

LA **Loop-mediated** **isothermal Amplification**, UNE AVANCÉE MAJEURE DANS L'ANALYSE EN BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Renaud CASSIER, Rodrigue COURCHANT et Louis-Marie ROCQUE

INTRODUCTION

La technologie de LAMP (*Loop-mediated isothermal AMPlification*) constitue une avancée majeure dans le monde de la biologie moléculaire et permet grâce à son amplification d'ADN à température constante d'apporter une solution au diagnostic terrain (point of care).

Cette technologie décrite pour la première fois en 2000 dans le journal *Oxford University Press* [1] permet une amplification d'ADN très spécifique, efficace et rapide à température constante. De fait, cette technologie ne nécessite pas d'appareil de type thermocycleur.

Les mécanismes moléculaires d'amplifications uniques de la LAMP [1], combinés à une non nécessité de l'extraction des ADN, permettent l'obtention de résultats en moins d'une heure. La lecture des résultats, visuelle et immédiate, participe également à cette rapidité [11].

L'absence de thermocycleur, la rapidité de la réaction et l'absence de purification en font réellement un outil très intéressant pour le diagnostic terrain. Enfin une technologie fiable, sensible et robuste qui permet de réaliser des analyses point of care, ainsi que d'accélérer les temps de décision.

Dans cet article, nous vous proposons de découvrir dans une première partie le fonctionnement de la LAMP et les différents mécanismes moléculaires permettant une amplification isotherme. Puis, nous nous intéresserons à la mise en place concrète d'une analyse utilisant la technologie de LAMP. Enfin nous vous donnerons quelques exemples d'application terrain.

1. LES MÉCANISMES DE LA LAMP

La LAMP est une technique d'amplification d'acides nucléiques qui fait partie des techniques d'amplification isotherme, aussi appelées PCR isothermes (Polymerase Chain Reaction isothermes) [1]. Cette technique de Biologie Moléculaire consiste à amplifier une séquence nucléique cible, à température constante, sans matériel spécifique et sans obligation de purification du matériel génétique. Elle permet d'obtenir des milliards de copies d'une séquence cible en moins d'une heure (souvent une demi-heure suffit), à des niveaux de détection équivalents à ceux de la PCR en temps-réel [7], [8]. La révélation et l'interprétation des résultats sont d'une simplicité extrême, car pouvant être réalisées à l'œil nu (figure 1).

La LAMP présente des caractéristiques uniques faisant sa spécificité.

La première d'entre elles consiste à utiliser de 4 à 6 amorces, conçues pour reconnaître spécifiquement 6 à 8 régions distinctes et spécifiques de la séquence cible. Cela permet une reconnaissance précise et efficace des séquences d'intérêts tout en accélérant le processus d'amplification [1].

La deuxième caractéristique remarquable de la LAMP est la réalisation de l'étape de dénaturation des doubles brins d'ADN sans traitement thermique. La séparation des doubles brins (originels ou néosynthétisés) est réalisée grâce à la combinaison de l'activité de déplacement de brin et l'absence d'activité exonucléasique de la polymérase utilisée [1] [2] [3]. Cette compétence de la polymérase permet donc de ne pas avoir à varier les températures.

La troisième caractéristique de la LAMP repose également sur une propriété de la polymérase : sa résistance aux inhibiteurs. La polymérase est peu sensible à la présence d'inhibiteurs comme

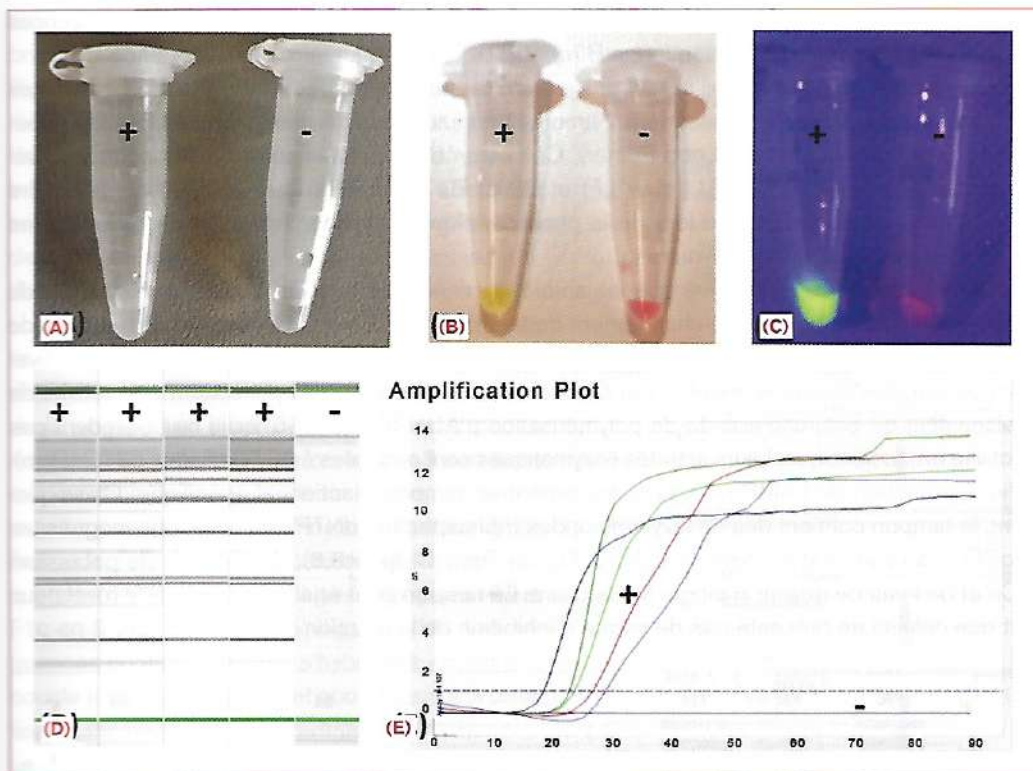


FIGURE 1 - EXEMPLES DE MÉTHODES DE RÉVÉLATION DES AMPLIFICATIONS LAMP
 (A) Turbidimétrie, (B) Colorimétrie par pHmétrerie, (C) Fluorescence,
 (D) Électrophorèse capillaire, (E) Suivi temps-réel par thermocycleur

le sang, le sérum et différents ingrédients contenus dans les aliments [4] [5] [6]. De fait, une analyse de LAMP ne nécessite pas d'ADN hautement purifié et est parfaitement réalisable sur des échantillons non traités [1], [9]. Cela permet de raccourcir et décomplexifier l'analyse, l'étape d'extraction et de purification des matériels génétiques pouvant être une phase longue et difficile.

La quatrième caractéristique intéressante de la LAMP est la réalisation de l'amplification à température constante [1]. La gestion de l'amplification ne nécessitant qu'un maintien à température, il est possible de réaliser l'analyse à l'aide d'un seul bloc-chauffant ou d'un bain marie [14]. Cela présente un double avantage : une limitation certaine de l'investissement nécessaire (quelques centaines d'euros pour un bloc-chauffant contre plusieurs milliers d'euros pour un thermocycleur) et la possibilité de réaliser l'analyse dans tout type d'environnement.

