

UNIVERSITE D'AIX-

MARSEILLE

ED 62 - SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Dpt. Innovation – Laboratoire « *New Immunoassay Concepts* », bioMérieux, Marcy-l'Etoile

Laboratoire EPV – Emergence des Pathologies Virales – UMR_D 190, Marseille

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade universitaire de Docteur de
l'Université d'Aix-Marseille

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie

Soutenue le vendredi 7 décembre 2018 par **M. Gérald THEILLET**

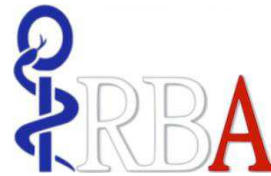
Développement d'un support microfluidique papier pour le diagnostic bas coût d'arboviroses émergentes

Directeurs de thèse : Docteur Isabelle LEPARC-GOFFART et Docteur Frédéric BEDIN

JURY

Docteur Anna-Bella FAILLOUX, Institut Pasteur, Paris	Rapporteuse
Professeur Yves GERMANI, Institut Pasteur et BioSpeedia, Paris	Rapporteur
Professeur Renée GRILLOT, Faculté de Pharmacie de Grenoble	Examinatrice
Professeur Emmanuel DROUET, Faculté de Pharmacie de Grenoble	Examineur
Docteur Christophe PEYREFITTE, IRBA de Marseille	Examineur
Docteur Frédéric BEDIN, bioMérieux, Marcy-l'Etoile	Examineur
Docteur Isabelle LEPARC-GOFFART, IRBA de Marseille	Examinatrice

Numéro national de thèse CIFRE (convention de recherche signée avec l'ANRT) : 2015/0514



UNIVERSITE D'AIX-

MARSEILLE

ED 62 - SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Dpt. Innovation – Laboratoire « *New Immunoassay Concepts* », bioMérieux, Marcy-l'Etoile

Laboratoire EPV – Emergence des Pathologies Virales – UMR_D 190, Marseille

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade universitaire de Docteur de
l'Université d'Aix-Marseille

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie

Soutenue le vendredi 7 décembre 2018 par **M. Gérald THEILLET**

Développement d'un support microfluidique papier pour le diagnostic bas coût d'arboviroses émergentes

Directeurs de thèse : Docteur Isabelle LEPARC-GOFFART et Docteur Frédéric BEDIN

JURY

Docteur Anna-Bella FAILLOUX, Institut Pasteur, Paris	Rapporteuse
Professeur Yves GERMANI, Institut Pasteur et BioSpeedia, Paris	Rapporteur
Professeur Renée GRILLOT, Faculté de Pharmacie de Grenoble	Examinatrice
Professeur Emmanuel DROUET, Faculté de Pharmacie de Grenoble	Examineur
Docteur Christophe PEYREFITTE, IRBA de Marseille	Examineur
Docteur Frédéric BEDIN, bioMérieux, Marcy-l'Etoile	Examineur
Docteur Isabelle LEPARC-GOFFART, IRBA de Marseille	Examinatrice

Numéro national de thèse CIFRE (convention de recherche signée avec l'ANRT) : 2015/0514

Remerciements

L'ensemble de ce travail a été effectué au sein du laboratoire « *New Immunoassay Concepts* » du département Innovation de bioMérieux SA. Ce projet s'est fait en collaboration avec le Centre National de Référence (CNR) des arbovirus, rattaché à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) de l'hôpital d'instruction des armées Laveran, à Marseille. Ce projet a été financé par bioMérieux et une bourse CIFRE de l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT).

Merci beaucoup aux Dr Christine Rozand, Frédéric Bedin et Pascal Dalbon de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce travail de recherche. Merci pour votre soutien indéfectible, et un remerciement tout particulier au Dr Frédéric Bedin de m'avoir dirigé tout au long de ces trois années de recherche. Nos échanges au quotidien et tes conseils avisés m'ont énormément apporté, autant sur le plan professionnel que personnel. Ta gentillesse et ta bonne humeur au quotidien sont des points que je n'oublierai jamais !

Un grand merci au Dr Isabelle Leparc-Goffart, co-directrice de ce travail de recherche, ainsi qu'à tout le personnel de l'IRBA de Marseille, chez qui j'ai effectué quelques séjours pour mener à bien certaines expérimentations. Ce fut pour moi une grande opportunité et une chance de profiter de vos conseils et de votre grande expertise sur les arbovirus.

J'adresse mes remerciements et ma sincère reconnaissance aux Drs Anna-Bella Failloux, Renée Grillot, Christophe Peyrefitte, Yves Germani et Emmanuel Drouet pour avoir accepté de juger mon travail.

Merci au Dr. Jean-Louis Pittet et à Mme Céline Domingos, ainsi qu'aux autres membres du département Industrie de bioMérieux, de m'avoir accueilli en stage à mes débuts dans l'entreprise. Votre confiance en mes capacités et mon travail effectué avec vous m'ont convaincu dans ma voie professionnelle et dans mon choix de continuer sur un doctorat. Je vous en suis très reconnaissant !

Merci aux Dr Agnès Rubens, Frédéric Foucault, Marie-Pierre Montet, à M. Laurent Boulet et à tous les autres membres de l'équipe Innovation de m'avoir accueilli au sein du département. Merci pour votre bonne humeur, les échanges scientifiques, conseils, suivis, aides, mais aussi gentillesse, gâteaux, blagues, chansons d'anniversaires... Avec vous, l'innovation est entre de bonnes mains !

Un grand merci aux membres du département de caractérisation des matières premières, ainsi qu'au personnel du département des matières premières de bioMérieux, pour leur aide tout au long du projet. Merci pour votre incroyable expertise et votre soutien !

Merci à Mmes Annick Blanc-Michaud et Nathalie Picot, du département Infodoc de bioMérieux, pour leur aide et les conseils apportés dans mes recherches bibliographiques. *Pubmed* et *EndNote* n'ont (presque) plus aucun secret pour moi désormais, grâce à vous !

Merci à Jean-Philippe Truong, du département de Propriété Industrielle, pour son accompagnement tout au long du projet, et la relecture de la thèse.

Merci à l'ensemble des personnes du département des Immunoassays et du département *Medical Diagnostic Discovery Dpt.* (MD3) de bioMérieux pour leur accueil, leur gentillesse, et de m'avoir permis d'utiliser leurs locaux pour de nombreuses et fructueuses expérimentations.

Un grand merci à MM. Carine Maisse-Paradisi, Margot Enguehard, M. Dimitri Lavilette et au personnel de l'INRA pour leur accueil au sein de leur laboratoire, leur expertise et leurs conseils tout au long de notre fructueuse collaboration. De telles échanges entre les domaines publics et privés devraient être plus nombreux, la Science en serait grandement bénéficiaire !

Merci à M. Thibault Champion de nous avoir supportés lors des déjeuners.

Un grand merci à mes collègues mais surtout et avant-tout ami(e)s Diane Voir, Camille Lebayle et Alexandre Hébrard, rencontré(e)s en Master 2 à Grenoble et avec qui l'aventure s'est prolongée chez bioMérieux. Merci de m'avoir supporté (il en faut du courage !) et soutenu durant ces 3 ans chez bioMérieux. Je vous souhaite le meilleur pour votre avenir professionnel que je devine brillant !

Un merci tout particulier aux membres de ma famille pour leur soutien constant, leur honnêteté à dire qu'ils n'ont rien compris à ce que je faisais mais qu'ils étaient fiers de moi, de m'avoir encouragé dans mes choix professionnels et à ne jamais baisser les bras devant les difficultés. Je vous aime !

Merci à Elodie Voilin, notre stagiaire en début d'aventure, pour le travail accompli. Bravo à toi !

Merci à vous d'avoir lu cette thèse.

Résumé

L'incidence des infections à arbovirus (*arthropod born virus*) a augmenté de façon spectaculaire au cours des dernières décennies dans les régions tropicales et subtropicales du globe, touchant des centaines de millions de personnes chaque année. Les virus de la dengue et du chikungunya sont transmis par les moustiques du genre *Aedes* et peuvent causer un large panel de symptômes, allant parfois jusqu'au décès. Bien que les tests de diagnostic conventionnels fournissent un diagnostic précoce des infections aiguës à arbovirus, l'accès à ces tests est souvent limité dans les pays en développement. Un diagnostic précoce et rapide est crucial pour améliorer la prise en charge du patient et réduire le risque de complications. Il y a donc un besoin urgent de développer des outils peu chers, simples d'utilisation, rapides, robustes, et utilisables auprès du patient. Les tests de diagnostic sur support papier (PAD) ont ces caractéristiques.

Dans un premier temps, un PAD imprimé à la cire a été développé et évalué pour la détection de la protéine Non Structurale 1 (NS1) de la dengue, dans du sang et du plasma. Le PAD a été en mesure de détecter spécifiquement 10 ng.mL^{-1} de protéines dans divers types d'échantillons, en 6 à 8 minutes.

Par la suite, une version améliorée du PAD obtenue par découpe laser a été conçue et testée pour la détection de la protéine NS1 de la dengue et des IgM spécifiques du virus, dans le sang et le plasma. Ces deux paramètres ont pu être détectés en 8 minutes.

Les travaux de mise au point du PAD effectués sur la dengue ont ensuite été appliqués à la détection des IgM du virus du chikungunya dans des sérums humains, en utilisant des Particules virales Pseudotypées (PPs). Ces antigènes synthétiques se sont avérés être des outils puissants pour la capture des IgM spécifiques. Les résultats obtenus ont montré une sensibilité de 70,6% et une spécificité d'environ 98% avec un temps d'obtention des résultats de moins de 10 minutes. Le PAD a montré peu de réactions croisées avec d'autres arboviroses. Les PPs ont enfin été caractérisées par différentes méthodes physico-chimiques dans le but de déterminer les éléments clef de leurs performances.

Le PAD pourrait être utilisé pour le diagnostic précoce de la dengue et du chikungunya, qui nécessitent des protocoles de gestion spécifiques pour les populations à risque.

Abstract

The incidence of arboviruses infections has increased dramatically in recent decades in tropical and sub-tropical areas worldwide, affecting hundreds of millions of people each year. Dengue and chikungunya viruses are typically transmitted by mosquitoes and can cause a wide range of symptoms, and sometimes death. Although conventional diagnostic tests can provide diagnosis of acute infections, access to these tests is often limited in developing countries. Early and prompt diagnosis is crucial to improve patient management and reduce the risk of complications. Consequently, there is an urgent need to develop affordable, simple, rapid, and robust tools that can be used at 'Point of Care' settings. Paper-based Analytical Devices (PAD) have these attributes.

Firstly, we developed and evaluated a PAD for the detection of the dengue Non Structural 1 (NS1) viral protein in blood and plasma samples. Experiments have been carried out to increase specificity, while maintaining the required sensitivity. The PAD was able to detect specifically 10 ng.mL^{-1} of NS1 protein in various sample types and in 6-8 minutes.

Secondly, an improved version of the PAD obtained by laser cutting was designed and tested for the detection of dengue NS1 protein and virus-specific IgM in blood and plasma. Each parameter could be detected in 8 minutes.

PAD development performed on dengue fever was then applied to the detection of chikungunya virus IgM in human sera, using viral Pseudo-Particles (PPs). These synthetic antigens have proven to be powerful tools for specific IgM detection. The results obtained showed a sensitivity of 70.6% and a specificity of approximately 98% with a time to results of less than 10 minutes. The PAD showed few cross reactions with other arboviruses. The PPS were finally characterized with different physico-chemical methods in order to determine the key factors of their performances.

The PAD could help health workers in the early diagnosis of tropical diseases such as dengue and chikungunya that require specific management protocols on risk populations.

Liste des abréviations

2D : deux dimensions

3D : trois dimensions

aa : acide aminé

ADCC : médiation cellulaire de la cytotoxicité dépendante de l'anticorps

Arbovirus : *Arthropod-Borne Virus* (virus transmis par les insectes)

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ARNv : ARN viral

ATAP : *Advanced Technology and Projects*

AVCI : Années de Vie Corrigées de l'Incapacité

BFV : Virus de la Forêt de Barmah

BPB : bleu de bromophénol

BSA : albumine de sérum bovin

CARPHA : *Caribbean Public Health Agency*

CDC : *Centers for Disease Control and Prevention* (Centres de contrôle et de prévention des maladies)

CHIKV : Virus du chikungunya

CNR : Centre National de Référence des Arbovirus.

DALY : *Disability Adjusted Life Years* (Espérance de vie corrigée de l'incapacité)

DCs : cellules dendritiques

DEL : diode électroluminescente

DENV : Virus de le dengue

DPS : délai post début des symptômes

DW : poids de l'invalidité (utilisé pour le calcul du *DALY*)

ECDC : *European Center for Disease Prevention and Control* (Centre Européen de contrôle et de prévention des maladies)

ECP : Effet Cytopathique

ECSA : *Eastern/Central/South Africa lineage* (génotype Est/Central/Afrique du Sud)

EEEV : Virus de l'Encéphalite Equine de l'Est

EJ : virus de l'encéphalite japonaise

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

ESL : virus de l'encéphalite de Saint-Louis

FGM : Fardeau Global de la Maladie

GAC-ELISA : *Type G Immunoglobulin Antibody Capture - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

IgG : Immunoglobulines de type G

IgM : Immunoglobulines de type M

IIFT : *Indirect Immunofluorescence Test* (test d'immunofluorescence indirecte)

INSERM : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale

IRBA : Institut de Recherche Biomédicale des Armées.

Kb : Kilobases, 1 Kb est égal à 1 000 bases nucléotidiques

kDa : KiloDalton

MAC-ELISA : *Type M Immunoglobulin Antibody Capture - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

MIT : *Massachusetts Institute of Technology*

MF1 : *Microfiber Paper* (papier en microfibres de verre)

NDUV : Virus Ndumu

NK : lymphocyte *Natural Killer*

nsPs : Protéines Non-Structurales

nt : nucléotide

NTR : Régions Non-Traduites

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONNV : Virus O’Nyong-Nyong

ORFs : *Open Reading Frame* (cadre ouvert de lecture)

PAD : *Paper Analytical Device*

PAL : enzyme Phosphatase Alcaline

PCR : *Polymerase Chain Reaction* (réaction en chaîne par polymérase, ou amplification en chaîne par polymérase)

PDMS : polydimethylsiloxane

Pe : nombre de Reynolds

PER : peroxydase

PET : polyethylene terephthalate

PFU.mL⁻¹ : *Plaque Forming Units*, ou nombre de particules virales par millilitre d’échantillon

PMMA : polyméthacrylate de méthyle

POC : *Point-of-Care* (test diagnostic réalisé « au chevet du patient »)

PRNT : *Plate Reduction Neutralization Test* (séroneutralisation)

q-RT-PCR : *quantitative – RetroTranscription - Polymerase Chain Reaction* (amplification génomique en temps réel *via* rétro-transcription)

q-RT-RPA : *quantitative – RetroTranscription - Recombinase Polymerase Amplification*

RRV : Virus Ross River

RT-LAMP : *Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*

RVF : virus de la fièvre de la vallée du Rift

SELEX : *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*

SFV : Virus de la forêt Semliki

TBE : virus de l’encéphalite à tique

TOS : virus Toscana

TTR : *Time to Result* (temps d’obtention du résultat)

UV : rayons UltraViolets

VEEV : Virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VSIN : Virus Sindbis

WEEV : Virus de l'Encéphalite Equine de l'Ouest

WN : virus West Nile

YLD : *Years Lived with Disability* (nombre d'années vécues avec un état de handicap)

YLL : *Years of Life Lost* (nombre d'années de vie perdues due à une mort précoce)

ZIKA ou ZIKV : virus Zika

Table des illustrations

Figure 1 : Distribution géographique mondiale des virus de la dengue, du chikungunya et Zika	1
Figure 2 : Critères ASSURED établis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour le développement de tests de diagnostics à destination des pays émergents	2
Figure 3 : Arbre phylogénétique simplifié des virus du genre <i>Alphavirus</i>	6
Figure 4 : Distribution géographique d'épidémies au virus chikungunya dans les régions d'Afrique et d'Asie.....	8
Figure 5 : Origine, expansion et distribution des différents génotypes du virus du chikungunya et ces vecteurs de transmission.....	9
Figure 6 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différents génotypes du virus du chikungunya, issu de l'analyse complète du génome viral	10
Figure 7 : Cycles de transmissions, vecteurs et réservoirs du CHIKV	11
Figure 8 : Photographie des moustiques <i>Aedes aegypti</i> et <i>Aedes albopictus</i>	13
Figure 9 : Distribution géographique du moustique <i>Ae. albopictus</i> en Europe.....	13
Figure 10 : Organisation du génome virale du chikungunya	14
Figure 11 : Organisation du génome du CHIKV et produits des gènes	15
Figure 12 : Structure en 3 dimensions du CHIKV	17
Figure 13 : Schéma en coupe du CHIKV	18
Figure 14 : Cycle de réplication du CHIKV dans la cellule hôte.....	21
Figure 15 : Pathogénicité de l'infection au virus du chikungunya.....	23
Figure 16 : Dissémination du CHIKV dans l'organisme, avec cellules et organes cibles	25
Figure 17 : Illustration de l'évolution à l'infection au CHIKV au cours du temps et les différentes phases de la maladie.....	27
Figure 18 : Illustration schématique du <i>DALY</i>	31
Figure 19 : Evolution des marqueurs de l'infection au CHIKV et les méthodes de diagnostic associées	35
Figure 20 : Algorithme de diagnostic séquentiel pour les voyageurs malades et de retour d'une région épidémique pour CHIKV, DENV ou ZIKA	36

Figure 21 : Représentation schématique de la détection des IgM anti-CHIKV par la technique MAC-ELISA	43
Figure 22 : Représentation schématique de la détection des IgG anti-CHIKV par la technique GAC-ELISA	44
Figure 23 : ELISA direct pour la sérologie IgG anti-CHIKV	45
Figure 24 : Schématisation de la technique d'IIFT pour la sérologie IgG anti-CHIKV	46
Figure 25 : Représentation schématique d'un protocole de séroneutralisation	47
Figure 26 : Kit de biologie moléculaire utilisable sur automate, et automate	54
Figure 27 : Appareil de biologie Moléculaire FilmArray® de l'entreprise BioFire®Defense	54
Figure 28 : Photographie du plus petit ordinateur du monde	56
Figure 29 : Smartphone modulaire de Google	57
Figure 30 : Equipement de laboratoire à très bas prix	58
Figure 31 : Illustration de la dynamique du cycle macro-économique et des différents concepts d'innovation entrant en jeu	60
Figure 32 : Illustration éclatée d'un test de type LFA	65
Figure 33 : Illustrations de quelques procédés de fabrications de PAD en 2 dimensions	69
Figure 34 : Illustration de la fabrication de canaux sur un PAD par la technique de la photolithographie	70
Figure 35 : Photographie de la surface d'un morceau de papier ayant subi une abrasion au laser	71
Figure 36 : Illustrations de différentes formes données à des PAD	71
Figure 37 : PAD microfluidique papier sous forme de cassette	72
Figure 38 : Démonstration de la différence de cinétique de migration des fluides colorés vers la zone de détection du PAD	73
Figure 39 : Illustration d'un PAD en 3D où quatre liquides colorés se croisent sans se mélanger	74
Figure 40 : Illustration d'un pliage en origami pour former une structure 3D	75
Figure 41 : Exemple d'un μ PAD 3D	76
Figure 42 : Processus de fabrication d'un PAD en trois dimensions par utilisation d'un laser pour former des canaux	77
Figure 43 : Dispositif analytique papier en format Rubik's Cube	77

Figure 44 : Comportement d'un fluide dans un dispositif microfluidique.....	79
Figure 45 : Systèmes de mélanges de fluides dans un circuit microfluidique.....	80
Figure 46 : Formation d'un canal microfluidique par abrasion du support papier.....	81
Figure 47 : Contrôle de l'écoulement d'un fluide pas utilisation d'un pont dissolvable	82
Figure 48 : Contrôle de l'écoulement d'un fluide pas utilisation d'un PAD absorbant.....	83
Figure 49 : Détection colorimétrique de glucose sur PAD en deux dimensions.....	85
Figure 50 : Représentation illustrative d'une réaction colorimétrique utilisant des AuNPs sur support LFA	86
Figure 51 : PAD papier avec une détection électrochimique du glucose sanguin utilisant des électrodes en graphite.....	87
Figure 52 : PAD utilisant une diode et de la fluorescence comme système de révélation.....	88
Figure 53 : Illustration du dispositif de diagnostic de <i>N. meningitidis</i> par technologie LAMP	91
Figure 54 : Dispositif fluide composé d'un film flexible laminé à chaud entre deux couches de plastiques thermorésistants	91
Figure 55 : Migration d'un fluide au sein d'un fil de coton	92
Figure 56 : Graphique représentant l'évolution du nombre de propriétaires de téléphones portables au Nigeria	93
Figure 57 : L'appareillage LUCAS	94
Figure 58 : Lecture d'un résultat de PAD papier avec un système smartphone.....	95
Figure 59 : Test IC utilisant des aptamères dirigés contre les protéines d'enveloppe du CHIKV	98
Figure 60 : Tests IC pour le diagnostic de la protéine NS1 du virus de la dengue (sérotypage 1) et du virus Zika.....	99
Figure 61 : Tests immunochromatographiques sur support papier pour la détection multiplexée des protéines de <i>Plasmodium</i> et de DENV	100
Figure 62 : Système RT-PCR sur micropuce	101
Figure 63 : Test de diagnostic moléculaire basé sur l'utilisation d'une imprimante 3D modifiée	102
Figure 64 : Système de détection RT-LAMP en tube	104

Tableaux

Tableau 1 : Formules de calcul des années de vie corrigées de l'incapacité (DALY).....	30
Tableau 2 : Virus à tester en PCR et sérologie selon la provenance géographique du patient	37
Tableau 3 : Tableau récapitulatif de performances de 4 tests de diagnostic sérologique du CHIKV, évalués par le CNR Arbovirus et le CDC	51
Tableau 4 : Récapitulatifs d'études de comparaison de performances de tests sérologiques pour le diagnostic du CHIKV	52
Tableau 5 : Tableau récapitulatif de performances du test IIFT d'EuroImmun® pour le diagnostic sérologique IgM et IgG du CHIKV	53
Tableau 6 : Caractéristiques spécifiques des critères ASSURED pour le développement de tests POC pour le diagnostic du VIH-1 et VIH-2.....	63
Tableau 7 : Récapitulatif des procédés de fabrications de PAD en 2 dimensions	68
Tableau 8 : Formule du nombre de Reynolds (Re)	78
Tableau 9 : Récapitulatif des principales méthodes de détection sur support papier.....	84

Table des matières

PREAMBULE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. LE VIRUS DU CHIKUNGUNYA	5
1.1 PRESENTATION GENERALE	5
1.1.1. Origine et classification du virus	5
1.1.2. Epidémiologie et distribution géographique	6
1.1.3. Diversité génétique	8
1.1.4. Vecteurs de transmission et réservoirs.....	10
1.1.4.1. Vecteurs et cycles de transmission.....	10
1.1.4.2. <i>Aedes aegypti</i>	12
1.1.4.3. <i>Aedes albopictus</i>	12
1.2. ORGANISATION MOLECULAIRE DU VIRUS	14
1.2.1. Génome viral	14
1.2.2. Protéines virales.....	14
1.2.2.1. Les protéines non-structurales (nsPs).....	14
1.2.2.2. Les protéines structurales	16
1.3. LA MUTATION E1 - A226V	18
1.4. CYCLE VIRAL	19
1.5. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION VIRALE.....	21
1.5.1. Cellules cibles, réponse immunitaire	21
1.5.2. Organes cibles et pathologies associées.....	23
1.5.3. Evolution de l'infection au virus et symptômes associés	26
1.5.3.1. Phase aiguë	26
1.5.3.2. Phase chronique.....	28
1.5.3.3. Traitement et prévention de la maladie	28
1.5.3.4. <i>Disability-Adjusted Life Years</i> (DALY)	29
1.5.3.4.1. Définition	29
1.5.3.3.2. Exemple 1 : l'épidémie en Inde de 2006.....	31
1.5.3.3.3. Exemple 2 : l'épidémie dans la région des Amériques	32
2. LE DIAGNOSTIC DU CHIKV.....	34
2.1. LES METHODES STANDARDISEES.....	35
2.1.1. Détection du virus du chikungunya sur prélèvements	38
2.1.1.1. Détection du génome viral	38
2.1.1.2. Détection des antigènes viraux.....	39
2.1.2. Isolement du virus sur cellules en culture.....	39

2.1.3. Détection des anticorps anti-CHIKV sur prélèvements.....	42
2.1.3.1. Sérologie IgM.....	42
2.1.3.2. Sérologie IgG	44
2.1.3.3. Séroneutralisation (PRNT)	46
2.2. LES TESTS COMMERCIALISES	48
2.2.1. Détection du génome viral sur prélèvements.....	48
2.2.2. Sérologie.....	50
2.2.3. Automates.....	53
3. LES TESTS BAS COUT (<i>LOW COST</i>).....	56
3.1 CONTEXTE MONDIAL ET EMERGENCE DU BAS COUT	56
3.2. LES CRITERES ASSURED	62
3.3. LES TESTS RAPIDES : UN PAS VERS LES SOLUTIONS BAS COUT ?	64
3.4. LES SOLUTIONS PAPIERS.....	66
3.4.1. Fabrication d'un test sur support papier (PAD).....	67
3.4.1.1. Tests en deux dimensions (2D)	67
3.4.1.2. Tests en trois dimensions (3D).....	73
3.4.2. Ecoulement et mélange des fluides.....	78
3.4.3. Méthodes de détection et révélation	83
3.5. SUPPORTS ALTERNATIFS POUR LA FABRICATION DE DISPOSITIFS MICROFLUIDIQUES	90
3.6. OBTENTION ET LECTURE DES RESULTATS : ESSOR DU SMARTPHONE	92
3.7. SYSTEMES BAS COUT ET DETECTION DES ARBOVIRUS	97
TRAVAUX EXPERIMENTAUX	105
ARTICLE 1 : SOLUTION MICROFLUIDIQUE PAPIER POUR LE DIAGNOSTIC BAS COUT AU CHEVET DU PATIENT D'INFECTIONS A FLAVIVIRUS EN PHASE VIREMIQUE.....	106
ARTICLE 2 : SOLUTION MICROFLUIDIQUE PAPIER OBTENUE PAR DECOUPE LASER POUR LA DETECTION DE LA PROTEINE NON-STRUCTURALE 1 (NS1) ET DES IGM DIRIGÉES CONTRE LE VIRUS DE LA DENGUE.....	117
ARTICLE 3 : SEROLOGIE IGM ANTI-CHIKUNGUNYA SUR SUPPORT MICROFLUIDIQUE PAPIER OBTENU PAR DECOUPE LASER ET UTILISANT DES PSEUDOPARTICULES VIRALES COMME ANTIGENE DE CAPTURE.....	131
ARTICLE 4 : ETUDE COMPARATIVE DE <i>VIRUS-LIKE PARTICLES</i> ET DE <i>PSEUDOTYPED-PARTICLES</i> DE CHIKUNGUNYA UTILISEES DANS LA DETECTION SEROLOGIQUE D'IMMUNOGLOBULINES DE TYPE M SPECIFIQUES.	165
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	200
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	207

Préambule

Le virus du chikungunya (CHIKV) est un arbovirus (*arthropod born virus*) transmis par les moustiques du genre *Aedes*, également vecteurs des virus de la dengue et Zika. Ces agents infectieux ainsi que leurs vecteurs sont principalement présents dans les régions tropicales et subtropicales du globe (Ruckert, Weger-Lucarelli *et al.* 2017) (**Figure 1**). Le CHIKV est aujourd'hui présent dans 60 pays en Asie, Afrique, en Europe et dans les pays d'Amérique.

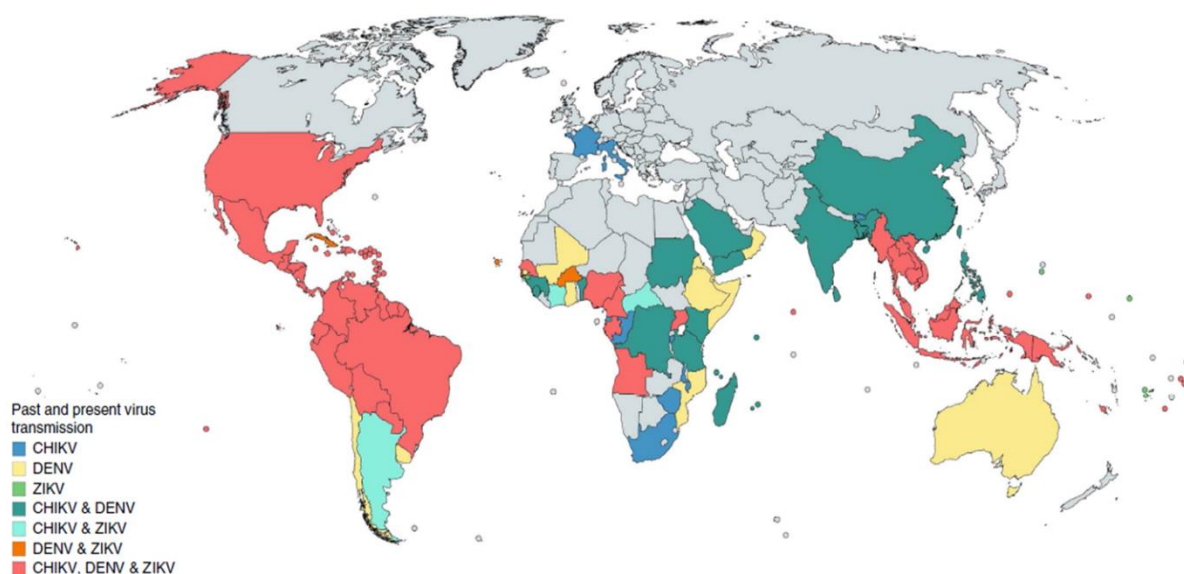


Figure 1 : Distribution géographique mondiale des virus de la dengue, du chikungunya et Zika. D'après Claudia Rückert *et al.* 2017.

Le CHIKV a été identifié pour la première fois en Afrique de l'Est en 1952-1953, en Tanzanie et au Mozambique, avant de se propager dans le reste de l'Afrique et en Asie entre les années 1950 et 1990. Plus récemment, en 2014, il a été détecté à Montpellier dans le sud de la France, puis en 2017 dans le département du Var (Calba, Guerbois-Galla *et al.* 2017), ainsi qu'en Italie (Marano, Pupella *et al.* 2017). La grande adaptabilité des vecteurs de ces virus a permis leur expansion rapide à travers le monde, avec notamment l'apparition d'un nouveau vecteur, le moustique *Aedes albopictus*, également surnommé « moustique tigre », plus adapté aux régions tempérées que ne le sont les autres moustiques du même genre. Des études prédictives ont montré une probable expansion de ce moustique sur toute l'Europe, en partie à cause du réchauffement climatique, laissant présager de futures épidémies en Europe (Caminade, Medlock *et al.* 2012).

Une infection à chikungunya se caractérise par de la fièvre et des arthralgies (douleurs articulaires), ainsi que des myalgies, nausées, une forte fatigue et des éruptions cutanées. Bien que peu mortelle (191 décès sur plus de 1 300 000 cas suspects dans les Caraïbes, en Amérique latine et aux États-Unis d'Amérique en 2015), seuls 3 à 28% des personnes infectées sont asymptomatiques (Brouard, Bernillon *et al.* 2008, Gérardin, Guernier *et al.* 2008, Rathore, Runyon *et al.* 2017). De plus, entre 10% et 15% des malades développent une forme chronique de la maladie avec des arthralgies sévères très handicapantes (Brighton and Simson 1984, Manimunda, Vijayachari *et al.* 2010, Dupuis-Maguiraga, Noret *et al.* 2012).

En début d'infection, la symptomatologie associée au virus du chikungunya est très proche de celle des virus de la dengue et Zika. Cependant, la prise en charge associée à chaque maladie est différente. Ainsi, de nombreux tests de diagnostic ont été développés pour diagnostiquer spécifiquement chaque virus. Les tests de biologie moléculaire permettent la détection du génome viral présent dans un échantillon du patient infecté. Lorsque le virus n'est plus présent dans l'organisme du patient, environ 7 jours après l'apparition des premiers symptômes, une sérologie des anticorps dirigés contre le virus est effectuée. Bien que performants, ces tests sont effectués en laboratoire et nécessitent du matériel dédié, ainsi que des infrastructures importantes, du personnel qualifié et coûtent cher.

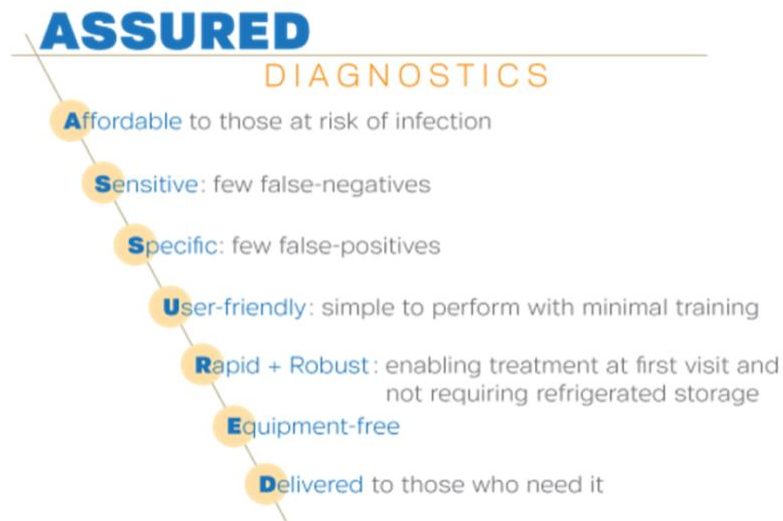


Figure 2 : Critères ASSURED établis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour le développement de tests de diagnostics à destination des pays émergents. D'après l'OMS, 2003.

Afin de permettre aux populations des pays émergents d'avoir accès à des tests de diagnostic performants et financièrement accessibles, l'OMS a défini des critères, dits ASSURED, pour le développement de tests de diagnostic à destination de ces pays (**Figure 2**).

L'émergence de tests dits POC (*Point-of-Care*), c'est-à-dire effectués au plus près du patient et peu chers, tels que les tests rapides sur bandelettes, sont un exemple de technologies développées pour correspondre aux critères ASSURED. Cependant, malgré un coût moins important que les tests et les méthodes utilisées dans les pays développés, ils restent chers et présentent des performances insuffisantes, notamment en termes de sensibilité de détection.

Le développement de technologies de diagnostic sur support papier représente une solution alternative attractive pour le développement de tests POC de nouvelle génération à bas coût. Dans ce contexte, le papier représente un matériau attractif car il représente une solution simple pour nombre d'applications, notamment dans le diagnostic clinique. Ce matériau est bon marché, facilement transportable, facile d'accès, biocompatible et recyclable. Combinée à d'autres technologies pour une fabrication de masse telles que des découpeuses laser, ainsi qu'à des systèmes de lecture alternatifs comme des smartphones, cette technologie ouvre la voie au diagnostic personnalisé et pourrait éventuellement améliorer la qualité de vie des personnes concernées, et ce à moindre coût.

Dans le présent manuscrit, nous nous sommes intéressés à l'utilisation d'un dispositif microfluidique sur support papier, appelé PAD (*Paper-based Analytical Device*), pour le diagnostic à bas coût des virus du chikungunya et de la dengue. Le travail de mise au point a été tout d'abord effectué sur la dengue car de nombreux outils (anticorps, protéines recombinantes.) étaient déjà disponibles en interne. Par la suite, en parallèle au développement de nouvelles matières premières dédiées, le travail s'est axé sur le diagnostic du chikungunya.

La partie bibliographique est divisée en 3 parties. La première partie a pour objectif de présenter le virus du chikungunya et les pathologies qui lui sont associées. La seconde partie porte sur les différentes techniques et méthodes de diagnostic du virus aujourd'hui utilisées en laboratoire et commercialisées. La troisième partie s'intéresse aux différentes technologies alternatives de diagnostic à bas coût qui ont été développées en concordance avec les critères ASSURED.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le virus du chikungunya

1.1 Présentation générale

1.1.1. Origine et classification du virus

La fièvre du chikungunya est une maladie infectieuse causée par le virus du chikungunya (CHIKV). CHIKV est un Arbovirus (*Arthropod-Borne Virus*) identifié pour la première fois en Afrique de l'Est, en 1952-1953, lors d'une épidémie en Tanzanie et au Mozambique (Lumsden 1955, Robinson 1955). Le nom du virus provient du dialecte Makondé (population de Tanzanie et du nord du Mozambique) signifiant « maladie de l'homme courbé », qui fait référence à la posture voutée des personnes souffrant d'arthralgies (articulations douloureuses) causées par le virus (Kucharz and Cebula-Byrska 2012). L'historique du virus suggère qu'il a sévi en Afrique dès le 18^{ème} siècle et était confondu avec la fièvre de dengue, provoquée par le virus du même nom (DENV), de par la similarité des symptômes des deux maladies en début d'infection (Rossini, Landini *et al.* 2016).

CHIKV appartient à la famille des *Togaviridae* et au genre *Alphavirus*, dont font également partie les virus de l'Encéphalite Equine de l'Est, de l'Ouest et du Venezuela (Rathore, Runyon *et al.* 2017). Les membres du genre *Alphavirus* sont traditionnellement classés dans le groupe des virus du Nouveau Monde incluant VEEV (Virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela) et EEEV (Virus de l'Encéphalite Equine de l'Est), ou de l'Ancien Monde dont font partie ONNV (Virus O'Nyong-Nyong), SFV (Virus de la Forêt de Semliki) et RRV (Virus Ross River) (**Figure 3**) (Powers, C. *et al.* 2001, Garmashova, R. *et al.* 2007, Solignat, Gay *et al.* 2009). Le CHIKV fait partie de la classe IV des virus (génomme à ARN simple brin, cf. **chapitre 1.2.1**) d'après la classification de Baltimore, établie sur la composition du génome viral (Baltimore 1971).

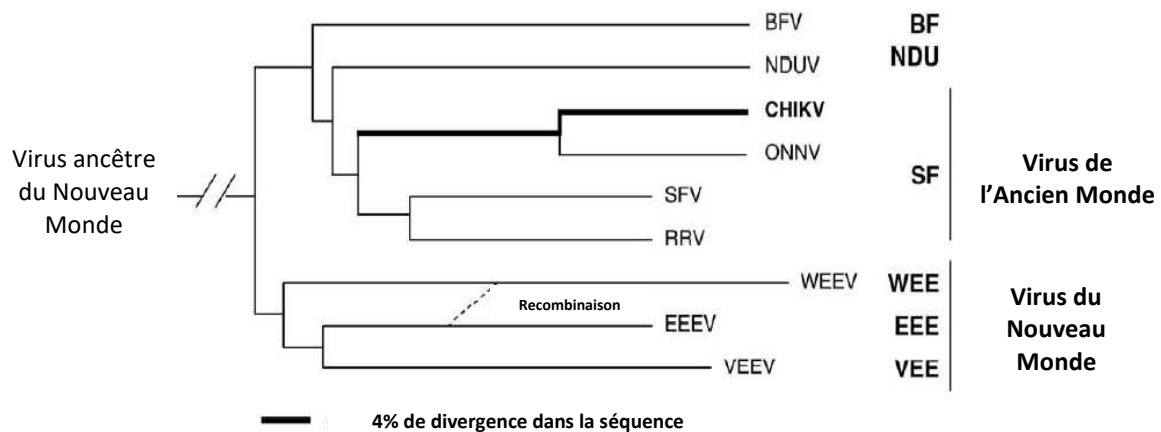


Figure 3 : Arbre phylogénétique simplifié des virus du genre *Alphavirus*. BFV : Virus de la forêt de Barmah; NDUV : Virus Ndumu ; CHIKV : Virus du chikungunya ; ONNV : Virus O’Nyong-Nyong ; SFV : Virus de la forêt de Semliki ; RRV : Virus Ross River ; WEEV : Virus de l’Encéphalite Equine de l’Ouest ; EEEV : Virus de l’Encéphalite Equine de l’Est ; VEEV : Virus de l’Encéphalite Equine du Venezuela. D’après Solignat *et al.* 2009.

1.1.2. Épidémiologie et distribution géographique

Suite à sa découverte en 1952, le virus n’a cessé de se propager, provoquant des épidémies sporadiques en Afrique et en Asie, entre la fin des années 1950 et les années 1990 (**Figure 4**). La première preuve directe d’une fièvre chikungunya en dehors de l’Afrique a été mise en évidence à Bangkok (Thaïlande) en 1958 (Hammon, Rudnick *et al.* 1960). Le virus a ensuite été retrouvé au Cambodge et en Inde en 1961-1963 et en 1974, souvent associé à des épidémies de dengue, avant de s’étendre au reste de l’Asie. Durant 30 ans, il n’a plus été recensé d’activité épidémique forte, probablement grâce à l’établissement d’une immunité collective dans la population (Rossini, Landini *et al.* 2016). En 2004, une épidémie majeure a débuté sur les îles de Lamu (Kenya), avant de s’étendre aux îles de l’Océan Indien (îles Maurice, île de la Réunion, Maldives), en Afrique de l’Ouest, en Inde et en Asie, engendrant des millions de cas (Rougeron, Sam *et al.* 2015, Weaver and Lecuit 2015).

En 2005, une nouvelle épidémie majeure a eu lieu sur les îles françaises de La Réunion, où 300 000 cas sont alors répertoriés. Cette épidémie s’est étendue jusque dans le sous-continent Indien, engendrant là encore des millions de cas. Une épidémie de telle ampleur - jusque-là jamais observée - a été probablement causée par la synergie de plusieurs facteurs : i) l’augmentation du transport aérien, permettant une dissémination rapide du virus, ii) le manque d’exposition de la population humaine de l’Océan Indien et de l’Asie du Sud au virus, iii)

l'urbanisation entraînant l'augmentation de la densité de population, iiiii) le changement climatique et les migrations (Kucharz and Cebula-Byrska 2012, Weaver and Forrester 2015). De cette importante épidémie a résulté l'arrivée de voyageurs infectés en Europe, en Asie et dans les Amériques, avec des transmissions locales du virus constatées dans le Nord de l'Italie (2007) et dans le Sud de la France métropolitaine en 2010 (Grandadam, Caro *et al.* 2011).

En 2008-2009, une épidémie de chikungunya s'est produite dans le sud de la Thaïlande avec plus de 50 000 cas suspects recensés (Rossini, Landini *et al.* 2016). 12 cas autochtone de CHIKV ont été observé en France en 2014 à Montpellier (Delisle, Rousseau *et al.* 2015), puis 19 dans le département du Var en 2017 (Calba, Guerbois-Galla *et al.* 2017), ainsi que 146 cas autochtones confirmés et 93 probables en Italie, dans la région du Latium (<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/RRA-chikungunya-Italy-update-9-Oct-2017.pdf>).

Le premier cas autochtone de contamination au CHIKV dans la région des Caraïbes a été répertorié sur l'île de Saint Martin (territoire français partagé avec les néerlandais), en octobre 2013 (Figure 5). Des cas autochtones ont ensuite été observés sur d'autres îles des Caraïbes, avant une dissémination en Amérique Centrale, où 11 cas ont été diagnostiqués durant l'été 2014. En septembre 2014, plus de 100 cas de chikungunya ont été diagnostiqués en Polynésie Française, notamment à Tahiti (Aubry, Teissier *et al.* 2015). En août de la même année, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a répertorié plus de 650 000 cas autochtones dans la région des Amériques (Rossini, Landini *et al.* 2016). En avril 2015, plus de 1 300 000 cas suspects de chikungunya ont été enregistrés dans les Caraïbes, en Amérique latine et aux États-Unis d'Amérique, avec 191 décès imputés à cette maladie.

Au Brésil, pays plus particulièrement touché, le premier cas autochtone de transmission du CHIKV a été détecté en septembre 2014 dans la ville d'Oiapoque (Rossini, Landini *et al.* 2016). La même année, 2 772 cas d'infection au CHIKV ont été confirmés (Cavalcanti, Freitas *et al.* 2017). En 2015, plus de 20 000 cas suspects et 7 800 cas confirmés de chikungunya ont été répertoriés par le Ministère de la Santé brésilien (Nunes, Faria *et al.* 2015). Entre juin et août 2016, 220 000 cas et plus de 90 morts du chikungunya ont été répertoriés au Brésil (Cavalcanti, Freitas *et al.* 2017). Des études épidémiologiques ont suggéré qu'environ 94% de la population brésilienne encourait alors un risque d'infection au CHIKV (Nunes, Faria *et al.* 2015).

Depuis, 45 pays ou territoires d'Amérique ont répertoriés des cas de contamination au CHIKV sur leurs sols (Furuya-Kanamori, Liang *et al.* 2016) (Source : CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* - <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/>).

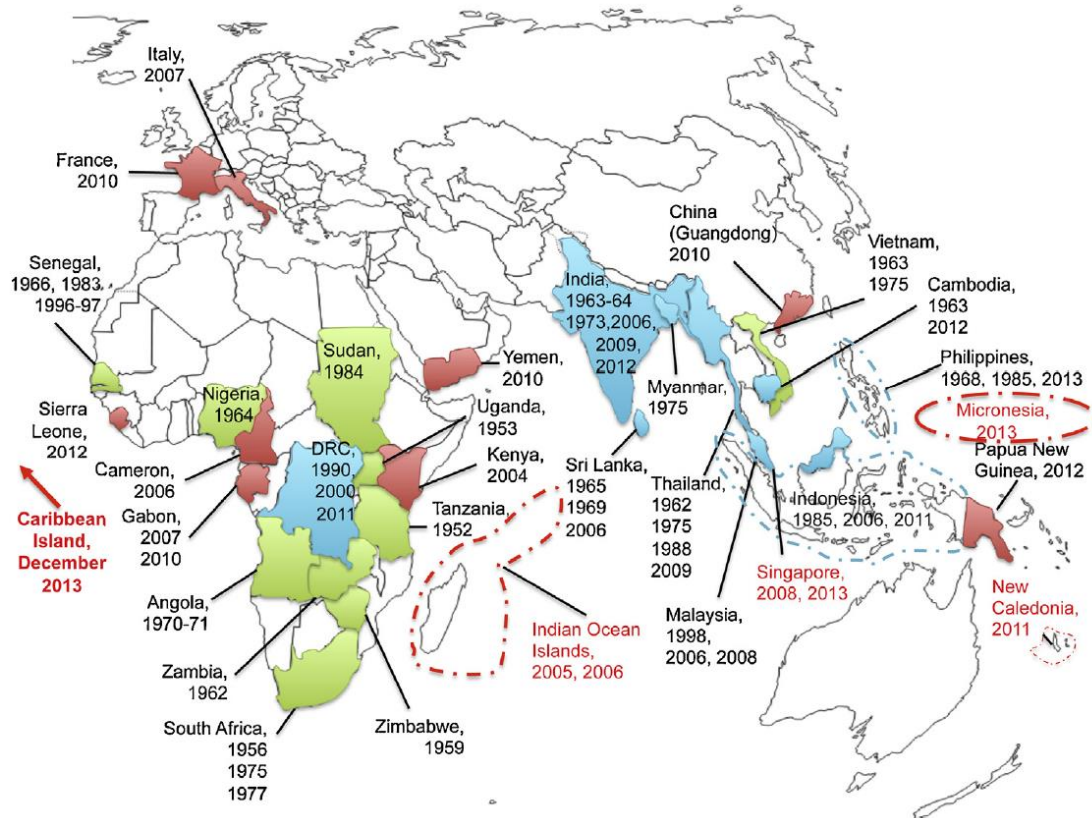


Figure 4 : Distribution géographique d'épidémies au virus chikungunya dans les régions d'Afrique et d'Asie. En vert : pays présentant des épidémies avant 2004 . En bleu : pays touchés par des épidémies avant et après 2004. En rouge : pays avec des épidémies uniquement depuis ou après 2004. D'après V. Rougeron *et al.* 2015.

1.1.3. Diversité génétique

Quatre principaux génotypes du CHIKV ont été établis suite à des études phylogénétiques du virus : les génotypes Ouest Africain, Asiatique, Océan Indien et Est/Central/Afrique du Sud (ECSA) (Powers, Brault *et al.* 2000) (**Figure 5**). L'épidémie de 2004 sur les îles Lamu (Kenya) était due à une souche de génotype ECSA. Des analyses de séquences et des études de phylogénies ont montré que les souches de CHIKV isolées durant les épidémies en Asie entre 1958 et 1973 constituent un groupe monophylétique situé à la racine du génotype ECSA, formant la lignée Asiatique (**Figure 6**). Cette lignée serait devenue distincte du génotype ECSA entre 1879 et 1927 (Petersen and Powers 2016). La lignée Asiatique s'est

apparemment éteinte en Inde après l'épidémie de 1973 mais a continué de circuler en Asie du Sud, provoquant quelques cas sporadiques (Weaver and Forrester 2015).

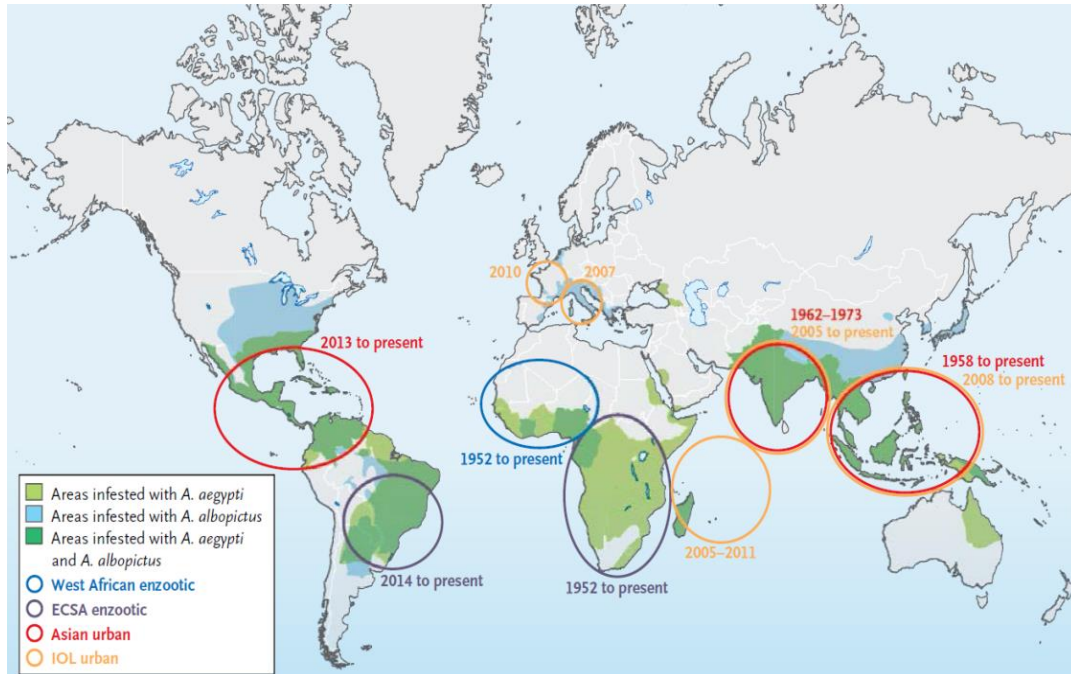


Figure 5 : Origine, expansion et distribution des différents génotypes du virus du chikungunya et ces vecteurs de transmission. ECSA : Eastern, Central and South African. IOL : Indian Ocean Lineage. D'après Scott C. Weaver *et al.* 2015.

