

La PCR isotherme multiplexée en microfluidique pour la détection d'agents pathogènes

Résumé L'ADN bactérien est un biomarqueur exogène qui, après amplification par PCR (« polymerase chain reaction ») peut être détecté à partir d'un échantillon biologique comme le sang ou l'urine. La détection de cet ADN amplifié permet d'identifier l'agent pathogène responsable de l'infection, ainsi que ses éventuelles résistances aux antibiotiques lorsqu'il s'agit d'une infection bactérienne. Bien que très sensible, la PCR nécessite un équipement sophistiqué, des infrastructures et du personnel qualifié pour sa mise en œuvre. Une méthode d'amplification de l'ADN, dans des conditions isothermes, appelée LAMP (« loop-mediated isothermal amplification ») permettrait de simplifier le schéma de détection. Mais la LAMP nécessite l'utilisation d'amorces pour la détection d'une cible unique, ce qui rend ses possibilités de multiplexage très limitées et empêche la recherche simultanée de plusieurs biomarqueurs bactériens dans un même mélange réactionnel. L'utilisation de la microfluidique offre de nouvelles stratégies pour multiplexer des réactions de LAMP tout en restant simple d'utilisation.

Mots-clés Biomarqueurs, maladies infectieuses, diagnostic, microfluidique, LAMP, amplification isotherme.

Abstract Multiplexed isothermal PCR in microfluidics for the detection of pathogens

Bacterial DNA is an exogenous biomarker that after amplification by PCR (polymerase chain reaction) can be detected in biological samples such as blood or urine. Detection of this amplified DNA makes it possible to identify pathogens responsible for infections and their potential resistance to antibiotics in the case of a bacterial infection. Although PCR is highly sensitive, it requires a sophisticated system that calls for infrastructure and qualified staff. A method for DNA amplification under isothermal conditions, called LAMP ("loop-mediated isothermal amplification") would simplify the detection workflow. However, LAMP requires primers to detect a single target which limits its multiplexing capabilities, and therefore prevents the simultaneous search for several bacterial biomarkers in the same reaction mix. Microfluidics allow the implementation of novel strategies for multiplexing LAMP while remaining simple to use.

Keywords Biomarkers, infectious diseases, diagnostic, microfluidic, LAMP, isothermal amplification.

Le diagnostic des maladies infectieuses : un enjeu sanitaire mondial

Les maladies infectieuses représentent le problème sanitaire le plus important dans le monde [1]. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques complique la prise en charge des infections bactériennes et est responsable d'une forte mortalité [2]. La détection et l'identification rapide de l'agent pathogène responsable d'une infection sont primordiales afin d'adapter le traitement selon l'agent pathogène concerné et ses résistances associées, et de prendre les mesures de prévention nécessaires pour éviter sa propagation. Les méthodes de référence se basent la plupart du temps sur l'observation phénotypique (culture, observation microscopique, tests biochimiques, etc.). Ces méthodes sont fastidieuses et chronophages, le délai de réponse pouvant aller jusqu'à plusieurs jours, entraînant l'administration d'un traitement sans *a priori* parfois inadapté ou l'administration tardive d'un traitement approprié, et donc des risques de complications pour les patients et une pression accrue sur les systèmes de santé (coûts, personnel, places disponibles...).

Des tests à l'échelle moléculaire basés sur la détection de l'ADN (acide désoxyribonucléique), tels que la PCR (« polymerase chain reaction »), permettent de réaliser l'amplification de séquences cibles d'ADN et de gagner ainsi en rapidité, spécificité et sensibilité. Cependant, les technologies telles que la PCR requièrent des infrastructures adaptées, du matériel coûteux et du personnel qualifié pour la préparation des échantillons, et peuvent être difficiles d'accès dans les environnements aux ressources limitées ou dans les territoires

isolés. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a défini les critères ASSURED (abordable, sensible, spécifique, simple d'utilisation, rapide, sans équipement, facilement transportable), qui définissent les caractéristiques idéales d'un test diagnostique [1]. Une méthode d'amplification isotherme d'une partie de l'ADN de l'agent pathogène, telle que la LAMP (« loop-mediated isothermal amplification »), couplée à la microfluidique, permettrait de conserver, voire d'améliorer la spécificité, la sensibilité et la rapidité, caractéristiques de la PCR, tout en restant simple d'utilisation afin de se rapprocher au mieux des critères ASSURED.

Une histoire d'amplification

Les premières publications rapportant l'amplification de brins d'ADN datent des années 1970, mais il faut attendre le dépôt d'un brevet par l'entreprise Cetus en 1986 pour la première description de la PCR [3]. Cette véritable photocopieuse à ADN a ouvert la voie à de multiples applications, de la détection d'une mutation pour le diagnostic d'une maladie génétique ou dans le cadre d'un cancer, à l'amplification d'une cible d'intérêt (ADN viral ou bactérien...) jusqu'au diagnostic de maladies infectieuses.

