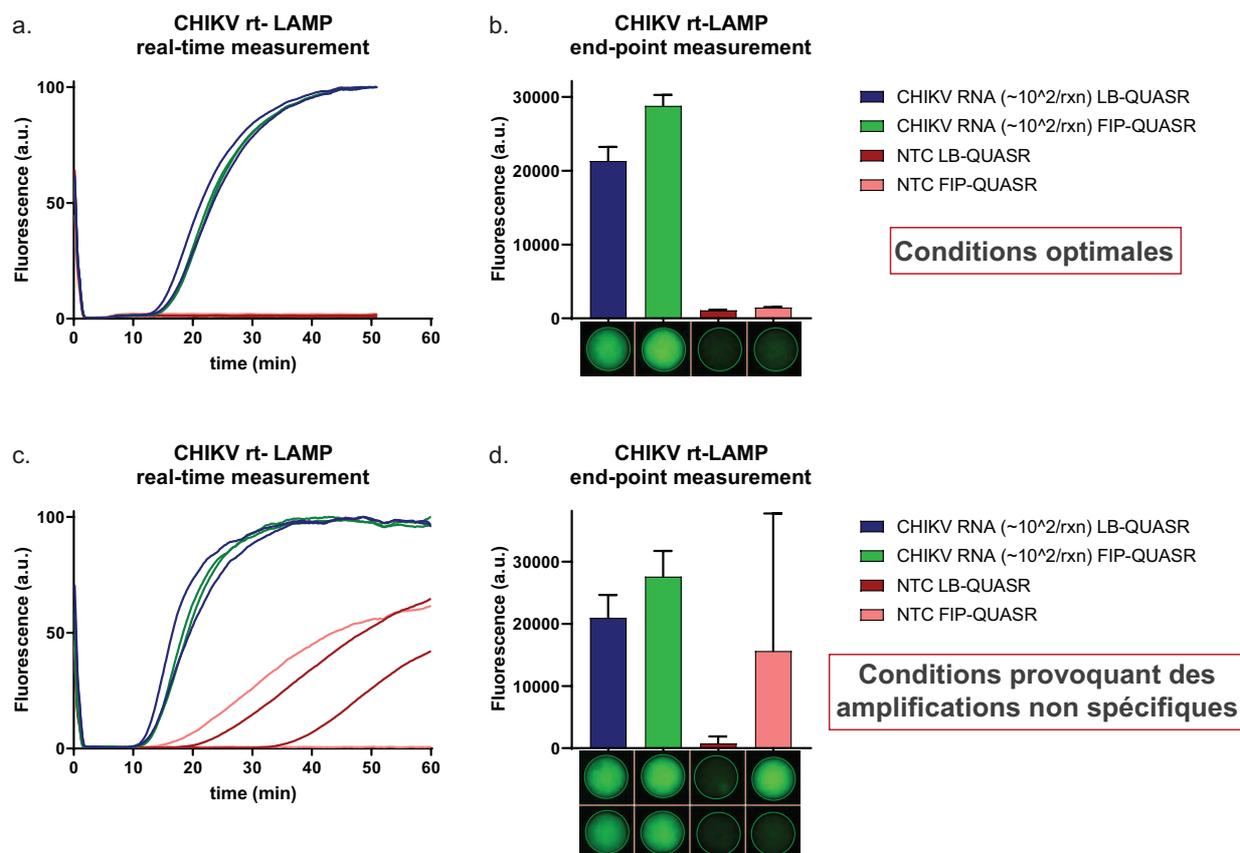


FIGURE 3.4 – Comparaison entre les amorces QUASR LB et FIP pour la rt-LAMP CHIKV. (a) rt-LAMP CHIKV, 3mM de $MgSO_4$, Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82. (*suite à une erreur de manipulation, l'amplification n'a duré que 50 min*) (b) Mesure QUASR FAM en point final. (c) rt-LAMP CHIKV, 6mM de $MgSO_4$, Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82. (d) Mesure QUASR FAM en point final.

négatif rt-LAMP QUASR-FIP amplifié, signe que l'amorce FIP a été impliquée dans l'amplification non spécifique.

Dans le cas de la rt-LAMP CHIKV, l'amorce LB est donc plus adaptée à la méthode QUASR que l'amorce FIP.

Un séquençage des produits d'amplification pourrait nous aider ici à confirmer le mécanisme avancé. Nous pourrions ainsi observer si ce sont les boucles et dimères de l'amorce FIP observés *in silico* en figure 3.1 qui sont à l'origine des amplifications non spécifique de cette expérience.

rt-LAMP QUASR DENV-1 et DENV-4. Durant le développement des rt-LAMP QUASR DENV sérotype-spécifiques, d'autres expériences illustrant la spécificité des amorces QUASR sont réalisées. Les rt-LAMP QUASR DENV-1 et DENV-4 sont ici prises comme exemple de LAMP QUASR resp. peu spécifiques et très spécifiques.

Les rt-LAMP QUASR DENV-1 en figure 3.5.a nous montre un grand nombre d'amplification non spécifique des ARN de DENV-2, 3 et 4 et du contrôle négatif. Ces faux

positifs sont visible pour les trois premiers en figure 3.5.b dans le canal FAM, signe que l'amorce QUASR (ici l'amorce LB) a été impliquée dans l'amplification non spécifique des l'ARN de DENV-2, 3 et 4 mais pas dans celle du contrôle négatif.

La rt-LAMP QUASR DENV-4 en figure 3.5.c nous montre aussi un grand nombre d'amplification non spécifiques des ARN de DENV-1, 2 et 3 et du contrôle négatif. Ces faux positifs ne sont pas visibles en figure 3.5.d dans le canal FAM, signe que l'amorce QUASR (ici l'amorce BIP) n'a été impliqués dans aucune des amplifications non spécifiques.

Dans le cas de la rt-LAMP DENV-1, L'amorce LB n'est pas un bon candidat d'amorce QUASR. En effet, cette amorce semble être souvent impliquée lors d'amplifications non spécifiques. Cependant, dans le cas de la rt-LAMP DENV-4, l'amorce BIP semble être un excellent candidat d'amorce QUASR. Elle semble n'être pas impliquée lors d'amplifications non spécifiques.

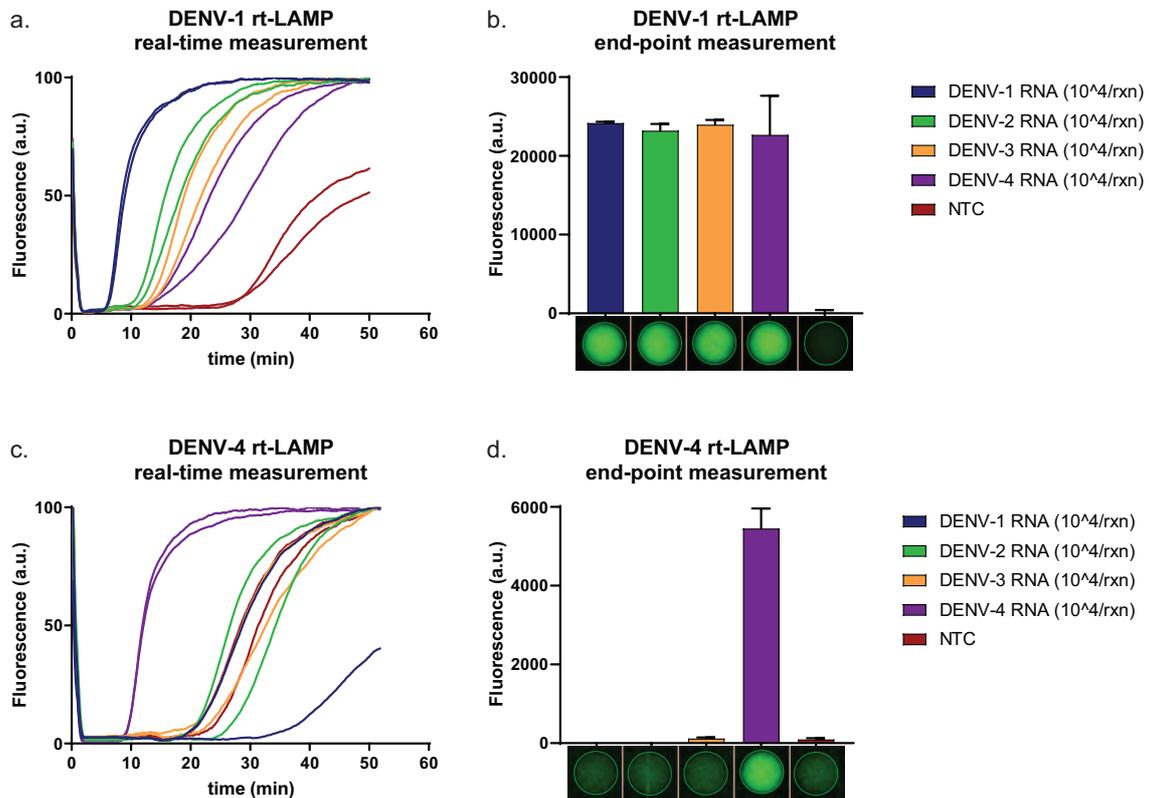


FIGURE 3.5 – Spécificité de la méthode QUASR. rt-LAMP QUASR DENV-1, ARN de DENV-1, 2, 3 et 4 (a) Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82. (b) Mesure QUASR FAM en point final. (c) rt-LAMP QUASR DENV-4, ARN de DENV-1, 2, 3 et 4. Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82. (d) Mesure QUASR FAM en point final.

L'exemple de la rt-LAMP DENV-4 illustre bien l'avantage que peut avoir la méthode QUASR par rapport à un suivi classique par intercalant : on gagne en spécificité. La sélection et la validation de l'amorce demande cependant une étude préalable.

3.2.2 A propos du quencher.

L'influence de la T_m du quencher a été étudié pour l'optimisation de la LAMP QUASR DENV-3. Comme mentionné plus haut en section 3.1.1, le quencher par défaut de 10 nucléotide possède une T_m élevé de 50°C . On compare alors deux quenchers pour cette LAMP QUASR. Un quencher de 10 nucléotides et un quencher de 8 nucléotides possédant une T_m de 36°C .

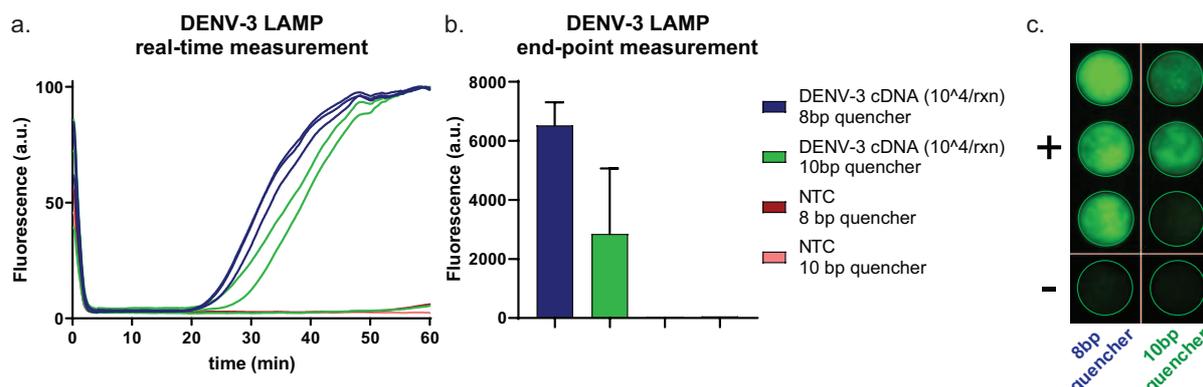


FIGURE 3.6 – LAMP QUASR DENV-3, ADNc de DENV-3, variation de la taille du quencher QUASR. (a) Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82 (b) Mesure QUASR FAM en point final (c) images associées.)

La réaction d'amplification LAMP QUASR réalisé avec le quencher de 8 nucléotides est plus rapide qu'avec le quencher de 10 nucléotide (mTt_{50} de 32,2 min et 37,6 min pour resp. 8 et 10 nt). Cela s'explique par le fait qu'une partie des quenchers de 10 nucléotides s'hybrident avec leur amorce QUASR durant la réaction, limitant l'implication de celles-ci. De plus, parmi les réactions réalisées avec le quencher de 10 nt, une expérience sur les trois ne montre aucun signe d'amplification.

Des expériences additionnelles sont nécessaires pour comprendre plus en détail le ralentissement et le manque de reproductibilité de la LAMP au quencher de 10 nucléotides. Il semble cependant que la T_m du quencher joue un rôle important sur la cinétique et la sensibilité de la réaction LAMP QUASR. Ces phénomènes, ainsi que la continuité entre la fonction QUASR et la fonction DARQ [31] sont étudiés plus en détail par Ball. et all [13] et sont en accord avec notre résultat préliminaire. Nous choisirons d'utiliser le quencher de 8 nucléotides pour la LAMP QUASR DENV-3.

3.2.3 Intensité du signal QUASR.

L'intensité du signal QUASR varie principalement en fonction de deux paramètres : la concentration en amorce QUASR et le type de fluorophore associé.

Concentration de l'amorce QUASR. La concentration des amorces FIP/BIP (0,8 μM) étant le double de celle des amorces LF/LB (0,4 μM), les LAMP QUASR associées au amorces FIP/BIP sont généralement plus intense. Ainsi, la figure 3.7.a compare les intensités de signal brut à t60, $I(t60)$ des QUASR CHIKV FIP et CHIKV LB. On peut observer que le signal moyen du QUASR FIP positif est environ 30% fois plus important que celui du QUASR LB positif. Cet effet est moindre pour les contrôles négatifs, ce qui confère au QUASR FIP un ratio brut signal/bruit légèrement supérieur (2,5 pour FIP contre 2,2 pour LB)

Fluorophore associé. l'intensité du signal produit par la LAMP QUASR associée au fluorophore Texas Red est supérieure à celle associée au fluorophore FAM. La figure 3.7.b compare les $I(t60)$ des QUASR ZIKV FAM et ZIKV Texas Red (pour la même amorce FIP). On peut observer que le signal moyen du QUASR Texas Red positif est environ 3 fois supérieure au signal moyen du QUASR FAM positif. Le ratio brut signal/bruit du QUASR Texas Red est bien meilleur (5,5 pour Texas Red contre 2,3 pour FAM). Dans le but d'obtenir un signal le plus puissant possible, d'autres fluorophores pourraient être testés (Alexa, Cy3, Cy5, etc)

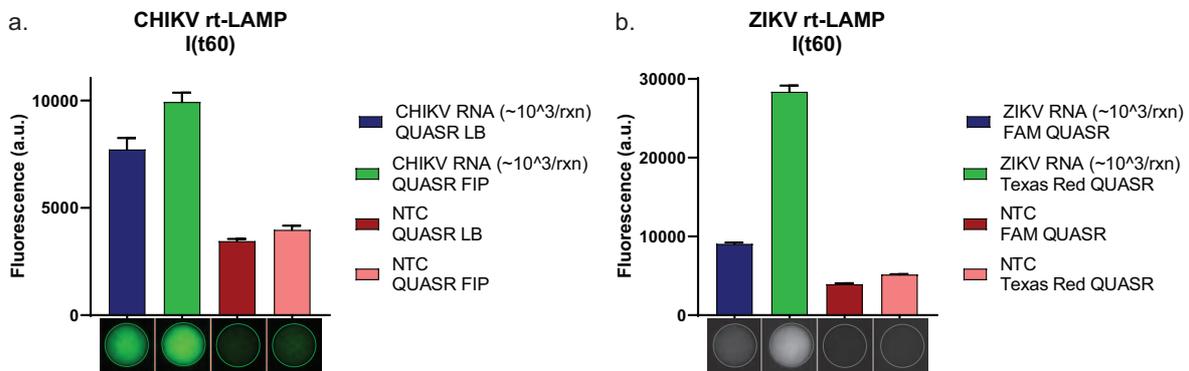


FIGURE 3.7 – Comparaisons des intensités de signal brut $I(t60)$ pour différentes LAMP QUASR. (a) rt-LAMP QUASR CHIKV, ARN de CHIKV et NTC, $I(t60)$ des QUASR LB et FIP (b) rt-LAMP QUASR ZIKV, ARN de ZIKV et NTC, $I(t60)$ des QUASR Texas Red et FAM.

3.3 Développement du multiplexage QUASR.

Comme mentionné dans l'introduction de ce chapitre, la méthode QUASR permet de réaliser plusieurs test LAMP en un seul tube, en associant un fluorophore différent à l'amorce QUASR de chaque jeu.

Dans cette section sont réalisés les premiers tests de multiplexage QUASR. Leurs sensibilités et spécificités sont comparées à la LAMP standard.

3.3.1 Première preuve de concept d'un duplex QUASR.

La possibilité d'un duplexe QUASR entre les LAMP ZIKV et CHIKV est étudiée en utilisant les jeux de LAMP QUASR disponibles alors au laboratoire, associés au même fluorophore (FAM). Ainsi, deux mélanges réactionnels distincts sont préparés :

- Un mélange réactionnel contenant les amorces CHIKV QUASR et les amorces ZIKV standard.
- Un mélange réactionnel contenant les amorces ZIKV QUASR et les amorces CHIKV standard.

Les concentrations habituelles sont conservées pour chaque jeu d'amorces, doublant la concentration totale (on passe de 2,8 μM à 5,2 μM d'amorces au total). En regard des recommandations pour les mélanges d'amorces concentrés évoqués en section 2.3.4 (6,4 μM au total), on se situe dans des conditions de bon fonctionnement de la réaction LAMP.

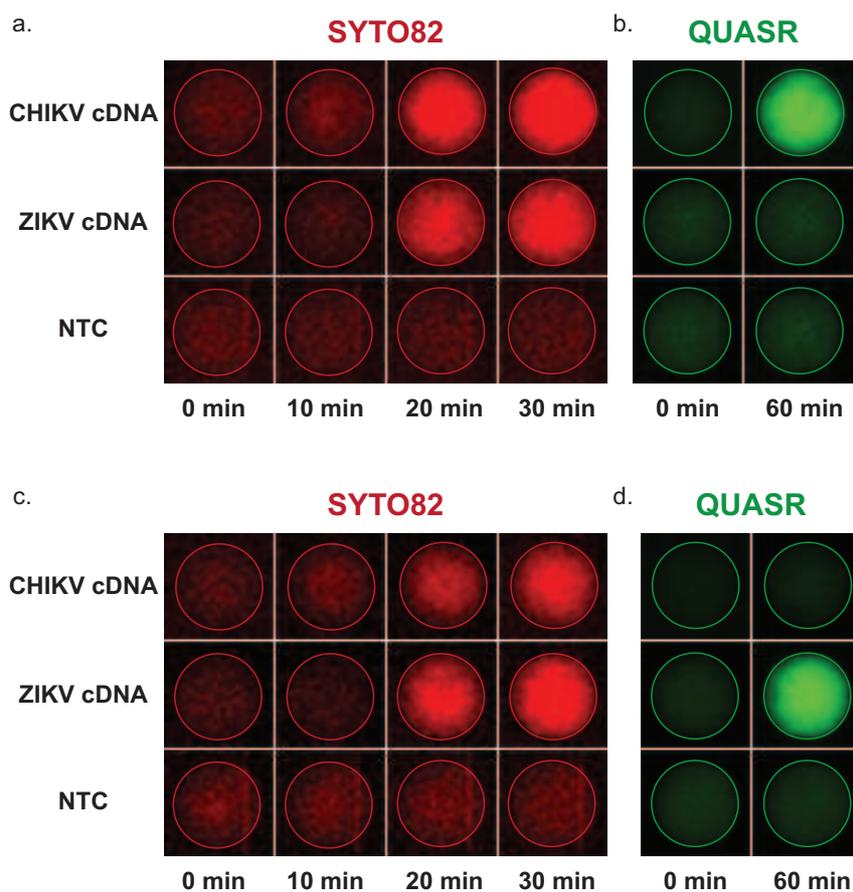


FIGURE 3.8 – Première approche du multiplexage QUASR pour les LAMP ZIKV et CHIKV. (a) LAMP duplex contenant les amorces CHIKV QUASR et ZIKV standard, ADNc de CHIKV, ZIKV et NTC. Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82 et mesure QUASR FAM en point final (b) LAMP duplex contenant les amorces ZIKV QUASR et CHIKV standard, ADNc de CHIKV, ZIKV et NTC. Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82 et mesure QUASR FAM en point final.

Pour ces deux mélanges réactionnels, on observe grâce à l'agent intercalant une amplification sur les disques contenant les ADNc de CHIKV et de ZIKV, mais pas d'amplification dans le disque contrôle négatif (figure 3.8.a et c). Les mesures QUASR FAM pour le premier mélange réactionnel montrent une amplification seulement dans le disque contenant l'ADNc de CHIKV (figure 3.8.b). Les mesures QUASR FAM pour le second mélange réactionnel montrent une amplification seulement dans le disque contenant l'ADNc de ZIKV (figure 3.8.d).

Ce premier résultat suggère la faisabilité d'une LAMP QUASR duplex CHIKV/ZIKV.

3.3.2 QUASR bicolore.

En utilisant une amorce QUASR ZIKV (FIP) associée au fluorophore Texas Red, un premier test de multiplexage QUASR bicolore est réalisé. A l'inverse des expériences précédentes, la cinétique de réaction ne peut pas être suivie par le biais d'un agent intercalant car les deux canaux de fluorescence sont utilisés pour les mesures QUASR de chacune des deux LAMP.

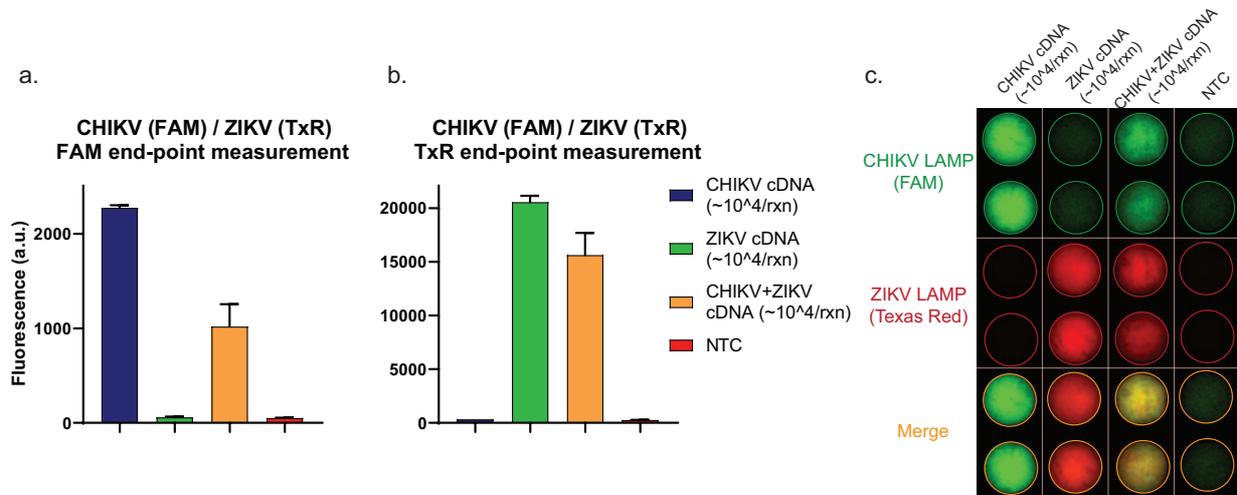


FIGURE 3.9 – Multiplexage des LAMP CHIKV QUASR (canal FAM) et ZIKV QUASR (canal Texas Red)

Les mesures en point final dans la canal FAM (figure 3.9.a) et Texas Red (figure 3.9.b) démontrent la spécificité de la LAMP QUASR duplex CHIKV/ZIKV.

On observe dans les disques double-positifs (contenant à la fois l'ADNc de CHIKV et ZIKV) une diminution du signal QUASR pour les deux cibles. La compétition entre les deux réactions lorsqu'elles se produisent simultanément (notamment en réactifs "consommables" comme les dNTPs) pourrait induire une moindre synthèse d'amplicon et expliquer cette diminution de signal QUASR.

3.3.3 Evaluation des sensibilité/spécificité de la méthode QUASR.

On évalue la sensibilité et la spécificité d'une rt-LAMP QUASR et d'une rt-LAMP QUASR duplex.

On compare alors les performances de :

1. la rt-LAMP CHIKV standard (amorces de CHIKV standard)
2. la rt-LAMP CHIKV QUASR (amorces de CHIKV QUASR)
3. la rt-LAMP CHIKV QUASR en condition de duplex (amorces de CHIKV QUASR+ZIKV standard)

L'ARN de CHIKV quantifié en RT-qPCR à la CIBU, est dilué à 100, 10 et 5 copies/ μ L (ce qui, à raison de 4 μ L/réaction donne 400, 40 et 20 copies/réaction).

Sensibilité. Dans chaque conditions, les trois concentrations d'ARN de CHIKV sont amplifiées en une quinzaine de minutes (figure 3.10). Les cinétiques d'amplifications sont comparables entre les trois conditions (11,9/14,3/16,7 min ; 12,7/14,9/16,9 min ; 11,0/14,0/16,0 ; pour les $mTt50$ respectifs des amorces CHIKV, CHIKV QUASR et CHIKV QUASR+ZIKV). Cela indique que l'utilisation de la méthode QUASR et l'addition d'un jeu d'amorces pour réaliser une LAMP duplex n'affecte pas la cinétique et la sensibilité de la réaction.

Spécificité. Des amplifications non spécifiques ont lieu dans les disques contrôles négatifs dans les trois conditions. Leur cinétiques sont comparables. Il ne semble donc pas que l'ajout de la méthode QUASR et du multiplexage diminue la spécificité de la rt-LAMP. De plus, Les mesures QUASR en point finale pour les rt-LAMP réalisées avec les amorces CHIKV QUASR ne reflètent pas d'amplification non spécifiques. L'ajout du jeu d'amorce ZIKV n'affecte donc pas la spécificité de la rt-LAMP CHIKV QUASR.

<i>La rt-LAMP CHIKV QUASR demeure donc sensible (20 brins/réaction) et spécifique en présence d'autres amorces dans le mélange réactionnel.</i>

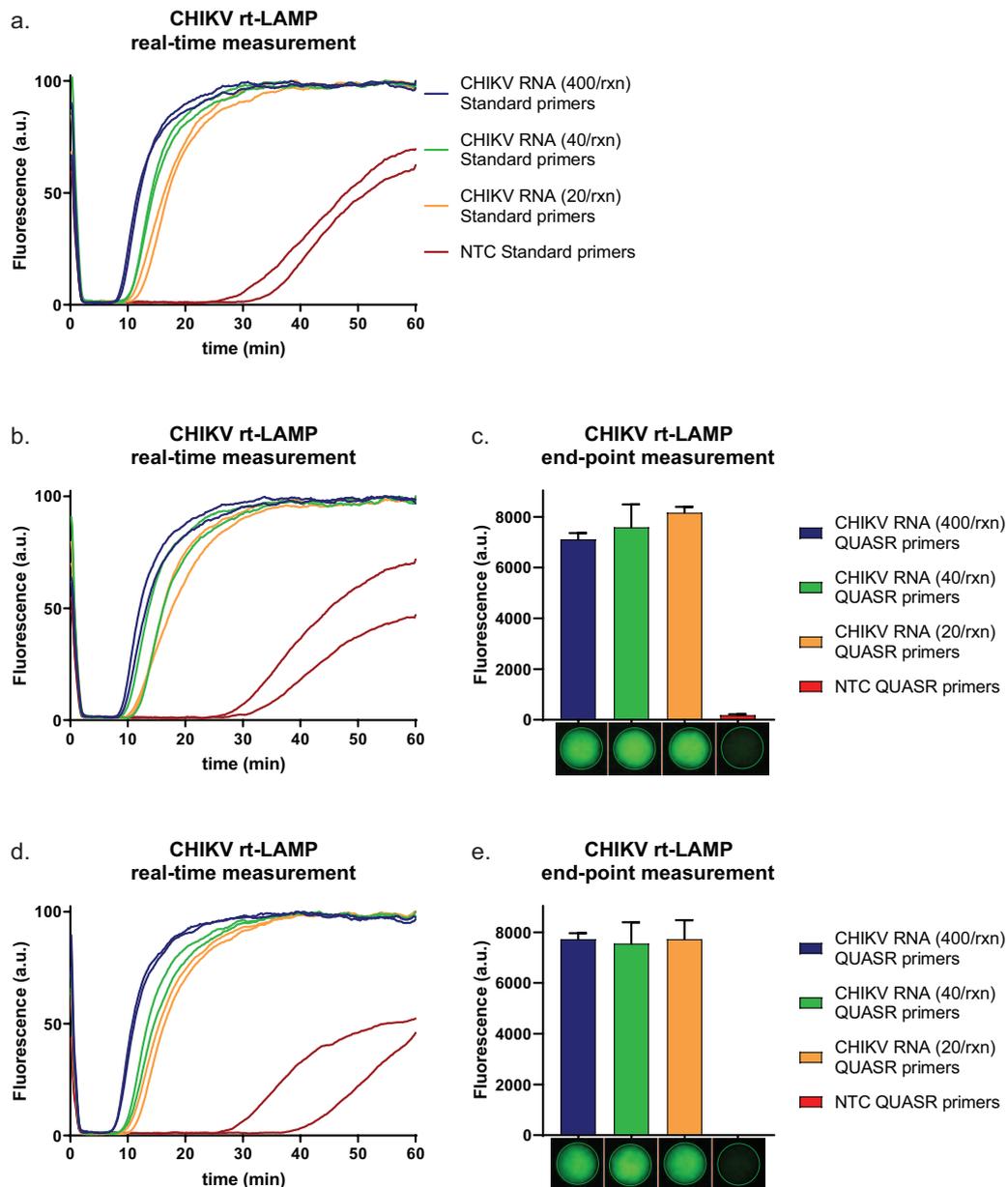


FIGURE 3.10 – Comparaison des cinétiques et sensibilités de différents jeux d’amorces de rt-LAMP CHIKV (a) rt-LAMP CHIKV, amorces rt-LAMP CHIKV standard. Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82. (b) rt-LAMP CHIKV, amorces rt-LAMP CHIKV QUASR. Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82. (c) Mesure QUASR FAM en point final. (d) rt-LAMP CHIKV, amorces rt-LAMP CHIKV QUASR + ZIKV standard. Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82. (e) Mesure QUASR FAM en point final.

3.4 Multiplexer les rt-LAMP QUASR Zika, Dengue et Chikungunya sur papier.



FIGURE 3.11 – Schéma d'un dispositif Zika/Dengue/Chikungunya

Suivant l'objectif principal du travail de thèse, le multiplexage des rt-LAMP QUASR DENV-U, ZIKV et CHIKV est envisagé. Notre but est de réaliser un système à deux disques permettant de multiplexer ces trois tests et d'y ajouter une (rt-)LAMP contrôle positif. Deux de ces trois tests se dérouleraient dans un des disques, le troisième test et la réaction contrôle positif dans le second disque.

N.B. : Ce dispositif de terrain aurait pour premier lieu d'application l'île de la Réunion, où la détection des virus Zika, Chikungunya et Dengue constitue un enjeu de santé publique. La récente épidémie de Dengue-2 (DENV-2) en 2019 à la Réunion nous a poussé à nous concentrer sur la détection de DENV-2 par la rt-LAMP Dengue universelle (DENV-U).

Après s'être assuré que ces trois rt-LAMP QUASR sont spécifiques, on étudiera la mise en place de duplex QUASR deux à deux, ainsi que l'ajout d'un contrôle positif QUASR.

3.4.1 Spécificité des rt-LAMP QUASR DENV-U, ZIKV et CHIKV.

La première tâche consiste à s'assurer de la spécificité de ces trois jeux d'amorces et du bon fonctionnement de la méthode QUASR. Au vu des précédentes cinétiques de réactions, et pour gagner du temps expérimental, on réalise des amplifications de 45 min seulement. Chaque jeu d'amorce est donc testé avec les 6 ARN de DENV-1 à 4, ZIKV et CHIKV.

La rt-LAMP QUASR DENV-U détecte uniquement les 4 sérotypes, le signal QUASR (ici en Texas Red) est bien spécifique (figure 3.12.a et b).

La rt-LAMP QUASR ZIKV détecte uniquement l'ARN de ZIKV. Le signal QUASR est la aussi spécifique (malgré un léger bruit de fond dans un des disques contenant l'ARN de DENV-3).

La rt-LAMP QUASR CHIKV détecte uniquement l'ARN de CHIKV. Le signal QUASR est la aussi spécifique.

Alors même que les concentrations en ARN sont environs dix fois supérieures, on observe que les cinétiques d'amplifications de la rt-LAMP DENV-U sont relativement plus lentes

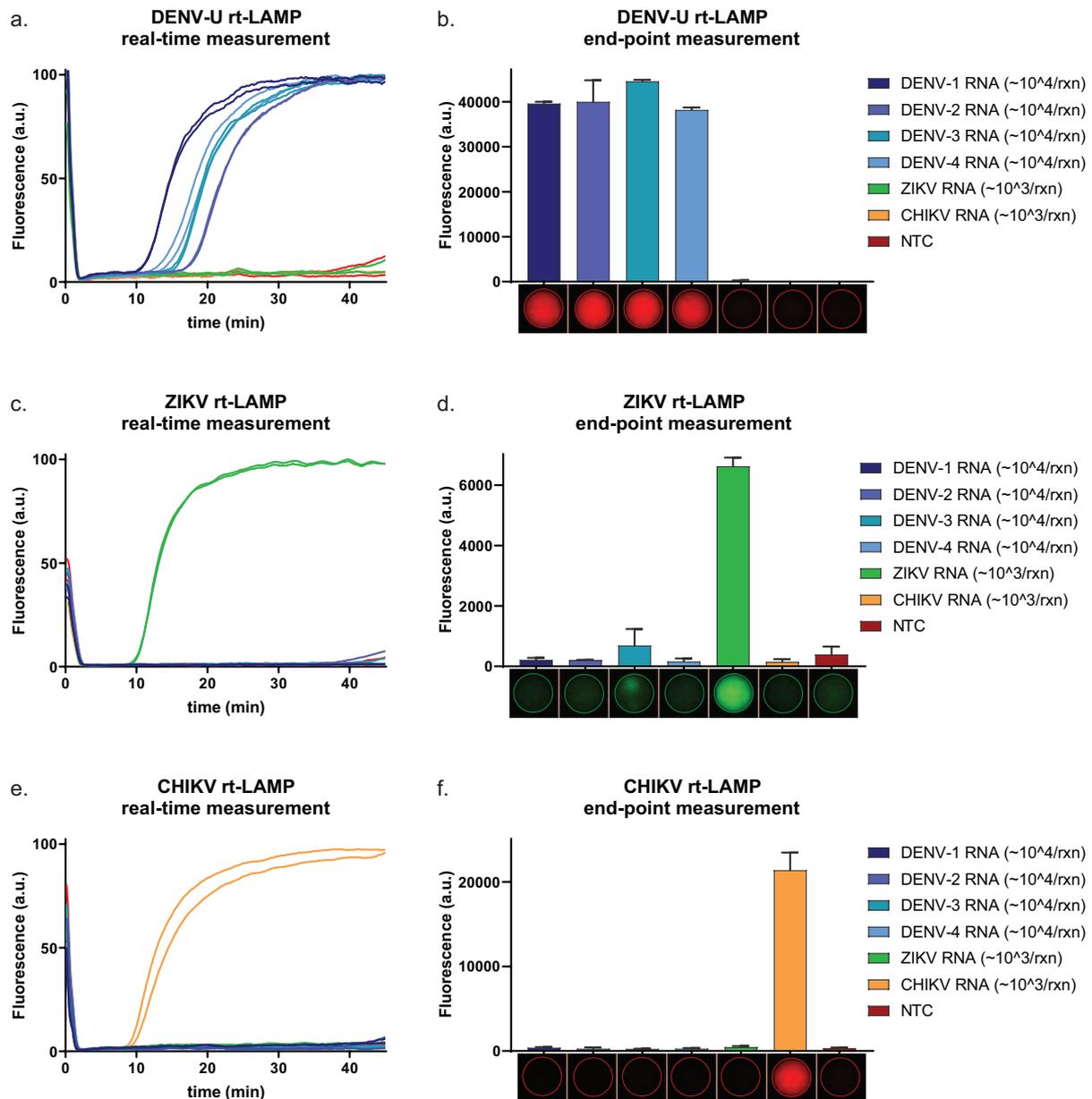


FIGURE 3.12 – Spécificité des rt-LAMP QUASR DENV-U, ZIKV et CHIKV. (a) rt-LAMP DENV-U, ARN de DENV-1 à 4, ZIKV et CHIKV. Suivi de la réaction en temps réel par SYTO9 (b) Mesure QUASR Texas Red en point final (c) rt-LAMP ZIKV, ARN de DENV-1 à 4, ZIKV et CHIKV. Suivi de la réaction en temps réel par SYTO82 (d) Mesure QUASR FAM en point final (e) rt-LAMP CHIKV, ARN de DENV-1 à 4, ZIKV et CHIKV. Suivi de la réaction en temps réel par SYTO9 (f) Mesure QUASR Texas Red en point final.

que les cinétiques des rt-LAMP ZIKV et CHIKV (mTt_{50} de 14,8 min, 22,05 min, 19,6 min et 18,9 pour les amplification de DENV-1 à 4 contre 13,1 et 13,7 min pour les amplifications de ZIKV et CHIKV).