Egalement issue du génotype ECSA de l'épidémie au Kenya en 2004, la souche de CHIKV qui a sévi en 2005 en Inde et sur les îles de l'Océan Indien, notamment sur l'île de la Réunion, a été classifiée comme lignée de l'Océan Indien (IOL). Ce génotype est lié à une propagation fulgurante du virus, encore jamais observée, due à une mutation génétique particulière, nommée E1 – A226V (cf. **chapitre 1.3**) (Thayan, Yusof *et al.* 2016). L'épidémie liée à la lignée IOL est à l'origine des cas importés de CHIKV en France métropolitaine et en Italie en 2007 et 2010, *via* des voyageurs infectés (Chen, Puri *et al.* 2016, Rossini, Landini *et al.* 2016). L'identification de la lignée Asiatique comme responsable de l'épidémie de CHIKV en Amérique Centrale (2013-2014) s'expliquerait par des cas de contaminations importés d'Océanie ou d'Asie du Sud (**Figure 5**).

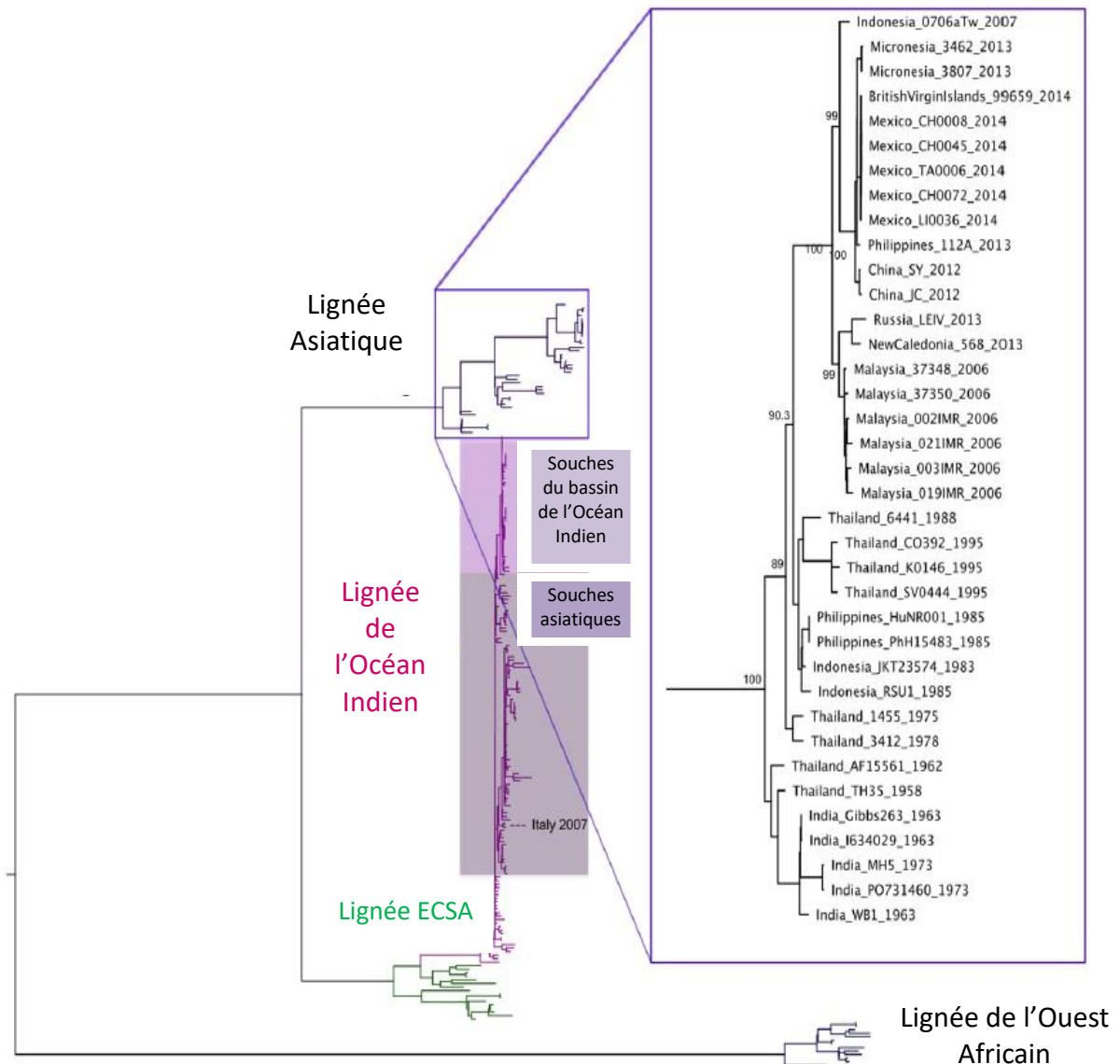


Figure 6 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différents génotypes du virus du chikungunya, issu de l'analyse complète du génome viral. D'après Scott C. Weaver *et al*, 2015.

1.1.4. Vecteurs de transmission et réservoirs

1.1.4.1. Vecteurs et cycles de transmission

Les principaux vecteurs de ce virus sont les moustiques du genre *Aedes* (Figure 7). Deux cycles de transmission distincts ont été identifiés pour le CHIKV : un cycle enzootique

sylvatique (ne touchant que les animaux des milieux forestiers) et un cycle urbain incluant l'Homme. Les primates non-humains représentent les hôtes réservoirs et d'amplification du pathogène pour le cycle sylvatique. Ce cycle peut être perturbé par l'infection d'humains vivant à proximité, impliquant les moustiques du cycle sylvatique dans la transmission du CHIKV à l'Homme, ainsi que dans la transmission interhumaine lors de courtes épidémies (Caglioti, Castilletti *et al.* 2013).

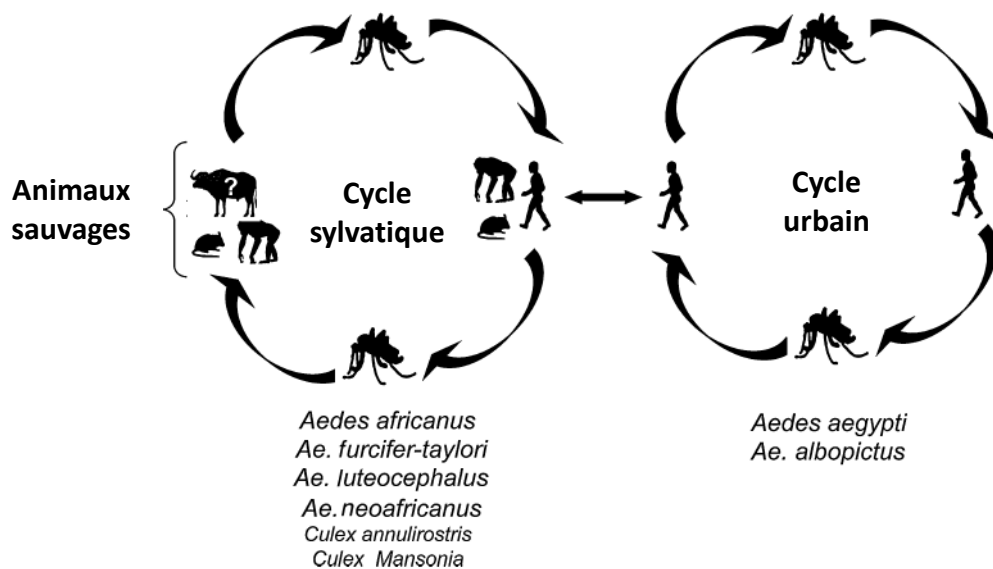


Figure 7 : Cycles de transmissions, vecteurs et réservoirs du CHIKV.
 D'après Rougeron *et al.* 2015.

Le cycle urbain a été mis en évidence lors de l'apparition du CHIKV en Asie dès les années 1950, et dans l'Océan Indien, l'Inde et le Sud de l'Asie depuis 2005. Le moustique considéré comme le vecteur classique du virus dans ce cycle est le moustique du genre *Aedes* et de l'espèce *aegypti*. Cependant, depuis l'épidémie de 2005 sur l'île de la Réunion, un autre moustique, *Aedes albopictus*, est considéré comme l'un des principaux vecteurs du CHIKV. De par la présence de ce moustique à proximité des habitations humaines, son rôle dans la transmission du virus n'en a été que plus forte (Kucharz and Cebula-Byrska 2012). Durant les périodes inter-épidémies, le cycle de transmission sylvatique apparaît comme permettant le maintien du virus, le singe jouant notamment le rôle de réservoir (Rougeron, Sam *et al.* 2015).

1.1.4.2. *Aedes aegypti*

Ae. aegypti (**Figure 8**) est un vecteur de transmission très efficace en milieu urbain car il pique préférentiellement les humains. Il est présent dans les régions tropicales et subtropicales du globe. Seules les femelles piquent afin de faire un repas de sang permettant le développement de leurs œufs. Le moustique est capable de piquer plusieurs personnes pour obtenir un repas de sang complet, et peut donc contaminer autant de personnes piquées. *Ae. aegypti* se reproduit dans les points d'eau stagnantes qui sont naturellement très nombreux autour des habitations humaines, facilitant ainsi la transmission interhumaine du virus (Petersen and Powers 2016).

1.1.4.3. *Aedes albopictus*

Ae. albopictus est plus connu sous le nom de « Moustique tigre » de par les rayures qu'il arbore sur ses pattes, ainsi que par une ligne blanche longitudinale visible sur son thorax (**Figure 8**). Contrairement à l'*Ae. aegypti*, ce moustique peut également se développer dans les régions tempérées, telles que l'Europe et l'Amérique du Nord (**Figure 5**). Il a été identifié dans plus 12 pays Européens (**Figure 9**), et dans une grande partie des Etats-Unis (Kucharz and Cebula-Byrska 2012). Cette présence étendue sur le globe offre la possibilité au CHIKV de se propager dans de nouvelles niches écologiques, jusque-là épargnées par le virus. Il peut survivre en milieu rural et urbain, a une durée de vie de 4 à 8 semaines, peut voler sur des distances de 400 à 600 mètres (Kucharz and Cebula-Byrska 2012), est diurne et silencieux. Ses œufs sont hautement résistants et peuvent rester viables durant les saisons froides pour donner naissance à des larves qui deviennent adultes à la saison chaude suivante. Ainsi, dans les pays des zones tropicales, les épidémies coïncident généralement avec la saison des pluies car la population de moustiques augmente fortement à ce moment de l'année (Powers and Logue 2007).

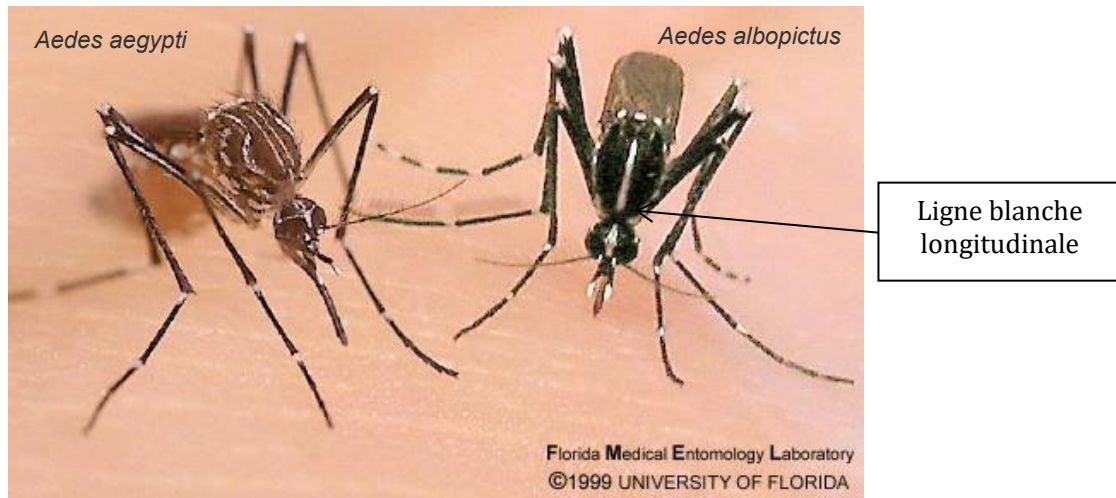


Figure 8 : Photographie des moustiques *Aedes aegypti* (gauche) et *Aedes albopictus* (droite), vecteurs de transmission de nombreux arbovirus dont le virus chikungunya.
Source : Université de Floride (<https://fmel.ifas.ufl.edu>).

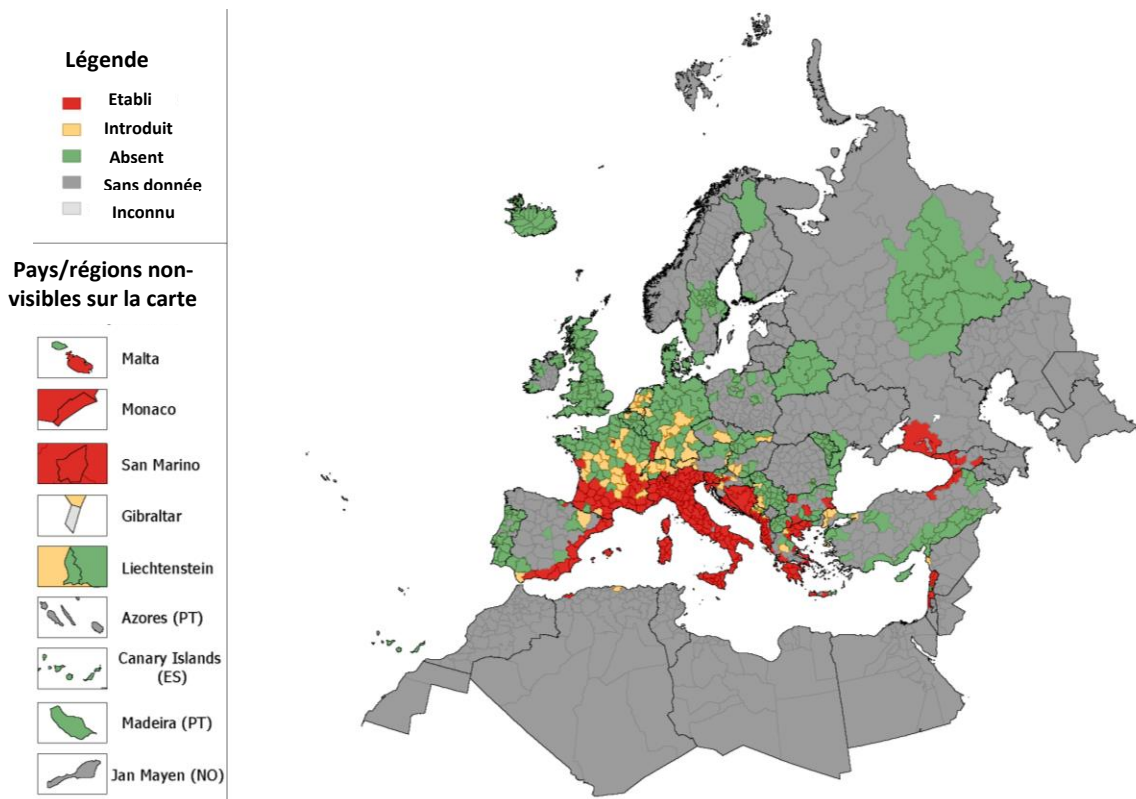


Figure 9 : Distribution géographique du moustique *Ae. albopictus* en Europe (septembre 2017). D'après le site ECDC « European Center for Disease Prevention and Control ».

1.2. Organisation moléculaire du virus

1.2.1. Génome viral

Le génome du CHIKV est composé d'un ARN simple brin, d'approximativement 12 Kilobases (Kb), et de polarité positive (+) (**Figure 10**) (Jose, Snyder *et al.* 2009, Galán-Huerta, Rivas-Estilla *et al.* 2015). La séquence codante consiste en deux grands cadres ouverts de lectures (ORFs) : l'ORF en région 5' code pour deux précurseurs des protéines non-structurales, P123 et P1234, tandis que l'ORF en région 3' code pour un précurseur des protéines structurales. Ces polyprotéines sont par la suite clivées par des protéases pour finalement donner 4 protéines non-structurales (nsPs) et 5 protéines structurales (Solignat, Gay *et al.* 2009, Leung, Ng *et al.* 2011). Les nsPs sont directement traduites depuis l'ARN génomique tandis que les protéines structurales le sont à partir d'un ARN subgénomique 26S (Schwartz and Albert 2010, Lum and Ng 2015). Les deux ARN possèdent une coiffe de type m7GpppNp-RNA (Delang, Li *et al.* 2016) en 5', qui protège l'ARN de la dégradation.

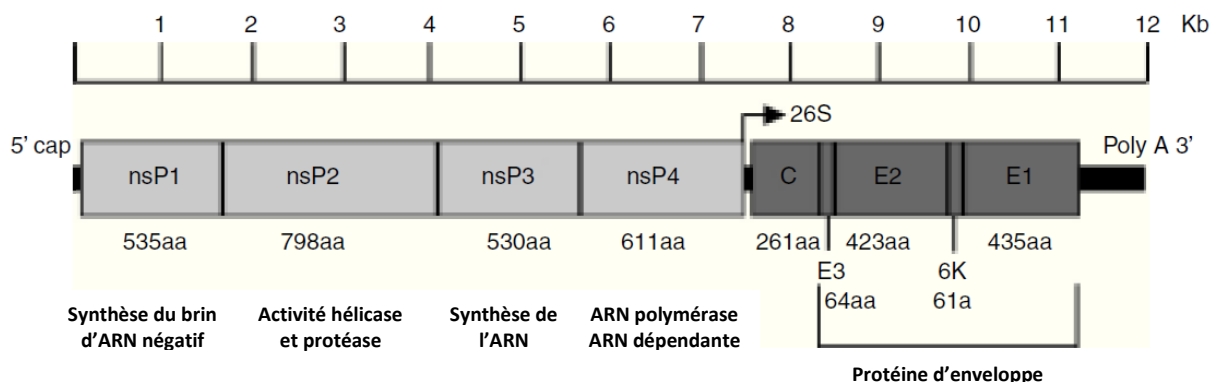


Figure 10 : Organisation du génome virale du chikungunya. D'après Galán-Huerta *et al.* 2015.

1.2.2. Protéines virales

1.2.2.1. Les protéines non-structurales (nsPs)

Les *Alphavirus* possèdent 4 protéines non-structurales, nommées nsP1 à nsP4 (**Figure 11**). Elles forment un complexe de répllication virale dans la cellule hôte. La nsP1 est nécessaire à la synthèse de la coiffe et à la méthylation des nouveaux brins d'ARN génomiques viraux et de l'ARN subgénomique lors de leur transcription. Elle a également un rôle d'amorçage dans

la synthèse du brin d'ARN viral complémentaire, de polarité négative, lors de la réplication du virus dans la cellule hôte. Elle jouerait un rôle de régulation de l'activité protéasique de nsP2.

La protéine nsP2 joue un rôle dans la synthèse de la coiffe en 5' de l'ARN génomique *via* une activité d'ARN triphosphatase. Sa région C-terminale possède une activité protéase nécessaire dans le clivage de la polyprotéine P1234, précurseur des polyprotéines non-structurales virales. Elle reconnaît également le promoteur de l'ARN 26S et a un rôle de facteur d'initiation de la transcription de cet ARNm (Suopanki, Sawicki *et al.* 1998). Elle est également impliquée dans l'arrêt de la transcription du génome de la cellule (Strauss and Strauss 1994).

La protéine nsP3 possède une activité de liaison à l'ARN viral (ARNv) et une activité phosphatase (Malet, Coutard *et al.* 2009), empêchant la circularisation du génome. Des études de mutagenèse sur des souris ont permis de mettre en évidence le rôle de modulateur de la pathogénicité que joue nsP3 (Park and Griffin 2009).

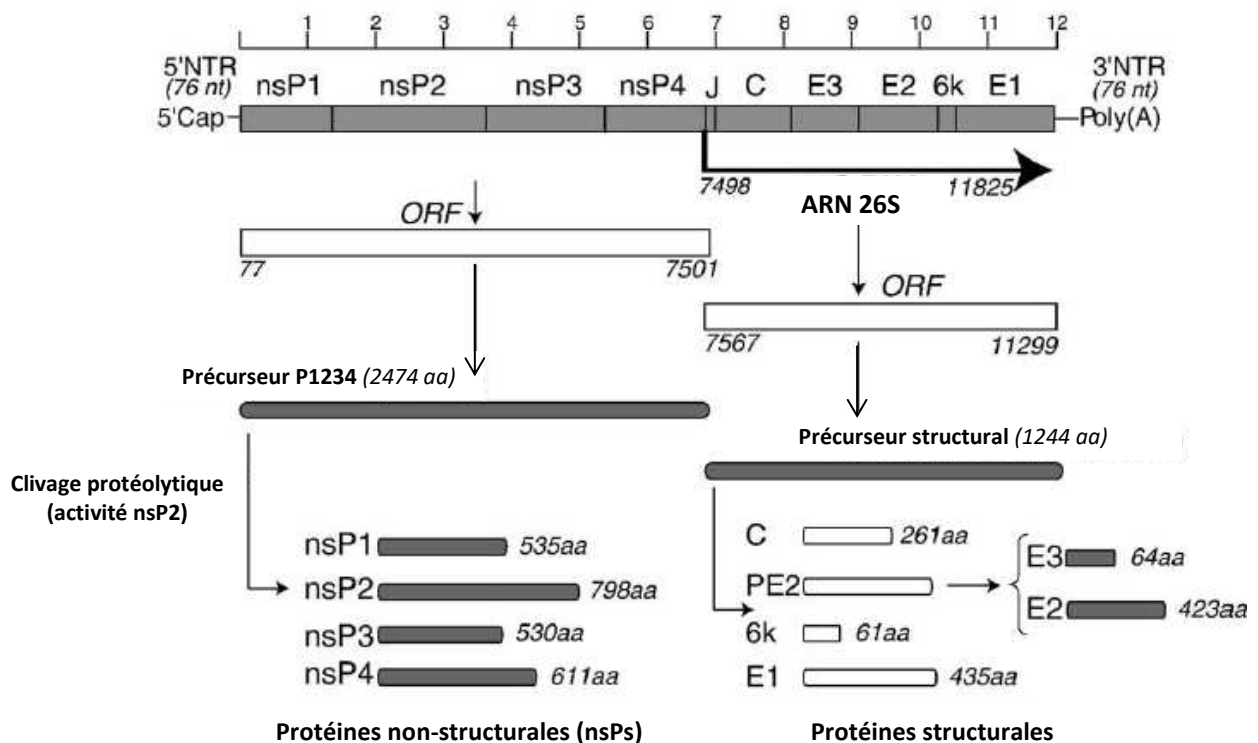


Figure 11 : Organisation du génome du CHIKV et produits des gènes. Les extrémités 5' et 3' du génome portent des régions non traduites (NTR). La zone de jonction (J) n'est également pas codée. ORF : cadre ouvert de lecture. nt : nucléotides. D'après Solignat *et al.* 2009.

Enfin, la protéine nsP4 est une ARN-polymérase ARN dépendante. Elle catalyse la réaction de réplication de l'ARN viral *via* synthèse d'un brin d'ARN complémentaire du brin d'ARN matrice. La majorité des nsP4 produites sont protégées de la protéolyse en se complexant aux autres nsPs virales pour former les complexes de réplication (cf. **chapitre 1.4**), tandis que les autres nsPs sont rapidement dégradées (de Groot, Hardy *et al.* 1990). Cette protéine jouerait probablement le rôle de « matrice » pour les autres protéines non-structurales du virus, afin de permettre leur interaction entre elles et la formation du complexe de réplication (Schwartz and Albert 2010, Leung, Ng *et al.* 2011).

1.2.2.2. Les protéines structurales

Cinq protéines structurales ont été identifiées : E1, E2, E3, C et 6K (**Figure 11**). De nombreuses études ont été faites pour déterminer la structure des *Alphavirus*, par des méthodes de cryo-microscopie électronique et de cristallographie aux rayons X. Plusieurs *Alphavirus* ont ainsi été étudiés, dont VSIN (Virus Sindbis), SFV (Virus de la forêt Semliki), VRR (Virus Ross River) et VEEV (Virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela) (Lamb, Lokesh *et al.* 2010) (Tang, Jose *et al.* 2011).

Les *Alphavirus* sont de forme sphérique avec une capside icosaédrique. Ils ont un diamètre d'environ 70nm. Le génome est encapsulé dans des protéines de capside, formant la nucléocapside. Celle-ci est enveloppée dans une bicouche lipidique, dérivée de la membrane cellulaire hôte, où les glycoprotéines d'enveloppe (E1 et E2) sont disposées en réseau icosaédrique (Sun, Xiang *et al.* 2013) (**Figure 12**).

- **Glycoprotéines d'enveloppe (E1, E2 et E3):** la glycoprotéine précurseur d'E2, appelée pE2, et la glycoprotéine E1 interagissent pour former des hétérodimères E1-pE2. Ces complexes sont transportés vers la membrane plasmique de la cellule hôte. Durant le transport, pE2 est clivée par une protéase pour générer les protéines E2 et E3. Par la suite, les glycoprotéines d'enveloppe transmembranaires E1 et E2 vont s'assembler pour former l'hétérodimère E1-E2, qui sera transporté vers la membrane cellulaire pour former l'enveloppe du nouveau virus (**Figure 12**, **Figure 13** et **Figure 14**). La protéine E3 a un rôle primordial car elle permet un assemblage efficace des particules. En effet, elle sert de médiateur pour le repli conformationnel des hétérodimères et leur activation lors de l'entrée du virus dans la cellule cible. Un total de 240 hétérodimères forment ainsi 80 spicules trimériques (chaque spicule est un trimère d'hétérodimères) à la surface du virion (Jose, Snyder *et al.* 2009). Les spicules sont

agencés en un réseau icosaoédrique asymétrique, formé d'hexamères et de pentamères de spicules (Sun, Xiang *et al.* 2013) (**Figure 12** et **Figure 13**).

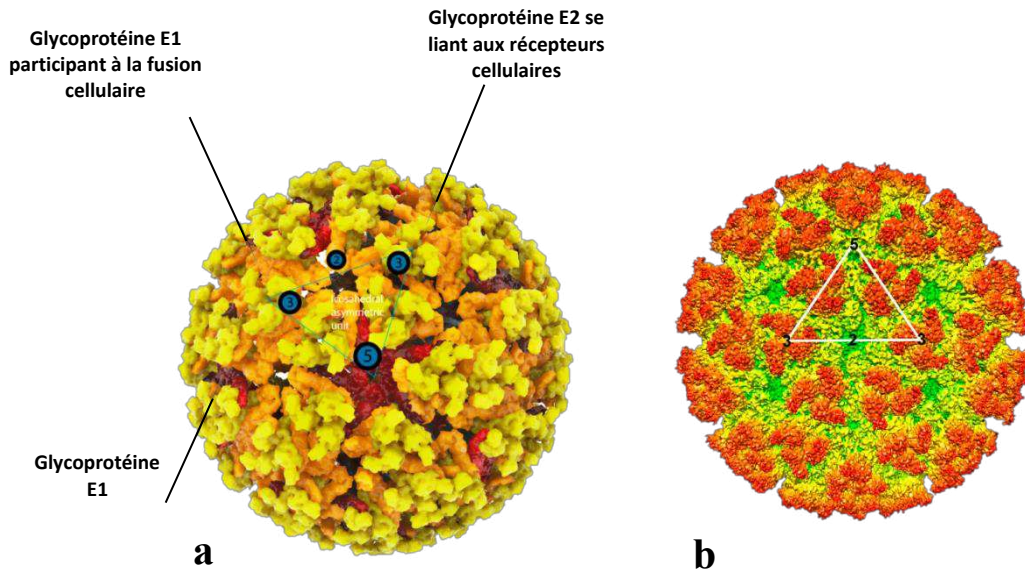


Figure 12 : Structure en 3 dimensions du CHIKV, avec représentation des protéines d'enveloppes assemblées en unités icosaoédriques (triangles). Les chiffres correspondent aux différents ordres de symétries des protéines de capside et d'enveloppe à la surface du virus.

- a) figure de représentation de la structure de surface du CHIKV. Source : 3Dciencia.com.
 b) figure colorisée d'une analyse cryo-microscopique à transmission du CHIKV. Les spicules sont représentés en orange. D'après Sun *et al.* 2013.

E2 est impliquée dans la liaison avec la cellule hôte, *via* des récepteurs cellulaires encore mal identifiés. La liaison d'E2 avec son récepteur entraîne une endocytose du virus dans la cellule cible (**Figure 14**). Une fois à l'intérieur de la cellule, l'ectodomaine de la glycoprotéine E1 va entraîner la fusion de la membrane virale avec la membrane endosomale de la cellule hôte. L'ectodomaine, composé de trois domaines (I, II et III), correspond à la partie de la protéine située à la surface de l'enveloppe virale. Les domaines restants de la protéine E1 sont transmembranaires et sont enchâssés dans la membrane lipidique.

- **Protéine 6K (6K):** la protéine 6K est un polypeptide de 6 KiloDalton (kDa). Entre 7 et 30 copies sont présentes dans le virion, et sont essentielles à l'assemblage des particules virales. 6K influencerait sur le transport des virions vers les sites d'assemblage situés à la membrane

plasmique (**Figure 14**), avant d'être incorporé aux virions (Lusa, Garoff *et al.* 1991). Ce polypeptide est une viroporine (protéine formant des canaux dans les membranes) : il forme des canaux ioniques sélectifs, et altère la perméabilité membranaire des cellules, pour permettre le relargage des virus hors de la cellule infectée (Melton, Ewart *et al.* 2002). Des études de Jose *et al.* (2009), portant sur des altérations au niveau de la région du génome codant pour 6K, voire la suppression de la séquence codant pour ce peptide, ont démontré que ces altérations entraînaient une très forte réduction du rendement de production de virus infectieux (Jose, Snyder *et al.* 2009).

- **Capside (C)**: la capside a différentes fonctions, dont un rôle crucial dans l'assemblage du virion, la protection du génome viral, et le relargage du virus par bourgeonnement hors de la cellule hôte (Goh, Hobson-Peters *et al.* 2015). La nucléocapside, qui renferme le génome viral, est composée de 30 hexamères et de 20 pentamères (**Figure 13**) pour un total de 280 protéines de capside par virion. C'est cette nucléocapside qui donne sa forme sphérique au virus. Chaque protéine de capside a une masse molaire d'environ 30 kDa.

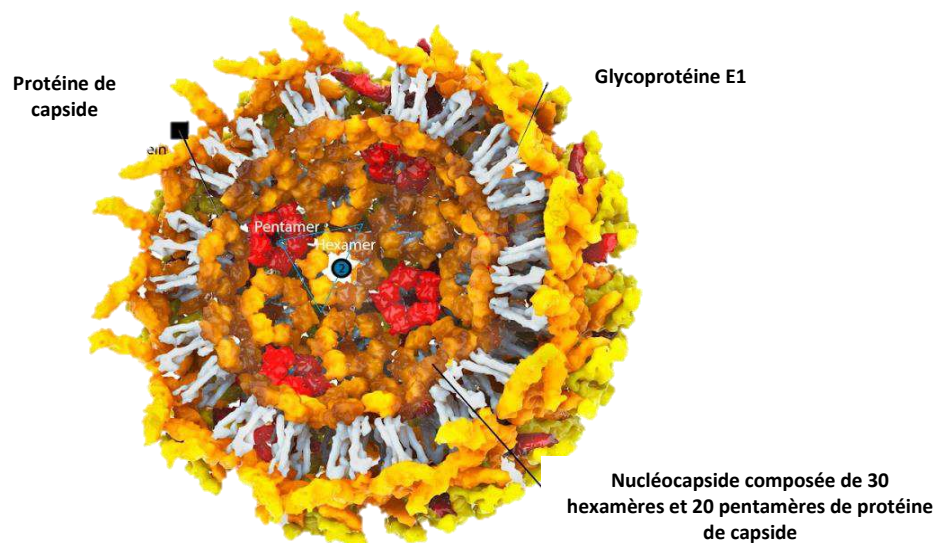


Figure 13 : Schéma en coupe du CHIKV, représentant l'enveloppe virale, la membrane lipidique et la nucléocapside. Source : 3Dciencia.com.

1.3. La mutation E1 - A226V

Des expérimentations réalisées par Tsetsarkin *et al.* portant sur des mutations au niveau des gènes codant pour des protéines structurales du virus, ont permis d'émettre l'hypothèse qu'une substitution de l'acide aminé alanine, en position 226 de la protéine d'enveloppe E1 du

CHIKV de génotype ESCA, par une valine (mutation E1 – A226V), confère une adaptation accrue du virus au moustique *Ae. albopictus*. Cette mutation lui permet d'être transmis *via* ce nouvel hôte. L'épidémie de l'île de la Réunion en 2005 a été associée à une souche de CHIKV portant cette mutation. Des études ont prouvé que cette mutation est directement responsable d'une augmentation significative de l'infectiosité du CHIKV pour *Ae. albopictus*, notamment grâce à une dissémination virale plus efficace du virus de l'intestin vers différents organes du moustique (abdomen, glandes salivaires) (Tsetsarkin, Vanlandingham *et al.* 2007), augmentant ainsi la transmissibilité du virus par ce moustique.

Cette mutation a entraîné un nombre important d'épidémies dans les zones géographiques où *Ae. albopictus* était abondant. En effet, ce moustique ayant une large distribution géographique, il peut transmettre le virus à une population plus grande que celle touchée uniquement par *Ae. aegypti*, augmentant ainsi l'impact épidémiologique du CHIKV (Rossini, Landini *et al.* 2016). En 2017, des cas de chikungunya ont été répertoriés en France et en Italie, pays situés dans une région tempérée du globe où *Ae. albopictus* est désormais implanté (**Figure 9**), illustrant l'impact de cette mutation sur l'étendue des zones géographiques où le virus sévit.

1.4. Cycle viral

Le cycle de réplication est identique pour tous les *Alphavirus* (**Figure 14**). Le virus pénètre la cellule cible par endocytose médiée par la clathrine, *via* des récepteurs cellulaires de surface, et la protéine d'enveloppe E2 virale. Il en résulte la formation d'un endosome intracellulaire contenant le virus. L'acidité de l'endosome induit un changement conformationnel de l'ectodomaine de la protéine d'enveloppe E1 virale, qui va exposer son peptide de fusion vers la membrane cible. Ce peptide hydrophobe, très conservé, situé à l'extrémité N-terminale du domaine II de la protéine, est normalement protégé par une partie de la protéine E2 (Voss, Vaney *et al.* 2010, Kuo, Chen *et al.* 2012). L'exposition du peptide de fusion entraîne la dissociation des hétérodimères E1-E2 et la formation d'homotrimères E1 (Wahlberg, Bron *et al.* 1992, Sanchez-San Martin, Liu *et al.* 2009). Ces trimères E1 insèrent leur peptide de fusion dans la membrane de la cellule cible et se replient en une structure en forme « d'épingle à cheveux » (Bressanelli, Stiasny *et al.* 2004). Cette étape aboutit à la fusion de la membrane du virus avec celle de l'endosome, entraînant le relargage de la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire, suivi de la libération du génome viral.

Le génome viral utilise la machinerie cellulaire pour être transcrit. Dans 20% des cas, les ribosomes ne traduisent pas correctement le codon STOP situé à l'extrémité 3' du gène qui code pour P123, générant un précurseur P1234 par translecture (Li and Rice 1993). Ce phénomène permet de réguler l'expression de nsP4 (issue de P1234) et son activité ARN-polymérase ARN dépendante. La protéine nsP4 se lie à P123 pour former le complexe de réplication qui va synthétiser le brin d'ARN de polarité négative (-) complémentaire du génome viral (Shirako and Strauss 1994). Ce nouveau brin servira alors de brin matrice pour la synthèse de l'ARN messager (ARNm) génomique 49S de polarité positive (+) des nouveaux virions, initiée par le complexe de réplication formé des 4 protéines non-structurales matures (**Figure 14**). Le clivage du précurseur P123 par la protéine nsP2, via son activité auto-protéolytique, permet l'obtention des protéines nsP1, nsP2 et nsP3 matures. Les quatre nsPs vont former un nouveau complexe de réplication virale qui va alors synthétiser un brin d'ARN 49S de polarité positive (+), qui correspond au génome des nouveaux virions, et l'ARN messager (ARNm) subgénomique 26S. La traduction de l'ARNm subgénomique 26S permet la synthèse des précurseurs des protéines structurales de capsid, 6K, pE2 et E1 (cf. **chapitre 1.2.2.2**), sous contrôle d'un promoteur interne (Dupuis-Maguiraga, Brun *et al.* 2011).

Après les étapes de clivage des polyprotéines précurseurs des protéines structurales, *via* des activités auto-protéolytiques, les protéines de capsid sont libérées dans le cytoplasme, puis vont s'associer à l'ARN génomique 49S (+) pour former la nucléocapsid du nouveau virus. Les glycoprotéines pE2 et E1 subissent des modifications post-traductionnelles lors de leur passage dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Le précurseur pE2 est clivé pour donner les glycoprotéines E2 et E3. Les glycoprotéines E1 et E2 s'associent pour former des hétérodimères E1-E2 qui sont transportés vers la membrane cellulaire hôte pour y être incorporés (**Figure 14**). La nucléocapsid migre vers la membrane plasmique cellulaire pour sortir de la cellule hôte par bourgeonnement, processus par lequel elle acquiert sa membrane bilipidique où se trouvent les hétérodimères E1-E2, formant l'enveloppe du nouveau virion. La protéine 6K participe à la formation et au bourgeonnement des nouveaux virions en interagissant avec la protéine E2. Le virus, désormais mature, peut infecter de nouvelles cellules cibles (Schwartz and Albert 2010, Lum and Ng 2015).

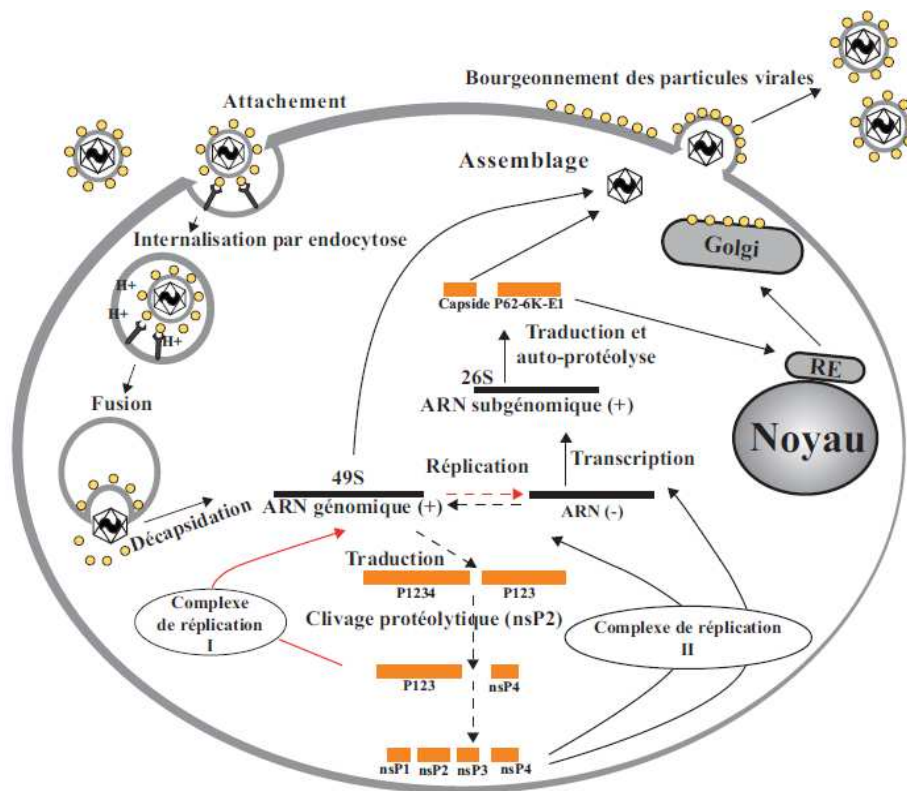


Figure 14 : Cycle de réplication du CHIKV dans la cellule hôte. D'après Dupuis-Maguiraga *et al.* 2011

1.5. Physiopathologie de l'infection virale

1.5.1. Cellules cibles, réponse immunitaire

Suite à la piqûre d'un moustique infecté par le CHIKV, le virus va cibler les cellules épithéliales, et les fibroblastes du derme et de l'épiderme (**Figure 15**) reconnus comme étant susceptibles à l'infection au virus (Couderc, Chretien *et al.* 2008, Kam, Ong *et al.* 2009, Ong, Lum *et al.* 2014). Il débute alors sa multiplication dans l'organisme (Sourisseau, Schilte *et al.* 2007). En revanche, il n'a pas été montré d'infection par le CHIKV, ni *ex vivo* ni *in vitro*, des lymphocytes CD4⁺ ou des cellules dendritiques (DCs), contrairement à RRV, VEEV ou DENV (Wu, Grouard-Vogel *et al.* 2000, Shabman, Morrison *et al.* 2007, Gardner, Burke *et al.* 2008, Schilte, Couderc *et al.* 2010, Dupuis-Maguiraga, Brun *et al.* 2011). Cependant, les DCs jouent un rôle important durant la phase aigüe de l'infection en étant les principaux producteurs d'IFN de type I (Siegal, Kadowaki *et al.* 1999), ce qui pourrait initier et activer la lyse des cellules médiée par les lymphocytes NK (Colonna, Trinchieri *et al.* 2004).

Dans le même temps, le virus pénètre les micro-capillaires sanguins sous-cutanés pour se retrouver dans la circulation sanguine, où il infecte les macrophages dérivés des monocytes (Her, Malleret *et al.* 2010, Thiberville, Moyen *et al.* 2013). Ces macrophages se retrouvent ensuite dans la circulation sanguine et atteignent d'autres organes, où ils vont libérer le virus. De nombreuses études ont permis de décrire le tropisme viral et la réplication du CHIKV dans des systèmes de culture cellulaire et des modèles animaux (Glasgow 1966, Hahon and Zimmerman 1970, Rinaldo, Overall *et al.* 1975), avant que des études sur des cultures cellulaires humaines caractérisent le tropisme du virus chez les humains (Ozden, Huerre *et al.* 2007, Sourisseau, Schilte *et al.* 2007). Krejbich *et al.* ont démontré que l'apoptose (mort cellulaire programmée) et l'autophagie cellulaire (dégradation du cytoplasme cellulaire par ses propres lysosomes) des cellules cibles du CHIKV favorisent la réplication et la dissémination du virus aux cellules voisines non-infectées (Krebich-Trotot, Denizot *et al.* 2011, Krejbich-Trotot, Gay *et al.* 2011, Dhanwani, Khan *et al.* 2012).

L'infection initie la réponse immunitaire de l'organisme hôte par la production de cytokines telles que les interférons (IFN) de type I, de différentes cytokines et chimiokines, qui instaurent une réponse immunitaire globale de lutte contre le virus (Schilte, Couderc *et al.* 2010). Les interférons de type I agissent de concert avec les immunoglobulines de type M (IgM) dirigées contre le CHIKV, synthétisées dès le 4^{ème} jour DPS pour faire diminuer la virémie (Gardner, Anraku *et al.* 2010, Labadie, Larcher *et al.* 2010, Schwartz and Albert 2010, Wauquier, Becquart *et al.* 2011, Rougeron, Sam *et al.* 2015). Les IFN de type I sont de petites protéines d'environ 150aa sécrétées essentiellement par les cellules du système immunitaire, en réponse à une infection virale ou bactérienne. Elles représentent la première ligne de défense de l'immunité innée avec les lymphocytes Natural Killer (NK), dont elles accroissent l'activité cytotoxique (Perry, Chen *et al.* 2005). Les IFN atteignent un pic de concentration concomitant au pic de virémie, puis leur concentration diminue dans le temps avec l'augmentation du titre en IgM anti-CHIKV (Rougeron, Sam *et al.* 2015).

Après 3-4 jours supplémentaires, ce sont les IgG qui sont produites et sécrétées dans l'organisme. Elles sont liées à la mémoire immunitaire qui fait que le patient sera normalement protégé lors d'une nouvelle infection au CHIKV (Gasque, Couderc *et al.* 2015, Schwameis, Buchtele *et al.* 2016).

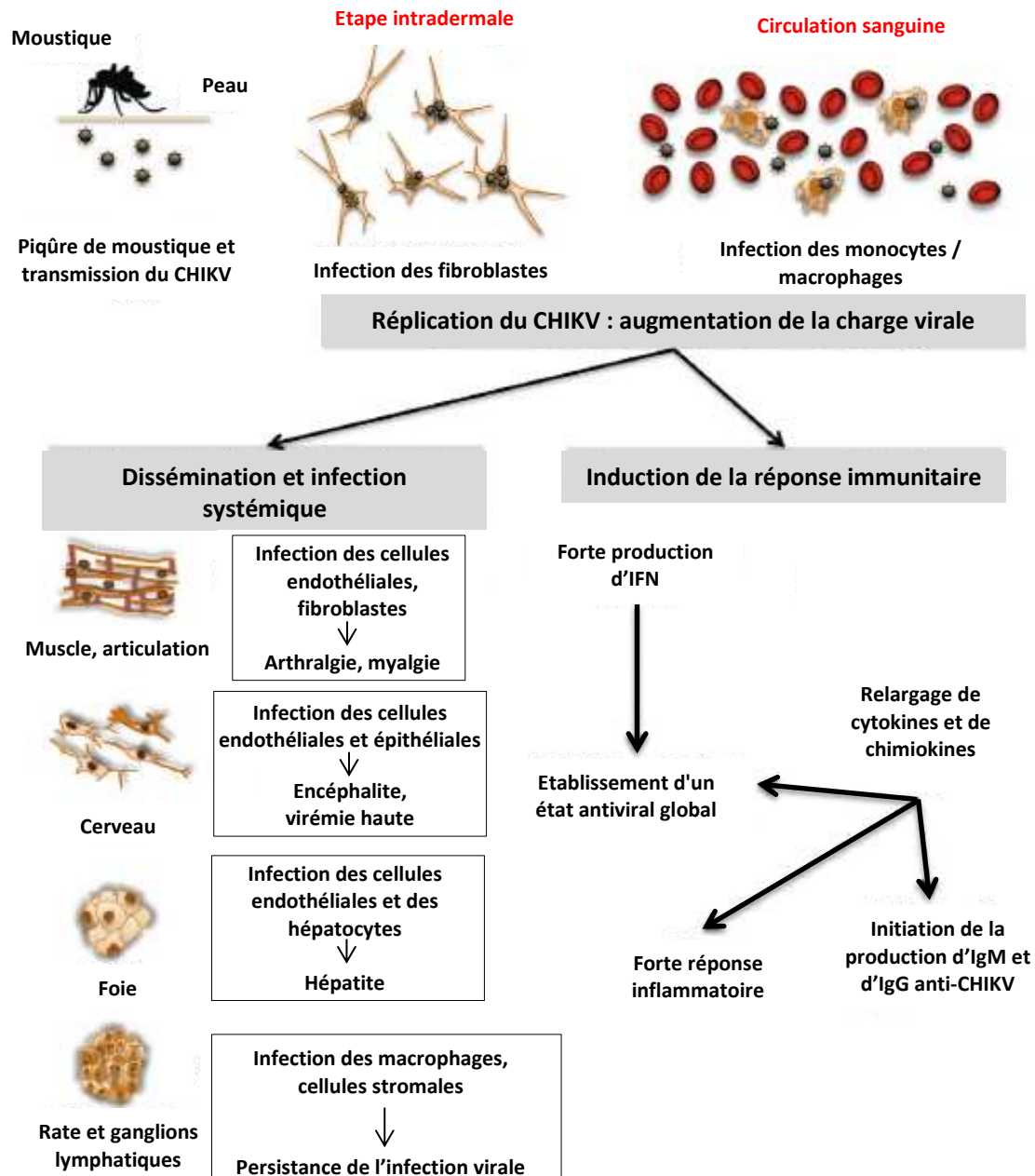


Figure 15 : Pathogénicité de l'infection au virus du chikungunya. D'après Rougeron *et al.* 2015.

1.5.2. Organes cibles et pathologies associées

Le virus se dissémine dans l'organisme et va infecter les tissus périphériques, principalement les muscles, les articulations, les cellules endothéliales du foie et du cerveau, ainsi que les macrophages et les cellules de la rate et des ganglions lymphatiques où il va être

répliqué et libéré dans la circulation sanguine (Ong, Lum *et al.* 2014, Rougeron, Sam *et al.* 2015) (**Figure 15**). L'infection des ganglions lymphatiques peut être caractérisée par une adénopathie (inflammation des ganglions lymphatiques), qui peut se traduire par des quintes de toux et des douleurs à la poitrine.

Comme nous l'avons vu précédemment, les premières cellules infectées par le CHIKV sont les cellules du derme et de l'épiderme, à savoir les fibroblastes et les cellules de Langerhans (**Figure 15**). Le virus y débute sa réplication, ce qui peut induire des éruptions cutanées et des démangeaisons de la peau sur la zone concernée. Cette réplication reste locale et limitée dans le temps, mais le virus est véhiculé vers les autres organes *via* la circulation sanguine des micro-capillaires du derme (Dupuis-Maguiraga, Brun *et al.* 2011) (**Figure 16**), déclenchant les premières défenses du système immunitaire inné.

L'infection des cellules du foie peut entraîner une hépatite (**Figure 15**) avec une apoptose des hépatocytes, une infection des cellules de Kupffer (macrophages propres au foie) et des cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins irrigant le foie (Garnier, Blanchet *et al.* 2006, Schwartz and Albert 2010).

Lorsque les muscles et les articulations sont atteints, apparaissent des myalgies (douleurs musculaires) et de l'arthralgie (douleurs articulaires) (**Figure 15**). En effet, c'est l'infiltration de cellules infectées par le CHIKV et la réplication virale dans les muscles et articulations qui est associée à ces pathologies douloureuses. Jusqu'à 15% des patients présentent des douleurs arthralgiques qui peuvent subsister plusieurs mois après l'infection, indiquant une chronicité de la maladie. Cette chronicité serait due à la persistance de l'infection dans les cellules du cartilage au niveau des articulations, des cellules musculaires et des macrophages de la rate (Messaoudi, Vomaske *et al.* 2013), stimulant l'inflammation. Cette chronicité est également imputable aux lésions causées au cartilage lors de la réaction inflammatoire.

Lorsque les cellules nerveuses sont atteintes, dans de rares cas, des syndromes de Guillain-Barré peuvent être observés (Agarwal, Vibha *et al.* 2017). Il s'agit d'une inflammation du système nerveux périphérique, débutant par une faiblesse et des picotements dans les extrémités comme les jambes, pouvant s'étendre aux bras et au visage. Dans certains cas, cette pathologie peut évoluer vers une paralysie des membres inférieurs, avec une atteinte des muscles thoraciques rendant la respiration et la déglutition difficiles (source OMS : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/guillain-barre-syndrome/fr/>).