Après une étape d'extraction de l'ADN d'intérêt à partir de l'échantillon, l'amplification d'une séquence donnée sur un brin d'ADN est réalisée grâce à un thermocycleur, dispositif de chauffage complexe, coûteux et énergivore. Il permet de réaliser la succession de cycles de chauffage et de refroidissement du mélange réactionnel, chaque cycle comportant trois étapes à des températures différentes, aboutissant à la

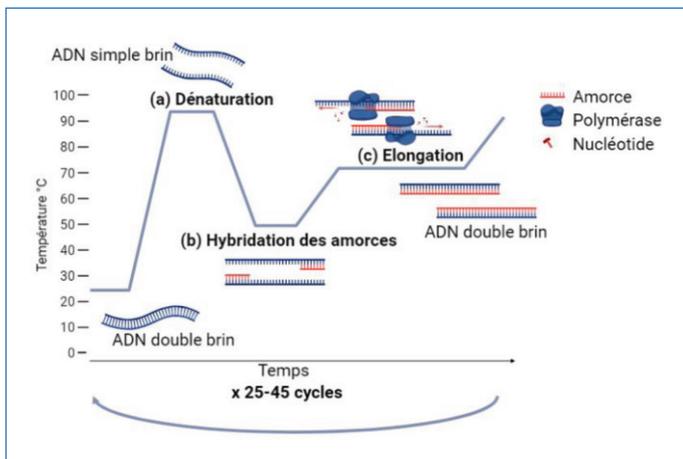


Figure 1 - Cycles de températures aboutissant à l'amplification d'un brin mère en deux brins d'ADN fils par PCR : (a) dénaturation du double brin d'ADN mère par la chaleur, qui rompt les liaisons hydrogène liant les deux brins (10-60 sec) ; (b) hybridation des amorces (séquences complémentaires au brin cible) (30-60 sec) ; (c) élongation par l'intermédiaire d'une polymérase thermostable (enzyme qui catalyse l'élongation d'un brin d'ADN par enchaînement de nucléotides complémentaires) (30 sec-quelques minutes).

formation de deux molécules d'ADN double brin identiques, appelées amplicons, à partir d'une molécule d'ADN double brin mère [4] (figures 1 et 2). Les séquences amplifiées ont généralement une taille de 50 à 200 paires de bases, la durée des étapes de dénaturation, d'hybridation des amorces et d'élongation dépendent de la taille de la séquence cible. Pour

visualiser les amplicons en point final, une migration par électrophorèse dans un gel d'agarose contenant un intercalant de l'ADN (historiquement le bromure d'éthidium (BET)) visible sous exposition aux UV est largement utilisée. Les molécules d'ADN migrent dans le gel en fonction de leur taille (nombre de paires de bases) et des marqueurs de taille permettent d'identifier si les amplicons ont la taille attendue. Une autre méthode permettant de mettre en évidence l'apparition d'amplicons est la PCR en temps réel. Elle permet le suivi de l'amplification au cours du temps par fluorescence, et donc d'introduire une notion de quantification. En effet, plus la cible est en quantité importante dans l'échantillon initial, plus l'amplification est détectée tôt. L'augmentation de la fluorescence au cours du temps est permise par l'ajout dans le mélange réactionnel d'une molécule intercalant l'ADN et possédant la propriété de fluorescer mille fois plus lorsqu'elle est intercalée entre deux brins d'ADN. Cette technique présente l'avantage de pouvoir être employée quelle que soit la cible. La PCR en temps réel est la technologie de PCR la plus utilisée dans les laboratoires d'analyses médicales.

Enfin la PCR digitale (dPCR), développée initialement en plaque à puits et disponible aujourd'hui sous format microfluidique, fait intervenir un fractionnement de l'échantillon en condition de dilution limite, afin d'aboutir en moyenne à une séquence cible par compartiment. Chaque molécule d'ADN peut ainsi être amplifiée indépendamment des autres de manière parallélisée, ce qui permet d'améliorer la sensibilité de la détection. La dPCR permet également un multiplexage