Cette faible vitesse de réaction de la rt-LAMP DENV-U nous pousse à conserver une durée d'amplification de 45 min. Elle s'explique probablement par le design complexe de cette rt-LAMP pan-sérotype à 9 amorces, permettant plusieurs scénarios d'amplifi-

cations. Le fait que la rt-LAMP DENV-U ne comporte qu'une seule amorce Loop (LB), pourrait aussi participer à la différence de vitesse d'amplification. En effet les amorces Loop (LF/LB), accélèrent fortement la réaction [20].

3.4.2 Appariement des duplex QUASR.

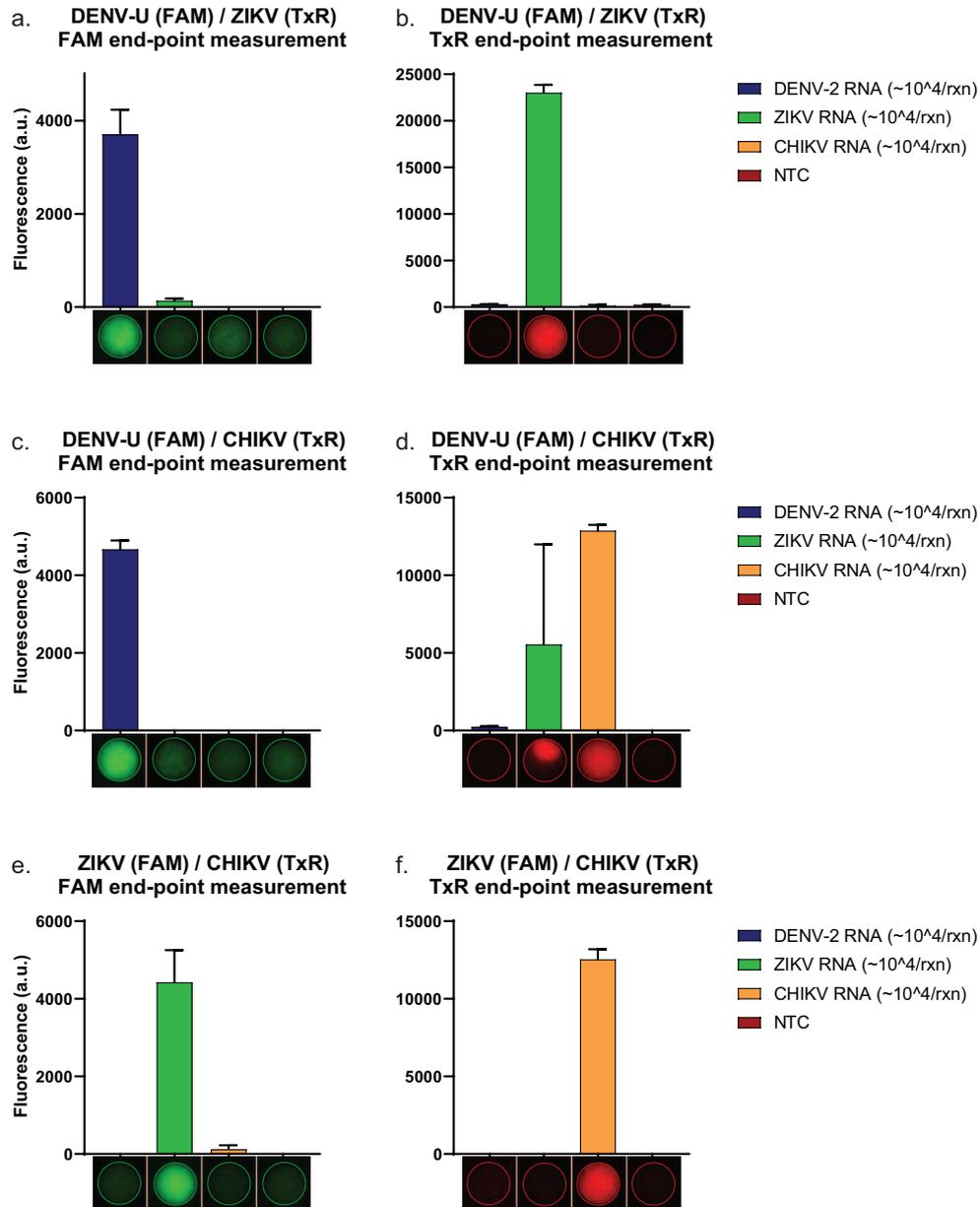


FIGURE 3.13 – rt-LAMP des trois duplexes QUASR (a) DENV-U(FAM)/ZIKV(Texas Red), Canal FAM (b)DENV-U(FAM)/ZIKV(Texas Red), Canal Texas Red (c) DENV-U(FAM)/CHIKV(Texas Red), Canal FAM (d)DENV-U(FAM)/CHIKV(Texas Red), Canal Texas Red (e) ZIKV(FAM)/CHIKV(Texas Red), Canal FAM (f)ZIKV(FAM)/CHIKV(Texas Red), Canal Texas Red

Une fois vérifié la spécificité des trois rt-LAMP, les trois duplex possibles sont testés.

On vérifie pour chacun d'eux la détection de leurs cibles respectives et l'absence d'amplification non spécifique lorsqu'ils sont confrontés au troisième pathogène ou à un contrôle négatif :

- le duplex DENV-U/ZIKV est spécifique, aucune amplification non spécifique n'est visible en présence d'ARN de CHIKV (figure 4.5.a et b).
- le duplex DENV-U/CHIKV amplifie correctement ses cibles mais on observe une amplification non spécifique impliquant l'amorce QUASR CHIKV en présence d'ARN de ZIKV (figure 4.5.c et d).
- le duplex ZIKV/CHIKV est spécifique, aucune amplification non spécifique n'est visible en présence d'ARN de DENV (ici DENV-2) (figure 4.5.e et f).

Le duplex DENV-U/ZIKV est choisi, il est spécifique et montre une bonne reproductibilité au fur des répétitions d'expériences. On cherche maintenant à coupler la troisième rt-LAMP, CHIKV, à une (rt-)LAMP contrôle positif.

3.4.3 Ajout d'un contrôle : le problème des doubles positifs

Ajout du contrôle positif rt-LAMP Sigmavirus Notre première idée est de coupler la rt-LAMP CHIKV QUASR avec la rt-LAMP Sigmavirus. Le Sigmavirus est un virus à ARN infectant les diptères (par ex. les mouches), et il est utilisé en routine à la CIBU comme contrôle positif d'extraction. Il pourrait être inclus dans l'échantillon (par exemple lyophilisé au préalable dans le tube de lyse) et sa détection nous assurerait que toute la procédure (extraction et amplification) s'est déroulée convenablement. Nos premières expériences visent donc à coupler les rt-LAMP CHIKV et Sigmavirus. Après analyse, on choisi l'amorce FIP comme amorce QUASR de la rt-LAMP Sigmavirus.

Le duplex CHIKV/Sigmavirus est testé en présence des trois ARN de DENV-2, ZIKV et CHIKV et en ajoutant systématiquement de l'ARN de Sigmavirus au mélange réactionnel. La rt-LAMP CHIKV demeure sensible et spécifique (figure 3.14.a). On observe la bonne amplification du Sigmavirus en présence d'ARN de DENV-2, de ZIKV et dans le disque contrôle négatif, mais une absence d'amplification en présence d'ARN de CHIKV (figure 3.14.b).

Cette absence d'amplification rappelle la diminution de signal QUASR observée lors de la réalisation de double positifs ZIKV/CHIKV en figure 3.9. Il est probable que cette absence d'amplification soit due à une compétition entre les deux rt-LAMP pour les réactifs. La rt-LAMP CHIKV se déroule plus rapidement et consomme tous les dNTPs présents dans le mélange réactionnels. L'amplification de l'ARN de Sigmavirus ne peut donc pas avoir lieu.

Pour permettre les deux amplifications simultanées (figure 3.14.c et d), les quantités de dNTPs et d'enzyme polymérase sont augmentées. La condition A correspond au protocole

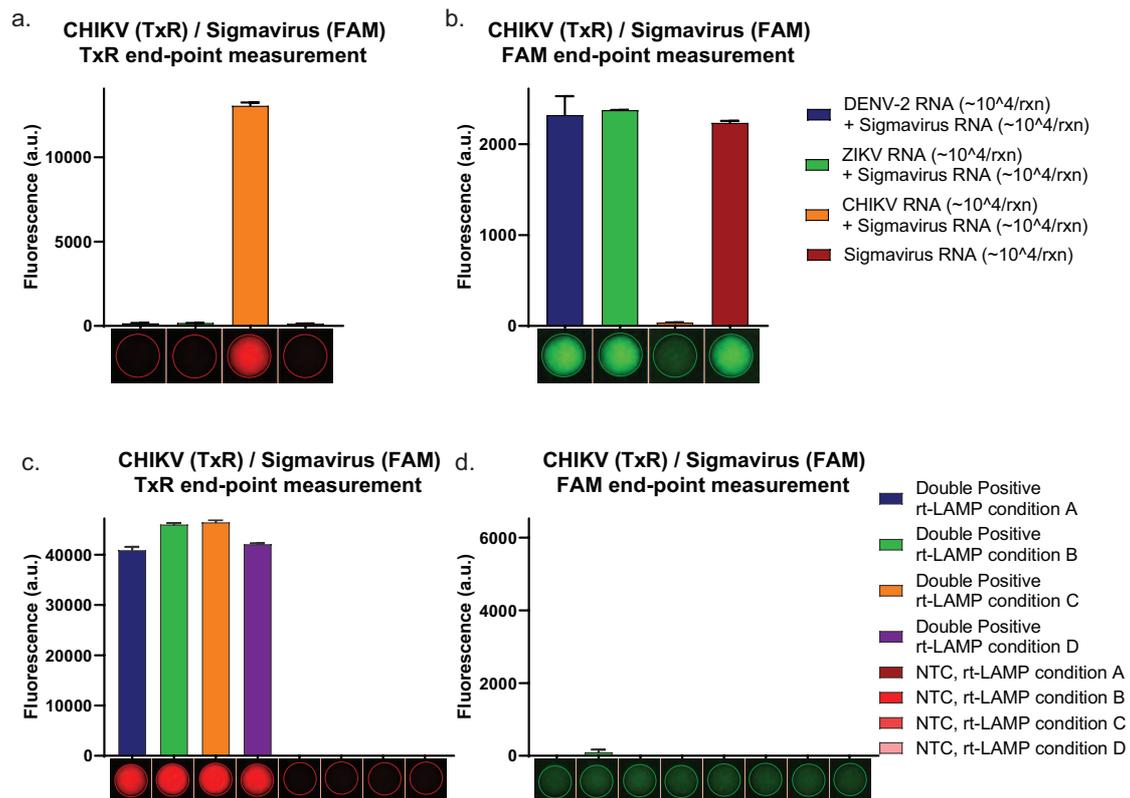


FIGURE 3.14 – Ajout d’un contrôle positif Sigmavirus : (rt-)LAMP QUASR CHIKV/Sigmavirus (a) et (c) CHIKV(Texas Red)/Sigmavirus(FAM), Canal Texas Red (b) et (d) CHIKV(Texas Red)/Sigmavirus(FAM), Canal FAM, Condition A : 0,4 mM each dNTPs, 0,4 U/μL GspSSD 2.0, 4 mM MgSO₄; Condition B : 0,7 mM each dNTPs, 0,4 U/μL GspSSD, 4,5 mM MgSO₄ 2.0; Condition C : 0,4 mM each dNTPs, 0,6 U/μL GspSSD 2.0, 4 mM MgSO₄; Condition D : 0,7 mM each dNTPs, 0,6 U/μL GspSSD 2.0, 4,5 mM MgSO₄

standard (0,4 mM de chaque dNTP, 0,4 U/μL de polymérase). On augmente les quantité de dNTPs dans les conditions B et D (0.7mM dNTPs), et on augmente la quantité de polymérase dans les conditions C et D (0,6 U/μL). Malgré ces modifications, apportant plus de réactifs et d’enzymes, seule la rt-LAMP CHIKV montre une amplification.

Les limites de temps de développement du projet nous poussent à mettre de côté le contrôle positif par rt-LAMP Sigmavirus et tenter d’adapter d’autres LAMP plus rapides, en contrôle positifs.

LAMP S. enterica et S. aureus Deux duplex QUASR entre la rt-LAMP CHIKV et les LAMP S. enterica et S. aureus sont réalisés. On teste pour chacun la condition double positive, qui fait défaut dans le duplex CHIKV/Sigmavirus.

Le duplex CHIKV/S. enterica ne montre pas d’amplification simultanée en présence des deux cibles (figure 3.15.a). De plus, des amplifications non spécifiques ont lieu dans le disque contrôle négatif du duplex (impliquant l’amorce QUASR S. enterica). A l’inverse, le duplex CHIKV/S. aureus montre une amplification simultanée en présence des deux

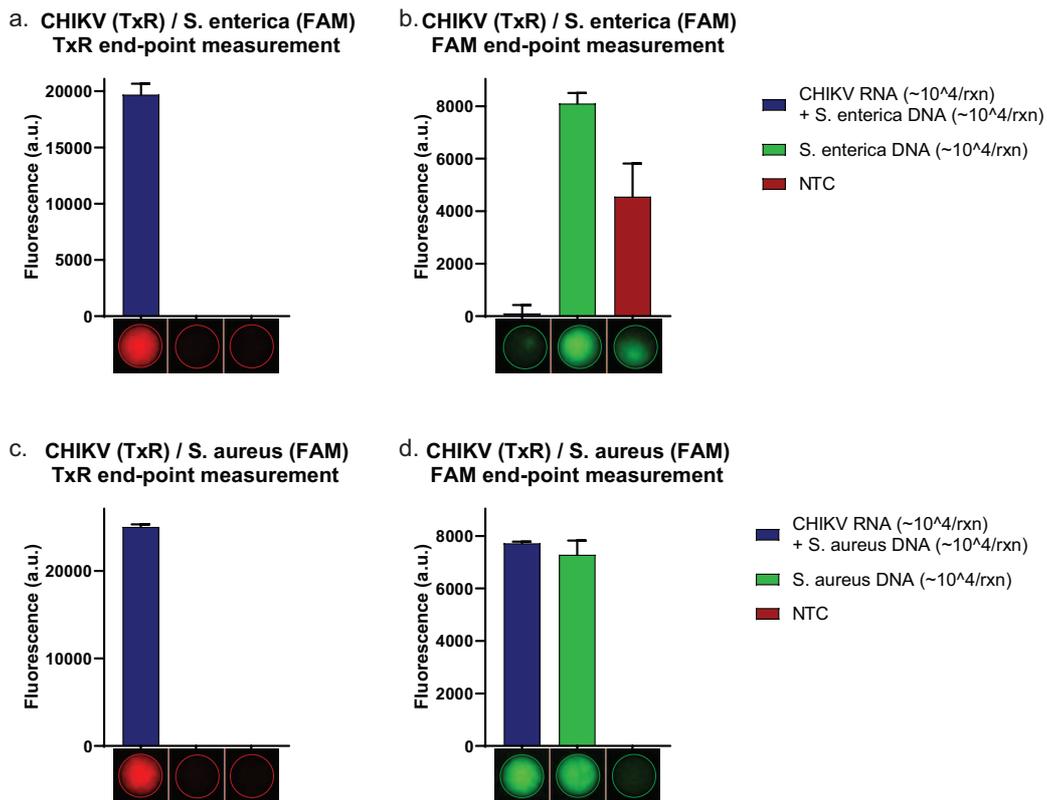


FIGURE 3.15 – Ajout d’un contrôle positif LAMP *S. enterica* ou *S. aureus*. (a) CHIKV(Texas Red)/*S. enterica*(FAM), Canal Texas Red (b) CHIKV(Texas Red)/*S. enterica*(FAM), Canal FAM (c) CHIKV(Texas Red)/*S. aureus*(FAM), Canal Texas Red (d) CHIKV(Texas Red)/*S. aureus*(FAM), Canal FAM.

cibles et pas d’amplification non spécifique dans le disque contrôle négatif (figure 3.15.c et d).

La LAMP *S. aureus* semble donc être un bon candidat pour jouer le rôle de contrôle positif en duplex avec la rt-LAMP CHIKV. De l’ADN de *S. aureus* serait alors lyophilisé dans le disque avec les réactifs rt-LAMP, et amplifié au lancement du test pour valider le bon fonctionnement du dispositif.

Influence de la concentration des deux cibles Bien que cela soit un avantage pour sa vitesse de détection, le fait que la réaction LAMP soit très rapide et consomme une grande quantité de réactifs apparaît ici comme un désavantage pour la détection de deux cibles simultanément dans un même disque. On étudie alors plus en détail dans le cas de notre duplex CHIKV/*S. aureus* l’influence de la concentration respective de chaque cible.

La concentration en ADN de *S. aureus* est fixée à 10 fois la limite de détection de la LAMP *S. aureus* (100 CFU/rxn). La concentration en ARN de CHIKV varie de 400 à 20 brins/rxn, des concentrations normalement au dessus du seuil de détection (cf figure 3.10).

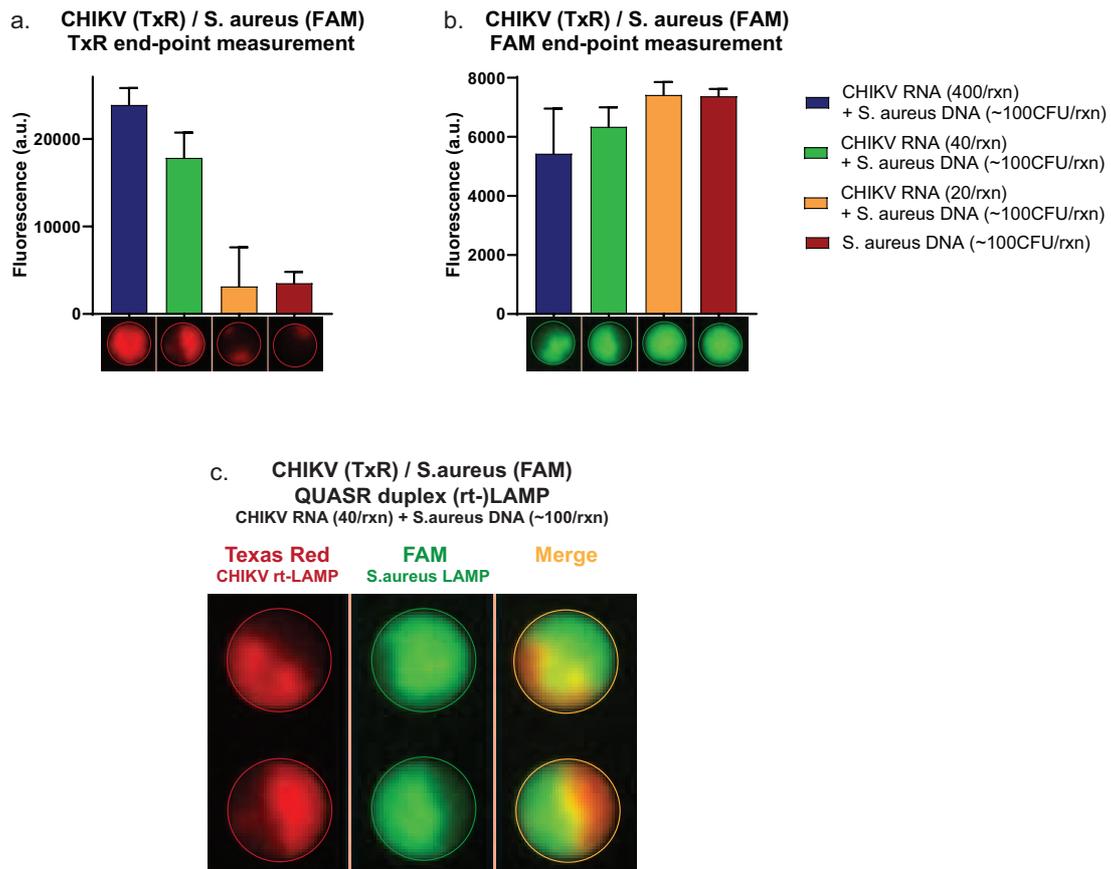


FIGURE 3.16 – Optimisation du duplex QUASR CHIKV/S. aureus, limite de détection en condition double positive. (a) CHIKV(Texas Red)/S. aureus(FAM), Canal Texas Red (b) CHIKV(Texas Red)/S. aureus(FAM), Canal FAM (c) image des disques à t60 pour la condition : 40 brins/rxn d'ARN de CHIKV, 100 CFU/rxn de S.aureus.

Du fait de l'amplification de l'ADN de S. aureus par la LAMP S. aureus, on observe une difficulté de la rt-LAMP CHIKV à détecter 40 brins d'ARN/réaction. Le signal QUASR est diminué n'est pas uniforme sur les disques. A 20 brins d'ARN/réaction, il n'y a plus de signal QUASR pour la rt-LAMP CHIKV (figure 3.16.a).

De même, la LAMP S aureus est affectée par l'amplification de la rt-LAMP CHIKV et possède une signal QUASR plus intense à faible quantité ou sans ARN de CHIKV (figure 3.16.b).

La deuxième condition (40 brins d'ARN/réaction de CHIKV et 100 CFU/réaction de S. aureus) est intéressante. Il semble que les cinétiques de réaction des deux LAMP sont de même ordre et on observe en signal QUASR un partage physique des disques en deux zones, privilégiant l'une ou l'autre des amplifications. Ce cas particulier illustre bien la compétition entre les deux LAMP pour les réactifs présents sur le "territoire" du disque. Le fait que les concentrations en ARN/ADN cible soient assez proches des limites de détection joue un rôle, car on n'observe pas ce phénomène en figure 3.15.c et d. ou les concentrations en CHIKV et S. aureus sont de 10^4 /réaction.

A des concentrations élevées, un grand nombre de brins cible vont initier des amplifications LAMP en tous points du disque, impliquant des amorces QUASR en tout point du disque, et on observe donc une répartition homogène du signal. A plus faible concentration, seulement quelques brins vont initier des amplifications, qui vont diffuser et d'étendre en partant de leur point d'initiation. En s'étendant, elles consomment les dNTPs du volume environnant et empêchent une autre amplification d'avoir lieu au même endroit dans le disque.

Il semblerait donc que les doubles positifs sont détectés seulement si les deux LAMP ont des cinétiques semblables et que les cibles sont présentes en quantité suffisante (~ 10 fois la limite de détection).

étude du double positif DENV-U/ZIKV. Dans le cas de la détection de co-infections, si les réactions sont multiplexées sur un même disque, la situation est analogue à celle évoquée plus haut. On se penche alors sur le duplex DENV-U/ZIKV pour étudier la situation de double positif.

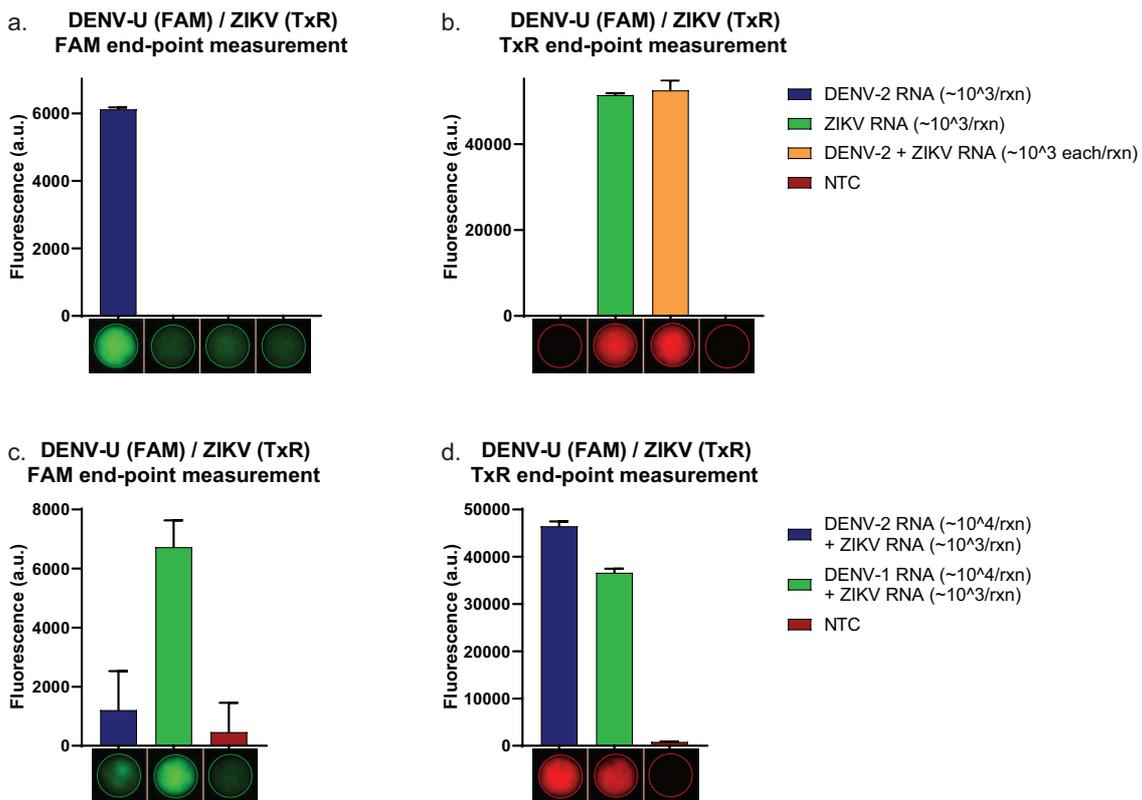


FIGURE 3.17 – Etude du double positif pour le duplex QUSAR DENV-U/ZIKV.

Une première série d'expérience est réalisée, pour tester la double amplification en présence d'ARN de DENV-2 et de ZIKV (figure 3.17.a et b). En présence des deux cibles, seule l'amplification de ZIKV a lieu. La rt-LAMP DENV-U est en effet plus lente, et spécialement pour l'amplification du sérotype 2 (cf figure 3.12.a). Une deuxième série

d'expérience est alors réalisée, en augmentant la quantité d'ARN de DENV-2 (10^4 /rxn) et en testant la double amplification en présence de DENV-1, qui présente une amplification plus rapide (cf figure 3.12.a). L'ARN de DENV-2 n'est toujours pas amplifié mais en présence d'ARN de DENV-1, on observe une double amplification.

Ce résultat suggère là encore que la cinétique des deux réactions joue un rôle important sur leur occurrence simultanée. Il nous informe aussi qu'en l'état actuel, notre test serait en difficulté pour détecter la présence des deux virus DENV-2 et ZIKV dans un même échantillon. Or, des cas de co-infection Dengue/Zika ont été reportés dans la littérature, notamment au Brésil, durant une récente épidémie de Zika dans la région de Sao José do rio Preto, où la Dengue est endémique [120]. Sur 1254 patients suspectés d'une infection à un arbovirus, 286 patients étaient porteurs de la dengue (DENV-1 et DENV-2 principalement) et 12 de ces patients (4%) étaient co-infectés par le virus Zika. Dans cette situation particulière (contexte d'épidémie de Zika sur fond de dengue endémique), notre test serait, en l'état, en difficulté pour détecter ces co-infections Dengue/Zika.

3.4.4 Réalisation du multiplex QUASR.

Le développement du test est aboutit dans sa forme duplex QUASR, DENV-U/ZIKV ; CHIKV/Ctrl+. La LAMP *S. aureus* est utilisée comme contrôle positif et on ajoute de l'ADN de *S. aureus* dans chaque mélange réactionnel (~500CFU/rxn). Les expériences suivantes sont réalisées pour illustrer et confirmer les spécificités des deux duplex QUASR (figure 3.18).

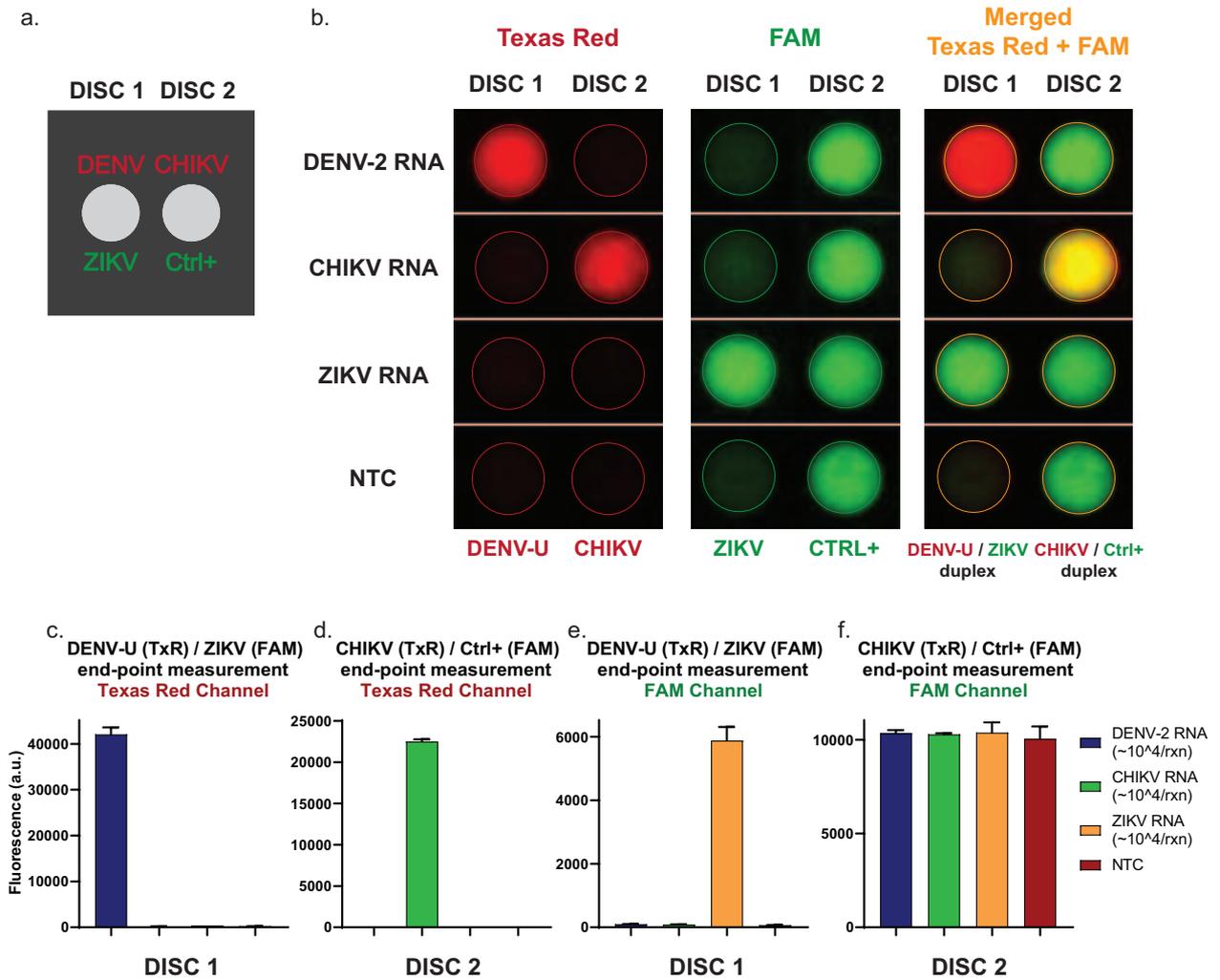


FIGURE 3.18 – Multiplex rt-LAMP QUASR Dengue/Zika/Chikungunya. (a) Schéma décrivant le dispositif à deux disques. (b) images des disques 1 (Dengue/Zika) et 2 (Chikungunya/Ctrl+) à t60, canaux Texas Red et FAM séparés et canaux Texas Red et FAM superposés. (c) Disque 1, DENV-U(Texas Red)/ZIKV(FAM) Canal Texas Red (d) Disque 2, CHIKV(Texas Red)/CTRL+(*S. aureus*) Canal Texas Red (e) Disque 1, DENV-U(Texas Red)/ZIKV(FAM) Canal FAM (f) Disque 2, CHIKV(Texas Red)/CTRL+(*S. aureus*)(FAM) Canal FAM.

On observe dans le premier duplex un signal QUASR Texas Red uniquement en présence d'ARN de DENV, et un signal QUASR FAM uniquement en présence d'ARN de ZIKV (figure 3.18.a,c et d). On observe dans le deuxième duplex un signal QUASR Texas

Red uniquement en présence d'ARN de CHIKV, et un signal QUASR FAM dans toutes les réactions, dû à la présence systématique d'ADN de *S. aureus* (figure 3.18.a,e et f).

Les images des deux canaux de fluorescence sont superposés en figures 3.18.b, illustrant les quatre aspects possibles du test pour la détection de chaque pathogène.

Les multiplex rt-LAMP QUASR Dengue/Zika et Chikungunya/Ctrl+ (*S. aureus*) sont donc tous deux spécifiques.

Ce qu'il faut retenir.

- La technologie QUASR a été adaptée à notre système papier, permettant le multiplexage des tests Zika/Dengue/Chikungunya et d'un contrôle positif sur deux disques.
- Le signal QUASR est intense, visible à l'oeil nu ou avec une simple caméra de smartphone. le test est lu en fin de réaction, "à froid", il peut être stocké à température ambiante et être lu plusieurs jours après utilisation du test.
- Le duplex des tests LAMP a plusieurs avantages.
 - Tout d'abord, il permet d'économiser les réactifs, n'utilisant qu'un seul mélange réactionnel pour deux tests. Une réaction rt-LAMP dans notre dispositif papier au laboratoire coûte environ 1€10 (figure en annexe), 85% du coût étant imputable aux enzymes et dNTPs. Ainsi, une réaction rt-LAMP en duplex ne coûte que 60 centimes par cible. Ce prix pourrait encore diminuer dans le cas d'une production plus massive, permettant l'achat des réactifs à bas coût.
 - Le multiplexage dans un disque permet aussi d'économiser l'échantillon et donc de gagner en sensibilité. Dans le cas d'un système comportant un volet de capture (comme décrit au chapitre 4), les ARN capturés sont répartis dans deux disques seulement (au lieu de quatre si on ne réalise pas de multiplexage), doublant ainsi la sensibilité du dispositif.
- Nous avons pointé un phénomène de compétition entre les réactions, qui pourrait affecter la sensibilité du duplex dans le cas d'un patient co-infecté (co-infection Dengue-Zika par exemple). Cet effet, non décrit par l'article de Ball et al. [13], doit être étudié plus en profondeur. Il est très probablement dû à l'épuisement des réactifs causé par la LAMP la plus rapide, et pourrait alors être évité en augmentant les concentrations en dNTPs ou en ajustant les paramètres de chaque LAMP (notamment les concentrations en amorces) de manière à équilibrer les deux cinétiques d'amplifications.