Enfin, les cellules épithéliales et endothéliales du cerveau peuvent être infectées (**Figure 15, Figure 16**) *via* le liquide cébrospinal, pouvant aboutir à de rares cas de méningo-encéphalites, particulièrement graves chez les enfants (Chandak, Kashyap *et al.* 2009, Laurichesse, Do *et al.* 2009, Dupuis-Maguiraga, Brun *et al.* 2011).

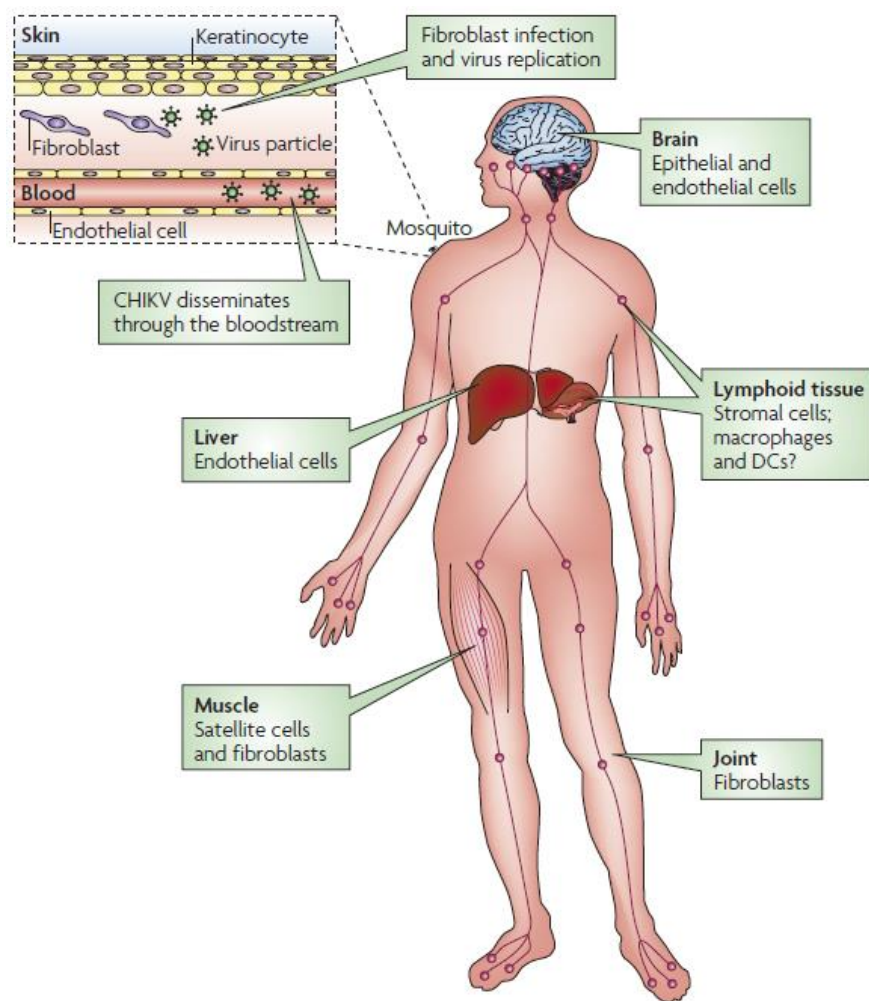


Figure 16 : Dissémination du CHIKV dans l'organisme, avec cellules et organes cibles.
D'après O. Schwartz *et al.* 2010.

1.5.3. Evolution de l'infection au virus et symptômes associés

1.5.3.1. Phase aigüe

Lors d'une piqûre de moustique infecté par le CHIKV, le virus est injecté dans les capillaires sanguins et va infecter, *via* la circulation sanguine, les cellules susceptibles (cf. **chapitre 1.5.1**). Après une phase d'incubation du virus de 3 jours en moyenne, pouvant atteindre 14 jours, les symptômes apparaissent brutalement. Une fièvre pouvant dépasser les 39°C indique le début de la phase aigüe de la maladie, qui peut durer jusqu'à 2 semaines (Das, Jaffar-Bandjee *et al.* 2010). La charge virale va augmenter fortement durant cette période, jusqu'à atteindre $10^8 - 10^9$ copies d'ARN.mL⁻¹ de sang lors du pic de virémie (Laurent, Le Roux *et al.* 2007, Jaffar-Bandjee, Das *et al.* 2009), qui se situe environ 4 à 5 jours après l'apparition des premiers symptômes (**Figure 17**).

Entre 3% et 28% des personnes infectées restent asymptomatiques (Brouard, Bernillon *et al.* 2008, Rathore, Runyon *et al.* 2017), contre approximativement 85% pour la dengue. Quand la maladie est symptomatique, la phase aigüe se caractérise par une forte fièvre accompagnée de frissons, d'éruptions et de démangeaisons cutanées, de myalgie (douleurs musculaires) et d'une asthénie (forte fatigue) (Pialoux, Gauzere *et al.* 2007, Khoury and Camilo 2015). De plus, dans 80% à 90% des cas, le patient est atteint d'arthralgies sévères (douleurs articulaires) durant cette phase, souvent très handicapantes et empêchant toute activité physique. Elles touchent principalement les articulations des mains, des poignets, des épaules et des genoux (Sam and AbuBakar 2006).

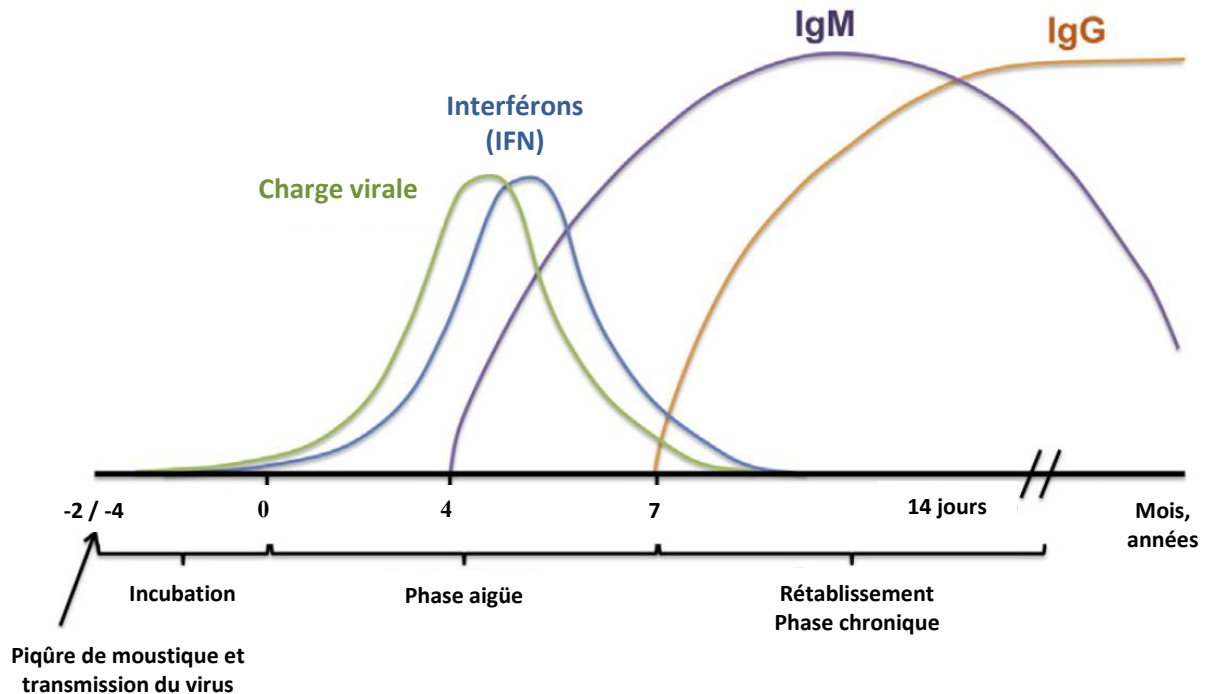


Figure 17 : Illustration de l'évolution à l'infection au CHIKV au cours du temps et les différentes phases de la maladie. IgM : Immunoglobulines de type M ; IgG : Immunoglobulines de type G. D'après Rougeron *et al.* 2015.

Les IgM anti-CHIKV sont les indicateurs d'une primo-infection récente au virus. Elles sont les premières à être produites par l'organisme infecté, approximativement lorsque le pic de virémie est atteint. Ces anticorps sont produits par l'organisme jusqu'à 14 jours DPS, et leur concentration sanguine persiste plusieurs mois, voire plusieurs années après la maladie. Ils ont un rôle agglutinant et neutralisant du pathogène. Les IgM permettent également l'activation du système du complément, un des systèmes de défense de l'organisme contre les infections et faisant partie de l'immunité innée.

1.5.3.2. Phase chronique

Environ 7 jours DPS, des immunoglobulines de type G (IgG) vont être produites par l'organisme. Ces anticorps sont sécrétés par les plasmocytes et sont circulants. Ils restent présents chez le patient plusieurs années après l'infection, et vont jouer un rôle dans la mémoire immunitaire.

Les récepteurs du domaine Fc des IgG servent d'interface entre l'immunité humorale spécifique et le virus, afin d'aider à son élimination rapide dans le cas d'une nouvelle infection (Wallace, Howell *et al.* 1994). Ce fragment Fc va permettre la fixation des IgG sur l'agent pathogène (opsonisation), ce qui aura comme conséquence d'induire la phagocytose du germe, l'agglutination, l'activation du complément et la médiation cellulaire de la cytotoxicité dépendante de l'anticorps (ADCC) (Urbaniak and Greiss 1980). Les IgG jouent donc un rôle dans la mémoire immunitaire, empêchant le patient de retomber malade car la réaction immunitaire secondaire sera plus rapide et efficace contre le virus. En effet, durant une réinfection pour le virus, la réponse immunitaire humorale par les IgG sera plus rapide et plus efficace.

Dans la majorité des cas, le malade guérit sans séquelles entre 7 et 14 jours. Cependant, approximativement 15% des patients ayant contracté le CHIKV développent des formes chroniques de la maladie, notamment de l'arthrite rhumatoïde chronique, qui peut durer jusqu'à plusieurs mois, voire des années après la phase aiguë. Les personnes les plus touchées par ces complications sont les adultes de plus de 40 ans (Schilte, Staikowsky *et al.* 2013). Ces formes sont souvent associées à une forte charge virale lors de la phase virémique (Das, Jaffar-Bandjee *et al.* 2010). Il a été également démontré qu'une arthralgie persistante suite à l'infection au CHIKV pouvait être associée à un taux élevé d'interleukines de type 6 (Chow, Her *et al.* 2011). Des cas d'arthralgies chroniques ont été observés jusqu'à 18 mois après l'infection, avec des articulations douloureuses et des insomnies, pouvant conduire le patient à un état dépressif et/ou de grande anxiété (Couturier, F *et al.* 2012).

1.5.3.3. Traitement et prévention de la maladie

Selon l'Institut Pasteur et l'INSERM (Institut National de la santé et de la recherche médicale), la prise en charge médicale du chikungunya est purement symptomatique et repose sur des traitements anti-douleurs (paracétamol) et anti-inflammatoires, pour atténuer les

douleurs articulaires. La prise d'anti-inflammatoires est cependant contre-indiquée dans les zones géographiques où il y a cocirculation de différents arbovirus, du fait du risque d'hémorragie dans le cas d'une infection par le virus de la dengue.

Ces traitements n'ont cependant aucun effet préventif sur la survenue d'une évolution chronique de la maladie. Afin de favoriser la récupération fonctionnelle de l'organisme suite à l'infection, des séances de rééducation avec un kinésithérapeute peuvent être nécessaires afin d'améliorer la fonction des différentes articulations atteintes. Il n'existe actuellement ni vaccin, ni traitement préventif, ni traitement curatif de la maladie (sources : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/chikungunya> ; <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/chikungunya-maladie-homme-courbe>).

1.5.3.4. Disability-Adjusted Life Years (DALY)

Bien que le taux de mortalité dû au chikungunya soit relativement faible (taux de mortalité de 1/1000 lors de l'épidémie de l'île de La Réunion en 2005, avec 254 décès) (Mavalankar, Shastri *et al.* 2008, Das, Jaffar-Bandjee *et al.* 2010), la maladie a un impact important sur la vie en bonne santé des personnes infectées, avec un lourd impact socio-économique pour les régions touchées (impossibilité de travailler pour les personnes infectées, due aux symptômes handicapants de la maladie). Des outils comme le *DALY* ont été mis en place pour évaluer cet impact, et sont détaillés dans les paragraphes suivants.

1.5.3.4.1. Définition

Le *DALY*, ou Années de Vie Corrigées de l'Incapacité (AVCI) (**Tableau 1, Figure 18**), est une mesure qui a été élaborée afin de répondre aux besoins de données pour la prise de décision dans le domaine de la santé, à l'échelle internationale (source : Institut National de la Santé Publique du Québec). Ce concept est né de la collaboration entre l'Université de Harvard, de la Banque Mondiale et de l'OMS, dans le cadre du Projet Mondial sur le « Fardeau Global des Maladies » (FGM) (Murray and Lopez 1996). Appliqué à une maladie particulière, le *DALY* permet d'exprimer le FGM de cette maladie sur la population humaine, et d'en évaluer la charge de morbidité et de mortalité associées (Krishnamoorthy, Harichandrakumar *et al.* 2009). Le FGM permet « d'estimer et de hiérarchiser les répercussions des maladies sur la santé des populations » (Granados *et al.* 2005). Il correspond au nombre cumulé d'années de vie en bonne

santé perdues par un individu, en raison de maladies, de handicap ou de mort précoce (**Figure 18**). Il est établi que 1 *DALY* correspond à 1 année de vie en bonne santé perdue. Son mode de calcul est illustré dans la **Figure 18**.

Tableau 1 : Formules de calcul des années de vie corrigées de l'incapacité (DALY). D'après l'OMS, 2004.

Composante	Définition	Formule	Détails
<i>DALY</i>	<i>Disability-Adjusted Life Years</i>	<i>DALY</i> = <i>YLD</i> + <i>YLL</i>	Voir ci-dessous
<i>YLD</i>	<i>Years Lived with Disability*</i>	<i>YLD</i> = $P \times DW$	P = prévalence de la maladie DW = poids de l'invalidité
<i>YLL</i>	<i>Years of Life Lost*</i>	<i>YLL</i> = $N \times L$	N = nombre de décès dus à la maladie L = espérance de vie normale à l'âge du décès

**YLD* : « *Years Lived with Disability* », à savoir les années vécues avec un état de handicap.

YLL* : « *Years of Life Lost* », représentant le nombre d'années de vie perdues due à une mort précoce (Figure 18**) (Murray and Acharya 1997).

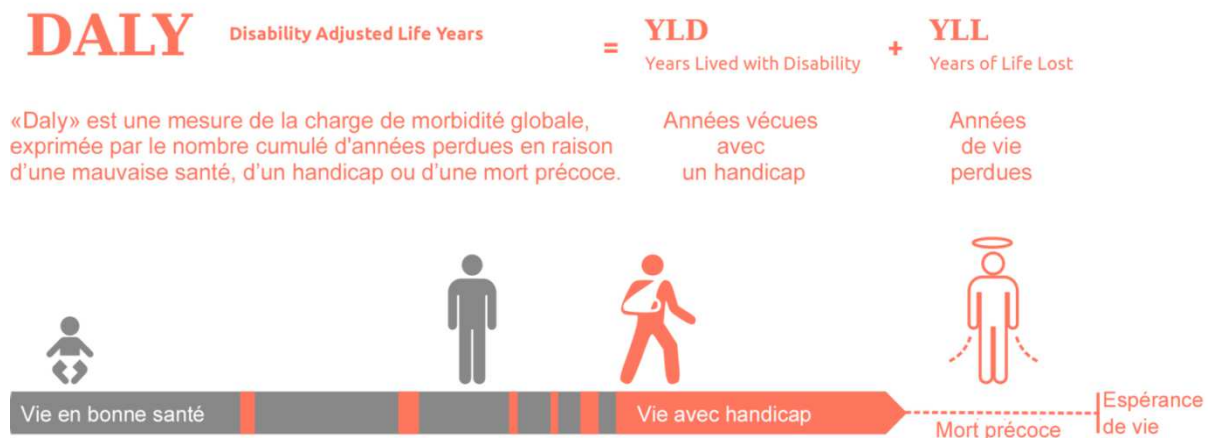


Figure 18 : Illustration schématique du DALY.
D'après Lamiot — Travail personnel, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=21442957>

Le poids de l'invalidité DW est un facteur qui reflète la gravité de la maladie sur une échelle allant de 0 (santé parfaite) à 1 (décès).

Elaboré à la base pour évaluer la charge de morbidité de manière cohérente à l'échelle mondiale, quelles que soient les maladies, les facteurs de risque et les régions considérées (source : OMS), le DALY peut être appliqué à une maladie ou une pathologie en particulier, et à une région délimitée du globe. Afin de montrer la charge de morbidité du chikungunya sur les populations infectées, ainsi que l'impact socio-économique qui en résulte, le DALY ainsi que les pertes économiques associées ont été évaluées pour les épidémies de 2006 en Inde, et 2013-2015 en Amérique.

1.5.3.3.2. Exemple 1 : l'épidémie en Inde de 2006

Concernant l'épidémie de chikungunya de 2006 en Inde, l'évaluation du DALY porte sur les cas de chikungunya aigus et chroniques, à partir des données de cas signalés et présumés de fièvre du chikungunya, dans différents états indiens. Pour les maladies aiguës, la durée moyenne de la maladie était de neuf jours et pour les cas chroniques, elle était de six mois en moyenne. Pour calculer le DALY de cette épidémie, le DW du chikungunya n'a pas pu être utilisé car il n'a pas été évalué avec certitude. Pour le remplacer, le DW de l'arthrite rhumatoïde a été utilisé. Il correspond à un des symptômes les plus handicapants de la maladie (Krishnamoorthy, Harichandrakumar *et al.* 2009).

Il a été estimé une perte de 25 588 *DALY* au cours de l'épidémie, avec une charge générale de 45,26 *DALY* par millions d'habitants. Les valeurs estimées vont de 0,01 *DALY* à 265,565 *DALY* par millions d'habitants selon les états. Le Karnataka, un état dans le Sud du pays, représente 55% du fardeau à lui seul. L'arthralgie chronique représente 69% du *DALY* de l'épidémie, ce qui en fait le symptôme le plus handicapant de la maladie.

L'épidémie a globalement eu un fort impact sur l'activité économique de l'Inde. De nombreuses personnes atteintes de la maladie ne pouvaient plus travailler à cause des symptômes, notamment l'arthralgie. Il en a résulté une perte de revenus pour le pays, corrélée à une perte de productivité, de 391 millions de Roupies Indiennes, correspondant à environ 5 millions d'Euros au taux de change actuel (Krishnamoorthy, Harichandrakumar *et al.* 2009).

1.5.3.3. Exemple 2 : l'épidémie dans la région des Amériques

Le *DALY* a également été calculé pour l'épidémie de chikungunya qui a eu lieu dans les Amériques entre 2013 et 2015 (cf. **chapitre 1.1.2**). Il a été calculé un *DALY* moyen de 0,60 par individu infecté. Au niveau sociétal, le *DALY* calculé est de 2 432 pour 100 000 habitants, mais avec de grandes disparités selon les régions considérées. En effet, il est de 24 882 pour 100 000 habitants des Caraïbes contre 11 440 pour 100 00 habitants en Amérique Centrale, et de 41 pour 100 000 habitants d'Amérique du Nord. La région la plus impactée est celle des Caraïbes, qui comptabilise 46,4% des *DALY* totaux calculés de la région (Yaseen, Simon *et al.* 2012).

Tout comme en Inde, cette épidémie a eu un impact important sur l'économie. Les pertes totales sur la région des Caraïbes ont été estimées à \$90,7 milliards (soit 78 milliards d'€ au taux de change actuel), à \$33,8 milliards en Amérique Centrale (27 milliards d'€) et à \$2,4 milliards en Amérique du Nord (2 milliards d'€). Les pays les plus touchés étaient la Colombie (\$45 milliards soit 36 milliards d'€), la République Dominicaine (\$43,9 milliards soit 35 milliards d'€) et le Salvador (\$15,2 milliards soit 12 milliards d'€). Là encore, les Caraïbes représentent la région la plus touchée, représentant 49% de l'ensemble des coûts, contre seulement 1,3% pour l'Amérique du Nord.

Concernant le coût par habitant, il a été estimé à \$737 par habitant en Amérique Centrale (soit 600€), contre \$2 042 pour les habitants des Caraïbes (soit 1 645€) et \$5 pour les habitants

d'Amérique du Nord (soit 4€) (Krishnamoorthy, Harichandrakumar *et al.* 2009, Yaseen, Simon *et al.* 2012).

2. Le diagnostic du CHIKV

En plus de la gestion efficace des patients, un diagnostic précis d'une infection par un arbovirus est utile dans de nombreux domaines. Les données de diagnostic permettent un meilleur contrôle des foyers d'infection ainsi que des épidémies, par la mise en place de mesures de lutte anti-vectorielle et/ou l'isolement des patients. Les résultats de diagnostic fournissent également des données épidémiologiques en santé publique pour la surveillance du virus. De plus, ils permettent d'évaluer l'efficacité de la vaccination lorsque celle-ci est disponible. Le choix des tests de diagnostic à effectuer se base sur différents critères tels que le DPS, la cinétique de la virémie et la charge en anticorps, ainsi que des capacités du laboratoire en charge de l'analyse.

Dans le cas des virus du chikungunya, de la dengue et Zika, la symptomatologie des maladies associées à ces virus est très proche en début d'infection. C'est pourquoi il est important de diagnostiquer correctement chacun d'eux afin d'optimiser la prise en charge du patient, pendant la maladie et lors de sa convalescence. Par exemple, le diagnostic d'un Zika chez les femmes enceintes dans les zones où le virus est endémique ou épidémique entraîne un suivi de l'évolution du fœtus, ainsi que des précautions pour ne pas risquer une transmission sexuelle du virus entre individus. Dans le cas de la dengue, le suivi du statut sérologique chez les enfants atteints du virus assure une vigilance de l'évolution des symptômes dans les cas d'une infection secondaire.

Dans certaines régions tropicales et subtropicales du globe, les virus du chikungunya, de la dengue et Zika co-circulent avec d'autres germes autres que des arbovirus, tels que le typhus, la malaria ou la leptospirose, et qui présentent une symptomatologie similaire à celle des arboviroses (Ganoza, Matthias *et al.* 2010, Fang, Blanton *et al.* 2017, Amir, Cheong *et al.* 2018). Certains traitements contre ces maladies, comme les antipaludéens contre la malaria ou les antibiotiques contre le typhus, ne sont pas adaptés au traitement des arboviroses, pouvant causer une apparition de symptômes plus graves et entraîner des résistances aux drogues sur le long terme.

2.1. Les méthodes standardisées

Schématiquement, il existe deux grandes stratégies de diagnostic du CHIKV, recommandées par l'OMS (World Health Organization 2009) : la détection du virus (génome viral, protéines virales, virus isolé) et l'identification de la réponse immunitaire spécifique du virus par des tests sérologiques. Chaque stratégie n'étant effectuée que dans un intervalle de temps bien précis durant l'infection (**Figure 19**), il est important de connaître la date de début des symptômes chez le patient infecté (Gaibani, Landini *et al.* 2016). Cependant, comme elle n'est pas toujours facile à identifier précisément, plusieurs tests peuvent être combinés afin d'augmenter la confiance dans les résultats obtenus (Mardekian and Roberts 2015). Lorsque la date d'apparition des symptômes est connue (après une phase d'incubation du virus dans l'organisme allant de 3 à 14 jours), le choix de la méthode diagnostique utilisée se base sur les critères tels que présentés sur la **Figure 19**, à savoir : i) une RT-PCR jusqu'à 4 jours DPS ; ii) une RT-PCR et une sérologie IgM et IgG entre J5 et J7 DPS ; iii) une sérologie à partir de 8 jours DPS.

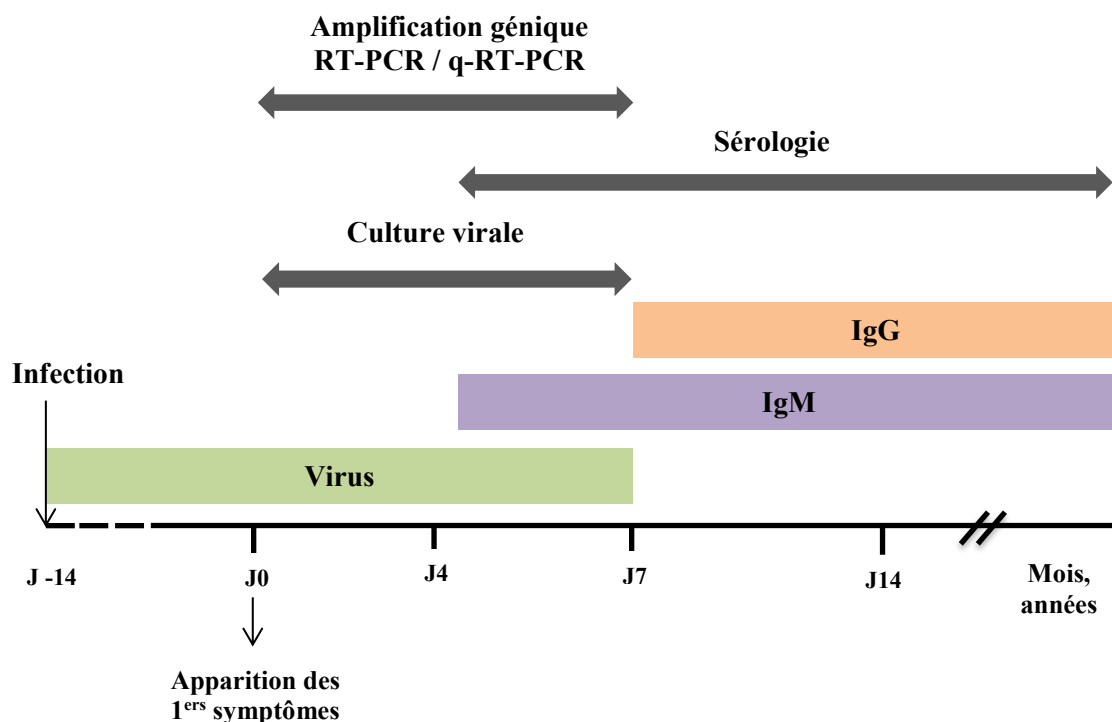


Figure 19 : Evolution des marqueurs de l'infection au CHIKV et les méthodes de diagnostic associées.

L'OMS recommande d'effectuer une seconde sérologie de confirmation entre 10 et 15 jours après le premier prélèvement (World Health Organization 2009). De plus, selon la provenance géographique de la personne infectée, le diagnostic différentiel des arbovirus que l'on sait co-circulants avec le CHIKV et présentant les mêmes symptômes, sera effectué sur le patient. Moulin *et al.* ont établi en 2016 un algorithme de diagnostic séquentiel applicable aux voyageurs malades et de retour d'une région épidémique pour CHIKV, DENV ou ZIKA (Moulin, Selby *et al.* 2016) (**Figure 20**). Tsai *et al.* l'ont complété en 2017 pour la dengue et Zika en raison des réactions croisées connues entre ces deux virus (Tsai, Youn *et al.* 2017).

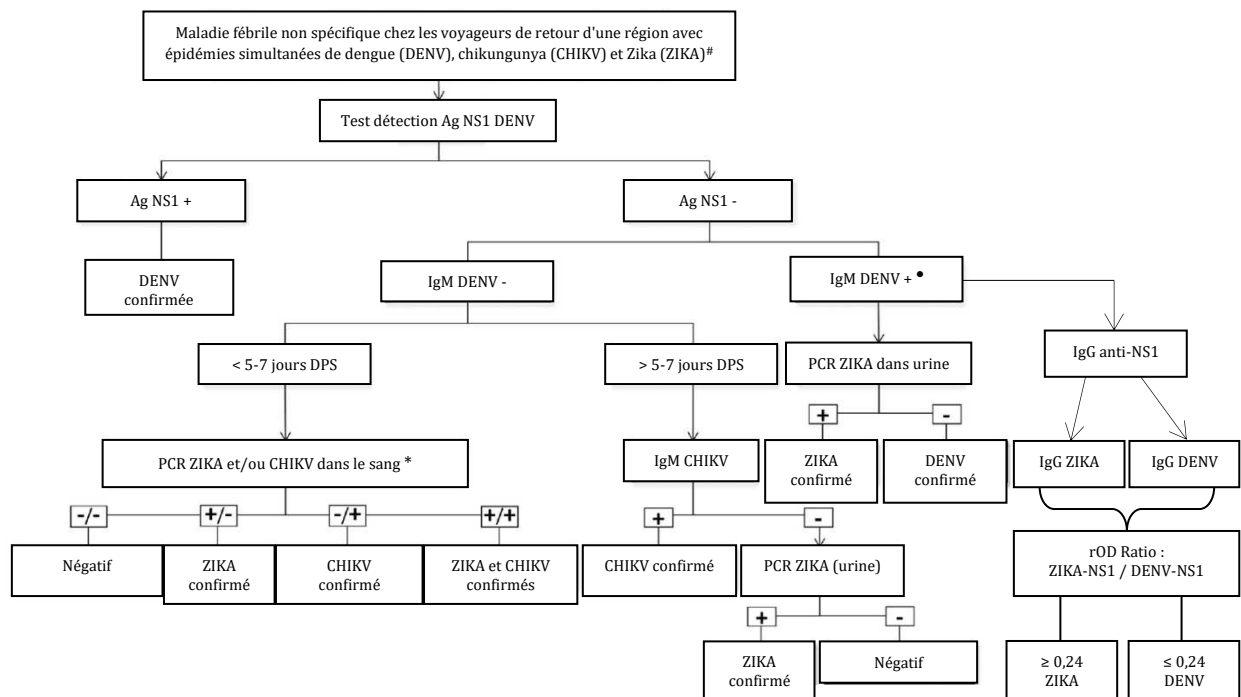


Figure 20 : Algorithme de diagnostic séquentiel pour les voyageurs malades et de retour d'une région épidémique pour CHIKV, DENV ou ZIKA. D'après Moulin, Selby *et al.* 2016, Tsai, Youn *et al.* 2017.

DPS : délai post début des symptômes.

: avoir exclu la malaria avec un test rapide avant de procéder au diagnostic.

● : réactions croisées entre flavivirus ZIKA et DENV.

* : les tests séquentiels sont une alternative en l'absence de signes cliniques inquiétants.

Cependant, dans la pratique, en raison de la situation épidémiologique de chaque virus, de la provenance géographique de la personne au moment de l'infection et des capacités du laboratoire en charge du diagnostic, l'ensemble de l'algorithme est peu respecté. Ainsi, en France, le CRN arbovirus de Marseille (Centre Nationale de Référence des Arbovirus, de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées) a établi une liste de virus à diagnostiquer, à la fois en PCR et en sérologie, en fonction de la provenance géographique du patient (cf. **Tableau 2**).

Tableau 2 : Virus à tester en PCR et sérologie selon la provenance géographique du patient. CHIK : virus du chikungunya ; DEN : virus de la dengue ; EJ : virus de l'encéphalite japonaise ; TBE : virus de l'encéphalite à tique ; RRV : virus Ross River ; RVF : virus de la fièvre de la vallée du Rift ; TOS : virus Toscana ; WN : virus West Nile ; ZIKA ou ZIK : virus Zika ; ESL : virus de l'encéphalite de Saint-Louis. Les numéros correspondent aux départements français. Source : IRBA avec accord.

PCR					Le 01 05 18	SEROLOGIE								
VIRUS A TESTER					ZONE GEOGRAPHIQUE					ANTIGENES A TESTER				
(DEN)	WN	(CHIK)	TOS	(ZIK)	SUD France Surveillance: (02-04-05-06-07-09-11-12-13-19-24-26-30-31-32-33-40-46-47-48-64-65-66-30-34-38-73-81-82-83-84)					DEN	WN	ZIK	TOS	CHIK
(DEN)	WN	(CHIK)	TBE	(ZIK)	NORD France Surveillance: (01-36-49-67-68-69-71-85-92-94)					DEN	WN	ZIK	TBE	CHIK
DEN	WN	CHIK	RVF	ZIK *FJ	MAGREB - MOYEN ORIENT - AFRIQUE					DEN	WN *FJ	ZIK	RVF	CHIK
DEN	WN	CHIK	*ZIK		USA					DEN	WN	ZIK	ESL	CHIK
DEN	ZIKA	CHIK	MAY		GUYANE - AMERIQUE CENTRALE - AMERIQUE DU SUD					DEN	WN	ZIK	MAY	CHIK
DEN	ZIKA	CHIK			PACIFIQUE SUD					DEN	WN	ZIK	RRV	CHIK
DEN	ZIKA	CHIK	EJ		ASIE					DEN	WN	ZIK	EJ	CHIK
DEN	ZIKA	CHIK	*WN		CARAIBES - ANTILLES					DEN	WN	ZIK	ESL	CHIK

Pendant la période de surveillance (1er mai- 30 novembre):

Les PCR Chik-Den-Zik sont faites également sur les patients n'ayant pas voyagé et résidents dans les départements où A. albopictus est actif

Les chapitres suivants vont présenter les différentes méthodes qui ont été développées pour le diagnostic du CHIKV. Elles seront présentées en fonction du moment de l'infection où leur utilisation est recommandée : la détection du virus dans un premier temps (génom viral, antigènes, virus entier), et la détection des anticorps spécifiques du virus développés par l'organisme suite à l'infection, dans un second temps.

2.1.1. Détection du virus du chikungunya sur prélèvements

Après une phase d'incubation du virus dans l'organisme infecté d'une durée de 2 à 4 jours, l'apparition des premiers symptômes est corrélée à l'augmentation de la virémie. Le virus peut dès lors être détecté par amplification du génome viral (ARNv) et détection des antigènes viraux (protéines structurales), comme décrit dans les paragraphes suivants.

2.1.1.1. Détection du génome viral

La détection de l'ARNv par RT-PCR est la méthode de diagnostic du CHIKV réalisée en première intention lors de la phase virémique de la maladie, et se fait sur un prélèvement de sang total du patient. En effet, elle n'est possible que lorsque que le virus est encore présent dans l'organisme du patient infecté, soit généralement jusqu'à 7 jours DPS (**Figure 17, Figure 19**). Le génome du CHIKV étant un ARN simple brin, il est nécessaire de rétrotranscrire ce génome en ADN afin de l'amplifier ensuite, via une PCR ou une qPCR (amplification génomique en temps réel). Cette méthode de diagnostic possède à la fois une grande sensibilité et une grande spécificité de détection. Le résultat est obtenu en environ 1 à 2 heures selon la technique de PCR utilisée. Phui San Ho *et al.* ont développé et évalué la sensibilité et spécificité d'une technologie de RT-PCR en temps réel (marquage au SYBR Green), en utilisant une sonde nucléotidique désignée pour l'amplification du gène codant la protéine nsP2 du CHIKV. La limite de détection calculée était de 1 PFU.mL⁻¹ (*Plaque Forming Units*, ou nombre de particules virales infectieuses par millilitre d'échantillon) (Ho, Ng *et al.* 2010). D'autres études ont montré qu'il était possible de détecter le génome viral par RT-PCR en utilisant des sondes dirigées contre les régions du génome codant pour les protéines d'enveloppe E1, E2 et E3, mais également contre nsP1 (Pastorino, Bessaud *et al.* 2005, Carletti, Bordi *et al.* 2007, Esposito and Fonseca 2017). Cependant, ces techniques nécessitent du matériel, une infrastructure importante et sont coûteuses (Deepak, Kottapalli *et al.* 2007, Al-Siyabi, Binkhamis *et al.* 2013, Dullaert-de Boer, Akkerman *et al.* 2018).

Il est également possible de détecter l'ARNv dans des prélèvements récoltés de façon non-invasive. Musso *et al.* ont démontré en 2016 qu'il était possible de détecter le CHIKV dans un prélèvement d'urine et de salive (Musso, Teissier *et al.* 2016). Cependant, ils affirment qu'une analyse à partir d'un prélèvement salivaire ne peut pas remplacer une analyse faite sur un prélèvement de sang total. La salive ne peut être utilisée que durant la première semaine DPS si la collecte de sang est impossible, avec une sensibilité moindre que la PCR. Quant à

l'urine, son analyse ne permet pas d'élargir la fenêtre de détection du génome viral du CHIKV (Musso, Teissier *et al.* 2016). La salive et l'urine sont des alternatives intéressantes pour des analyses, mais le sang reste l'échantillon biologique de référence pour le diagnostic du CHIKV.

2.1.1.2. Détection des antigènes viraux

Les techniques de diagnostic immunologiques employées pour la détection du virus reposent sur la capture de l'antigène d'intérêt par des anticorps dirigés spécifiquement contre cet antigène. La révélation de cette capture est possible *via* l'utilisation d'une enzyme couplée à un anticorps qui, en dégradant son substrat, va produire un produit coloré, indiquant un résultat positif. La grande majorité des tests décrits dans la littérature permettent de détecter les protéines d'enveloppe du virus, et plus particulièrement la protéine E2, dans un format ELISA sandwich (Kumar, Khan *et al.* 2012, Okabayashi, Sasaki *et al.* 2015). La détection de ces protéines structurales présente une sensibilité plus faible que la détection du génome viral par q-RT-PCR. En effet, Kumar *et al.* ont évalué en 2012 que leur solution de diagnostic de la protéine E2 de CHIKV avait une sensibilité de 89% et une spécificité de 100%. De plus, il n'a pas été mis en évidence de réaction croisée avec d'autres arbovirus tels que le virus O'Nyong-Nyong, le virus de la fièvre jaune ou le virus Ross River (Kumar, Khan *et al.* 2012).

Il existe peu d'études sur la détection de la protéine de capside pour diagnostiquer une infection récente au CHIKV (Goh, Hobson-Peters *et al.* 2015, Damle, Jayaram *et al.* 2016). La capside est « protégée » par l'enveloppe virale, la rendant moins accessible aux anticorps que les protéines d'enveloppe, présentes à la surface du virus.

2.1.2. Isolement du virus sur cellules en culture

Le CHIKV ayant besoin de la machinerie cellulaire hôte pour sa propre réplication, la production du virus sur cellules en cultures *in vitro* a été une des premières techniques employées pour l'étude du virus. Elle peut également être utilisée en diagnostic. Cette technique permet d'obtenir du virus en grande quantité, facilitant ainsi sa détection ainsi que sa caractérisation. La production du virus sur cellules peut également être utilisée entre le jour de l'apparition des premiers symptômes et jusqu'à 7 jours DPS, correspondant à la présence du virus dans l'organisme du patient infecté (**Figure 19**).

Différents types de lignées cellulaires sont utilisés, notamment pour le diagnostic du CHIKV. Les cellules *Vero* (cellules de rein de singe vert africain, adhérentes et permissives au CHIKV) permettent d'isoler le virus à partir d'échantillons biologiques, et de produire le virus. Les cellules C6/36 sont également utilisées. Ce sont des cellules de larves d'*Ae. albopictus*, semi-adhérentes et permissives au CHIKV. Tout comme les cellules *Vero*, elles sont utilisées pour la mise en culture des souches virales et pour l'isolement du virus à partir d'échantillons biologiques (source : communication personnelle CNR IRBA). Ces méthodes présentent l'avantage d'isoler le virus du prélèvement biologique, et d'établir son caractère infectieux. De plus, elles permettent de produire du virus qui pourra être conservé et utilisé dans d'autres méthodes diagnostic (Hsiung 1989, Leland and Ginocchio 2007), voire des recherches pour le développement de vaccins.

Le diagnostic d'une infection virale sur culture cellulaire se fait par visualisation d'un effet cytopathique (ECP). Cependant, étant donné que de nombreux virus provoquent des ECP, il n'est pas possible d'identifier spécifiquement le virus incriminé. Ainsi, des outils biologiques ont été développés dans ce but.

L'immunofluorescence indirecte (IIFT) est une technique sensible de détection et de titrage du virus. Cette technique est notamment utilisée pour étudier la cinétique de croissance virale ainsi que les mécanismes d'infection virale (Moi and Takasaki 2016). L'immunofluorescence repose sur l'utilisation de cellules eucaryotes (*Vero* ou C6/36) en culture et que l'on met en contact avec le virus, comme le CHIKV. Après croissance du virus, les cellules sont récupérées, centrifugées, perméabilisées, et fixées sur une lame. Un anticorps primaire non-marqué et dirigé contre le CHIKV est appliqué sur les cellules, et va se lier au virus. Un anticorps secondaire marqué par un fluorochrome, tel que le FITC (*fluorescein isothiocyanate*, une molécule dérivée de la fluorescéine et qui est fluorescente) ou de l'Alexa Fluor® (fluorochrome commercial) (Masrinoul, Puiprom *et al.* 2014), et dirigé contre l'anticorps primaire, est ensuite ajouté. La lame est lavée et la présence du virus peut alors être observée au microscope à fluorescence et/ou confocal (Wikan, Sakoonwatanyoo *et al.* 2012, Masrinoul, Puiprom *et al.* 2014). Il est également possible de détecter la fluorescence par cytométrie en flux. Dans ce cas, les cellules ne sont pas fixées sur une lame, mais sont mises en contact avec les anticorps en milieu liquide, dans des tubes. Une fois fixées par les anticorps, les cellules sont analysées en cytométrie et il est possible de dénombrer les cellules infectées (présence de fluorescence) et celles non-infectées (absence de fluorescence).

Il est possible de faire une analyse sérologique via l'immunofluorescence. Après infection de cellules en culture par les CHIKV, un sérum de patient, contenant les IgM anti-CHIKV à détecter, est déposé sur les cellules en culture traitées et perméabilisées. Les IgM spécifiques du virus vont aller le fixer, et ces anticorps sont révélés par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. La fluorescence est ensuite observée au microscope, révélant la présence d'IgM anti-CHIKV (Moi and Takasaki 2016).

Toutes ces techniques présentent toutefois certains inconvénients. Le temps d'obtention du résultat est long, entre 48h et plusieurs jours (culture des cellules, temps nécessaire à l'apparition des ECP, lecture des ECP, marquage...). Il est nécessaire d'avoir un laboratoire disposant d'un niveau de sécurité suffisant pour manipuler des agents pathogènes de classe III (les agents de cette classe sont une menace pour la santé du personnel qui les manipule, et représentent un risque tangible pour la population. Cependant, leur prophylaxie est connue et des traitements spécifiques peuvent être appliqués au patient malade). La lecture des résultats est dépendante de la subjectivité de la personne réalisant la lecture, et nécessite un personnel expérimenté. Ces méthodes sont coûteuses et de plus en plus délaissées au profit de méthodes diagnostic plus rapides et moins coûteuses.

2.1.3. Détection des anticorps anti-CHIKV sur prélèvements

A l'issue de la phase aigüe de la maladie, la détection du virus dans l'organisme devient problématique. Cependant, il est possible de détecter les anticorps synthétisés par l'organisme et dirigés contre le virus.

2.1.3.1. Sérologie IgM

La sérologie des IgM anti-CHIKV permet de diagnostiquer une infection récente. La méthode généralement utilisée est le MAC-ELISA (*Type M Immunoglobulin Antibody Capture - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Martin, Muth *et al.* 2000, Yap, Pok *et al.* 2010, Johnson, Goodman *et al.* 2016, Johnson, Russell *et al.* 2016, Dinkar, Singh *et al.* 2017) (**Figure 21**). Un anticorps dirigé contre les IgM humaines est adsorbé en fond de plaque 96 puits, et va capturer les IgM contenues dans l'échantillon biologique du patient, dont les anticorps dirigés contre le CHIKV. Un antigène viral, généralement du virus hydrolysé, est ajouté et va se fixer aux IgM spécifiques du CHIKV. Enfin, un anticorps spécifique du CHIKV conjugué à une enzyme - phosphatase alcaline (PAL) ou peroxydase (PER) - est ajouté et va se lier aux protéines virales. L'ajout d'un substrat colorimétrique va permettre, sous l'action de l'enzyme du conjugué, d'obtenir un produit coloré. La présence de ce produit de dégradation indique un résultat positif pour la détection d'IgM anti-CHIKV chez le patient testé.

Une des contraintes de cette méthode est l'utilisation de l'antigène viral sous forme de lysat (**Figure 21**). La production du virus nécessite un laboratoire sécurisé ainsi qu'une période de production et de purification de plusieurs jours. Afin d'éviter tout risque d'infection par le CHIKV, il est nécessaire d'inactiver le virus chimiquement, par exemple avec de la bêta-propiolactone (BPL). La BPL est un agent alkylant qui réagit avec les acides nucléiques et les protéines. La BPL est ainsi largement utilisée pour l'inactivation des virus (à ADN et ARN) (Morgeaux, Tordo *et al.* 1993, Bonnafous, Nicolai *et al.* 2014).

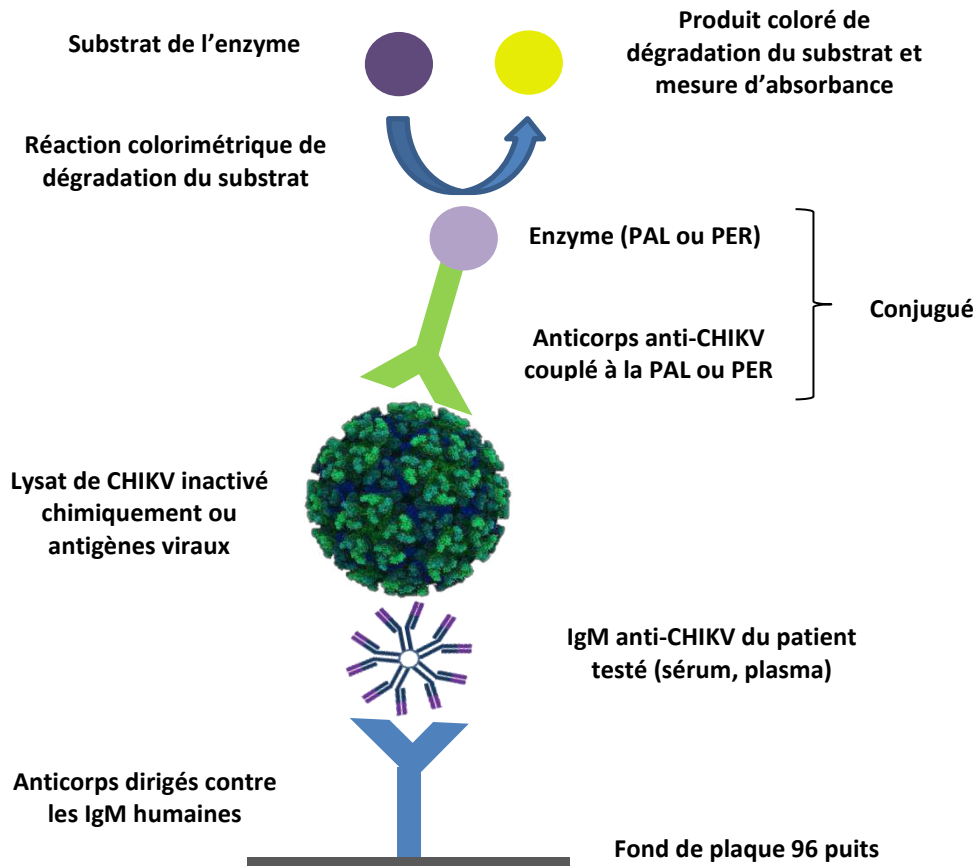


Figure 21 : Représentation schématique de la détection des IgM anti-CHIKV par la technique MAC-ELISA.

Un des désavantages de cette inactivation est qu'elle pourrait altérer les épitopes antigéniques reconnus par les anticorps de détection, diminuant ainsi la sensibilité de la méthode. Des antigènes alternatifs au lysat viral ont été développés et testés par MAC-ELISA. Généralement, ces antigènes correspondent aux protéines recombinantes E1 et E2 (Khan, Dhanwani *et al.* 2014, Tripathi, Priya *et al.* 2014), mais également à la protéine de capsid (Cho, Kim *et al.* 2008, Rianthavorn, Wuttirattanakowit *et al.* 2010, Priya, Khan *et al.* 2014). Cependant, ces protéines recombinantes étant le plus souvent produites en système procaryote (*Escherichia coli*), il n'y a pas de modifications post-traductionnelles, donc pas de glycosylation, ce qui a un impact sur la structure tridimensionnelle de la protéine, et peut diminuer la sensibilité du test.

2.1.3.2. Sérologie IgG

Les IgG anti-CHIKV ne sont pas des marqueurs d'une infection récente mais des marqueurs de la mémoire immunitaire. Leur présence permet d'affirmer que le patient a déjà été infecté par le virus. Le premier format de détection des IgG souvent utilisé est le GAC-ELISA (*Type G Immunoglobulin Antibody Capture - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Kumar, Pok *et al.* 2014). Le principe de détection est le même que celui sur MAC-ELISA (voir paragraphe précédent), à la différence que l'on utilise généralement des anticorps polyclonaux qui fixeront les antigènes viraux, afin de capturer les IgG anti-CHIKV présents dans l'échantillon biologique du patient (**Figure 22**). Alternativement, l'ELISA direct, dans lequel l'antigène est directement adsorbé sur le support, est largement utilisé (**Figure 23**) (Laras, Sukri *et al.* 2005).

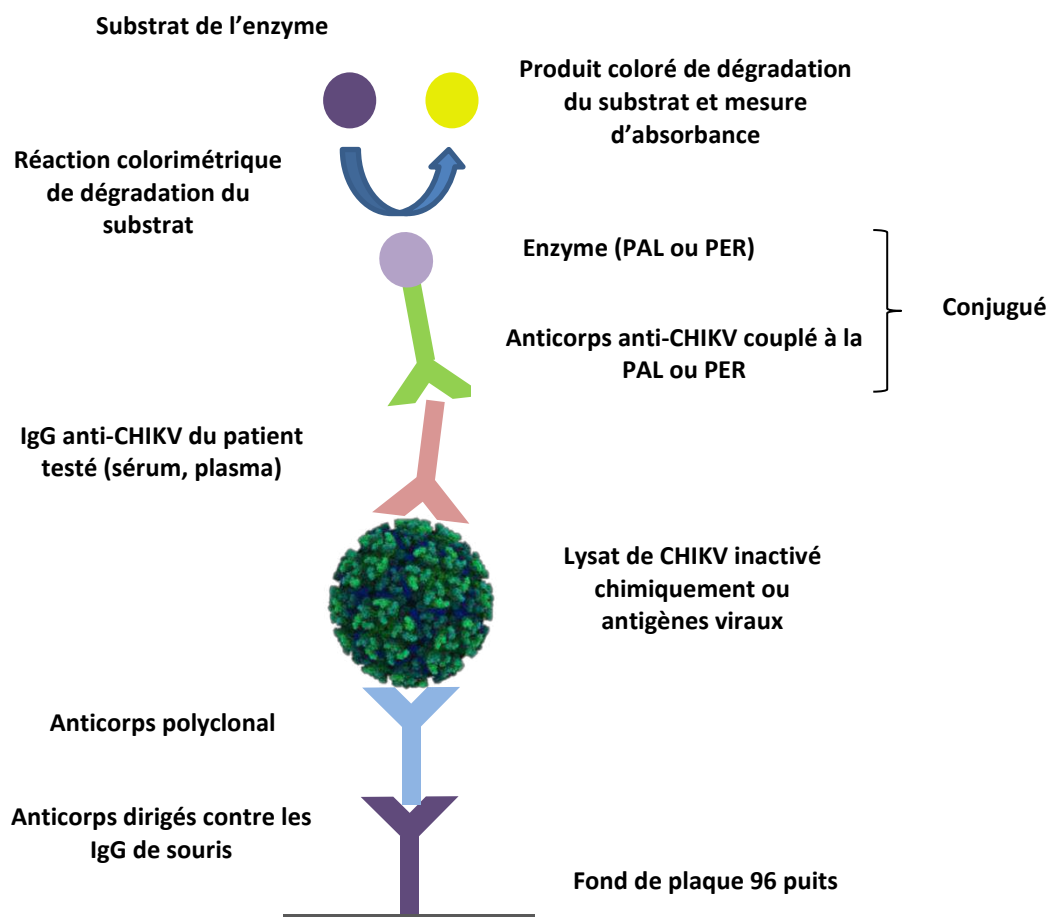


Figure 22 : Représentation schématique de la détection des IgG anti-CHIKV par la technique GAC-ELISA.