Enfin, la dernière caractéristique unique de la LAMP concerne la lecture et l'interprétation des résultats pouvant être réalisées à l'œil nu, même si des techniques de révélation classiques (tel que la migration sur gel [8] ou le suivi temps-réel en thermocycleur [10] ou en turbidimétrie [9]) sont réalisables. Il est par exemple possible de révéler les résultats par l'utilisation de la turbidimétrie, par un intercalant ADN ou encore par l'utilisation d'indicateurs pHmétrique [11].

La LAMP présente donc un intérêt tout particulier pour la détection de pathogènes (notamment bactéries et virus) dans un contexte d'utilisation terrain en tant que « point-of care ». La simplicité, la rapidité, la fiabilité et la robustesse de la méthode sont les meilleurs atouts de la LAMP.

1.1. PRINCIPE DE LA LAMP

■ Les principaux composants de la LAMP

La LAMP nécessite de réaliser un mix réactionnel. Celui-ci ne diffère que peu des mixs réactionnels classiques utilisés lors de la PCR en demandant d'intégrer des amorces, une polymérase et un tampon de réaction.

Les amorces sont le cœur du système. La LAMP fonctionne avec un jeu de 4 ou 6 amorces possédant chacune des caractéristiques propres.

Un jeu de 4 amorces se compose des éléments suivants (figure 2A) :

- Les amorces extérieures F3 (Forward Outer Primer) et B3 (Backward Outer Primer) spécifiques respectivement des séquences F3c et B3c. Ces amorces servent essentiellement de points d'ancrage à l'enzyme afin de séparer les brins matrices des brins néosynthétisés.
- Les amorces intérieures FIP (Forward Inner Primer) et BIP (Backward Inner Primer) sont les amorces permettant la copie et la création de la boucle. Ces amorces possèdent un design particulier. Le FIP est composé des séquences F2 (complémentaires de la séquence F2c) et de la



séquence F1c (complémentaire de la séquence F1). Le BIP est lui composé des séquences B2 (complémentaire de la séquence B2c) et B1c (complémentaire de la séquence B1). Alternativement, il est possible d'utiliser des jeux de 6 amorces (figure 2B). En plus des 4 amorces précédentes, ces systèmes possèdent 2 amorces supplémentaires, les amorces LF et LB appelées amorces de boucles (ou Loop Primer). Ces amorces sont dessinées dans la séquence séparant les séquences F2 et F1 (pour LF) et B2 et B1 (pour LB). Leur rôle est de permettre l'accélération de l'amplification lors de la phase cyclique en rendant disponibles de nouvelles zones d'hybridation pour la polymérase.

La polymérase est, au même titre que les amorces, un élément crucial à la bonne réalisation de l'amplification. En l'absence de changement de température, elle doit être en mesure à la fois de séparer les brins et de les copier. Les enzymes utilisées sont la *Bst* et la *Bsm*, issues respectivement de *Bacillus stearotherophilus* et *Bacillus smithii*. Ces amorces possèdent une activité de déplacement de brin, une activité de polymérisation d'ADN 5'-3' et 3'-5' mais ne possèdent pas d'activité exonucléasique. Leurs activités enzymatiques sont optimales à 66 °C (*Bst*) et 63 °C (*Bsm*). Enfin, La réaction de LAMP nécessite également un tampon réactionnel spécifique. Classiquement, le tampon contient des désoxynucléotides triphosphates (dNTP), du sulfate de magnésium ($MgSO_4$), du sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$, du Tris-HCl (pH=8,8), du chlorure de potassium (KCl) et de l'eau de qualité Biologie Moléculaire. Le tampon peut également inclure le révélateur, tant que celui-ci ne présente pas de risque d'inhibition de la réaction.

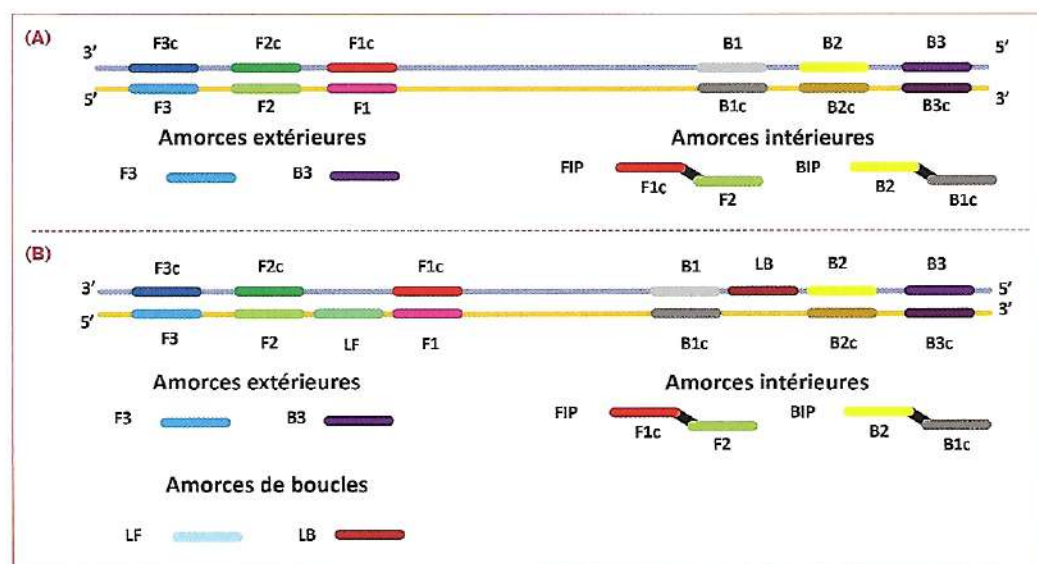


FIGURE 2 - PRÉSENTATION DES SÉQUENCES ET DES AMORCES DE LAMP
(A) : Jeu de 4 amorces / (B) : Jeu de 6 amorces

■ Mécanisme d'amplification

La mécanique d'amplification par LAMP est découpée en deux grandes phases : la phase acyclique (figure 3) et la phase cyclique (figure 4).

Lors de chacune de ces phases, les 3 trois grandes étapes de la PCR sont retrouvées :

- dénaturation des doubles brins, via l'activité de déplacement de brins de la polymérase,
- hybridation des amorces,
- élongation et synthèse des brins via l'activité de polymérisation de la polymérase.

■ Phase acyclique

La phase acyclique est l'étape de démarrage de la réaction, permettant d'aboutir à partir de l'ADN matrice à la création d'une structure en haltère. Les différentes étapes de cette phase se déroulent de manière concomitante.

La séquence F2 de l'amorce FIP s'hybride en 3' à sa séquence complémentaire, F2c sur le brin matrice (figure 3-1). La polymérase commence la synthèse d'un nouveau brin (brin 1) à partir de F2. L'amorce F3 s'hybride à sa séquence complémentaire, la séquence F3c (figure 3-2). La polymérase réalise l'élongation des nouveaux brins à partir de F2 et de F3 (figure 3-3). Lorsque la polymérase copiant la séquence à partir de F3 (brin 2) rencontre le brin 1, celui-ci est déplacé grâce à l'activité de déplacement de brin de la polymérase (figure 3-4). Cela permet d'aboutir à 2 brins néosynthétisés (figure 3-5) : le brin 2 peut à nouveau servir de brin matrice, le brin 1 sert à la création de la structure en haltère. Le brin 1 est composé en 5' de l'amorce FIP, et donc de la séquence F1c. Celle-ci s'hybride à sa séquence complémentaire F1 présente également sur le brin 1. Cela permet d'aboutir à un brin possédant une boucle en 5' (figure 3-6).