Chapitre 4

Analyser un échantillon sur le terrain : dispositif papier pour le diagnostic multiplex des arbovirus Zika, Dengue et Chikungunya.

Contents

4.1	Matériels et méthodes	108
4.1.1	lyophilisation et séchage	108
4.1.2	Préparation de l'échantillon	111
4.2	Stocker les réactifs dans le papier	114
4.2.1	Lyophilisation	114
4.2.2	Séchage	119
4.2.3	comparaison lyophilisation et séchage	121
4.2.4	Durée de stockage et limite de détection	123
4.2.5	Réalisation du multiplexe en mix lyophilisé.	124
4.3	Extraction et répartition de l'ARN sur un système papier multiplexé.	125
4.3.1	Evaluation de la capture	125
4.3.2	Evaluation de l'élution	127
4.3.3	Extraction d'ARN et détection sur le dispositif papier	129
4.3.4	Mise en place de protocole sans extraction en phase solide	136

LE stockage des réactifs et la préparation de l'échantillon sont deux problématiques importantes des tests de terrain.

En effet, dans des conditions où les ressources sont limitées, les réactifs conservés à -20°C dans un laboratoire classique doivent être stockés à température ambiante. La forme séchée est alors privilégiée et les mélanges réactionnels sont réhydratés avant utilisation.

L'autre difficulté majeure rencontrée lors de l'application des tests d'acides nucléiques sur le terrain est la préparation de l'échantillon [121]. Comme évoqué au chapitre 1, des molécules présentes dans les matrices biologiques (hémoglobine, immunoglobulines, etc) inhibent la plupart des amplifications [78]. Une étape d'extraction permettant de purifier les acides nucléiques est donc nécessaire.

La lyophilisation et le séchage des mélanges réactionnels de rt-LAMP sur papier, essentielle à l'acheminement de nos dispositifs sur le terrain, sera traitée dans une première partie du chapitre.

L'adaptation de l'extraction d'ARN sur un dispositif papier sera développée dans la seconde partie du chapitre. Dans le cas précis de notre dispositif, le lien entre la composition du lyophilisat et la performance de l'élution des ARN capturés sera discuté.

Enfin, les premières évaluations d'un test papier multiplexé pour la détection des virus Zika, Dengue et Chikungunya seront présentées en fin de chapitre.

4.1 Matériels et méthodes

4.1.1 lyophilisation et séchage

Lyophilisation du kit OptiGene ISO004.

Les kits OptiGene ISO004-RT sont disponibles sous deux formes, lyophilisé ou liquide. La forme lyophilisé est fournie avec un buffer de réhydratation. Le protocole développé pour lyophiliser le kit ISO004-RT est le suivant (figure 4.1) :

- Réhydrater l'ampoule ISODR004-RT10 avec $150\mu\text{L}$ d'eau RNase free
- Dans un tube sur glace, mélanger le kit ISO004 réhydraté à l'eau, les amorces et l'agent intercalant comme mentionné dans la table 4.1.
- déposer $18\mu\text{L}$ de cette solution chacun des 12 disques.
- Incuber les disques à -20°C durant 20min
- placer les disques dans le lyophilisateur et lancer une lyophilisation durant la nuit.

Une fois les disques lyophilisés, on les conserve à température ambiante dans une atmosphère sèche (à l'aide de dessiccants). On les réhydrate avec le buffer de réhydratation et l'échantillon à tester et on incube à 65°C pour lancer la réaction LAMP.

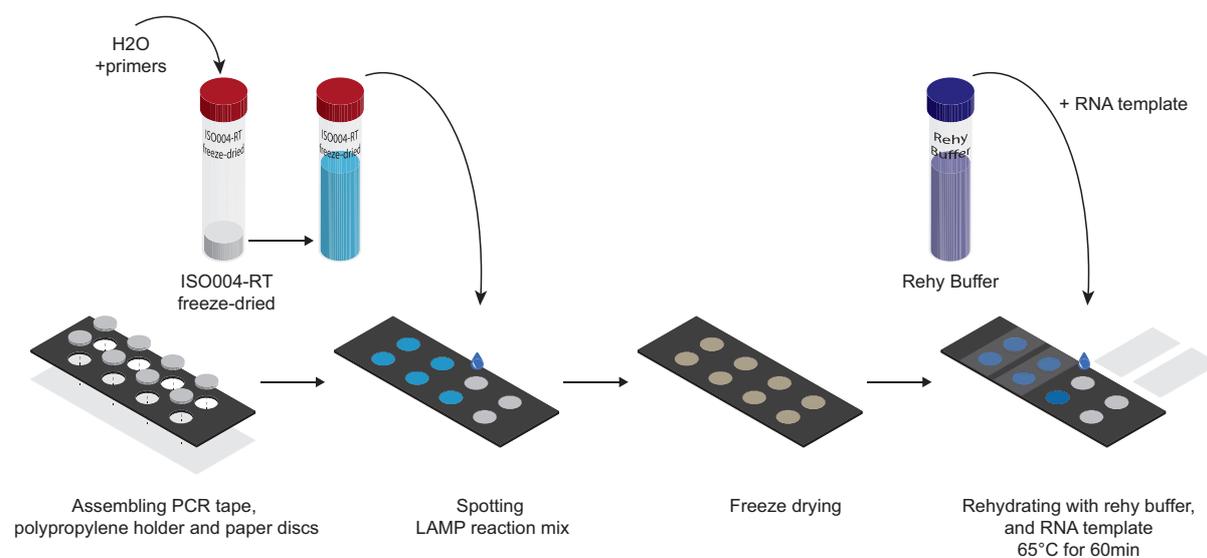


FIGURE 4.1 – Schéma résumant les étapes de lyophilisation et réhydratation en utilisant le kit ISO004-RT freeze-dried.

OptiGene : lyophilisation du kit ISO004-RT	
Reagents	Volume (µL)
H ₂ O	67.9
ISO004 Master Mix (H ₂ O rehydrated)	140.4
Intercalating Dye (µM)	2.3
Primer Mix (X)	23.4
TOTAL	234.0

TABLE 4.1 – Protocole utilisé pour lyophiliser 12 disques de réaction rt-LAMP à partir d'une ampoule de mastermix OptiGene ISO004RT-10

Lyophilisation maison (réactifs séparés)

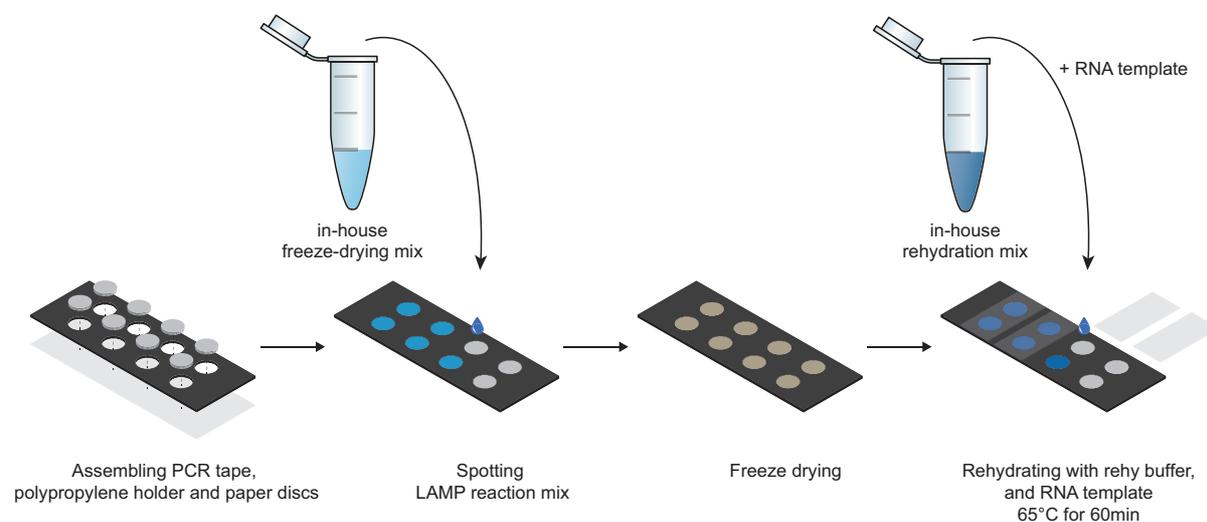


FIGURE 4.2 – Schéma résumant les étapes de lyophilisation et réhydratation en utilisant les réactifs séparés (lyophilisation maison).

En se basant sur divers travaux mentionnant les lyophilisations de mélanges réactionnels LAMP [122] [123] et d'un compte rendu de développement d'OPS diagnostics¹, on lyophilise de manière standard seulement les enzymes (GspSSD, et AMV-RT), les amorces et les dNTPs. Les sels et détergents contenus dans le iBuffer5 sont mentionnés comme affectant la stabilité du lyophilisat, et ne sont donc pas lyophilisés. De plus, le mélange à lyophiliser doit comporter le moins possible de glycérol, pour assurer la stabilité de l'enzyme sous forme lyophilisée [124]. On se procure donc les enzymes *glycerol-free* quand cela est disponible (enzyme Bst de *NEB*) ou bien les enzymes à très forte concentration que l'on dilue dans un *storage buffer* sans glycérol (enzyme GspSSD2.0 de *OptiGene*).

La composition du mélange lyophilisé est décrite en table 4.2.a. On note la présence de 5% de trehalose et 50% de lyophilisation Reagent (*OPS Diagnostics*, LR2X 500-02) pour stabiliser le lyophilisat.

a. Lyophilisation de (rt-)LAMP				
Reagents	Concentration initiale	Concentration finale	Volume 1 rxn (µL)	Volume 9 rxn (µL)
H2O			3.88	34.88
dNTPs (mM)	10.00	0.40	0.80	7.20
Lyophilization reagent 2X	2.00	1.00	10.00	90.00
Trehalose (%)	50.00	5.00	2.00	18.00
Intercalating Dye (µM)	50.00	0.50	0.20	1.80
Primer Mix (X)	10.00	1.00	2.00	18.00
GspSSD (U/µL)	8.00	0.40	1.00	9.00
AMV-RT (U/µL)*	8.00	0.05	0.13	1.13
TOTAL			20.00	180.00

b. buffer de réhydratation (rt-)LAMP				
Reagents	Concentration initiale	Concentration finale	Volume 1 rxn (µL)	Volume 9 rxn (µL)
H2O			8.40	75.60
10X iBuffer5	10.00	1.00	2.00	18.00
MgSO4 (mM)	50.00	4.00	1.60	14.40
Betain (M)	5.00	1.00	4.00	36.00
échantillon			4.00	36.00
TOTAL			20.00	180

TABLE 4.2 – Tables résumant les protocoles de lyophilisation et réhydratation des mélanges réactionnels rt-LAMP. (a) Mélange réactionnel à lyophiliser. *AMV-RT à n'ajouter qu'en cas de rt-LAMP. (b) Buffer de réhydratation.

On procède ensuite à la lyophilisation de manière similaire au protocole utilisé pour le kit ISO004.

De même, on conserve les disques à température ambiante dans une atmosphère sèche (à l'aide de dessiccants), et on les réhydrate avec le tampon de réhydratation maison dont la composition est décrite en table 4.2.b.

Séchage

On peut procéder à un séchage à la place de la lyophilisation. On place alors les disques contenant le mélange réactionnel durant la nuit dans une jarre étanche contenant des sels

1. OPS <https://opsdiagnostics.com/notes/LyoqPCRreagents.html>

dessiccants (par ex. sulfate de calcium anhydre). Les expériences de séchage des mélanges réactionnels (rt-)LAMP ont été principalement réalisés avec l'ajout de stabilisant E de ReadyDrytm PCR stabilizer commercialisés par *Biomatrix*. 5 μ L de stabilisant E sont alors ajoutés au mélange réactionnel.

4.1.2 Préparation de l'échantillon

Principe de fonctionnement.

La préparation de l'échantillon consiste dans notre cas en une extraction des acides nucléiques. La méthode développée s'inspire de travaux antérieurs réalisés notamment par Gan et al. [97], McFall et al [79] et Xu et al. [88]. Elle est assez analogue à une extraction en phase solide sur colonne de silice réalisée par centrifugations successives de l'échantillon lysé, de tampons de rinçages et d'un tampon d'éluion. Un disque de fibre de verre GF monté sur une plaque de polypropylène, utilisé à la place de la colonne de silice, assure la capture des acides nucléiques. Comme illustré dans la figure 4.3, en posant le disque de GF sur un PAD absorbant (Sample PAD en cellulose Merck CFSP223000), l'échantillon puis les buffers, passent à travers le disque de GF par capillarité.

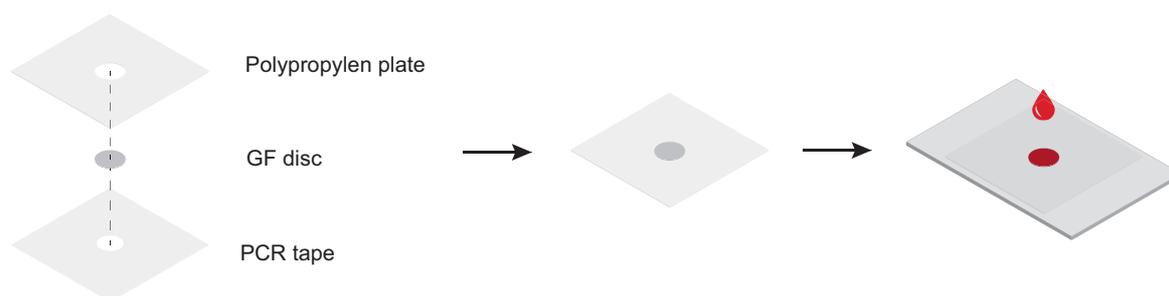


FIGURE 4.3 – Schéma résumant la fabrication du système papier de capture d'acide nucléique

Traitement des disques

Les fibres de verre sont par défaut traitées au RNasecuretm (Life technologies, AM7006), pour les rendre *RNase-free* selon un protocole inspiré par les travaux de Gootenberg et al. [87] :

1. Incuber les disques 30 minutes à 60°C dans une solution de RNasecure 4%
2. Effectuer trois rincages de 15 minutes à l'eau RNase free.
3. Faire sécher les disques à 80°C durant 45 minutes.

Dispositifs papiers incluant la préparation d'échantillon.

Deux systèmes sont développés, à quatre ou deux disques, leur fabrication est illustrée dans la figure 4.4. Ils sont tous deux composés d'un volet de capture (illustré en figure

4.3) pouvant se plier sur un volet d'amplification, dans lequel des disques contiennent les mélanges réactionnels lyophilisés. Dans le cas du système à quatre disques, une croix de répartition en fibre de verre Std17 est empilée au volet d'amplification pour permettre la répartition des ARN capturés dans les quatre puits.

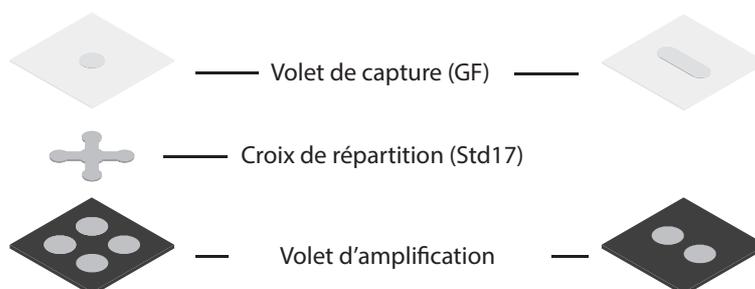


FIGURE 4.4 – Schéma résumant la fabrication des systèmes à quatre et deux disques.

système à quatre disques. La préparation d'échantillon se fait sur un disque de GF circulaire de 4 à 7 mm de diamètre. Une croix de répartition en fibre de verre Standard17 sert à répartir l'éluat entre les quatre disques de GF (figure 4.5)

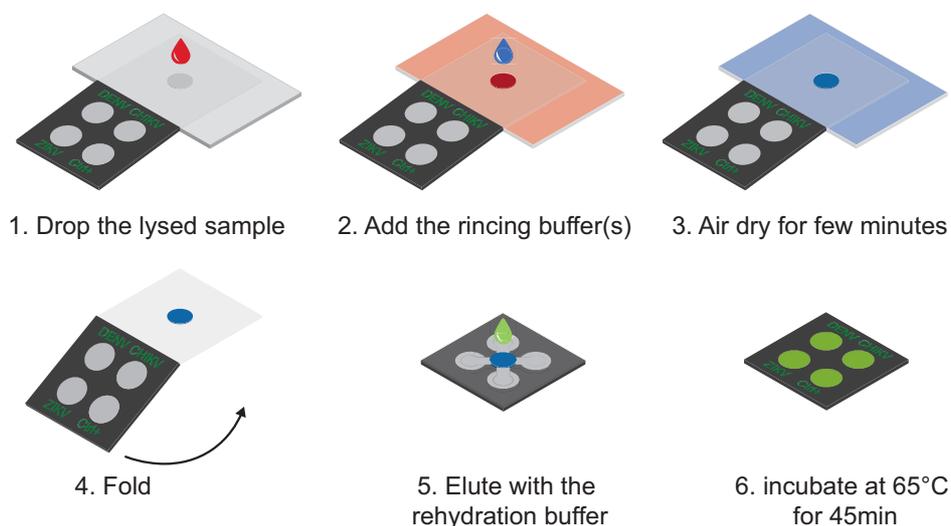


FIGURE 4.5 – Schéma résumant les étapes de préparation d'échantillon pour un système à quatre disques

système à deux disques. La préparation d'échantillon se fait sur une bandelette de GF de 4mm sur 8mm. L'élution de la bandelette se fait directement dans les deux disques de GF (figure 4.5)

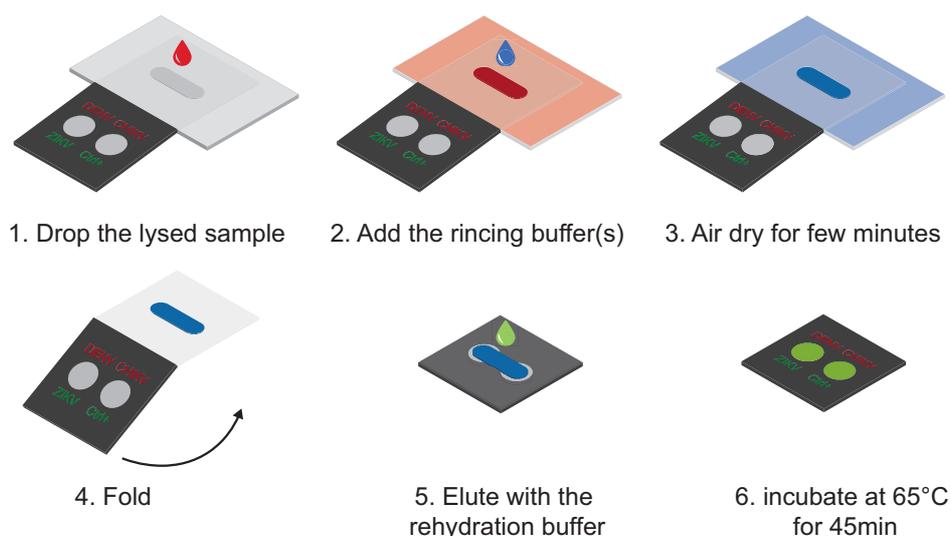


FIGURE 4.6 – Schéma résumant les étapes de préparation d'échantillon pour un système à deux disques

Protocole d'extraction.

Deux méthodes de préparations d'échantillon sur papier sont évoquées dans la suite du manuscrit et sont adaptées de deux kits d'extractions sur colonne : le Quick-DNA/RNA Viral Kit commercialisé par *Zymo Research* et le QIAamp Viral RNA Mini Kit commercialisé par *QUIAGEN*.

Quick-DNA/RNA Viral Kit (*Zymo Research*) sur papier :

- Dans un tube, mélanger l'échantillon avec deux fois son volume de Viral Buffer (de manière standard, 50 μ L d'échantillon avec 100 μ L de Viral Buffer)
- Vortexer durant 30 secondes.
- déposer l'échantillon lysé sur le disque de capture. Le liquide passe à travers le disque et est absorbé par le pad absorbant, en dessous du disque (figure 4.5.1).
- De la même manière, déposer 400 μ L de Wash Buffer sur le disque de capture (figure 4.5.2)
- Attendre 5 à 10 minutes que le disque sèche (figure 4.5.3).
- Disposer le volet de capture au dessus du volet de détection (figure 4.5.4), et éluer le disque de capture avec le volume approprié : 80 μ L pour un volet de détection à 4 disques, 40 μ L pour un volet de détection à deux disques. (figure 4.5.5)

QIAamp Viral RNA Mini Kit *QUIAGEN* sur papier :

- Dans un tube, mélanger 50 μ L d'échantillon avec 200 μ L Buffer AVL (ou 140 μ L d'échantillon avec 560 μ L de Buffer AVL).
- Incuber à température ambiante durant 10 minutes.
- Ajouter 200 μ L d'éthanol (ou 560 μ L d'éthanol).

- déposer l'échantillon lysé sur le disque de capture. Le liquide passe à travers le disque et est absorbé par le pad absorbant, en dessous du disque (figure 4.5.1).
- De la même manière, déposer 400µL de Buffer AW1 sur le disque de capture (figure 4.5.2)
- Déposer 400µL de Buffer AW2 sur le disque de capture.
- Attendre 5 à 10 minutes que le disque sèche (figure 4.5.3).
- Disposer le volet de capture au dessus du volet de détection (figure 4.5.4), et éluer le disque de capture avec le volume approprié : 80µL pour un volet de détection à 4 disques, 40 µL pour un volet de détection à deux disques. (figure 4.5.5)

4.2 Stocker les réactifs dans le papier

Nous développons dans cette section des méthodes de lyophilisation et de séchage permettant de stocker durablement les réactifs LAMP dans le papier.

4.2.1 Lyophilisation

Nous nous attachons ici à l'optimisation des mélanges réactionnels du lyophilisat et du buffer de réhydratation. Notre objectif est double :

1. D'une part, améliorer la qualité de la lyophilisation : sensibilité et spécificité du test réhydraté, longévité de la lyophilisation.
2. D'autre part, lyophiliser dans le disque un maximum de réactifs du mélange réactionnel.

Comme précisé en section 4.1.1, il n'est pas recommandé de lyophiliser les sels et détergents ni la bétaine. Ceux-ci composent généralement le tampon de réhydratation. Cependant, dans notre cas, le tampon de réhydratation sert aussi de tampon d'élution du volet de capture (figure 4.5 et 4.6). Or les tampons d'élution doivent contenir peu de sels pour être efficaces (dans le cas de l'élution d'ARN, il s'agit même le plus souvent d'H₂O pure).

Dans l'idéal, on voudrait donc éluer/réhydrater le dispositif avec de l'H₂O pure. il est donc important de lyophiliser un maximum des sels et détergents dans les disques de réaction.

Nous nous concentrons donc sur la lyophilisation maison (section 4.1.1) pour laquelle nous contrôlons les quantités de chaque réactif. La lyophilisation du kit ISO004-RT (dont le détail de la composition n'est pas connu) sera utilisée comme élément de comparaison.

rt-LAMP Sigmavirus. La rt-LAMP Sigmavirus sera principalement utilisée comme rt-LAMP "type". Elle nous permet par la suite de tester facilement des échantillons contaminés au Sigmavirus. En effet, le Sigmavirus étant un virus de type I, infectant uniquement

les mouches, nous pouvons le manipuler sans danger sur une paillasse de laboratoire à l'IPGG, ce qui n'est pas le cas pour les virus Zika, Dengue et Chikungunya.

Optimisation du mélange à lyophiliser et du buffer de réhydratation

La composition du lyophilisat décrite en table 4.2.a assure une bonne cinétique d'amplification de la rt-LAMP réhydratée un jour après la lyophilisation (J+1) et une bonne spécificité (on n'observe pas d'amplification non spécifique dans le disque contrôle négatif). Pour chaque variation de la composition du lyophilisat et du buffer de réhydratation, on s'assure que la cinétique de réaction et la spécificité sont conservées.

Concentration en Betaine. La Betaine est un adjuvant couramment utilisé dans les réactions LAMP, usuellement à une concentration de 1M. On évalue dans notre cas la nécessité d'ajouter de la bétaine au buffer de réhydratation (figure 4.7.a).

La LAMP sans bétaine, produit un signal anormalement faible, quoique la cinétique de réaction soit semblable ($mTt50$ est d'environ 28,5 min pour les trois conditions 0 M, 0,5 M et 1 M de bétaine). L'importance de la bétaine dans la LAMP sur papier a déjà été soulignée dans la littérature [89].

La concentration en bétaine dans le buffer de réhydratation est fixée à 0,5M pour les expériences ultérieures.

Ajout d'un inhibiteur de ribonucléase (RNasin). Dans le but d'être plus résistant aux contaminations par les RNases, en suivant les recommandations de la littérature [87] [123], on ajoute un inhibiteur de RNase au lyophilisat (RNasin *Promega*). On vérifie en figure 4.7.b. qu'il ne nuit pas à la lyophilisation et n'inhibe pas la réaction LAMP ($mTt50$ de 23,9 min et 25,4 min resp. avec et sans RNasin).

On ajoute 0,4U/ μ L de RNasin dans les lyophilisations ultérieures.

Ajout de tréhalose. Le tréhalose est un disaccharide connu pour améliorer la stabilité et la durée des lyophilisations. On vérifie que l'ajout de 5% de tréhalose au lyophilisat n'altère pas la cinétique ni la spécificité du test en figure 4.7.c. ($mTt50$ de 24,9 min et 21,9 min pour resp. 0% et 5% de trehalose). Pour 10%, un des duplicats positif est fortement ralenti, des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier la reproductibilité d'un tel phénomène.

On ajoute 5% de tréhalose dans les lyophilisations ultérieures.

Quantité de polymérase. Certaines publications mentionnent une augmentation de la dose d'enzyme polymérase dans le lyophilisat [86] [125]. On compare la lyophilisation d'une concentration standard (0,4U/ μ L) et celle d'une concentration 1,5 fois supérieure (0,6U/ μ L). La cinétique ne semble pas être différente à J+1 ($mTt50$ de 14,9 min et 13,5

min pour resp. 0,4 et 0,6U/ μ L). Il serait intéressant de tester l'impact de la concentration en enzyme sur la durée de vie de la lyophilisation.

Pour limiter la quantité de glycérol résiduel présent dans le lyophilisat, on conserve une concentration de 0,4U/ μ L de polymérase dans les lyophilisations ultérieures.

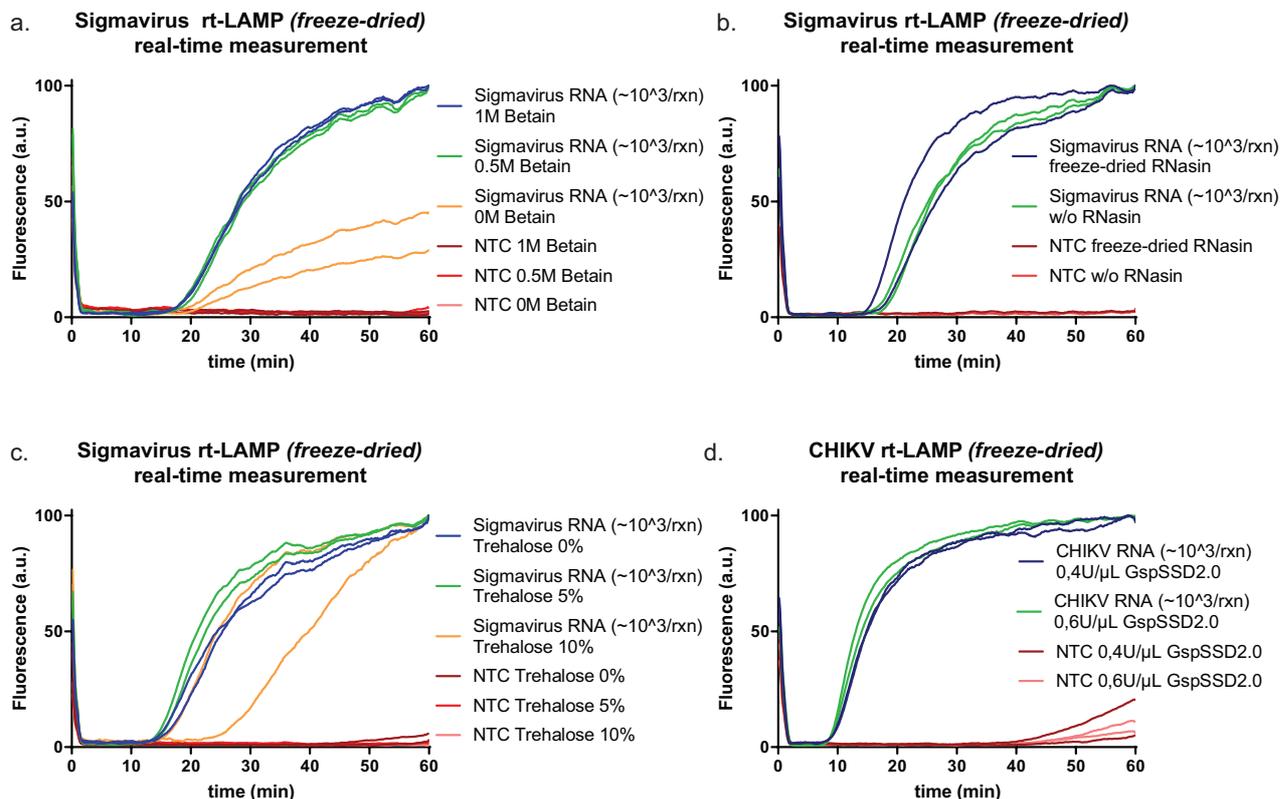


FIGURE 4.7 – Optimisation de la composition du lyophilisat et du buffer de réhydratation. Suivi des réactions en temps réel par SYTO82 (a) rt-LAMP Sigmavirus lyophilisée, réhydratée à J+1, ARN de Sigmavirus, bêtaïne à 0M, 0,5M et 1M (b) rt-LAMP Sigmavirus lyophilisée avec ou sans RNasin, réhydratée à J+1, ARN de Sigmavirus (c) rt-LAMP Sigmavirus lyophilisée avec 0%, 5% ou 10% de tréhalose, réhydratée à J+1, ARN de Sigmavirus. (d) rt-LAMP CHIKV, lyophilisée avec 0,4 ou 0,6U/ μ L de GspSSD2.0, réhydratée à J+1, ARN de CHIKV

Remarque sur la concentration en glycérol. La présence de glycérol est décrite dans de nombreux brevets et articles comme délétère pour la stabilité d'une lyophilisation si sa concentration dépasse 1% vol/vol [124] [126] [127] [128]. Il ne peut pas être sublimé dans un lyophilisateur standard (comme le nôtre) et demeure donc dans le lyophilisat. Ses trois fonctions hydroxyles lui confèrent une forte hygroscopie, qui favorise l'absorption des molécules d'eau de l'air environnant. Et plus le degré d'humidité résiduel dans le lyophilisat est élevé, plus les enzymes se dégradent rapidement.

Les enzymes sont en général conservées dans des tampons composés à 50% vol/vol de glycérol. Il est donc nécessaire :

- Soit de dialyser les solutions d'enzymes pour en retirer le glycérol [126].

- Soit de se procurer des enzymes très fortement concentrées et de les diluer dans un tampon sans glycérol.
- Soit de se procurer lorsque cela est possible l'enzyme dans un tampon sans glycérol.

La GspSSD 2.0 est disponible à très forte concentration (1000U/ μ L). On la dilue dans un Buffer sans glycérol abaissant la quantité de glycérol à 0.4% vol/vol. En additionnant les quantités de glycérol présentes dans le lyophilisat (provenant de l'enzyme GspSSD, l'AMV-RT et le RNasin), on obtient une quantité résiduelle de 0,64% dans le mélange final.

Lyophilisation des composés du buffer de réhydratation

En vue d'obtenir un buffer de réhydratation le plus semblable à un buffer d'élution (10mM Tris-Cl ou même H₂O), on teste l'ajoute de la bétaine, du MgSO₄ et du iBuffer au lyophilisat (figure 4.8).

Ajout de MgSO₄ et bétaine au lyophilisat. En figure 4.8.a, quatre mélanges rt-LAMP sont lyophilisés : un mélange standard, un mélange standard contenant le MgSO₄ en plus, un mélange standard contenant la bétaine en plus, et un mélange standard contenant MgSO₄ et bétaine en plus. On réhydrate les lyophilisats à J+1.

Malgré le ralentissement des cinétiques d'amplifications ($mTt50$ de 27,0 min pour la lyophilisation standard et 29,0 min, 29,4 min et 31,8 min pour les ajouts resp. de MgSO₄, bétaine, et des deux), l'amplification se produit dans les disques contrôles positif et la spécificité est conservée.

Ajout de iBuffer au lyophilisat. De la même manière, la lyophilisation du iBuffer est étudiée (figure 4.8.b). Comme évoqué au début de la section 4.2.1, il serait idéal de pouvoir lyophiliser le iBuffer, et réaliser l'étape d'élution/réhydratation uniquement à l'eau. Le iBuffer contient probablement les différents sels permettant les conditions tampons nécessaires à la réaction (Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄) ainsi que des détergents (Triton X-100, Tween-20...), mais sa composition exacte n'est pas communiquée par *OptiGene*. Malgré de nombreux essais, l'ajout de iBuffer dans le lyophilisat inhibe totalement l'amplification à J+1.