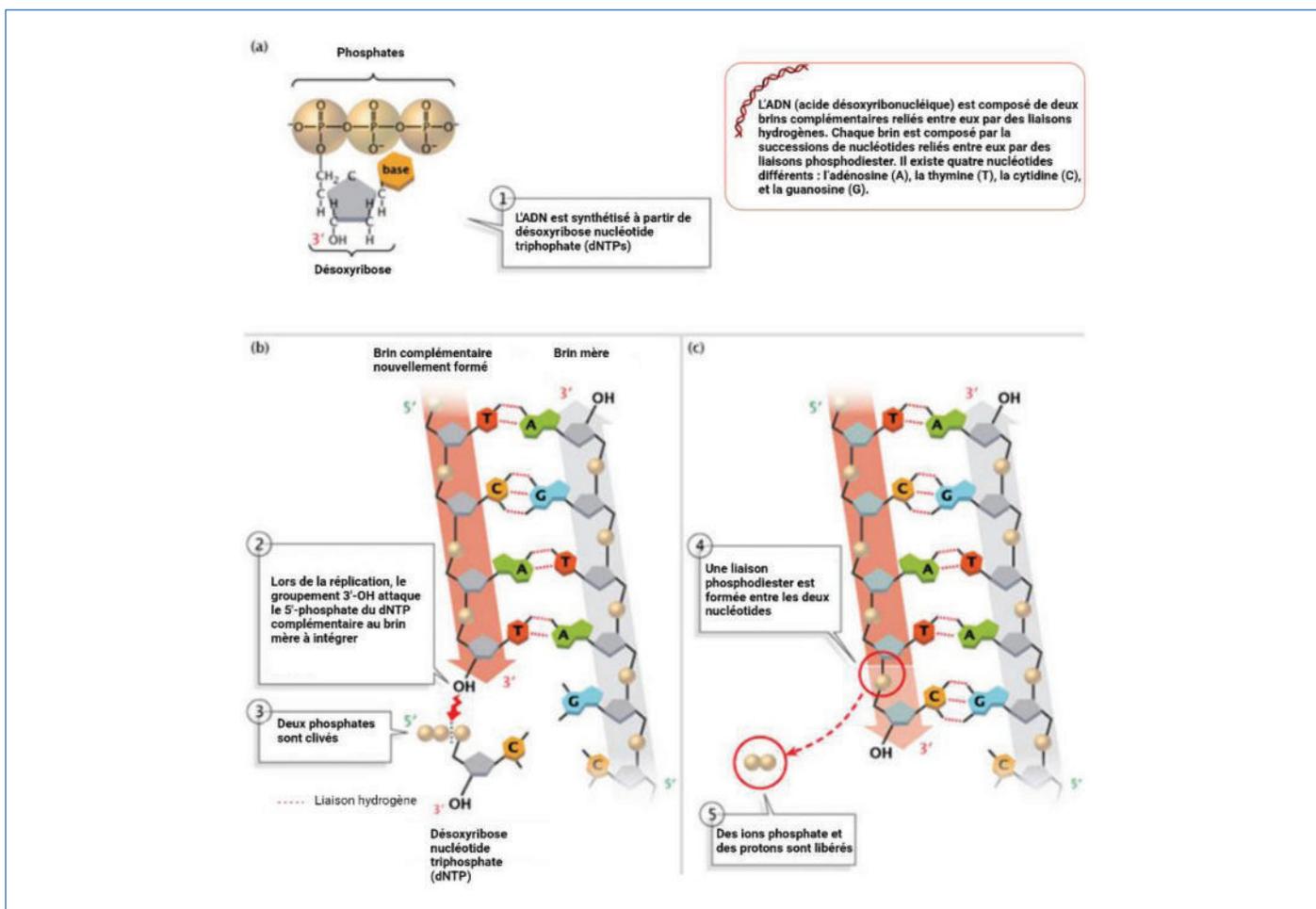


Figure 2 - Formation d'un brin d'ADN complémentaire par élongation grâce à une polymérase à partir d'un brin mère : (a) structure d'un désoxyribose nucléotide triphosphate (dNTP) ; (b) intégration d'un dNTP au sein d'un brin en cours d'élongation ; (c) formation d'une liaison phosphodiester liant les nucléotides d'un même brin et d'une liaison hydrogène liant les deux brins complémentaires. (Adapté de [3]).

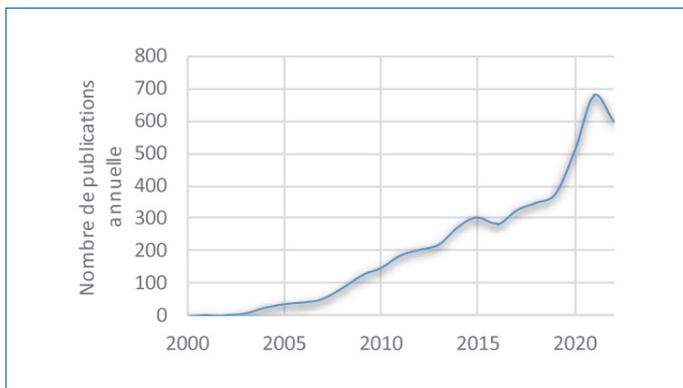


Figure 3 - Nombre de publications référencées sur PubMed concernant la LAMP entre 2000 et 2022, avec la requête « LAMP assay [Supplementary Concept] OR loop mediated isothermal amplification ».

qui est la détection simultanée de plusieurs cibles, ainsi que la quantification absolue [5]. Cette technique est notamment utilisée dans le cadre de la recherche de mutations dans le domaine de la cancérologie, grâce à l'emploi de sondes spécifiques permettant une discrimination allélique [5]. Des évolutions technologiques [6] dérivées de la PCR digitale ont été développées pour miniaturiser cette technologie et faciliter la préparation de l'échantillon, étape chronophage et nécessitant du personnel de laboratoire qualifié ; cependant elles nécessitent toujours l'utilisation d'un thermocycleur.

La LAMP : une technique au cœur de l'innovation

La LAMP a été développée au début des années 2000 dans le but d'éviter l'utilisation du thermocycleur, grâce à une amplification à température constante, et de pallier le manque de spécificité des méthodes d'amplification isothermes déjà décrites [7], telles que la NASBA (« nucleic acid sequence-

based amplification ») (1991) [8] et la SDA (« strand displacement amplification ») (1992) [9]. Le nombre d'articles référencés sur PubMed concernant la LAMP depuis la première publication en 2000 est en constante augmentation, avec un pic en 2020 et 2021 dû à la pandémie mondiale de Covid-19, pendant laquelle la nécessité de diagnostic rapide, fiable et peu coûteux est passée en priorité des problématiques de santé publique, et donc de recherche (figure 3).