Sur le brin 1, la séquence B2 de l'amorce BIP s'hybride en 3' à sa séquence complémentaire, B2c (figure 3-7), et la polymérase commence la synthèse d'un nouveau brin (brin 3). L'amorce B3 s'hybride à sa séquence complémentaire B3c sur le brin 1 (figure 3-8), ce qui va permettre d'aboutir au brin 4. Sous l'effet de l'activité déplacement de brin de la polymérase, la boucle du brin 2 s'ouvre, rendant accessible à la copie sa partie 5' (figure 3-9). Lorsque la polymérase copiant la séquence à partir de B3 (brin 4) rencontre le brin 3, celui-ci est déplacé grâce à l'activité de déplacement de brin de la polymérase (figure 3-10). Le brin 3 peut à nouveau servir de brin matrice, le brin 3 sert alors à la création de la structure en haltère. Le brin 3 est composé en 5' de l'amorce BIP et en 3' de l'amorce FIP. Le brin possède donc des séquences complémentaires à ses extrémités : F1 et F1c en 3' ; B1 et B1c en 5' (figure 3-11). Les séquences complémentaires s'hybrident, créant une boucle à chaque extrémité et aboutissant à la création d'une structure en haltère (figure 3-12).

Le même enchainement d'événements se déroule à partir du deuxième brin matrice et aboutit à une seconde structure en haltère (brin 3' - figure 3-12).

■ Phase cyclique

La phase cyclique débute à partir des structures en haltère obtenues en fin de phase acyclique. Chaque brin offre entre 3 et 4 sites d'hybridation disponibles pour les amorces FIP, BIP, LF ou LB (figure 4 A et B) :

Les amorces intérieures s'hybrident à leur site complémentaire respectif permettant à la polymérase de venir synthétiser de nouveaux brins. L'activité de déplacement de brin de la polymérase couplée à son activité de polymérisation et aux grands nombres de sites d'hybridation disponibles entraîne une amplification rapide et continue. Cela permet d'aboutir à des structures moléculaires complexes (figure 4 C). La réaction se poursuit tant que des sites d'hybridation restent disponibles, jusqu'à épuisement de l'un des composants ou encore jusqu'à destruction thermique de l'enzyme (80 °C - 5 min).

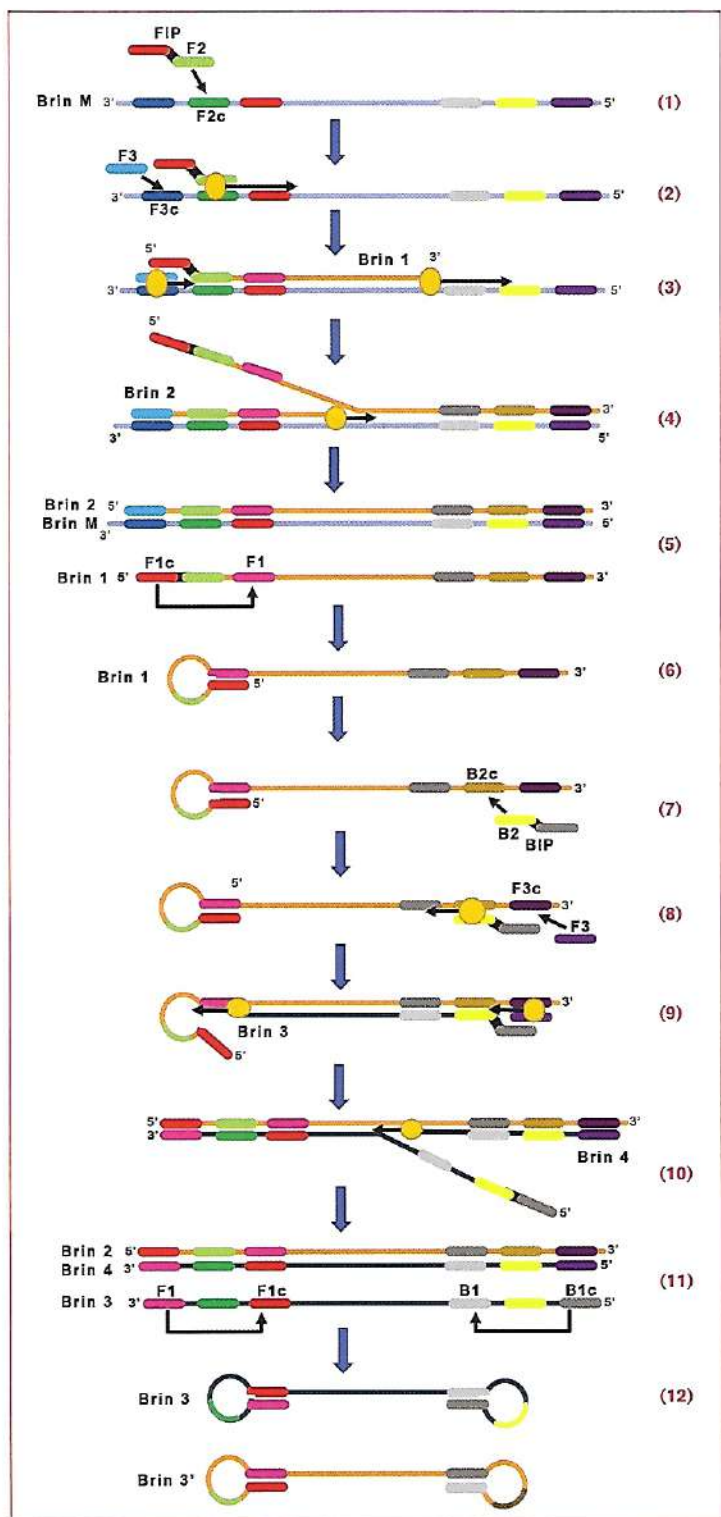


FIGURE 3
PHASE ACYCLIQUE À PARTIR
DU BRIN MATRICE 3'-5'

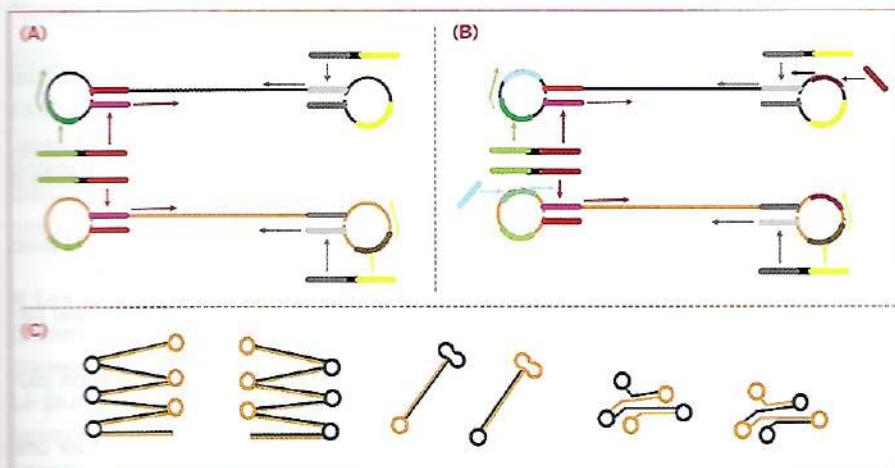


FIGURE 4 - PHASE CYCLIQUE:
ZONES D'AMPLIFICATION
DISPONIBLES
(A) avec un jeu de 4 amorces
et (B) avec un jeu de 6 amorces
et aboutissant à différents types
de structures moléculaires (C)