La présence de sels en forte quantité est probablement la cause de cet échec. Cependant, certaines publications rapportent la lyophilisation de mélanges réactionnels PCR et LAMP avec les sels. Leur différence réside peut être dans la présence d'adjuvant, ou la qualité de la lyophilisation (plus basse pression et température)

Limite de détection et QUASR. L'expérience décrite en figure 4.8.c et 4.8.d évalue les performances de la rt-LAMP CHIKV QUASR pour laquelle on lyophilise le maxi-

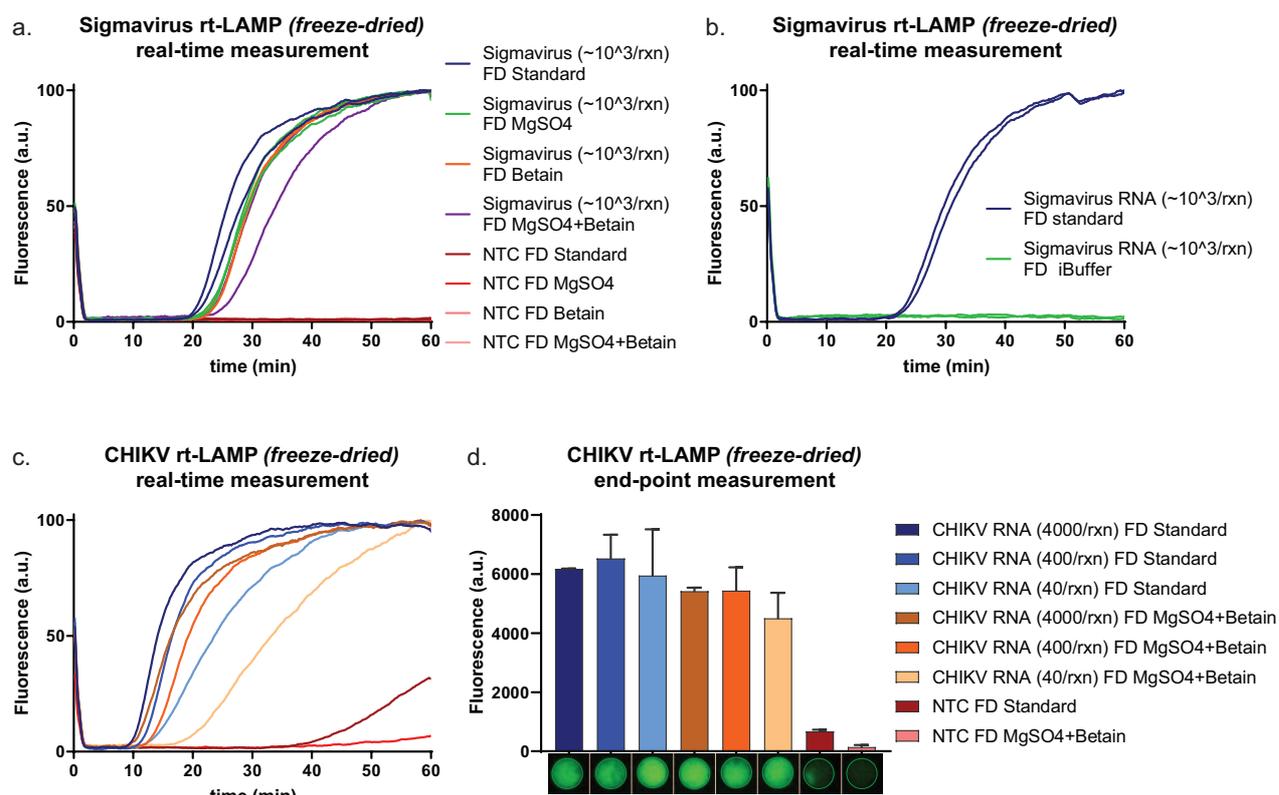


FIGURE 4.8 – lyophilisation des composés présents dans le buffer de réhydratation. Suivi des réactions en temps réel par SYTO82. (a) rt-LAMP Sigmavirus lyophilisée avec ou sans bêtaïne et MgSO₄, réhydratation à J+1, ARN de Sigmavirus. Suivi des réactions en temps réel par SYTO82 (b) rt-LAMP Sigmavirus lyophilisée avec ou sans iBuffer, réhydratation à J+1, ARN de Sigmavirus. Suivi des réactions en temps réel par SYTO82 (c) rt-LAMP CHIKV QUASR lyophilisée avec ou sans bêtaïne+MgSO₄, réhydratation à J+1, ARN de CHIKV (4000, 400 ou 40 brins/réaction). Suivi des réactions en temps réel par SYTO82 (courbes d’amplification moyenne de chaque duplicat) (d) Mesure QUASR FAM en point final.

num de composés possibles (mélange standard + MgSO₄ + bêtaïne), et ce pour trois concentrations d’ARN dans le mélange réactionnel (4000, 400 et 40 brins/rxn).

A J+1, on observe bien un ralentissement des cinétiques d’amplification par rapport à la lyophilisation du mélange standard seul (*mTt*₅₀ de 16,4 min, 19,3 min et 33,3 min avec MgSO₄ et bêtaïne, contre 14,1 min, 16,6 et 24,3 min pour la lyophilisation standard). Malgré ce ralentissement, la détection de 40 brins/réaction est possible et la rt-LAMP demeure spécifique. La lyophilisation des amorces QUASR est aussi testée pour la première fois ici. Elles sont toujours fonctionnelles après lyophilisation, l’ajout de MgSO₄ et bêtaïne semble diminuer légèrement l’intensité du signal.

La durée de vie de ces différentes lyophilisations est évaluée en section 4.2.4.

4.2.2 Séchage

Un séchage à l'air libre des mélanges réactionnels est étudié. Une telle méthode permettrait de s'affranchir du processus de lyophilisation, qui nécessite un appareillage lourd et coûteux. Le développement d'une méthode de séchage des mélanges sur papier permettrait de fabriquer les dispositifs dans des environnements non spécialisés, sur le terrain. Cela pourrait s'avérer utile dans une situation où l'on souhaite développer et optimiser un test directement sur le terrain.

Comparaison des stabilisants *Biomatrix*.

Dans certains travaux, les mélanges réactionnels ne sont pas lyophilisés mais simplement séchés [123] [129] en ajoutant un stabilisant commercialisé par *Biomatrix*. Cette compagnie propose des adjuvants permettant le séchage de mélanges réactionnels. Les 8 stabilisants du kit ReadyDrytm PCR stabilizer (nommés de A à H) sont testés. La totalité des expériences est disponible en annexe, on montrera ici les résultats les plus pertinents. Pour évaluer les 8 stabilisants en une expérience, la plupart de ces tests sont réalisés en simplicats.

séchage des sels et détergents. *Biomatrix* rapporte le séchage de *master mix* complets, incluant les sels et détergents. On réalise une première expérience de séchage des mélanges de LAMP, incluant ou non les sels et détergents, et ce pour les enzymes *NEB* et *OptiGene*.

Pour 7 stabilisants sur 8, avec les réactifs *NEB* comme *OptiGene*, on observe une absence d'amplification dans les mélanges séchés contenant le buffer (figure 6.1 en annexe). En revanche, dans les mélanges séchés sans buffer, on observe une amplification (Tt50 de 15 à 20 min). On montre en exemple le séchage avec le stabilisant E en figure 4.9. C'est seulement pour le stabilisant C que l'on observe une amplification claire du mélange séché avec les sels et détergents, dans le cas des réactifs *NEB*. Cette réaction est cependant assez lente (Tt50 = 43,7 min).

On optimise par la suite le séchage de mélanges réactionnels rt-LAMP avec le stabilisant E.

Séchage du glycérol. *Biomatrix* rapporte le séchage de mélanges réactionnels contenant du glycérol. On étudie donc l'impact de la quantité de glycérol sur le séchage en figure 4.10.a. On utilise une GspSSD dans un buffer standard (50% glycérol) ou appauvri en glycérol (voir section 4.2.1). Les quantités de glycérol résiduel dans les deux mélanges sont respectivement 3,14% et 0,64%. De manière attendue, la cinétique d'amplification est plus lente à J+1 dans le mélange contenant plus de glycérol, signe que sa présence affecte négativement le séchage (Tt50 de 27,4 min et 37,9 min pour resp. 0,64% et 3,14% de glycérol).

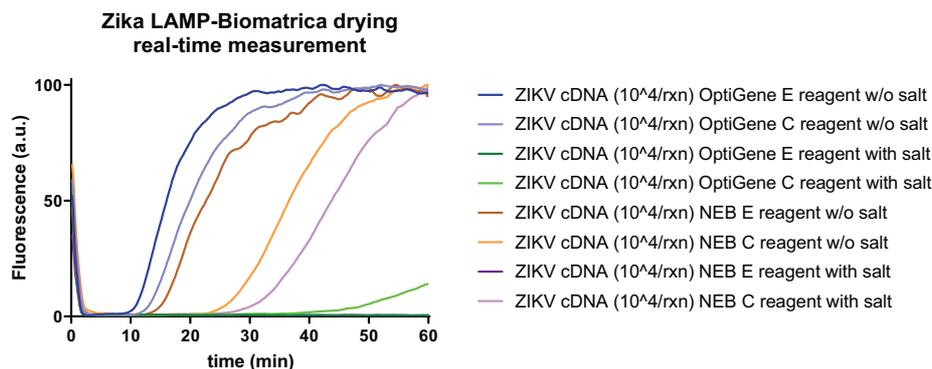


FIGURE 4.9 – LAMP ZIKV, séchage avec les stabilisants *Biomatrix* E et C. Réactifs *OptiGene* ou *NEB*, avec ou sans sels et détergents.

Séchage des enzymes (Bst et GspSSD) Enfin, la performances des enzymes *NEB* et *OptiGene* (figure 4.10.b. Comme vu précédemment avec les mélanges réactionnels frais, l’amplification est plus rapide avec l’enzyme *OptiGene* GspSSD 2.0 ($Tt_{50} = 21,6$ min) qu’avec l’enzyme *NEB* Bst2.0 WS ($Tt_{50} = 32,5$ min). De plus, on observe une amplification non spécifique précoce dans le disque contrôle négatif ou est séchée l’enzyme *NEB*. (On réalise les mêmes tests avec les autres stabilisants, les résultats en annexe figure 6.2).

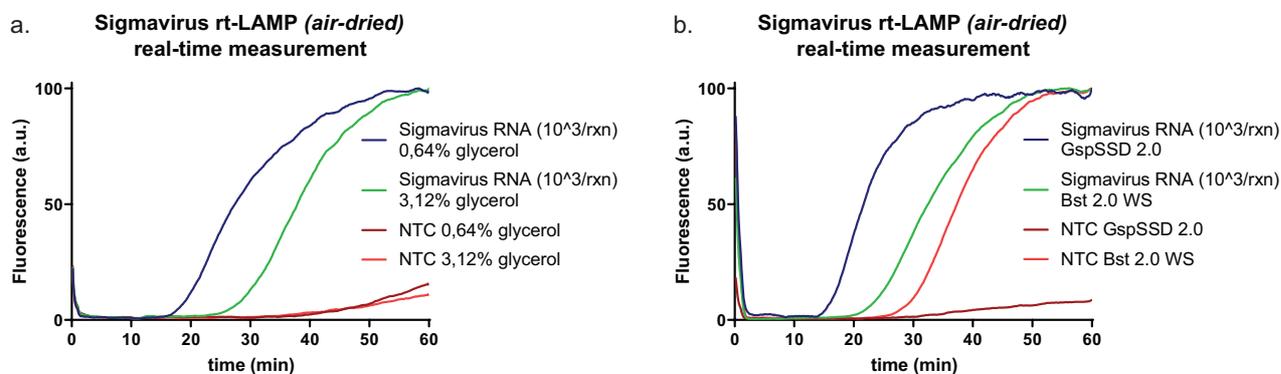


FIGURE 4.10 – Optimisation du séchage de mélange réactionnel rt-LAMP Sigmavirus avec le stabilisant *Biomatrix* E. Suivi des réactions en temps réel par SYTO82 (a) Variation de la concentration en glycérol dans le lyophilisat, réhydratation à J+1, ARN de Sigmavirus (b) Lyophilisation des enzymes GspSSD 2.0 (*OptiGene*) ou Bst 2.0 WS (*NEB*).

On utilisera donc la GspSSD 2.0 à faible concentration en glycérol, et le stabilisant *Biomatrix* E pour sécher les mélanges réactionnels rt-LAMP (sans *iBuffer*).

La composition des stabilisants de séchages *Biomatrix* est tenue secrète par la compagnie. Cependant, leur brevet protégeant ces stabilisants mentionne les différentes molécules qui les composent [130]. On note dans ce brevet les mentions répétées de Sucrose, et Melezitose (des disaccharides proches du tréhalose), de PVA, et d’Alanyl-Glutamine. Ces composés seraient intéressants à tester pour la mise en place d’un séchage maison.

4.2.3 comparaison lyophilisation et séchage

On désire résumer et comparer en une même série d'expériences les qualités de lyophilisation du mélange maison et de séchage avec le stabilisant E développés plus haut. Une série de puces tests comprenant ces deux mélanges réactionnels ainsi qu'un mélange ISO004 à lyophiliser (section 4.1.1) sont soit lyophilisées, soit séchées. On teste donc par la même occasion les qualités du stabilisant E pour la lyophilisation et la possibilité de sécher notre mélange maison.

On réalise ces expériences pour la rt-LAMP Sigmavirus et pour la rt-LAMP ZIKV QUASR. On réhydrate les disques à J+1

Sigmavirus On observe une amplification rapide de la rt-LAMP Sigmavirus séchée avec stabilisant E ($mTt50 = 24,0$ min), suivit d'une amplification plus lente de la rt-LAMP séchée avec le mélange maison ($mTt50 = 41,0$ min). Le kit commercial séché montre une amplification tardive. n'atteignant pas de plateau en 60 minutes. On observe des amplifications non spécifiques précoces (à environ 30 min) dans les disques contrôles négatifs séchés avec le stabilisant E.

Pour les rt-LAMP Sigmavirus lyophilisées, les amplifications sont plus rapides ($mTt50$ de 19,4 min, 24,4 min et 27,2 min pour resp. stabilisant E, mélange maison, kit ISO004), semblant indiquer une meilleur conservation des enzymes par lyophilisation. On observe toujours des amplifications non spécifiques dans les disques contrôles négatifs séchés avec stabilisant E.

ZIKV Les résultats sont assez semblables pour les rt-LAMP ZIKV QUASR séchées et lyophilisées. Séchage au stabilisant E ($mTt50 = 17,9$ min) plus rapide que le séchage maison ou séchage du kit ISO004 ($mTt50$ resp. de 30,7 min et 28,7 min), et amplifications non spécifiques dans les disques contrôles négatifs séchés avec stabilisant E (visibles en mesure QUASR donc impliquant l'amorce QUASR FIP).

De même, les amplifications des réactions Lyophilisées sont plus rapides ($mTt50$ de 16,7 min, 18,2 min et 20,8 min pour resp. stabilisant E, LR+tréhalose, kit ISO004), et on observe là encore une amplification non spécifique dans un disque contrôle négatif lyophilisé avec stabilisant E.

En conclusion

- Il est possible de sécher ou lyophiliser des mélanges réactionnels rt-LAMP en utilisant le stabilisant E. On note cependant des amplifications non spécifiques récurrentes à partir de 30 minutes de réaction, laissant penser qu'il contient un composé affectant l'activité de la polymérase GspSSD 2.0.
- Il est possible de sécher ou lyophiliser des mélanges réactionnels rt-LAMP en utilisant notre protocole maison (ajout de Lyoph. Rreagent + tréhalose). les amplifica-

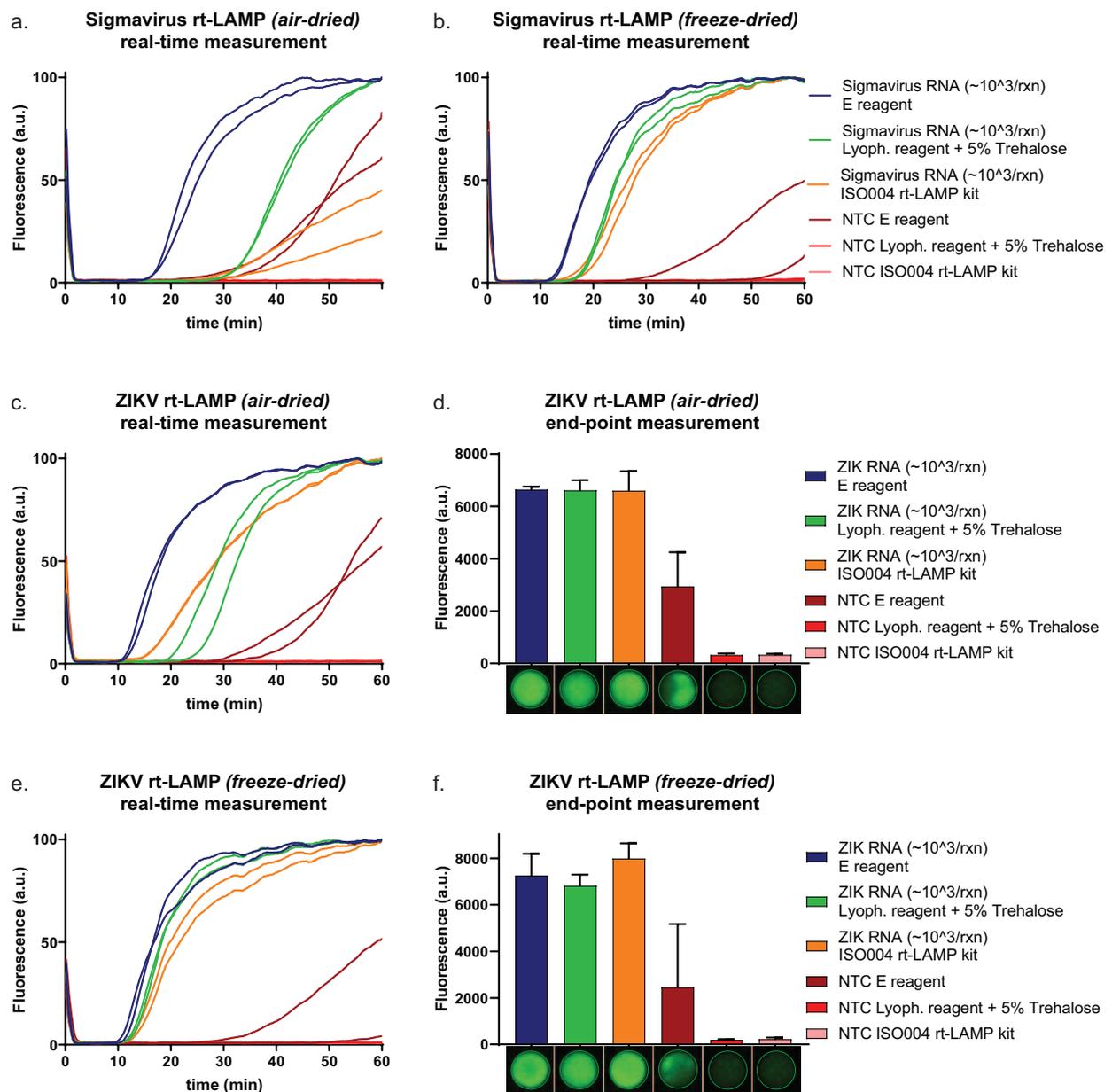


FIGURE 4.11 – Comparaison entre séchage et lyophilisation pour des mélanges rt-LAMP maisons contenant le stabilisant E ou Lyoph. reagent + 5% trehalose et le kit ISO004 (a) rt-LAMP Sigmavirus séchées, réhydratation à J+1, suivi des réactions en temps réel par SYTO82 (b)rt-LAMP Sigmavirus lyophilisées, réhydratation à J+1, suivi des réactions en temps réel par SYTO82 (c) rt-LAMP ZIKV séchées, réhydratation à J+1, suivi des réactions en temps réel par SYTO82 (d) Mesure QUASR FAM en point final. (e) rt-LAMP ZIKV lyophilisées, réhydratation à J+1, suivi des réactions en temps réel par SYTO82 (f) Mesure QUASR FAM en point final.

tions sont comparables à celles du kit commerciale ISO004, plus rapides dans le cas de la lyophilisation. Ce protocole possède une meilleure spécificité que le séchage avec stabilisant E (pas d'amplification dans les disques contrôles négatifs).

4.2.4 Durée de stockage et limite de détection

On étudie la durée de vie de a lyophilisation avec LR+tréhalose, pour trois formulations, le protocole standard (table 4.2), le protocole standard avec ajout du MgSO₄ au lyophilisat, et le protocole standard avec ajout du MgSO₄ et de la bétaine au lyophilisat. On compare leurs performances à celles du kit ISO004 sur une durée de 2 mois.

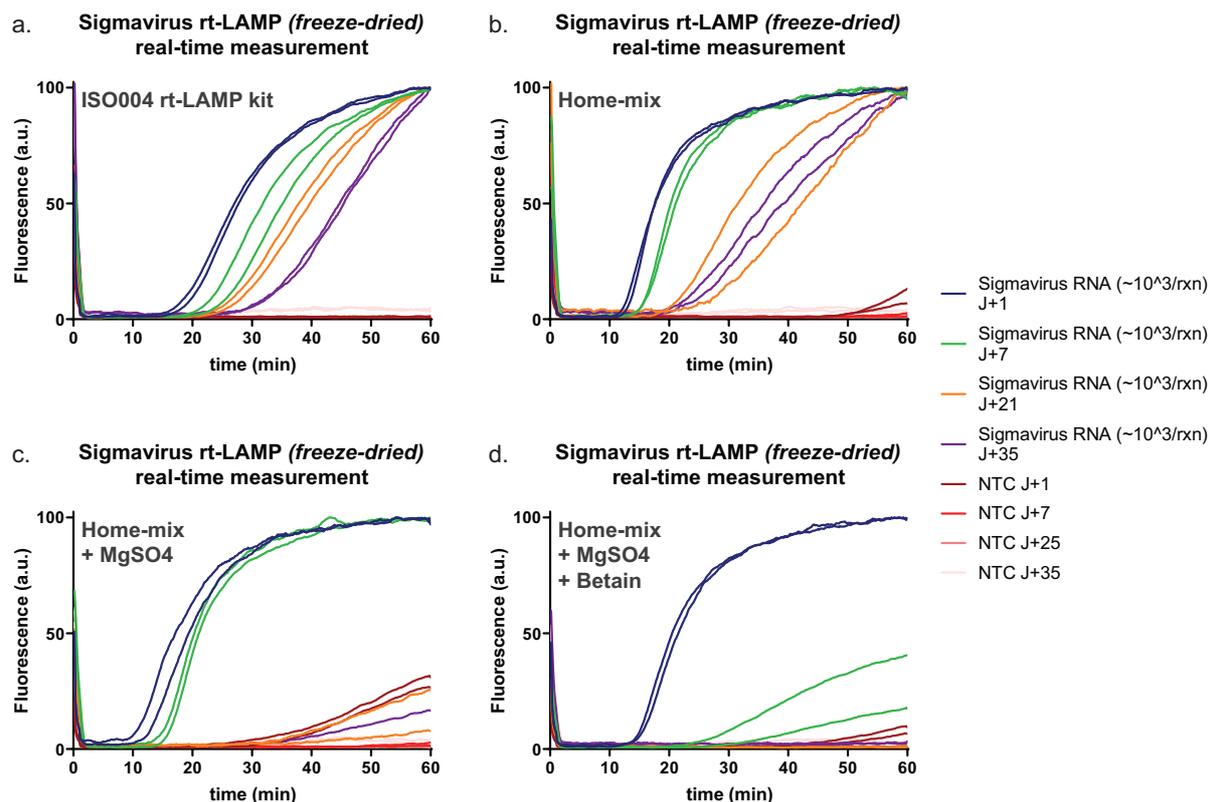


FIGURE 4.12 – Comparaisons des durées de vie des différents mélanges réactionnels lyophilisés (a) kit ISO004-RT (b) lyophilisation maison (c) lyophilisation maison + MgSO₄ (d) lyophilisation maison + MgSO₄ + bétaine

Les kits ISO004 lyophilisés sur disques perdent en rapidité au fur et à mesure de leur vieillissement (mTt_{50} allant de 27,4 min à J+1 à 33,5 min, 38,8 min et 45,0 min à resp. J+7 J+25 et J+35). Ce ralentissement témoigne probablement d'une dégradation progressive des enzymes, mais la détection de 10^3 brins par réactions est toujours possible 1 mois après la lyophilisation.

La lyophilisation au LR+trehalose du protocole standard, montre les mêmes caractéristiques. A J+1 et J+7, les amplifications sont rapides (mTt_{50} resp. de 17,6 min et 20,7 min), et on observe un ralentissement des cinétiques à J+21 et J+35 (mTt_{50} resp. 36,9 min et 37,6 min), suggérant là aussi, une dégradation progressive des enzymes au cours du temps.

L'ajout de MgSO₄ semble affecter la durée de vie du lyophilisat. Les amplifications à J+1 et J+7 (mTt_{50} resp. de 18,3 min et 20,7 min) sont comparables à celles sans MgSO₄.

Cependant, après 3 semaines, on observe plus d'amplifications, signe d'une dégradation importante des enzymes.

L'ajout supplémentaire de bétaine affecte encore plus la durée de vie du lyophilisat. L'amplification à J+1 ($mTt50 = 21,0$ min) est déjà très dégradée à J+7 et n'est plus visible. à J+21.

On peut conclure d'après ces expériences que notre lyophilisation "maison" a une performance comparable à la lyophilisation du kit ISO004. Cependant ces deux lyophilisations ont une durée de vie limitée d'au moins un mois. La quantité de glycérol résiduel encore importante de 0,64% pourrait être abaissée à 0.02% en utilisant une transcriptase inverse et un inhibiteur de ribonucléase *glycerol-free*. Cela aurait un effet protecteur sur la durée de vie du lyophilisat. De même les conditions de conservations pourraient être améliorées. L'emballage hermétique sous vide des puces tests pourrait être plus efficace que le stockage actuel en boîte de pétri contenant des sels dessiccants.

On observe ici que l'ajout de $MgSO_4$ et de bétaine est délétère pour la conservation du lyophilisat. L'effet hygroscopique de ces deux composés est probablement responsable de la dégradation prématurée des enzymes en leur présence, écourtant la durée de vie du lyophilisat.

La plupart des expériences de préparation d'échantillon dans la suite du manuscrit se font à J+1, date à laquelle l'efficacité des différents lyophilisat est comparable. on utilisera par exemple la lyophilisation de $MgSO_4$ et bétaine pour ne pas avoir à les ajouter aux buffer d'élution/réhydratation. Les récents résultats sur la durée de vie des lyophilisations montrent qu'il est nécessaire de trouver une formulation plus adaptée en leur présence. Certains travaux, notamment ceux de Carter et al. [131] recensent la lyophilisation de longue durée de mélanges réactionnels rt-LAMP contenant bétaine, $MgSO_4$ et autres sels . Les différences principales avec notre protocole, est l'absence totale de glycérol, la concentration en tréhalose deux fois supérieure et les conditions de lyophilisations (plus froides et à plus basse pression).

4.2.5 Réalisation du multiplexe en mix lyophilisé.

Pour l'application au dispositif papier Dengue/Zika/Chikungunya, la lyophilisation des rt LAMP duplex QUASR est réalisée.

Sur le même modèle que l'expérience montré en figure 3.18, les duplex DENV-U/ZIKV et CHIKV/Ctrl+ (*S.aureus*) sont lyophilisés dans deux puces tests. On ajoute au lyophilisat du duplex CHIKV/Ctrl+ l'ADN de *S.aureus* (500 CFU/rxn). Ainsi, l'ADN séché du contrôle positif est réhydraté en même temps que le test et permet de valider la bonne conservation des réactifs et le bon déroulement de la réaction.

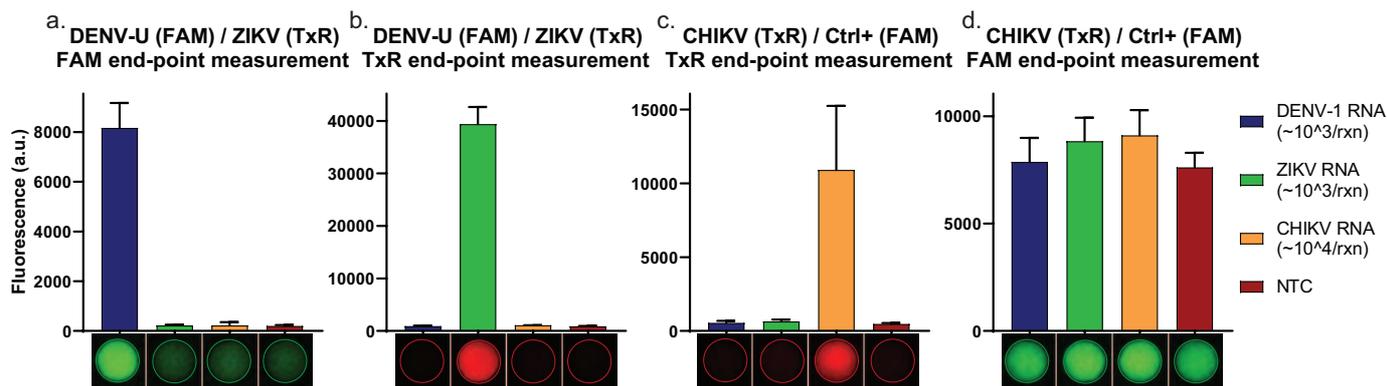


FIGURE 4.13 – Analyse point final des deux duplex rt-LAMP QUASR Dengue/Zika et Chikungunya/Ctrl+.

Les rt-LAMP QUASR duplex lyophilisés sont spécifiques. L'adaptation du système à la préparation de l'échantillon est donc la dernière étape nécessaire à l'aboutissement de notre dispositif papier.

4.3 Extraction et répartition de l'ARN sur un système papier multiplexé.

Dans cette section nous démontrons pour la première fois la capture et l'élution multiplexée d'ARN sur un système papier. Nous adaptons ensuite cette méthode au multiplex Zika, Dengue, Chikungunya.

La capture d'ADN sur un disque de fibre de verre a été reporté dans plusieurs travaux antérieurs [88] [79] [97]. On cherche à reproduire ces résultats et développer la capture d'ARN sur le même principe. La fibre de verre est majoritairement composé de silice. Le principe de capture est donc le même que pour les colonnes d'extraction : une extraction en phase solide basée sur l'affinité réversible entre les acides nucléiques et la silice.

4.3.1 Evaluation de la capture

L'évaluation du rendement de capture de la fibre GF est réalisée comme illustré par la figure 4.14. L'échantillon lysé passe à travers le disque, que l'on rince ensuite (protocole en section 4.1.2). A ce stade, le disque de GF est isolé et placé dans un tube contenant 150µL de tampon d'élution, le tube est vortexé durant 15 sec. et on dose la quantité d'ADN/ARN présent dans le liquide d'élution. En supposant que tous les ADN/ARN capturés se détachent en solution dans le tube, on peut en déduire la quantité d'ADN/ARN capturée par le disque. On compare cette quantité à une capture classique sur colonne réalisée en parallèle.

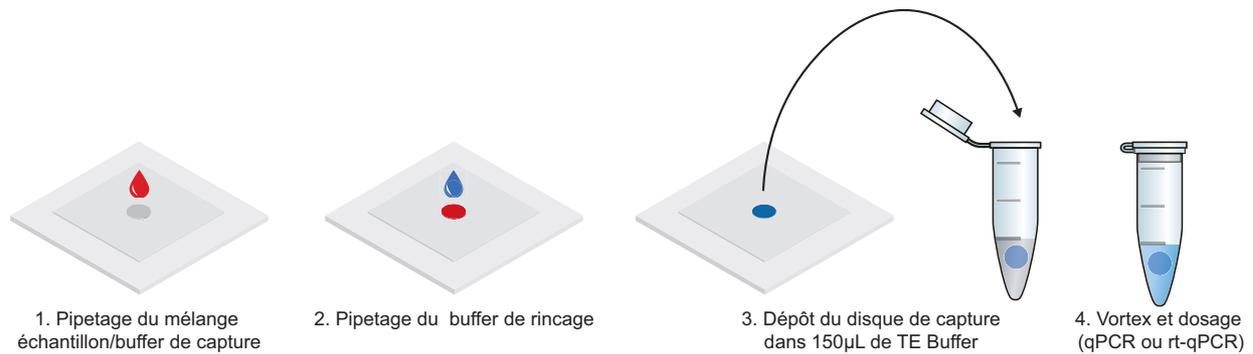


FIGURE 4.14

Capture d'ADN

On cherche dans un premier temps à évaluer les capacités de capture d'ADN de la fibre de verre GF. On compare plusieurs tampons de capture et d'élution : des tampons réalisés au laboratoire selon le protocole de Boom et al. [132] et les tampons issus du kit Quick-DNA/RNA Viral Kit de *Zymo Research*. On utilise un ADN plasmidique pour lequel une qPCR a été développé à la CIBU. 2 µL d'une solution contenant le plasmide sont mélangés à 48µL de sérum de veau foetal (SVF), de telle sorte que la concentration finale en plasmide soit de 10^2 ou $10^3/\mu\text{L}$. On procède aux extractions sur disque de GF et sur colonne *Zymo Research*.

Name	CP	Concentration	Recovery
Plasmid DNA (1E3/µL) GF extraction, Boom buffers	27.01	4.23E+03	100%
Plasmid DNA (1E3/µL) GF extraction, ZYMO buffers	26.78	4.85E+03	100%
Plasmid DNA (1E3/µL) ZYMO columns, ZYMO buffers	29.66	8.36E+02	63%
Plasmid DNA (1E2/µL) GF extraction, Boom buffers	29.08	1.19E+03	89%
Plasmid DNA (1E2/µL) GF extraction, ZYMO buffers	28.92	1.32E+03	99%
Plasmid DNA (1E2/µL) ZYMO columns, ZYMO buffers	32.02	1.98E+02	15%

FIGURE 4.15 – Taux de capture d'ADN plasmidique par le GF en comparaison à un protocole classique (ZYMO)

On observe que la capture sur disque GF d'ADN plasmidique à 10^3 brins/µL est de 100% et que celle à 10^2 brins/µL est de 89% pour les tampons *Boom* et 99% pour les tampons *Zymo*. des extractions sans plasmide sont réalisées en contrôle négatif et ne montre pas d'amplification. Ces résultats positifs nous encouragent à évaluer sur le même modèle la capture d'ARN viral sur GF avec les tampons *Zymo*.

Capture d'ARN

Le même protocole est réalisé en diluant cette fois-ci des particules virales de Sigmavirus dans du SVF à des concentrations de 10^3 et 10^4 particules/µL, et en dosant les ARN

capturé par une rt-qPCR Sigmavirus.

a.

Name	CP	Concentration	Recovery
Sigmavirus RNA (1E4/ μ L) GF extraction [1]	28.73	1.85E+03	56%
Sigmavirus RNA (1E4/ μ L) GF extraction [2]	28.37	2.30E+03	70%
Sigmavirus RNA (1E4/ μ L) ZYMO column	28.76	1.82E+03	55%
Sigmavirus RNA (1E3/ μ L) GF extraction [1]	32.33	2.21E+02	33%
Sigmavirus RNA (1E3/ μ L) GF extraction [2]	31.78	3.05E+02	46%
Sigmavirus RNA (1E3/ μ L) ZYMO column	32.77	1.70E+02	26%

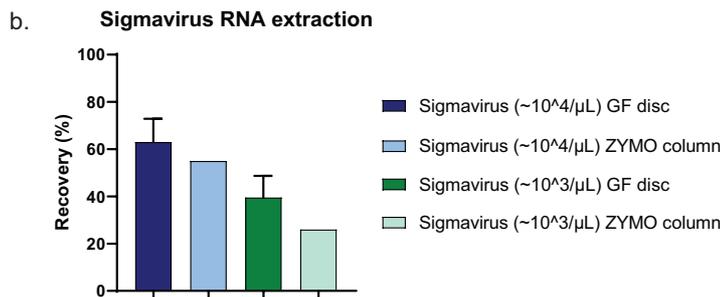


FIGURE 4.16 – Capture d'ARN par la GF (a) Table de quantification en RT-qPCR (b) Graphique décrivant les taux de capture du GF en comparaison à la capture sur colonne ZYMO.

On réalise les captures sur GF en duplicat. On observe un taux de capture moyen de 63% pour le Sigmavirus dilué à 10^4 particules/ μ L et de 40% pour le Sigmavirus dilué à 10^3 / μ L. Les colonnes ZYMO capture resp. 55% et 26%. des extractions sans Sigmavirus sont réalisées en contrôle négatif et ne montre pas d'amplification.

L'utilisation du GFF pour capturer les ARN semble donc être approprié. Les rendements de capture sont comparables à ceux d'une colonne commerciale.

4.3.2 Evaluation de l'élution

L'élution des ARN capturés sur le disque de GF est évaluée avec différents tampons selon le protocole décrit en figure 4.17. On procède de la même manière que pour l'évaluation de la capture, en ajoutant une étape d'élution du disque de GF. Le disque est ensuite déposé et vortexé dans 150 μ L d'H₂O. Ainsi, l'ARN non élué par l'étape d'élution par capillarité, est récupéré et dosé en RT-qPCR. Plus l'élution réalisée à l'étape 3 est efficace, plus la quantité d'ARN récupéré en le tube est faible. On peut ainsi comparer plusieurs tampons d'élution.