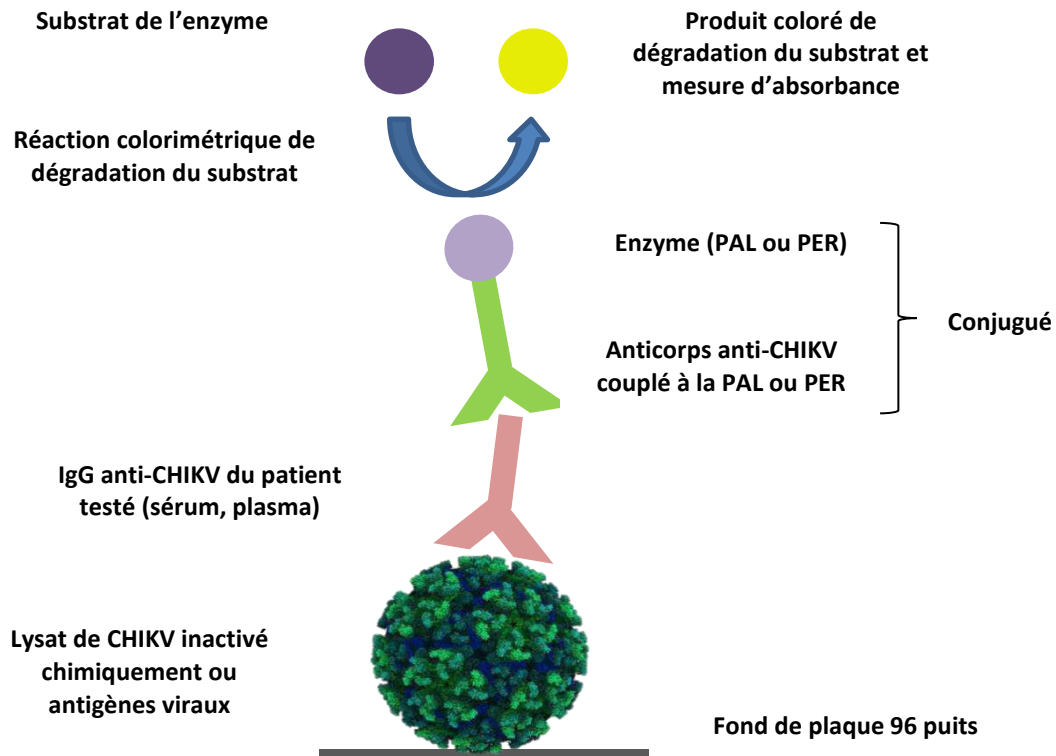


Figure 23 : ELISA direct pour la sérologie IgG anti-CHIKV.

Des tests de diagnostic sérologiques basés sur l'immunofluorescence indirecte (IIFT) (**Figure 24**) ont également été développés et commercialisés pour le diagnostic sérologique (IgM et/ou IgG) du chikungunya et d'autres arbovirus (Litzba, Schuffenecker *et al.* 2008, Litzba, Klade *et al.* 2010, Johnson, Goodman *et al.* 2016). Un antigène du CHIKV est déposé à la surface d'une plaque. L'échantillon biologique est ajouté et les anticorps dirigés contre le CHIKV, développés par le patient, vont fixer ces antigènes. Ces anticorps sont ensuite détectés par un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps du patient, et couplé à un fluorochrome, tel que le FITC ou l'Alexa Fluor. Ce fluorochrome va émettre de la fluorescence qui sera alors visible au microscope à fluorescence et/ou confocal.

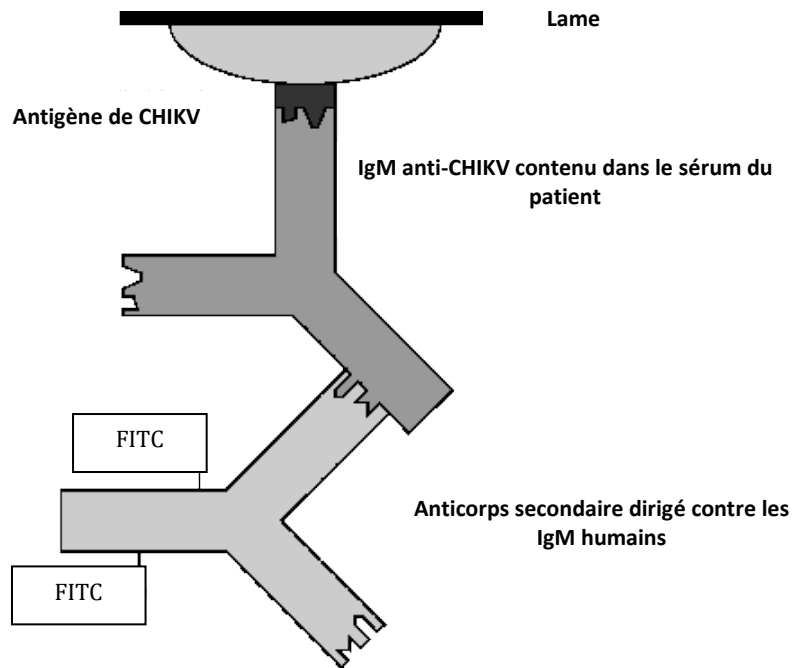


Figure 24 : Schématisation de la technique d'IIFT pour la sérologie IgG anti-CHIKV. Source : www.euroimmun.com

2.1.3.3. Séroneutralisation (PRNT)

La culture virale peut également être employée afin de détecter les anticorps neutralisants anti-CHIKV (Azami, Moi *et al.* 2016) (**Figure 25**). Différentes dilutions du sérum du patient à tester, contenant les anticorps dirigés contre le CHIKV, sont mises en mélange avec une souche de CHIKV cultivée en laboratoire à une concentration prédéterminée. Le mélange est ensuite déposé sur une culture de cellules *Vero* ou cellules C6/36, et incubé à 37°C durant 24h à 48 heures. En cas de présence d'anticorps anti-CHIKV, ceux-ci vont se fixer au virus et neutraliser son entrée dans les cellules en culture. La neutralisation est modulée par la quantité d'anticorps neutralisants présents dans l'échantillon. La visualisation de peu ou pas d'ECP sera considérée comme un résultat positif pour la sérologie. A l'inverse, en cas d'absence d'anticorps d'intérêts (patient négatif), l'infection des cellules par le virus ne sera pas neutralisée et de nombreux ECP seront observables au microscope (Azami, Moi *et al.* 2016) (**Figure 25**). Bien qu'une certaine réactivité croisée puisse se produire, notamment entre les flavivirus Zika et dengue, les tests de diagnostic PRNT sont considérés comme étant très spécifiques pour les arbovirus, et constituent une méthode dite « *Gold-Standard* » (ou méthode

de référence) pour l'évaluation des différents tests sérologiques (Venturi, Zammarchi *et al.* 2016).

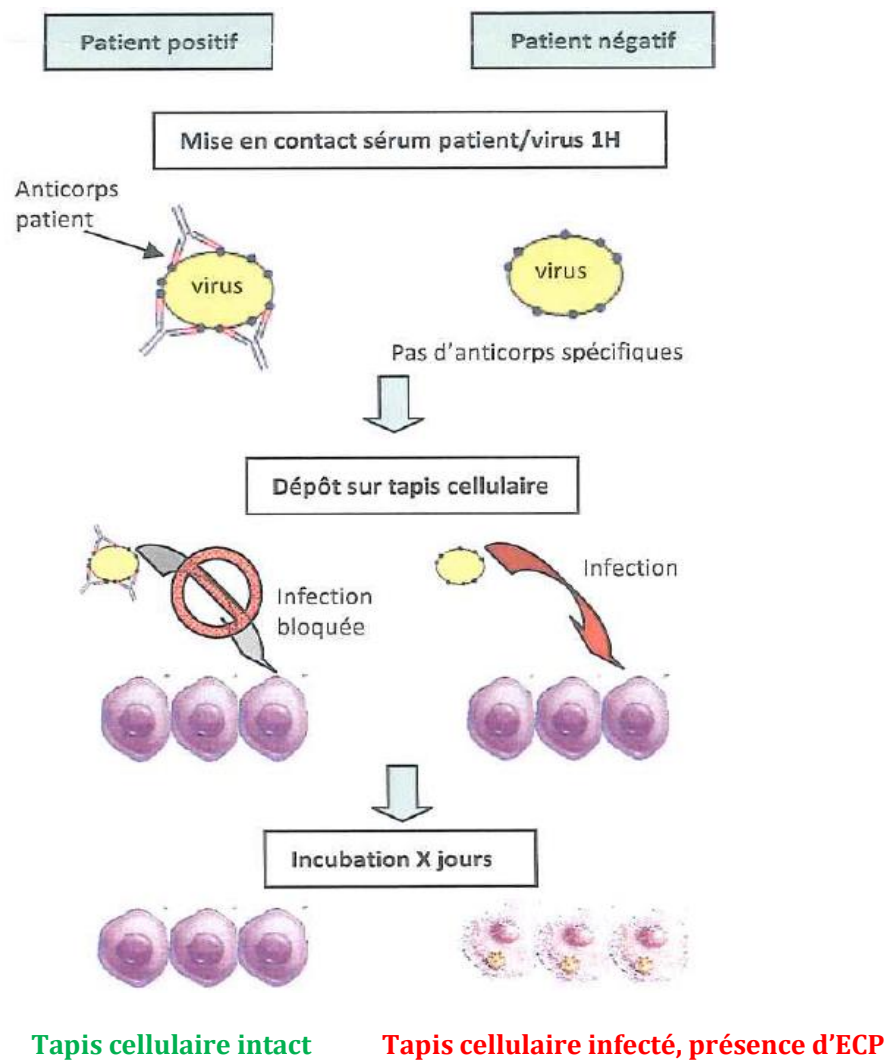


Figure 25 : Représentation schématique d'un protocole de séroneutralisation.
Source : IRBA avec accord.

2.2. Les tests commercialisés

Les recherches bibliographiques et la veille technologique n'ont pas mis en évidence de kits commerciaux pour la détection d'antigène viraux pour le diagnostic du CHIKV. Les tests actuellement commercialisés pour le diagnostic de ce virus sont des tests de biologie moléculaire et sérologiques, décrits ci-après.

2.2.1. Détection du génome viral sur prélèvements

De nombreux kits de biologie moléculaire permettant la détection du CHIKV par amplification génomique sont commercialisés. En 2009, Panning *et al.* ont évalué les performances du kit de diagnostic RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 CE, commercialisé par Altona-Diagnostics (Panning, Hess *et al.* 2009). Ce kit est utilisable sur de nombreuses plateformes de biologie moléculaire, inclut des contrôles internes pour s'assurer de la validité du test, et peut être utilisé en parallèle avec le RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0, pour le diagnostic du ZIKV. Ce kit a été évalué pour la détection du gène codant la protéine nsP1 d'un CHIKV de la lignée de l'OI, isolé en 2006. Un kit RT-PCR développé en interne a servi de méthode standard pour l'évaluation des performances du kit RealStar®. Les performances cliniques, obtenues sur 57 échantillons de patients et 22 échantillons négatifs, ont permis de calculer une sensibilité et une spécificité de 100%. En termes de sensibilité analytique du kit commercial, elle a été calculée entre 137 et 190 copies d'ARN viral.mL⁻¹ de plasma. De plus, il n'a été constaté aucune réaction croisée avec des échantillons contaminés par RRV, SFV, VSIN, EEEV, EEEW, Mayaro, ONNV et BFV. Une évaluation plus récente du kit, réalisée par Mat Jusoh *et al.* en 2017, montrent une sensibilité de 90,3% (28 échantillons positifs sur 31 testés) et une spécificité de 100% (calculée sur 5 échantillons) (Mat Jusoh and Shueb 2017).

Un autre kit de détection du CHIKV, le Chikungunya Virus Real Time RT-PCR Kit, est commercialisé par Liferiver™. Des contrôles internes sont inclus, notamment un contrôle positif (contenant 1×10⁷copies.mL⁻¹). Les données constructeur indiquent une sensibilité de détection évaluée à 1×10³ copies d'ARN viral.mL⁻¹.

L'entreprise Certest Biotec a développé et commercialisé le kit Viasure® pour une détection multiplexée des virus Zika, de la dengue et du chikungunya. Ce kit permet une détection en temps réel de ces virus contenus dans des échantillons de sang, de sérum, de plasma ou d'urine. Des contrôles négatifs et positifs sont également inclus dans ce kit. Comme le kit

précédent, il peut être utilisé sur de nombreuses plateformes de biologie moléculaires commercialisées. En termes de performances, les données constructeur indiquent une limite de détection à ≥ 10 copies d'ARN viral dans le volume d'échantillon testé. Pour la spécificité, il n'a pas été constaté de réactions croisées avec d'autres arbovirus, tels que YFV, WNV, ESL. De plus, les 3 virus testés (ZIKV, DENV, CHIKV) ne croisent pas entre eux.

Mat Jusoh *et al.* ont également évalué les performances du kit GenoAmp® Trioplex Real-Time RT-PCR Zika/Den/Chik de Mediven (Mat Jusoh and Shueb 2017). Les résultats obtenus par les auteurs sont identiques au test RealStar®, à savoir une sensibilité de détection de 90,3% (28 échantillons positifs sur 31 testés) et une spécificité de 100% (calculée sur 5 échantillons). Les auteurs ont également évalué deux tests immunochromatographiques pour la détection de l'antigène NS1 : le test rapide ProDetect Dengue Duo NS1 Antigen IgG/IgM (Mediven) et le test rapide SD BIOLINE Dengue Duo®. Les résultats obtenus sur ces tests rapides ont été comparés aux tests PCR. Les résultats entre les tests rapides et les tests PCR montrent une concordance des résultats (appelée Coefficient kappa de Cohen, ou *K*) de 51,9%.

Les tests de biologie moléculaire pour la détection en temps réel des virus de la dengue, du chikungunya et Zika montrent de très bonnes performances, avec des temps d'obtention des résultats relativement rapide, d'environ 1 heure pour les plus rapides. Leurs performances sont meilleures que les tests rapides POC aussi bien en termes de sensibilité et de spécificité. Cependant, ces kits nécessitent du personnel qualifié, une importante infrastructure et un équipement spécialisé pour réaliser les différentes étapes nécessaires au diagnostic (extraction du génome viral, purification et amplification). Leur coût reste également un obstacle important pour leur utilisation dans les pays à revenus limités. C'est pourquoi l'utilisation de tests de diagnostic de biologie moléculaire alternatifs à bas coût est une piste intéressante à explorer.

2.2.2. Sérologie

De nombreux tests sérologiques pour le diagnostic du CHIKV sont commercialisés. Ils sont regroupés en 3 grandes formats de diagnostic : i) des tests ELISA en plaques 96 puits, pour la sérologie IgM (MAC-ELISA) ou IgG (GAC-ELISA) ; ii) des tests d'immunofluorescence indirect ; iii) des tests de diagnostic rapide POC de type LFA (*Lateral Flow Assay*) (cf. **chapitre 3.3**).

Les performances de quelques-uns de ces tests ont été évalués dans la littérature. En 2014, le CNR Arbovirus a réalisé une étude comparative des performances de 4 kits commerciaux de diagnostic sérologique du CHIKV, marqués *in-vitro* et ayant la certification CE (autorisation de vente sur le marché Européen) (Prat, Flusin *et al.* 2014). Deux tests sont des tests rapides pour la sérologie IgM du CHIKV : « SD Bioline Chikungunya IgM » (Standard Diagnostics Inc., Yongin-si, Corée du Sud) et « OnSite Chikungunya IgM Combo Rapid Test » (CTK Biotech Inc., San Diego, Californie, Etats-Unis d'Amérique). Les deux autres tests sont des ELISAs pour la sérologie IgM et IgG anti-CHIKV : « Chikungunya IgM m-capture ELISA and Chikungunya IgG Capture ELISA » (IBL International, Hamburg, Allemagne), et le test « Anti-Chikungunya Virus ELISA IgM test and Anti-Chikungunya Virus ELISA IgG » (Euroimmun®, Lübeck, Allemagne). L'évaluation de performance de ces tests a été réalisée sur deux séries d'échantillons de sérums : un panel A de 23 échantillons et un panel B de 30 échantillons, qui ont été choisis sur la base de leur réactivité contre le CHIKV et contre d'autres arbovirus. Chaque panel a été préalablement caractérisé et évalué par un ELISA développé en interne et par séroneutralisation, dans les laboratoires du CNR et du CDC, avant d'être testé sur les kits commerciaux. Le panel B n'était utilisé que si les résultats de sensibilité et de spécificité obtenus sur le panel A étaient supérieurs à 70%. Les kits ont également été testés sur des sérums avec des IgM dirigées contre les virus O'Nyong-Nyong et Mayaro pour évaluer la spécificité de détection (IgM et IgG). Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de performances de 4 tests de diagnostic sérologique du CHIKV, évalués par le CNR Arbovirus et le CDC. D'après Prat *et al.* 2014.

	Tests rapides		Tests ELISA	
	SD Bioline Chikungunya IgM	<i>OnSite</i> Chikungunya IgM Combo Rapid Test (CTK Biotech)	Chikungunya IgM m-capture ELISA and Chikungunya IgG Capture ELISA (IBL)	Anti-Chikungunya Virus ELISA IgM test and Anti- Chikungunya Virus ELISA IgG (EuroImmun®)
Sensibilité (%)	30	20	79 (IgM) 52 (IgG)	85 (IgM) 88 (IgG)
Spécificité (%)	73	93	88 (IgM) 96 (IgG)	82 (IgM) 95 (IgG)
Faux-positifs (%)	57	33	12 (IgM)	18 (IgM)
Faux-négatifs (%)	39	36	21 (IgM)	15 (IgM)

Les résultats obtenus sur le panel A ont démontrés les faibles performances des tests rapides. De ce fait, le panel B n'a pas été testé. Pour les kits ELISA, les valeurs de sensibilité et de spécificité étant > 70%, ils ont également été testés pour le panel B.

Les deux tests ELISA testés présentent une meilleure sensibilité et spécificité que les tests rapides. Cependant, ils présentent un nombre non-négligeable de faux négatifs et de faux positifs (**Tableau 3**).

Il en a été conclu que les tests rapides présentent des résultats médiocres, comparés aux tests ELISA réalisés en interne au CNR Arbovirus et le CDC. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors d'une précédente étude d'évaluation utilisant les mêmes tests rapides, pour traiter des échantillons de sérum provenant de résidents indonésiens (Kosasih, Widjaja *et al.* 2012). Ces résultats démontrent l'importance de l'évaluation des trousse de diagnostic commerciales et des protocoles publiés, avant l'utilisation de ces outils dans les milieux cliniques (Prat, Flusin *et al.* 2014).

Le **Tableau 4** récapitule des études ayant évalué les performances de quelques kits commerciaux pour le diagnostic sérologique du CHIKV.

Tableau 4 : Récapitulatifs d'études de comparaison de performances de tests sérologiques pour le diagnostic du CHIKV.

Auteurs	Kits testés		Sensibilité (%)	Spécificité (%)	
	Entreprise	Nom et conditions d'utilisation			
Yap, Pok <i>et al.</i> 2010	CTK Biotech	On Site Chikungunya IgM rapid test		12,12	100
	EuroImmun®	IgM IFA		75,76	100
	Test développé en interne	MAC-ELISA		93,94	95,6
Rianthavorn, Wuttirattanakit <i>et al.</i> 2010	SD Bioline	One Step IgM	Testé en phase de virémie	22	88
			Testé en phase de convalescence	83	71
Arya and Agarwal 2011	CTK Biotech	On Site Chikungunya IgM rapid test		71	100
Blacksell, Tanganuchitcharnchai <i>et al.</i> 2011	SD Bioline	IgM antibody ELISA	Testé en phase de virémie	4	92
			Testé en phase de convalescence	84	91
		IgM antibody ICT (testé en phase de virémie)	Opérateur 1	1,9	92,5
			Opérateur 2	3,9	94,2
			Opérateur 3	3,9	95,0

Litzba *et al.* ont évalué, en 2008, le premier kit commercial de diagnostic sérologique IgM et IgG du CHIKV par immunofluorescence indirecte IIFT, commercialisé par EuroImmun® (Litzba, Schuffenecker *et al.* 2008). Le kit a été testé sur 2 panels qui ont été caractérisés en routine en IIFT, MAC-ELISA ou GAC-ELISA standardisés, au Bernhard-Nocht-Institute de Hamburg, en Allemagne. Le même kit commercial a été testé en 2016 par le CDC et le CARPHA (*Caribbean Public Health Agency*) pour la sérologie IgM (Johnson,

Goodman *et al.* 2016). Les résultats de sensibilité obtenus pour les deux panels sont indiqués en **Tableau 5**.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif de performances du test IIFT d'EuroImmun® pour le diagnostic sérologique IgM et IgG du CHIKV. D'après Litzba *et al.* 2008, Johnson *et al.* 2016.

	Bernhard-Nocht-Institute	CDC	CARPHA
Sensibilité (%)	96,9 (IgM) 95,4 (IgG)	92 (IgM)	100 (IgM)
Spécificité (%)	98,3 (IgM) 100 (IgG)	100 (IgM)	92 (IgM)

Il en a été déduit que ce test IIFT présente de bonnes performances. Cependant, le CDC et le CARPHA précisent que, sur des échantillons dont les résultats étaient équivoques, il est nécessaire de procéder à plusieurs essais. Le bruit de fond de fluorescence des cellules non-infectées, responsable de ces résultats équivoques, pourrait être réduit par une contre-coloration. La compétence du technicien influe également sur l'interprétation des résultats et donc sur la concordance des résultats entre les deux centres (Johnson, Goodman *et al.* 2016).

2.2.3. Automates

Des tests de diagnostic d'arbovirus ont été développés sur des automates et sont disponibles sur le marché. L'un de ces tests est le NanoCHIP® ZIKV/DENV/CHIKV (**Figure 26a**), développé et commercialisé par Savyon Diagnostics®, basée en Israël. Ce kit permet la détection différenciée et multiplexée des virus Zika, du chikungunya et des quatre sérotypes de la dengue, à partir d'échantillons de sérum, de sang total, d'urine ou de liquide amniotique. Ce test fonctionne sur le système de biologie moléculaire NanoCHIP®XL, commercialisé par la même entreprise (**Figure 26b**) et permet une détection qualitative et automatisée des virus. De plus, ce système est capable de faire du criblage à moyen-haut débit, et avec un minimum de manipulation par l'opérateur.

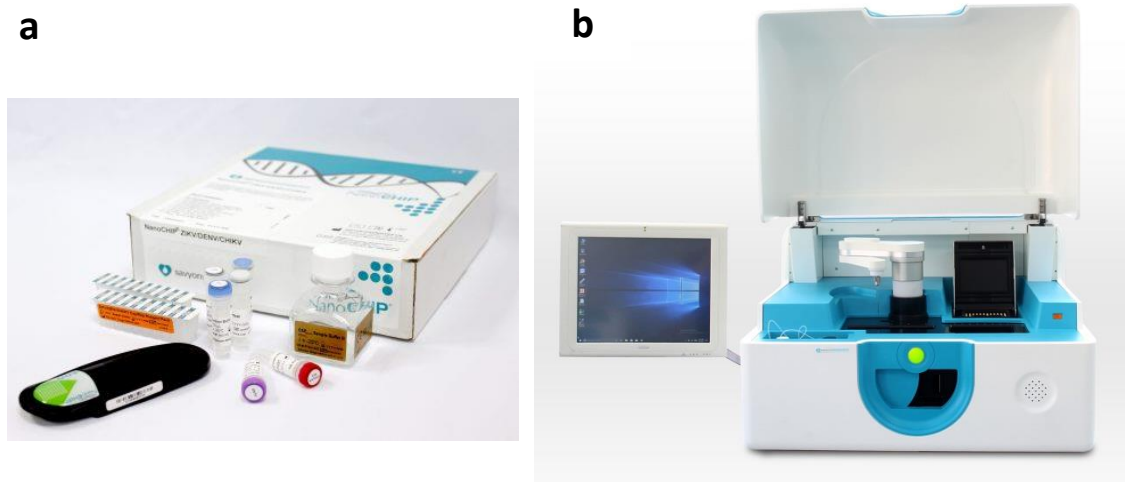


Figure 26 : Kit de biologie moléculaire utilisable sur automate, et automate. a) kit de détection NanoCHIP® ZIKV/DENV/CHIKV ; b) appareil de biologie moléculaire NanoCHIP®XL. Source : www.nanochipxl.com.

L'entreprise BioFire® Defense a développé un test de détection appelé FilmArray® Global Fever Panel – RUO, permettant la détection multiplexée de 19 germes infectieux (virus, bactéries et protozoaires) à partir d'échantillons de sang total (environ 200µL). Parmi les virus inclus dans ce test, sont référencés les virus du chikungunya, la fièvre hémorragique de Crimée-Congo, la dengue, Ebola, le virus Lassa, le virus Marburg, le virus West-Nile, la fièvre jaune et Zika. Ce test permet la détection du germe infectieux en une heure, sur l'appareil de biologie moléculaire FilmArray® de l'entreprise (**Figure 27**), de façon automatisée et avec un minimum de manipulation de la part de l'opérateur (2 minutes).



Figure 27 : Appareil de biologie Moléculaire FilmArray® de l'entreprise BioFire®Defense. Source : <http://biofiredefense.com>.

Des automates ont également été développés pour la détection du virus Zika. En octobre 2017, l'entreprise Roche® a annoncé avoir reçu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis pour le test cobas® Zika NAT, sur les systèmes de biologie moléculaire cobas® 6800/8800, commercialisés par l'entreprise. En mai 2018, Roche® a également annoncé le lancement du test Elecsys® Zika IgG, le premier immunoessai entièrement automatisé pour la détection des IgG anti-Zika, et marqué CE. Ce test peut également être utilisé pour déterminer la séroprévalence de Zika dans différentes populations, afin d'évaluer le niveau de statut immunitaire au sein de cette population et d'un pays.

Malgré de très bonnes performances, ces automates basés sur l'amplification génique ne sont pas adaptés au diagnostic sur le terrain pour les pays en développement. Leurs coûts sont plus élevés que les tests rapides. De plus, ces technologies nécessitent un personnel qualifié, ne sont pas transportables et requièrent une importante infrastructure. Elles peuvent difficilement être utilisées au chevet du patient.

3. Les tests bas coût (*low cost*)

3.1 Contexte mondial et émergence du bas coût

En mars 2018, l'entreprise IBM, spécialisée dans le développement et la commercialisation de logiciels, de matériels et de services informatiques, a présenté durant sa conférence « *Think 2018* » le plus petit ordinateur du monde (**Figure 28a**). Sa taille est de 1mm^2 , soit la taille d'un grain de sel (**Figure 28b, flèches rouges**). Il a été conçu pour être jetable, et sera surtout utilisé pour de la traçabilité. De plus, IBM a annoncé que son prix de fabrication ne serait que de 10 cents. Il pourra également être intégré dans des systèmes de *blockchain*, c'est-à-dire une technologie de stockage et de transmission d'informations entièrement cryptée, permettant de s'assurer de la traçabilité des données et de leur sécurité. Le bas coût correspond donc aussi à une performance technologique.

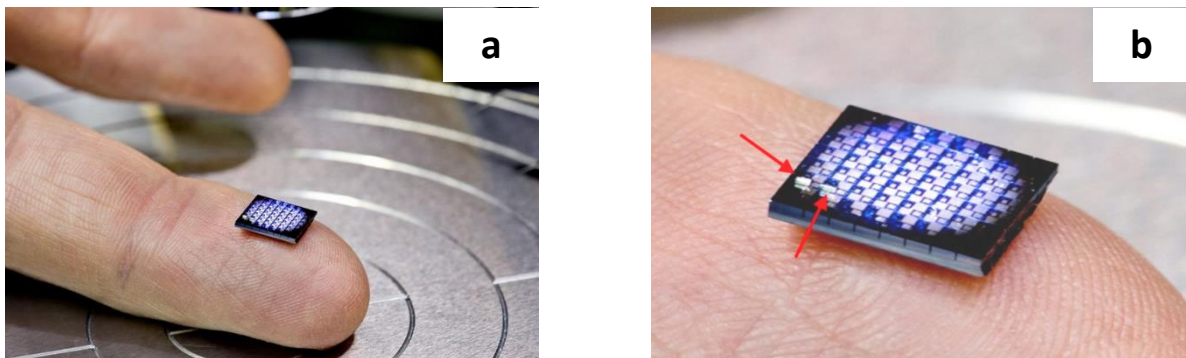


Figure 28 : Photographie du plus petit ordinateur du monde. a) puce composée de 64 cartes mères contenant chacune 2 mini-ordinateurs IBM ; b) les flèches rouges indiquent 1 mini-ordinateur (1mm^2). Source : IBM.com.

En 2014, Google annonçait le développement d'un smartphone modulaire, appelé « Project ARA ». Initialement lancé en partenariat avec Motorola Mobility, et porté par l'équipe *Advanced Technology and Projects (ATAP)*, un incubateur de projets de Google, il vise à concevoir et commercialiser un téléphone modulaire (**Figure 29a**). Le principe repose sur l'ajout de modules à un exosquelette (le téléphone) par un système d'aimants. Ces modules pouvaient être un appareil photo, une batterie, un capteur, de la mémoire supplémentaire... afin de pouvoir personnaliser complètement son smartphone (Yadav and Yadav 2015). Google souhaitait commercialiser un « kit de démarrage » aux alentours de \$50US comprenant un cadre, un écran, une batterie, un processeur bas de gamme et le Wifi. Chaque module

supplémentaire aurait coûté \$15US (Bhalla 2016). L'équipe ATAP avait annoncé la commercialisation de ce smartphone pour 2017, lors de la convention *Google I/O 2016*.

Dans le cadre du Project ARA, Google s'est associée avec la Start-Up Vestigen, une société slovaque spécialisée dans les nouvelles technologies biomédicales, notamment le développement de capteurs intelligents pour une utilisation sur téléphone portable. L'entreprise travaille sur un des modules du Project ARA qui permettrait aux utilisateurs d'analyser différents types d'échantillons, comme le sang capillaire (**Figure 29b**) ou l'eau, pour une surveillance de la santé ou de l'environnement (Martelli 2015). Cependant, en septembre 2016, Google annonçait l'arrêt du Project ARA, à quelques mois de la sortie de la version grand public (Morris 2016).

En 2013, le Massachusetts Institute of Technology (MIT) a récompensé, dans son magazine *Technology Review*, Lina Nilsson, co-fondatrice de Tekla Labs, comme innovateur visionnaire de moins de 35 ans (Nilsson and Greenwald 2013). Tekla Labs est un collectif d'ingénieurs du campus de Berkeley (Californie, Etats-Unis d'Amérique) qui promeut la distribution d'équipements de laboratoire dits « libres », c'est-à-dire non-propriétaires, et conçus pour l'équipement de laboratoires courants, et ce à très bas prix. Ce collectif a développé un agitateur magnétique avec une simple table d'enregistrement recyclée (**Figure 30a**), une centrifugeuse à partir d'un batteur à œuf de cuisine modifié (**Figure 30b**), et un thermocycleur pour l'amplification génique, à partir d'un thermomètre et d'ampoules électriques. Le prix de vente de ces équipements bas coût est d'environ un dixième du prix de l'équipement commercial traditionnel (Nilsson 2014).

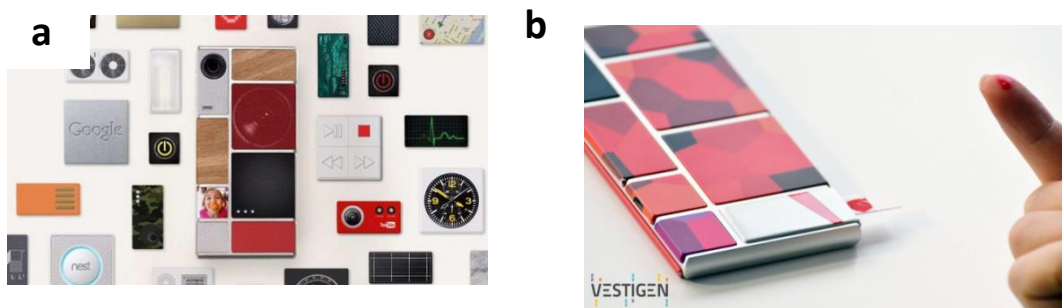


Figure 29 : Smartphone modulaire de Google. a) photographie du smartphone modulaire de Google (Project ARA), avec les modules pouvant le composer ; b) module de diagnostic médical développé par Vestigen pour le Project ARA. Sources : Google/ARA Project et Vestigen.com.

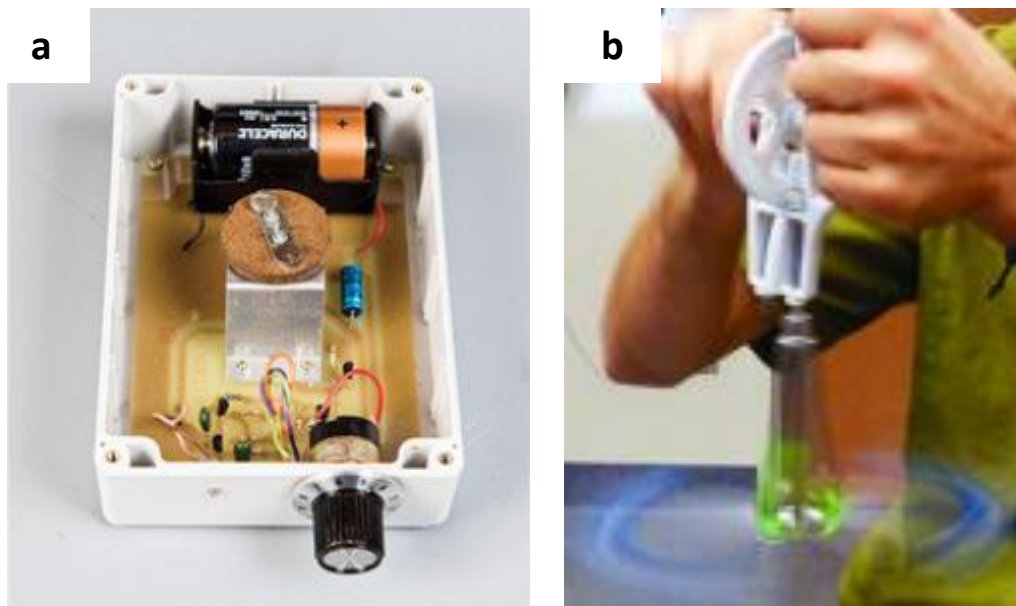


Figure 30 : Equipement de laboratoire à très bas prix. a) agitateur magnétique conçu par de Tekla Labs ; b) centrifugeuse Tekla Labs conçue avec un batteur à œuf de cuisine.
Source : Teklalabs.com.

Ces exemples illustrent l'intérêt grandissant du monde de la recherche pour des solutions bas coût, aussi bien pour du matériel de laboratoire que pour des technologies de diagnostic. Il y a aujourd'hui peu d'entreprises qui se lancent dans d'aventure du *low-cost* (ou bas coût). Cependant, il est nécessaire pour les entreprises ayant un attrait pour ce domaine d'évaluer l'intérêt du développement et de la commercialisation de leur technologie, car de nombreux critères et contraintes sont à prendre en compte, comme par exemple : i) l'attrait du domaine technologique (volume de marché, nombre de concurrents, potentiel de progrès, menaces de technologies de substitution...) et ii) la compétitivité technologique de l'entreprise (brevets enregistrés, capacité de financement, compétences des équipes de Recherche et Développement...) (Jolly 2013). Il y a donc un manque de rentabilité pour ces entreprises à plus ou moins long terme, d'autant plus que les technologies bas coût sont en concurrence avec des technologies plus sophistiquées déjà commercialisées et plus rentables.

En revanche, il y a une demande grandissante des banques, des fonds d'investissements et des cabinets de consulting pour les technologies novatrices telles que les nanotechnologies, les imprimantes 3D, etc... Dans le domaine de la santé et du diagnostic *in-vitro*, les tests rapides sont plébiscités, notamment ceux à destination des pays émergents (Farkas and Biesen 2011,

World Health Organization 2011, Booz, Robert Wood Johnson *et al.* 2012, Abbas, Smith *et al.* 2017, UNAIDS and World Health Organization 2018).

Il est intéressant d'étudier le fonctionnement du cycle de l'innovation afin de comprendre l'intérêt porté sur les technologies bas coût. Kondratieff a défini en 1929 les « cycles macro-économiques », ou « renouvellement macro-économique » (**Figure 31**) (Kondratieff 1929). L'auteur a identifié 4 phases majeures.

La première phase, dite de croissance (ou d'exploration) est une période de croissance rapide, utilisant beaucoup de ressources (matières premières). Le succès de cette phase dépend de la capacité à s'adapter facilement à une grande variété de conditions et de bien gérer l'incertitude quant à l'évolution de la technologie.

Le passage à la seconde phase du cycle, la phase de conservation, se fait progressivement, avec un taux de croissance qui ralentit. Il s'agit d'une période d'optimisation de la technologie, où la flexibilité et la variation de la phase de croissance sont remplacées au fur et à mesure par la stabilité et la rigidité. Le système atteint des performances quasi-optimales dans des conditions bien définies.

Ces deux phases sont soutenues par des innovations apportées à la technologie développée et définies par Clayton Christensen. Elles permettent de concevoir un produit durable car plus robuste et au design quasi-définitif, et dont le développement nécessite une moindre consommation de matières premières, permettant de soutenir la croissance de l'entreprise (Christensen 2013).

La phase suivante, la phase de libération, consiste en une destruction, ou décomposition de la technologie développée. Un événement déclencheur (aussi appelée perturbation) déstabilise le système de développement et le brise, détruisant ainsi la fonctionnalité de la technologie. Cette décomposition peut se produire très rapidement, en prenant beaucoup moins de temps que les phases de croissance et de conservation. Mais une fois que la perturbation initiale disparaît, la décomposition cesse. Cette phase est initiatrice de la 4^{ème} phase, celle de la réorganisation. Joseph Schumpeter a introduit le concept de destruction créative qui opère dans cette phase, et qui décrit comment la destruction de la phase de libération permet une nouvelle création dans la phase suivante, la phase de réorganisation (Schumpeter 1942).

La phase de réorganisation (ou de renouvellement) est caractérisée par l'utilisation des connaissances acquises lors des précédentes phases pour établir un nouveau système, une

nouvelle technologie : c'est la période de l'invention et de l'expérimentation, où des changements sont simples à réaliser (réorganisation interne, reconfiguration des composants de la technologie, entrée de nouveaux composants...). L'émergence de ce nouveau système est le début d'un nouveau cycle, commençant par une nouvelle phase de croissance (Ehlert 2015).

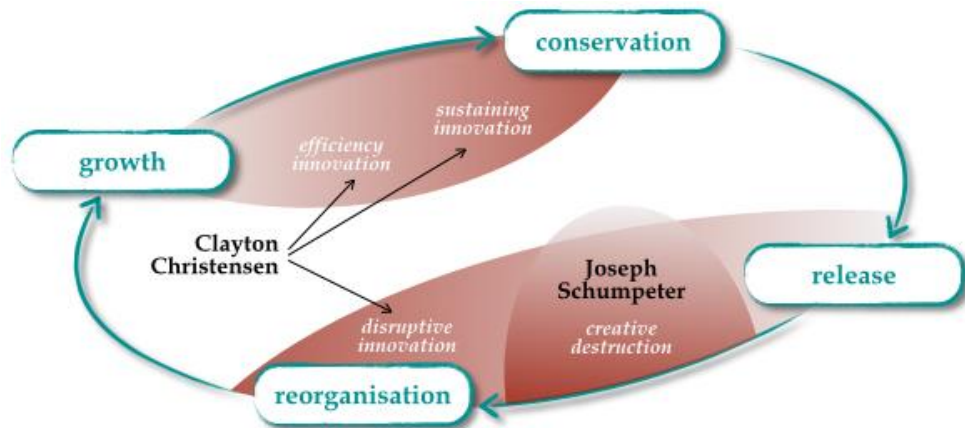


Figure 31 : Illustration de la dynamique du cycle macro-économique et des différents concepts d'innovation entrant en jeu.

Source : <https://understandinginnovation.blog>

Clayton Christensen a également inventé les termes d'innovation disruptive (ou de rupture) et d'innovation incrémentale, pour décrire comment l'innovation soutient la croissance d'une entreprise (Christensen 2013). L'innovation disruptive suppose de radicalement changer de modèle économique, mais également de structure industrielle : changements de fournisseurs, de concurrents, de forme de produit et de technologies, permettant de créer un avantage concurrentiel. L'innovation disruptive se caractérise par un bas coût d'introduction d'une nouvelle technologie sur le marché, souvent de faible qualité. Celle-ci va croître progressivement jusqu'à dépasser, en termes de volume et/ou de valeur, celle des offres traditionnelles. La disruption rend compte du processus par lequel une entreprise de petite taille, et aux ressources limitées, est capable de rivaliser avec des compagnies plus importantes en termes de taille et de moyens, et bien établies dans leur secteur. Pour être en position de rupture, les nouveaux venus doivent cibler dans un premier temps des secteurs délaissés par les compagnies bien établies, et ainsi prendre pied sur le marché en proposant une fonctionnalité plus appropriée, bien souvent à un prix inférieur. Cette innovation prend alors place au niveau

de la phase de réorganisation du cycle macro-économique, propice à l'apparition d'une nouvelle technologie. C'est dans ce contexte qu'émergent les technologies de diagnostic bas coût, tels que les LFA et les PAD, en opposition aux plateformes de diagnostic plus élaborées mais plus coûteuses et souvent inadaptées au marché des pays émergents.

L'innovation incrémentale, quant à elle, ne suppose pas un changement aussi radical que l'innovation disruptive. Elle se définit par la capacité d'innover en conservant le même modèle économique, les mêmes fournisseurs et les mêmes distributeurs. Il s'agit alors d'ajouter de nouvelles fonctionnalités à une gamme de produit déjà existante. Christensen a également montré qu'au cours d'un même cycle macro-économique, en plus des innovations d'efficacité et durable, des cycles plus courts d'innovation incrémentale opèrent, permettant le développement de la technologie (Christensen 2013).

Cependant, malgré les efforts produits pour le développement de technologies bas coût, notamment dans le diagnostic *in-vitro*, Matthew Bates et Alimuddin Zumla affirment que les coûts de ces technologies peuvent rester trop élevés pour le système de santé de nombreux pays (Bates and Zumla 2015). Ils affirment que les besoins des sociétés de diagnostics semblent en contradiction avec les besoins des systèmes de santé dans les pays émergents, à savoir une gamme de tests de diagnostic POC performants à des prix compétitifs et des exigences minimales.

Matthew Bates et Alimuddin Zumla prédisent alors l'apparition d'un futur paysage diagnostique, avec le développement entrepreneurial d'outils de diagnostic à faible coût, davantage adaptés aux besoins spécifiques de zones géographiques données. Ceci se traduira par des niveaux peu élevés de contrôle et d'assurance de la qualité, et leur faible prix permettra de créer de nouveaux marchés. La qualité de ces "diagnostics génériques" s'améliore au fur et à mesure que le marché se crée, établissant un parallèle avec le marché des médicaments génériques (Bates and Zumla 2015).

En conclusion, dans le domaine du diagnostic de pathologies infectieuses, la recherche de solutions bas coût paraît une évidence, tant le budget de santé des pays les plus touchés - considérés comme émergents - sont réduits, et que ces pathogènes y représentent un véritable problème de santé publique. Les situations endémiques pouvant évoluer vers des pandémies nécessitent d'apporter des réponses rapides, simples et performantes (critères ASSURED). Les centres de recherche les plus prestigieux, aussi bien publics que privés (MIT, Google, IBM...)

développent des approches médicales et techniques innovantes, démontrant que le bas coût peut aller de pair avec l'innovation technologique.

3.2. Les critères ASSURED

Afin de permettre aux populations des pays émergents d'avoir accès à des tests de diagnostic performants et financièrement accessibles, l'OMS a défini des critères dits ASSURED. L'acronyme ASSURED a été défini en 2003 lors d'un programme spécial de recherche et de formation sur les maladies tropicales, à l'initiative de l'OMS. Ces critères permettent de définir les caractéristiques idéales d'un test qui peut être utilisé à tous les niveaux du système de santé (Kettler, White *et al.* 2004). En 2004, la Fondation Bill & Melinda Gates a organisé un forum mondial sur le diagnostic de la santé pour déterminer les avantages attribuables à l'amélioration des diagnostics pour la santé mondiale (Hay Burgess, Wasserman *et al.* 2006). Il a notamment été prédit que l'investissement dans l'amélioration de l'accès aux diagnostics aura dans les prochaines années un impact plus important que l'amélioration de la performance des tests (Peeling and Mabey 2010).

Ces critères spécifient que les tests ASSURED doivent être : i) Abordables, afin qu'un maximum de gens puisse y avoir accès ; ii) Sensibles et Spécifiques, c'est-à-dire aussi performant que les tests commercialisés dans les pays développés, avec le moins de faux négatifs et de faux positifs possibles ; iii) simple d'Utilisation, sans avoir de compétences particulières en biologie ou dans le domaine de la santé ; iiiii) Rapides et robustes, pour diagnostiquer un maximum de personnes en un minimum de temps, permettre un conditionnement et un transport aisés, et une utilisation dans toutes les conditions météorologiques ; v) sans Equipement nécessaire à l'analyse du résultat et qui rendrait le test trop cher ; vi) Disponible facilement auprès de l'utilisateur final, en pharmacie ou en dispensaire selon les pays (Martinez, Phillips *et al.* 2010, Tay, Pavesi *et al.* 2016).

Les tests répondant à ces critères visent principalement à fournir un diagnostic rapide et à faciliter la prise de décision immédiate (Mabey, Peeling *et al.* 2004). Ces tests visent également à contourner les obstacles auxquels font face certains outils de diagnostic dans ces pays, tels que : un système de santé inexistant caractérisé par l'absence de sécurité sociale, un financement insuffisant, une mauvaise compréhension de l'utilisation des tests, un accès limité au matériel clinique de référence, un manque d'accès aux souches et aux réactifs, ou encore un accès restreint aux sites d'essais cliniques (Kettler, White *et al.* 2004).

Enfin, de tels dispositifs doivent pouvoir fonctionner dans des environnements où l'alimentation en électricité n'est pas fiable, dans des conditions où l'asepsie n'est pas toujours parfaite, ou encore des zones où il n'y a pas assez de personnel qualifié pour accomplir les tâches habituellement réservées aux infirmières et aux laborantins (source : <http://www.who.int/bulletin/volumes/90/12/12-102780/en/>).

Un des premiers tests de diagnostic pour lequel les critères ASSURED ont été appliqués a été développé contre le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) de type 1 et type 2. L'obtention rapide des résultats a permis d'accroître le nombre de personnes connaissant leur statut sérologique, aidant à administrer rapidement un traitement antirétroviral et diminuant le nombre de patients perdus de vue en raison d'une attente trop longue des résultats (Branson 2003). De même, la connaissance du statut sérologique du patient, grâce à un diagnostic rapide et de qualité, a permis de limiter la transmission du virus, par l'utilisation de moyens de protection tels que les préservatifs. Les spécifications ASSURED pour ce virus sont détaillées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Caractéristiques spécifiques des critères ASSURED pour le développement de tests POC pour le diagnostic du VIH-1 et VIH-2. D'après Wu et Zaman, 2012.

Caractéristiques	Spécifications (pour le VIH-1 et VIH-2)
Affordable	Moins de \$500 par machine, moins de \$10 par test
Sensible Spécifique	Limite de détection basse (500 copies d'ARN par mL, 350 cellules T CD4+ par µL)
Utilisable facilement	1 – 2 jours d'entraînement, simple d'utilisation
Rapide et robuste	< 30 minutes pour le diagnostic, < 1,5 heure pour la surveillance de la charge de VIH, consommables minimes, conservation > 1 an à température ambiante, débit élevé
Sans Équipement	Compact, alimenté par batterie, analyse des données sur site, élimination facile, manipulation aisée des échantillons, pas de chaîne du froid
Disponible facilement	Portable

3.3. Les tests rapides : un pas vers les solutions bas coût ?

Le développement de tests de diagnostic à bas coût répond aux besoins grandissants de demandes de tests accessibles et performants, à destination des pays dits émergents ou à ressources limités. Ces pays ne peuvent pas – ou difficilement – avoir accès aux tests de diagnostic *in-vitro* commercialisés dans les pays développés, et effectués dans des laboratoires d'analyse médicale possédant des équipements sophistiqués.

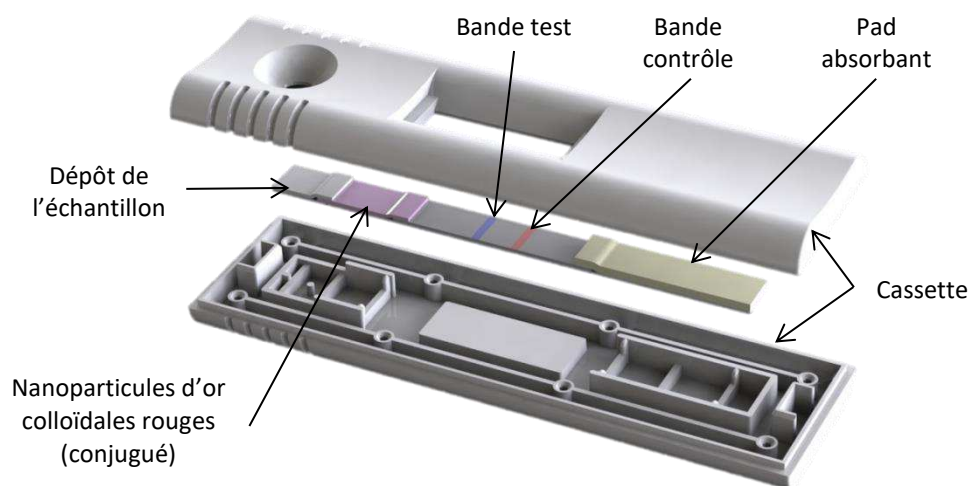
Les maladies infectieuses sont la principale cause de décès dans les pays émergents (Yager, Edwards *et al.* 2006), estimés à environ 14 millions, soit 25% des 56 millions de morts enregistrés à travers le monde chaque année (Bissonnette and Bergeron 2010, Hu, Wang *et al.* 2014). Plus de 95% de ces décès sont dus à un défaut de diagnostic et de traitements efficaces et adéquats, ainsi qu'aux difficultés d'accès à des infrastructures médicales où pouvoir effectuer ces tests (Yager, Domingo *et al.* 2008, Lee, Kim *et al.* 2010). C'est pourquoi le développement de tests adaptés aux conditions particulières de ces pays, en prenant en compte les critères socio-économiques notamment, est essentiel pour apporter une réponse aux problèmes de santé publique que représentent les maladies infectieuses.