■ La révélation de l'amplification

Une fois la réaction terminée, les résultats de l'amplification doivent être révélés et interprétés. Des méthodes classiques de biologie moléculaire, telles que l'électrophorèse [8] ou le suivi temps-réel par thermocycleur [7], peuvent être utilisées. Par exemple, la révélation peut être réalisée par l'utilisation d'intercalants d'ADN tels que le SybrGreen, l'EvaGreen ou le PicoGreen.

Brièvement, les intercalants s'insèrent dans les doubles brins d'ADN. Soumis à la bonne longueur d'onde, ils émettent alors de la fluorescence pouvant être captée par une caméra adaptée (figure 5 A). L'amplification LAMP peut alors être suivie de la réalisation d'une courbe de fusion afin de confirmer la présence de la cible recherchée. Typiquement, ce genre de suivi ne peut être réalisé que grâce à l'utilisation d'un thermocycleur temps-réel.

L'un des intérêts de la LAMP est la possibilité de révéler visuellement les résultats d'amplification à la fin de la réaction. De nombreuses méthodes existent afin de faciliter la lecture des résultats qui se basent presque toutes sur une différence de couleur entre les résultats négatifs (pas d'amplification), et positifs (amplification) : utilisation d'ions métalliques, d'intercalants d'ADN, de marqueurs pHmétriques, de bandelettes ou encore de la turbidimétrie [11].

Les mécanismes de révélation se basent sur une utilisation des sous-produits de réaction. Deux exemples peuvent être pris :

- L'utilisation des marqueurs pHmétriques se base sur l'acidification du milieu réactionnel lors de l'amplification. Le rouge de phénol est un marqueur pouvant être utilisé et présentant trois états : coloration rouge en forme basique ($\text{pH} > 8,4$), orange en forme neutre ($8,4 > \text{pH} > 6,6$) et jaune en forme acide ($6,6 > \text{pH} > 1,2$). Le mix avant amplification présente un pH basique et une couleur rouge. Lors de la copie du brin matrice, la polymérase incorpore les désoxynucleotides triphosphates au brin néosynthétisé, libérant ainsi un ion H^+ à chaque incorporation. Cet ion abaisse le pH du mix. Au cours des multiples copies, de plus en plus d'ions H^+ sont libérés ce qui entraîne une acidification progressive du mix, jusqu'à obtenir une coloration jaune (figure 5 B).
- La création de pyrophosphates de magnésium lors de l'amplification crée un trouble visible à l'œil nu. À chaque incorporation de désoxynucleotides triphosphates aux brins néosynthétisés par la polymérase, un pyrophosphate ($(\text{P}_2\text{O}_7)^{4-}$) est libéré dans le milieu réactionnel. Ce pyrophosphate se complexe avec 2 sulfates de magnésium (MgSO_4) aboutissant à un pyrophosphate de magnésium ($\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$). Leur accumulation au cours de la réaction entraîne un dépôt blanc dans le tube (figure 5 C). Ce dépôt est visible à l'œil nu mais peut également être mesuré par un turbidimètre.

1.2. POINTS FORTS ET POINTS FAIBLES DE LA LAMP

■ Les points forts de la LAMP

La LAMP permet la réalisation d'analyses de Biologie Moléculaire avec des sensibilités et des spécificités équivalentes à celles de la PCR temps-réel [7], [8], [12] ; sans obligation de matériel spécifique et onéreux, type thermocycleur, et cela pour des durées d'amplifications très courtes, généralement comprises entre 30min et 1h [1], [6], [7], [12].

La forte résistance des polymérases aux inhibiteurs classiques de la PCR [9] est un avantage important de la LAMP. En effet, cette caractéristique permet de se contenter d'une simple lyse, voire de ne pas avoir à extraire les ADN [13].

Ces points forts de la LAMP entraînent l'existence de l'un des avantages de cette méthode : sa simplicité de prise en main. Rapide, flexible et permettant une lecture simple des résultats, la LAMP propose également des kits prêts à l'usage rendant cette technologie accessible à tout un chacun [14], [15].

Tous ces points forts entraînent une souplesse et une flexibilité permettant à la LAMP d'être une technologie parfaitement adaptée à un usage terrain [14], [16]. Cette technologie est donc tout à fait indiquée dans des cas où les ressources en temps et en moyens techniques sont limitées. Enfin, la méthode LAMP propose une série de déclinaisons rendant la technologie adaptée à toutes sortes de thématiques et de problématiques :

- La **RT-LAMP** (rétrotranscriptase-LAMP) permet l'amplification et la détection des ARN avec la même rapidité et efficacité que la LAMP classique ou la rétrotranscriptase PCR [8].
- La **LAMP temps-réel** permet un suivi en temps-réel de l'amplification, que cela soit par turbidimétrie [8] ou par utilisation de sondes [10].
- Le **multiplexage** des systèmes LAMP permet de détecter lors d'une seule réaction plusieurs cibles [17].
- La **RFLP-LAMP** (restriction fragment length polymorphism LAMP) permet d'effectuer une digestion enzymatique des amplicons afin d'identifier une séquence [18].



2019 XXXIX L'OPERA N°91

- La **LAMP-SNP** (LAMP single nucleotide polymorphism) permet d'amplifier et de détecter une séquence sur la base d'une mutation d'un seul nucléotide [19].

La LAMP est donc une méthodologie offrant à ses utilisateurs des avantages et des points forts particulièrement intéressants, notamment au travers d'une flexibilité et d'une simplicité plus grande que la PCR de laboratoire (tableau I).

TABEAU I - TABLEAU DE COMPARAISON DES METHODES PCR ET LAMP

Comme toute technique d'analyse, la LAMP n'est pas une technique universelle et souffre, en conséquence, de quelques points faibles (tableau 1).

Le plus gros point noir de cette technologie est la difficulté de design des amorces. Le design nécessite de bien maîtriser la mécanique d'amplification mais également de prendre en compte des paramètres de thermodynamiques spécifiques à chaque type d'amorces, en plus des contraintes

habituelles du design d'amorces (pas de design sur des zones en épingles, % GC, température de fusion...) [20]. Le grand nombre d'amorces impliquées demande également d'être particulièrement vigilant aux risques d'homo- et hétérodimères, pouvant entraîner des cas de faux positifs. Enfin, les amorces se doivent d'être toutes spécifiques de la séquence cible afin d'éviter tout risque de réaction croisée.

Des logiciels de design existent pour aider au design de ces amorces [20], [21], [22]. Ceux-ci facilitent grandement le design d'amorces mais nécessitent cependant encore un nombre important d'interventions de l'utilisateur pour être pleinement efficaces.