La LAMP est facilement réalisable sans équipement spécifique. En effet, il est possible de faire l'amplification dans un bain-marie ou dans une étuve étant donné qu'elle se déroule à température constante, tout en conservant une bonne spécificité et une très bonne sensibilité (quelques copies de l'ADN cible) [7]. Cependant, c'est une technique qui est sensible aux contaminations croisées avec l'ADN présent sur les surfaces où sont préparés les échantillons [10]. L'amplification isotherme est réalisée avec l'enzyme *Bst* qui possède une activité lui permettant de déplacer les brins en plus de l'activité polymérase à 60-65 °C, ce qui permet de s'affranchir de l'étape de dénaturation de l'ADN double brin par chauffage à 90-95 °C [7, 10]. Une première étape d'initiation faisant intervenir les amorces FIP (« forward inner primer »), BIP (« backward inner primer »), B3 (« backward primer »), F3 (« forward primer ») permet d'obtenir un brin d'ADN avec une boucle à chaque extrémité. Ensuite une cascade d'amplifications grâce aux amorces facultatives LF (« loop primer forward ») et LB (« loop primer backward »), permet d'obtenir des amplicons de formes et de tailles différentes (de 150 à plus de 1 000 paires de bases) [7, 10] (figure 4).

Les amplicons ainsi obtenus sont également détectables par électrophorèse sur gel d'agarose, mais ce n'est pas la méthode de choix car leur taille est très variable et c'est une méthode fastidieuse. Il est également possible de faire un suivi en temps réel grâce à un intercalant de l'ADN fluorescent, de la même

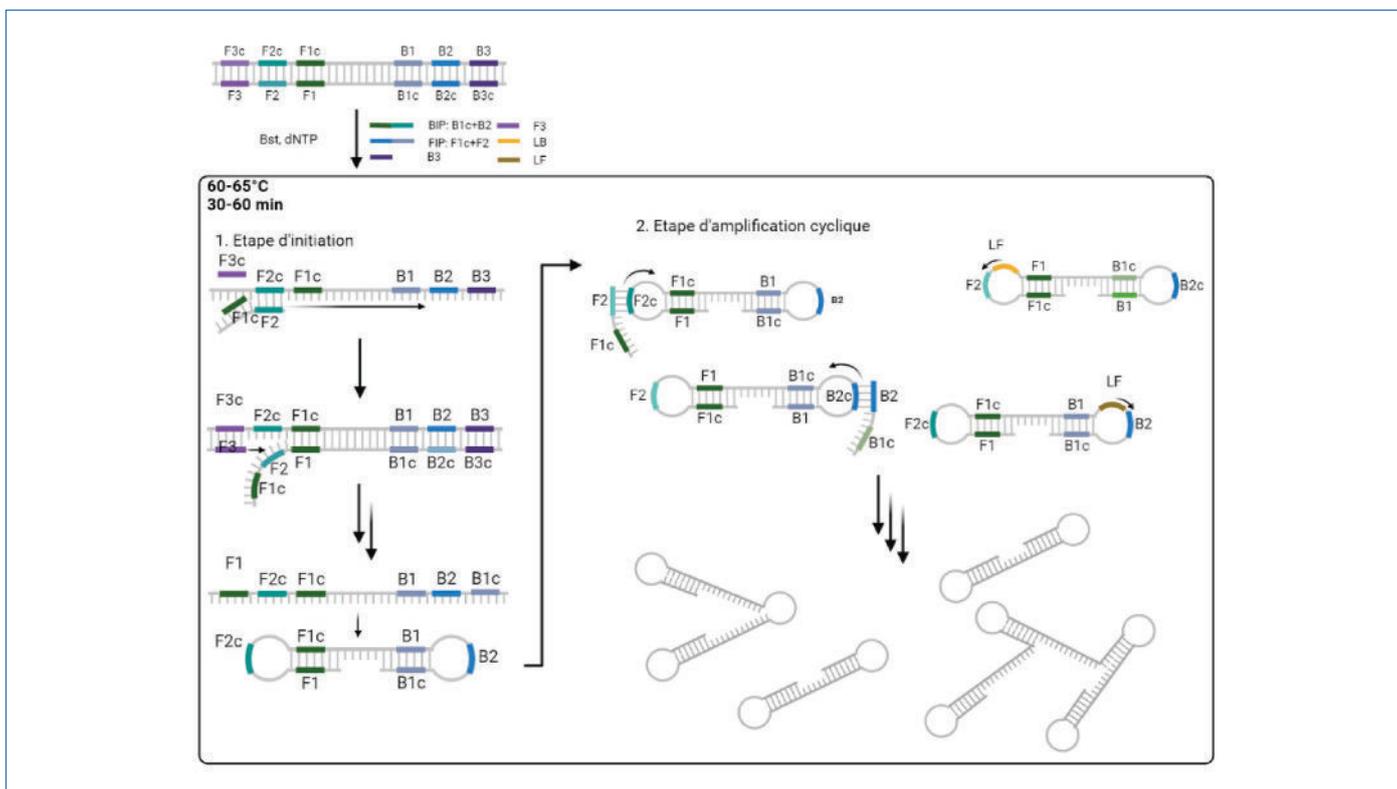


Figure 4 - Réaction d'amplification d'une séquence d'ADN double brin par LAMP.