Les tests POC (*Point-of-Care*), c'est-à-dire effectués au plus près du patient, peuvent apporter une réponse à ces questions. Ehrmeyer et Laessig ont défini en 2007 le POC comme une méthode de diagnostic pouvant être effectuée à proximité du patient, avec l'hypothèse que les résultats des tests seront disponibles immédiatement ou dans un délai très court, afin d'aider les soignants à poser un diagnostic immédiat et/ou effectuer une intervention clinique (Ehrmeyer and Laessig 2007, Bissonnette and Bergeron 2010). Enfin, afin de rendre les tests les plus abordables possible d'un point de vue financier, la recherche et l'utilisation de matériaux simples et peu coûteux ont été essentiels.

La nitrocellulose offre la possibilité d'effectuer, sur un même matériau, la réaction immunologique de capture des analytes et leur détection (Liana, Raguse *et al.* 2012, Hu, Wang *et al.* 2014). Elle peut être utilisée sous forme de bandelettes, protégées par une cassette en plastique pour former un test de diagnostic de type LFA (*Lateral Flow Assay*) (**Figure 32**). Ces tests sont utilisés dans de nombreux domaines dont le diagnostic infectieux ou les tests de grossesse, entre autres. Ils sont généralement constitués d'une bandelette de nitrocellulose où se déroule la réaction immunologique. Une goutte de sang capillaire est déposée sur une bande de papier en fibre de verre située en amont. Ce morceau de papier permet de séparer les hématies des autres composants du sang, qui migrent vers la zone de détection. L'échantillon atteint une

seconde bandelette juxtaposée à la bande de papier de verre et contenant les conjugués qui fixent l'analyte à détecter, permettant par la suite la révélation et la lecture du résultat. Le complexe analyte/conjugué migre ensuite sur la bandelette de nitrocellulose et est capturé par des anticorps spécifiques au niveau de la zone test, provoquant l'apparition d'un signal coloré dû à l'accumulation du conjugué. L'échantillon continue de migrer jusqu'à une dernière bandelette qui sert de pompe fluide et absorbe l'effluent (**Figure 32**).

L'avantage de ces tests est qu'ils sont simples d'utilisation, avec un rendu rapide du résultat lisible à l'œil nu, et sont peu chers (Rozand 2014). Ils sont bien adaptés aux pays émergents (Kafkova 2016) et répondent aux différents critères ASSURED (Kettler, White *et al.* 2004, Wu and Zaman 2012). Cependant, ils sont souvent limités par leur capacité à ne détecter qu'un ou deux analytes par test, ainsi que par des performances souvent moindres en terme de sensibilité et/ou de spécificité lors de tentatives de détection multiplexées, à savoir détecter de multiples germes sur un même test (Fu, Liang *et al.* 2011). De plus, même avec un prix de vente maîtrisé ou négocié, ils restent chers et donc relativement peu accessibles pour les populations des pays les plus pauvres, à l'instar de l'Autotest VIH® vendu en France en pharmacie, au prix de 28€ et non-remboursé par la sécurité sociale (source : sida-info-service.org).



3.4. Les solutions papiers

Le papier représente une solution alternative attractive pour le développement de tests POC de nouvelle génération à bas coût car il représente une solution simple pour nombre d'applications, notamment dans le diagnostic clinique. Ce matériau est bon marché, facilement transportable, facile d'accès, biocompatible et recyclable (Rozand 2014). Les premiers tests de diagnostic utilisant ce matériau ont été les tests urinaires, mis au point par le chimiste parisien Jules Maumené, en 1850. Ils furent ensuite commercialisés en 1883 par le physiologiste anglais George Oliver (Hu, Wang *et al.* 2014). Durant les années 1920, les premiers tests papiers pH ont été fabriqués et commercialisés (Foster and Gruntfest 1937). En 1956 fut développé un test de détection semi-quantitative du glucose dans les urines (Comer 1956). La même année, Plotz et Singer ont développé les premiers tests d'agglutination, qui ont posé les bases du format LFA. Depuis, les tests LFA ont continué d'évoluer et ont été développés pour le diagnostic rapide de nombreuses maladies infectieuses.

En 2009, la revue *Technology Review* a récompensé Whitesides *et al.* pour le PAD (*Paper Analytical Device*) microfluidique, considéré alors comme étant l'une des 10 technologies émergentes. Le PAD consiste en un test papier jetable qui permet de vérifier la présence de maladies infectieuses ou de maladies chroniques dans une petite quantité d'urine ou de sang. Le dispositif final est fait de carrés de papier de la taille d'un timbre-poste. Le bord d'un carré est plongé dans un échantillon d'urine ou mis au contact d'une goutte de sang, et le fluide biologique se déplace à travers des canaux microfluidiques prédéfinis pour rejoindre des puits d'analyse. Selon les réactifs chimiques présents sur ces zones de détection, différentes réactions colorimétriques se produisent et teintent le papier en cas de réaction positive (Grifantini 2009, Hu, Wang *et al.* 2014).

3.4.1. Fabrication d'un test sur support papier (PAD)

La méthode de fabrication d'un test de diagnostic bas coût utilisant le papier comme matériau, ou PAD, doit inclure des critères de prix réduit (matière première, industrialisation) mais aussi de simplicité et de robustesse. De nombreuses techniques de fabrication ont été recensées et compilées par Xiao Jiang *et al.* en 2016 (**Tableau 7**) (Jiang and Fan 2016) et certaines sont illustrées dans la **Figure 33** (Jiang and Fan 2016).

Traditionnellement, un PAD est constitué d'une zone de dépôt de l'échantillon biologique à analyser (« sample PAD »), d'une zone réactive permettant de réaliser le diagnostic du pathogène, et d'une zone absorbante qui joue le rôle de pompe fluidique (migration du fluide par capillarité) et de zone déchet, récupérant l'effluent.

Nous distinguerons deux types de PAD : les PAD en deux dimensions (2D) et les PAD en trois dimensions (3D) qui diffèrent, entre autres, de par leur structure et leurs procédés de fabrication.

3.4.1.1. Tests en deux dimensions (2D)

Les PAD 2D sont des PAD où toutes les étapes nécessaires au diagnostic sont réalisées de façon « linéaire » (sur le même plan), et généralement sur le même matériau. Les PAD 2D peuvent être fabriqués selon deux principales techniques : la mise en place de zones hydrophiles et hydrophobes sur le papier (différents modes d'impression, imprégnation), et la découpe du papier pour former des frontières physiques à l'écoulement des fluides (découpage au laser par exemple). Les différentes techniques sont détaillées dans le **Tableau 7** et illustrées par la **Figure 33**.

Tableau 7 : Récapitulatif des procédés de fabrications de PAD en 2 dimensions.
D'après Xiao Jiang *et al.* 2016.

Techniques de fabrication	Exemples		Sources bibliographiques
Motif hydrophiles - hydrophobes	Impression	Impression par traçage	Bruzewicz, Reches <i>et al.</i> 2008
		Impression par jet d'encre	Elsharkawy, Schutzius <i>et al.</i> 2014
		Impression flexographique	Olkkonen, Lehtinen <i>et al.</i> 2010
		Impression à la cire	Bedin, Boulet <i>et al.</i> 2017
	Modelage guidé par masque	Photolithographie	Martinez, Phillips <i>et al.</i> 2008
		Traçage en 1 étape	Nie, Zhang <i>et al.</i> 2012
		Vaporisation	Sameenoi, Nongkai <i>et al.</i> 2014
		Impression sérigraphique	Dungchai, Chailapakul <i>et al.</i> 2011
		Trempe dans de la cire	Songjaroen, Dungchai <i>et al.</i> 2011
		Gravure / abrasion	Songok, Tuominen <i>et al.</i> 2014
		Dépôt en phase de vapeur	Kwong and Gupta 2012
	Estampage		Curto, Lopez-Ruiz <i>et al.</i> 2013
	Embossage à chaud		Yu and Shi 2015
Création de barrières physiques	Découpage avec traceur, laser ou autres outils		Spicar-Mihalic, Toley <i>et al.</i> 2013

Parmi ces différentes techniques de fabrication, la technique par impression consiste à utiliser les propriétés d'un composant hydrophile (le papier) et d'un agent hydrophobe (cire, polymère...) afin de créer des motifs fluidiques à la surface du PAD. Une des méthodes d'impression utilisée pour l'obtention de PAD est l'impression par jet d'encre (Elsharkawy, Schutzius *et al.* 2014, Yamada, Henares *et al.* 2015) (**Figure 33a**). L'impression par jet d'encre permet de délivrer de l'encre, des biomolécules et autres réactifs avec précision au sein du PAD, afin de former des zones de détection biochimiques à l'intérieur et à la surface du dispositif. De plus, cette méthode de fabrication est compatible avec une industrialisation à grande échelle et un coût de fabrication réduit (Li, Tian *et al.* 2010).

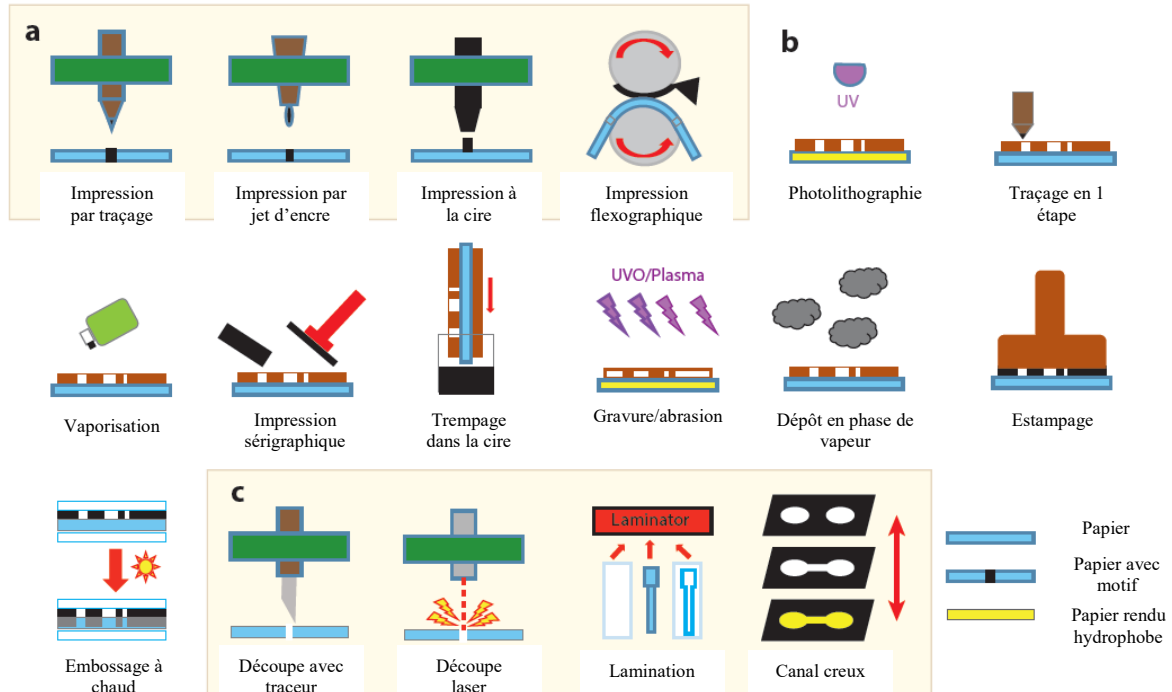


Figure 33 : Illustrations de quelques procédés de fabrications de PAD en 2 dimensions.
a : méthode par impression ; b : modelage guidé par masque ; c : création de barrières physiques.
D'après Xiao Jiang *et al.* 2016

Une autre méthode de fabrication repose sur la dégradation contrôlée du papier par utilisation de rayons ultraviolets (UV), la photolithographie. Whitesides et Martinez ont été les premiers à utiliser l'application de rayons UV sur le papier, permettant de créer des motifs au sein même du PAD (Martinez, Phillips *et al.* 2007, Martinez, Phillips *et al.* 2008). Pour cela, un masque de protection, constitué de résine, est placé à la surface du PAD. Le PAD sera dégradé sur les zones où la résine ne sera pas présente, formant ainsi des canaux ou différents motifs (**Figure 34**). L'expérimentateur choisit lui-même les zones à protéger des UV afin d'obtenir le motif final souhaité.

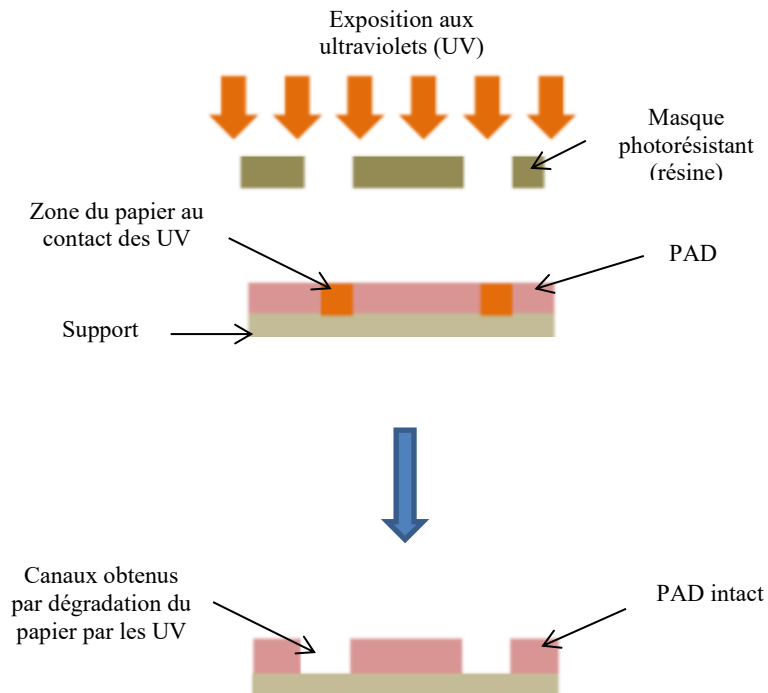


Figure 34 : Illustration de la fabrication de canaux sur un PAD par la technique de la photolithographie.

Source : <http://www.dileepnanotech.com/>

Si l'on ne souhaite pas la destruction totale du papier, l'abrasion de surface (ou « *etching* ») peut être utilisée. Elle consiste à ne dégrader que la surface du papier pour former des motifs (**Figure 33b**). Pour cela, différents outils peuvent être utilisés, tels que les UV mais avec une exposition moins longue que pour la photolithographie (Ibrahim and Ito 2010), ou des agents chimiques tels que l'acide nitrique (Song 2015) ou l'acide acétique (Ibrahim and Ito 2010). Une pointe très fine, telle que l'extrémité d'une lame de rasoir, peut être utilisée pour « gratter » la surface du papier et former un motif à sa surface (Giokas, Tsogas *et al.* 2014). L'utilisation d'un laser, dont la puissance est contrôlable, peut également être envisagée (**Figure 35**) (Chitnis, Ding *et al.* 2011).

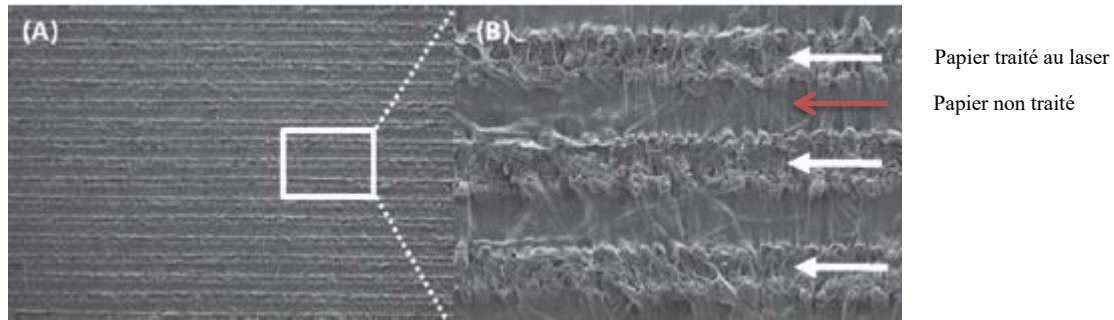


Figure 35 : Photographie de la surface d'un morceau de papier ayant subi une abrasion au laser. A) image microscopique d'un réseau de lignes obtenue par abrasion laser du papier; B) image agrandie : les flèches blanches indiquent les zones traitées au laser. D'après Chitnis, Ding *et al.* 2011.

L'embossage à chaud est une autre méthode de fabrication de PAD (**Figure 33b**). Celle-ci consiste en l'utilisation d'un pistolet chauffant et d'un Parafilm® sur lequel ont été dessinés des canaux par photolithographie. Le Parafilm® est posé à la surface du papier, et il est ensuite chauffé avec le pistolet pour donner au PAD son relief définitif (Yu and Shi 2015).

Ces différentes méthodes de fabrication de PAD en 2 dimensions permettent de donner au circuit microfluidique les formes que l'on souhaite (Fenton, Mascarenas *et al.* 2009) (**Figure 36**), afin de faciliter un écoulement plus ou moins rapide de l'échantillon biologique sur le support ou le mélange de liquides (cf. **chapitre 3.4.2**), voire la dilution d'un liquide (Osborn, Lutz *et al.* 2011).

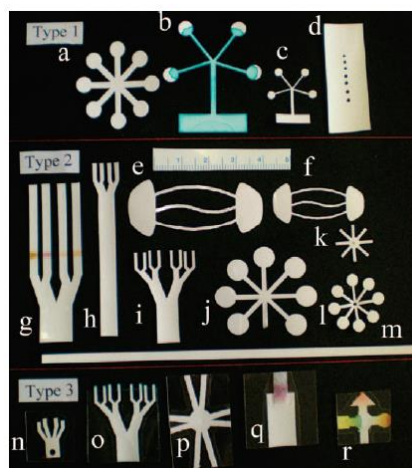


Figure 36 : Illustrations de différentes formes données à des PAD. D'après Fenton *et al.* 2009.

En 2012, Elain Fu *et al.* ont développé un test de diagnostic de la malaria et à destination des pays émergents (Fu, Liang *et al.* 2012). Ce test est constitué d'une cassette en plastique contenant les différents composants et analytes permettant la réalisation du test (**Figure 37a**). Le conjugué, le tampon et les nanoparticules d'or (amplifiant le signal de détection) sont déposés sur le PAD sous forme déshydratée. Une fois la cassette refermée, un circuit microfluidique est reconstitué (**Figure 37b**). C'est dans ce circuit que migrera l'échantillon biologique. Ce dernier va réhydrater les différents composants du test, et permettra la révélation en cas de réaction positive. De plus, il est possible de jouer sur les distances séparant les réactifs de la zone de détection. Plus la distance est grande, plus le temps de migration des réactifs (remis en suspension par le liquide) vers la zone de détection sera long. De ce fait, si plusieurs réactifs sont placés à différentes distances de la zone de détection, ceci permet l'apport successif et ordonné des différents composants sur la zone réactive (**Figure 38**), permettant une réaction chimique, immunologique ou autre (Fu, Lutz *et al.* 2010).

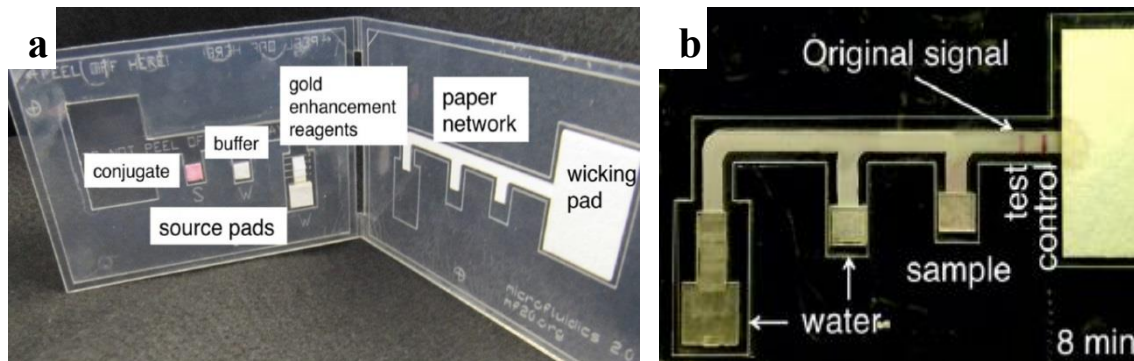


Figure 37 : PAD microfluidique papier sous forme de cassette. a) composants du PAD en deux dimensions ; b) exemple d'une réaction de diagnostic positive avec le PAD 2D fonctionnel. D'après Fu *et al.* 2012.

Conjugate: conjugué ; *buffer*: tampon ; *source pads*: pad de dépôt de l'échantillon ; *gold enhancement reagents*: nanoparticules d'or ; *paper network*: support papier ; *wicking pad*: pad déchets ; *water*: eau ; *sample*: échantillon ; *original signal*: signal de détection ; *test*: zone test ; *control*: contrôle interne positif.

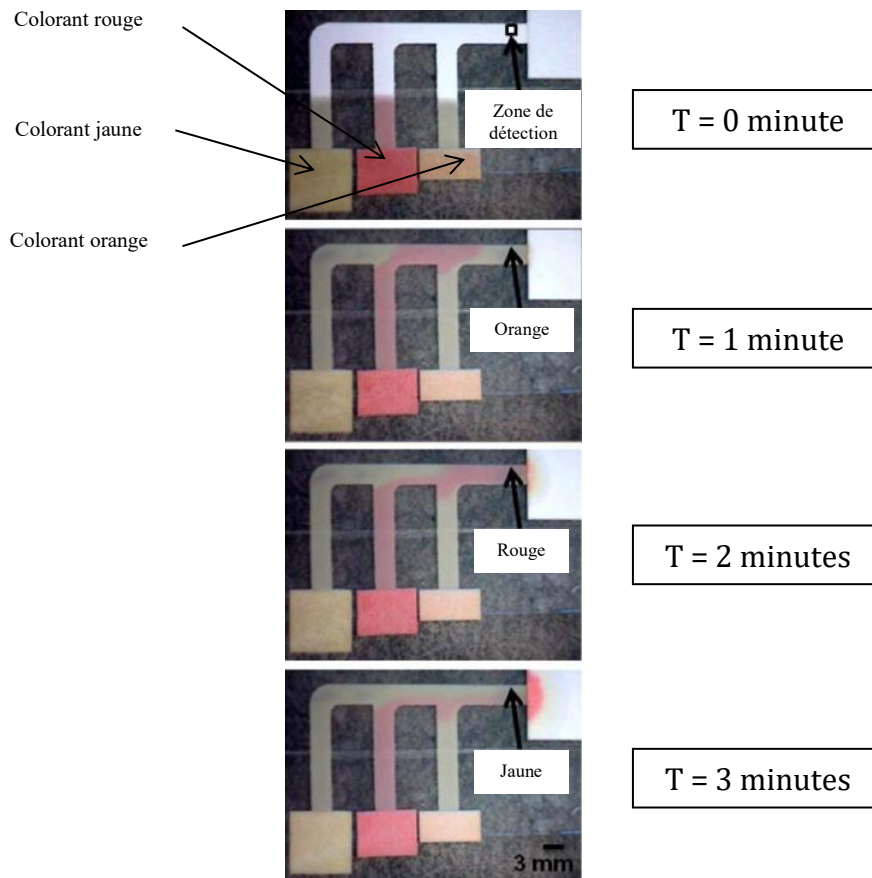


Figure 38 : Démonstration de la différence de cinétique de migration des fluides colorés vers la zone de détection du PAD. D'après Fu, Lutz *et al.* 2010.

3.4.1.2. Tests en trois dimensions (3D)

Contrairement aux PAD 2D, les PAD 3D consistent en l'assemblage de différentes couches de papier. Les fluides peuvent se diriger aussi bien dans la direction horizontale que verticale au sein du PAD, et peuvent se croiser sans se mélanger (Martinez, Phillips *et al.* 2008) (**Figure 39**). Martinez *et al.* ont démontré qu'il était possible de faire se croiser différents fluides au sein d'un même système grâce à la superposition de différentes couches de papier (Martinez, Phillips *et al.* 2007). Des canaux sont obtenus sur les couches de papier par photolithographie (**Figure 39a**) et ces couches sont ensuite superposées les unes sur les autres pour donner le PAD final en trois dimensions. Les motifs dessinés sur les différentes couches superposées vont se rejoindre, *via* des perforations d'une couche de papier intermédiaire, afin de ne former plus qu'un seul canal (**Figure 39b**). Suivant le même principe, il est également possible d'obtenir

plusieurs canaux. Ainsi, en déposant un liquide sur chaque canaux, ils se croiseront sans se mélanger (**Figure 39c**).

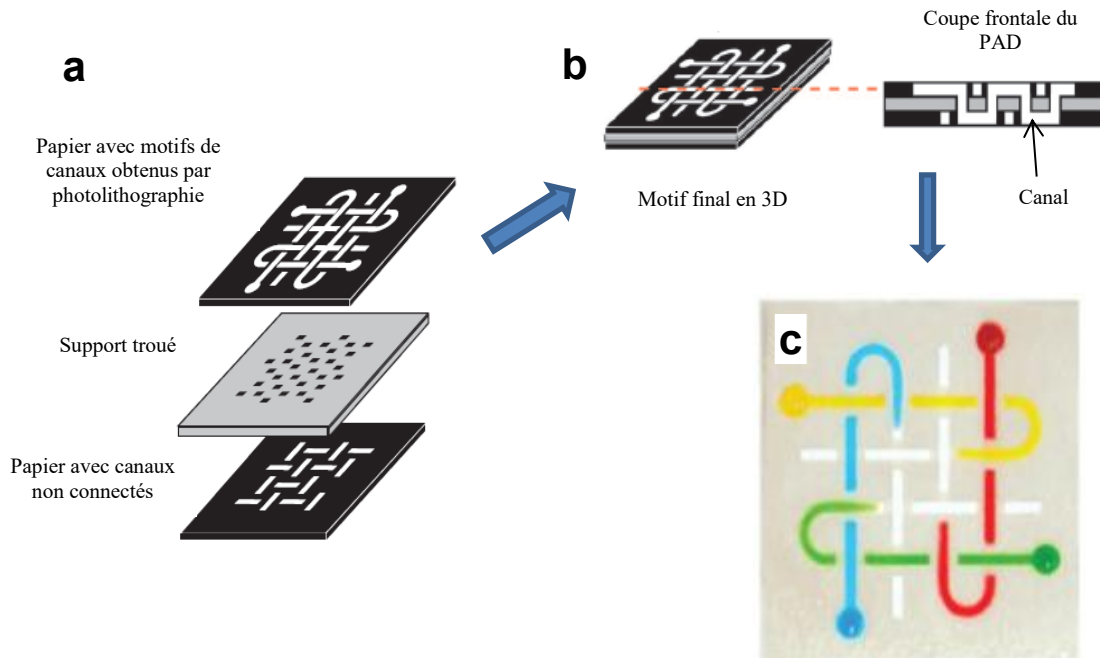


Figure 39 : Illustration d'un PAD en 3D où quatre liquides colorés se croisent sans se mélanger. a) schéma des canaux obtenus par photolithographie des différentes couches de papier ; b) superposition des couches de papier pour former le PAD 3D, et coupe frontale du dispositif après assemblage ; c) photographie des flux de migration de différents liquides au sein du PAD. D'après Martinez *et al.* 2008.

Une des technologies de PAD 3D également développées repose sur le principe du pliage origami (Liu and Crooks 2011, Ge, Wang *et al.* 2012, Liu, Cassano *et al.* 2013, Overvelde, de Jong *et al.* 2016). L'avantage de ce format est qu'il ne nécessite que des pliages (**Figure 40**). Les différents canaux, zones de détections et autres composants du PAD sont fabriqués sur le même morceau de papier, et le pliage sur lui-même permet la mise en contact des différents composants, et initie la réaction de détection souhaitée sans avoir besoin de les coller entre eux. En effet, l'utilisation d'un adhésif peut être source de contaminations et d'adsorptions non-spécifiques (Martinez, Phillips *et al.* 2008, Liu and Crooks 2011). Overveld *et al.* ont illustré en 2016 le principe du pliage Origami en utilisant différentes bandelettes de papier (Overvelde, de Jong *et al.* 2016). Chacune est pliée sur elle-même de façon à lui donner une forme triangulaire, et chaque triangle est associé aux autres pour donner une structure en trois dimensions (**Figure 40**). Il est alors aisé de donner la forme que l'on souhaite à la structure, qui pourra alors servir de support diagnostic.

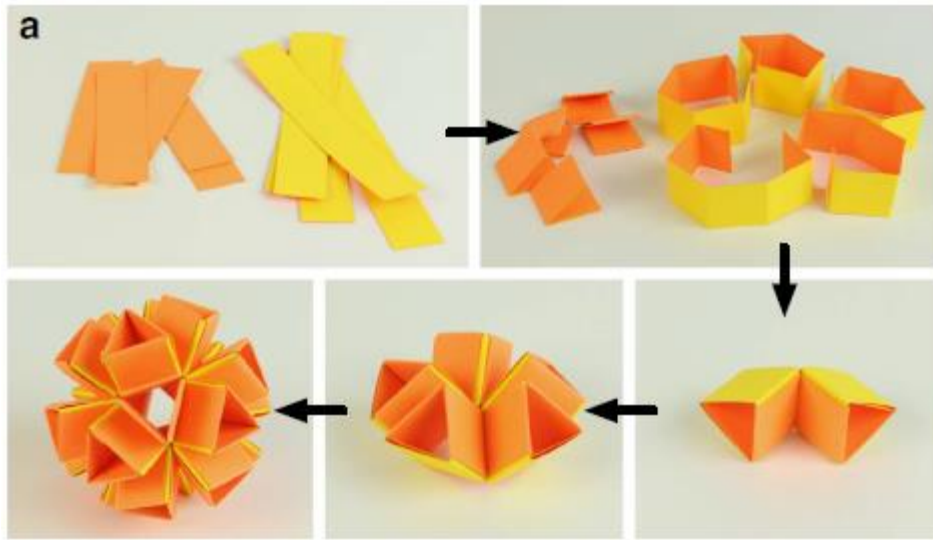


Figure 40 : Illustration d'un pliage en origami pour former une structure 3D.
D'après Overveld *et al.* 2016.

Liu et Crooks ont développé en 2011 un dispositif en trois dimensions fabriqué à partir d'une seule feuille de papier. Des spots sont dessinés sur la feuille de papier par la photolithographie (**Figure 41a**). Chaque spot correspond à une zone de dépôt d'un échantillon. Cette feuille est ensuite pliée sur elle-même à la main, formant ainsi un PAD en trois dimensions, constitué de plusieurs couches superposées sans adhésif (**Figure 41b**). L'expérimentateur dépose sur chaque rond de la couche supérieure du PAD les échantillons, illustré sur la **Figure 41c** par un liquide coloré. Après quelques minutes, le PAD est déplié et on peut observer que toutes les couches du dispositif ont été imprégnées des différents liquides (**Figure 41d**), montrant la possibilité pour un échantillon de migrer dans un dispositif obtenu par pliage origami d'une simple feuille de papier. L'applicabilité de ce dispositif utilisant des réseaux microfluidiques multicouches est démontrée pour des tests colorimétriques, et ce dispositif peut également être appliqué pour de la fluorescence (Liu and Crooks 2011).

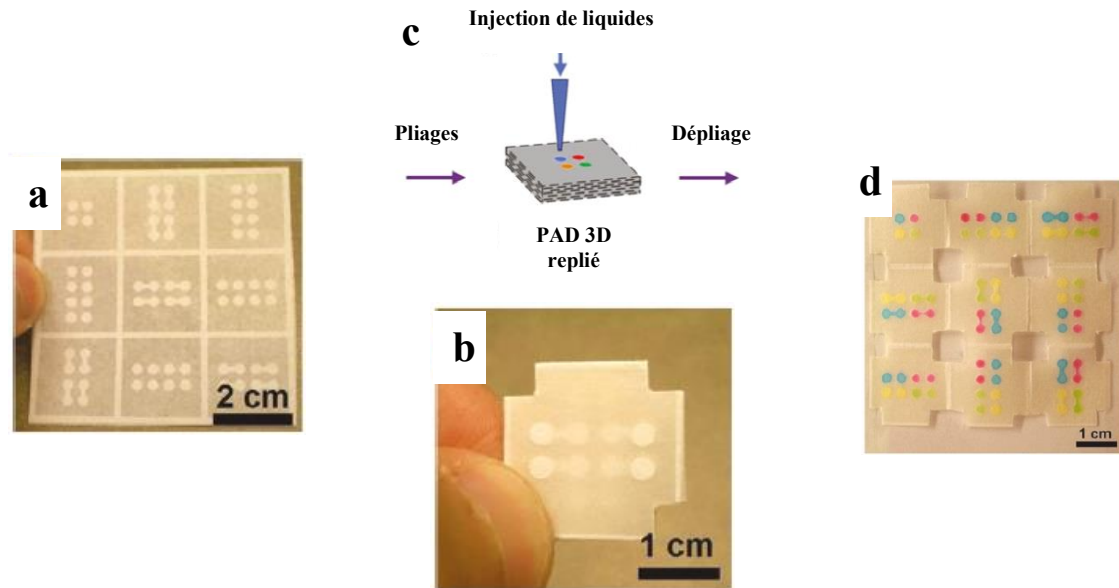


Figure 41 : Exemple d'un μ PAD 3D. a) support papier en 2D avec zones de dépôts des liquides (ronds blancs) ; b) schéma du PAD 3D après pliage ; c) injection de liquides colorés ; d) dépliage du PAD 3D et visualisation de la migration des liquides dans les différentes couches de papier.
D'après Liu and Crooks, 2011.

Le pliage façon origami n'est pas la seule méthode d'obtention d'un PAD en trois dimensions. En plus de la photolithographie, un laser peut être utilisé pour former des structures 3D. He, Katis *et al.* ont développé une méthode de fabrication de barrières hydrophobes au sein d'une structure 3D, obtenue par superposition de couches de papier en 2D et après action d'un laser (He, Katis *et al.* 2016). Les couches de papier sont superposées et imprégnées d'un polymère photorésistant. Un laser est appliqué à la surface de ce matériau, qui est ensuite lavée avec un solvant. Après ce traitement, il est constaté que les différentes couches de papier sont reliées entre elles sur les zones du papier où le laser a été appliqué. Le polymère, sous l'action du laser, a formé des barrières au sein du dispositif 3D. Le papier situé entre ces barrières forme alors des canaux fluidiques (**Figure 42**).

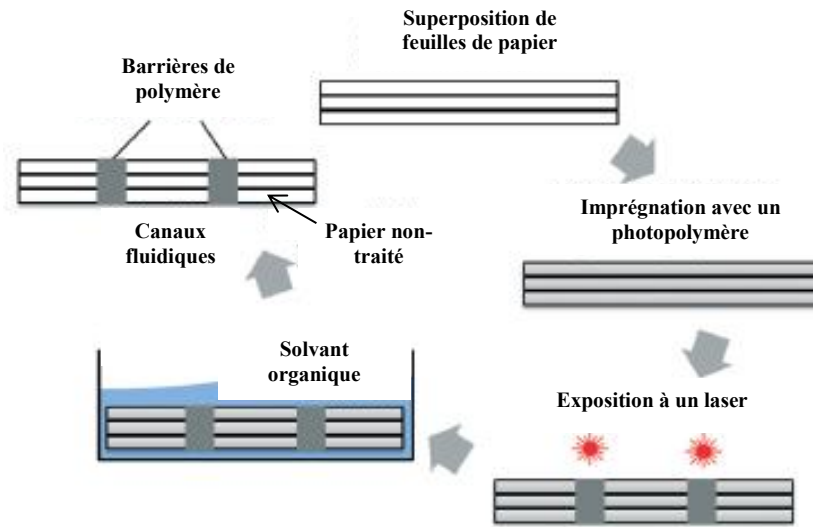


Figure 42 : Processus de fabrication d'un PAD en trois dimensions par utilisation d'un laser pour former des canaux. D'après P. J. W. He *et al.* 2016.

Fu, H., Yang, J. *et al.* ont récemment décrit une méthode simple de fabrication de dispositifs analytiques en 3D à base de papier, nommée « Rubik's Cube stamping » (RCS) (Fu, Yang *et al.* 2017) (**Figure 43**). Le dispositif développé s'inspire du Rubik's Cube classique à six faces. Cinq faces d'un Rubik's Cube sont assemblées avec de petits composants métalliques, tandis que la sixième face sert de support lorsque le Rubik's Cube assemblé n'est pas utilisé. Le mécanisme de pivot interne du Rubik's Cube permet d'ajuster les motifs microfluidique du Rubik's Cube sur une face fonctionnelle, motifs obtenus par estampage (déformation d'un objet ou d'une surface plane à chaud et de façon irréversible, grâce à une "matrice" installée sur une presse hydraulique, mécanique ou à vis – appliquée sur la zone désirée).

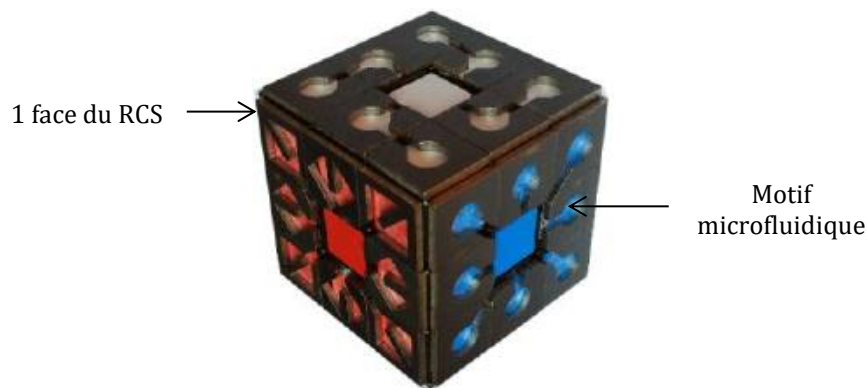


Figure 43 : Dispositif analytique papier en format Rubik's Cube. D'après Fu, H., Yang, J. *et al.* 2017.

Les auteurs affirment qu'une telle méthode d'estampage est assez simple et peu coûteuse, et peut être mise en œuvre facilement par des utilisateurs non formés, dans des environnements à ressources limitées comme les petits laboratoires, ou même à domicile et sur le terrain. De plus, l'utilisation d'aptamères couplés à des enzymes permet une amplification du signal sur le dispositif Rubik's Cube qui, lié à un glucomètre personnel dans le cas d'une analyse du glucose sanguin par exemple, permet une lecture portable, rapide et quantitative. L'utilité du Rubik's Cube en papier a été démontrée avec la détection sensible et spécifique, en quelques minutes, de l'adénosine dans des urines non diluées.

3.4.2. Ecoulement et mélange des fluides

Les dispositifs papier peuvent nécessiter le dépôt et le mélange de plusieurs fluides sur un même support, afin de permettre la réaction immunologique ou moléculaire nécessaire à la détection de l'analyte d'intérêt. Pour cela, différentes études ont été menées afin d'optimiser l'écoulement et le mélange de fluides à une échelle microscopique, ce qui reste problématique. L'écoulement des fluides au niveau microscopique sur un support poreux peut être défini par le nombre de Reynolds Re , qui est le rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité qui s'appliquent au sein d'un fluide en mouvement (Reynolds 1884) (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Formule du nombre de Reynolds (Re). D'après Reynolds, 1884.

Formule	Composantes	Unités
$Re = \frac{\rho VL}{\eta}$	ρ : masse volumique du fluide	kg.m^{-3}
	V : vitesse d'écoulement du fluide	m.s^{-1}
	L : la taille du système microfluidique	m
	η : viscosité dynamique du fluide	$\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$

Dans des dimensions microfluidiques, Re varie entre 0,0001 et 0,5, et jusqu'à des valeurs supérieures à 2300 dans des environnements macrofluidiques (Français and Molinaro 2016). Ainsi, dans un système microfluidique, l'écoulement des liquides est principalement laminaire (Gervais, de *et al.* 2011) (**Figure 44a**) car les forces visqueuses dominent les forces d'inertie, et est caractérisé par un Re faible (**Figure 44b**), rendant difficile le mélange de différents fluides s'écoulant au sein du même système microfluidique.

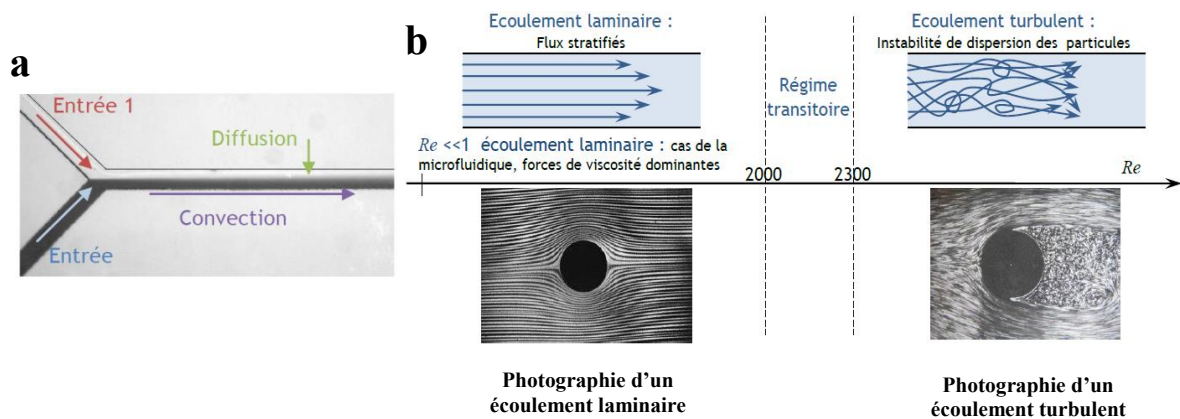


Figure 44 : Comportement d'un fluide dans un dispositif microfluidique. a) illustration de l'écoulement laminaire de 2 fluides dans un même canal microfluidique ; b) caractérisation des différents types d'écoulements des fluides en fonction du Re .

Source : Français *et al.* 2016 et <http://images.math.cnrs.fr/>

Plusieurs solutions ont été proposées pour favoriser le mélange de différents fluides sur le support papier, notamment grâce à des systèmes de mélanges dits actifs *via* l'utilisation de pompes (Thomas and Bessman 1975, Lee 2007, Funke, Buchenauer *et al.* 2010). Cependant, ces systèmes sont coûteux et peu robustes. C'est pourquoi des systèmes de mélanges « passifs » ont également été développés (Werts, Raimbault *et al.* 2012), car peu coûteux, fiables et facilement intégrables aux dispositifs POC bas coût (Français and Molinaro 2016). Un mélange passif ne nécessite aucun dispositif autre que les liquides et le support. La mise en contact des liquides sur le support suffit à leur mélange (**Figure 45a**), cependant un temps d'exposition plus long est nécessaire.

Il est possible d'obtenir un mélange de deux liquides au sein d'un circuit microfluidique en mettant ces deux liquides en contact suffisamment longtemps lors de la migration. On observera alors leur mélange par diffusion de façon passive, c'est-à-dire sans l'aide d'un

mécanisme de mélange (**Figure 44a** et **Figure 45a**). En s'éloignant de la source du dépôt des fluides, des gradients de concentrations sont observés (**Figure 45a**) (Werts, Raimbault *et al.* 2012).

Stroock *et al.* ont montré en 2002 que l'insertion de motifs au sein du dispositif microfluidique, tels que des chevrons alternés obtenus par estampage du support papier microfluidique, produit des turbulences permettant le mélange de fluides (Stroock, Dertinger *et al.* 2002) (**Figure 45b**). La perforation du support peut également conduire à une diffusion et un mélange plus efficace des fluides (Zhong, Wu *et al.* 2015) (**Figure 45c**).

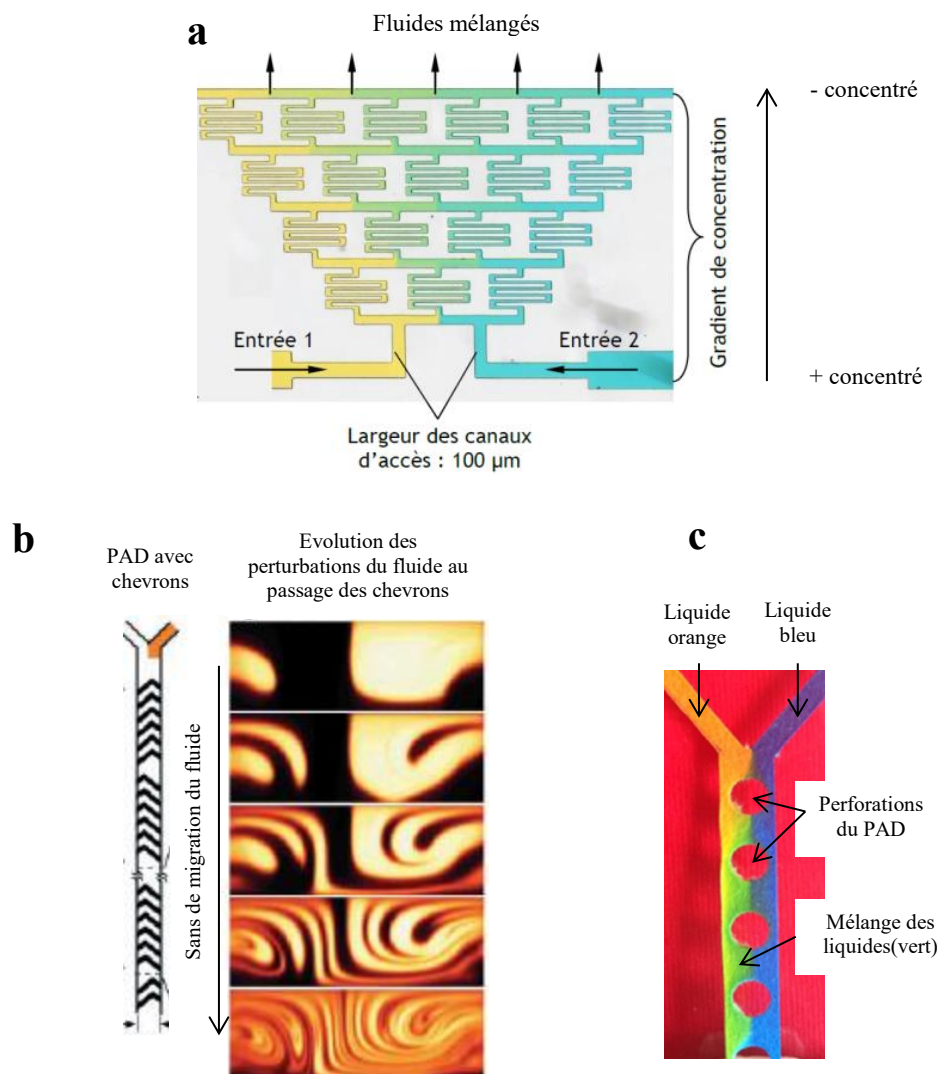


Figure 45 : Systèmes de mélanges de fluides dans un circuit microfluidique. a) micro-mélanges par diffusion et gradients de concentrations de deux liquides dans un système microfluidique 2D ; b) motifs de chevrons alternés, en surface du PAD, et les turbulences observées au leur niveau au passage d'un fluide ; c) mélange par diffusion de deux fluides au passage de figures géométriques découpées dans le PAD. D'après Werts *et al.* 2012, Stroock *et al.* 2002, Zhong *et al.* 2015.

Il est également possible de contrôler la vitesse d'écoulement du liquide biologique sur le support papier. Giokas *et al.* ont montré en 2014 que l'abrasion du papier sur sa longueur ou sa largeur, avec une pointe très fine, permet de former des canaux pouvant accélérer ou ralentir la vitesse du flux de migration du liquide dans le PAD (**Figure 46**) (Giokas, Tsogas *et al.* 2014).

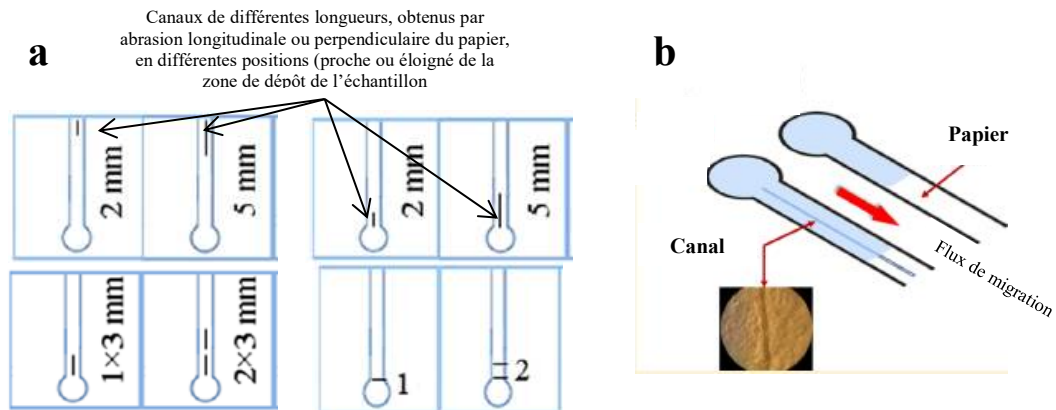


Figure 46 : Formation d'un canal microfluidique par abrasion du support papier. a) illustration de l'abrasion longitudinale ou perpendiculaire du support papier pour la formation de canaux microfluidiques ; b) illustration de la différence de migration d'un fluide avec ou sans canal microfluidique dans le support papier. D'après Giokas *et al.* 2014.

Une solution alternative consiste à placer des obstacles physiques sur le PAD et sur le flux du liquide biologique, de façon à le ralentir et contrôler la migration de l'échantillon. Houghtaling *et al.* ont utilisé un pont en saccharose qui permet de relier deux membranes de papier en nitrocellulose (**Figure 47a**). Lors du passage d'un liquide, le pont va absorber le fluide et va se dissoudre. Plus le pont sera fin, plus la dissolution sera rapide. Une fois qu'un volume défini de liquide est passé d'une membrane de papier à l'autre *via* ce pont, il y a rupture de celui-ci, stoppant la migration du fluide (Houghtaling, Liang *et al.* 2013) (**Figure 47b**).