La conséquence directe d'un mauvais design, notamment si les amorces ont tendance à créer des dimères, combiné à des méthodes de révélation indirectes (détection des sous-produits) est un taux important de faux positifs. Ce point peut cependant être facilement évité soit lors du design, soit en réalisant une confirmation post-amplification des résultats (électrophorèse, test bandelette, courbe de fusion, digestion enzymatique...).

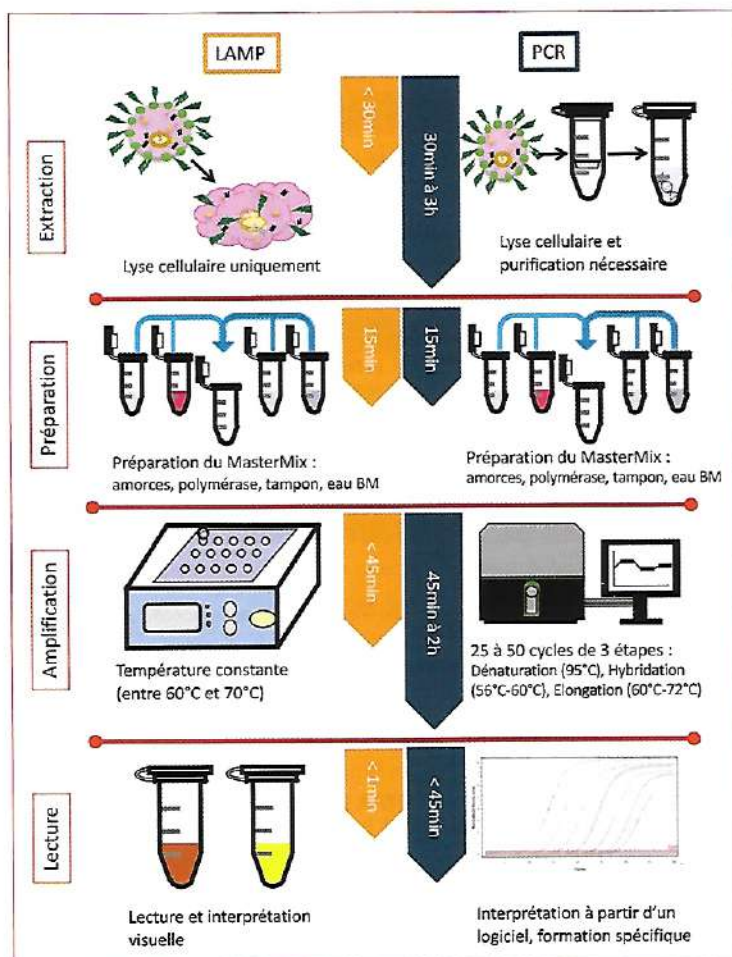
Un autre point critique de la LAMP est un risque accru de contamination de l'environnement par des amplicons. Son taux exceptionnel d'amplification est ainsi une arme à double tranchant pouvant entraîner des contaminations importantes en cas d'ouverture non maîtrisée des tubes post-amplification.

Enfin, le dernier point d'alerte de la LAMP concerne les méthodes dérivées, notamment la LAMP temps-réel [8], [10], le multiplexage de système LAMP [16] et la RFLP-LAMP [17]. En effet, ces méthodes nécessitent du matériel spécifique (thermocycleur temps-réel, turbidimètre temps-réel, électrophorèse et système de révélation) faisant perdre à la LAMP sa simplicité d'utilisation.

2. PROTOCOLE DE MANIPULATION DE LA LAMP

Cette partie de l'article traite des généralités protocolaires ; les manipulations et le temps exposés dans cette partie sont des données généralistes et ne traitent en aucun cas d'un protocole en particulier.

Les protocoles de manipulation entre une analyse par méthode LAMP et une méthode PCR diffèrent peu. Les différences fondamentales se situent surtout dans la phase d'amplification et de révélation. (figure 6)



■ Matériels et consommables nécessaires

Comme décrit précédemment, le matériel et les consommables nécessaires pour la réalisation d'une analyse PCR (matériel spécifique et spécialisé) et d'une analyse LAMP (matériel non spécifique) ont peu de choses en commun. Le tableau II présente les différents éléments nécessaires à la préparation et la réalisation de ces analyses de détection.

■ Extraction de l'échantillon et purification de l'ADN

■ PCR

Suivant le type de cible que l'on cherche à analyser (Bactérie GRAM + ou GRAM -, cellule procaryote / eucaryote, protozoaires, virus), le protocole d'extraction et de purification de l'ADN et de l'ARN est à adapter. L'extraction thermique, l'extraction chimique avec une solution commerciale, ou un couplage des deux méthodes. La polymérase de la PCR est très sensible aux inhibiteurs, c'est pour cela qu'il est nécessaire que l'ADN soit purifié. La purification peut se faire selon plusieurs méthodes, les plus connues étant la purification sur bille magnétique ou sur colonne

FIGURE 6 - SCHÉMATISATION DES PROTOCOLES TYPES DE MANIPULATION LAMP ET PCR

de silice. En général, une extraction/ purification d'un échantillon dure de 30 minutes à 3 h suivant le type de cible et de matrice.

	PCR	LAMP
Matériel minimum obligatoire	• Bloc-chauffant ou bain thermostaté • Centrifugeuse • Hotte de biologie moléculaire • Micropipettes • Solution d'extraction d'ADN (centrifugeuse, extracteur automatisé...) • Thermocycleur • Vortex	• Bloc-chauffant ou bain thermostaté • Micropipettes
Matériel optionnel	• Électrophorèse et plaques de révélation • Spectrophotomètre	• Électrophorèse et plaques de révélation • Hotte de biologie moléculaire • Lampe UV • Thermocycleur ou turbidimètre
Consommables plastiques	• Microtubes PCR • Microplaques PCR + films de scellage • Pointes à filtres • Tubes 1,5 mL ou 2 mL	• Pointes à filtres • Tubes 1,5 mL ou 2 mL
Environnement de travail	• Environnement à ambiance contrôlée	N'importe où

TABLEAU II - MATÉRIELS ET CONSOMMABLES NÉCESSAIRES ET OPTIONNELS POUR LA RÉALISATION D'ANALYSES DE PCR ET DE LAMP

■ LAMP

La LAMP ne nécessite pas nécessairement de réaliser cette étape, en fonction de la cible et de la matrice (bactérie Gram -, sang...). L'extraction de l'ADN par lyse cellulaire peut de plus être suffisante. Celle-ci suit alors le même protocole que pour une PCR classique, le but étant de rendre disponible le matériel génétique des cibles à analyser. La polymérase de la LAMP étant peu sensible aux inhibiteurs, l'étape de purification n'est pas nécessaire. Cela réduit considérablement le temps de manipulation (moins de 30 minutes).

■ Préparation des mixs réactionnels

La préparation des mixs réactionnels de LAMP et de PCR sont quasi identiques (tableau III). Les mixs sont préparés de préférence dans une hotte de biologie moléculaire avec des EPI dédiés à cette activité. La préparation est réalisée par pipetage de microvolumes à l'aide de micropipettes adaptées et de pointes à filtres. Afin d'éviter cette étape de préparation, les mixs peuvent être trouvés lyophilisés (réhydratation par ajout d'eau ou de l'échantillon extrait).