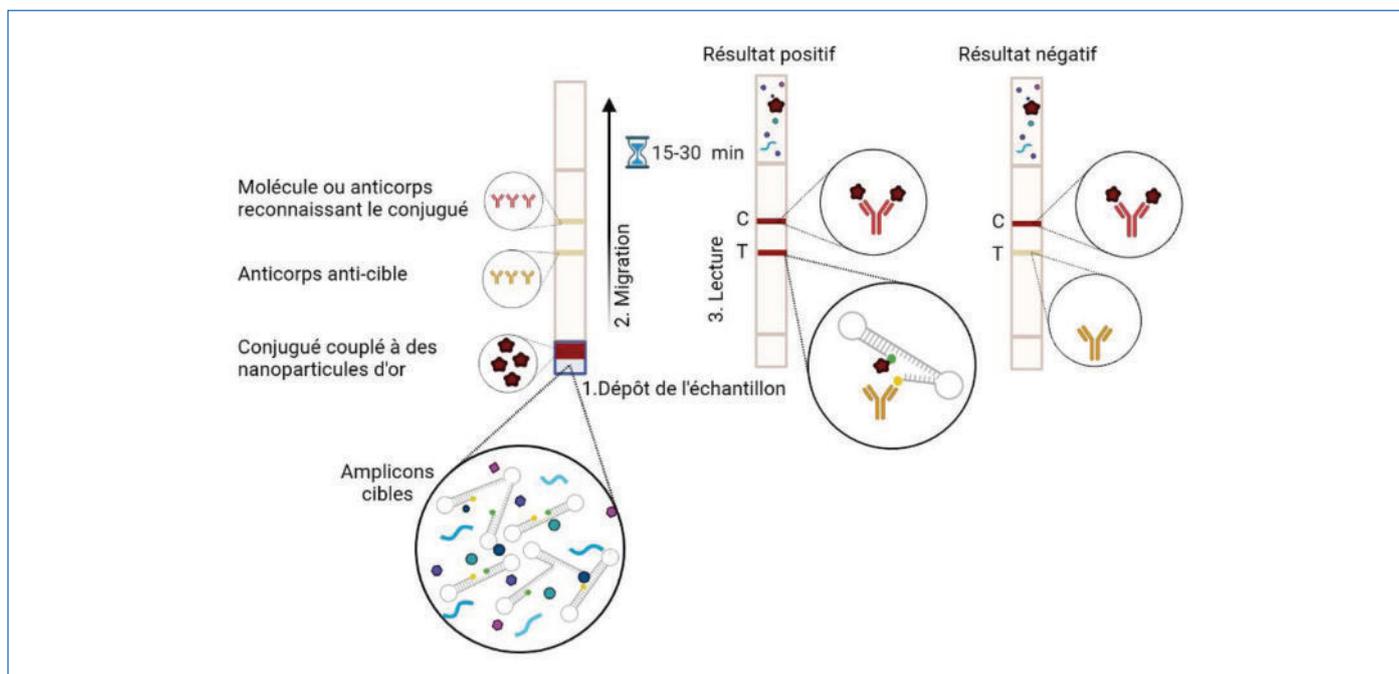


Figure 5 - Détection sur bandelette des brins d'ADN néosynthésés par LAMP (amplicons cible).

façon que pour la PCR en temps réel. La turbidité peut aussi être mesurée au cours du temps, grâce à l'augmentation lors de l'amplification d'ions pyrophosphates libres qui se lient au magnésium contenu dans le milieu réactionnel, formant un précipité de pyrophosphate de magnésium [11]. Ces ions pyrophosphates libres sont libérés lorsqu'un désoxyribose nucléotide triphosphate (dNTP), composant élémentaire de l'ADN, est intégré dans la chaîne d'ADN nouvellement formée sous forme monophosphate (voir figure 2).

Ces méthodes fournissent des informations intéressantes mais nécessitent l'utilisation d'appareils sophistiqués pour la détection. De nombreux tests en point final ont été mis au point, qui présentent l'avantage d'être adaptés au format terrain. Les tests colorimétriques utilisent des indicateurs colorés pour mettre en évidence les changements de l'environnement chimique du milieu réactionnel :

- les indicateurs métalliques tels que le bleu d'hydroxynaphtol (HNB) ou la calcéine sont sensibles à la diminution de la concentration en magnésium libre par formation de magnésium pyrophosphate [12] ;
- les indicateurs de pH tels que le rouge de phénol, le rouge neutre et le rouge de crésol changent de couleur avec la diminution du pH (d'environ 8,8 à 6) au cours de la réaction du fait de la libération de protons lors de la liaison du pyrophosphate d'un dNTP avec la chaîne d'ADN en cours de formation [13].

Il est possible de coupler des amorces de LAMP avec une molécule se liant avec une autre molécule couplée aux nanoparticules d'or (par exemple biotine et streptavidine) et ainsi utiliser ce système comme détection colorimétrique. En effet, grâce à la propriété de résonance plasmonique des nanoparticules d'or, on observe un changement du rouge lorsqu'elles sont libres en solution au violet-bleu lorsqu'elles sont rapprochées les unes des autres. La turbidité peut également être observée à l'œil nu [14], ainsi que la fluorescence à l'aide d'une lampe UV [15]. Ces techniques de détection qualitatives peuvent manquer de précision, puisque soumises à la subjectivité d'interprétation de l'observateur, et conduire à des résultats qualifiés de faux positifs ou de faux négatifs.