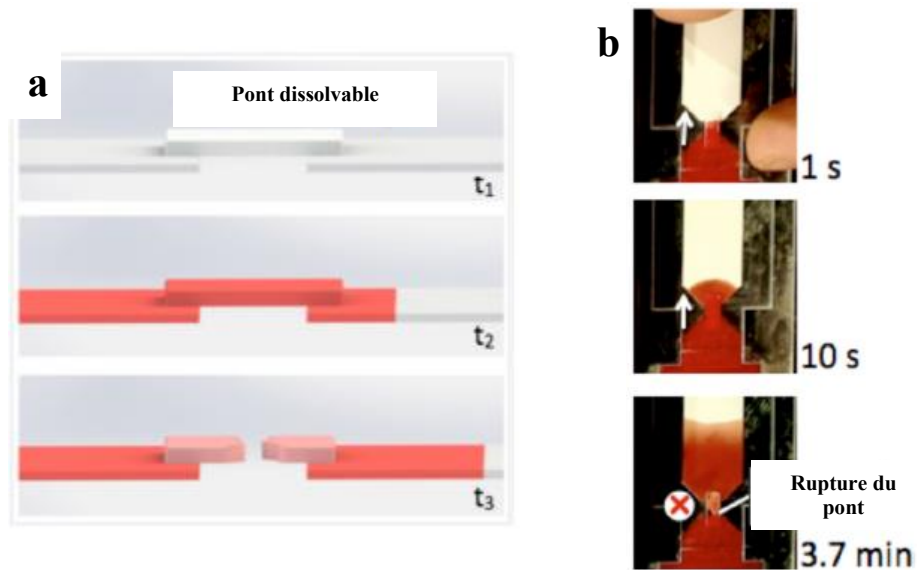


Figure 47 : Contrôle de l'écoulement d'un fluide par utilisation d'un pont dissolvable. a) illustration du pont dissolvable déposé sur le PAD ; b) migration du fluide et la dissolution du pont au cours du temps. D'après Houghtaling *et al.* 2013.

Bhushan J. Toley *et al.* ont proposé en 2013 d'utiliser un PAD absorbant, fait de cellulose et déposé à la surface de la membrane de cellulose composant le test, pour ralentir le flux de migration de l'échantillon biologique (**Figure 48b**). Les auteurs ont montré qu'il était possible de faire migrer plus ou moins rapidement le liquide le long de la bandelette test en utilisant un PAD absorbant plus ou moins long. En effet, plus le PAD est long, plus la migration sera longue (**Figure 48c**). Il est également possible de jouer sur l'épaisseur du PAD absorbant : plus il sera épais, plus le flux sera ralenti en comparaison d'un test sans PAD absorbant (**Figure 48a**). (Toley, McKenzie *et al.* 2013).

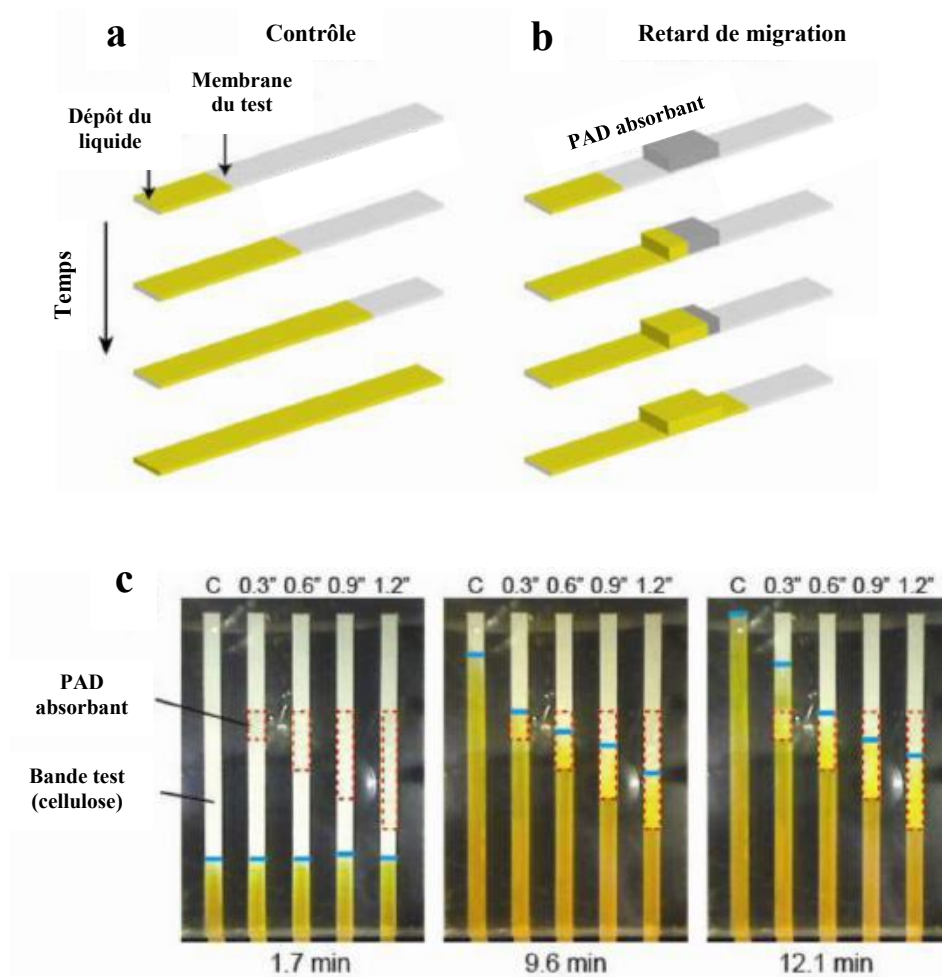


Figure 48 : Contrôle de l'écoulement d'un fluide pas utilisation d'un PAD absorbant.
a) membrane sans PAD absorbant (contrôle négatif) ; b) membrane test avec PAD absorbant et illustration du retard de migration du fluide; c) photographies du test avec des PAD absorbants de différentes longueurs, et observation du délai de migration.
D'après Toley *et al.* 2013.

3.4.3. Méthodes de détection et révélation

Afin de visualiser le résultat du test diagnostique sur support bas coût, différentes méthodes de détection et de révélations ont été développées, et appliquées à de nombreux domaines tels que le biomédical, l'environnemental et l'agro-alimentaire (Liana, Raguse *et al.* 2012, Cate, Adkins *et al.* 2014). Les principales méthodes sont présentées dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Récapitulatif des principales méthodes de détection sur support papier.

Méthodes de détection		Références
Colorimétrie	Enzymatique	Martinez, Phillips <i>et al.</i> 2010
	Immunoessais	Bagherbaigi, Córcoles <i>et al.</i> 2014
	Nanomatériaux	Tsai, Shen <i>et al.</i> 2013
Electrochimique		Noiphung, Songjaroen <i>et al.</i> 2013
Fluorescence		Zhang, Zuo <i>et al.</i> 2015
Chimioluminescence et Electrochimioluminescence		Cormier 2013, Zhang, Ge <i>et al.</i> 2013
Hybride (différentes techniques sur un même support)		Rattanarat, Dungchai <i>et al.</i> 2014

La détection colorimétrique est l'une des approches les plus couramment utilisées car la plus simple à mettre en œuvre (Lin, Gritsenko *et al.* 2016, Morbioli, Mazzu-Nascimento *et al.* 2017). Martinez *et al.* ont été les premiers à démontrer l'utilité de la détection du glucose sanguin sur un support microfluidique papier (Martinez, Phillips *et al.* 2007). Cette détection a été largement étudiée par la suite (Zhu, Feng *et al.* 2014, Gabriel, Garcia *et al.* 2016, Wang, Li *et al.* 2018). Son fonctionnement repose sur deux réactions enzymatiques. La première réaction consiste en la dégradation du glucose par l'enzyme glucose-oxydase, avec production de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , au niveau de la zone de détection. La seconde réaction est catalysée par l'enzyme peroxydase, qui va utiliser le peroxyde d'hydrogène précédemment formé et un agent chromogénique incolore à base de phénol, comme substrats. Le produit de cette réaction enzymatique donne un agent chromogénique coloré (Jokerst, Adkins *et al.* 2012, Morbioli, Mazzu-Nascimento *et al.* 2017) (**Figure 49a**). Il est possible d'utiliser du chitosane afin d'amplifier et d'homogénéiser le signal de détection (Gabriel, Garcia *et al.* 2016) (**Figure 49b**). Le chitosane est une substance dérivée de la chitine, composant principal de la carapace des insectes et des crustacés, retrouvé également chez les champignons. Il est utilisé dans de

nombreux domaine, tels que la cosmétique et la diététique. En médecine, il est employé dans la régénération tissulaire et pour la vectorisation de biomatériaux (de Arruda, Pereira *et al.* 2017).

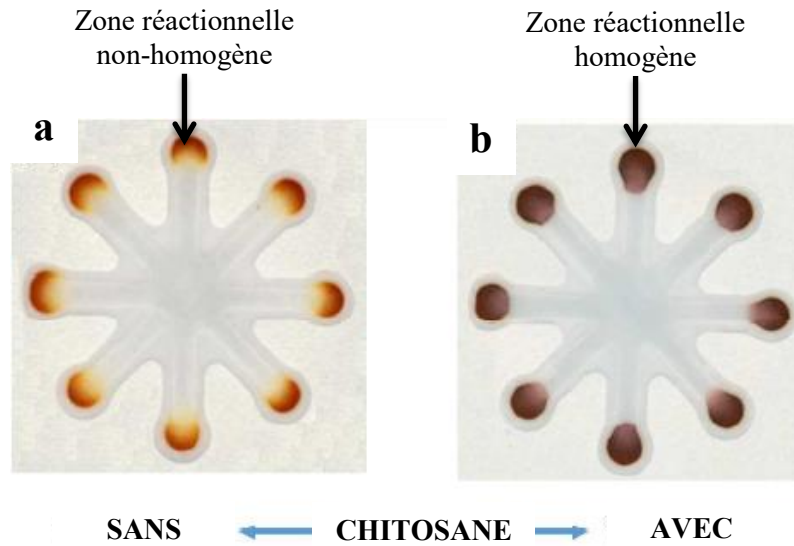


Figure 49 : Détection colorimétrique de glucose sur PAD en deux dimensions, avec chitosane (a) ou sans chitosane (b) incorporé à la cellulose du papier.
D'après Gabriel *et al.* 2016.

La détection colorimétrique peut également se faire par l'intermédiaire d'une réaction immunologique. Bagherbaigi *et al.* ont montré qu'il était possible de détecter l'hormone chorionique gonadotrophine humaine (HCG, produite par la femme au cours de la grossesse) sur un support microfluidique à base de coton (Bagherbaigi, Córcoles *et al.* 2014). La protéine à détecter est capturée *via* un anticorps adsorbé à la surface du coton, et révélée par une enzyme conjuguée à un anticorps dirigé contre la protéine. L'ajout du substrat de l'enzyme permet sa dégradation et l'obtention d'un produit coloré, révélant une réaction positive.

L'utilisation de nanomatériaux est également rapportée (Doughan, Noor *et al.* 2017, Gabriel, Garcia *et al.* 2017). De nombreux tests de diagnostic reposent sur l'utilisation de nanoparticules d'or (AuNPs) car elles sont plus stables que les molécules organiques précédemment citées, et présentent une meilleure sensibilité de détection (Zhao, Ali *et al.* 2008, Veigas, Jacob *et al.* 2012, Cate, Adkins *et al.* 2014, Veigas, Fortunato *et al.* 2015). De nombreux tests diagnostic utilisant les AuNPs ont été développés, principalement des LFA, pour la détection de maladies infectieuses (Tsai, Shen *et al.* 2013, Zarei 2018), de biomarqueurs

cancéreux (Wu, Xue *et al.* 2013) ou d'ions tels que le cadmium Cd^{2+} (López Marzo, Pons *et al.* 2013). Le principe repose sur le couplage des AuNPs colorées (le plus souvent en rouge) à un anticorps dirigé contre l'antigène à détecter. L'anticorps de capture est adsorbé à la surface du PAD, au niveau de la zone de test. Les anticorps de détection dirigés contre l'antigène, et couplés aux AuNPs, vont ensuite fixer l'antigène. Le complexe immunitaire ainsi formé migre jusqu'à la ligne test et va être fixé par l'anticorps de capture. L'accumulation des AuNPs sur la zone test provoquera l'apparition d'une bande rouge, indiquant une réaction positive (**Figure 50**) (Lee, Nordman *et al.* 2013).

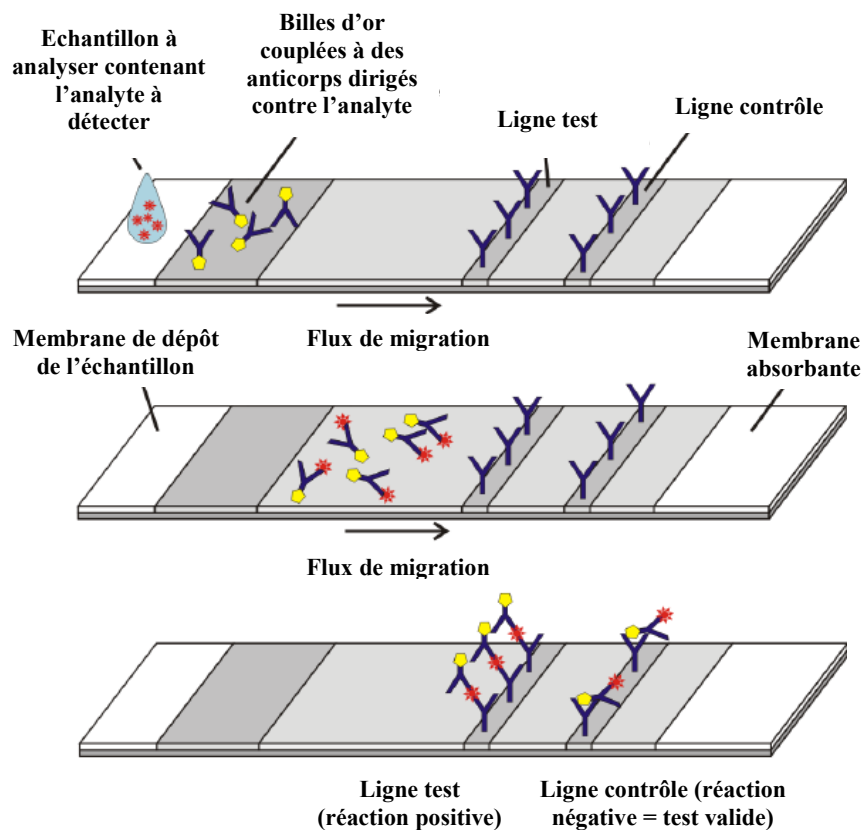


Figure 50 : Représentation illustrative d'une réaction colorimétrique utilisant des AuNPs sur support LFA. D'après Lee, Nordman *et al.* 2013.

La détection électrochimique repose sur l'utilisation d'un système d'électrodes (Godino, Gorkin *et al.* 2012), directement intégrées au PAD, pour la détection de nombreux analytes, tels que des biomarqueurs cancéreux (Ge, Zhang *et al.* 2017). Noiphung *et al.* ont développé un PAD pour la détection électrochimique du glucose dans un échantillon de sang total, en utilisant

des électrodes en carbone (Noiphung, Songjaroen *et al.* 2013). L'utilisation de trois électrodes différentes (détection, quantification et de référence) permet une détection d'analytes avec une sensibilité de l'ordre du nanomolaire (**Figure 51**) (Dungchai, Chailapakul *et al.* 2009, Newman and Thomas-Alyea 2012).

Santhiago *et al.* ont développé un PAD papier avec une détection électrochimique du glucose sanguin utilisant des électrodes en graphite. La glucose-oxydase catalyse, en présence d'oxygène, l'oxydation du glucose en acide gluconique. Du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est également libéré comme produit de la réaction enzymatique et il oxyde un acide présent sur le PAD (l'acide p-aminophénylboronique), formant entre autres des ions 4-aminophénol (4-AP). Le composé 4-AP est électroactif et peut être détecté électrochimiquement par les électrodes *via* le potentiel électrique généré par ce composé (Santhiago and Kubota 2013).

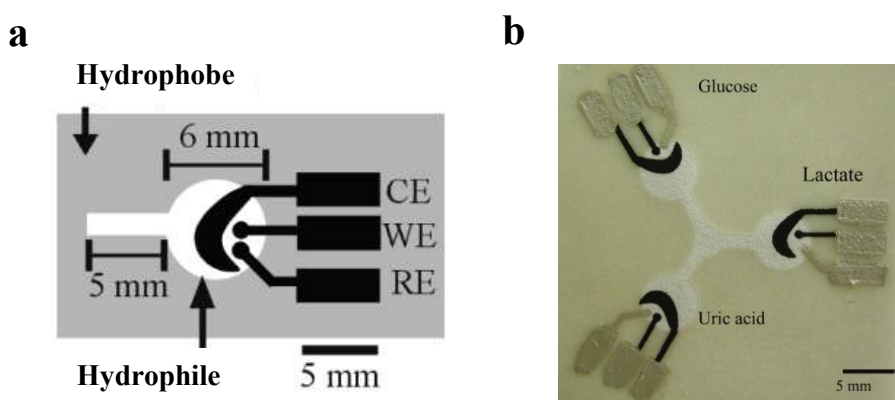


Figure 51 : PAD papier avec une détection électrochimique du glucose sanguin utilisant des électrodes en graphite. a) schéma d'un système d'électrodes. CE : électrode de quantification ;

WE : électrode de détection ; RE : électrode de référence ; b) photographie d'un système d'électrodes pour la détection de glucose, de lactate et d'acide urique sur un PAD.

D'après Dungchai *et al.* 2009.

Les méthodes de détection utilisant la fluorescence reposent sur l'utilisation de fluorophores (fluorescéine, FITC...) qui, lorsqu'ils sont excités, vont émettre une fluorescence, observable avec des systèmes optiques variés (microscopes à fluorescence, lecteurs de fluorescence portatifs, scanners à fluorescence ou lecteurs de microplaques) (Thom, Lewis *et al.* 2014, Zeming, Salafi *et al.* 2018), ou à l'œil nu. Cette technique a l'avantage de présenter une sensibilité et spécificité de détection plus forte que la colorimétrie (Zheng, Tan *et al.* 2013). Hatai *et al.* ont publié en 2012 leurs travaux sur la détection d'ions métalliques lourds dans les cellules humaines et animales. Ils ont développé un capteur chimique pour la détection sélective

d'ions mercure Hg^{2+} . Ce capteur combine une fluorescéine et de l'histidine, couplées à du thiocarbamate (composé organosulfuré). Ce composé fournit des atomes de soufre au capteur, ce qui a pour conséquence d'augmenter la spécificité du dispositif au mercure (Carter, Young *et al.* 2014), et d'amplifier par 19 le signal fluorescent. Ce chimio-capteur a été utilisé sur des tests papier pour la détection d' Hg^{2+} dans des échantillons aqueux, ainsi que pour l'imagerie d' Hg^{2+} chez les poissons zèbres adultes et dans les cellules du carcinome épithélial humain (Hatai, Pal *et al.* 2012).

Nicole K. Thom *et al.* ont développé en 2014 un PAD en trois dimensions contenant une pile interne qui permet d'alimenter une diode électroluminescente (DEL) (Thom, Lewis *et al.* 2014). Lorsqu'une solution aqueuse est ajoutée, la batterie est activée et la DEL va s'allumer pour éclairer la région du PAD où la réaction se déroule (**Figure 52a**). Dans cette étude, le système de détection repose sur l'activité de l'enzyme β -D-galactosidase. Si l'enzyme se trouve dans l'échantillon, elle va hydrolyser le galactose présent sur le PAD. Un composé faiblement fluorescent, intégré au PAD, va alors libérer de la fluorescéine (Cho and Sessler 2009), faisant ainsi augmenter la fluorescence. Ce signal fluorescent est ensuite capturé à l'aide d'un téléphone portable (**Figure 52b**), puis quantifié (Ma, Li *et al.* 2012).

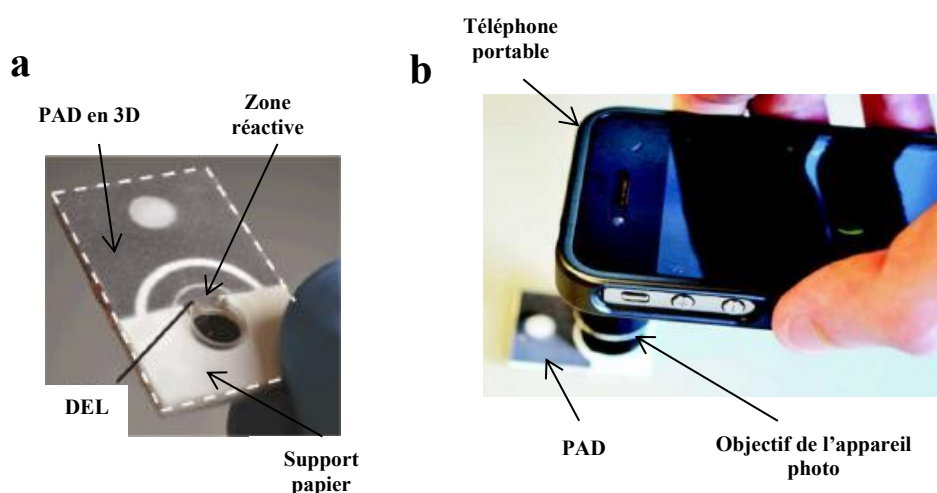


Figure 52 : PAD utilisant une diode et de la fluorescence comme système de révélation. a) photographie du PAD en 3D ; b) prise en photo de la fluorescence sur la zone réactive du PAD, avec un téléphone portable. D'après Thom *et al.* 2014.

L'un des avantages des réactifs utilisant de petites molécules chimiques, par rapport aux réactifs classiques, est leur stabilité thermique à long terme. Cette stabilité thermique à long terme est une caractéristique qui sera particulièrement utile dans les pays chauds et dans les environnements à ressources limitées, éloignés de toute structure médicale (Thom, Lewis *et al.* 2014).

La chimioluminescence est proche de la fluorescence à la différence que le signal émis est obtenu par réactions chimiques entre 2 composés qui sont catalysés, ou se déplacent d'un état stable vers un état excité (Cormier 2013). Il existe deux mécanismes différents dans le processus de chimioluminescence : i) l'oxydation de réactifs chimiques ; ii) l'augmentation ou l'inhibition des composés luminescents (Chen, Lin *et al.* 2014). De la même façon, l'électrochimioluminescence repose sur la luminescence émise par une réaction électrochimique. Plus précisément, le phénomène repose sur des réactions de transferts d'électrons qui ont lieu entre deux radicaux, l'un anionique et l'autre cationique (Swanick, Ladouceur *et al.* 2012, Lin, Gritsenko *et al.* 2016).

Enfin, il est possible de combiner plusieurs systèmes de détection, afin d'augmenter le niveau de sensibilité du test. Yan *et al.* ont développé en 2013 un PAD 3D origami, utilisant des aptamères en capture, avec un système de détection électrochimioluminescent couplé à des électrodes à base de papier poreux utilisant des AuNPs (Yan, Yan *et al.* 2013). Tous les systèmes de détection précédemment décrits ont été développés pour une utilisation sur un support papier, dans le but de permettre une détection plus sensible de différents analytes (Liu, Cassano *et al.* 2013, Santhiago, Nery *et al.* 2014, Mauk, Song *et al.* 2018).

Malgré de nombreuses avancées dans le domaine du diagnostic sur support papier, les résultats obtenus sont majoritairement qualitatifs ou semi-quantitatifs. Pour pallier cet inconvénient, l'adoption de nouveaux procédés d'ingénierie et de fabrication sont à étudier, tels que l'étude de nouveaux types de papier et l'introduction de technologies de pointe pour une fabrication de masse. Tous ces paramètres ouvrent la voie au diagnostic personnalisé et pourraient éventuellement améliorer la qualité de vie des personnes concernées (Mahato, Srivastava *et al.* 2017).

3.5. Supports alternatifs pour la fabrication de dispositifs microfluidiques

La cellulose et la nitrocellulose sont les composants majeurs des tests bandelettes disponibles dans le commerce (Pelton 2009). La cellulose est principalement utilisée en tant que filtre et pour les tests chromatographiques. La nitrocellulose est un élément important des tests LFA car elle compose la bandelette où se déroule la réaction immunologique de détection. Cependant, de nombreux autres matériaux ont été développés pour la fabrication de tests bas coût.

Maowei Dou *et al.* ont développé un PAD hybride papier / PDMS (polydimethylsiloxane), un polymère siliconé, pour la détection de la bactérie *Neisseria meningitidis*, responsable de méningite aiguë chez l'Homme, par la technologie LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*), c'est-à-dire l'amplification isothermale (à température constante) de l'ADN bactérien (Li, Fan *et al.* 2017) (**Figure 53**). Les auteurs affirment que leur système hybride offre une grande polyvalence, en fournissant à la fois un diagnostic qualitatif auprès du patient, ainsi que des tests de confirmation et des analyses quantitatives en laboratoire. La limite de détection de *N. meningitidis* obtenue avec ce dispositif est d'environ 3 copies d'ADN par zone de détection LAMP (2mm de diamètre) en environ 45 minutes, ce qui est proche de la sensibilité de détection d'une seule bactérie. Ce dispositif ne nécessite pas l'étape de préparation des échantillons en amont, ni d'équipement annexe. Enfin, ce système hybride et bas coût fournit un diagnostic rapide et sans instrument de *N. meningitidis* dans des environnements à ressources limitées (Dou, Dominguez *et al.* 2014).

Il est également possible d'utiliser un film flexible (Focke, Kosse *et al.* 2010), constitué de polymères et disponible dans le commerce. Des circuits fluidiques sont dessinés sur ce film, par « etching » (abrasion) ou exposition aux UV (cf. **chapitre 3.4.1.1.**). Ce film est ensuite disposé entre 2 couches de plastique en polyethylene terephthalate (PET) ou polyméthacrylate de méthyle (PMMA), des polymères plastique thermorésistants et transparents. L'assemblage est ensuite laminé à chaud pour former le dispositif fluidique final (Tsai, Yang *et al.* 2006) (**Figure 54**).

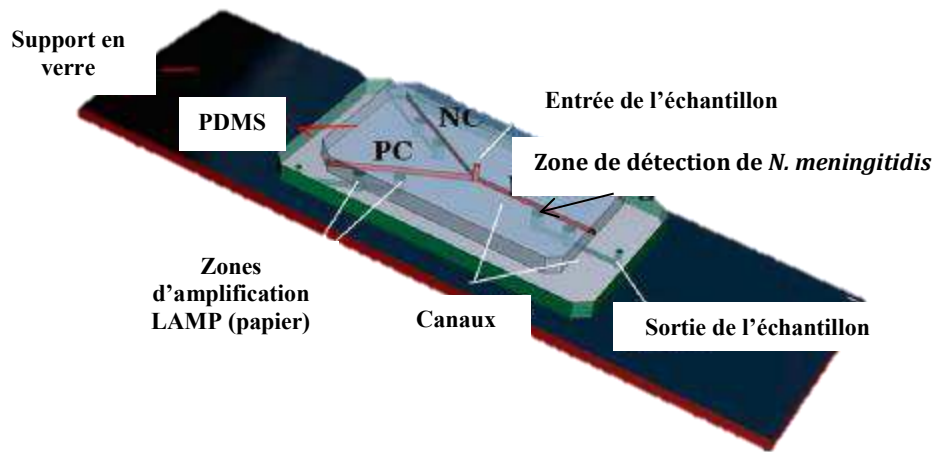


Figure 53 : Illustration du dispositif de diagnostic de *N. meningitidis* par technologie LAMP. La puce se compose d'une couche supérieure et d'une couche intermédiaire en PDMS, et d'une lame de verre pour l'administration de réactifs, la réaction LAMP et le support de structure, respectivement. PC = contrôle positif ; NC = contrôle négatif. D'après Maowei Dou *et al.* 2014.

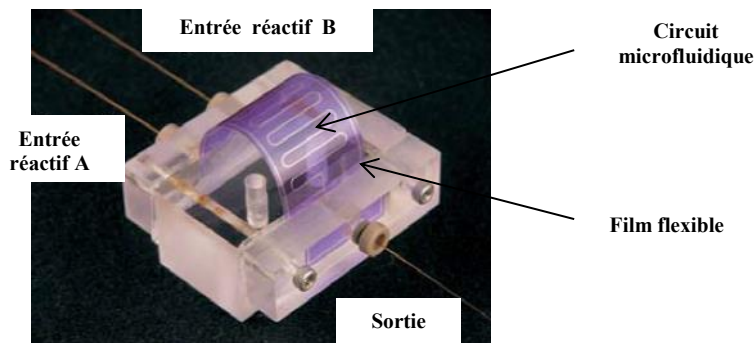


Figure 54 : Dispositif fluide composé d'un film flexible laminé à chaud entre deux couches de plastiques thermorésistants.
D'après Tsai, Yang *et al.* 2006.

Le coton est également un matériau intéressant pour la fabrication de dispositifs microfluidiques 2D. Azadeh Nilghaz *et al.* ont montré en 2011 le procédé de fabrication d'un dispositif microfluidique à base de coton, utilisant la méthode d'impression à la cire pour l'obtention de circuits fluidiques (Nilghaz, Wicaksono *et al.* 2012). Les auteurs ont choisi ce matériau car il se trouve facilement dans le commerce, et est présenté comme un nouveau support peu coûteux, léger et flexible pour la fabrication de systèmes microfluidiques en deux et trois dimensions. Le motif fluide choisi est imprimé à la cire sur une feuille de papier,

puis est transféré sur un tissu en coton par traitement thermique. La détection colorimétrique de la sérum-albumine bovine (BSA) dans l'urine a été réalisée par observation visuelle directe du changement de couleur du bleu de bromophénol (BPB) dans les zones de réaction du dispositif. Une application diagnostique d'un tel dispositif est donc possible.

L'utilisation de fil de coton a également été étudiée. Safavieh *et al.* ont analysé les capacités de migration de différents fluides au sein d'un fil de coton (**Figure 55a**). La vitesse d'écoulement est lente, la migration est stochastique (non-fluide) et sensible à l'humidité relative. Il en a été déduit que les fils de coton ne sont pas optimisés pour le flux capillaire. Pour pallier ces obstacles, les fils ont été enduits de cire ou d'autres additifs qui améliorent le glissement et empêchent le déchirement du fil, mais qui le rendent hydrophobe. En utilisant le même fil après traitement par un plasma (état de la matière constitué de charges électriques, obtenu par chauffage à très haute température ou application d'un champ électrique intense), le liquide avance plus rapidement au sein du fil (**Figure 55b**).

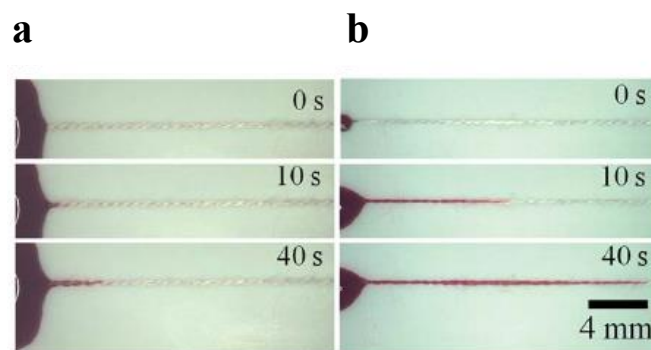
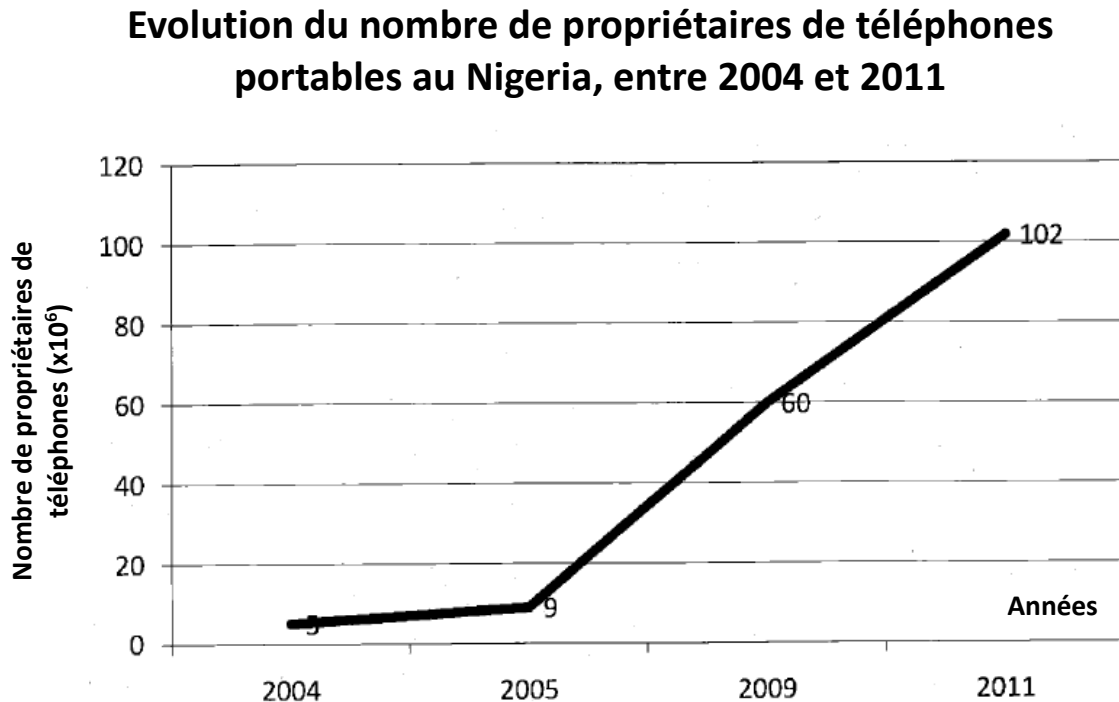


Figure 55 : Migration d'un fluide au sein d'un fil de coton. a) migration d'un colorant rouge dans un fil de coton sec ; b) illustration de la migration du même colorant qu'en (a) mais sans fil de coton pré-activé avec du plasma d'air. D'après Safavieh *et al.* 2011.

3.6. Obtention et lecture des résultats : essor du smartphone

Les pays émergents sont considérés par les fabricants de téléphones portables et les opérateurs mobiles comme le prochain marché à conquérir, le marché des pays développés étant arrivé à maturité. Les professionnels de la téléphonie mobile s'intéressent désormais aux « *next billions* », c'est-à-dire aux milliards d'habitants restants à équiper en « *smartphone* » (téléphones multifonctions connectés à Internet). En effet, un rapport de Gartner datant de 2014 prévoyait qu'en 2018, 78 % des ventes mondiales de smartphones concerneraient les pays en

développement. Par exemple, au Nigeria entre 2004 et 2011, le nombre de propriétaires de téléphones portables est passé de 5 millions à 102 millions (**Figure 56**). De plus, ce rapport prévoyait également que plus de 50% des utilisateurs se serviraient en priorité d'une tablette ou d'un smartphone pour effectuer toutes leurs activités en ligne (<https://www.gartner.com/newsroom/id/2939217>).



Seulement 450 000 lignes fixes opérationnelles en 2001

Figure 56 : Graphique représentant l'évolution du nombre de propriétaires de téléphones portables au Nigeria, entre 2004 et 2011.

Sources : American Society for Microbiology et Institut Mérieux.

Dans ce contexte, le smartphone peut être considéré comme l'un des appareils le plus prometteur pour le développement de plateformes de diagnostic POC, permettant une prestation de soins de santé mobile et une médecine personnalisée. Avec plus de 6,5 milliards d'abonnés à un forfait de téléphonie mobile dans le monde et environ 1,6 milliards de nouveaux appareils vendus chaque année, la technologie des téléphones portables crée également de nouvelles opportunités, notamment dans le diagnostic *in vitro* (Vashist, Mudanyali *et al.* 2014). Début 2012, la revue scientifique *The Scientist* a récompensé un microscope miniature couplé à un téléphone, surnommé LUCAS (**Figure 57**) dans son classement des meilleures innovations de

l'année 2011 (<https://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/31522/title/Top-Ten-Innovations-2011/>). Son inventeur, le Dr. Aydogan Ozcan, affirme qu'il ne coûte que \$10 et à vocation à remplacer les instruments de microscopie très élaborés pour une utilisation sur le terrain.



Figure 57 : L'appareillage LUCAS. a) microscope holographique à super-résolution de pixels « Lensfree » ; b) téléphone couplé au microscope Lensfree ; c) signature en image du parasite de la malaria dans des globules rouge. Source : « *Accelerating commercialization of cost-saving health technologies* » de Booz|Allen|Hamilton et California Healthcare Foundation (mai 2012).

De nombreuses applications de diagnostic ont été développées pour une utilisation avec un smartphone (**Figure 58**), afin d'aider à la lecture et à l'analyse des résultats après prise d'une photo sur la zone de lecture du test, et analyse de l'intensité de la bande ou du spot avec une application embarquée (Lee, Kim *et al.* 2013, You, Park *et al.* 2013).

Un des principaux avantages de l'utilisation d'un smartphone dans le diagnostic auprès du patient est qu'ils produisent des documents authentifiés à moindre coût pour le référencement et la traçabilité.

En raison du potentiel du diagnostic assisté par smartphone, des collaborations ont été initiées entre les principaux fabricants de téléphones et des industriels du domaine de la santé (Mahato, Srivastava *et al.* 2017). Par conséquent, il y a une émergence forte d'appareils de diagnostic basés sur les téléphones pour les soins de santé généraux (Vashist, Mudanyali *et al.*

2014). Bien que divers prototypes aient été proposés, aucun d'entre eux n'est commercialisé à ce jour.

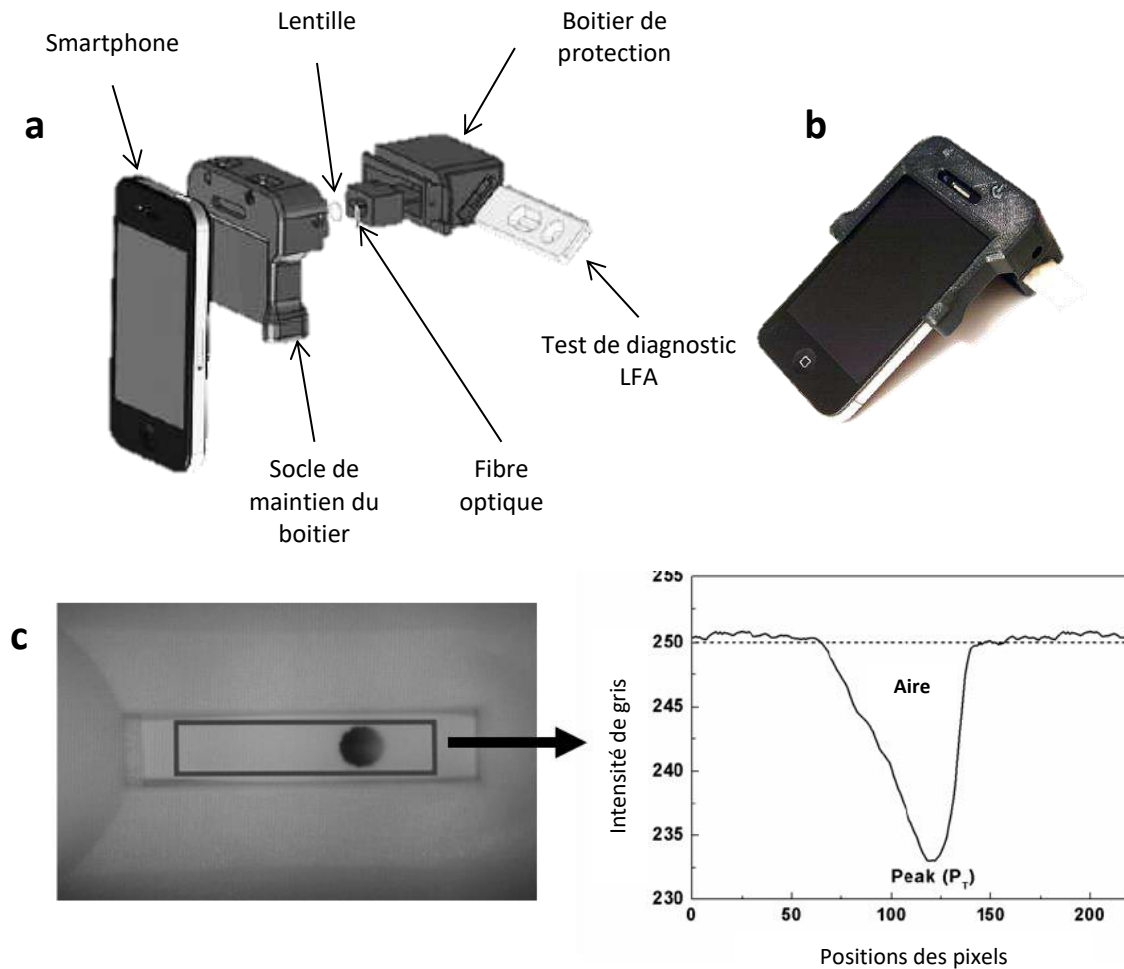


Figure 58 : Lecture d'un résultat de PAD papier avec un système smartphone. a) vue éclatée du système de diagnostic de type LFA couplé à un smartphone ; b) téléphone couplé au système de lecture de test LFA. D'après You D.J. *et al.* 2013 ; c) exemple de photographie d'une zone de test et analyse de l'intensité du spot *via* application sur le téléphone. D'après Lee S. *et al.* 2013.

Ces différentes technologies mobiles permettent d'améliorer l'autogestion des patients atteints de maladies chroniques, de suivre les personnes avec un handicap ou des personnes âgées, et avec un minimum d'interférence dans leur vie quotidienne (Vashist, Mudanyali *et al.* 2014). Cependant, la compatibilité de ces systèmes avec les critères « bas coût » définis par l'OMS pour le développement de tests à destination des pays émergents reste un point à améliorer. En effet, l'acquisition d'un téléphone portable avec un appareil photo (smartphone)

et d'un abonnement téléphonique pour un accès internet, afin de transmettre des données à un médecin, représentent un investissement important, limitant ainsi l'accès d'une certaine partie de la population à ces solutions. Il est donc important de travailler au développement de solution bas coût pour ces systèmes également, et pas seulement sur le test diagnostic en lui-même.

La réalité du terrain révèle que 89% des nigériens et 76% des bangladais ont un téléphone portable, quand seulement 1% des habitants ont une ligne de téléphonie fixe au Nigeria, au Ghana, au Bangladesh, en Ouganda ou au Togo. Dans ce dernier pays, depuis l'arrivée de constructeurs de téléphones chinois tels que Huawei ou Xiaomi, la téléphonie mobile est accessible à tous, avec des téléphones portables à moins de 10€ et des smartphones à moins de 40€ (Frintz 2015). Ces prix attractifs sont dus à la politique des constructeurs chinois, dont la compétitivité du prix devient le critère essentiel. En effet, ces constructeurs proposent des modèles de smartphones ultra-compétitifs et un rapport nombre de fonctionnalités/prix que ne peuvent se permettre les géants du secteur, comme Samsung ou Apple. De plus, de par la diminution de l'écart de prix entre un téléphone mobile classique et un smartphone d'entrée de gamme, de nombreux habitants de pays émergents remplacent leur ancien téléphone par un smartphone (Lucas 2015). Il est aisé de se procurer ces téléphones, notamment sur les plateformes de vente en ligne. Les sites alibaba.com et aliexpress.com, appartenant au groupe « *Alibaba Group Holding Limited* » et présidé par Jack Ma (fondateur d'alibaba.com), permettent d'acquérir facilement et à très bas prix de nombreux smartphones, par lot de plusieurs pièces ou à l'unité.

En conclusion, les téléphones mobiles, et notamment les smartphones, peuvent être d'une grande utilité pour les applications diagnostiques, notamment grâce aux dernières avancées technologiques en matière de téléphonie mobile, telles que l'augmentation de la mémoire et de la puissance de traitement des téléphones, la résolution des caméras, le GPS, la connectivité sans fil et les applications (Quesada-González and Merkoçi 2017).

Néanmoins, le succès de l'utilisation de smartphones dans le domaine du diagnostic dépendra fortement de la technologie de détection (fluorescence, électrochimique...) (cf. **chapitre 3.4.3.**), dont dépendra la sensibilité de détection du dispositif. Le diagnostic sur papier semble très prometteur, associé à une quantification sur smartphone (Mahato, Srivastava *et al.* 2017). De plus, dans la plupart des cas, le diagnostic papier couplé au smartphone se suffit à lui-même, sans autre source d'énergie que celle du téléphone lui-même.

Quesada-González and Merkoçi affirment que le développement de la biodétection par smartphone aura pour conséquence de décentraliser les systèmes de soins et les laboratoires actuels. Ils prévoient également la propagation rapide des tests de diagnostic POC et d'autres appareils de surveillance à utiliser au plus près du patient. Ils affirment que ces développements s'inscriront dans le cadre du développement futur des villes intelligentes, dans lesquelles les téléphones mobiles joueront un rôle crucial pour les connexions au réseau (Quesada-González and Merkoçi 2017).

3.7. Systèmes bas coût et détection des arbovirus

Des systèmes de diagnostic *in vitro* ont été développés pour permettre une détection efficace et à moindre coût d'arbovirus. La grande majorité des tests développés et commercialisés sont des tests rapides de type LFA, dont les caractéristiques peuvent ne pas être totalement adaptées au diagnostic dans certains pays à revenus limités, notamment en termes de performances. L'émergence de solutions à bas coût représente une alternative intéressante aux LFA pour ces pays.

Le diagnostic des arbovirus porte sur 2 paramètres : i) la détection du virus dans l'échantillon (par amplification génique avec des techniques de biologie moléculaire, ou la détection des protéines virales par immunoessai) ; ii) la sérologie pour la détection des IgM et/ou IgG spécifiques du virus développées par le patient suite à l'infection. Des expérimentations ont principalement porté sur le développement de l'amplification isothermale, ainsi que la détection de protéines virales sur support bas coût (papier, PDMS, polymères...).

Bruno *et al.* ont développé un test de diagnostic du CHIKV utilisant des aptamères comme outils de capture et de détection de l'ARN viral (**Figure 59**) (Bruno, Carrillo *et al.* 2012). Les aptamères sont de courts fragments d'ARN ou d'ADN simple brin obtenus par voie synthétique, et qui ont la capacité de fixer un ligand spécifique, tel qu'une protéine. Des études ont démontrées que les aptamères peuvent lier les protéines de nombreux virus et inhiber la progression de l'infection, tels que le virus de l'hépatite C (Kikuchi, Umehara *et al.* 2009), le virus de la grippe H5N1 (Cheng, Dong *et al.* 2008) et le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (Ellenbecker, Sears *et al.* 2012). Bruno *et al.* ont développé et criblé une banque d'aptamères ADN, dirigés contre les protéines d'enveloppe du CHIKV, pour les utiliser comme outils de diagnostic du virus sur support papier. Tous les aptamères développés ont été testés comme outil de capture et/ou de détection des protéines d'enveloppe du CHIKV sur le test

immuno chromatographique (IC). Utilisés en détection, les aptamères sont couplés à des billes d'or colloïdales AuNPs. Les résultats obtenus montrent qu'une détection est possible lorsque l'aptamère de capture et celui de détection sont différents. Les aptamères peuvent être considérés comme de la matière première à bas coût, comparativement au développement et à la production d'anticorps monoclonaux traditionnellement utilisés en immunoessai pour la détection virale. En effet, la méthode de production des aptamères – SELEX : *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment* – est un processus efficace, rentable et beaucoup moins long que la méthode d'obtention des anticorps monoclonaux (Chai, Xie *et al.* 2011) qui nécessite une infrastructure plus importante (animalerie, équipement pour la culture cellulaire...).

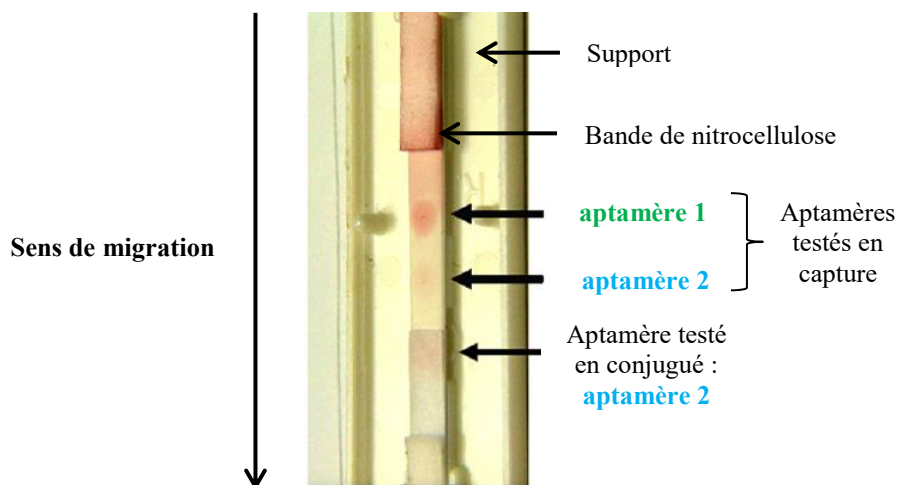


Figure 59 : Test IC utilisant des aptamères dirigés contre les protéines d'enveloppe du CHIKV. D'après Bruno *et al.* 2012.

Bosch *et al.* ont développé un test IC permettant le diagnostic du virus Zika et des 4 sérotypes du virus de la dengue, selon les critères ASSURED (Bosch, de Puig *et al.* 2017). Le test repose sur la détection de la protéine NS1 des virus par utilisation d'anticorps monoclonaux et de nanoparticules d'or colloïdales, sur une bande de nitrocellulose (**Figure 60**). Les auteurs affirment que leur test permet de distinguer les 4 sérotypes de la dengue, et le virus Zika, sans réactions croisées. La sensibilité pour le diagnostic de la dengue a été estimée entre 76% et 100%,

et la spécificité entre 89% et 100% selon les sérotypes. Pour le diagnostic du virus Zika, la sensibilité et la spécificité sont de 81 % et 86 %, respectivement.



Figure 60 : Tests IC pour le diagnostic de la protéine NS1 du virus de la dengue (sérotypage 1) et du virus Zika. C : contrôle interne positif ; NS1 : zone test (capture de la protéine NS1). Un spot rouge sur la zone NS1 indique un résultat positif.
D'après Bosch *et al.* 2017.

Des travaux de Deraney *et al.* ont porté sur le développement d'un test de diagnostic sur support papier et en trois dimensions, pour la détection immunochromatographique et multiplexée des protéines *histidine-rich protein 2* (HRP2) et lactate déshydrogénase (pLDH) de *Plasmodium*, et de la protéine non-structurale 1 (NS1) de DENV sérotype 2 (Deraney, Mace *et al.* 2016) (**Figure 61**). Les antigènes sont dilués à différentes concentrations dans un tampon avant d'être déposés sur le test. Les auteurs ont montré qu'il n'y a pas de différence significative de performances pour la détection de ces antigènes entre l'immunoessai multiplexé et les immunoessais réalisés en simplex. En effet, les réactifs requis pour chaque immunoessai sont séparés spatialement au sein d'une architecture tridimensionnelle, permettant ainsi d'ajuster les conditions expérimentales indépendamment pour chaque essai. La lecture d'un résultat positif se fait par l'apparition d'une coloration rouge sur la zone test. Les limites de détection des antigènes détectés dans un format multiplexé ont été évalués à : 46,1 ng.mL⁻¹ (HRP2), 100,7 ng.mL⁻¹ (pLDH) et 57,9 ng.mL⁻¹ (NS1).