Composants	PCR	LAMP
Polymérase	Polymérase dépendante de l'application	<i>Bst</i> ou <i>Bsm</i> polymérase
Activités enzymatiques minimum de la polymérase	Polymérisation 3'-5' Activité exonucléasique 3'-5'	Polymérisation 3'-5' Déplacement de brins
Amorces	2 amorces sens et antisens	De 4 à 6 amorces
Proportion des amorces	Proportion équimolaire (1 : 1)	FIP/BIP: 8, F3/B3: 1, LF/LB:2
Nucléotides	dATP, dTTP, dCTP, dGTP	dATP, dTTP, dCTP, dGTP
Cofacteurs de réaction	(NH ₄) ₂ SO ₄ , Tris-HCl (pH = 8,8), KCl, eau de qualité Biologie Moléculaire	MgSO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , Tris-HCl (pH = 8,8), KCl, eau de qualité Biologie Moléculaire

TABLEAU III - COMPOSITION D'UN MIX TYPE DE PCR ET DE LAMP

■ Dépôt de l'échantillon et amplification

■ PCR

20 µL de mix d'amplification sont déposés dans chaque puits de la microplaque PCR, puis 5 µL d'échantillon sont déposés. La microplaque doit être correctement scellée avant homogénéisation pour éviter toute fuite de solution dans l'environnement. Ensuite la microplaque peut être installée dans le thermocycleur préalablement programmé et le cycle d'amplification en 3 phases, dénaturation, hybridation et élongation de l'ADN peut démarrer. Cette étape d'amplification dure entre 1 h 30 et 2 h.

■ LAMP

La proportion entre le mix d'amplification et l'échantillon est identique à la PCR. Les précautions de scellage des tubes doivent être identiques de manière à ce qu'il n'y ait pas contamination de l'environnement. Une fois homogénéisé, le mélange est incubé à température constante, entre 60



et 70 °C selon les cibles. Le temps d'amplification dure entre quelques minutes et une heure suivant la cible et la limite de détection de la mesure. Pour exemple, dans le protocole de détection de la tuberculose pulmonaire par la méthode LAMP [33], la phase d'amplification dure 40 minutes à 67 °C. Il est important de bien respecter le temps d'incubation.

■ Révélation

■ PCR

Une fois l'ADN amplifié, la contamination de l'environnement est un paramètre à prendre en compte dans le cas où l'on doit desceller la plaque pour avoir accès aux puits pour révélation. Ce risque est surtout présent lors de PCR en point final. En effet, la révélation nécessite d'ouvrir les tubes afin de pouvoir réaliser, par exemple, une électrophorèse. La PCR la plus pratiquée en laboratoire est la PCR en temps réel. L'un de ses avantages est que le thermocycleur est équipé d'un lecteur permettant le suivi en temps réel du nombre de copies générées à chaque cycle. Ceci évite d'avoir à ouvrir les tubes pour lire les résultats.

Les méthodes de révélation et lecture des PCR demandent de la technicité, de la formation et du temps. Ainsi, une électrophorèse peut prendre plusieurs heures avant de donner un résultat. Une interprétation de PCR temps-réel demande une formation spécifique et peut prendre plusieurs dizaines de minutes.

■ LAMP

Tout comme pour la PCR, cette étape peut s'avérer contaminante en cas d'ouverture des tubes post-amplification. Cette étape doit donc se faire avec précaution pour éviter une contamination d'ADN amplifié dans l'environnement de travail. Des protocoles spécifiques existent afin d'effectuer la révélation sans ouverture de l'échantillon amplifié (par exemple, utilisation d'un marqueur pHmétrique). Dans les cas des révélations par marqueur visuel, la lecture se fait instantanément et à l'œil nu.

Cependant, il est également possible d'appliquer à la LAMP les mêmes techniques de révélation que la PCR. Dans ce cas, les mêmes caractéristiques sont observées.

3. APPLICATIONS DE LA LAMP

Depuis les premières publications et les brevets déposés autour de la technologie par la société EIKEN (EIKEN Chemical CO., LTD), les analyses basées sur la LAMP ne cessent de se développer pour apporter des solutions en laboratoire mais également des solutions utilisables directement sur le terrain (point of care).

Les technologies d'analyses biologiques progressent d'année en année et permettent aujourd'hui une réponse en quelques heures. L'utilisation massive de la biologie moléculaire a permis le développement de plateaux techniques et de laboratoires spécialisés accrédités répondant à une demande de plus en plus croissante. La performance de ces analyses en fait un standard pour les recherches de pathogènes (bactéries, virus) ou de séquences d'ADN (oncologie, classifications). Cependant, malgré les progrès liés à l'optimisation des enzymes, à la taille et la précision des machines, les délais d'analyse restent dépendants du temps de transport. La technologie de LAMP peut dans certains cas apporter une solution complémentaire utilisable directement sur le terrain.

■ Application agronomique

Depuis 2013, en Italie, sévit une maladie des oliviers liée à la bactérie pathogène *Xylella fastidiosa* [23]. Depuis les premiers cas relevés, la maladie liée à cette bactérie est apparue en Corse et dans le sud de la France en 2015. *Xylella fastidiosa* a infecté de très nombreux oliviers, cette bactérie peut toucher des arbres d'ornement ainsi que des arbres fruitiers. Suite à son apparition, *Xylella fastidiosa*, considéré comme le plus grand pathogène des plantes à travers le monde, est classé comme agent de quarantaine pour l'Union européenne [24].

En septembre 2015, l'EFSA a mis en place un plan de recherche prioritaire afin de mieux connaître ce pathogène et proposer des solutions de dépistage et de lutte contre ce microorganisme [24]. Le groupe 1 était chargé de proposer des solutions de surveillance et de dépistage. Pour la surveillance et la détection, il a été souligné qu'il importait de définir à l'avance les raisons pour lesquelles une surveillance est nécessaire : c'est à dire définir un objectif d'enquête clair. La recherche peut-elle améliorer l'identification des cibles (agent pathogène, vecteur, hôte et voies) et des lieux de surveillance ? Quelles sont les meilleures méthodes et périodes de surveillance ? Les réponses à ces questions dépendent de l'amélioration des méthodes de détection de l'agent pathogène, en particulier pendant la période d'infection latente, et des connaissances sur les com-

portements de vecteur sous-jacents. Des techniques avancées de télédétection peuvent également aider à délimiter les zones potentiellement infectées si les ressources de l'enquête sont limitées, mais il pourrait y avoir un compromis entre la taille de la zone à étudier et la sensibilité des méthodes de détection. Pour faciliter la recherche des épidémies et de la dispersion de *X. fastidiosa* ainsi que l'échange et l'analyse de données dans tous les États membres, il est également nécessaire d'harmoniser les méthodes d'enquête et de partager les données.

L'institut Agronomique de BARI (Italie) a proposé un test innovant basé sur la technologie de LAMP. Cette méthode est directement utilisable sur le terrain et permet de détecter le micro-organisme directement sur la plante très tôt dans la période d'infection mais également chez les insectes hôtes-vecteurs [25]. Ce test est aujourd'hui reconnu et largement utilisé pour la détection de *Xylella fastidiosa* dans les zones de culture infectées.