On cherche à connaître la capacité d'élution du buffer de réhydratation du kit ISO004 (cf figure 4.1). Ce buffer (dont la composition nous est inconnue) est utilisé pour réhydrater le kit rt-LAMP lyophilisé ISO004. Il contient probablement des sels et détergents (\sim 4mM MgSO₄, \sim 50mM Tris-HCl, \sim 30mM KCl, \sim 30mM (NH₄)₂SO₄) et \sim 1M de bétaine) ce qui n'est pas approprié pour un buffer d'élution d'ARN (composé en général d'H₂O Rnase-free +/- 10mM Tris-HCl)

Ce buffer de réhydratation est comparé à l'H₂O.

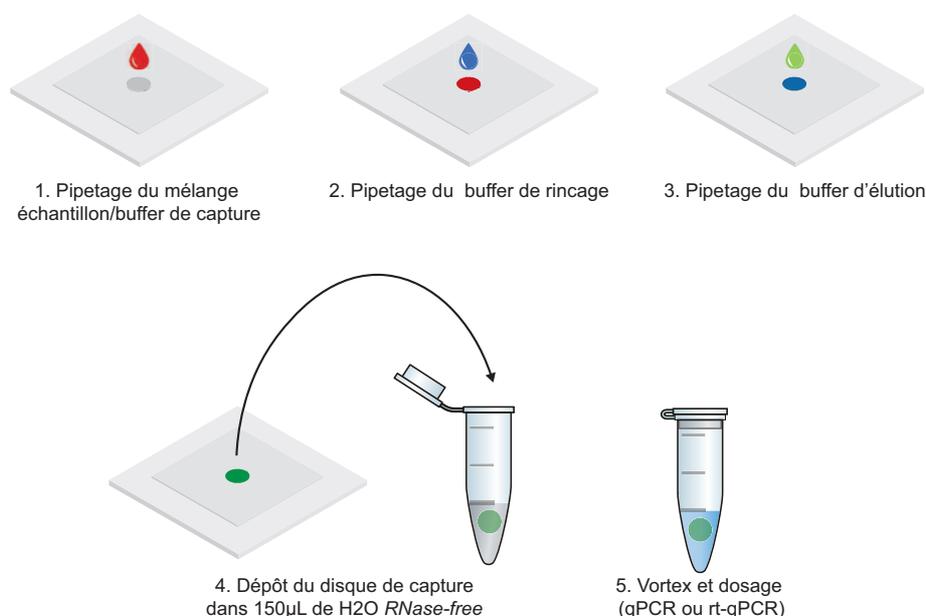


FIGURE 4.17

Name	CP	Concentration	elution efficiency
Sigmavirus (1E3/µL) GF extraction, w/o elution	31.54	6.49E+01	no elution
Sigmavirus (1E3/µL) GF extraction, H ₂ O elution	∅		100%
Sigmavirus (1E3/µL) GF extraction, rehy buffer elution	32.4	2.94E+01	45%
Sigmavirus (1E3/µL) ZYMO column	32.23	3.44E+01	

TABLE 4.3

Pour un échantillon contenant ($10^3/\mu\text{L}$), le buffer de réhydratation élue 45% de l'ARN. Dans le disque élué à l'H₂O, l'ARN n'est plus détectable. On suppose que la majorité a été élué.

Plusieurs expériences de ce type ont été reproduites et montrent la même tendance. Les travaux décrivant les mécanismes de l'extraction sur colonne, précisent bien l'importance d'éluier les ARN avec de l'H₂O RNase-free ou un tampon Hypotonique.

Enfin, des expériences proches ont été réalisées à la CIBU par nos collaborateurs, tentant d'éluier des colonnes de silices avec le tampon de réhydratation. Leurs résultats montrent là aussi que le tampon de réhydratation a des capacités d'éluion très limitées.

4.3.3 Extraction d'ARN et détection sur le dispositif papier

Les premiers couplages capture sur GF/réhydratation de disques de détections de GF sont réalisés. Au début du projet, on lyophilise uniquement en utilisant le kit ISO004, dont on ne contrôle pas la composition. On est donc forcé d'éluier et réhydrater avec le tampon de réhydratation fourni dans le kit (figure 4.1). Le développement de notre lyophilisation maison nous permet de modifier nos tampons d'éluition, en tentant d'approcher au maximum les recommandations (H₂O +/- Tris-HCl à 10 mM).

De même au début du projet, on réalise une rt-LAMP par disque, notre dispositif prend donc la forme d'un système à 4 disques, Un pour chaque pathogène (ZIKV, DENV et CHIKV) et un contrôle positif, permettant de s'assurer du bon fonctionnement du test. Selon le premier protocole de la section 4.1.2, on capture l'ARN sur le disque GF du volet de capture, puis, refermant le volet de capture sur le volet d'amplification (composé des quatre disques réactionnels), on élue le disque de GF. L'éluat se répartit alors grâce à une croix en fibre de verre (Std17 *Whatman*) dans les quatre disques réactionnels. Le développement de la méthode QUASR nous permettra de passer de quatre disques à deux disques en réalisant un duplex QUASR par disque (figure 4.5). Cela simplifie la fabrication du test (on retire la croix de répartition) et permet de gagner en sensibilité en divisant moins l'éluat.

On continue notre optimisation en utilisant le Sigmavirus comme preuve de concept, pour pouvoir manipuler facilement en dehors d'un laboratoire de niveau 2. La rt-LAMP sigmavirus est lyophilisée dans chaque disque. Le "quadruplex" ou "duplex" détecte ainsi plusieurs fois la même cible, ce qui permet de nous assurer la bonne répartition de l'éluat entre les disques réactionnels.

Enfin, la fabrication des dispositifs est assez complexe, et comprend de nombreuses étapes. Les principaux échecs au début du développement du dispositif sont liés à la non-détection du sigmavirus pour de multiples raisons : mauvaise lyophilisation, dégradation des ARN lors de la préparation, inhibition de la rt-LAMP par des composants de l'échantillon ou des buffers de lyse et rincages. Par conséquent, on ne réalise pas systématiquement d'extraction de contrôles négatifs (sans Sigmavirus) avant d'avoir mis au point un test efficace. Les résultats intermédiaires présentés ici ne comportent pas, pour la plupart, d'extraction de contrôles négatifs. Bien entendu, les résultats finaux (figures 4.21 et 4.22) en comportent.

Extraction de Sigmavirus pur (non suspendu dans un échantillon biologique)

Les premiers tests sont réalisés en capturant l'ARN de Sigmavirus suspendu dans une solution de PBS, évitant ainsi la présence d'inhibiteurs dans "l'échantillon".

Importance du rinçage au RNasecure Le développement de la préparation d'échantillon sur papier est d'abord réalisé avec de l'ADN. Les premières transpositions à l'ARN sont infructueuses, on n'observe pas d'amplification. En s'inspirant d'un protocole de Gootenberg et al. [87], on tente de rincer les disques de GF et la croix de répartition de Std17 RNasecure (*Invitrogen*), pour les rendre *RNase-free*.

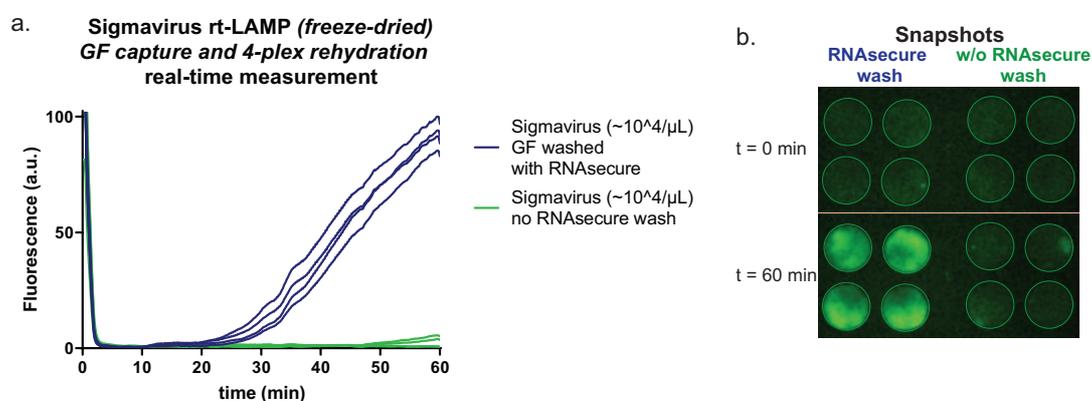


FIGURE 4.18 – Etude du rinçage des disques GF croix de répartition Std17 au RNasecure (a)

Le système non rincé au RNasecure ne montre aucune amplification. En revanche, dans le dispositif rincé, on observe une amplification de l'ARN de sigmavirus. On peut supposer que dans le dispositif non rincé, l'ARN de Sigmavirus est dégradé par des RNases présentes sur le disque GF et sur la croix de répartition.

Les disques de GF et les croix de répartitions Std17 sont systématiquement rincés au RNasecure dans la suite du manuscrit.

Élution en un ou deux temps Selon les expériences et références évoquées en section 4.3.2, on estime que la capacité d'élution du tampon de réhydratation n'est pas idéale. Ce tampon est fourni sous une forme concentré (3/5 X), resuspendue à 1X avant l'élution/réhydratation des expériences précédentes. Un élution en deux étapes est évaluée, d'abord avec 32μL d'H₂O, puis 48μL de tampon de réhydratation (3/5 X). Ainsi, une partie de l'élution se fait dans des conditions idéales, avec de l'H₂O pure.

La cinétique d'amplification des quatre disques du système élué en deux temps est la plus rapide ($mTt_{50} = 26,5$ min vs. 33,4 min élué en un temps). Cette méthode, ajoutant une étape, n'est pas forcément souhaitable dans le protocole final, mais illustre bien encore une fois, la supériorité de l'élution à l'H₂O pure par rapport au tampon riche en sels.

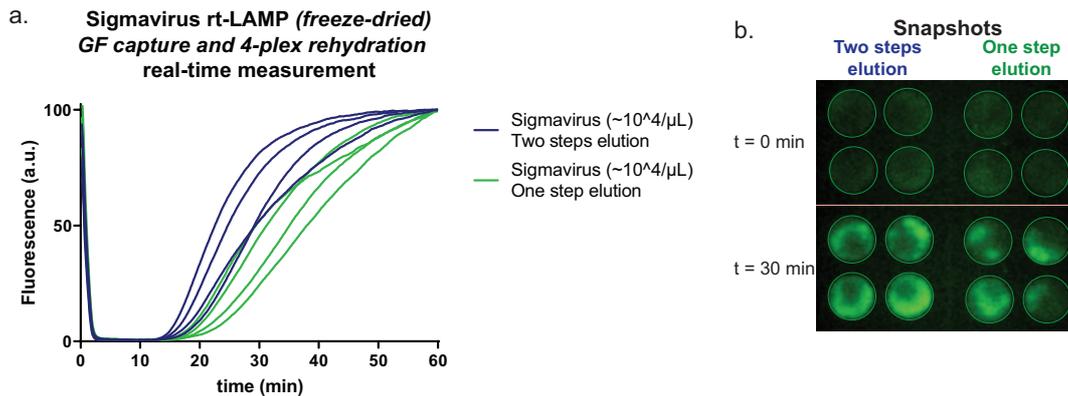


FIGURE 4.19 – Ajout d'une étape d'éluion à l'eau RNase free

Extraction de Sigmavirus dans une matrice biologique (Serum ou Plasma)

Dans un second temps, le Sigmavirus est mélangé à du plasma ou du sérum à raison de 20 μ L de Sigmavirus dans 30 μ L de plasma ou sérum. Cet "échantillon" contient donc des inhibiteurs d'amplifications, et ressemble d'avantage à un échantillon réel.

L'ajout de plasma humain ou de sérum de veau foetal (FBS) inhibe toute amplification selon notre protocole adapté du kit *Zymo* (figure 4.20.a et b). D'autres protocoles et d'autres tampons sont transposés à notre système notamment le QIAamp Viral RNA Mini Kit *QUIAGEN*. Ce kit, transposé selon le protocole décrit en section 4.1.2 s'avère être efficace pour la préparation d'échantillon contenant du plasma et du sérum (figure 4.20.c et d). Il est étudié dans la suite du manuscrit.

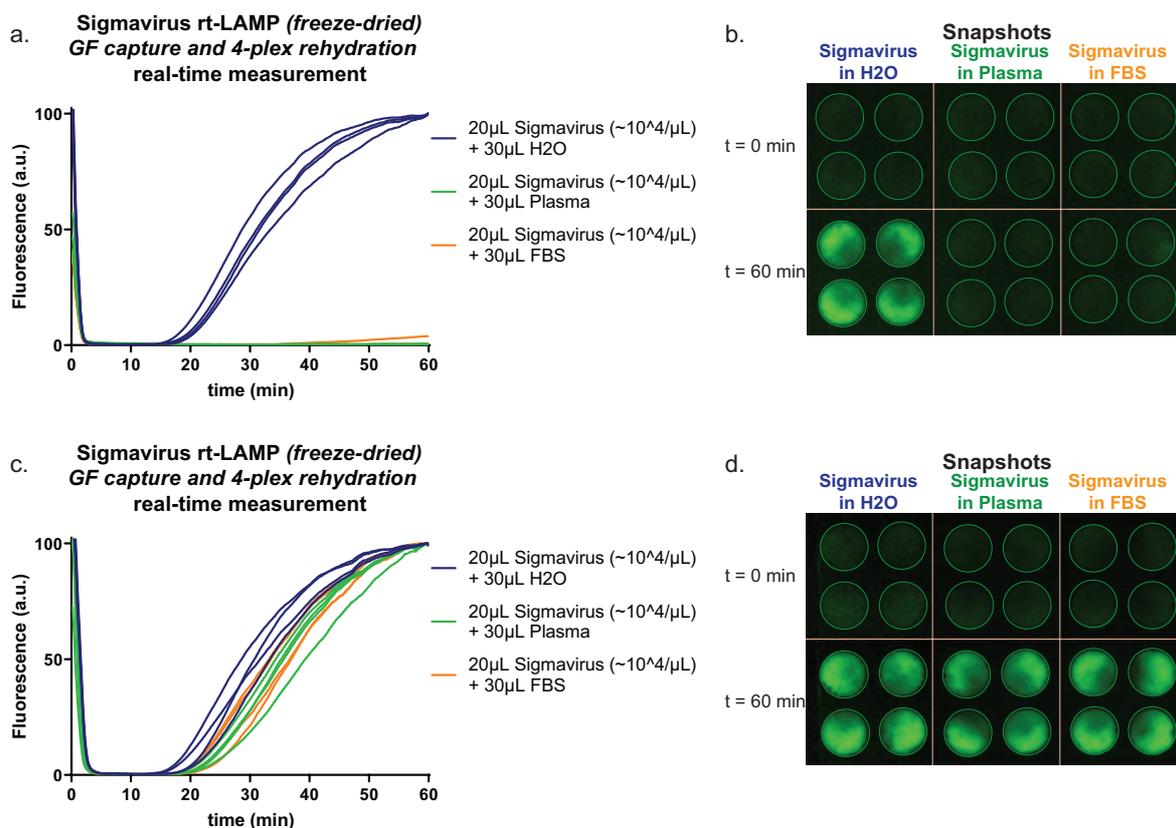


FIGURE 4.20 – Comparaison des protocoles Quiagen et ZYMO pour la préparation d'échantillon de plasma et serum.

Optimisation du protocole Quiagen.

Capture sur disque de silice. L'extraction d'acide nucléique sur colonne se fait habituellement sur des colonnes de silice. Pour s'approcher au maximum d'une colonne classique, un volet de capture est fabriqué en utilisant un disque de silice (récupéré sur une colonne QIAGEN) à la place du disque de GF. Les deux systèmes sont comparées en figure 4.21.a. L'extraction sur membrane de silice semble moins efficace, selon nos conditions expérimentales ($mTt50 = 44,6$ min pour l'extraction sur Silice contre 35,0 min sur GF).

Cette expérience a été répétée un grand nombre de fois et les résultats sont toujours semblables. La moindre efficacité de la silice pourrait provenir de sa conformation moins condensée, plus spongieuse, qui la rend plus difficile à sécher et éluer.

Volume de l'échantillon. Le volume extrait est augmenté (de 50 à 140 μ L). A quantité de Sigmavirus égale (20 μ L de la solution mère), la part de sérum/plasma dans nos "échantillons" passe de de 60 à 85%, s'approchant plus d'échantillons réels. La taille du disque de GF est elle aussi augmentée (de 4 à 7mm de diamètre) pour permettre un débit de filtration plus important. L'amplification est toujours nette ($mTt50 = 43,1$ min).

L'extraction d'un contrôle négatif, ne contenant pas de Sigmavirus, permet de vérifier la spécificité du test (figure 4.21.b).

Des préparations d'échantillons de 140 μ L sont réalisées avec FBS et plasma figure 4.21.c. Elles permettent la détection du Sigmavirus (*mTt50* aux alentours de 42 min). Dans cette série d'expériences, l'un des disques de la préparation d'échantillon de plasma montre une cinétique d'amplification plus lente que les autres. Ce phénomène est visible lorsque la réhydratation ne se fait pas de manière symétrique. La répartition du premier éluat (36 μ L d'H₂O) est asymétrique, certains disques récupèrent moins d'ARN élué que les autres. Si la répartition du tapon de réhydratation est asymétrique, les concentrations finales en sels seront différentes de la concentration optimale, affectant les performances de la lyophilisation.

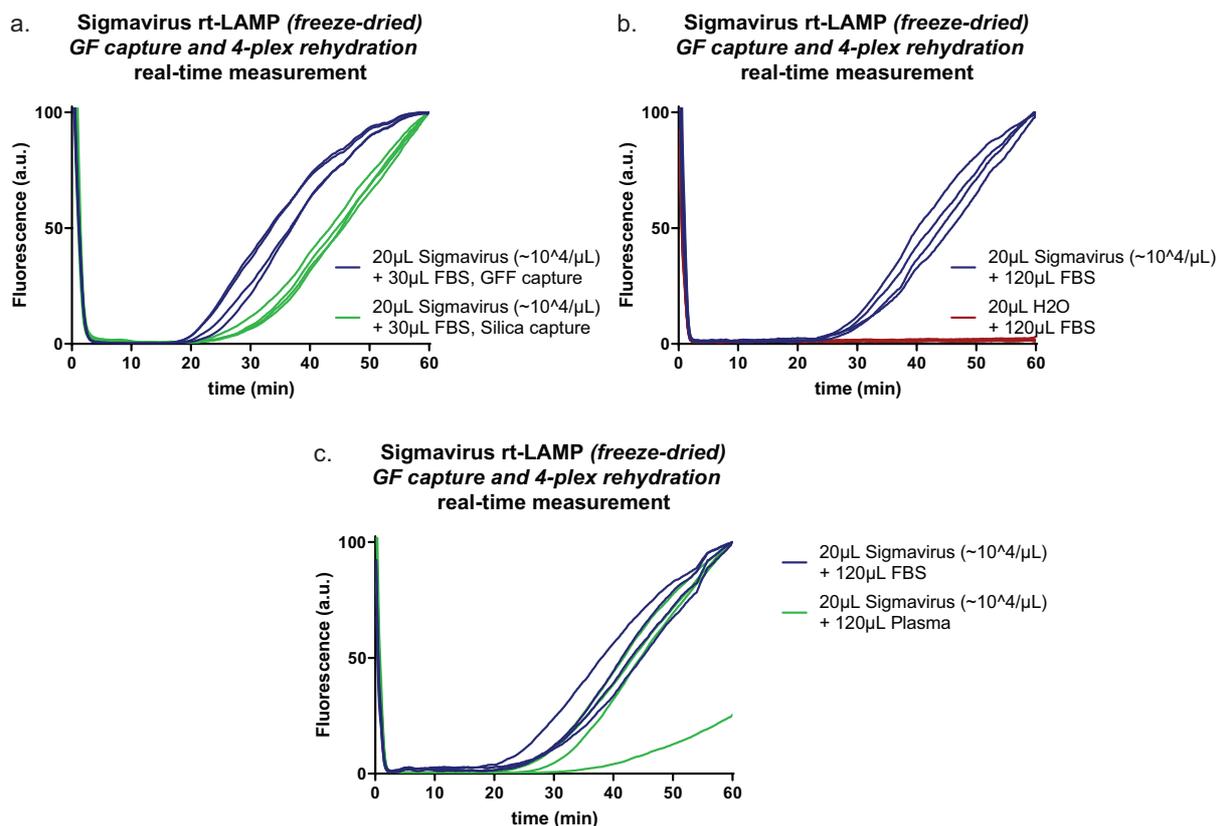


FIGURE 4.21 – Optimisation du protocole de capture (a)comparaison entre GF et membrane de silice pour la capture (b)préparation d'un échantillon de 140 μ L (c)échantillon de 140 μ L, comparaison FBS et Plasma.

Pour ces raisons, et grâce au multiplexage QUASR, un système à deux disques est développé, permettant une élution/réhydratation directe du disque de capture aux disques réactionnels.

Optimisation du dispositif duplex

La capture du système à deux disques se fait sur une languette de GF de 3,25 mm sur 10,5 mm. Ces dimensions permettent le contact direct entre la languette et les disques de GF lors du pliage du dispositif. Ainsi, l'ARN capturé s'élué dans les disques réactionnels sans passer par un étage intermédiaire, qui pourrait en retenir une partie par effet chromatographique.

Les différentes méthodes d'éluions sont testées, et la lyophilisation maison, nouvellement mise au point, est évaluée.

Une lyophilisation du kit ISO004 et une lyophilisation maison sont réalisées pour les rt-LAMP Sigmavirus. Pour chaque lyophilisation, deux modes de d'éluion/réhydratation sont comparés, en un temps (tampon de réhydratation 1X) ou deux temps (H₂O d'abord puis tampon de réhydratation concentré).

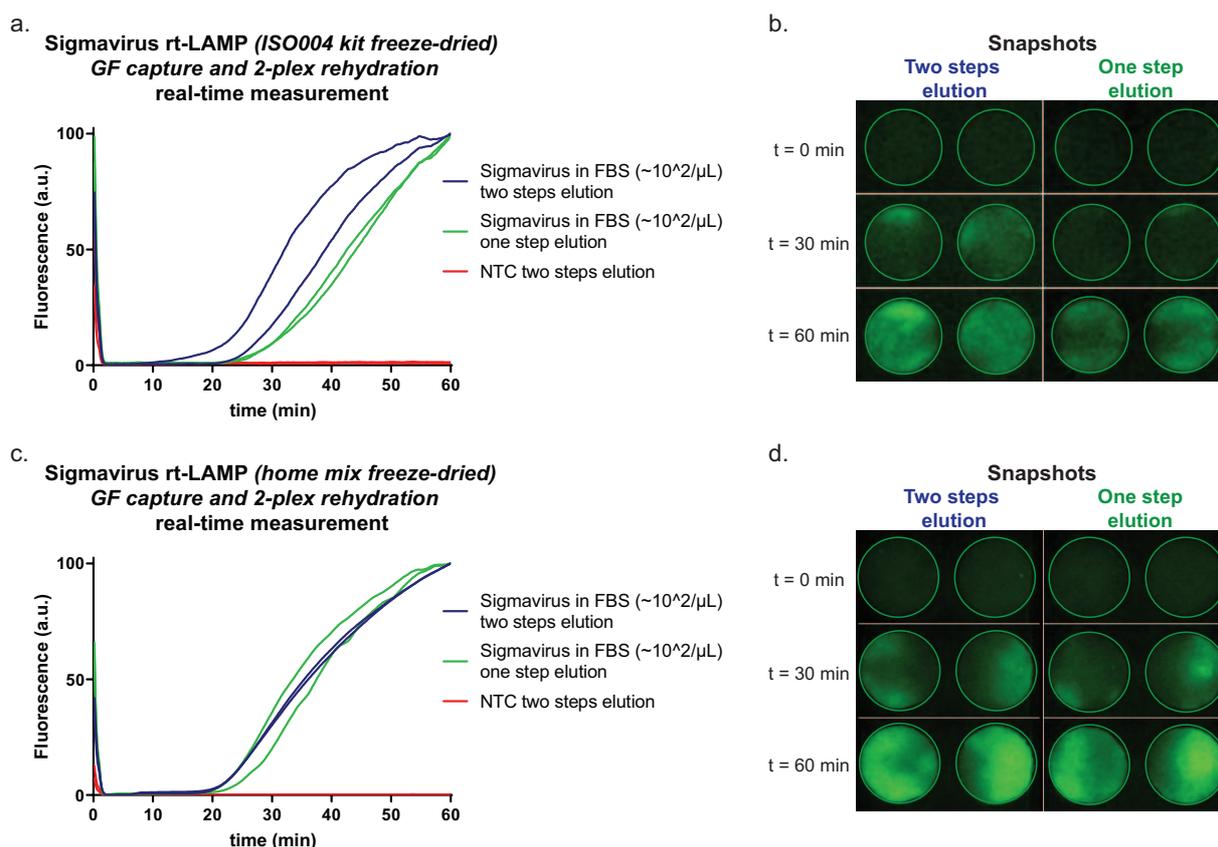


FIGURE 4.22 – Dispositif à deux disques (a)rt-LAMP Sigmavirus lyophilisé avec le kit ISO004. réhydratés en une ou deux étapes (b) rt-LAMP Sigmavirus lyophilisation maison. réhydratés en une ou deux étapes.

kit ISO004-RT. Pour les kits ISO004-RT, l'éluion/réhydratation en deux temps semble être plus efficace (figure 4.22). On observe une cinétique de réaction plus rapide ($mTt_{50} = 35,5$ min vs 43,3 min pour éluion/rehy. en un temps)

Lyophilisation maison. Pour les lyophilisations maison, MgSO₄ et bétaine sont lyophilisés dans les disques. L'élution/réhydratation se fait seulement avec le iBuffer. On observe que les éluions/réhydratations en un temps ou deux temps ont des cinétiques similaires (*m*Tt50 resp. de 35,5 min et 35,8 min). L'absence de MgSO₄ et de bétaine dans le tampon d'élution/réhydratation de la lyophilisation maison pourrait améliorer ses capacités d'élution.

Le système de préparation d'échantillon à deux disques, lyophilisés maison, réhydraté en un temps, semble être le plus avancé et efficace des systèmes développés durant les travaux de thèse. On adapte ce système au triplex ZIKV/DENV/CHIKV démontré en section 3.4.4.

Dispositif papier *sample-to-answer* pour la détection de Zika, Dengue et Chikungunya.

Les premiers dispositifs papiers couplant préparation d'échantillon et amplification rt-LAMP QUASR Dengue/Zika/Chikungunya sont testés (figure 4.23.a). L'ARN des pathogènes Dengue, Chikungunya et Zika est mélangé à du sérum, et une préparation d'échantillon selon le protocole du système à deux disques est réalisée. Ces résultats préliminaires sont présentés en figure 4.23.

Un signal QUASR Texas Red est observé dans le le disque 1 uniquement en présence d'ARN de dengue dans l'échantillon extrait (figure 4.23.c), et dans le disque 2 uniquement en présence d'ARN de Chikungunya (figure 4.23.d). De même on observe un signal QUASR FAM dans le disque 1 en présence d'ARN de Zika dans l'échantillon (figure 4.23.d). Le disque 2 montre systématiquement une amplification QUASR FAM de l'ADN lyophilisé au préalable (contrôle positif), validant chacun des test (figure 4.23.f).

Un bruit de fond du signal QUASR supérieur à celui des expériences sans préparation d'échantillon est visible, notamment pour la rt-LAMP Zika. Il pourrait être dû à la présence résiduelle de molécules du sérum ou des tampons utilisés, qui affecterait la réaction LAMP, ou l'interaction entre l'amorce QUASR et son quencher. Des molécules protectrices rapportées comme le PVP, le PVA [133] [134] ou le polyéthylène glycol cite-brevetRPA pourraient être ajoutées au lyophilisat pour lever cette interaction.

4.3.4 Mise en place de protocole sans extraction en phase solide

Des alternatives à l'étape d'extraction de l'ARN sont envisagées. Plusieurs travaux mentionnent que la réaction LAMP est moins sensible aux inhibiteurs que la PCR [123] [135]. Il serait alors possible de réhydrater directement le mélange réactionnel lyophilisé avec l'échantillon. Celui-ci pourrait être plus ou moins dilué ou chauffé pour inactiver une partie des inhibiteurs, mais la préparation d'échantillons serait grandement simplifiée.

Comparaison des enzymes GspSSD2.0 et Bst3.0

Toutes les publications reportant des LAMP directement réalisées sur du sang ou du plasma, utilisent les enzymes *NEB* Bst, et diluent l'échantillon environ 10 fois. L'enzyme BSt3.0 est spécifiquement vendue par *NEB* comme étant plus résistante aux inhibiteurs².

2. <https://international.neb.com/products/m0374-bst-3-0-dna-polymerase>

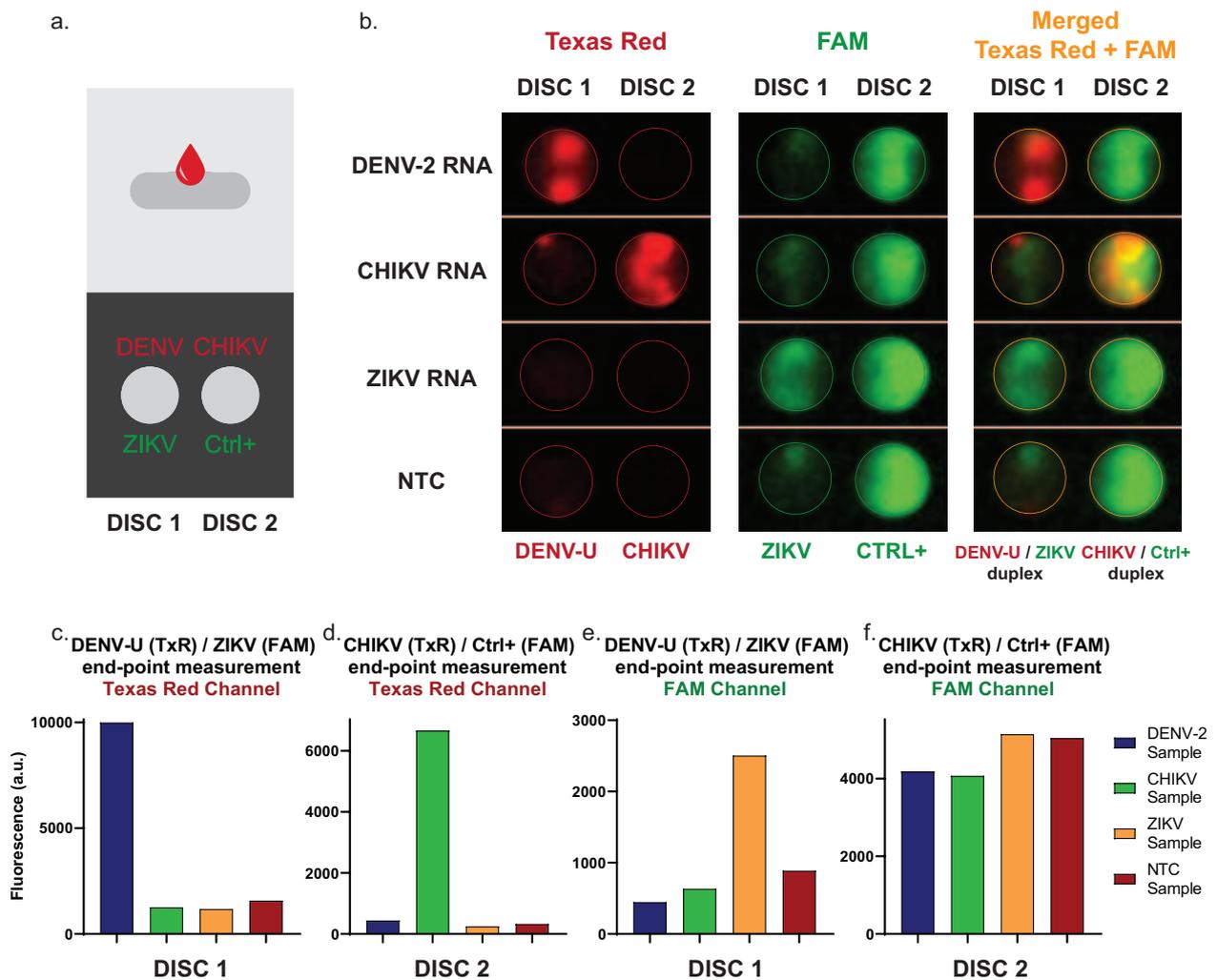


FIGURE 4.23 – Extraction et amplification sur dispositif papier d'ARN de DENV-2, CHIKV ou ZIKV spikés dans du sérum. (a) Schéma représentant le dispositif (triplex QUASR sur deux disques + contrôle positif) (b) Images montrant le signal QUASR en point final des quatre dispositifs testés pour chaque pathogène (50 μ L de sérum contenant 10^4 brins/ μ L d'ARN du pathogène concerné). (c) Mesure QUASR Texas Red pour le disque 1 : rt-LAMP DEN-U. (d) Mesure QUASR Texas Red pour le disque 2 : rt-LAMP CHIKV. (e) Mesure QUASR FAM pour le disque 1 : rt-LAMP ZIKV. (f) Mesure QUASR FAM pour le disque 2 : LAMP ctrl+ (S. aureus).

Les enzymes Bst 2.0, Bst 3.0 et GspSSD 2.0 sont donc comparées pour une rt-LAMP Sigmavirus, avec ou sans 10% de plasma en figure 4.24.

A 10^4 virus/réaction, la rt-LAMP Bst2.0 est inhibée par la présence de plasma. Pour la Bst 3.0 et la GspSSD 2.0, les cinétiques d'amplifications sont similaires avec et sans plasma. On observe cependant une cinétique plus rapide pour la GspSSD 2.0 ($mTt50 = 28,8$ min vs 44,1 min pour Bst 3.0).

A 10^3 virus/réaction, la rt-LAMP Bst2.0 ne montre aucune amplification. La rt-LAMP Bst 3.0 est plus lente et un des duplicats contenant 10% de plasma ne montre aucune amplification. La rt-LAMP GspSSD 2.0 a une cinétique semblable avec et sans plasma ($mTt50$ resp. de 39,3 et 42,0 min).

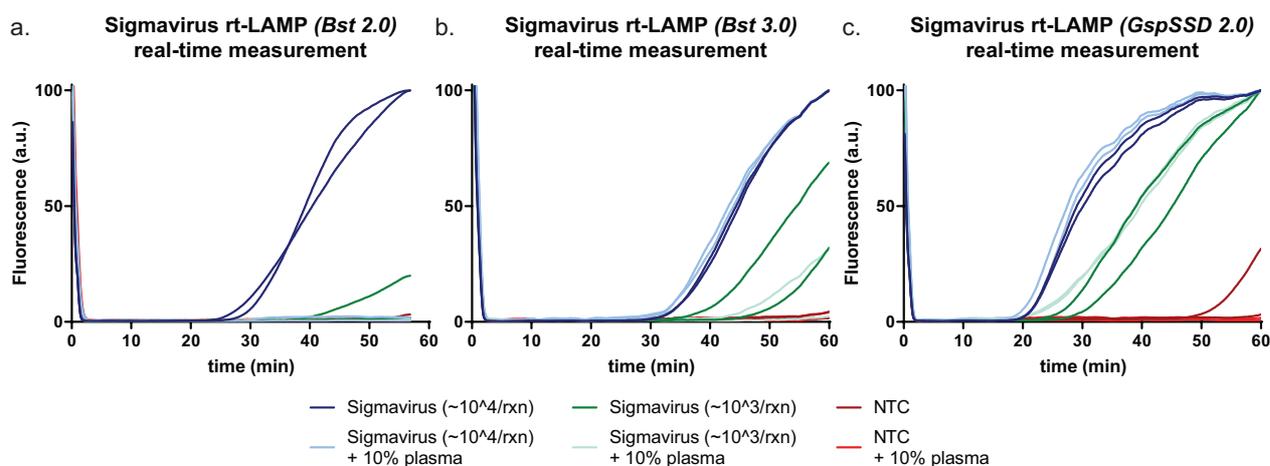


FIGURE 4.24 – Comparaison des performances de la rt-LAMP Sigmavirus en présence d’inhibiteurs (a) Sigmavirus (10^4 et 10^3 virus/réaction), polymérase GspSSD 2.0, +/- 10% plasma (b) Sigmavirus (10^4 et 10^3 virus/réaction), polymérase Bst 3.0, +/- 10% plasma

Dans nos conditions expérimentales, La rt-LAMP GspSSD 2.0 semble donc plus sensible. Non seulement, la présence de 10% de plasma ne semble pas affecter l’activité de l’enzyme mais on observe aussi que la lyse de la capsid virale (au moins pour Sigmavirus) n’est pas nécessaire. On peut supposer qu’à 65°C, la température est suffisante pour permettre le désassemblage des protéines de la capsid et permettre l’accès du matériel génétique viral au réactifs rt-LAMP.