Par la suite, une fois la conception du dispositif et les conditions expérimentales finalisées, les antigènes ont été dilués dans des échantillons de sang humain hémolysé afin de modéliser une matrice plus complexe et réaliste. En effet, un hémolysat est nécessaire afin d'améliorer la sensibilité du test en libérant les antigènes trouvés contenus dans les érythrocytes parasités. Les antigènes de *Plasmodium* sont détectés à la concentration de 500 ng.mL⁻¹,

correspondant à environ 6500 parasites par μL , correspondant au nombre de parasites présents lors de la phase virémique. Des études antérieures ont déterminé que le taux médian de protéine NS1 circulant dans le sérum des patients infectés par DENV est de 126 ng.mL^{-1} . Le résultat expérimental obtenu par les auteurs est de $57,9 \text{ ng.mL}^{-1}$, se situant donc dans cette plage de concentrations cliniquement pertinente, indiquant que ce test pourrait donc être utilisé pour la détermination efficace de l'infection par DENV.

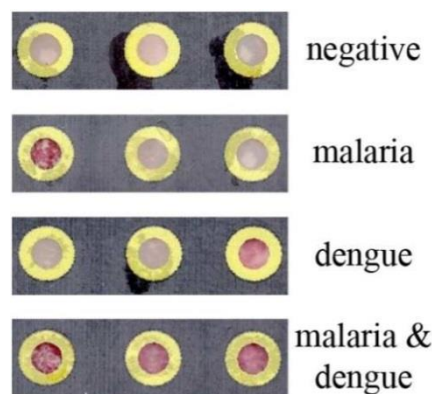


Figure 61 : Tests immunochromatographiques sur support papier pour la détection multiplexée des protéines de *Plasmodium* et de DENV à partir d'hémolysats de patients infectés. D'après Deraney *et al.* 2016.

Un microsystème d'amplification génomique sur micropuce pour la détection des virus de la dengue et d'entérovirus 71 a été mis au point par Lien *et al* (Lien, Lee *et al.* 2007). L'ensemble de la structure est à base de PDMS, et comprend des microbobines magnétiques, des microchauffeurs et des capteurs de température (**Figure 62**). Des modèles d'ARN du virus de la dengue de sérotype 2 et de l'entérovirus (EV) 71 ont été utilisés dans cette étude. Des chambres pour le stockage du tampon de lavage, de l'échantillon et des réactifs de la RT-PCR ont été intégrés au dispositif, avec des microcanaux reliant les différentes chambres. Les différentes solutions sont dirigées vers des chambres réactionnelles grâce à des micro-pompes actionnées par une valve électromagnétique. Des billes de $4,5\mu\text{m}$ de diamètre, fonctionnalisées avec des anticorps dirigés contre les virus à détecter, sont diluées dans une solution de PBS avant d'être chargées dans la chambre de prétraitement de l'appareil. Un échantillon positif pour la dengue est ensuite injecté dans le dispositif, et est capturé par les billes. Les billes liées au virus sont ensuite dirigées dans la chambre réactionnelle et mélangées avec un tampon de lyse préchargé dans le système, à 95°C durant 95 min. Les réactifs de RT-PCR sont ensuite pompés sur la puce et l'amplification génique est effectuée sur 40 cycles. Les produits d'amplification

sont finalement retirés de la chambre réactionnelle et séparés sur un gel d'électrophorèse. Les performances de ce microsystème ont été comparées à un kit d'extraction d'ARN commercial (QIAGEN, Allemagne) et il a été démontré la même efficacité de détection pour les deux méthodes (Lien, Lee *et al.* 2007, Hattersley, Greenman *et al.* 2013).

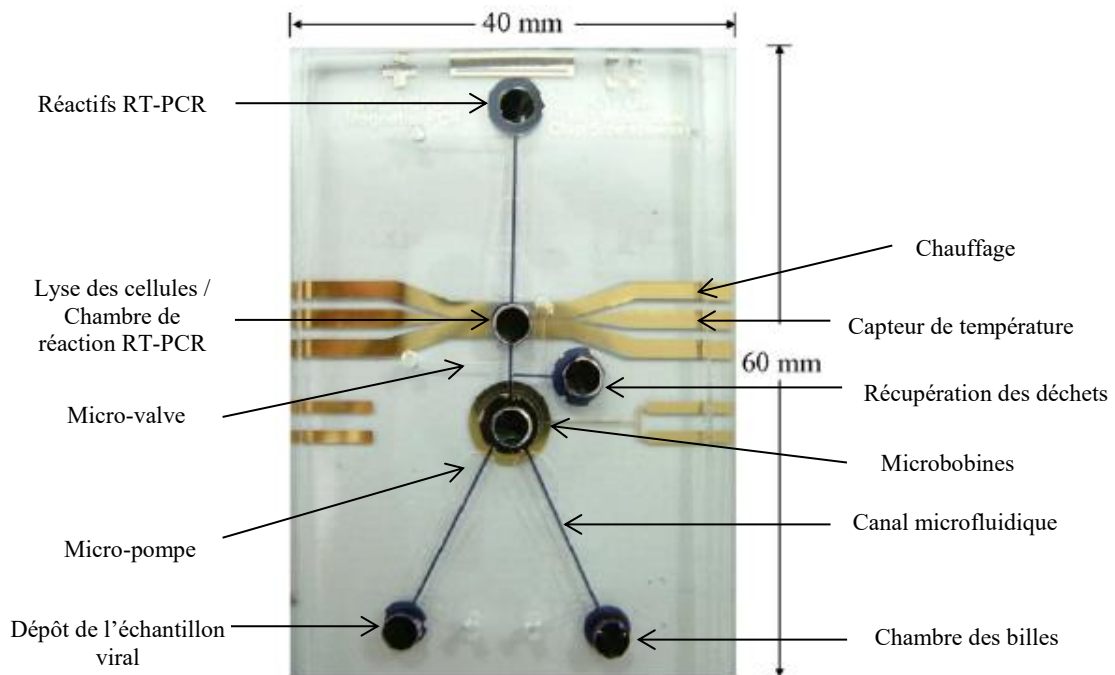


Figure 62 : Système RT-PCR sur micropuce. D'après K-Y Lien *et al.* 2007.

Chan K. *et al.* ont développé un système de biologie moléculaire portable et à bas coût pour le diagnostic d'une infection au ZIKV (Chan, Weaver *et al.* 2016). En moins de 15 minutes, cette plateforme, équipée d'une imprimante 3D, peut extraire l'ARN viral de 12 échantillons d'urine, en simultané et de façon automatisée (**Figure 63**). Cette plateforme peut ensuite effectuer une réaction d'amplification du génome viral par RT-RPA (*Retro-Transcription Recombinase Polymerase Amplification*) ou RT-PCR, et ce en approximativement 15 minutes. L'amplification par RPA est une alternative isotherme à la PCR, et qui s'effectue dans un tube. En RPA, l'amplification isotherme du génome (ADN) est obtenue par la liaison d'amorces oligonucléotidiques complémentaire de l'ADN à amplifier, et l'extension du brin complémentaire s'effectue *via* une polymérase (Piepenburg, Williams *et al.* 2006). En ajoutant une enzyme transcriptase inverse (RT) à la réaction RPA, il est possible de détecter de l'ARN, qui sera alors rétro-transcrit en ADN, qui sera lui-même amplifié. De plus,

contrairement à la PCR, la réaction de RPA ne nécessite pas de dénaturation thermique ou chimique, rendant inutile l'utilisation d'un thermocycleur ou de tout autre équipement ou réactif supplémentaire, ce qui est compatible avec les critères bas coût.

L'utilisation de sondes fluorescentes permet de suivre en temps réel l'amplification génomique qui peut être mesurée à l'aide de LEDs et d'un smartphone *via* utilisation de sa caméra. D'après les auteurs, cette plateforme ne comporte pas de composants coûteux et compliqués à utiliser, la rendant simple d'utilisation et adaptée à des environnements à ressources limitées. Elle a le potentiel d'offrir un diagnostic simple et rapide.

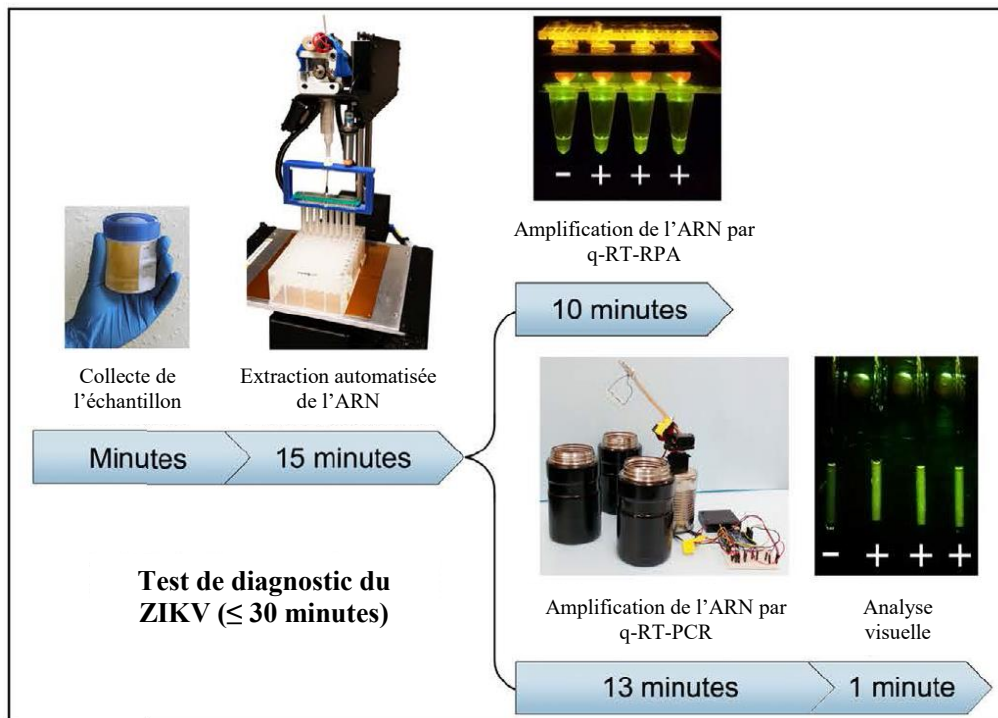


Figure 63 : Test de diagnostic moléculaire basé sur l'utilisation d'une imprimante 3D modifiée. RPA : *Recombinase polymerase amplification*. D'après Chan K. *et al.* 2016.

L'imprimante 3D peut également être utilisée pour faire de la préparation d'échantillons, en réalisant de façon automatisée l'extraction des acides nucléiques en utilisant des particules magnétiques. Une microplaque 96 puits peut être utilisée pour contenir les échantillons et les réactifs nécessaires à l'amplification génique. Si l'amplification nécessite un chauffage de l'échantillon, il est possible d'utiliser la tête chauffante de l'imprimante, qui peut être une plaque chauffante ou un filament.

L'ensemble du protocole de diagnostic moléculaire du ZIKV sur cette plateforme, aussi bien en q-RT-RPA que q-RT-PCR, peut être effectuée en 27 à 30 min (15 min d'extraction et 12 à 15 min d'amplification). Les résultats montrent une bonne sensibilité de détection (5pfu.ml⁻¹ d'échantillon), et il n'est pas observé de réaction croisée avec les virus de la dengue et du chikungunya.

Lo, Yang *et al.* ont mis au point un dispositif pour le diagnostic de la dengue, *via* une combinaison d'amplification par RT-LAMP en tube (*Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*) (Notomi, Okayama *et al.* 2000), couplée à une détection sur support papier (Lo, Yang *et al.* 2013) (**Figure 64**). L'amplification isotherme en boucle (LAMP) permet d'amplifier l'ADN avec une grande spécificité, efficacité et rapidité dans des conditions isothermales. Cette méthode utilise une ADN polymérase et un ensemble de quatre amorces spécialement conçues pour reconnaître un total de six séquences distinctes sur l'ADN cible. Une amorce interne contenant les séquences des brins sens et antisens de l'ADN cible initie l'amplification. Lorsqu'elle est conjuguée à une transcription inverse, cette amplification isotherme peut être utilisée pour amplifier l'ARN.

Après amplification du génome viral par RT-LAMP (**Figure 64a**), les produits d'amplification (ADN double brin) sont mélangés avec des sondes d'acides nucléiques fluorescentes et spécifiques du génome amplifié. Ce mélange est déposé sur des zones de lecture de la fluorescence, préalablement dessinées par impression à la cire sur une feuille de papier Whatman (**Figure 64b**). Après un lavage au PBS, les signaux de fluorescence sont observés et enregistrés à l'aide d'un système d'enregistrement d'images, puis analysés à l'aide du logiciel ImageJ.

L'utilisation de la technologie LAMP permet aux auteurs de développer une solution de diagnostic simple et peu coûteuse, avec un appareil facile à fabriquer et à manipuler, et s'avère moins coûteux en comparaison d'autres méthodes d'amplification qui nécessitent une infrastructure spéciale et du personnel qualifié.

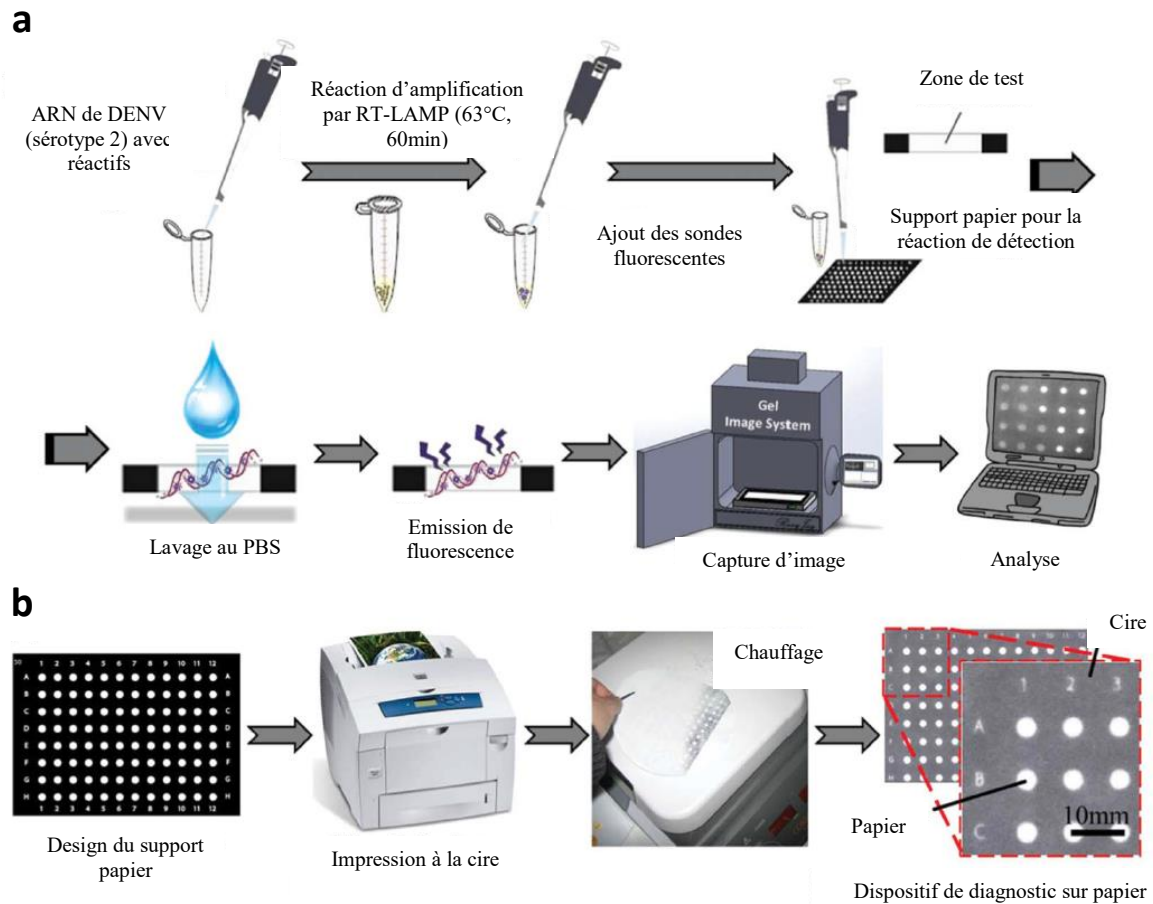


Figure 64 : Système de détection RT-LAMP en tube. a) processus de diagnostic RT-LAMP sur support papier du virus de la dengue ; b) fabrication du dispositif papier de détection des amplicons. D'après Lo, Yang *et al.* 2013.

Ces différentes technologies de détection du génome viral par amplification génique restent cependant encore assez éloignées des exigences des critères ASSURED. Il est nécessaire d'extraire le génome viral, de l'amplifier, de récupérer les résultats et de les rendre interprétables. Ces contraintes rendent difficile leur utilisation sur le terrain au plus près du patient. Cependant, les technologies présentées dans ce chapitre montrent qu'il y a une volonté de développement vers le bas coût, pour mieux répondre aux besoins des pays concernés par ces infections virales.

L'objectif de cette introduction a été de présenter le virus du chikungunya et les différentes technologies de diagnostic qui lui sont dédiées. Nos travaux, présentés dans la seconde partie de ce manuscrit, portent sur le diagnostic bas coût de ce virus, en s'inspirant de recherches préalablement effectuées sur le virus de la dengue.

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

Article 1 : Solution microfluidique papier pour le diagnostic bas coût au chevet du patient d'infections à flavivirus en phase virémique.

Bedin Frédéric, Boulet Laurent, Voilin Elodie, Theillet Gérald, Rubens Agnès & Rozand Christine

Article publié dans *Journal of Medical Virology* (2017) : *Paper-based point-of-care testing for cost-effective diagnosis of acute flavivirus infections.*

Comme nous l'avons vu précédemment, le papier représente un support intéressant pour le développement de tests de diagnostic à bas coût, pouvant correspondre aux critères ASSURED établis par l'OMS. Différentes méthodes de fabrication peuvent être utilisées pour obtenir un support microfluidique fonctionnel, sur lequel peuvent être fixés divers agents biologiques servant à la détection de l'analyte d'intérêt. Nous avons développé une technologie de diagnostic sur support papier en microfibres de verre, avec circuit microfluidique hydrophobe obtenu par impression à la cire, que nous avons appelé PAD. Ce support papier a été évalué pour la détection de la protéine non-structurale 1 (NS1) des virus de la dengue (DENV) et Zika (ZIKV).

Des anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre les protéines NS1 de ces deux virus ont été développés en interne chez bioMérieux. Chacun de ces anticorps a également été couplé à la phosphatase alcaline (PAL) pour être éventuellement utilisé comme outil de détection. Des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la protéine NS1 de DENV ont également été développés. Ces derniers, testés en Western-Blot, ont montré une forte réaction croisée avec la protéine NS1 de Zika, rendant leur utilisation possible pour la détection de NS1 des deux virus. Afin de déterminer le couple d'anticorps permettant la meilleure détection de la protéine d'intérêt, des ELISA ont été effectués en microplaque 96 puits, avec l'ensemble des anticorps utilisés soit comme anticorps de capture, soit comme anticorps de détection. Pour la DENV, le couple d'anticorps p122 en capture et 8C1B2 en détection (p122/8C1B2) présente le meilleur signal de détection. Pour ZIKV, il s'agit des couples p82/4A8C12 et p122/4A8C12.

Ces couples d'anticorps ont ensuite été évalués sur le PAD pour la détection de NS1 sur des échantillons de plasma ou de sang issus de patients sains et chargés avec des quantités connues de protéine NS1. Les résultats montrent une bonne détection de la protéine d'intérêt pour les deux virus. Cependant, afin d'objectiver les résultats et de quantifier le signal observé, une valeur de signal spécifique, appelée « S », a été déterminée. Initialement obtenue par une analyse sur ordinateur avec le logiciel ImageJ à partir d'une photo de chaque PAD, son calcul a été facilité avec le développement d'une application smartphone sur support Android®. Une étude de corrélation a montré que les valeurs de S obtenues avec ImageJ corrôlaient avec celles obtenues avec l'application Android® ($R^2 = 0,93$). Les résultats du test sont obtenus entre 6 et 8 minutes.

Par la suite, nous avons souhaité améliorer la sensibilité de détection de notre PAD et diminuer le bruit de fond observé au niveau du contrôle négatif interne au test. Différentes

méthodes ont été évaluées comme la composition du tampon de lavage, l'addition d'un agent bloquant (biolipiduresTM, BSA ou gélatine) ou l'addition d'un détergent pour éliminer les interactions non-spécifiques. Il a été observé que l'utilisation de la BSA et d'un biolipidureTM (agent bloquant synthétique) ainsi qu'une étape de lavage avec du tampon PBS1X permettait d'améliorer la valeur du signal S obtenu sur l'application smartphone, en augmentant le niveau de signal spécifique sur la zone de test et/ou en réduisant le bruit de fond au niveau contrôle négatif interne.

Nous avons ensuite déterminé une valeur S dite « seuil » au-delà de laquelle un test sera considéré comme positif pour l'analyte à détecter. Cette valeur seuil a été obtenue avec 35 échantillons de plasma et 35 échantillons de sang issus de patients sains (non dengue). Chaque test a été réalisé en duplicat. La moyenne (m) et l'écart-type (σ) des valeurs S des tests ont été calculés, et la valeur seuil a été définie à $S_{\text{seuil}} = m + 2\sigma$.

Nous avons alors déterminé la limite de détection du PAD. Des échantillons de sang et plasma sains ont été chargés avec différentes concentrations de NS1 de DENV et ZIKV. Ces échantillons ont été testés sur le PAD ainsi que sur un tests rapide commercial de diagnostic de type *Lateral Flow Assay* (LFA), pour la détection de NS1 de DENV, qui a servi de référence. Pour les deux virus, les performances calculées sur le PAD sont de 10ng de protéine NS1 par mL de plasma, et 20ng de protéine NS1 par mL de sang. Les résultats obtenus sur le test rapide indiquent que le PAD présente des performances équivalentes à celui-ci. Cependant, les résultats sont obtenus entre 6 et 8 minutes pour le PAD contre 20 minutes pour le test rapide. Des plasmas de patients avec une infection dengue confirmée, prélevés en phase virémique et testés pour la détection de NS1, ont également été détectés comme positifs sur le PAD.

Enfin, une nouvelle version du PAD a été développée et testée pour une détection multiplexée de NS1 de DENV et ZIKV. Il a été montré qu'il était possible de détecter spécifiquement, sur un même PAD et à partir d'un même échantillon plasmatique, la protéine NS1 de DENV et de ZIKV en moins de 8 minutes. Les résultats sont présentés dans le papier ci-après.

Paper-based point-of-care testing for cost-effective diagnosis of acute flavivirus infections

Frederic Bedin  | Laurent Boulet | Elodie Voilin | Gerald Theillet |
Agnes Rubens | Christine Rozand

Innovation, BioMerieux SA, Chemin de l'Orme,
Marcy l'Etoile, France

Correspondence

Frederic Bedin, PhD, Innovation, BioMerieux SA,
Chemin de l'Orme, Marcy l'Etoile, France.
Email: frederic.bedin@biomerieux.com

Flavivirus infections are a serious healthcare concern in tropical and subtropical countries. Although well-established laboratory tests can provide early diagnosis of acute dengue or Zika infections, access to these tests is limited in developing countries, presenting an urgent need to develop simple, rapid, and robust diagnostic tools. Microfluidic Paper-based Analytical Devices (μ PAD), are typically rapid, cost-effective, user-friendly, and they can be used as diagnostic tools for the diagnosis of these infections at Point of Care settings. Early and prompt diagnosis is crucial to improve patient management and reduce the risk of complications. In the present study, we developed and evaluated a wax-printed paper-based device for the detection of the dengue and Zika non-structural NS1 viral protein in blood and plasma. Experiments have been carried out to increase specificity, while maintaining the required sensitivity. As a consequence, the quality of the raw materials and the washing steps were proved to be crucial. The μ PAD was able to detect specifically in 6–8 min 10 ng/mL of protein in various sample types. A prototype for the differential detection of dengue and/or Zika NS1 protein was developed. The reading of the results was simplified by using a dedicated application on a smartphone.

KEYWORDS

arbovirus, diagnosis, fluidics, NS1

1 | INTRODUCTION

Febrile diseases are one of the most frequent causes of morbidity and mortality in developing countries. For many years, malaria was the leading cause of fever, especially in children, and contributed to significant mortality in sub-Saharan Africa. However, recent studies highlight the importance of non-malarial causes.^{1,2} Besides bacterial diseases, viral etiologies including those caused by arboviruses such as the dengue virus (DENV) and, more recently, by the Zika virus (ZIKV), tend to become worrying public health issues. Arbovirus infections are viral diseases transmitted by bloodsucking arthropods (mosquitoes, ticks, sand flies or culicoides). The arboviruses can be mainly classified in seven virus families, including the *Flaviviridae* (genus *Flavivirus*) with the yellow fever virus (present in Africa and Americas), dengue virus, West Nile virus (in Africa, South Asia, Americas), the Japanese encephalitis virus (in South Asia), the Saint Louis encephalitis virus (in Americas) or the Zika virus that is now emerging in Africa, Asia, and the Americas.^{3,4}

Clinical manifestations of these diseases are often asymptomatic or mildly symptomatic with an acute self-limiting febrile syndrome in a few days that includes headache, retro-orbital pains, sometime rash.

However, for arbovirus such as dengue and Zika, a significant percentage of patients develop more severe forms of the disease or complications that imply that these patients must be taken in charge in a specific care environment.

The problem for the clinician is the differential diagnosis of these pathologies to adapt the patients care. For dengue patients, for instance, fast and reliable early diagnosis is essential for the management of clinical cases that may progress to severe dengue. For Zika, the management of pregnant women is important because of the potential damage by the virus to the fetus brain. This early diagnosis can be accomplished by amplification of the viral genome (RT-PCR), by virus isolation or by looking for specific IgM. Detecting viral Non Structural glycoprotein 1 (NS1) in the blood of patients represents an alternative path in the early diagnosis of flaviviruses. The assay can also be useful for epidemiological surveillance.^{5–7} NS1, a secreted viral glycoprotein produced by infected cells, is synthesized as a monomer and is dimerized rapidly after post-translational modifications in the endoplasmic reticulum. Dimers are transported to the cell surface and associate as hexamers that accumulate in large amounts in the extracellular medium.^{8,9}

For most countries affected by arboviruses such as DENV and ZIKV, the price of a regular diagnostic test is often considered to be too expensive. New diagnostic tests should be developed by taking into account the challenges posed by the economy of developing countries. Thus, according to WHO, an ideal diagnostic test is an ASSURED test that must be Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly (it can be done by individuals with a minimum level of training), Rapid, and Robust, Equipment-free, Delivered to those who need it.¹⁰

Paper fabrication is one of the most mastered technologies of human history. Currently, paper-based materials are used for numerous biochemical analyses from the dipstick assays for urine analysis to the lateral flow assays (LFAs) for the rapid detection of infectious diseases.^{11,12}

Since the basics of Lateral Flow Assays (LFA) have been laid, they have been constantly upgraded. Recently, Whitesides et al. at Harvard University introduced paper-based microfluidics to manufacture low cost and very simple Paper Analytical Devices (PAD).^{13–15} Paper is hydrophilic and porous, thus PADs are mainly based on capillary force to drive aqueous fluid movement into designed channels without mechanical assistance.¹⁶ PADs are made by patterning physical or chemical hydrophobic boundaries to form channels on paper.¹⁷ Due to the compatibility of the paper with a large number of components, PADs can be functionalized by adding chemical or biological molecules that can be immobilized by a physical absorption or a chemical coupling. Finally, paper is biodegradable and easy to recycle.^{18,19}

A traditional LFA corresponds to the assembling of different material. A piece of fiber glass paper is used to separate red blood cells from plasma. Fiber glass paper is located upstream from the conjugate pad (made of cellulose paper) and the test strip (nitrocellulose membrane).²⁰ Conversely, in the present study, the analytical device that has been developed consists of a single piece of fiber glass paper. The proof of concept, using this microfluidic device, has been performed using the NS1 proteins of dengue and Zika as target antigens to be detected from plasma and whole blood samples, in simplex and multiplex formats.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Materials and specimens

DENV- and ZIKV-negative plasma and whole blood specimens from healthy donors were obtained from the French National Blood Bank

(Etablissement Français du Sang, Lyon, France). DENV and ZIKV acute patient plasma samples were obtained from Biomnis (Lyon, France) through a specific contract with bioMérieux. All experiments were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained for any experimentation.

NS1-directed polyclonal antibodies p122 or p82 (DENV), monoclonal antibodies 6C6A9, 8C1B2 (DENV) and 4A8C12, 4B9C1, 9C6D7 (ZIKV) were all generated at bioMérieux SA after rabbit or mice immunizations with recombinant NS1 proteins internally produced.²¹

2.2 | Enzyme Linked ImmunoSorbant Assays (ELISA)

After an overnight sensitization with monoclonal antibodies diluted at 5 µg/mL in Tris buffer pH 6.2, 96-well plates (Nunc) were saturated 1 h at RT with PBS-Bovine Serum Albumin 5% (BSA, Sigma, Saint Quentin Falavier, France). After 4 washes with PBS-Tween20 0.1%, plasma containing (or not) the NS1 protein (0.5 µg/mL) was added and incubated 2 h at 37°C. The developing with PNPP substrates (ThermoFisher, Waltham, MA) was performed after 1 h incubation at 37°C with a 1 µg/mL solution of an alkaline phosphatase (AP)-labeled antibody in PBS-BSA-0.5%. The absorbance level (optical density [OD]) was read at 450 nm using a spectrophotometer (Biotek, Virooski, VT). All samples were tested in duplicate and in two independent experiments. Alternatively, when a rabbit polyclonal antibody was used as a detection tool, an additional step was added: a 0.2 µg/mL solution of a goat AP-labeled anti-rabbit polyclonal antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) was incubated 45 min at 37°C before addition of the PNPP substrate.

2.3 | µPAD manufacturing and functionalization

The pattern was wax-printed on a standard sheet of 80 gr paper (Evercopy, France), and then transferred to MF1 paper (Wattman) by blotting in “sandwich” at 120°C under a pressure of 0.1 bar for 3 min. At the end of the process, the pattern was blotted on MF1 paper (cf Fig. 1A). This pattern was constituted by a channel delimited by a hydrophobic barrier made of wax (thick black line) with a larger area on top for the loading of the sample, and by several small areas for the functionalization, all separated by lines of yellow wax that facilitates the antibody-antigen reactions by reducing the fluid flow rate. The first area (positive control area visualized by blue points) was coated with 0.35 µL of an internally developed antibody directed against the AP

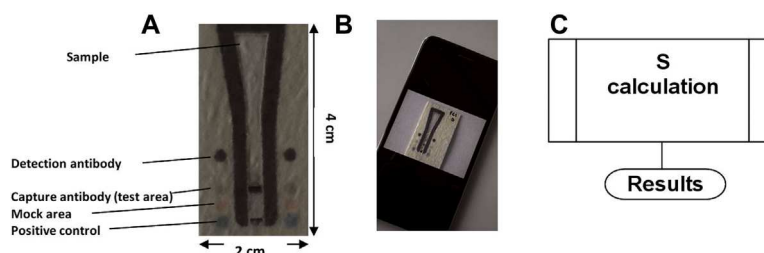


FIGURE 1 Workflow for NS1 protein detection from patient capillary blood or plasma: (A) Sample is loaded on the top of the device. If NS1 is present, it is captured by the capture antibody and a blue band appears in the test area as illustrated. If it is absent, there is no signal. (B) When the signal appears (4–6 min after addition of the colorimetric substrate), a picture is taken and analyzed by the smartphone application. (C) Depending on the S value ($S = \frac{\text{Test-Blank}}{\text{Mock-Blank}}$), the sample analyzed is considered either positive or negative

(0.5 mg/mL in PBS1x). The second area corresponded to the Mock area (red points). It was coated with 0.35 μ L of PBS-BSA0.5%. The third zone was the Test zone (green points) which was functionalized by adding 0.35 μ L of anti-NS1 antibody (1 mg/mL in PBS1x). The last area (black points) was loaded with a solution of anti-NS1 AP-labeled antibody (50 μ g/mL in a bioMérieux buffer containing sucrose and detergent). After depositing of the antibody solutions on the four areas, the microfluidic Paper-based Analytical Devices (μ PAD) was dried for 3 min in an oven warmed to 60°C. The functionalized μ PAD can be stored several days at room temperature before use.

2.4 | Test of samples on the μ PAD

The functionalized μ PAD was loaded by 25 μ L of sample (plasma or whole blood) spiked by different amounts of commercial NS1 proteins (Biorad [Hercules, CA] for dengue or The Native Antigen Company [Oxfordshire, United Kingdom] for Zika). These NS1 proteins, expressed in 293 human cells (CRL-1573, ATCC), were fully glycosylated and contained a C-terminal 6xHis-tag. Once the sample has reached the bottom of the channel, an optional washing step can be performed by adding 10–30 μ L of washing buffer directly on the “black points” area. When the washing buffer was totally absorbed by the μ PAD, the coloring substrate (BCIP solution, Promega Madison, WI) was added. The μ PAD is finally incubated for a few minutes until the signal appeared. A picture was then taken by a smartphone. Alternatively, a commercial in vitro diagnostic device was used (OneSite Duo Dengue Rapid test, CTK Biotech, San Diego, CA) following the manufacturer's instructions.

2.5 | Signal quantification on the μ PAD

For the signal quantification, a dedicated algorithm embedded in a smartphone was developed with the help of students from Ecole Centrale Lyon (Lyon). The application, called μ PAD reader v1.0, was installed on a Samsung Galaxy A3 smartphone. Blank, Test, and Mock areas were targeted by the application on the pictures taken once the signal appeared on the μ PAD. The application uses the x-y coordinates of areas to be read. Coordinates were entered in the program with the help of Quick Response (QR) code based tags printed on the μ PAD. If required, an integrated tactile tool allows the targeting to be adjusted. To adjust the reading to the current lighting conditions, the Blank, corresponding to a white non-reactive area of the paper, was measured. The S signal was finally calculated as $S = \frac{\text{Test} - \text{Blank}}{\text{Mock} - \text{Blank}}$. Data (μ PAD picture, areas measured, and pixel quantification of each area) were saved in the internal memory of the smartphone. The entire process from the sample loading to the signal quantification is illustrated in Fig. 1.

3 | RESULTS

3.1 | Raw material selection for NS1 detection by sandwich-ELISA and application on paper

In order to determine the couple of antibodies that best fitted for the NS1 protein detection for dengue and Zika, different antibodies were

successively tested by sandwich-ELISA on microplates either as capture or detection antibodies, when labeled with AP. Western-blotting previously conducted on the dengue or Zika NS1 proteins showed that p122 and p82 dengue polyclonal antibodies generated strong cross reactive signal on Zika NS1 protein (data not shown). Consequently, these two antibodies can potentially be used for both dengue and Zika NS1 detection.

As illustrated in Fig. 2A, for dengue, the combination of rabbit polyclonal antibodies for capture associated with the 8C1B2 monoclonal antibody in detection gave the higher OD (mean of OD = 1.801) followed by the 6C6A9 (mean of OD = 1.491). The use of monoclonal antibodies 8C1B2 and 6C6A9 for the NS1 capture associated with polyclonal antibodies for the detection also worked well (mean of OD = 1.413). For Zika virus (see Fig. 2B), the polyclonal antibody p122 or p82 as capture antibodies in sandwich with the monoclonal antibody 4A8C12 in detection showed to be the couple of antibodies that led to higher optical density (mean of OD = 1.640). Because p122 and p82 polyclonal antibodies were not labeled, it was not possible to test the combinations using these two antibodies both in capture and detection.

Thus, the antibody couples selected for the NS1 sandwich ELISA on paper were p122/8C1B2 for dengue and p122 (or p82)/4A8C12, for Zika.

Finally, these combinations were tested on the μ PAD by loading 25 μ L of sample (whole blood or plasma) containing different quantities of NS1 proteins of different serotypes (serotypes 1, 2, and 3, for dengue).

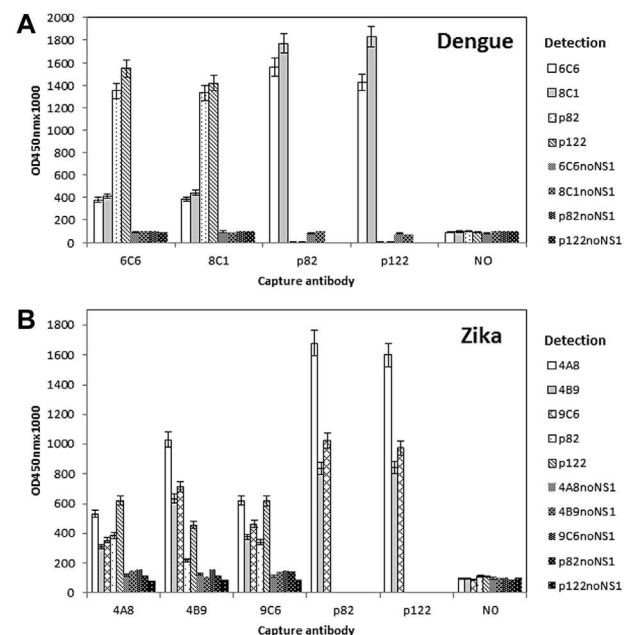


FIGURE 2 Antibody selection by ELISA. Dengue monoclonal antibody combinations were evaluated by capture-ELISA on recombinant NS1 protein spiked on plasma for dengue (A) and for Zika (B). They were tested either as capture or detection antibody (“Detection”). Antibodies have been obtained by bioMérieux after mice immunization with recombinant NS1 protein. Detection antibodies were labeled by alkaline phosphatase. OD was read after the addition of PMPP substrate. NO: no capture antibody. NoNS1: no NS1 spiked in the plasma

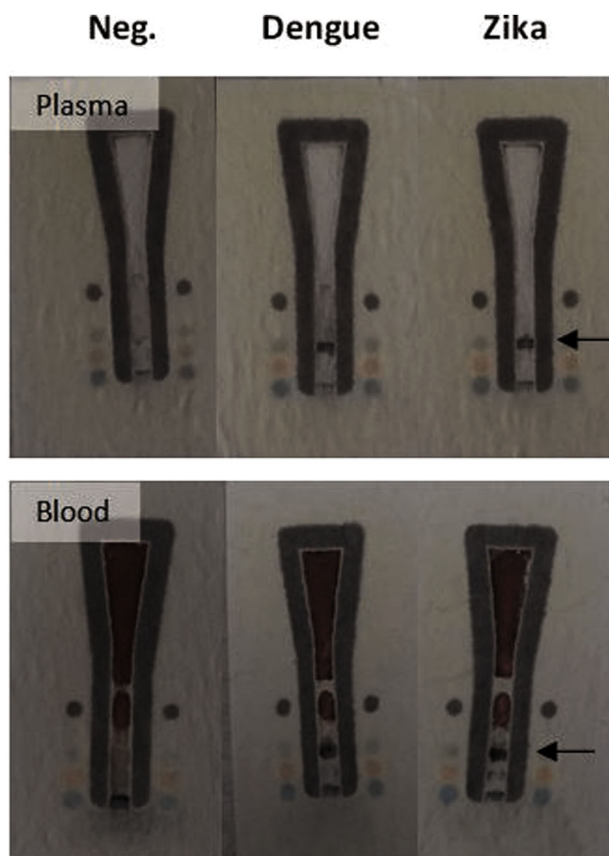


FIGURE 3 NS1 dengue or Zika detected on μ PAD. Plasma or whole blood ("Blood"), were either not spiked ("Neg.") or spiked with 1 μ g of dengue NS1 protein ("Dengue") or 1 μ g of Zika NS1 protein (Zika) before loading on the μ PAD. Arrows: test area where signal is observed

A sample with no NS1 protein was used as negative sample. The typical results obtained with dengue NS1 protein or Zika NS1 protein in plasma or in blood samples are illustrated in Fig. 3. Antibodies 8C1B2 for dengue, or 4A8C12 for Zika, were coated on the test area. The detection was performed with p122 associated to an AP-labeled rabbit antisera. The level of the background that appeared on the mock band was variable. On μ PADs loaded with whole blood, the separation of the plasma from the red blood cells thanks to the glass fiber that constitutes the μ PAD was clearly visible. Using the smartphone application a value of specific signal (S) was calculated for each test band (green point on μ PAD). The value of S corresponded to the formula $S = \frac{\text{Test} - \text{Blank}}{\text{Mock} - \text{Blank}}$, and took into consideration the background observed on the test. For negative plasma, S valued between 0.95 and 1.2. For positive samples, S was higher than 1.5 and depended on the background intensity red on the Mock band. The complete process, from the sample loading to the S calculation, took less than 8 min.

3.2 | Improvement of the signal intensity and decrease of the background noise

Two tracks were explored to reduce the signal intensity of the background sometimes observed on the μ PAD and to increase the specific signal.

First, the effects of the volume and the composition of the washing buffer on the background level on the Mock area were investigated. The highest S value was obtained using 10 μ L of PBS1x ($S = 4.03$). The addition of a blocking agent in the washing buffer (BSA 0.5% or gelatin 0.5%) did not bring about any improvement. The addition of a small amount of Tween20 (0.01–0.05%) was not efficient because it melted the wax barrier of the μ PAD. Compared to a μ PAD with no wash, a washing step with 10 μ L of PBS1x increased the signal by more than 1.7 fold.

Second, different blocking buffer compositions, used both on the Mock control area and after functionalization of the Test area, were evaluated. The reference buffer was made of PBS1x containing 0.5% BSA. New blocking agents such as Biolipidure™ 103, 206, 405, and 802 (NOF corporation, Japan) were tested at two different concentrations in comparison to the BSA. The highest signal was obtained with the reference buffer (PBS-BSA 0.5%; $S = 4.22$) or with PBS buffer containing Biolipidure™ 206 at 1% ($S = 5.42$). The addition of these blocking agents increased the signal from 1.7 (BSA) to 2.2 (Biolipidure™ 206–1%) compared to when no blocking agent was added.

In conclusion, the use of blocking agents such as BSA or Biolipidure™ 206 and a washing step with 10 μ L of PBS1x could improve the S signal calculated by the smartphone application by increasing the specific signal level on the test zone and/or by reducing the background level on the Mock area.

3.3 | Determination of the limit of detection

In order to determine the limit of detection, the mean of the S signal obtained on μ PADs loaded with negative samples (without NS1) was calculated. Thirty-five μ PADs were loaded with 25 μ L of dengue/Zika negative plasma. The S signal was estimated for each μ PAD and the mean and the standard deviation were deduced. For the μ PAD functionalized with dengue antibodies, the mean (M) of S was 1.12 and the standard deviation (SD) was 0.18. Consequently, a test was considered positive on plasma when the S value was higher than $M + 2SD = 1.48$. For the μ PAD functionalized with Zika antibodies, the mean (M) of S was 1.1 and the standard deviation (SD) was 0.11. The test was considered positive when S was higher than 1.32. In parallel, the S signal was estimated for 35 μ PAD loaded with dengue/Zika negative whole blood. For the μ PAD functionalized with dengue antibodies, the mean (M) of S was 1.24 and the standard deviation (SD) was 0.14. Consequently, a test was considered positive on whole blood when the S value was higher than $M + 2SD = 1.52$. For the μ PAD functionalized with Zika antibodies, the mean (M) of S was 1.16 and the standard deviation (SD) was 0.15. The test was considered positive when S was higher than 1.46.

Serial dilutions, from 40 μ g/mL to 5 ng/mL, of dengue NS1 protein (serotype 1, 2, or 3) in healthy, dengue/Zika negative plasma were tested on the μ PAD functionalized with appropriate antibodies. The S signal was calculated by the smartphone application. If S was found to be higher than 1.48, the signal was considered as positive. For dengue serotype 1, 2, and 3, the limit of detection was estimated to be 10 ng/mL (cf Table 1, NS1-1, NS1-2, and NS1-3). In whole blood, the limit of detection was found to be 20 ng/mL. For Zika NS1, the limit of detection

in plasma and in whole blood was 10 and 20 ng/mL, respectively. The final result was always obtained in less than 8 min.

Sometimes, *S* was found aberrant (cf Table 1, in bold). That corresponded to imperfections ("wrinkles") on the MF1 paper that modified the gray level on the picture and had an impact on the signal calculation. Some attempts to reduce this effect (pressing of the paper, addition of plastic film on the top of the μ PAD) were unsuccessful.

As a reference, a commercial dengue Lateral Flow Assay (CTK Biotech) was tested in parallel using the same dilutions of dengue NS1 protein. For the commercial LFA, the limit of detection in plasma or whole blood was estimated to be 20 ng/mL and the final result was obtained in 21-25 min (not shown).

For the Zika NS1 protein, the limit of detection by the μ PAD was estimated to be 10 ng/mL (plasma) or 20 ng/mL (blood). Because no commercial in vitro diagnostic LFA was currently available for NS1 Zika detection, no benchmarking was conducted.

In conclusion, the μ PAD solution enabled better performances compared to a commercial lateral flow assay (on dengue) both in terms of limit of detection and of time-to-result. The device worked on whole blood and on plasma and was able to detect both Zika and dengue serotype 1, 2, 3 NS1 proteins.

3.4 | Test of samples from acute dengue patients on the μ PAD

All the data presented in the previous paragraphs were obtained on plasma or blood spiked with recombinant NS1 proteins. To test the μ PAD with patients samples and compare the results obtained with a reference method, five plasma samples from acute dengue patients were tested both on μ PAD and on a commercial LFA. Plasma

samples came from primary acute dengue patients (serotype 1 and 3), taken early during the course of the disease (mean = 4.2 days after the onsets of symptoms). All were previously confirmed to be NS1 positive using the Platelia NS1 ELISA (Biorad). Four out of five plasmas were taken from female patients. Patients were 25-64 years old (mean = 36.8 years).

The results (see Fig. 4A) showed that all the NS1 positive patients were detected positive by the μ PAD. The *S* values were higher than 1.48, considered as the positivity threshold. Simultaneously, the same plasma specimens were tested with the OneSite Duo Dengue Rapid test (CTK Biotech), as a reference in vitro diagnostic kit. As for the μ PAD, all the plasma were found positive (see Fig. 4B). The signal appeared generally more intense than for the μ PAD, except for two samples, P8 (38 year old female taken at day 4 after onsets of symptom; DENV serotype 1) and P35 (a 27 years old female taken at day 4 after onsets; DENV serotype 3) that were barely visible. For the μ PAD, P8 and P35 corresponded also to the lowest positive *S* signal.

In conclusion, it is possible, using the μ PAD, to detect the NS1 protein in plasma specimens from acute dengue patients.

3.5 | Multiplex detection of dengue and Zika NS1 proteins on plasma

In order to assess the possibility of detecting the dengue or Zika NS1 protein from the same sample on the same μ PAD, a new μ PAD was designed and assessed. This new μ PAD is composed of two channels. The left channel was functionalized for the detection of the Zika NS1 protein. It included, as previously shown (see Fig. 1A) from the bottom to the top, one positive control area, one Mock area, one Test area coated with the monoclonal antibody 4A8C12 (green points), and one

TABLE 1 Limit of detection of dengue and Zika NS1 on μ PAD

NS1 (μ g/mL)	40	5	0.15	8.10^{-2}	4.10^{-2}	2.10^{-2}	1.10^{-2}	5.10^{-3}	0
Dengue									
NS1-1 Plasma	2.5	2.36	2.02	1.81	1.73	1.70	1.57	1.28	1.12
NS1-2 Plasma	2.27	2.20	1.96	1.92	1.71	1.64	1.55	1.34	1.10
NS1-3 Plasma	2.76	2.35	2.18	1.86	1.69	1.61	1.65	1.37	0.93
+/- Plasma	+	+	+	+	+	+	+	-	-
NS1-1 Blood	2.83	2.42	2.05	1.89	1.73	1.74	1.59	1.25	1.12
NS1-2 Blood	3.15	2.27	1.97	1.84	1.8	1.56	1.48	1.42	1.05
NS1-3 Blood	2.90	2.69	2.04	1.81	1.73	1.63	1.63	1.50	1.13
+/- Blood	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Zika									
NS1 Plasma	2.63	2.24	1.68	1.61	1.57	1.51	1.45	1.3	1.09
+/- Plasma	+	+	+	+	+	+	+	-	-
NS1 Blood	2.88	2.29	1.80	1.79	2.02	1.58	1.43	1.37	1.18
+/- Blood	+	+	+	+	+	+	-	-	-

For the μ PAD, the limit of detection was estimated by calculating the mean of *S* plus 2 standard deviations obtained for 35 μ PADs loaded with sample containing no NS1 protein. Plasma specimens or blood were spiked with serial dilutions of NS1 protein from 40 μ g to 5 ng of protein/mL of sample. *S*: mean of signal obtained on three assays using the smartphone application ($S = \frac{\text{Test-Blank}}{\text{Mock-Blank}}$) for Zika or for serotype 1 (NS1-1), 2 (NS1-2), or 3 (NS1-3) both for plasma (plasma) or whole blood (blood). Depending of the *S* values, for each NS1 concentration the final result is considered either as positive (+) or negative (-).

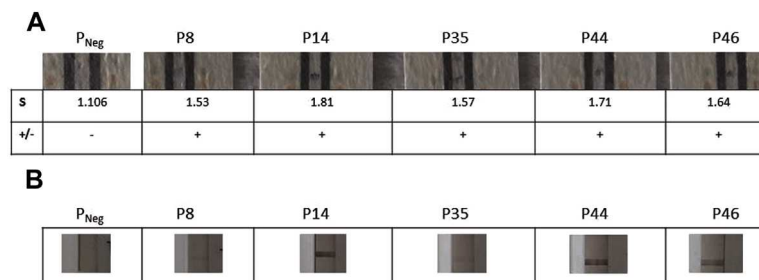


FIGURE 4 Use of μ PAD for NS1 detection on plasma specimens from acute dengue patients. Plasma of acute dengue patients (P8-P46) or dengue negative patient (PNeg) were loaded on the μ PAD (A) and on a commercial LFA (CTK Biotech, (B). For the μ PAD, depending of the S value ($S = \frac{\text{Test-Blank}}{\text{Mock-Blank}}$), the test result is considered either as positive (+) or negative (-)

area loaded with the polyclonal antibody p122 (white points). The last area was functionalized with an AP-labeled goat anti-rabbit IgG (black points). The right channel was functionalized for the detection of the dengue NS1 protein by coating the specific monoclonal antibody 8C1B2 in the test area. Otherwise, the other areas were coated with the same material as for Zika NS1 detection. As illustrated in Fig. 5, when plasma spiked with Zika NS1 protein (1 μ g/mL) was tested, the channel corresponding to the Zika NS1 became positive. When dengue NS1 protein was used, the right channel, corresponding to the dengue, was positive. If the plasma contained the two proteins, the two channels were positive. If no protein was spiked in the plasma, there was no positive signal. The table below the pictures of the μ PAD gives the S values obtained in each channel and indicates if the signal is positive or not. In NS1-positive samples, S was generally found to be more than twofold higher than in negative samples. However, for the test Zika/0, this ratio was 1.6.