■ Application alimentaire

La viande et les produits à base de viande constituent une source importante de protéines. Cependant, dans certaines cultures, certaines viandes sont interdites à la consommation. C'est le cas de la viande de porc pour les personnes de confession musulmane ou juive. De très nombreux scandales sanitaires ont révélé des failles dans la traçabilité et il a été retrouvé du poulet dans des boulettes de viande 100 % bœuf [26] ou de la viande de cheval dans des plats cuisinés à base de bœuf [34]. Certains pays réalisent des contrôles de spécification sur les importations afin de vérifier la conformité de la marchandise. Des tests permettant de détecter la présence de porc dans des produits carnés sont mis au point [35] et prennent ainsi tout leur sens pour un contrôle douanier rapide et efficace.

Dans ce contexte et devant l'absence de laboratoire équipé permettant une détection fiable et sensible, des tests basés sur la technologie de LAMP ont vu le jour. La détection d'ADN de porc par LAMP est décrite dans la littérature [27]. La spécificité, la rapidité et l'absence de matériels coûteux nécessaires à une amplification d'ADN permettent à cette technologie d'être utilisée par des opérateurs sur le terrain.

■ Application biologie humaine et animale

Certaines maladies ont un impact sanitaire mondial et les solutions de détection terrain sont privilégiées. C'est le cas pour le paludisme/malaria, qui est une maladie infectieuse due à un parasite du genre *Plasmodium*, propagée par la piqûre de certaines espèces de moustiques anophèles.

La détection de la malaria repose sur la détection du parasite par microscopie [36] ou la détection d'antigène [28]. Cependant ces tests ne sont pas très sensibles et ne permettent pas la détection de faibles quantités de parasites ce qui pose des problèmes lors de retour de voyage dans des pays infectés [29]. Un kit de détection de la malaria validé par l'OMS (programme de lutte contre la malaria OMS 2014) a été mis au point et validé. Ces tests ont été validés par comparaison avec des tests de nested-PCR [30]. Au total 705 échantillons ont été testés, la sensibilité et la spécificité sont respectivement de 98,4 % et de 98,1 %. En conclusion, le diagnostic LAMP est similaire au test laboratoire de nested PCR, mais il réduit grandement le temps d'analyse et peut se réaliser directement sur le terrain [31].

La malaria n'est pas la seule maladie à avoir suscité l'intérêt. La tuberculose fait également l'objet de tests terrain à base de technologie de LAMP [32]. Le retard au diagnostic constitue un des facteurs de risque de survenue grave. La mise en œuvre de techniques rapides, sensibles et spécifiques est nécessaire. Des renseignements cliniques et épidémiologiques doivent accompagner toute prescription afin d'aider le biologiste dans son interprétation. Le diagnostic conditionne l'ensemble de la stratégie thérapeutique. Les tests LAMP [15] permettent des diagnostics terrain performants.

Au niveau de la biologie animale, la LAMP a démontré tout son intérêt dans un premier temps d'un point de vue universitaire. Plusieurs revues [38], [39], [40] compilent ainsi de nombreuses publications et démontrent toute l'attente envers des tests moléculaires rapides et praticables directement sur site.

Par exemple, la leptospirose est une zoonose mondiale, touchant aussi bien les humains que les animaux. L'une des difficultés de la détection de la leptospirose à l'heure actuelle est la combinaison d'une phase d'incubation longue avec l'absence de symptôme caractéristique [41]. Les moyens de détection sont à l'heure actuelle les techniques de microbiologie et la PCR. Les *Leptospira* sont particulièrement difficiles à cultiver avec des phases de croissance pouvant atteindre les 2 mois. La PCR est préférée de par sa rapidité, mais demande un temps de transport vers le laboratoire [41]. L'utilisation de la LAMP en tant que diagnostic de terrain prend ainsi tout son sens. SUWANCHAROEN *et al.* ont montré la possible utilisation de la LAMP pour la détection



2019

XXXXIX

L'OPÉRON N°91

des *Leptospira*. Cette méthode s'est montrée plus adaptée que la PCR et présente une sensibilité de 96,8 % et une spécificité de 97 % [42].

Dans une revue des technologies vétérinaires pour la détection rapide de terrain des pathogènes, Howson *et al*, en 2017, citent la LAMP mais déplorent l'absence de kits commerciaux disponibles [43]. Cependant, dès l'année suivante des kits LAMP à destination des vétérinaires ont été développés par la société Loop Dee Science [44] et sont disponibles à la vente [14].

CONCLUSION

La découverte des principes de la technologie LAMP date des années 2000. La maturation de la technologie et des méthodologies, ont permis l'émergence de nombreux kits d'analyses pour des secteurs d'activités variés.

Le monde du diagnostic est en recherche constante de méthode de plus en plus rapide, sensible et performante. Particulièrement bien adaptée à une utilisation terrain, notamment grâce à sa simplicité, sa rapidité et sa robustesse, la LAMP est aujourd'hui reconnue notamment au travers des choix de l'EFSA, de l'OMS ou la FAO.

Autour de cela, de plus en plus de solutions clés en main sont proposées aux utilisateurs à travers l'émergence de nouvelles sociétés souhaitant promouvoir l'utilisation de cette technologie innovante. Présentant des caractéristiques techniques équivalentes à celles de la PCR, la LAMP permet de résoudre des problématiques de temps d'analyse et de transport des échantillons. De par ses caractéristiques, la LAMP séduit de nombreux domaines. Et si sa prochaine conquête se trouvait dans les salles de TP ?