Certains tests commerciaux sont accompagnés d'un petit lecteur pour la colorimétrie, la turbidité ou la fluorescence afin de pallier ce biais et de rendre le test plus fiable, comme par exemple Alethia®, intégrant l'incubation et la lecture, commercialisés par Meridian Bioscience®.

Il est également possible de coupler la LAMP à une détection sur bandelette [16]. Il faut pour cela marquer avec une étiquette deux des six amorces, une des étiquettes sera reconnue par l'anticorps fixé sur la membrane et l'autre formera une liaison avec le conjugué couplé à une nanoparticule d'or (par exemple l'étiquette biotine reconnue par la streptavidine couplée à l'or colloïdal), formant ainsi une ligne rouge en cas d'échantillon positif par accumulation des nanoparticules d'or à l'endroit où sont fixés les anticorps de la ligne test. La ligne contrôle sera constituée de molécules ou d'anticorps fixés reconnaissant le conjugué (figure 5).

Concernant la LAMP digitale [17], tout comme pour la PCR digitale, différents développements sont en cours afin de permettre d'être plus rapide et moins sensible que la PCR aux inhibiteurs. Ces techniques ne sont pas encore disponibles pour des applications sur le terrain car des appareils de lecture perfectionnés, comme par exemple un microscope confocal, sont nécessaires pour la lecture des résultats.

Détection et diagnostic par des systèmes commerciaux de LAMP

Il existe des tests déjà commercialisés qui se basent sur la technique de LAMP pour la détection d'agents pathogènes. De nombreux tests trouvent leur application en contrôle qualité dans l'industrie agro-alimentaire pour le contrôle des matières premières, des produits finis et de l'environnement de production. Il existe par exemple de nombreux kits et appareils pour la détection de *Salmonella*, des bactéries retrouvées dans les produits d'origine animale et pouvant être responsables d'infections gastro-intestinales graves. Ces tests étant destinés aux industriels, on retrouve majoritairement des tests de détection en temps réel, nécessitant une préparation de l'échantillon par du personnel formé et l'utilisation

d'un appareil pour la détection, mais présentant l'avantage d'un gain de temps par rapport aux méthodes de référence. D'autres tests trouvent leur application en diagnostic clinique, au « chevet du patient », avec un minimum de manipulation des échantillons et d'instrumentation. La LAMP est adaptable en dispositif terrain grâce à la possibilité de lyophilisation des réactifs et de détection en point final [7, 10]. Comme évoqué précédemment, la pandémie de Covid-19 a accéléré la recherche et le développement de dispositifs de diagnostic. Il existe donc plusieurs applications commerciales pour la détection du Covid-19 [10] mettant en œuvre la détection, d'un changement de couleur du milieu réactionnel, de la fluorescence ou de la turbidité, avec lecture et interprétation grâce à un lecteur [18], comme ID NOW™ commercialisé par Abbott. Le test Lucira™ a même été développé pour une utilisation à la maison, grâce à une préparation très simple ressemblant à celle effectuée pour les tests bandelette, et un appareil très compact pour l'incubation et la détection. Il existe également des applications en parasitologie, notamment pour le diagnostic du paludisme, une pathologie endémique causée par des parasites du genre *Plasmodium* et responsable d'une importante mortalité dans certaines régions d'Afrique. Deux dispositifs sont commercialisés pour diagnostiquer le paludisme par LAMP, avec détection des amplicons en point final (turbidité) : Loopamp™ (Eiken Chemical), et Alethia® (Meridian Bioscience Inc.), commercialisé avec un lecteur pour rendre l'interprétation plus objective [19]. Pour le diagnostic d'infections bactériennes, la détection de cibles multiples est indispensable pour l'identification de la bactérie et de ses résistances aux antibiotiques. En effet, ces informations sont codées par des gènes différents. Il existe des kits permettant la détection simultanée de plusieurs cibles avec détection par fluorescence en temps réel, comme eazplex® commercialisé par AmplexDiagnostics. Bien que ces solutions permettent de gagner en rapidité par rapport aux

méthodes de référence, la nécessité de manipulation par du personnel qualifié n'est pas adaptée au format terrain ou au chevet du patient. Un des leviers pour contourner ce problème est le multiplexage en puce microfluidique.

La microfluidique : une stratégie pour le multiplexage sur le terrain

La microfluidique est une technologie permettant la manipulation de fluides dans des canaux à l'échelle micrométrique. Son utilisation dans le cadre d'une application à un test analytique permet la réduction des volumes réactionnels afin d'obtenir un dispositif compact et adapté à l'utilisation sur le terrain, et également de réduire les coûts en réactifs. Cela peut également contribuer à la simplification des manipulations en permettant l'intégration de toutes les étapes (préparation de l'échantillon, amplification, détection) au sein d'un unique dispositif. Les possibilités de design sont infinies et permettent de répondre à la spécificité de chaque projet.