La possibilité de réaliser une amplification rt-LAMP sans préparation d’échantillon préalable simplifierait grandement le test. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer sa faisabilité avec d’autres types de matrices (sang, urine, salive, etc..), la proportion maximale d’échantillon n’inhibant pas la réaction, et la limite de détection associée. En effet, le fait de diluer l’échantillon limite le volume maximal à tester. Dans nos diques de 18µL on teste ici 1,8 µL d’échantillon au maximum. La sensibilité du test peut alors être affectée. A l’inverse, le volume traité avec l’usage du volet de capture peut être bien supérieure (~200µL).

On pourrait donc imaginer deux types de tests incluant ou non les étapes de captures en fonction de la sensibilité requise. Si l’ADN/ARN cible est présent en grande quantité dans l’échantillon ($>10^3$ brins/µL), une dilution 1/10 dans le buffer de réhydratation serait suffisante. Si la concentration en ADN/ARN cible est plus faible, une étape de capture serait nécessaire.

Ce qu’il faut retenir.

- Nous avons développé une procédure de lyophilisation des réactifs rt-LAMP sur papier dont la durée de vie est supérieure à un mois (limite de détection $\leq 10^3$ brins

d'ARN/réaction). Nous avons validé cette méthode de lyophilisation dans le cas de notre test Zika/Dengue//Chikungunya/Ctrl+ en rt-LAMP QUASR. Cette procédure peut encore être améliorée par l'élimination totale de glycérol dans la composition du lyophilisat.

- Nous avons développé une procédure d'extraction d'ARN sur disque de fibre de verre GF, permettant la capture d'ARN de Sigmavirus, sa répartition et son amplification spécifique dans 4 ou 2 disques.
- Un point clé dans l'élaboration de notre dispositif a été mis en exergue. En effet, l'élution des ARN capturés est optimale avec de l'H₂O *RNase-free* mais il est difficile de lyophiliser les sels et détergents de rt-LAMP dans les disques de réactions. Un équilibre est trouvé dans le cas de la lyophilisation maison où l'on ajoute MgSO₄ et bétaine au lyophilisat. L'élution/réhydratation avec les sels restant (iBuffer) semble alors aussi efficace que l'élution à l'H₂O.
- Enfin, une méthode de préparation très simplifiée consistant à diluer 10 fois l'échantillon dans le mélange réactionnel a été récemment explorée. Les résultats montrent que la rt-LAMP n'est pas inhibée dans ces conditions. La quantité d'échantillon est cependant plus faible, ce qui affecte la limite de détection du test.
- Des expériences préliminaires ont été menées, avec notre système couplant préparation d'échantillon et détection multiplexée, sur des échantillons de sérum contenant de l'ARN des virus Zika, Dengue et Chikungunya. Elles montrent que le dispositif papier permet une détection spécifique de ces trois cibles. Des tests sur des échantillon contenant les virus en question sont prévus à l'institut Pasteur, et permettront d'envisager une application sur le terrain à la Réunion.

Chapitre 5

Dispositif papier pour le diagnostic multiplex de pathogènes vétérinaires : étude préliminaire.

Contents

5.1	Matériels et méthodes	143
5.1.1	Design et choix des amorces LAMP	143
5.2	Design d'amorces (rt-)LAMP pour le diagnostic du coryza. .	143
5.2.1	Design in silico	144
5.2.2	Validation expérimentale.	145

Nous avons développé un test sur papier détectant des pathogènes pour le diagnostic humain. Un grand nombre d'autres applications sont envisageables pour un tel dispositif, dont voici quelques exemples :

- Détecter la présence de champignons ou parasites de la plante (notamment pour la culture de la vigne) ;
- Détecter la présence de pathogènes contaminant les produits agro-alimentaires ;
- Différencier génétiquement la provenance de produits agroalimentaire (différencier viande de boeuf et viande de cheval, lait de chèvre et lait de vache, détecter la présence d'OGM, etc) ;
- Détecter la présence de pathogènes chez les animaux, que ce soit des animaux d'élevages (mammites de la vache à lait, diarrhée néonatale du veau, etc) ou des animaux de compagnie (infections des chiens, chats, etc) ;

Durant le travail de thèse, nous avons initié le développement d'une application vétérinaire : un test permettant le diagnostic multiplexé des pathogènes du coryza du chat.

Le coryza est une rhinotrachéite du chat (inflammation des voix respiratoires supérieures) de cause infectieuse, caractérisée par une toux, des éternuements violents et répétés, un larmolement et une respiration bruyante. C'est une affection courante qui peut être due à trois pathogènes, L'Herpèsvirus félin (FHV-1), le Calicivirus félin (FCV) et la bactérie *Chlamydia felis* (*C. felis*). Les caractéristiques principales de ces pathogènes sont décrites en figure 5.1.

L'identification du pathogène responsable se fait par (rt-)PCR. Un prélèvement de cellules buccales est réalisé, envoyé dans un laboratoire d'analyse qui rend une réponse quelques jours plus tard. Du fait de la lenteur de cette procédure, ce diagnostic exact n'est pas réalisé de manière systématique dans les cabinets vétérinaires. Pourtant, il serait intéressant de connaître le pathogène responsable du coryza, autant pour des raisons thérapeutiques (administration d'une thérapie antibiotique en cas d'infection à *C. felis*) que pour des raisons de prévention (quarantaine en cas d'infection à herpèsvirus si le chat fait partie d'un élevage).

Face à ce constat nous nous sommes donc penchés sur la faisabilité d'un tel dispositif en couplant amplification isotherme et microfluidique papier. S'inspirant de notre triplex Zika/Dengue/Chikungunya, nous avons entamé le développement d'un test de diagnostic multiplex sur papier Herpèsvirus félin/Calicivirus félin/*Chlamydia felis*.

La première étape nécessaire a été le design d'amorces (rt-)LAMP pour ces trois pathogènes, pour lesquels aucune (rt-)LAMP n'est encore publiée. Nous utiliserons donc le travail mené durant ce projet pour décrire en détail les démarches suivies, et les difficultés rencontrées lors du design et de la validation d'amorces LAMP.

5.1 Matériels et méthodes

5.1.1 Design et choix des amorces LAMP

Comme détaillé au chapitre 2, les étapes générales du design d'amorces LAMP sont les suivantes :

1. 1. Un alignement des génomes d'intérêt est réalisé pour obtenir une séquence conservée de 500-1500bp.
2. 2. Le logiciel LAMP Designer est utilisé pour le design des amorces. 10 jeux d'amorces sont proposés par le logiciel.
3. 3. On sélectionne trois ou quatre de ces jeux d'amorces selon les critères suivants :
 - *Région amplifiée* : Sélectionner des jeux d'amorces amplifiant différentes zones de la séquence cible.
 - *Primers blast optimal* : Un primer BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est réalisé sur ncbi.com avec les amorces F3 et B3 encadrant la région amplifiée. L'algorithme BLAST va chercher dans la base de données ADN/ARN, des séquences qui pourraient être amplifiées par notre couple d'amorces. On s'assure qu'il détecte le maximum de séquences du pathogène d'intérêt et qu'il ne détecte pas d'autre séquence.
4. Les jeux d'amorces sélectionnés sont commandés et testés expérimentalement en utilisant le protocole standard de la CIBU 2.1 (c). On compare la limite de détection, la cinétique et la spécificité de ces jeux d'amorces.

5.2 Design d'amorces (rt-)LAMP pour le diagnostic du coryza.

Les trois pathogènes responsables du coryza sont la bactérie *Chlamydia felis* (*C. felis*), Le virus à ADN Herpesvirus félin (FHV-1) et le Calicivirus félin (FCV). Leurs caractéristiques principales sont décrites en figure 5.1.

Species	Type	Genome size
<i>Chlamydia felis</i> (<i>C. felis</i>)	Gram - bacteria	1.7 Mbp
<i>Feline Herpesvirus</i> (FHV-1)	dsDNA virus	134 kbp
<i>Feline Calicivirus</i> (FCV)	ssRNA virus	7.5 kbp

TABLE 5.1 – Caractéristiques des trois principaux pathogènes impliqués dans le Coryza du chat.

5.2.1 Design in silico

On réalise l'alignement des séquences sur le logiciel *CLC Genomics Workbench* en utilisant les génomes disponibles sur NCBI¹. On aligne la totalité des génomes de FHV-1 portant la mention *complete genome* sur NCBI (47 génomes). Pour *C. felis*, il n'existe qu'un seul génome complet séquencé. L'alignement du gène *ompA*, séquencé 6 fois en entier est donc réalisé. On aligne la totalité des génomes de FCV portant la mention *complete genome* sur NCBI (47 génomes).

Les caractéristiques de ces alignements sont disponibles en figure 5.1.a. et b.

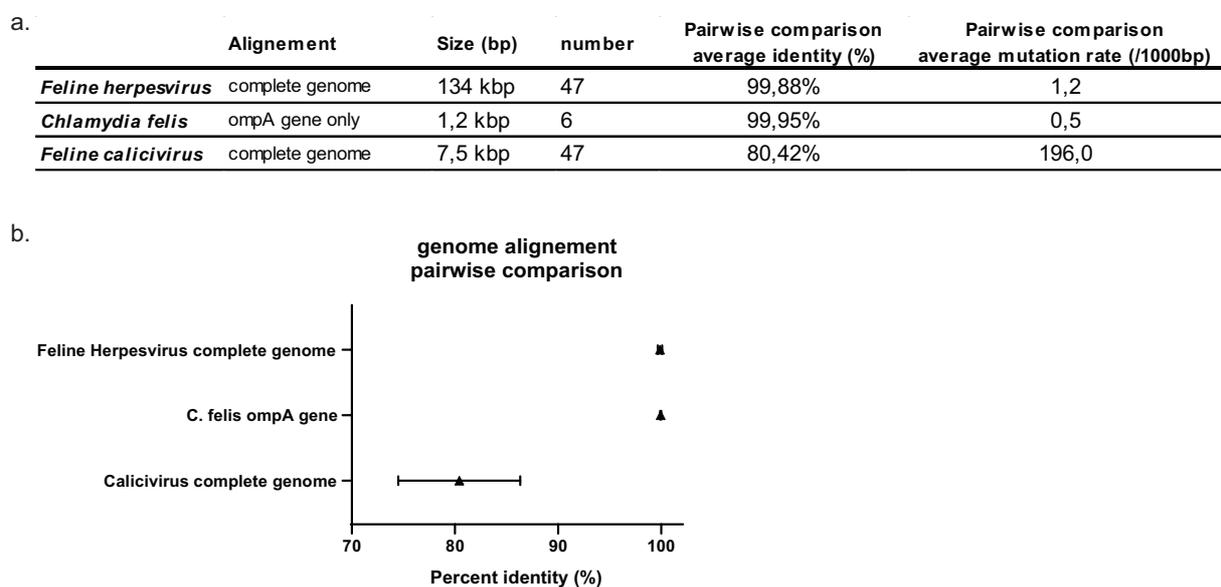


FIGURE 5.1 – Alignement des génomes complets d’Herpesvirus félin et de Calicivirus félin, et du gène *ompA* de *Chlamydia felis*. (a) Table récapitulant l’alignement et les comparaisons paire par paire (b) Moyenne et écart-type des pourcentage de similitudes.

Herpesvirus félin. Les différents génomes de FHV-1 sont tous très semblables, avec une différence moyenne entre deux génomes de 1,2 base toutes les 1000 bases. On choisit la séquence du gène de la "thymidine kinase" (TK) pour designer la LAMP FHV-1 (nucléotides 66480 à 67420). En effet ce gène est identique chez 100% des génomes alignés et est déjà reporté dans la littérature comme gène cible de PCR [136] [137].

Chlamydia felis. L’alignement des 6 séquences *ompA* montre une très forte conservation du gène entre les souches, avec une différence moyenne entre deux gènes de 0,5 base pour 1000 bases. *ompA* est lui aussi reporté dans la littérature comme gène cible de PCR, on le choisit donc pour designer la LAMP *C. felis* [136] [137].

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>

Calicivirus félin. L'alignement des génomes de Calicivirus montre une très grande variabilité. La comparaison paire par paire montre un score de ressemblance minimal de 74,3% entre deux des génomes, avec une différence moyenne de 196 bases pour 1000 bases, bien supérieure aux deux autres cibles.

Il nous est impossible de trouver une séquence de plus de 100 nt conservée chez tous les génomes. Une rt-LAMP détectant la souche de référence FCV-F9 en se basant sur le gène "capsid protein gene" (CPG) est désignée pour la preuve de concept.

Suivant le protocole décrit en 5.1.1, trois ou quatre jeux d'amorces sont commandés pour chaque pathogène cible. Les séquences de ces amorces sont reportées en annexes 6.6, 6.7, 6.8

Exemple de CF2 : En illustration, les séquences cibles du jeu d'amorces *C. felis* n°2 (CF2) ciblant le gène *ompA* sont montrées en figure 5.2.

Les amorces F3 et B3 sont flanquées de part et d'autre de l'amplicon. Les séquences F2 et B2 ciblées par les parties 3' des amorces FIP et BIP sont plus internes. Les séquences F1 et B1, permettent la formation des boucles de la structure *dumbbell* en s'hybridant avec les extrémités 5' F1c/B1c des amorces FIP/BIP. Enfin les amorces Loop, LF et LB, sont impliquées dans le déplacement des boucles des structures *dumbbell* permettant d'accélérer l'amplification.

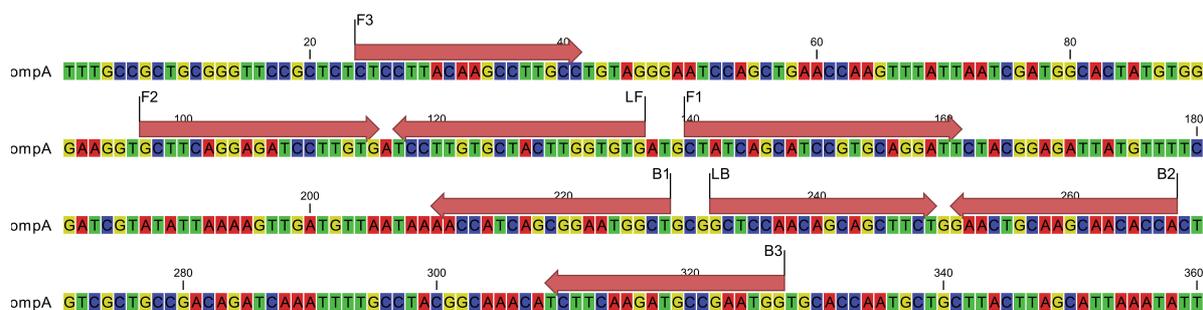


FIGURE 5.2 – Position des séquences cibles des amorces LAMP du jeu CF2 sur le gène *ompA*. Les amorces FIP et BIP sont composées resp. des séquences F1c/F2 et B1c/B2 bout à bout.

5.2.2 Validation expérimentale.

Génomes de références.

Il est difficile et onéreux d'obtenir des génomes ou souches de référence pour ces trois pathogènes. Nous décidons alors d'utiliser les souches vaccinales présentes dans trois vaccins disponibles : *Purevax RCPCh*, *Feligen CR* et *Versifel CVR-C*. Ils servent à la vaccination contre le Coryza, et contiennent les trois ou deux des trois pathogènes (table 5.2).

	Purevax RCPCh	Feligen CR	Versifel CVR-C
<i>Feline herpesvirus</i>	+	+	+
<i>Feline calicivirus</i>	+ (FCV-431, FCV-G1)	+ (FCV-F9)	+ (FCV-F9)
<i>Chlamydia felis</i>	+	-	+

TABLE 5.2 – Caractéristiques des trois vaccins utilisés pour valider la conception des amorces. Les vaccins Purevax RCPCh et Versifel CVR-C contiennent aussi une souche atténuée du virus de la pan-leucopénie féline.

Une extraction sur colonne des acides nucléiques contenus dans ces trois vaccins est réalisée selon le protocole de référence de la CIBU 2.1.1. Des (rt-)qPCR des trois pathogènes cibles (kits commerciaux *PrimerDesign*) sont réalisés sur les extraits permettant de doser les quantités d'ARN/ADN récupérées (table 5.3).

	Purevax RCPCh	Feligen CR	Versifel CVR-C
<i>Feline herpesvirus</i>	2,5E4/μL	1,3E6/μL	1,1E6/μL
<i>Feline calicivirus</i>	2,2E6/μL	7,9E4/μL	7,3E5/μL
<i>Chlamydia felis</i>	3,2E5/μL	0	1,1E6/μL

TABLE 5.3 – Quantification en (rt-)qPCR des différents génomes présents dans les trois vaccins utilisés.

On note la présence d'ARN de Calicivirus dans le vaccin Purevax RCPCh, alors que le virus y est sous forme inactivée (l'inactivation du virus n'a pas détruit l'ARN génomique)

Cinétiques et sensibilités.

On utilise des dilutions appropriées de ces extraits pour comparer dans un premier temps les sensibilités et les cinétiques d'amplification des jeux d'amorces. On considère aussi toute élévation de l'intensité de fluorescence dans les contrôles négatifs supérieure à 10% de l'intensité totale. Ces bruits de fond sont révélateurs de structures secondaires ou dimères formés par les amorces durant l'amplification et pouvant mener à des amplifications non spécifiques. Enfin la LAMP en tube est environ deux fois plus rapide que sur papier, les amplifications ne durent donc que 30 minutes.

LAMP FHV-1. Les trois jeux d'amorces (TK1, TK2 et TK3) ciblant le gène de la Thymidine Kinase du FHV-1 amplifient jusqu'à 100 brins par réaction en moins de 15 minutes (Tt50(100/rxn) resp. de 12, 8,75 et 10 min). Le plus rapide est le jeu TK n°2, mais on observe dans le contrôle négatif de ce jeu d'amorce une augmentation du bruit de fond au cours du temps (>13% de l'intensité maximale). Ce signal peut être due à l'hybridation des amorces entre elles formant des zones d'ADN double brin ciblées par l'intercalant. Ces hybridations peuvent conduire, dans le cas où elles impliquent l'extrémité 3' d'une amorce, à une amplification, générant là encore de l'ADN double brin. les jeux d'amorces dont les

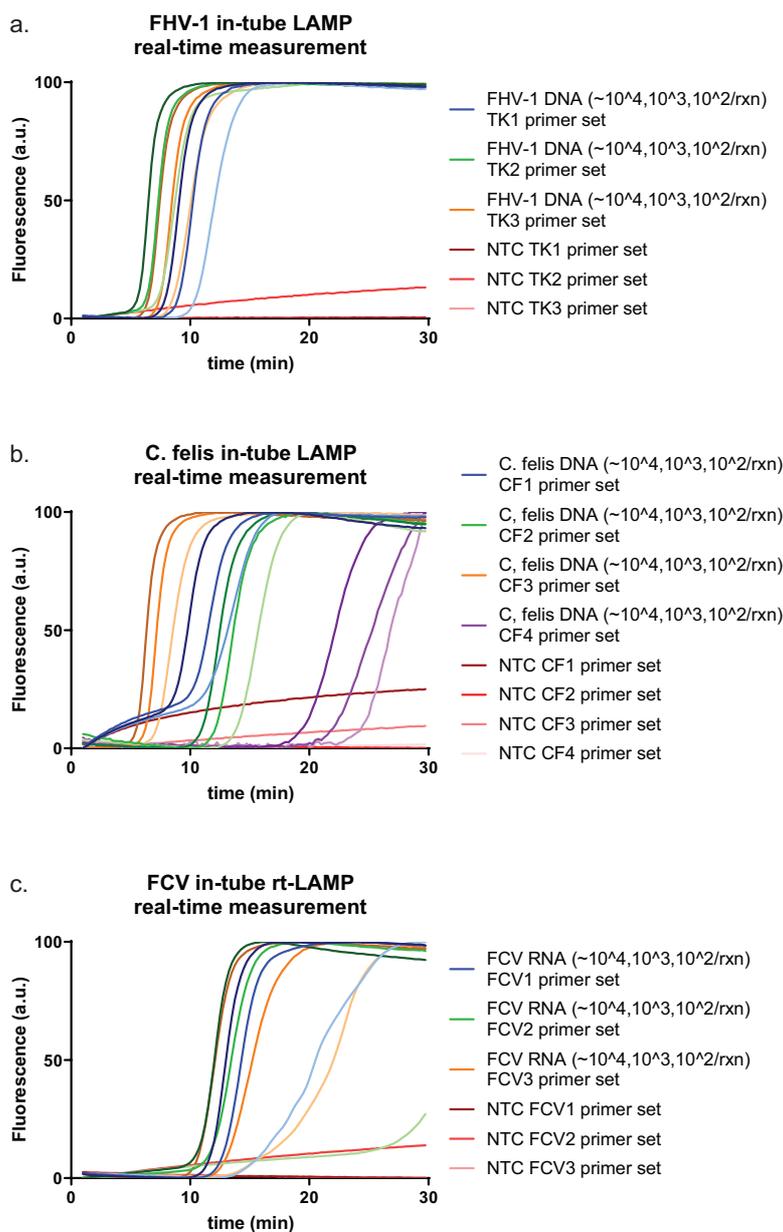


FIGURE 5.3 – Comparaison des différents jeux d’amorces pour les (rt-)LAMP FHV-1, C. felis et FCV. (a) comparaison des trois jeux d’amorces TK n°1 (en bleu) TK n°2 (en vert) et TK n°3 (en orange) (b) comparaison des quatre jeux d’amorces CF n°1 (en bleu) CF n°2 (en vert) CF n°3 (en orange) CF n°4 (en violet) (c) comparaison des trois jeux d’amorces FCV n°1 (en bleu) FCV n°2 (en vert) et FCV n°3 (en orange). Pour ces trois expériences, la nuance foncée symbolise 10^4 , la nuance intermédiaire 10^3 et la nuance claire 10^2 brins d’ADN/ARN cible par réaction.

contrôles négatifs génèrent un tel bruit de fond seront évités, car l’hybridation des amorces entre elles peut générer des amplifications non spécifiques et donc des faux positifs.

Une analyse sur les outils en ligne Multiple primer analyser et UNAFold (évoqués en section 3.1.1), pourrait apporter des indices quant au bruit de fond généré par les amorces. On observe grâce à cet outil, que le nombre de longs dimères d’amorces est plus élevé pour TK n°2 (table 5.4).

	<i>FHV-1</i>			<i>C. felis</i>				<i>FCV</i>		
	TK1	TK2	TK3	CF1	CF2	CF3	CF4	FCV1	FCV2	FCV3
probable dimers	2	6	1	4	7	1	4	4	7	1
3' end Hairpin	0	0	0	3	0	0	2	0	0	0

TABLE 5.4 – Récapitulatif du nombre d'hybridations rencontrées entre les amorces. On répertorie grâce au logiciel "multiple primer analysis" les dimères les plus probables ("optimal sensitivity" = 3). On répertorie grâce au logiciel "UNAFold", les structures *hairpin* impliquant plus de 4 nt de l'extrémité 3' de l'amorce formant une boucle.

LAMP *C. felis*. Les mêmes critères d'analyse, concernant les jeux d'amorces *C. felis*, montrent que les jeux CF3 et CF1 sont les plus rapides (Tt50(100/rxn) resp. de 8,5 et 13,25 min). On observe un fort bruit de fond (>25%) dans le contrôle négatif CF1 et un bruit de fond inférieur à 10% dans le contrôle négatif CF3. La prédiction de 3 structures *hairpin* impliquant l'extrémité 3' des amorces CF1 reportées en table 5.4 pourraient expliquer le fort bruit de fond observé pour ce jeu.

L'analyse des séquences grâce au logiciel UNAFold montre une caractéristique notable des primers FIP et BIP du jeu CF4. Ils forment des structures *hairpin* importantes impliquant plus de la moitié des bases, et dont les Tm calculés sont supérieurs à 60°C (figure 5.4). La présence de telles structures *hairpin* durant la réaction pourrait entraver leur hybridation avec l'ADN cible. Un tel phénomène expliquerait la lenteur de l'amplification du jeu CF4.

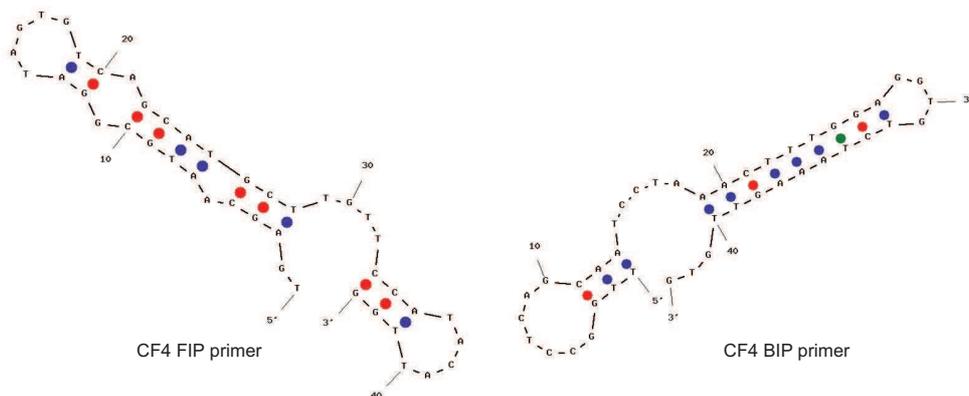


FIGURE 5.4 – Structures *hairpin* formées par les amorces FIP et BIP du jeu CF4. Ces images sont tirées du logiciel "UNAFold".

rt-LAMP FCV . La réaction rt-LAMP est plus lente du fait de l'étape additionnelle de rétro-transcription. Les jeux FCV1 et FCV3 ont une limite de détection au moins égale à 100 brins par réaction (Tt50(100/rxn) resp. de 20,5 et 22 min). La limite de détection du jeu FCV2 est supérieure à 100 brins par réaction. De plus on observe un bruit de fond (>13%) dans le contrôle négatif FCV2. Il pourrait s'expliquer par la présence d'un ou

plusieurs des 7 dimères probables recensés en table 5.4.

Spécificité

C. felis Sur les trois extractions de vaccin en notre possession, les vaccins Versifel CVR-C et Purevax RCPCh contiennent les génomes de FHV-1, FCV et *C. felis*. Le vaccin Feligen CR contient seulement les génomes de FHV-1 et FCV. Nous utilisons ce troisième extrait pour tester la spécificité des amorces de LAMP *C. felis*

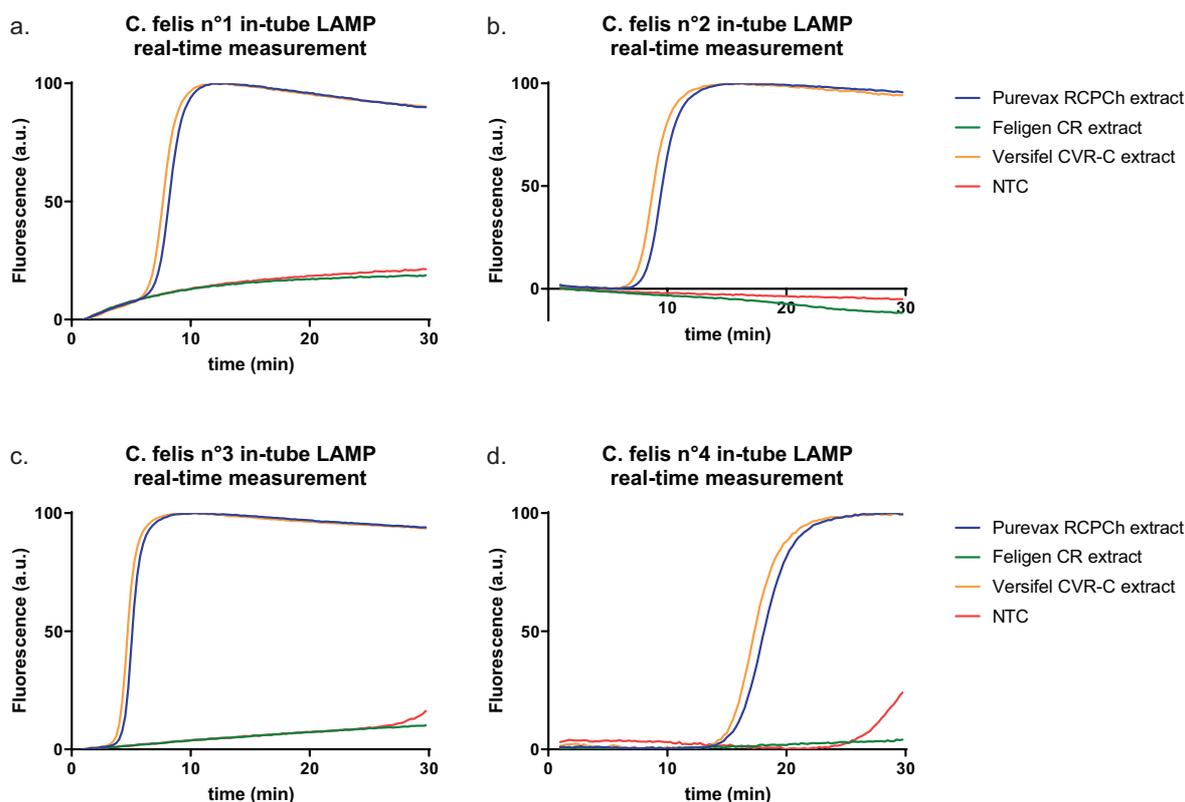


FIGURE 5.5 – Evaluation de la spécificité des amorces *C. felis*. (a) LAMP *C. felis* n°1 (b) LAMP *C. felis* n°2 (c) LAMP *C. felis* n°3 (d) LAMP *C. felis* n°4 en présence des trois extraits de vaccin *Coryza* dont deux seulement (Purevax RCPCh et Versifel CVR-C) contiennent de l'ADN de *C. felis*.

Les quatre jeux d'amorces amplifient clairement les extraits des vaccins Purevax RCPCh et Versifel CVR-C. On n'observe pas d'amplification des extraits de Feligen CR, ne contenant pas de *C. felis*. On note comme dans la figure précédente une augmentation du bruit de fond les jeux d'amorces n°1 et n°3. Comme précédemment, le jeu d'amorces n°4 est très tardif ($T_{t50} > 17 \text{ min}$) et on observe un début d'amplification non spécifique dans le tube contrôle négatif.

Parmi ces quatre jeux d'amorces, le jeu n°2 semblerait le plus approprié. Le tube contrôle négatif ne génère pas de bruit de fond, l'amplification est rapide, sensible et spécifique.

Calicivirus félin. La même expérience est réalisée pour évaluer la rt-LAMP FCV-F9

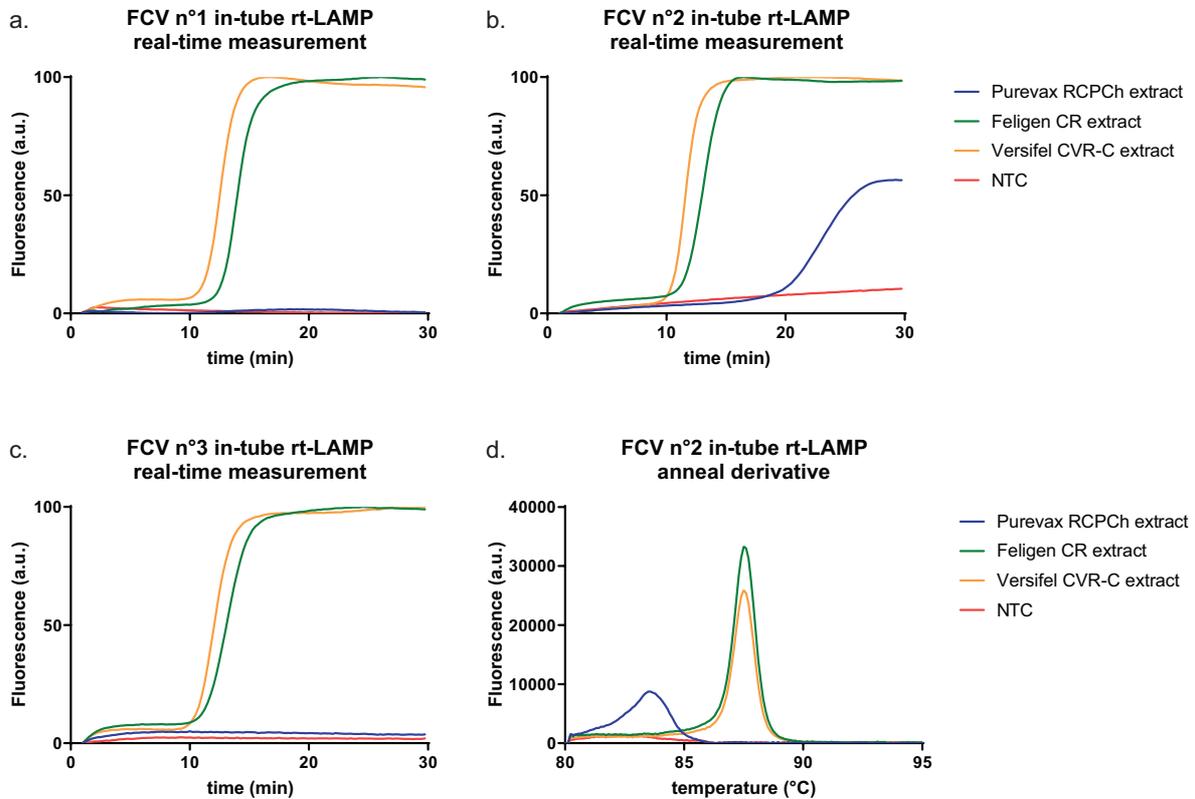


FIGURE 5.6 – Evaluation de la spécificité des amorces FCV-F9 (a)rt-LAMP FCV n°1 (b)rt-LAMP FCV n°2 (c)rt-LAMP FCV n°3 en présence des trois extraits de vaccin Coryza dont deux seulement (Versifel et Feligen) contiennent de l’ARN de FCV-F9. (d)dérivée de la courbe d’hybridation post-amplification pour la rt-LAMP FCV n°2.

Concernant les jeux FCV n°1 et n°3, on observe que l’amplification a lieu seulement pour les extractions Feligen CR et Versifel CVR-C contenant la souche FCV-F9 sur laquelle nos amorces sont désignées. L’absence d’amplification dans l’extraction Purevax RCPCh suggère que nos amorces sont spécifiques et ne réagissent pas avec les génomes de FHV-1 et de *C. felis*. Les amorces ne réagissent pas non plus avec l’ARN de FCV-431 et de FCV-G1, dont les génomes sont probablement trop éloignés de celui de FCV-F9.

Il aurait été intéressant de comparer les séquences cibles de ces trois souches mais celles de FCV-431 et FCV-G1 ne sont pas disponibles en ligne.