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., -Mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, E63.
- [2] Abdul-Ghani, R., Al-Meklaifi, A.M., Karanis, P., Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malarial parasites of humans: would it come to clinical reality as a point-of-care test?. *Acta Trop.* 2012, 12, 233-240.
- [3] Tanner, N.A., Evans, T.C. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Somerset, USA, 2014, pp.15.14.1-15.14.14.
- [4] Inacio, J., Flores, O., Spencer-Martins, I. Efficient Identification of Clinically Relevant *Candida* Yeast Species by Use of an Assay Combining Panfungal Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification with Hybridization to Species-Specific Oligonucleotide Probes, *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46, 713-720.
- [5] Wang, L., Shi, L., Alam, M., Geng, Y., Li, L., Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Res. Int.* 2008, 41, 69-74.
- [6] Kiddle, G., Hardinge, P., Buttigieg, N., Gandelman, O., Pereira, C., McElgunn, C.J., Rizzoli, M., Jackson, R., Appleton, N., Moore, C., Tisi, L.C., Murray, J.A.H., GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use. *BMC Biotechnol.* 2012, 12, 15.
- [7] Zhang, G., Brown, E.W., González-Escalona, N., Comparison of Real-Time PCR, Reverse Transcriptase Real-Time PCR, Loop-Mediated Isothermal Amplification, and the FDA Conventional Microbiological Method for the Detection of *Salmonella* spp. in Produce, *App. Environ. Microbiol.* 2011, 77, 6495-6501.
- [8] Parida M1, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus, *J Clin Microbiol.* 2004, Jan;42(1):257-63.
- [9] Kaneko H1, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods.* 2007, Apr 10;70(3):499-501.
- [10] Gadkar, V., J., Goldfarb, D., M., Gantt, S., Tilley P., A., G., Real-time Detection and Monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-quenching and De-quenching Fluorogenic Probes. *Sci Rep.* 2018, 8: 5548.
- [11] Fischbach J, Xander NC, Frohme M, Glöckler JF. Shining a light on LAMP assays—a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques.* 2015, Apr 1;58(4):189-94.
- [12] Teillaud, A., Croville, G., Camus-Bouclainville, C., Guerin, J., L., Bertagnoli, S., 15èmes Journées de la Recherche Cunicole, 19-20 novembre 2013, Le Mans, France.
- [13] Sun Y, Zhao L, Zhao M, Zhu R, Deng J, Wang F, Li F, Ding Y, Tian R, Qian Y. Four DNA extraction methods used in loop-mediated isothermal amplification for rapid adenovirus detection. *J Virol Methods.* 2014, Aug;204:49-52.
- [14] Plaque commercial Kitvia - Biomolkit FeLV / FIV - groupe Fimlab.
- [15] Plaque commercial Human Diagnostic - mycobacterium tuberculosis.
- [16] Sumudu Britton, Qin Cheng, Colin J. Sutherland, James S. McCarthy, A simple, high throughput, colourimetric, field applicable loop mediated isothermal amplification (HtLAMP) assay for malaria elimination, 2015, *Malar J* 14:335.
- [17] Ningwei Liu, Dayang Zou, Derong Dong, Zhan Yang, Da Ao, Wei Liu, Liuyu Huang. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus*. *Sci Rep.* 2017, 7: 45601.
- [18] (14) Shao Y1, Zhu S, Jin C, Chen F. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk. *Int J Food Microbiol.* 2011, Aug 2;148(2):75-9.
- [19] Peng Lin, Honglin Wang, Yuening Cheng, Shanshan Song, Yaru Sun, Miao Zhang, Li Guo, Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk. *Scientific Reports*, 2018, volume 8, Article number: 8393.
- [20] http://primerexplorer.jp/e/v5_manual/index.html consulté le 09/07/19.
- [21] <http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/> consulté le 09/07/19.
- [22] <http://www.premierbiosoft.com/isothermal/lamp.html> consulté le 09/07/19.
- [23] Cariddi C, Saponari M, Boscia D, De Stradis A, Loconsole G, Nigro F, Porcelli F, Potere O and Martelli GP, Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy. *Journal of Plant Pathology*, 2014, 96, 425-429.
- [24] Workshop on *Xylella fastidiosa*: knowledge gaps and research priorities for the EU. June 2016.

- [25] **D'Onghia AM, Santoro F, Yaseen T, Djelouah K, Guariso A, Percoco A and Valentini F.** An innovative monitoring model of *Xylella fastidiosa* in Apulia region, Italy. International Symposium of the European Outbreak of *Xylella fastidiosa* in Olive (Gallipoli, Italy 2014), 33.
- [26] **Ulca P.** Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods. *Meat Sci* 2013, 94(3), :280-284.
- [27] **Guangyao Ran, Linzhu Ren, Xiaolei Han, Xingxing Liu, Zhuang Li, Daxin Pang, Hongsheng Ouyang, Xiaochun Tan.** Development of a Rapid Method for the Visible Detection of Pork DNA in Halal Products by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Food Anal. Methods*, 2015, DOI 10.1007/s12161-015-0246-z.
- [28] **Shiff CJ, Minjas J, Premji Z.** The ParaSight(R)-F test: a simple rapid manual dipstick test to detect *Plasmodium falciparum* infection. *Parasitol Today*, 1994, 10:494-5.
- [29] **malERA.** A research agenda for malaria eradication: diagnoses and diagnostics. *PLoS Med* 2011, 8:e1000396.
- [30] **Hopkins H, González JJ, Polley SD.** Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new LAMP kit in a remote clinic in Uganda. *J Infect Dis.* 2013, Aug 15, 208(4), 645-52.
- [31] **Cook J, Aydin-Schmidt B, González JJ, Bell D, Edlund E, Nassor MH, Msellem M, Ali A, Abass AK, Mårtensson A, Björkman A.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. *Malar J.* 2015, Jan 28, 14 3.
- [32] **Ehsan Aryana, Manoochehr Makvandi, Ahmad Farajzadeha, Kris Huygen, Pablo Bifanib, Seye-Latif Mousavi, Abolfazl Fatehd, Abbass Jelodar, Mohammad-Mehdi Gouya, Marta Romano.** A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiological Research*, 2010, 165, 211-220.
- [33] **WHO.** The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Policy Guidance, 2016, NLM classification WF300.
- [34] https://www.lemonde.fr/societe/article/2019/04/16/scandale-de-la-viande-de-cheval-six-mois-ferme-pour-l-ex-directeur-de-l-entreprise-spanghero_5451022_3224.html, consulté le 11/07/2019.
- [35] **Guangyao Ran, Linzhu Ren, Xiaolei Han, Xingxing Liu, Zhuang Li, Daxin Pang, Hongsheng Ouyang, Xiaochun Tang.** Development of a Rapid Method for the Visible Detection of Pork DNA in Halal Products by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Food Analytical Methods*, 2015, DOI: 10.1007/s12161-015-0246-z.
- [36] **Laveran A.** Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme. Description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre. J-B. Baillière et fils 1881, Paris.
- [37] **WHO** - Note d'orientation sur le diagnostic du paludisme dans les contextes de faible transmission, 2014, WHO/HTM/GMP/2014.7
- [38] **Sahoo PR, Sethy K, Mohapatra S, Panda D,** Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. 2016,, 9(5), 465-469.
- [39] **Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, Tiwari R, Kapoor S, Kumar A, Thomas P.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2014, 17(2), 151-66.
- [40] **Rekha V, Rana R, Arun TR, Aswathi PB, John JK, Gopinath D, Sadanandan GV, Jacob A.** Loop mediated isothermal amplification (LAMP) test- a novel nucleic acid based assay for disease diagnosis. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2014, 2 (6), 344 - 350.
- [41] **Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène, Leptospira**, 2014, Université Médicale Virtuelle Francophone
- [42] **Duangjai SUWANCHAROEN, Busara SITTIWICHEANWONG and Anuwat WIRATSUDAKUL.** Evaluation of loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for pathogenic *Leptospira* spp. detection with leptospire isolation and real-time PCR, *Journal of Veterinary Medical Science*, 2016, 78(8), 1299-1302,
- [43] **E.L.A. Howson, A. Soldan, K. Webster, M. Beer, S. Zientara, S. Belák, J.M. Sánchez-Vizcaino, S. Van Borm, D.P. King, V.L. Fowler.** Technological advances in veterinary diagnostics: opportunities to deploy rapid decentralised tests to detect pathogens affecting livestock, *Review Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 2017, 36 (2), 479-498.
- [44] <http://www.loopdeescience.com/fr/>, consulté le 09/07/19.

L'ymagier NUMERO ERGO SUM : AUTO PORTRAIT D'UN TECHNICIEN MICROBIOLOGISTE



Photo : Pascal Picquot