Différents articles publiés ces dernières années décrivent des dispositifs microfluidiques permettant de réaliser des réactions de LAMP multiplexes pour la détection d'agents pathogènes. Ces puces microfluidiques sont pour la plupart fabriquées en matériau plastique sous le format de canaux et de chambres en parallèle [20] (figure 6a). Certaines publications présentent des puces sous le format de disques à centrifuger (figure 6b), permettant l'avancée des réactifs dans les différents compartiments de la puce grâce à la force centrifuge [21]. Une publication rapporte un format original avec une centrifugation à la main, permettant de s'affranchir totalement d'équipement autre que le dispositif de chauffage [22]. Dans cette optique d'utilisation réduite d'équipement, des puces ont été réalisées intégralement en papier tout en intégrant les étapes de préparation de l'échantillon, d'amplification et de détection [23] (figure 6c). Ces différents matériaux

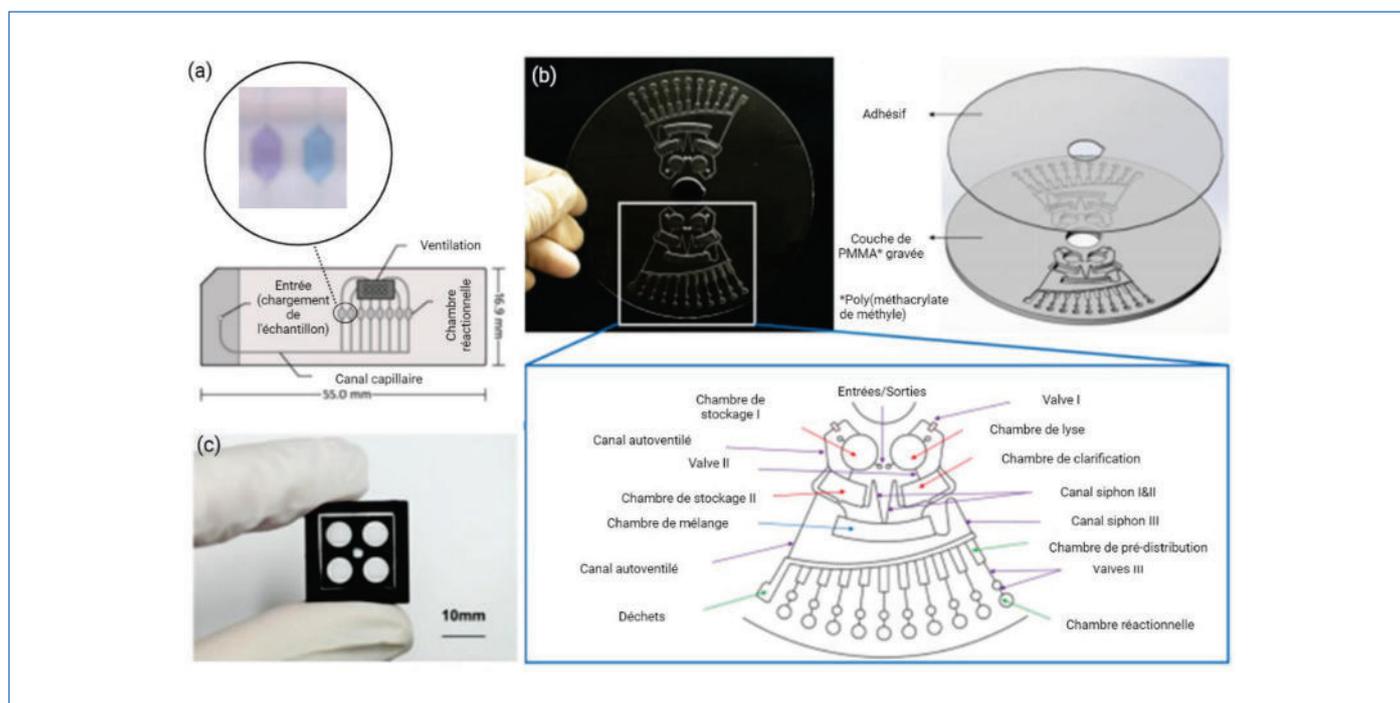


Figure 6 - Systèmes microfluidiques pour la réalisation de réactions d'amplification LAMP pour la détection de cibles multiples à partir d'un échantillon. (a) Canaux et huit chambres de réaction en parallèle, exemple de résultat positif (bleu ciel, à droite) et négatif (violet, à gauche) avec un test colorimétrique en puce avec du HNB. (b) Puce sous le format de disque à centrifuger avec vingt chambres réactionnelles. (c) Puce en papier avec quatre compartiments réactionnels (assemblage de papier de verre, membrane de polysulfone et membrane de polyéthylène sulfoné imprimée à la cire pour la rendre hydrophobe). (Adapté de [20], [21] et [22]).

sont adaptés à un usage unique, car ils sont faciles et peu coûteux à produire en grande quantité. Le chauffage est réalisé en bain-marie ou sur un bloc chauffant, et la détection est faite par colorimétrie, fluorescence ou sur bandelette. Le dispositif RTisochip-A™ microfluidique de LAMP pour la détection de bactéries a été commercialisé en Chine par Capitalbio [24]. Il permet la détection de 24 cibles simultanément en utilisant seulement 34,5 µL d'échantillon. Les réactifs sont répartis vers les chambres réactionnelles par centrifugation et la détection des amplicons est réalisée en temps réel par fluorescence. C'est un dispositif prometteur mais qui nécessite l'utilisation d'un appareil encombrant pour la centrifugation et la détection.

Vers une commercialisation des dispositifs microfluidiques de LAMP ?