On observe une amplification tardive de l’extrait de Purevax RCPCh par le jeu d’amorce n°2. Les produits amplifiés dans les extraits Feligen CR et Versifel CVR-C possèdent tous deux une température de fusion de 87,6°C. Le produit amplifié dans l’extrait Purevax RCPCh possède une température de fusion différente (83,5°C), suggérant qu’il est différent des deux autres (figure 5.6.d). Il pourrait s’agir d’une amplification non spécifique de tout autre séquence présente dans le vaccin, ou générée par les amorces elles-mêmes.

Ce qu'il faut retenir

- Cette première approche du design d'amorces LAMP nous a permis de nous familiariser avec le concept de la réaction LAMP et de comprendre les enjeux et les différentes étapes du processus de design d'un jeu d'amorce. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer les jeux sélectionnés :

- Les jeux de LAMP FHV-1 TK1 et TK3 doivent être testés avec des ADN/ARN séparés de *C.felis*, FCV, et FHV-1 pour évaluer leur spécificité.
- Le jeu de LAMP *C. felis* CF3 pourrait être testé lui aussi avec des ADN/ARN séparés des pathogènes pour confirmer sa spécificité.
- Des tests sur plusieurs souches purifiées, puis échantillons, seraient nécessaires par la suite pour confirmer la validité clinique de ces jeux d'amorces.

- Prédire la formation des dimères et boucles formés entre les amorces durant la réaction LAMP serait utile. Les jeux d'amorces à risque d'amplifications non spécifiques seraient évités. Notre première approche basique alliant les outils Multiple primer analyser et UNAFold tool, et répertoriant les dimères et boucles formés par chaque jeu semble intéressante. On observe des incohérences, notamment pour le jeu CF2. On pourrait cependant raffiner cette méthode, en évaluant la "dangerosité" des dimères proposés par Multiple primer analyser (probabilité d'être présents en solution à 65°C, caractère amplifiable...). Une telle évaluation des jeux d'amorces pourrait être rajoutée à la phase de design, et permettrait d'éviter le *screening* expérimental d'un grand nombre de jeux d'amorces.

- Enfin cette expérience de design d'amorce nous permet de pointer aussi certaines limites de la technique LAMP. En effet, la grande taille de l'amplicon sur lequel 6 amorces doivent s'hybrider rend le design difficile pour les génomes hautement variables. Le cas du Calicivirus est ici exemplaire, et il nous est impossible de réaliser un jeu d'amorce détectant tous les Calicivirus.

Plusieurs solutions s'offrent à nous :

- On pourrait étudier l'épidémiologie des Calicivirus félins pour concevoir une RT-LAMP adaptée aux souches présentes sur un territoire donné (i.e. la France ou l'Europe de l'Ouest).
- Une autre solution serait de réaliser une LAMP multiplex, sur le principe de la LAMP dengue pan-sérotype de Teoh et al. [102] utilisant plus de 6 amorces. L'ajout d'amorces supplémentaires permettrait plusieurs scénarios d'amplifications possibles en fonction de la souche de Calicivirus présente.
- On pourrait imaginer utiliser des réactions alternatives à la LAMP comme l'HDA ou la RPA ou encore la CFPA [138], pour lesquels les amorces sont désignées de

manière similaire à une PCR. De cette manière on pourrait sélectionner une courte séquence à amplifier conservée par tous les variants. Dans le cas de la CFPA, utilisant la même enzyme que la LAMP, la température de réaction est identique. Les deux amplifications pourraient donc être réalisées sur deux disques d'un même multiplex. Une des rare séquence conservées (à 99,7%) dans tous les génomes alignés se trouve au début du gène codant pour la protéine de capsid (des nucléotide 5295 à 5351). Cette soixantaine de paires de bases (figure 5.7, encadrée en vert) pourrait alors servir comme séquence cible pour une des amorces et une autre amorce pourrait se trouver dans une courte région conservée en 5' par exemple (encadrée en bleu).

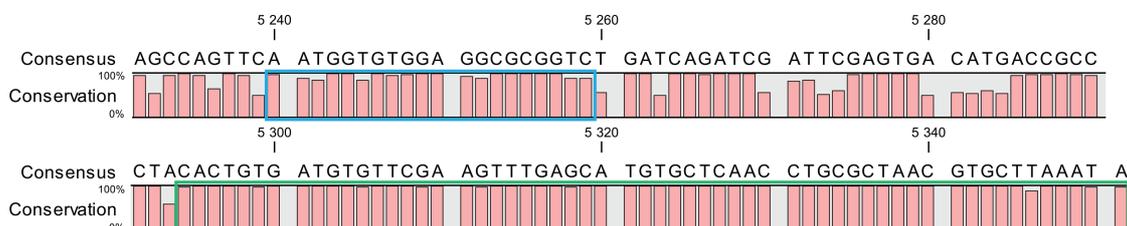


FIGURE 5.7 – exemple de séquence conservée parmi tous les génomes de calicivirus alignés, pouvant servir de séquence cible pour une ou deux amorces de RPA, HDA, CFPA, etc

Conclusion et perspectives

Contribution et perspectives. Durant ce travail de thèse nous avons développé et validé une méthode permettant de réaliser des amplifications d'ADN et d'ARN par (rt-)LAMP sur des disques de fibre de verre. L'amplification est rapide (<45 minutes) et sensible (LOD d'environ 20 brins par réactions). Ces amplifications peuvent être multiplexées grâce à la microfluidique papier et suivies en temps réel, permettant l'adaptation de LAMP quantitative (qLAMP) sur papier. Un premier système multiplexant les trois rt-LAMP Zika, Dengue et Chikungunya a été développé.

Nous avons réalisé pour la première fois la (rt-)LAMP QUASR sur un dispositif papier. Cette méthode développée récemment en tube produit un signal puissant et spécifique, idéal pour un test de terrain. De plus, cette méthode permet d'étendre les capacités de multiplexage des tests papiers en réalisant plusieurs tests sur un même disque. Un système papier de LAMP QUASR multiplexant deux à deux les rt-LAMP Zika, Dengue et Chikungunya, ainsi qu'un contrôle positif a été développé.

Nous avons étudié et mis au point un protocole permettant la lyophilisation des mélanges réactionnels de rt-LAMP sur papier, dont la durée de vie à température ambiante est supérieure à 1 mois. Des études sont en cours pour améliorer encore la stabilité des lyophilisats.

Nous avons développé pour la première fois un système papier couplant capture d'ARN et multiplexage. Ce dispositif a été éprouvé pour la détection de particules virales de Sigmavirus dans un échantillon de sérum et pour la détection multiplexée des ARN de Zika, Dengue et Chikungunya dans des échantillons de sérum.

Une des perspective du projet à court terme est de tester ces dispositifs papier sur des échantillons réels de patients infectés aux virus Zika, Dengue et Chikungunya (provenant des instituts pasteurs des zones touchées par ces virus : Guyane, la Réunion, Polynésie Française...). Par la suite, une évaluation du dispositif sur le terrain, à la Réunion par exemple, permettrait d'étudier ses capacités et son utilisation en conditions réelles.

De plus, des systèmes couplant amplification isotherme et microfluidique papier pourraient être développés pour d'autres applications diagnostiques. Un certain nombre de maladies tropicales négligées parasitaires (Leishmaniose, Bilharziose, Trypanosomiasés...)

et bactériennes (Trachome, Ulcère de Buruli...) pourraient ainsi être détectées et donc traitées plus rapidement. Un test multiplexé des fièvres hémorragiques virales (virus Lassa, Ebola, et Marburg par exemple) serait aussi intéressant en cas de déclenchement d'une épidémie de ce type. Enfin, devant l'apparition grandissante des résistances aux antibiotiques, des tests LAMP détectant les gènes de résistances (Beta-lactamases à spectre élargies, gènes de résistance à la méthiciline) seraient multiplexable à la détection des bactéries elles mêmes, évitant l'attente des 48h de culture et d'antibiogramme.

Le développement de systèmes quantitatifs ou semi-quantitatifs sur papier est une perspective très intéressante, permettant par exemple le suivi au cours du temps des charges virales du VIH ou de l'hépatite B. Cela aiderait grandement au suivi sur le terrain des patients infectés et à l'adaptation de leur traitement (contrôle des rechutes et des résistances).

Au delà du diagnostic humain. Enfin comme évoquées au chapitre 5, des applications au delà du diagnostic humain sont envisageables : détection de pathogènes et micro-organismes chez les animaux, dans les cultures, dans les aliments, dans l'environnement, typage des espèces, détection d'OGM, etc. Elles pourraient bénéficier à des domaines tels que la médecine vétérinaire, les recherches en écologie et environnement, l'agriculture, les contrôles qualité des chaînes de production alimentaires, les sciences participatives...

La mise en place rentable sur le marché d'un dispositif papier, sort du sujet de la thèse. On peut cependant l'imaginer sous plusieurs formes. La première consiste au déploiement de dispositifs de diagnostic des maladies infectieuses dans les pays émergents. La start-up *Diagnostic For All* issue du laboratoire de Georges Whitesides, a vu le jour dans les années 2010, tentant de commercialiser des tests en papier dans les pays émergents à très bas coût, en se basant sur un modèle économique dit "non-profitable" [139]. Le bilan de cette aventure entrepreneuriale semble mitigé², et suggère un transfert de technologie et une fabrication des dispositifs sur les lieux d'utilisation.

La mise en place de tests papiers dans les pays occidentaux serait aussi possible. On pourrait imaginer des dispositifs de diagnostic chez les médecins traitants ou dans les maisons médicales, menant à un diagnostic plus rapide et évitant au patient de se rendre dans un laboratoire d'analyse. Dans le cadre des pathologies chroniques, des tests pourraient aussi être réalisés à domicile par le patient lui même, et assurer le suivi de la réponse au traitement. Enfin, à l'heure du big data, la médecine se tourne de plus en plus vers des modèles préventifs nécessitant l'acquisition régulière de données. Des

2. Lors de la conférence Flow17, à Paris, Georges Whitesides, pionnier de la microfluidique papier, a rappelé ces faits en évoquant les difficultés rencontrées par la start-up *Diagnostic For All* issue de son laboratoire, et interpellé le public en lançant "qu'il faudrait vendre des centaines de milliers de tests à 1€ ne serait-ce que pour financer un doctorat ou un post-doc aux états-unis!".

tests réguliers à domicile pourraient venir alimenter ces bases de données et permettre de prévenir l'occurrence des maladies. Dans tous ces domaines, le papier pourrait jouer un rôle dans la réduction des coûts de production et la facilité d'utilisation des tests.

En ce qui concerne ma trajectoire personnelle, mon retour en externat et mon immersion future dans le monde médical seront une occasion privilégiée pour identifier des domaines d'applications pertinents de la microfluidique papier. Une bonne connaissance des structures de soins et des spécialités médicales sera un atout important pour assurer l'utilité d'une application diagnostique dans un système de santé.

Bibliographie

- [1] Organisation mondiale de la Santé. Comité d'experts de l'administration de la santé publique, premier rapport, série de rapports techniques, Genève, septembre 1952.
- [2] T Banchongakorn, AJC Hurtado, V Chauhan, R Dietz, HM Kodisinghe, M Swe, D Payne, J Perrone, W Rooney, RS Sharma, et al. A rapid dipstick antigen capture assay for the diagnosis of falciparum malaria. *Bulletin of the World Health Organization*, 74(1) :47–54, 1996.
- [3] Randall K Saiki, David H Gelfand, Susanne Stoffel, Stephen J Scharf, Russell Higuchi, Glenn T Horn, Kary B Mullis, and Henry A Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase. *Science*, 239(4839) :487–491, 1988.
- [4] Qingqing Cao, Madhumita Mahalanabis, Jessie Chang, Brendan Carey, Christopher Hsieh, Ahjegannie Stanley, Christine A Odell, Patricia Mitchell, James Feldman, Nira R Pollock, et al. Microfluidic chip for molecular amplification of influenza a rna in human respiratory specimens. *PLoS One*, 7(3) :e33176, 2012.
- [5] Angelika Niemz, Tanya M Ferguson, and David S Boyle. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends in biotechnology*, 29(5) :240–250, 2011.
- [6] Andres W Martinez, Scott T Phillips, George M Whitesides, and Emanuel Carrilho. *Diagnostics for the developing world : microfluidic paper-based analytical devices*, 2009.
- [7] Laura Magro, Camille Escadafal, Pierre Garneret, Beatrice Jacquelin, Aurélia Kwasiborski, Jean-Claude Manuguerra, Fabrice Monti, Anavaj Sakuntabhai, Jessica Vanhomwegen, Pierre Lafaye, et al. Paper microfluidics for nucleic acid amplification testing (naat) of infectious diseases. *Lab on a Chip*, 17(14) :2347–2371, 2017.
- [8] Oliver J Brady, Aaron Osgood-Zimmerman, Nicholas J Kassebaum, Sarah E Ray, Valdelaine EM de Araújo, Aglaêr A da Nóbrega, Livia CV Frutuoso, Roberto CR Lecca, Antony Stevens, Bruno Zoca de Oliveira, et al. The association between zika virus infection and microcephaly in brazil 2015–2017 : An observational analysis of over 4 million births. *PLoS medicine*, 16(3) :e1002755, 2019.
- [9] Van-Mai Cao-Lormeau, Alexandre Blake, Sandrine Mons, Stéphane Lastère, Claudine Roche, Jessica Vanhomwegen, Timothée Dub, Laure Baudouin, Anita Teissier,

- Philippe Larre, et al. Guillain-barré syndrome outbreak associated with zika virus infection in french polynesia : a case-control study. *The Lancet*, 387(10027) :1531–1539, 2016.
- [10] Organisation mondiale de la Santé. Déclaration sur la 1ère réunion du comité d’urgence du règlement sanitaire international concernant le virus zika. février 2016.
- [11] World Health Organization et al. Laboratory testing for zika virus infection : interim guidance. Technical report, World Health Organization, 2016.
- [12] Laura Magro, Béatrice Jacquelin, Camille Escadafal, Pierre Garneret, Aurélia Kwasiborski, Jean-Claude Manuguerra, Fabrice Monti, Anavaj Sakuntabhai, Jessica Vanhomwegen, Pierre Lafaye, et al. based rna detection and multiplexed analysis for ebola virus diagnostics. *Scientific reports*, 7(1) :1347, 2017.
- [13] Cameron S Ball, Yooli K Light, Chung-Yan Koh, Sarah S Wheeler, Lark L Coffey, and Robert J Meagher. Quenching of unincorporated amplification signal reporters in reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification enabling bright, single-step, closed-tube, and multiplexed detection of rna viruses. *Analytical chemistry*, 88(7) :3562–3568, 2016.
- [14] Kary Mullis, Fred Faloona, Stephen Scharf, RK Saiki, GT Horn, and H Erlich. Specific enzymatic amplification of dna in vitro : the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, volume 51, pages 263–273. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.
- [15] Olaf Piepenburg, Colin H Williams, Derek L Stemple, and Niall A Armes. Dna detection using recombination proteins. *PLoS biology*, 4(7) :e204, 2006.
- [16] Myriam Vincent, Yan Xu, and Huimin Kong. Helicase-dependent isothermal dna amplification. *EMBO reports*, 5(8) :795–800, 2004.
- [17] Paul M Lizardi, Xiaohua Huang, Zhengrong Zhu, Patricia Bray-Ward, David C Thomas, and David C Ward. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature genetics*, 19(3) :225, 1998.
- [18] David Y Zhang, Margaret Brandwein, Terence Hsuih, and Hong Bo Li. Ramification amplification : a novel isothermal dna amplification method. *Molecular Diagnosis*, 6(2) :141–150, 2001.
- [19] Tsugunori Notomi, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi, Toshihiro Yonekawa, Keiko Watanabe, Nobuyuki Amino, and Tetsu Hase. Loop-mediated isothermal amplification of dna. *Nucleic acids research*, 28(12) :e63–e63, 2000.
- [20] K Nagamine, Tesu Hase, and T Notomi. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and cellular probes*, 16(3) :223–229, 2002.

- [21] World Health Organization et al. The use of loop-mediated isothermal amplification (tb-lamp) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis : policy guidance. 2016.
- [22] Catherine B Poole, Zhiru Li, Andy Alhassan, Dylan Guelig, Steven Diesburg, Nathan A Tanner, Yinhua Zhang, Thomas C Evans Jr, Paul LaBarre, Samuel Wanji, et al. Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (nina-lamp). *PLoS One*, 12(2) :e0169011, 2017.
- [23] Jens Fischbach, Nina Carolin Xander, Marcus Frohme, and Jörn Felix Glökler. Shining a light on lamp assays' a comparison of lamp visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques*, 58(4) :189–194, 2015.
- [24] Yasuyoshi Mori, Kentaro Nagamine, Norihiro Tomita, and Tsugunori Notomi. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(1) :150–154, 2001.
- [25] Norihiro Tomita, Yasuyoshi Mori, Hidetoshi Kanda, and Tsugunori Notomi. Loop-mediated isothermal amplification (lamp) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols*, 3(5) :877, 2008.
- [26] Yogesh Kumar, Sangita Bansal, and Pranita Jaiswal. Loop-mediated isothermal amplification (lamp) : A rapid and sensitive tool for quality assessment of meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6) :1359–1378, 2017.
- [27] Nathan A Tanner, Yinhua Zhang, and Thomas C Evans Jr. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using ph-sensitive dyes. *Biotechniques*, 58(2) :59–68, 2015.
- [28] Paul R Selvin. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(9) :730, 2000.
- [29] Lucy M Hall, Marta Gerowska, and Tom Brown. A highly fluorescent dna toolkit : synthesis and properties of oligonucleotides containing new cy3, cy5 and cy3b monomers. *Nucleic acids research*, 40(14) :e108–e108, 2012.
- [30] Vijay J Gadkar, David M Goldfarb, Soren Gantt, and Peter AG Tilley. Real-time detection and monitoring of loop mediated amplification (lamp) reaction using self-quenching and de-quenching fluorogenic probes. *Scientific reports*, 8(1) :5548, 2018.
- [31] Nathan A Tanner, Yinhua Zhang, and Thomas C Evans Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques*, 53(2) :81–89, 2012.
- [32] Wei Liu, Simo Huang, Ningwei Liu, Derong Dong, Zhan Yang, Yue Tang, Wen Ma, Xiaoming He, Da Ao, Yaqing Xu, et al. Establishment of an accurate and fast de-

- tection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay. *Scientific reports*, 7 :40125, 2017.
- [33] Jizu Yi, Wandu Zhang, and David Y Zhang. Molecular zipper : a fluorescent probe for real-time isothermal dna amplification. *Nucleic acids research*, 34(11) :e81–e81, 2006.
- [34] Ryo Kubota, Paul LaBarre, Jered Singleton, Andy Beddoe, and Bernhard H Weigl. Non-instrumented nucleic acid amplification (nina) for rapid detection of *ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Biological engineering transactions*, 4(2) :69–80, 2011.
- [35] Kelly A Curtis, Donna L Rudolph, Irene Nejad, Jered Singleton, Andy Beddoe, Bernhard Weigl, Paul LaBarre, and S Michele Owen. Isothermal amplification using a chemical heating device for point-of-care detection of hiv-1. *PloS one*, 7(2) :e31432, 2012.
- [36] Elizabeth A Phillips, Taylor J Moehling, Sanchita Bhadra, Andrew D Ellington, and Jacqueline C Linnes. Strand displacement probes combined with isothermal nucleic acid amplification for instrument-free detection from complex samples. *Analytical chemistry*, 90(11) :6580–6586, 2018.
- [37] Andres W Martinez, Scott T Phillips, Manish J Butte, and George M Whitesides. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8) :1318–1320, 2007.
- [38] Robert Guthrie and Ada Susi. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 32(3) :338–343, 1963.
- [39] CTJ Dodson and WW Sampson. The effect of paper formation and grammage on its pore size distribution. *Journal of pulp and paper science*, 22(5) :J165, 1996.
- [40] Noosheen Walji and Brendan MacDonald. Influence of geometry and surrounding conditions on fluid flow in paper-based devices. *Micromachines*, 7(5) :73, 2016.
- [41] Robert Pelton. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(8) :925–942, 2009.
- [42] Julie Credou and Thomas Berthelot. Cellulose : from biocompatible to bioactive material. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(30) :4767–4788, 2014.
- [43] Sabina Di Risio and Ning Yan. Bioactive paper through inkjet printing. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 24(3) :661–684, 2010.
- [44] Jia Li, Fabrice Rossignol, and Joanne Macdonald. Inkjet printing for biosensor fabrication : combining chemistry and technology for advanced manufacturing. *Lab on a Chip*, 15(12) :2538–2558, 2015.

- [45] Andres W Martinez, Scott T Phillips, Benjamin J Wiley, Malancha Gupta, and George M Whitesides. Flash : a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 8(12) :2146–2150, 2008.
- [46] Xu Li, Junfei Tian, Thanh Nguyen, and Wei Shen. based microfluidic devices by plasma treatment. *Analytical chemistry*, 80(23) :9131–9134, 2008.
- [47] Yao Lu, Weiwei Shi, Jianhua Qin, and Bingcheng Lin. Fabrication and characterization of paper-based microfluidics prepared in nitrocellulose membrane by wax printing. *Analytical chemistry*, 82(1) :329–335, 2009.
- [48] Emanuel Carrilho, Andres W Martinez, and George M Whitesides. Understanding wax printing : a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical chemistry*, 81(16) :7091–7095, 2009.
- [49] Vinodh Rajendra, Clémence Sicard, John D Brennan, and Michael A Brook. Printing silicone-based hydrophobic barriers on paper for microfluidic assays using low-cost ink jet printers. *Analyst*, 139(24) :6361–6365, 2014.
- [50] Longfei Cai, Chunxiu Xu, ShuoHong Lin, Jiating Luo, Meidie Wu, and Fan Yang. A simple paper-based sensor fabricated by selective wet etching of silanized filter paper using a paper mask. *Biomicrofluidics*, 8(5) :056504, 2014.
- [51] Erin M Fenton, Monica R Mascarenas, Gabriel P Lopez, and Scott S Sibbett. Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. *ACS applied materials & interfaces*, 1(1) :124–129, 2008.
- [52] Jinfang Nie, Yuanzhi Liang, Yun Zhang, Shangwang Le, Dunnan Li, and Songbai Zhang. One-step patterning of hollow microstructures in paper by laser cutting to create microfluidic analytical devices. *Analyst*, 138(2) :671–676, 2013.
- [53] Yanyan Xia, Jin Si, and Zhiyang Li. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing : A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 77 :774–789, 2016.
- [54] Kentaro Yamada, Terence G Henares, Koji Suzuki, and Daniel Citterio. Paper-based inkjet-printed microfluidic analytical devices. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(18) :5294–5310, 2015.
- [55] Edward W Washburn. The dynamics of capillary flow. *Physical review*, 17(3) :273, 1921.
- [56] Jennifer L Osborn, Barry Lutz, Elain Fu, Peter Kauffman, Dean Y Stevens, and Paul Yager. Microfluidics without pumps : reinventing the t-sensor and h-filter in paper networks. *Lab on a Chip*, 10(20) :2659–2665, 2010.
- [57] Elain Fu, Barry Lutz, Peter Kauffman, and Paul Yager. Controlled reagent transport in disposable 2d paper networks. *Lab on a Chip*, 10(7) :918–920, 2010.

- [58] Elain Fu, Stephen A Ramsey, Peter Kauffman, Barry Lutz, and Paul Yager. Transport in two-dimensional paper networks. *Microfluidics and nanofluidics*, 10(1) :29–35, 2011.
- [59] Jaclyn A Adkins, Eka Noviana, and Charles S Henry. Development of a quasi-steady flow electrochemical paper-based analytical device. *Analytical chemistry*, 88(21) :10639–10647, 2016.
- [60] Xiaoxi Yang, Omid Forouzan, Theodore P Brown, and Sergey S Shevkoplyas. Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices. *Lab on a Chip*, 12(2) :274–280, 2012.
- [61] Grace Wu, Jaya Srivastava, and Muhammad H Zaman. Stability measurements of antibodies stored on paper. *Analytical biochemistry*, 449 :147–154, 2014.
- [62] Thomas W McDade, Sharon Williams, and J Josh Snodgrass. What a drop can do : dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography*, 44(4) :899–925, 2007.
- [63] Amara Apilux, Yoshiaki Ukita, Miyuki Chikae, Orawon Chailapakul, and Yuzuru Takamura. Development of automated paper-based devices for sequential multistep sandwich enzyme-linked immunosorbent assays using inkjet printing. *Lab on a Chip*, 13(1) :126–135, 2013.
- [64] Wijitar Dungchai, Orawon Chailapakul, and Charles S Henry. Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices. *Analytica chimica acta*, 674(2) :227–233, 2010.
- [65] Sharon Y Wong, Mario Cabodi, Jason Rolland, and Catherine M Klapperich. Evaporative concentration on a paper-based device to concentrate analytes in a biological fluid. *Analytical chemistry*, 86(24) :11981–11985, 2014.
- [66] Brittany Rohrman and Rebecca Richards-Kortum. Inhibition of recombinase polymerase amplification by background dna : a lateral flow-based method for enriching target dna. *Analytical chemistry*, 87(3) :1963–1967, 2015.
- [67] Natalia M Rodriguez, Winnie S Wong, Lena Liu, Rajan Dewar, and Catherine M Klapperich. A fully integrated paperfluidic molecular diagnostic chip for the extraction, amplification, and detection of nucleic acids from clinical samples. *Lab on a Chip*, 16(4) :753–763, 2016.
- [68] Kevin M Schilling, Anna L Lepore, Jason A Kurian, and Andres W Martinez. Fully enclosed microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical chemistry*, 84(3) :1579–1585, 2012.
- [69] Abdennour Abbas, Andrew Brimer, Joseph M Slocik, Limei Tian, Rajesh R Naik, and Srikanth Singamaneni. Multifunctional analytical platform on a paper strip : separation, preconcentration, and subattomolar detection. *Analytical chemistry*, 85(8) :3977–3983, 2013.

- [70] Jared Houghtaling, Tinny Liang, Gregory Thiessen, and Elain Fu. Dissolvable bridges for manipulating fluid volumes in paper networks. *Analytical chemistry*, 85(23) :11201–11204, 2013.
- [71] Barry Lutz, Tinny Liang, Elain Fu, Sujatha Ramachandran, Peter Kauffman, and Paul Yager. Dissolvable fluidic time delays for programming multi-step assays in instrument-free paper diagnostics. *Lab on a Chip*, 13(14) :2840–2847, 2013.
- [72] Bhushan J Toley, Jessica A Wang, Mayuri Gupta, Joshua R Buser, Lisa K Lafleur, Barry R Lutz, Elain Fu, and Paul Yager. A versatile valving toolkit for automating fluidic operations in paper microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 15(6) :1432–1444, 2015.
- [73] Andres W Martinez, Scott T Phillips, Zhihong Nie, Chao-Min Cheng, Emanuel Carrilho, Benjamin J Wiley, and George M Whitesides. Programmable diagnostic devices made from paper and tape. *Lab on a Chip*, 10(19) :2499–2504, 2010.
- [74] Emanuel Carrilho, Scott T Phillips, Sarah J Vella, Andres W Martinez, and George M Whitesides. Paper microzone plates. *Analytical chemistry*, 81(15) :5990–5998, 2009.
- [75] Andres W Martinez, Scott T Phillips, and George M Whitesides. Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50) :19606–19611, 2008.
- [76] Hong Liu and Richard M Crooks. Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami. *Journal of the American Chemical Society*, 133(44) :17564–17566, 2011.
- [77] Xiao Li and Xinyu Liu. Fabrication of three-dimensional microfluidic channels in a single layer of cellulose paper. *Microfluidics and nanofluidics*, 16(5) :819–827, 2014.
- [78] Waleed Abu Al-Soud and Peter Rådström. Purification and characterization of per-inhibitory components in blood cells. *Journal of clinical microbiology*, 39(2) :485–493, 2001.
- [79] Sally M McFall, Robin L Wagner, Sujit R Jangam, Douglas H Yamada, Diana Hardie, and David M Kelso. A simple and rapid dna extraction method from whole blood for highly sensitive detection and quantitation of hiv-1 proviral dna by real-time pcr. *Journal of virological methods*, 214 :37–42, 2015.
- [80] AV Govindarajan, S Ramachandran, GD Vigil, P Yager, and KF Böhringer. A low cost point-of-care viscous sample preparation device for molecular diagnosis in the developing world; an example of microfluidic origami. *Lab on a Chip*, 12(1) :174–181, 2012.
- [81] SA Byrnes, JD Bishop, L Lafleur, JR Buser, B Lutz, and P Yager. One-step purification and concentration of dna in porous membranes for point-of-care applications. *Lab on a Chip*, 15(12) :2647–2659, 2015.

- [82] Natalia M Rodriguez, Jacqueline C Linnes, Andy Fan, Courtney K Ellenson, Nira R Pollock, and Catherine M Klapperich. based rna extraction, in situ isothermal amplification, and lateral flow detection for low-cost, rapid diagnosis of influenza a (h1n1) from clinical specimens. *Analytical chemistry*, 87(15) :7872–7879, 2015.
- [83] Kattika Kaarj, Patarajarin Akarapipad, and Jeong-Yeol Yoon. Simpler, faster, and sensitive zika virus assay using smartphone detection of loop-mediated isothermal amplification on paper microfluidic chips. *Scientific reports*, 8(1) :12438, 2018.
- [84] Brittany A Rohrman and Rebecca R Richards-Kortum. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of hiv dna. *Lab on a chip*, 12(17) :3082–3088, 2012.
- [85] JC Linnes, NM Rodriguez, L Liu, and CM Klapperich. Polyethersulfone improves isothermal nucleic acid amplification compared to current paper-based diagnostics. *Biomedical microdevices*, 18(2) :30, 2016.
- [86] Prasad Shetty, Dipayan Ghosh, Minakshi Singh, Aparna Tripathi, and Debjani Paul. Rapid amplification of mycobacterium tuberculosis dna on a paper substrate. *RSC Advances*, 6(61) :56205–56212, 2016.
- [87] Jonathan S Gootenberg, Omar O Abudayyeh, Jeong Wook Lee, Patrick Essletzbichler, Aaron J Dy, Julia Joung, Vanessa Verdine, Nina Donghia, Nichole M Daringer, Catherine A Freije, et al. Nucleic acid detection with crispr-cas13a/c2c2. *Science*, 356(6336) :438–442, 2017.
- [88] Gaolian Xu, Debbie Nolder, Julien Reboud, Mary C Oguike, Donnelly A van Schalkwyk, Colin J Sutherland, and Jonathan M Cooper. Paper-origami-based multiplexed malaria diagnostics from whole blood. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(49) :15250–15253, 2016.
- [89] John T Connelly, Jason P Rolland, and George M Whitesides. “paper machine” for molecular diagnostics. *Analytical chemistry*, 87(15) :7595–7601, 2015.
- [90] Keith Pardee, Alexander A Green, Tom Ferrante, D Ewen Cameron, Ajay Daley-Keyser, Peng Yin, and James J Collins. based synthetic gene networks. *Cell*, 159(4) :940–954, 2014.
- [91] Julien Reboud, Gaolian Xu, Alice Garrett, Moses Adriko, Zhugen Yang, Edridah M Tukahebwa, Candia Rowell, and Jonathan M Cooper. based microfluidics for dna diagnostics of malaria in low resource underserved rural communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(11) :4834–4842, 2019.
- [92] Ana Catarina Araujo, Yajing Song, Joakim Lundeberg, Patrik L Stahl, and Harry Brumer III. Activated paper surfaces for the rapid hybridization of dna through capillary transport. *Analytical chemistry*, 84(7) :3311–3317, 2012.

- [93] Karen Scida, Bingling Li, Andrew D Ellington, and Richard M Crooks. Dna detection using origami paper analytical devices. *Analytical chemistry*, 85(20) :9713–9720, 2013.
- [94] Sharmili Roy, Ibrahim Abd Rahman, and Minhaz Uddin Ahmed. based rapid detection of pork and chicken using lamp–magnetic bead aggregates. *Analytical Methods*, 8(11) :2391–2399, 2016.
- [95] Xiaofeng Wei, Tian Tian, Shasha Jia, Zhi Zhu, Yanli Ma, Jianjun Sun, Zhenyu Lin, and Chaoyong James Yang. Target-responsive dna hydrogel mediated stop-flow microfluidic paper-based analytic device for rapid, portable and visual detection of multiple targets. *Analytical chemistry*, 87(8) :4275–4282, 2015.
- [96] Changchun Liu, Eran Geva, Michael Mauk, Xianbo Qiu, William R Abrams, Daniel Malamud, Kelly Curtis, S Michele Owen, and Haim H Bau. An isothermal amplification reactor with an integrated isolation membrane for point-of-care detection of infectious diseases. *Analyst*, 136(10) :2069–2076, 2011.
- [97] Wupeng Gan, Bin Zhuang, Pengfei Zhang, Junping Han, Cai-Xia Li, and Peng Liu. A filter paper-based microdevice for low-cost, rapid, and automated dna extraction and amplification from diverse sample types. *Lab on a Chip*, 14(19) :3719–3728, 2014.
- [98] Lu Zhang, Yi Zhang, Chunyan Wang, Qiang Feng, Fei Fan, Guojun Zhang, Xixiong Kang, Xuzhen Qin, Jiashu Sun, Yinghui Li, et al. Integrated microcapillary for sample-to-answer nucleic acid pretreatment, amplification, and detection. *Analytical chemistry*, 86(20) :10461–10466, 2014.
- [99] Ruihua Tang, Hui Yang, Yan Gong, MinLi You, Zhi Liu, Jane Ru Choi, Ting Wen, Zhiguo Qu, Qibing Mei, and Feng Xu. A fully disposable and integrated paper-based device for nucleic acid extraction, amplification and detection. *Lab on a Chip*, 17(7) :1270–1279, 2017.
- [100] Michael S Cordray and Rebecca R Richards-Kortum. A paper and plastic device for the combined isothermal amplification and lateral flow detection of plasmodium dna. *Malaria journal*, 14(1) :472, 2015.
- [101] Jane Ru Choi, Jie Hu, Yan Gong, Shangsheng Feng, Wan Abu Bakar Wan Abas, Belinda Pinguan-Murphy, and Feng Xu. An integrated lateral flow assay for effective dna amplification and detection at the point of care. *Analyst*, 141(10) :2930–2939, 2016.
- [102] Boon-Teong Teoh, Sing-Sin Sam, Kim-Kee Tan, Jefree Johari, Mohammed Bashar Danlami, Poh-Sim Hooi, Rafi Md-Esa, and Sazaly AbuBakar. Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *BMC infectious diseases*, 13(1) :387, 2013.

- [103] Sheng-feng Hu, Miao Li, Lan-lan Zhong, Shi-miao Lu, Ze-xia Liu, Jie-ying Pu, Jin-sheng Wen, and Xi Huang. Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1–4. *BMC microbiology*, 15(1) :265, 2015.
- [104] Igor P Oscorbin, Ekaterina A Belousova, Aleksandr I Zakabunin, Ulyana A Boyarskikh, and Maksim L Filipenko. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qlamp). *Biotechniques*, 61(1) :20–25, 2016.
- [105] Yasuyoshi Mori, Masataka Kitao, Norihiro Tomita, and Tsugunori Notomi. Real-time turbidimetry of lamp reaction for quantifying template dna. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 59(2) :145–157, 2004.
- [106] Sowmya Subramanian and Romel D Gomez. An empirical approach for quantifying loop-mediated isothermal amplification (lamp) using escherichia coli as a model system. *PloS one*, 9(6) :e100596, 2014.
- [107] Laura Magro. *Paper microfluidics : from liquid flow studies to Ebola virus diagnostics in Guinea*. Theses, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, October 2016.
- [108] Shih-Jie Lo, Shih-Chun Yang, Da-Jeng Yao, Jiann-Hwa Chen, Wu-Chun Tu, and Chao-Min Cheng. Molecular-level dengue fever diagnostic devices made out of paper. *Lab on a Chip*, 13(14) :2686–2692, 2013.
- [109] OptiGene. *LAMP user guide mastermixes and assay optimisation*. Horsham, West Sussex, UK, 1.0 edition, 2017.
- [110] New England BioLabs. *Warmstart LAMP Kit (DNA and RNA) instruction manual*. 240 County Road, Ipswich, MA 01938-2723, USA, e1700 edition, 2016.
- [111] Ya-Bing Duan, Chang-Yan Ge, Xiao-Ke Zhang, Jian-Xin Wang, and Ming-Guo Zhou. Development and evaluation of a novel and rapid detection assay for botrytis cinerea based on loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*, 9(10) :e111094, 2014.
- [112] Lijun Hu, Li M Ma, Shimin Zheng, Xiaohua He, Thomas S Hammack, Eric W Brown, and Guodong Zhang. Development of a novel loop-mediated isothermal amplification (lamp) assay for the detection of salmonella ser. enteritidis from egg products. *Food control*, 88 :190–197, 2018.
- [113] OptiGene. *LAMP user guide, polymerases*. Horsham, West Sussex, UK, 1.1 edition, 2018.
- [114] TA Steitz, SJ Smerdon, J Jager, CM Joyce, and H Pelletier. A unified polymerase mechanism for nonhomologous dna and rna polymerases—comment/reply. *Science*, 266(5193) :2022, 1994.