La LAMP peut présenter une alternative aux méthodes de référence et à la PCR pour le diagnostic des maladies infectieuses dans les territoires isolés ou ne bénéficiant pas d'infrastructures sophistiquées. Tout en permettant de gagner en rapidité, sensibilité et spécificité, cette technique est facilement implémentable en dispositif au chevet du patient grâce à la miniaturisation en microfluidique. Pour remplacer les méthodes de référence, les dispositifs développés doivent être faciles d'utilisation et ne pas nécessiter d'instrumentation. La limite de détection doit être semblable, voire plus performante que celle des dispositifs déjà commercialisés. De plus, les résultats obtenus doivent être robustes et reproductibles pour être validés par les autorités sanitaires. Pour passer de la preuve de concept à un produit commercial, tous les aspects de production, conservation des réactifs et d'acheminement ainsi que les aspects réglementaires doivent être pris en compte. Les différentes preuves de concepts récemment publiées permettent d'envisager une commercialisation de dispositifs microfluidiques de LAMP simples, robustes et efficaces pour lutter contre la propagation de maladies infectieuses.

[1] K.J. Land, D.I. Boeras, X.S. Chen, A.R. Ramsay, R.W. Peeling, REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes, *Nat. Microbiol.*, **2019**, 4(1), p. 46-54.
 [2] C.J. Murray *et al.*, Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, *The Lancet*, **2022** ([www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02724-0/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext)).
 [3] K.B. Mullis, Process for amplifying nucleic acid sequences, EP 0 201 184 B1, **1986**.
 [4] L. Pray, Major molecular events of DNA replication, *Nature Educ.*, **2008**, 1(1), 99.
 [5] B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Digital PCR, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1999**, 96(16), p. 9236-41.
 [6] T.K.F. Yung *et al.*, Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients, *Clin. Cancer Res.*, **2009**, 15(6), p. 2076-84.

[7] T. Notomi *et al.*, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28(12), e63.
 [8] J. Compton, Nucleic acid sequence-based amplification, *Nature*, **1991**, 350(6313), p. 91-92.
 [9] G.T. Walker *et al.*, Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique, *Nucleic Acids Res.*, **1992**, 20(7), p. 1691-96.
 [10] M. Soroka, B. Wasowicz, A. Rymaszewska, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR?, *Cells*, **2021**, 10(8), 1931.
 [11] Y. Mori, M. Kitao, N. Tomita, T. Notomi, Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2004**, 59(2), p. 145-157.
 [12] M. Goto, E. Honda, A. Ogura, A. Nomoto, K.I. Hanaki, Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue, *BioTechniques*, **2009**, 46(3), p. 167-172.
 [13] Y. Wang *et al.*, Development of a potential penside colorimetric LAMP assay using neutral red for detection of African swine fever virus, *Front. Microbiol.*, **2021** (www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.609821).
 [14] S. Tamura *et al.*, Development of a highly resolved loop-mediated isothermal amplification method to detect the N526K ftsI mutation of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*, *J. Microbiol. Methods*, **2017**, 141, p. 108-114.
 [15] Q. Li *et al.*, Visual detection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) simultaneously by duplex loop-mediated isothermal amplification, *Food Chem. Mol. Sci.*, **2022**, 4, 100107.
 [16] Y. Wang *et al.*, Loop-mediated isothermal amplification label-based gold nanoparticles lateral flow biosensor for detection of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, *Front. Microbiol.*, **2017**, 8, 192.
 [17] C. Wu *et al.*, TriD-LAMP: a pump-free microfluidic chip for duplex droplet digital loop-mediated isothermal amplification analysis, *Anal. Chim. Acta*, **2022**, 1233, 340513.
 [18] O.I. Wilner, D. Yesodi, Y. Weizmann, Point-of-care nucleic acid tests: assays and devices, *Nanoscale*, **2023**, 15(3), p. 942-952.
 [19] U. Morris, B. Aydin-Schmidt, Performance and application of commercially available loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kits in malaria endemic and non-endemic settings, *Diagnostics*, **2021**, 11(2), 336.
 [20] Y. Wang *et al.*, Genotyping of 30 kinds of cutaneous human papillomaviruses by a multiplex microfluidic loop-mediated isothermal amplification and visual detection method, *Virology*, **2020**, 17(1), 99.
 [21] H. Yan *et al.*, Multiplex detection of bacteria on an integrated centrifugal disk using bead-beating lysis and loop-mediated amplification, *Sci. Rep.*, **2017**, 7(1), 1460.
 [22] M. Li, A. Ge, M. Liu, B. Ma, C. Ma, C. Shi, A fully integrated hand-powered centrifugal microfluidic platform for ultra-simple and non-instrumental nucleic acid detection, *Talanta*, **2020**, 219, 121221.
 [23] Y. Seok *et al.*, A paper-based device for performing loop-mediated isothermal amplification with real-time simultaneous detection of multiple DNA targets, *Theranostics*, **2017**, 7(8), p. 2220-30.
 [24] Z. Li *et al.*, Fully integrated microfluidic devices for qualitative, quantitative and digital nucleic acids testing at point of care, *Biosens. Bioelectron.*, **2021**, 177, 112952.

Capucine TREILLE*, doctorante, **Karla PEREZ-TORALLA**, ingénieure-chercheuse, **Hervé VOLLAND**, ingénieur-chercheur, **Stéphanie SIMON**, ingénieure-chercheuse, et **Hervé BOUTAL**, ingénieur-chercheur, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et technologies pour la santé (DMTS), SPI, Gif-sur-Yvette.

* capucine.treille@cea.fr