- [115] I Sissoeff, J Grisvard, and E Guille. Studies on metal ions-dna interactions : specific behaviour of reiterative dna sequences. *Progress in biophysics and molecular biology*, 31 :165–199, 1978.
- [116] Vinod K Misra and David E Draper. On the role of magnesium ions in rna stability. *Biopolymers : Original Research on Biomolecules*, 48(2-3) :113–135, 1998.
- [117] Tran-Dinh Son, Madeleine Roux, and Michel Ellenberger. Interaction of mg²⁺ ions with nucleoside triphosphates by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Nucleic acids research*, 2(7) :1101–1110, 1975.
- [118] John L Tymoczko, Jeremy M Berg, and Lubert Stryer. *Biochemistry : A short course*. Macmillan, 2011.
- [119] Sarah S Wheeler, Cameron S Ball, Stanley A Langevin, Ying Fang, Lark L Coffey, and Robert J Meagher. Surveillance for western equine encephalitis, st. louis encephalitis, and west nile viruses using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *PloS one*, 11(1) :e0147962, 2016.
- [120] Cássia F Estofolete, Ana CB Terzian, Tatiana E Colombo, Georgia de Freitas Guimarães, Helio C Ferraz Junior, Rafael A da Silva, Gilmar V Greque, and Maurício L Nogueira. Co-infection between zika and different dengue serotypes during dengue outbreak in brazil. *Journal of infection and public health*, 12(2) :178–181, 2019.
- [121] Nasir Ali, Rita de Cássia Pontello Rampazzo, Alexandre Dias Tavares Costa, and Marco Aurelio Krieger. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *BioMed research international*, 2017, 2017.
- [122] Hua-Wei Chen, Giulia Weissenberger, and Wei-Mei Ching. Development of lyophilized loop-mediated isothermal amplification reagents for the detection of leptospira. *Military medicine*, 181(suppl_5) :227–231, 2016.
- [123] Aashish Priye, Sara W Bird, Yooli K Light, Cameron S Ball, Oscar A Negrete, and Robert J Meagher. A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of zika, chikungunya, and dengue viruses. *Scientific reports*, 7 :44778, 2017.
- [124] Paul R Klatser, Sjoukje Kuijper, Cor W van Ingen, and Arend HJ Kolk. Stabilized, freeze-dried per mix for detection of mycobacteria. *Journal of clinical microbiology*, 36(6) :1798–1800, 1998.
- [125] Kelly A Curtis, Donna L Rudolph, Daphne Morrison, Dylan Guelig, Steven Dieburg, David McAdams, Robert A Burton, Paul LaBarre, and Michele Owen. Single-use, electricity-free amplification device for detection of hiv-1. *Journal of virological methods*, 237 :132–137, 2016.
- [126] Martin Lee, Diane Lee, and Mark Laverick. Freeze-dried composition, December 17 2015. US Patent App. 14/763,244.

- [127] Felix Franks, Samantha Spiers, Martin Lee, and Diane Sutton. Freeze-dried compositions for biochemical reactions, October 6 2011. US Patent App. 13/001,208.
- [128] Sowmya Nagaraj, Shylaja Ramlal, Joseph Kingston, and Harsh Vardhan Batra. Thermostabilization of indigenous multiplex polymerase chain reaction reagents for detection of enterotoxigenic staphylococcus aureus. *Journal of microbiology, immunology and infection*, 51(2) :191–198, 2018.
- [129] CS Ball, RF Renzi, A Priye, and RJ Meagher. A simple check valve for microfluidic point of care diagnostics. *Lab on a Chip*, 16(22) :4436–4444, 2016.
- [130] Scott E Whitney, Stephanie de los Rios, Senait Ghirmai, Rolf Muller, Vasco Liberal, and Steven P Wilkinson. Formulations and methods for stabilizing pcr reagents, August 8 2017. US Patent 9,725,703.
- [131] Christoph Carter, Kevan Akrami, Drew Hall, Davey Smith, and Eliah Aronoff-Spencer. Lyophilized visually readable loop-mediated isothermal reverse transcriptase nucleic acid amplification test for detection ebola zaire rna. *Journal of virological methods*, 244 :32–38, 2017.
- [132] RCJA Boom, CJ Sol, MM Salimans, CL Jansen, PM Wertheim-van Dillen, and JPME Van der Noordaa. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*, 28(3) :495–503, 1990.
- [133] Youngung Seok, Hyou-Arm Joung, Ju-Young Byun, Hyo-Sung Jeon, Su Jeong Shin, Sanghyo Kim, Young-Beom Shin, Hyung Soo Han, and Min-Gon Kim. A paper-based device for performing loop-mediated isothermal amplification with real-time simultaneous detection of multiple dna targets. *Theranostics*, 7(8) :2220, 2017.
- [134] Matthew R Watts, Gregory James, Yasmin Sultana, Andrew N Ginn, Alexander C Outhred, Fanrong Kong, Jaco J Verweij, Jonathan R Iredell, Sharon CA Chen, and Rogan Lee. A loop-mediated isothermal amplification (lamp) assay for strongyloides stercoralis in stool that uses a visual detection method with syto-82 fluorescent dye. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 90(2) :306–311, 2014.
- [135] Kelly A Curtis, Daphne Morrison, Donna L Rudolph, Anupama Shankar, Laura SP Bloomfield, William M Switzer, and S Michele Owen. A multiplexed rt-lamp assay for detection of group m hiv-1 in plasma or whole blood. *Journal of virological methods*, 255 :91–97, 2018.
- [136] Jane E Sykes, Joanne L Allen, Virginia P Studdert, and Glenn F Browning. Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and chlamydia psittaci mucosal swabs by multiplex rt-pcr/pcr. *Veterinary microbiology*, 81(2) :95–108, 2001.
- [137] Chris Helps, Nicky Reeves, Kathy Egan, Pam Howard, and Dave Harbour. Detection of chlamydomydia felis and feline herpesvirus by multiplex real-time pcr analysis. *Journal of clinical microbiology*, 41(6) :2734–2736, 2003.

-
- [138] Xin Ye, Xueen Fang, Yang Li, Lijuan Wang, Xinxin Li, and Jilie Kong. Sequence-specific probe mediated isothermal amplification for the single-copy sensitive detection of nucleic acid. *Analytical chemistry*, 2019.
- [139] Charles R Mace and Una S Ryan. A unique approach to business strategy as a means to enable change in global healthcare : a case study. *Clinical chemistry*, 58(9) :1302–1305, 2012.

Chapitre 6

Annexes

a.

ZIKA	qRT-PCR	qRT-LAMP	qRT-RPA
Développeur	Lanciotti et al. (2008)	CIBU	CIBU
Température d'amplification (°C)	-	65°C	42°C
Gène cible	(PCR1) M-Env (PCR2) Env	Enveloppe	Memb-Env
Réactifs d'amplification	One-step Superscript III	Optigene Iso 004	TwistDx exo RT kit
Taille amplicon (pb)	(PCR1) 76 (PCR2) 78	260	123
Durée du test	120 min	20 min	20 min
LOD (copie/µl) pour la souche brésilienne	(PCR1) < 160 (PCR2) < 16	< 20	< 50
Coût par réaction (€)	8	2	4,5

b.

DENGUE	qRT-PCR	qRT-LAMP	qRT-RPA	
Développeur	CNR Arbovirus	Teoh BT et al. (2013)	El Wahed et al. (2015)	CIBU
Gène cible	3'UTR	3'UTR	3'UTR	3'UTR
Réactifs d'amplification	One-step Superscript III	Optigene Iso 004	TwistDx exo RT kit	TwistDx exo RT kit
Taille amplicon (pb)	118		119	200
Durée du test	90 min		20 min	20 min
LOD (copie/µl) pour le sérotype 1	< 72		< 72	
LOD (copie/µl) pour sérotype 2	< 49	>100	< 510	<u>En cours d'évaluation</u>
LOD (copie/µl) pour sérotype 3	< 12		< 12	
LOD (copie/µl) pour sérotype 4	< 17		< 17	
Coût par réaction (€)	4	2	4,5	4,5

c.

CHIKUNGUNYA	qRT-PCR	qRT-LAMP	qRT-RPA
Développeur	Pastorino et al. (2005)	CIBU	CIBU
Température d'amplification (°C)	-	65°C	40°C
Gène cible	E1	E2/6K	NSP4
Réactifs d'amplification	One-step Superscript III	Optigene Iso 004	TwistDx exo RT kit
Taille amplicon (pb)	188	264	136
Durée du test	90 min	20 min	20 min
LOD (copie/µl) pour la souche ECSA	< 300	< 20	< 40
Coût par réaction (€)	4	2	4,5

TABLE 6.1 – comparaisons des rt-LAMP et rt-RPA Dengue, Zika et Chikungunya à la rt-PCR. Limites de détection.

	<i>Speed</i>	<i>Power</i>	<i>Passages</i>
GF	35	11	5
Standard 17	35	11	3
PCR tape	16	12	1
polypropylene	20	12	18

TABLE 6.2 – paramètres de découpe de la grèveuse laser pour différents matériaux.

<i>Species</i>	<i>Primer name</i>	<i>Sequence</i>	<i>Target gene</i>
<i>Salmonella sp.</i>	S/ENT/F3	ATCGCACTGAATA TCGTACTG	invA
	S/ENT/B3	CCACGGTGACAATA GAGAAG	invA
	S/ENT/FIP	AATGCCAGACGAAA GCGTTCTACATTGACAGAAATCC	invA
	S/ENT/BIP	TCGATCAGTACCA GCGCTCTTACGCCAA TAACGAAATTGCC	invA
	S/ENT/LF	GGTAA TTAACA G TACCGCAGGA	invA
	S/ENT/LB	CTTGATTGAA GCGCATGCC	invA
<i>S. pneumoniae</i>	S/PNEU/F3	TTGCACGAA TAA CCAACCA	lytA
	S/PNEU/B3	GAACCA G TACCA G TTGCC	lytA
	S/PNEU/FIP	TTCTTCTGCCAGCCTGTTTCAACA TTAGCCGTGAGCAGTT	lytA
	S/PNEU/BIP	TGACACTGGCTACTGGTACGTAGTAGTACCAAGTGCCATTGAT	lytA
	S/PNEU/LF	AGCCGTTCTCAA TATCA TGCT	lytA
	S/PNEU/LB	CATTCAGACGGCTCTTATCCA	lytA
<i>S. aureus</i>	S/AUR/F3	CAGCTATTAGACGTGCGAT	arcC
	S/AUR/B3	TGTAA CGA TTGTGCCTACAG	arcC
	S/AUR/FIP	ATTGCCGGCGTTGTGTCA TAA TGGCCCCA AAA TTGGAA	arcC
	S/AUR/BIP	GCCATTGGATA CTTGTGGTGCCGATTGATTTCAGTTTCCAACC	arcC
	S/AUR/LF	CTGTTGATTTAGCTTGTGGGA	arcC
	S/AUR/LB	AATGTCACAGGGTATGATAGGC	arcC
<i>E. coli</i>	E/COL/F3	CCTGCGACAGACCTTTAC	malB
	E/COL/B3	TATGACTATACCAACGAAACCG	malB
	E/COL/FIP	AGACGGCTGGTTGTCTGCACTGACGTACTGAAACAACA	malB
	E/COL/BIP	TTCGATGCGCCATCAACCA CGGCACATTAGAACTGGG	malB
	E/COL/LF	CATACTCAGAGTGTCTGAAAGG	malB
	E/COL/LB	GACGATAGTTATCAGCAGGT	malB
<i>H. influenza</i>	H/INF/F3	TCATTA TTGCTCACCGTGG	hpd
	H/INF/B3	ATAAACTGCGCTTGTGTC	hpd
	H/INF/FIP	ACGACCATCCTTAGTCA TTGCTACGTTAGAGTCTAAA GCACTTG	hpd
	H/INF/BIP	ATGGCTTGACTGATGTTGCGACGATGACATA GTAACGACCAT	hpd
	H/INF/LF	CAGCCTGTTGTGCAAAACG	hpd
	H/INF/LB	CCCACATCGTCA CCGTAAA	hpd

TABLE 6.3 – liste des amorces développés par la CIBU détectant les bactéries *S. enterica*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenza*, *E. Coli*

Species	Primer name	Sequence	Target gene
<i>DENV-1</i>	DENV1/F3	TGTGTTCCCTCTCATAATG	NS2A
	DENV 1/B3	CAGACTCAA TCCAATCGTAA GA	NS2A
	DENV 1/FIP	CATCCTGTCTGAAGCA TTGGCTGGACAA TTGACA TGGAATGATC	NS2A
	DENV 1/BIP	CCTAGCTCTGATGGCCACTTCTCTCTA GATGTTA GTCTGCG	NS2A
	DENV 1/LF	CCAA CCA TGA TGCA TAA CCTG	NS2A
	DENV 1/LB	ATGAGA CCAA TGTT CGCTGT	NS2A
<i>DENV-2</i>	DENV 2/F3	CACACTGGATAGCAGCTTC	NS4B
	DENV 2/B3	CTATGTCCAGGATGTTGCTC	NS4B
	DENV 2/FIP	GGCCA CCA CTGTGAGGA TGA GAA CACCCCAA GATAA CC	NS4B
	DENV 2/BIP	CAAACGA GATGGGTTTCTGGATTGCTGGTTGTAATGCTT	NS4B
	DENV 2/LF	GGCTATGACAA CGTAGG TCAA	NS4B
	DENV 2/LB	ACGAAGAAAGA TCTCGGATTGG	NS4B
<i>DENV-3</i>	DENV 3/F3	CCCGTCCAAGGACGTAA	NS4A
	DENV 3/B3	CTGCTCGTGTGTCA TG	NS4A
	DENV 3/FIP	ACGACGGAGCTACAGGCAGAA GAA GTCAGGCCAAA	NS4A
	DENV 3/BIP	GGGACGTAAA GCCTGGAGCCTCTAACCA CTA GTCTGCTA	NS4A
	DENV 3/LF	GTTTGCTCAAACCGTGCC	NS4A
	DENV 3/LB	AACCGTGGAA GCTGTACG	NS4A
<i>DENV-4</i>	DENV 4/F3	GCTCCTTTCGAGAGTGAA G	3'UTR
	DENV 4/B3	AGTACAGCTTCCCTCTGG	3'UTR
	DENV 4/FIP	CGTTATTGGCGGAGCTACAGGAGGCTATTGAA GTCAGGC	3'UTR
	DENV 4/BIP	GGAGGCGTAAA TTCCAGGGGTCTCCTCTAACCGCTAGT	3'UTR
	DENV 4/LF	CAGCACGGTTTGTCTAAG	3'UTR
	DENV 4/LB	CTGTACGCGTGGCATA TTG	3'UTR
<i>DENV</i>	DenV1-4/F3/134	CAAACCGTGCTGCCTGT	3'UTR
	DenV1-4/F3/2	TGAGTAAACTATGCAGCCTGT	3'UTR
	DenV1-4/B3/123	ACCTGTTGATTCACAGCACC	3'UTR
	DenV1-4/B3/4	ACCTGTTGGATCAACAACACC	3'UTR
	DenV1-4/FIP/123	AGGGGTCTCCTCTAACCRCTAGTCTTTCAAACCRITGGAAGCTGTACGC	3'UTR
	DenV1-4/FIP/4	AGGGGTCTCCTCTAACCRCTAGTCTTTTTGCCACGGAA GCTGTACGC	3'UTR
	DenV1-4/BIP/123	ACAGCATA TTGACGCTGGGARAGA CGTTCTGTGCCTGGAATGATGCTG	3'UTR
	DenV1-4/BIP/4	ACAGCATA TTGACGCTGGGARAGA CGCTCTGTGCCTGGATTGATGTTG	3'UTR
	DenV1-4/LB/1234	CAGAGATCCTGCTGTCTC	3'UTR

TABLE 6.4 – liste des amorces utilisés dans la suite du manuscrit pour détecter spécifiquement les quatre sérotypes de Dengue, ou pour la détection pan-sérotipe

Species	Primer name	Sequence	Target gene
<i>CHIKV</i>	CHIKV/F3	TACTCCTGTGCGATGGTGG	
	CHIKV/B3	AGCATGGTAAAGATCTCAGA	
	CHIKV/FIP	GGCCGCTTTAGCTGTTCTGACCATACGAACTGACACCAAG	
	CHIKV/BIP	ACCTGTGGAAACGAGCAGCA GTTGCA TAGGACAATCAGG	
	CHIKV/LF	CAGCATAATTAAGCTAAGCAGGA	
	CHIKV/LB	AAGCCCTTATTCGCTGG	
<i>ZIKV</i>	ZIKV/F3	CAGCGTTCACATTCACCA	
	ZIKV/B3	CCGACTCCTATGACAAATGTAAAG	
	ZIKV/FIP	TTGCATGTCCACCGCCATAGTCA CAGTGGAGGTACAG	
	ZIKV/BIP	GGGAGGTTGATAACCGCTAACCGGATCAA GTTCCAGCATCAT	
	ZIKV/LF	CTGAGCTGGAACTTGGCA	
	ZIKV/LB	ATCACTGAAAGCACTGAGAACT	
<i>Sigmavirus</i>	SIGV/F3	CAAGAAAGCAACAGATCCTG	
	SIGV/B3	CCAACAATTACAGGATGGTCTT	
	SIGV/FIP	GCGGAGAGATGGAGTGTGAAAATGCCATAAGGTGAAATATGAG	
	SIGV/BIP	AGAGCAACCAATGGGCAACCGATTCCAAAGAACAGTCCTC	
	SIGV/LF	TACCATGGCATATCACAGATGG	
	SIGV/LB	ATGTCTCGCTGAGCTTTCC	

TABLE 6.5 – liste des amorces utilisés dans la suite du manuscrit pour détecter CHIKV, ZIKV et Sigmavirus

Species	Primer name	Sequence	Target gene
<i>FHV-1</i>	TK1/F3	TACTTACTACTTCCCAGAACCA	TK
	TK1/B3	GGTGTTCCTCACATACAACCTT	TK
	TK1/FIP	GTCGTTTCGGTCTGGACATGCTACTACTGGCGTAGTCT	TK
	TK1/BIP	TGCCTATA TCAACCGCCACTACCTGTTA TTGTGGATAGTCTGG	TK
	TK1/LF	AGATACCAACCGACAAACATCAG	TK
	TK1/LB	GCCGCAACCATACCTTCTT	TK
<i>FHV-1</i>	TK2/F3	ACATAGATGGTGCCTATGGA	TK
	TK2/B3	CCTGTTATTGTGGATAGTCTGG	TK
	TK2/FIP	ACCAACGACAAACATCA GTTTCACTTACTACTTCCCAGAACCA	TK
	TK2/BIP	TCTATGCCGTCCAGGACCGCGGTGATAGGCGAGCATC	TK
	TK2/LF	AGAGACTACGCCAGTATAGCA	TK
	TK2/LB	CGACGTGGTGAATTATCAGC	TK
<i>FHV-1</i>	TK3/F3	GTTTCCCCTCGCAAGATAT	TK
	TK3/B3	CCATCAGCCAACTAGTATT	TK
	TK3/FIP	GATTTCCAACGAGGTTCTCGTACTCTGGGTCTGACTT	TK
	TK3/BIP	TCGAGGAACATTTGAAGCGTCTTTGCGTAGTGCGTGAATT	TK
	TK3/LF	TGGAAGTGTGCCATTAGACT	TK
	TK3/LB	GCTCAAGAACCGGAGAACCA	TK

TABLE 6.6 – Séquence des trois jeux d'amorces LAMP FHV-1 retenus.

Species	Primer name	Sequence	Target gene
<i>C. felis</i>	CF1/F3	CATCCGTGCAGGATTCTAC	ompA
	CF1/B3	AGTAACCATTAGACGCTCCTA	ompA
	CF1/FIP	CAGTGGTGTGCTTGCA GTTCAAACCATCAGCGGAA TGG	ompA
	CF1/BIP	TCGCTGCCGACAGATCAAATAGTAA GCA GCA TTGGTGC	ompA
	CF1/LF	AGAA GCTGCTGTTGGAGC	ompA
	CF1/LB	ATCTTCAAGATGCCGAATGGT	ompA
<i>C. felis</i>	CF2/F3	CTCCTTACAA GCCTTGCC	ompA
	CF2/B3	CCATTCGGCATCTTGAAGA	ompA
	CF2/FIP	AATCCTGCA CGGATGCTGATAGGCTTCAGGAGATCCTTGTG	ompA
	CF2/BIP	AAACCATCAGCGGAA TGGCTTGGTGTGCTTGCA GTTC	ompA
	CF2/LF	CACACCAAGTAGCA CAAGGA	ompA
	CF2/LB	GCTCCAACAGCAGCTTCT	ompA
<i>C. felis</i>	CF3/F3	TAGGAGCGTCTAATGGTACT	ompA
	CF3/B3	CCTCTAGGCTTGTGATCATG	ompA
	CF3/FIP	CGTTTGGACGCTGAT TGGCGCA TTTAACCTTGTGCGATTG	ompA
	CF3/BIP	TTCTTGGAGCGT TGGTGCCTTGGAA TTCAGCTCCCAAAG	ompA
	CF3/LF	ATCAGTTCCTGCAAGCCAAT	ompA
	CF3/LB	AGCTTTGTGGGAATGTGGT	ompA
<i>C. felis</i>	CF4/F3	TGAATGGCAA GTAGGATTGG	ompA
	CF4/B3	AACAGCAATACCA CAAGCT	ompA
	CF4/FIP	TGAGCAA TGCGGATAGTGTGAGCATGCTTGTCCATACATTGG	ompA
	CF4/BIP	TTGGCCTCAGCAATCCTAAA CTTTGGAGGTGTCTAAA GTTGTG	ompA
	CF4/LF	TCGAAA GTAGCTCTTGACCAAT	ompA
	CF4/LB	ACAACTGGAAACCACTC	ompA

TABLE 6.7 – Séquence des quatre jeux d'amorces LAMP *C. felis* retenus.

Species	Primer name	Sequence	Target gene
<i>FCV</i>	FCV1/F3	CATCCGTGCAGGATTCTAC	CPG
	FCV1/B3	AGTAACCATTAGACGCTCCTA	CPG
	FCV1/FIP	CAGTGGTGTGCTTGCA GTTCAAACCATCAGCGGAA TGG	CPG
	FCV1/BIP	TCGCTGCCGACAGATCAAATAGTAA GCA GCA TTGGTGC	CPG
	FCV1/LF	AGAA GCTGCTGTTGGAGC	CPG
	FCV1/LB	ATCTTCAAGATGCCGAATGGT	CPG
<i>FCV</i>	FCV2/F3	CTCCTTACAA GCCTTGCC	CPG
	FCV2/B3	CCATTCGGCATCTTGAAGA	CPG
	FCV2/FIP	AATCCTGCA CGGATGCTGATAGGCTTCAGGAGATCCTTGTG	CPG
	FCV2/BIP	AAACCATCAGCGGAA TGGCTTGGTGTGCTTGCA GTTC	CPG
	FCV2/LF	CACACCAAGTAGCA CAAGGA	CPG
	FCV2/LB	GCTCCAACAGCAGCTTCT	CPG
<i>FCV</i>	FCV3/F3	TAGGAGCGTCTAATGGTACT	CPG
	FCV3/B3	CCTCTAGGCTTGTGATCATG	CPG
	FCV3/FIP	CGTTTGGACGCTGAT TGGCGCA TTTAACCTTGTGCGATTG	CPG
	FCV3/BIP	TTCTTGGAGCGT TGGTGCCTTGGAA TTCAGCTCCCAAAG	CPG
	FCV3/LF	ATCAGTTCCTGCAAGCCAAT	CPG
	FCV3/LB	AGCTTTGTGGGAATGTGGT	CPG

TABLE 6.8 – Séquence des quatre jeux d'amorces rt-LAMP *FCV* retenus.

Species	QUASR Primer name	Sequence	Quencher sequence
<i>Salmonella sp.</i>	S/ENT/FIP	F/AATGCCAGACGAAAGAGCGTTCGTTCTACATTGACAGAAATCC	GTCTGGCATT/Q
<i>S. pneumoniae</i>	S/PNEU/FIP	F/TTCTTCTGCCAGCCTGTTCAACATTAGCCGTGAGCAGTT	GGCAGAAAGAA/Q
<i>S. aureus</i>	S/AUR/LoopB	F/AATGTCACAGGGTATGATAGGC	CTGTGACATT/Q
<i>E. coli</i>	E/COL/LoopF	F/CATACTCAGAGTGTCTGAAGG	TCTGAGTATG/Q
<i>H. influenza</i>	H/INF/LoopB	F/CCCACATCGTCACCGTAAA	ACGATGTGGG/Q
DENV-1	DENV1/LoopB	F/ATGAGACCAATGTTGCTGT	TTGGTCTCAT/Q
DENV-2	DENV2/BIP	F/CAAAACGAGATGGGTTTCTGGATTGCTGGGTTGTAATGCTT	ATCTCGTTTG/Q
DENV-3	DENV3/FIP	F/ACGACGGAGCTACAGGCAGAAAGAAATCAAGCCCAA	TCCGTCGT/Q
DENV-4	DENV4/LoopB	F/CTGTACGCGTGGCATATTG	ACGCGTACAG/Q
DENV	DenV1-4/LoopB/1234	F/CAGAGATCCTGCTGTCTC	GGATCTCTG/Q
CHIKV	CHIKV/LB	F/AAGCCCTTATCCGCTGG	ATAAGGGCTT/Q
ZIKV	ZIKV/FIP	F/TTGCA GTGCCACCGCCATAGTCACAGTGGAGGTACAG	GGACATGCAA/Q
Sigmavirus	SIGV/FIP	F/GCGGAGAGATGGAGTGTGAAATATGCCATAAGGTGAAGTATGAG	ATCTCTCCGC/Q

TABLE 6.9 – liste des amorces QUASR utilisées dans la suite du manuscrit. F/ symbolise la position du fluorophore dans l'amorce QUASR en 5' et /Q symbolise la position du quencher dans le brin quencher, en 3'.

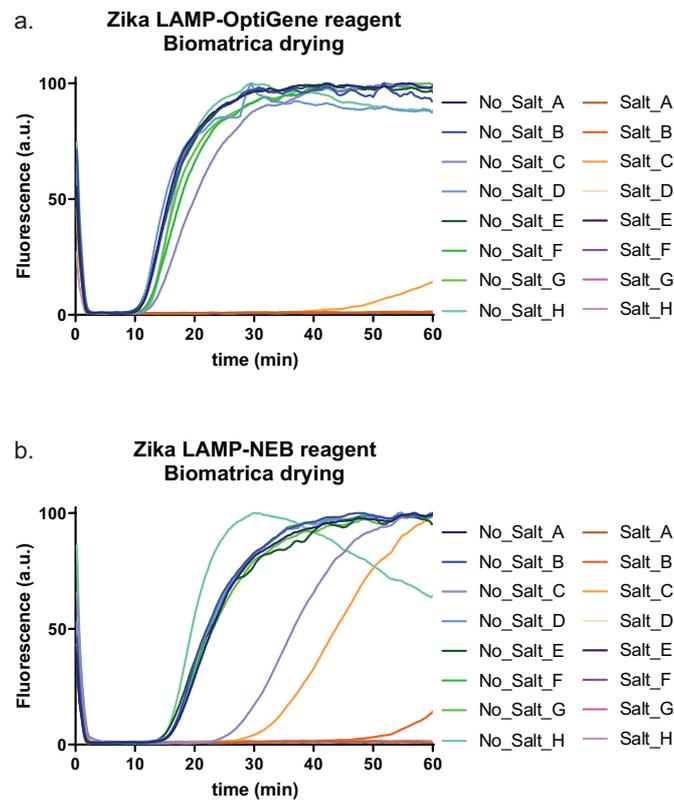


FIGURE 6.1 – Comparaison des matrices Biomatrix pour le séchage de mélanges LAMP.

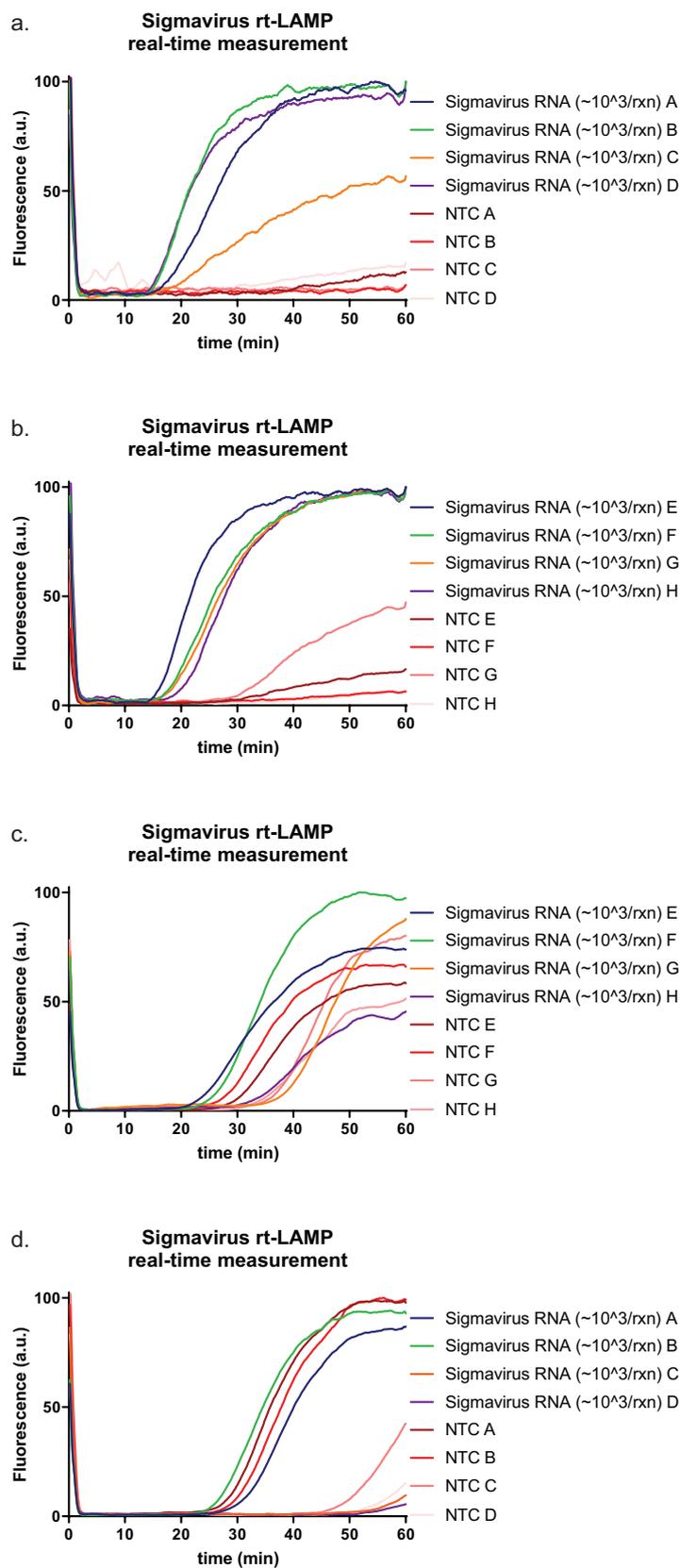


FIGURE 6.2 – Comparaison des matrices Biomatrixa pour le séchage de mélanges LAMP.

RÉSUMÉ

Le papier a récemment été redécouvert, en tant que matériau microfluidique pour la fabrication de systèmes d'analyses rapides. Ses fonctions de pompe capillaire, de filtration, sa disponibilité et son bas coût en font le parfait candidat pour des tests diagnostiques de terrain [1].

Depuis l'épidémie de maladie à virus Ebola en 2014, le laboratoire MMN et l'Institut Pasteur collaborent pour réaliser sur papier microfluidique des tests de biologie moléculaire (type PCR) pour le diagnostic de maladies infectieuses. Des expériences réalisées à Macenta (Guinée) sur des échantillons d'ARN purifiés ont démontré la pertinence de la technologie [2].

Dans ce travail de thèse, nous avons adapté au papier le suivi en temps réel d'un des tests de biologie moléculaire, la réaction LAMP. Nous avons exploré par la suite plusieurs modes de multiplexages des tests LAMP sur papier, ainsi que différents procédés de stockage des réactifs. Enfin, une méthode de purification d'ARN par capillarité a été mise au point, permettant la préparation d'un échantillon biologique réel (plasma, sérum, etc).

Ces nouveaux développements ont été intégrés dans le cadre d'une application pertinente : un test multiplexé pour la détection des virus Zika, Dengue et Chikungunya. Ces trois virus transmis par le même moustique, et provoquant des symptômes similaires, sont responsables de plusieurs épidémies récentes, dont l'épidémie à virus Zika qui a frappé le Brésil en 2016, et provoqué des complications neurologiques graves [3].

Enfin, nous ouvrirons ce travail sur le développement d'applications en dehors du diagnostic humain, notamment dans le domaine vétérinaire.

MOTS CLÉS

Microfluidique papier, Diagnostic, Test par amplification d'acide nucléique, LAMP.

ABSTRACT

Paper has recently been pointed out as an ideal substrate for microfluidic analysis systems. Capillary pumping and filtration abilities, along with its low cost and wide availability, are perfectly suited for point of care diagnostic applications [1].

Since the 2014 Ebola outbreak, the MMN Laboratory and the Pasteur Institute are working to conduct molecular biology tests on paper microfluidics for the diagnosis of infectious diseases. Tests realised in Guinée in 2015, by the two teams, have shown the pertinence of the technology [2].

In this thesis, we adapted on paper a molecular biology test called LAMP. Later we developed several ways of multiplexing LAMP tests and storing LAMP reagents on paper. We then achieved RNA capture on a paper device, allowing sample preparation of complex matrices, such as plasma or serum.

All those findings have been integrated for one relevant application : A multiplexed test for the detection of Zika, Dengue and Chikungunya viruses. Those three viruses, sharing the same mosquito vector, and leading to the same symptoms have been involved in several recent epidemics. Among them the Brazilian Zika outbreak in 2016, which brought up some severe neurological complications [3].

At last, we will present and discuss some developments out of human diagnosis scope, especially in veterinary sciences.

KEYWORDS

Paper microfluidic, Diagnostic, nucleic acid amplification test, LAMP.

[1] Martinez et al. (2009). Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. Analytical Chemistry.

[2] Magro et al. (2017). Paper-based RNA detection and multiplexed analysis for Ebola virus diagnostics. Scientific reports.

[3] World Health Organization. (2016). One year into the Zika outbreak: how an obscure disease became a global health emergency.