In conclusion, it was possible to specifically detect, the Zika and/or dengue NS1 protein in a multiplexed μ PAD.

3.6 | Correlation between the smartphone application and reference software using gray level analysis

In order to benchmark the smartphone application developed for the study, the S values obtained on 124 μ PAD by this application were compared with the values obtained on the same μ PAD but by using

reference software able to analyze and quantify the gray level of a picture. The Image J software (<http://imagej.nih.gov/ij/>) was chosen for this purpose. The μ PAD were loaded with 25 μ L of plasma spiked with different dilutions of dengue NS1 protein. A correlation curve (not shown) was drawn and compared the results obtained by the two methods. The curve slope c, close to 1 ($c = 0.936$), indicated that systematic bias was good. As suggested by the R2 coefficient higher than 0.8 ($R2 = 0.832$), the two methods correlated.

In conclusion, the S values calculated by using the smartphone application internally developed were compatible with the values obtained by using a reference method of gray level quantification.

4 | DISCUSSION

Paper-based devices provide an alternative technology for simple, cost-effective, portable, and recyclable diagnostic tools for many applications including clinical diagnosis. They are potentially well adapted to low income countries or when health costs are not covered by public health agencies. In the present article the proof of principle of the multiplex detection of flavivirus NS1 proteins in biological sample using a paper-based cost-effective device was established.

Among flaviviruses, dengue, and Zika viruses are two arboviruses transmitted by Aedes mosquitoes that co-circulate in the same geographic areas.²² During the acute phase of the infection in humans,

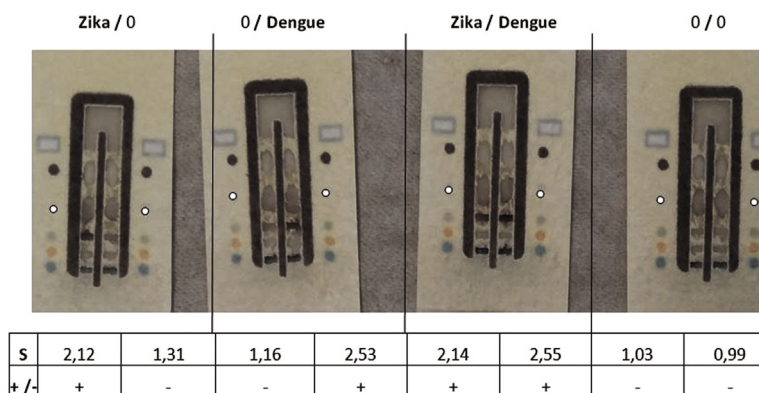


FIGURE 5 Multiplex detection of dengue and Zika NS1 on plasma. The S signal corresponded to $S = \frac{\text{Test-Blank}}{\text{Mock-Blank}}$ (mean of three independent experiments). 0: no NS1 protein (dengue and/or Zika) in the sample. Depending of the S value, the test result is considered either as positive (+) or negative (-)

up to 7 days after the onset, the symptoms between these two viruses are generally quite similar. However, these diseases may evolve to complications requiring a differentiated care and that do not concern the same at-risk populations. Rapid diagnostic tools that enable to differentiate between these viruses during the acute febrile phase would be of great help in endemic countries.

The main advantage of μ PAD over conventional laboratory-based tests such as ELISA, in addition to a reduced cost of goods, is that it can be easily manufactured in every part of the world. In addition, the results are quickly provided (here in less than 8 min) and can be read by the naked eye, and without any instrument. However, it is also possible, thanks to a simple smartphone application that we have developed, to perform a quantitative evaluation of the results obtained both on Test and Mock zones and consequently to increase the sensitivity of reading, even by an unskilled user. These data could possibly be transmitted by SMS to a centralized laboratory or hospital, for epidemiological purpose, for instance.

Unlike the traditional LFA that requires assembly of several pads and membranes made of different materials to ensure the sample preparation and analysis (sample pad and absorbent pads made of cellulose, conjugate pad made of glass fiber, and test strip made of nitrocellulose),²⁰ in the solution presented here only one material is needed to perform all these steps. A simple wax-patterned piece of MF1 paper allows the plasma to be separated from the red blood cells thanks to the glass fiber that is one of the main components of MF1. Because MF1 is hydrophilic and porous, the migration of the sample to the specific antibodies is driven by capillarity force, without mechanical assistance. The microfluidic pump is ensured by the presence of paper surrounding the wax-printed pattern. The use of a unique material would enable a simplification and, consequently, a reduction in the cost of manufacturing.

The μ PAD developed here shows a reduced background level and/or an increased specific signal when a washing step with 10 μ L of PBS and a blocking agent on the test zone are added to the workflow. Furthermore, the use of the smartphone application brings an additional value by automatically subtracting the background from the test signal. However, the background must be reduced further to minimize the false positives that could result from non-specific binding of assay reagents.

To optimize the specific signal, different concentrations of specific antibodies have also been tested. The optimal concentrations corresponded to those previously described in the literature for other paper-based devices.^{23,24}

The use of specific monoclonal antibodies for each virus instead of the dengue polyclonal p122 could probably help to reduce the background.

Compared to a commercial dengue LFA, it was possible, by using the μ PAD, to improve the limit of detection by two. In addition the time-to-result was reduced approximately threefold.

It was demonstrated that the dengue NS1 can also be detected in acute dengue patient plasma specimens, demonstrating that the μ PAD has potential clinical applications.

Previous studies have determined the median level of circulating NS1 in serum for patients infected with DENV. It varied among

individuals during the course of the disease, but it was generally around 120 ng/mL of serum, ranging from 10 ng/mL to 50 μ g/mL.^{25,26} The limit of detection estimated with the solution developed here, is compatible with these biological data.

The functions of DENV NS1 have not yet been fully elucidated but NS1 probably involves in pathogenicity. The diagnosis of DENV acute infection using NS1 LFA has been shown to be a good first-line test for dengue fever.²⁷ The NS1 antigen was found circulating from the first day after the onset of fever up to day 9, once the clinical phase of the disease is over. The NS1 protein could be detected even when viral RNA was negative in reverse transcriptase-PCR.²⁵ In a secondary DENV infection, the immune complexes formed by NS1 and antibodies increase rapidly via an anamnestic immune response; thus, the antigen is rarely found at 5-7 days after the onset of symptoms in secondary DENV-infected patients.²⁸

For Zika NS1, few data are currently available.^{29,30} No commercial in vitro diagnostic kit for NS1 detection is currently marketed. This makes the μ PAD benchmarking difficult.

The μ PAD can be used for NS1 dengue/NS1 Zika detection in multiplex. In tropical or subtropical countries, such as Brazil, a multiplexed assay might contribute to the management of testing campaigns at the point-of-care settings by minimizing the management of waste and simplifying the workflow in hospitals or dispensaries where many patients would be tested for the main arboviruses. Because transmission of many arboviruses, including flaviviruses, is carried out by the same *Aedes* mosquitoes, that colonize the same countries, it could also be interesting to include other viruses such as chikungunya and yellow fever to this multiplex.^{31,32}

The proof of concept being validated, it would be interesting to test subsequently blood samples from acute patients infected by dengue and/or Zika viruses in order to determine the clinical performances of our solution and compare them with the existing in vitro diagnostic kits.

In the present example, the multiplexed dengue/Zika test could help health workers in the accurate diagnosis and differentiation of Zika and dengue fever, two diseases caused by flaviviruses that are characterized by common symptoms during the acute phase, that co-localize in endemic countries but that require different management on distinct risk populations.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors wish to thank Marc Bossus, Celine Roesch, Michèle Guillote (Immunoassays department of bioMérieux) for antibody productions; Florence Bettworth, Blandine Le Levreur, and Marie-Claire Cavaud (Immunoassays department of bioMérieux) for antibody purification and labeling. Authors also thank Hélène Briand (Immunoassays department of bioMérieux) for her precious advices on immunologic detection and the rapid tests. The students of the Ecole Centrale de Lyon (Arthur Boutry, Gabriel Créti, Donatien Delehelle, François Paugam, Benoît Serrano, and Rémi Zuffinetti) have actively participated to the development of the smartphone application. Special thanks to Yasemin Ataman-Önal for manuscript reading.

REFERENCES

1. Bedin F. Brazil, land of choice for arbovirology? *Med Trop (Mars)*. 2007;67:281–287.
2. Acestor N, Cooksey R, Newton PN, et al. Mapping the aetiology of non-malarial febrile illness in Southeast Asia through a systematic review?terra incognita impairing treatment policies. *PLoS ONE*. 2012;7:e44269.
3. Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: a global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop*. 2016;166:155–163.
4. Mota MT, Terzian AC, Silva ML, Estofotele C, Nogueira ML. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. *Braz J Microbiol*. 2016;47:38–50.
5. Hajra A, Bandyopadhyay D, Heise LR, Bhadra R, Ball S, Hajra SK. Zika and pregnancy: a comprehensive review. *Am J Reprod Immunol*. 2017;77:e12607.
6. Teoh BT, Sam SS, Tan KK, et al. The use of NS1 rapid diagnostic test and qRT-PCR to complement IgM ELISA for improved dengue diagnosis from single specimen. *Sci rep*. 2016;6:27663.
7. Lee TH, Lee LK, Lye DC, Leo YS. Current management of severe dengue infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15:67–78.
8. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol*. 1999;73:6104–6110.
9. Pryor MJ, Wright PJ. The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. *Virology*. 1993;194:769–780.
10. Wu G, Zaman MH. Low-cost tools for diagnosing and monitoring HIV infection in low-resource settings. *Bull World Health Organ*. 2012;90:914–920.
11. Hu J, Wang S, Wang L, et al. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosens Bioelectron*. 2014;54:585–597.
12. Parolo C, Merkoci A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. *Chem Soc Rev*. 2013;42:450–457.
13. Connelly JT, Rolland JP, Whitesides GM. “Paper machine” for molecular diagnostics. *Anal Chem*. 2015;87:7595–7601.
14. Kumar AA, Hennek JW, Smith BS, et al. From the bench to the field in low-cost diagnostics: two case studies. *Angew Chem Int*. 2015;54:5836–5853.
15. Martinez AW, Phillips ST, Butte MJ, Whitesides GM. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angew Chem Int*. 2007;46:1318–1320.
16. Schilling KM, Jauregui D, Martinez AW. Paper and toner three-dimensional fluidic devices: programming fluid flow to improve point-of-care diagnostics. *Lab chip*. 2013;13:628–631.
17. Cassano CL, Fan ZH. Laminated paper-based analytical devices (LPAD): fabrication, characterization, and assays. *Microfluid Nano-fluidics*. 2013;15:173–181.
18. Fu E, Liang T, Spicar-Mihalic P, Houghtaling J, Ramachandran S, Yager P. Two-dimensional paper network format that enables simple multistep assays for use in low-resource settings in the context of malaria antigen detection. *Anal Chem*. 2012;84:4574–4579.
19. Rozand C. Paper-based analytical devices for point-of-care infectious disease testing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:147–156.
20. Sastre P, Gallardo C, Monedero A, et al. Development of a novel lateral flow assay for detection of African swine fever in blood. *BMC vet res*. 2016;12:206.
21. Steidel M, Fragnoud R, Guillotte M, et al. Nonstructural protein NS1 immunodominant epitope detected specifically in dengue virus infected material by a SELDI-TOF/MS based assay. *J Med Virol*. 2012;84:490–499.
22. Pessoa R, Patriota JV, Lourdes de SM, Felix AC, Mamede N, Sanabani SS. Investigation into an outbreak of dengue-like illness in pernambuco, Brazil, revealed a cocirculation of zika, chikungunya, and dengue virus type 1. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95:e3201.
23. Yu L, Shi Z, Fang C, Zhang Y, Liu Y, Li C. Disposable lateral flow-through strip for smartphone-camera to quantitatively detect alkaline phosphatase activity in milk. *Biosens Bioelectron*. 2015;69:307–315.
24. Zhang Y, Bai J, Ying JY. A stacking flow immunoassay for the detection of dengue-specific immunoglobulins in salivary fluid. *Lab Chip*. 2015;15:1465–1471.
25. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*. 2002;40:376–381.
26. de la Cruz-Hernandez SI, Flores-Aguilar H, Gonzalez-Mateos S, et al. Determination of viremia and concentration of circulating nonstructural protein 1 in patients infected with dengue virus in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88:446–454.
27. Dussart P, Petit L, Labeau B, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2:e280.
28. Vazquez S, Ruiz D, Barrero R, et al. Kinetics of dengue virus NS1 protein in dengue 4-confirmed adult patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68:46–49.
29. Wong SJ, Furuya A, Zou J, et al. A multiplex microsphere immunoassay for zika virus diagnosis. *EBioMedicine*. 2017;16:136–140.
30. Steinhagen K, Probst C, Radzinski C, et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Euro surveill*. 2016;21:1–16.
31. Althouse BM, Hanley KA, Diallo M, et al. Impact of climate and mosquito vector abundance on sylvatic arbovirus circulation dynamics in Senegal. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92:88–97.
32. Marcondes CB, Ximenes MF. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by Aedes (Stegomyia) mosquitoes. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49:4–10.

How to cite this article: Bedin F, Boulet L, Voilin E, Theillet G, Rubens A, Rozand C. Paper-based point-of-care testing for cost-effective diagnosis of acute flavivirus infections. *J Med Virol*. 2017;9999:1–8. <https://doi.org/10.1002/jmv.24806>

Article 2 : Solution microfluidique papier obtenue par découpe laser pour la détection de la protéine non-structurale 1 (NS1) et des IgM dirigées contre le virus de la dengue.

Theillet Gérald, Rubens Agnès, Foucault Frédéric, Dalbon Pascal, Rozand Christine, Leparcoffart Isabelle & Bedin Frédéric

Article publié dans *Archives of Virology* (2018) : *Laser-cut paper-based device for the detection of dengue non-structural NS1 protein and specific IgM in human samples.*

La première version du PAD qui a été développée reposait sur une impression à la cire, directement sur la surface du papier en microfibres de verre, d'un circuit microfluidique. Ce circuit permettait de diriger le flux de migration de l'échantillon à analyser vers les zones de détection du PAD. Cependant, afin d'améliorer la reproductibilité de production des PADs et la robustesse des résultats obtenus, une nouvelle version a été développée. Au lieu d'une impression du circuit microfluidique à la cire, le papier est directement découpé au laser à CO₂, selon un format prédéfini par ordinateur. Le PAD ainsi obtenu est ensuite disposé entre deux morceaux de plastique autocollant, qui ont la particularité de coller entre eux mais de ne pas coller le papier, et donc de laisser l'échantillon migrer sur le PAD. Le plastique supérieur a également été partiellement découpé au laser afin de générer des micro-fenêtres, permettant la fonctionnalisation du papier avec les différentes matières premières biologiques utilisées dans notre test.

Ce nouveau PAD a été expérimenté pour la détection de la protéine NS1 de DENV, mais également pour la détection des IgM spécifiques, indicateurs d'une contamination récente. La première expérimentation a porté sur la détection de la protéine NS1 dans des échantillons de plasma et de sang de patients sains que l'on a chargé en protéine NS1. Un anticorps monoclonal anti-NS1 de DENV, développé chez bioMérieux, a été utilisé à la fois comme anticorps de capture mais également comme anticorps de détection, ce dernier étant couplé à la PAL. Nous avons pu détecter NS1 sur ce nouveau PAD, aussi bien dans du sérum que dans du sang.

Une valeur de quantification du signal S a été calculée pour chaque test pour effectuer des calculs de performances. Dans un premier temps, une valeur seuil S_{seuil} a été calculée sur 20 échantillons de plasma sains (non dengue), testés en duplicat. Une valeur de S supérieure à S_{seuil} sera considérée positive pour l'analyte d'intérêt.

Une limite de détection a ensuite été déterminée avec des concentrations connues de NS1 chargées dans des échantillons de plasma de patients sains. La limite de détection a été estimée à 25ng de protéine NS1 par mL de plasma, avec un résultat obtenu en moins de 8 minutes. Ces mêmes échantillons ont été analysés sur test rapide commercial de type LFA, qui a servi de référence. La limite de détection correspond également à 25ng de protéine NS1 par mL de plasma, mais avec un temps d'obtention du résultat de 25 minutes.

Nous avons montré que le PAD anti-DENV ne détectait pas la protéine NS1 de ZIKV. De plus, en utilisant des anticorps dirigés contre la protéine NS1 de ZIKV sur des échantillons

chargés en NS1 de ZIKV, il a été possible de détecter spécifiquement cette protéine. Le PAD anti-NS1 de ZIKV ne détectait pas la NS1 de DENV. Il n'a donc pas été constaté de réaction croisée entre les protéines des deux virus, pourtant phylogénétiquement proches. Enfin, des plasmas de patients confirmés avec une infection dengue, prélevés en phase virémique et testés sur le PAD pour la détection de NS1, se sont révélés être positifs, et toujours en moins de 8 minutes.

Le second paramètre développé sur le PAD a été la sérologie des IgM anti-DENV. Pour cela, de la protéine recombinante EDIII (correspondant au domaine III de la protéine d'enveloppe du virus) a été utilisée comme outil de capture des IgM d'intérêt. Un anticorps anti-IgM humaines couplé à la PAL a été utilisé comme outil de détection. Une valeur seuil de détection S_{seuil} a été déterminée à partir de 16 échantillons de patients sains testés en duplicat, et fixée à $S_{\text{seuil}} = 1,16$. Par la suite, neuf échantillons de plasma caractérisés et provenant de patients positifs en IgM anti-DENV ont été testés sur le PAD ainsi que sur un test rapide commercial de référence. Pour la détection sur le PAD, six d'entre eux sont apparus clairement positifs, deux sont apparus faiblement positifs mais avec une valeur S supérieure à la valeur S_{seuil} fixée, et un seul est apparu négatif. Les résultats ont été obtenus en moins de 8 minutes. Les résultats observés sur le test rapide étaient équivalents à ceux du PAD.

Nous avons évalué les réactions croisées en utilisant des plasmas caractérisés et provenant de patients positifs en IgM dirigées contre d'autres arbovirus, tels que le virus Zika (ZIKV), le virus West Nile (WNV), le virus de la Fièvre Jaune (YFV) et le virus du chikungunya (CHIKV). Ces échantillons ont été testés sur un PAD fonctionnalisé pour détecter les IgM spécifiquement dirigées contre DENV. Aucune réaction croisée n'a été observée pour les échantillons testés. Les résultats détaillés sont présentés dans la publication suivante.



Laser-cut paper-based device for the detection of dengue non-structural NS1 protein and specific IgM in human samples

G. Theillet^{1,2} · A. Rubens¹ · F. Foucault¹ · P. Dalbon¹ · C. Rozand¹ · I. Leparc-Goffart² · F. Bedin¹ 

Received: 14 December 2017 / Accepted: 17 February 2018
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2018

Abstract

The incidence of flavivirus infections has increased dramatically in recent decades in tropical and sub-tropical areas worldwide, affecting hundreds of millions of people each year. Dengue viruses are typically transmitted by mosquitoes and can cause a wide range of symptoms from flu-like fever to organ impairment and death. Although conventional diagnostic tests can provide early diagnosis of acute dengue infections, access to these tests is often limited in developing countries. Consequently, there is an urgent need to develop affordable, simple, rapid, and robust diagnostic tools that can be used at ‘Point of Care’ settings. Early diagnosis is crucial to improve patient management and reduce the risk of complications. In the present study, a novel laser-cut device made of glass-fiber paper was designed and tested for the detection of the dengue Non Structural 1 (NS1) viral protein and specific IgM in blood and plasma. The device, called PAD, was able to detect around 25 ng/mL of NS1 protein in various sample types in 8 minutes, following a few simple steps. The PAD was also able to detect specific IgM in human plasmas in less than 10 minutes. The PAD appears to have all the potential to assist health workers in early diagnosis of dengue fever or other tropical fevers caused by flaviviruses.

Handling Editor: Tim Skern.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00705-018-3776-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ F. Bedin
frederic.bedin@biomerieux.com

G. Theillet
gerald.theillet@biomerieux.com

A. Rubens
agnes.rubens@biomerieux.com

F. Foucault
frederic.foucault@biomerieux.com

P. Dalbon
pascal.dalbon@biomerieux.com

C. Rozand
christine.rozand@biomerieux.com

I. Leparc-Goffart
isabelle.leparcgoftart@gmail.com

¹ BioMerieux, Innovations New Immuno-Concepts, Chemin de l’Orme, 69280 Marcy-l’Etoile, France

² ERRIT, HIA Laveran, 34 boulevard Laveran, 13013 Marseille, France

Introduction

Since 2008 and the first publication of Whitesides et al. [27], paper-based assays have become a major topic in the bio-analytical field and have given rise to abundant literature [9, 12, 24, 36]. Most types of bioassays have already been conducted in paper-like supports: (i) simple rapid tests, such as glucose [40] or enzyme [46] colorimetric assays, which only necessitate the contact between dried reagents and sample; (ii) multiple step protocols, such as sandwich immunoassays [5, 21]; (iii) complex genomic analysis, comprising DNA extraction, amplification, and detection [14, 22]. Whatever test type, paper-based disposables are good candidates to fulfill the “ASSURED” criteria as defined by the World Health Organization: Affordable, Sensitive, Specific, User friendly, Rapid and robust, Equipment free, and Delivered at the point of need [28].

Considered as precursors of paper-based assays, standard lateral flow assays (LFA) are made of the linear assembly of different materials cut into small pieces and glued together on a backing layer. The properties of each material are different and specific for a task within the assay: the nitrocellulose as a support for the colorimetric assay, the glass fiber paper for sample preprocessing, blood filtering and reagent storage, and the thick cellulose paper

as an absorbent pad [49] (see Supplementary data A1; [31]). These different materials are often used to create a so-called paper analytical device, composing 2D or 3D assemblies, more complex in terms of fluidics and more effective in terms of sensitivity than linear 1D lateral flow tests [20] or multiplexing [48].

While buffers or low viscosity samples, like urine, flow easily by capillarity through cellulose paper, more viscous fluids, such as human plasma, can lead to much longer assay times and sometime clogging. Furthermore, sample pretreatment and, more specifically, blood filtering can hardly be performed on untreated cellulose.

Conversely, one of the qualities of the glass-fiber paper is to remove red blood cells and quickly deliver limpid plasma [39]. Capillary flow rate is high (>1 mm/s) and is not severely impacted by sample viscosity. Furthermore, its applicability for single-step bioassays has previously been demonstrated [7, 18]. Here, to simplify the diversity of materials required as far as possible and thus, the manufacturing steps of our devices, glass-fiber paper was chosen as the unique material.

Historically, in order to create hydrophobic barriers for the distribution of fluids laterally or vertically on the paper, patterns were printed by the transfer of melted wax or other hydrophobic components [8, 27]. Laser cutting is an alternative method to produce paper analytical devices (PAD) [25]. One advantage is that any layer material can be patterned, regardless of thickness or fragility. While more expensive than wax printing, the precision and the reproducibility of patterns obtained with a laser cutter are exceptional. The resolution is only limited by laser beam size and robotic arm X-Y displacement precision.

To demonstrate the diagnostic application of the glass-fiber laser-cut devices, a multi-parameters viral disease model has been studied.

Arbovirus infections are viral diseases whose vectors are bloodsucking arthropods such as mosquitoes or ticks [50]. Clinical manifestations of these diseases are often asymptomatic or mildly symptomatic with an acute self-limiting febrile syndrome within a few days of infection that includes headaches, retro-orbital pain, and sometimes the appearance of a rash. However, for arboviruses such as dengue virus (DENV), a significant percentage of patients progress to more severe forms of the disease, that imply that these patients must be taken care of in specific care environments.

The virus, represented by 4 distinct serotypes (DENV1 to 4), is classified in the *Flavivirus* genus and is mainly transmitted in developing countries in the tropical and subtropical areas.

Early diagnosis of arboviruses infections can be accomplished by amplification of the viral genome, by virus isolation, or by looking for specific IgM. The detection of the viral Non-Structural protein 1 (NS1) in the blood of

patients represents an alternative path for the early diagnosis of flaviviruses [23].

NS1, a secreted viral glycoprotein produced by infected cells, is synthesized as a monomer and is dimerized rapidly after post-translational modifications in the endoplasmic reticulum. Dimers are transported to the cell surface and associate as hexamers that accumulate in large amounts in the circulating blood [19, 33].

Specific IgM become detectable 3 to 7 days after the onset of symptoms, followed by IgG. During a secondary infection by another serotype of dengue virus, the level of IgM is low or sometimes undetectable. Interestingly, the severity of the disease is generally associated with a secondary infection with a heterologous serotype [16, 41]. Thus, IgM may discriminate primary and secondary DENV infection and may be of prognostic value.

There is an important need to develop simple, rapid, low-cost, and robust diagnostic tools, especially in countries where dengue is a public health issue. Since proof of concept is considered as the first important step in the development of a fully functional prototype, the aim of the present work was to design a new low-cost, laser-cut, microfluidic device made of glass-fiber paper and to establish that it is possible, by using this device, to perform NS1 protein and specific IgM detection in human samples from dengue patients.

Materials and methods

Material and specimens

DENV-negative plasma and whole blood specimens from healthy donors were obtained from the French National Blood Bank (*Etablissement Français du Sang*, Lyon, France). Patient plasma samples were obtained from Biomnis (Lyon, France) or Biomex (Heidelberg, Germany) through specific contracts with bioMérieux SA. All experiments were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained for any experimentation.

NS1-directed monoclonal antibodies 13E1B3 (dengue) and 1H4F5 (Zika) were all generated by bioMérieux SA (France) after mice immunizations with recombinant NS1 proteins internally produced [42] or purchased (The Native Antigen Co., UK). Monoclonal antibody can be labeled with alkaline phosphatase (AP) as needed, following conventional procedures.

A chimeric recombinant protein that combines serotypes 1 and 3 Envelope protein Domain III (EDIII) was also used [15].

Paper device manufacturing

PAD designs are created with Inkscape v.0.92 (inkscape.org/fr). Manufacturing and assembly steps are performed before any biological activation.

Three layers, made of two different materials, are required to make the PAD. The bottom layer and the top layer are made of adhesive film ARcare7815 (Adhesive Research Inc.; Limerick, Ireland). This is 2 mil clear polyester film coated on one side with a medical grade acrylic pressure-sensitive adhesive. The intermediate layer is a glass-fiber paper-like substrate (MF1, GE Healthcare, Velizy, France).

PADs were produced using a 30W CO₂ laser cutting machine (Speedy 100, Trotec, France). Parameters like speed displacement and laser power are optimized for each material (paper or adhesive) and expected result (cutting or etching). The perimeter of the glass-fiber paper and adhesive, as well as holes in adhesives, are cut through by the laser (see red lines in the design file, Fig. 1a). A controlled

thickness of glass-fiber paper was removed by laser etching around each specific reaction area (see black areas in design file, Fig. 1a). Fig. 1b is an illustration of the final appearance of the device showing specific reaction areas. The surface of a PAD is 9 cm² and is 0.07 cm thick.

PAD description and biological activation

The adhesive top layer has several holes to dispense the sample and solutions inside the glass-fiber paper once the device is assembled (see Fig. 1b): one square-shaped hole for sample loading, one smaller hole for enzyme substrate and two other holes for spotting capture tools in reactive areas (Test and Control). The Test area was coated with a capture antibody directed against the dengue NS1 protein (0.5 µL at 4 mg/mL in PBS1x) or with 0.5 µg of a dengue recombinant protein EDIII [15]. In the Control area, a monoclonal antibody directed against the alkaline phosphatase (14A10B7, BioMérieux) was coated (0.5 µL at 0.5 mg/mL

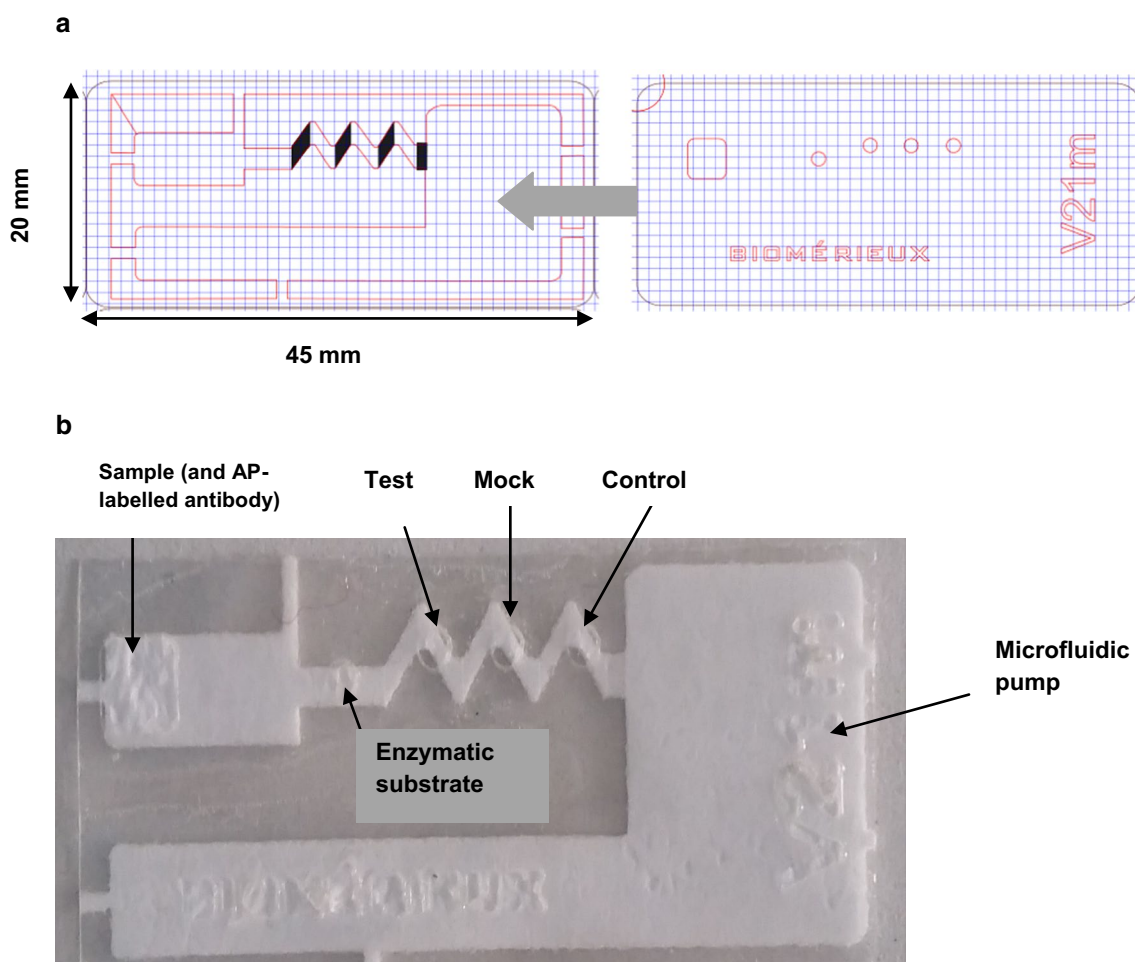


Fig. 1 Laser-cut PAD diagram. a: size and assembly of the different layers that constitute the PAD (from left to right: bottom polyester film & glass fiber paper, top polyester film containing five holes -in red). b: picture of a ready-to-use PAD with details (color figure online)

in PBS1x). The Mock area, inserted between the Test and the Control holes, was coated with 0.5 μ L of PBS1x pH7.5 containing 0.5%BSA. An AP-labeled monoclonal antibody diluted in a buffer containing detergent and sucrose (VIKIA[®] buffer, BioMérieux) was loaded in the square-shaped sample hole (3 μ L at 0.05 mg/mL). PAD functionalized with antibodies and proteins were finally dried 3 min at 60°C. The PAD could be stored for several days at room-temperature or at 4°C before use.

When added, the sample migrated through the glass-fiber and reached the zigzag-shaped reaction areas. In order to both constrain fluids in reaction areas and to increase the time of contact between proteins and antibodies, each reaction area is surrounded by two zones that are etched with laser to remove most of the paper thickness, (see black areas on Fig. 1a). Downstream of the reactive zones, a large paper area plays the role of a microfluidic pump and draws liquids by capillary flow.

NS1 protein detection on the PAD

After coating of the Test area with antibody directed against the NS1 protein, the PAD was loaded with 30 μ L of biological sample (plasma or whole blood), sometimes with different amounts of commercial NS1 protein added (Biorad for dengue NS1 or The Native Antigen Company for Zika NS1). These NS1 recombinant proteins, expressed in human cells, were fully glycosylated and contained a C-terminal 6xHis-tag. Once the sample was totally absorbed by the PAD, 30 μ L of the precipitating, coloring substrate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate solution, BCIP, Promega WI, USA) was added. Finally, the PAD was incubated for a few minutes until BCIP absorption and the appearance of the signal – blue if the sample was positive. A picture was then taken using a smartphone, 8 minutes after the sample loading. The value of the specific signal, called “S”, was quantified from this picture using the ImageJ software (imagej.nih.gov) which performs a grey level analysis and quantification.

S corresponded to the ratio between the value of the grey level on the Mock area and the value of the grey level on the Test area. Alternatively, a commercial *in-vitro* diagnostic kit was used (*OneSite* Duo Dengue Rapid test, CTK Biotech CA, USA) following the manufacturer instructions.

Specific IgM detection on the PAD

After coating of the Test area by EDIII protein, the PAD was loaded with 30 μ L of biological sample (plasma) as previously detailed. After BCIP addition, the PAD was incubated for a few minutes until appearance of the signal. A picture was then taken after 10 minutes and the ratio S was calculated from the picture using the ImageJ software (imagej.nih.gov). Alternatively, a commercial *in-vitro* diagnostic Lateral Flow Assay (LFA) was used (*OneSite* Dengue IgG/IgM Combo Rapid test, CTK Biotech) following the manufacturer's instructions.

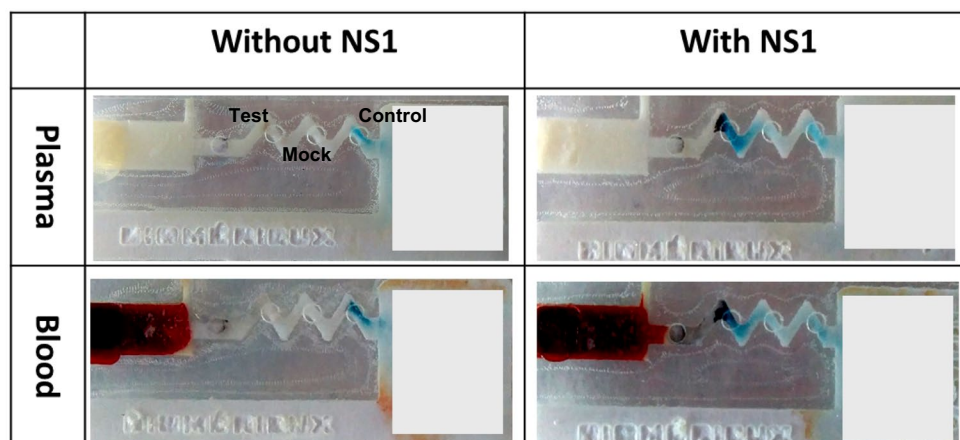
Results

NS1 detection on plasma and whole blood using the PAD

NS1 detection was performed by loading 30 μ L of sample (whole blood or plasma) spiked with 50 ng of NS1 protein. Two serotypes (serotypes 1 and 3 NS1) were evaluated. The monoclonal antibody 13E1B3, was coated on the Test area. The detection was performed using the AP-labelled 13E1B3 antibody. A previous study has proven that the monoclonal antibody 13E1B3 is useful for the efficient detection of DENV 1 and DENV 3 NS1 [42]. Samples without NS1 protein were used as negative samples. The typical results obtained in plasma or in blood samples are illustrated in Fig. 2.

When the whole blood was loaded, the separation of the plasma from the red blood cells, thanks to the glass fiber

Fig. 2 Representative pictures of the results obtained with the functionalized PAD. The results were obtained with 30 μ L of plasma spiked with 50 ng of DENV1 NS1 (=With NS1) or not spiked (=Without NS1). The experiment was also conducted using 30 μ L of whole blood (=blood) spiked/not spiked with 50 ng of DENV1 NS1. The Test, the Mock and the Control areas are indicated



that constitutes the PAD, was clearly visible (see Fig. 2). Using the ImageJ software, a value for the specific signal (S) was calculated for each experiment. The value of S corresponded to the formula (grey level calculated for Mock area)/(grey level calculated for Test area). Thus, S takes into consideration the background observed on the Mock area. For negative plasma or blood, S had values between 0.95 and 1.08. For positive samples, a dark blue signal appeared on the Test area and S could reach values up to 1.95. The presence of a blue coloration on the Control zone indicated that the test was successfully validated. The complete process, from the sample loading to the final picture, took 8 minutes.

Consequently, the PAD can be used to detect NS1 protein in plasma or in blood within minutes.

Determination of the NS1 limit of detection on plasma

In order to determine the limit of detection (LOD) of the PAD functionalized with dengue antibodies, the mean of the S ratio obtained on PADs loaded with negative samples (without NS1) was first calculated. Twenty PADs were loaded with 30 μ L of twenty dengue negative plasma specimens. The S ratio was estimated for each PAD, and the mean and the standard deviation were deduced. For these 20 PADs, the mean (M) of S was 1.02 and the standard deviation (SD) was 0.05. Consequently, a test was considered positive on plasma when the S value was higher than $M+2SD = 1.12$.

Serial dilutions, from 800 ng/mL to 3.1 ng/mL, of the dengue NS1 protein (serotype 1 or 3) in healthy, dengue negative plasma were then tested in triplicate on PADs functionalized with NS1 antibodies. The S ratio was calculated using ImageJ software. For both dengue serotypes 1 and 3, the limit of detection was estimated to be around 25 ng/mL (cf. Table 1, DENV1 and DENV3). The final result was always obtained in less than 8 minutes. Because they are poorly recognized by the 13E1B3 monoclonal antibody [42], DENV2 and DENV4 NS1 proteins were not assayed.

As a reference, a commercial dengue Lateral Flow Assay (CTK Biotech) was tested in parallel using the same dilutions of dengue NS1 protein. For the commercial LFA, the limit of detection in plasma was estimated to be around 25 ng/mL and the final result was obtained in 25 minutes (see Supplementary data A2).

In conclusion, the LOD of the PAD was close to the LOD of a commercial LFA (on dengue) but the time-to-result was reduced approximately threefold. The device was able to detect the NS1 proteins for dengue serotypes 1 and 3.

Table 1 Limit of detection of dengue NS1 proteins in human plasma

[NS1] ng/mL	NS1-DENV1	NS1-DENV3
800	1.59	1.93
400	1.47	1.53
200	1.35	1.49
100	1.25	1.36
50	1.16	1.28
25	1.13	1.12
12.5	1.1	1.09
6.2	1.07	1.04
3.1	1.07	1.02
0	1.04	1.03

[NS1] : concentration of NS1 spiked. DENV1/DENV3: dengue virus serotype 1/serotype 3

In bold : estimated limit of detection. Values correspond to the S ratio (grey level on the Mock area/grey level on the Test area)

Zika NS1 protein was not detected by the dengue PAD

Dengue and Zika (ZIKV) viruses are both flaviviruses with close phylogenetical relationships [32, 44]. To evaluate potential cross-reactions of the 13E1B3 antibody with Zika NS1 protein, PADs were tested with 30 μ L of plasma spiked with 50 ng of dengue NS1 protein serotype 1 (DENV1, Bio-rad) and/or 50 ng of Zika NS1 protein (The Native Antigen Co., UK). The PADs were functionalized either with monoclonal antibody 13E1B3 (directed against the dengue NS1 protein) or with monoclonal antibody 1H4F5 (directed against the Zika NS1 protein). Zika NS1 was detected by using an AP-labelled 1H4F5 antibody. As illustrated in Table 2, when the PAD was functionalized with the monoclonal antibody 13E1B3, the signal was only positive for samples spiked with dengue NS1 protein ($S=1.42$ or 1.48), but negative for sample spiked with Zika NS1 protein ($S=1.05$). Conversely, when the PAD was functionalized with the monoclonal antibody 1H4F5, only samples spiked with Zika NS1 were positive ($S=1.37$ or 1.33).

Consequently, the results on plasma showed that the cross-detection of the Zika NS1 protein was limited on the dengue PAD.

NS1 detection in plasma specimens from acute dengue patients

All the data presented in the previous paragraphs were obtained with plasmas or bloods spiked with recombinant NS1 proteins. To test dengue patient samples and to compare the results obtained with a reference method, five plasma samples from acute dengue patients were tested in parallel on PAD and on a commercial LFA (samples #1 to 5;

Table 2 Detection of dengue and Zika NS1 proteins on PAD

NS1 spiked	Type of PAD	S	NS1 positive ?	
DENV & ZIKV	Dengue	1.42	yes	
	Zika	1.37	yes	
DENV	Dengue	1.48	yes	
	Zika	1.07	no	
ZIKV	Dengue	1.05	no	
	Zika	1.33	yes	
No NS1	Dengue	0.96	no	
	Zika	1.06	no	

Samples spiked with DENV1 and/or ZIKV NS1 protein. Type of PAD : PAD are functionalized for dengue and/or Zika NS1 detection. S corresponds to the ratio between the grey level on the Mock area and on the Test area. Pictures represents results obtained on test areas

see Fig. 3a). The plasma samples came from primary acute dengue patients taken early during the course of the disease (mean = 4.2 days after the onsets of symptoms). All were confirmed to be NS1 positive using the Platelia NS1 ELISA (Biorad). Four out of five plasmas were taken from female patients. The patients were 25–64 years old (mean = 36.8 years). As a control, a dengue-negative plasma was also tested (sample Neg., see Fig. 3a)

The five dengue plasmas were weakly positive on PAD indicated by the presence of a faint blue signal on the Test area (see Fig. 3a). The S values were higher than 1.12 (positivity threshold). Simultaneously, the same plasma specimens were tested with the *OneSite Duo Dengue Rapid* test (CTK Biotech), as a reference *in-vitro* diagnostic kit. With the LFA, all the plasmas were found to be positive. The signal sometimes appeared more intense than for the PAD (samples #1 & 5). For samples #2 (38-year-old female taken at day 4 after onset of symptoms; DENV1), #3 (49-year-old female patient; DENV3) and #4 (a 27-year-old female taken at day 4 after onset; DENV3), signals were barely visible. Samples #2 and 4 also corresponded to the lowest positive S ratio obtained with the PAD ($S_2=1.16$ and $S_4=1.20$).

In conclusion, it is possible, using the PAD, to detect the NS1 protein in plasma specimens from acute dengue patients.

Specific IgM detection in plasma specimens from dengue patients

For the detection of the specific IgM, a chimeric EDIII recombinant protein (bioMerieux) was coated on the Test zone of the PAD. Detection was achieved thanks to an

AP-labeled donkey monoclonal antibody directed against human IgMs (Jackson ImmunoResearch, UK).

To determine the threshold at which the test can be considered as positive for dengue IgM, the mean of the S ratios obtained on PADs loaded with dengue-negative samples was first calculated. Sixteen PADs functionalized with chimeric EDIII were loaded with 30 μ L of sixteen dengue negative plasma specimens. S was estimated for each PAD and the mean and the standard deviation were calculated. The mean (M) of S was 1.08 and the standard deviation (SD) was 0.04. Consequently, a test was considered positive on plasma when the S value was higher than $M+2SD = 1.16$.

For the detection of specific IgM, nine dengue plasmas were used (samples #11 to 19; see Fig. 3b). These plasmas were all IgM positive and came from Hispanic or Polynesian patients (four males and five females). The mean age was 22 years old (range 16–47). According to the specimen supplier, IgM titer was estimated to be between 2.067 and 6.01 (mean 4.52). IgG titer was between 0.35 and 4.74 (mean 1.90). As a control, a dengue-negative plasma was also tested (sample Neg., see Fig. 3b).

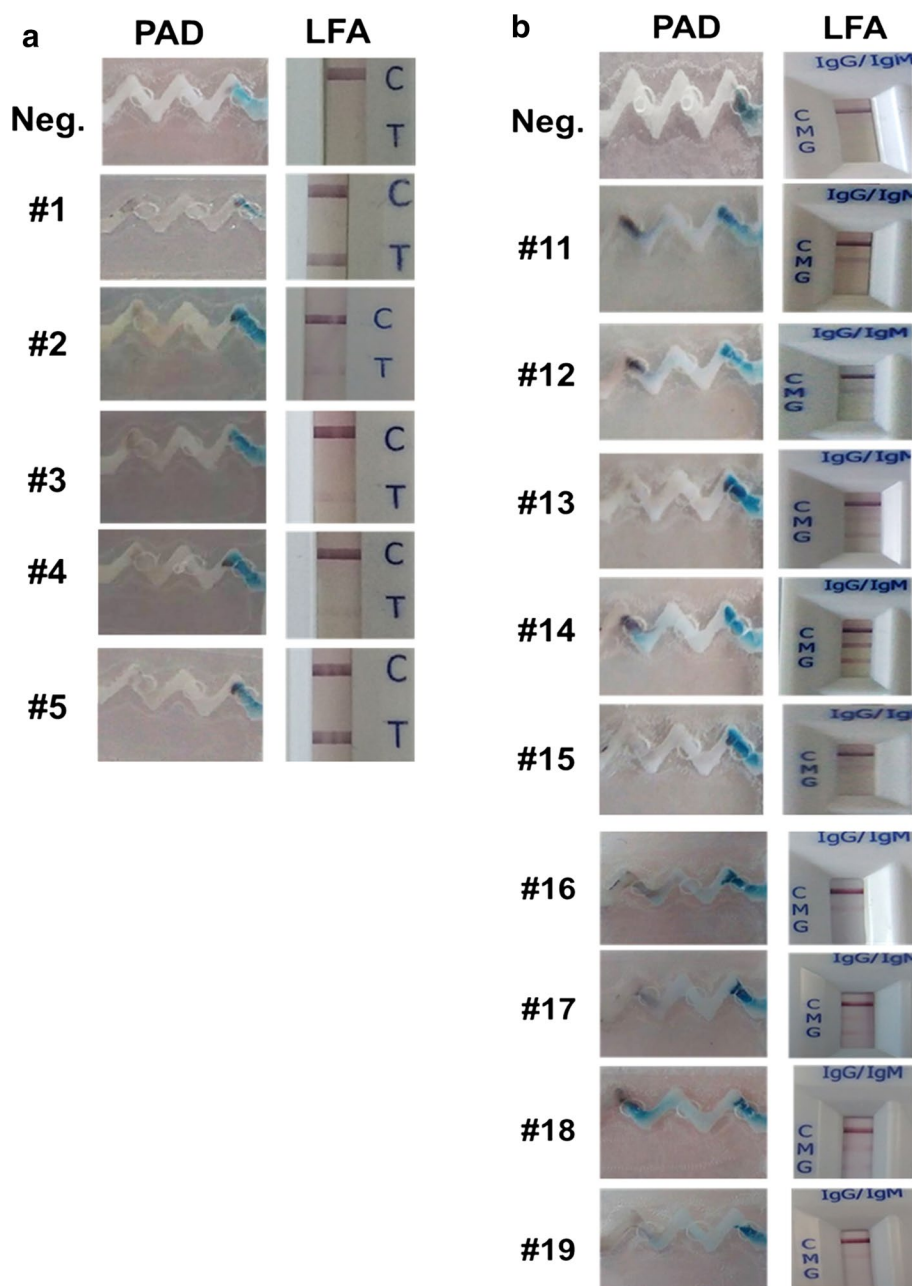
Among the 9 dengue plasmas tested, 6 were clearly positive on PAD by the presence of a dark blue signal on the Test area (plasma specimens #11, 12, 14, 16–18). For these plasmas, S was found to be between 1.22 (#17) and 1.45 (#18). For specimen #15 and #19, the signal observed on the Test zone was weak but was considered as positive because S was higher than 1.16 ($S_{15}=1.19$ and $S_{19}=1.2$). Sample #13, which has the lowest IgM titer (2.067), was found negative ($S=1.1$). All the results were obtained within 10 min.

In order to compare these results with the results obtained with a reference method, the same plasma specimens were used in a commercial *in-vitro* diagnosis LFA (CTK Biotech). Twenty-five minutes after sample loading, results showed that the most intense IgM band was observed for samples #11, 12 and 14. For samples #13 and 14, a clear band for the IgG was also visible. The IgM band was less intense for samples #13 and 15–19, but the test was positive for these samples. With the exception of sample #13, these results were comparable with the results obtained on PAD.

To test if IgG removal has an impact on the signal observed, 1 μ g of anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch, UK) or G protein (Thermoscientifics, France) was spotted upstream of the Test zone, on the hole used for the loading of the enzymatic substrate. No signal difference was observed between PAD with or without anti-IgG or G protein (not shown).

In conclusion, it is possible, using the PAD, to detect specific IgM in plasma specimens from dengue patients.

Fig. 3 PAD assayed for the detection of NS1 proteins and specific IgM in plasma of dengue patients and comparison with commercial LFAs. a. The PADs were functionalized with appropriate antibodies for the detection of dengue NS1 protein. Five plasma from acute dengue patients (#1 à 5) were tested on the PAD and on a commercial lateral flow assay (LFA). Neg.: plasma containing no NS1. On LFA, C corresponds to the control line and T corresponds to the test line. b. The PADs were functionalized with EDIII antigen for the detection of dengue specific IgM. Nine plasma specimens from dengue patients (#11 à 19) were tested on the PAD and on a commercial lateral flow assay (LFA). Neg.: test assessed with dengue-negative plasma. On the LFA, C corresponds to the control, M and G correspond to the IgM or IgG tests. The figure shows the reactive zone of the PAD



IgM detection on plasma specimens from patients infected by other arboviruses

In order to evaluate the potential cross reactions of IgM with the dengue EDIII protein, several plasma specimens from patients infected by a variety of arboviruses other than dengue virus were tested. Five patients were infected by a flavivirus: three patients were infected by the Zika virus (ZIKV), one by the Yellow Fever virus (YFV) and the last one by the West-Nile Virus (WNV). Two additional patients were infected by the chikungunya virus (CHIKV). CHIKV, an alphavirus, is transmitted by the *Aedes* mosquitoes, similar to dengue virus. The virus

co-circulates in the same geographical areas than dengue virus and cases of co-transmission are well documented [35, 34]. According to providers, all patients were controlled IgM-positive. All the samples were assessed twice.

Results, presented in Fig. 4, showed that all the PADs were negative for these samples. The mean S ratio was 1.057 with a maximum reached for the sample ZIKV2 ($S=1.14$). All the tests were validated because of the blue signal on the Control zone of the PAD. The dengue sample #12 (see Fig. 3b) was used as a dengue IgM positive sample.

In conclusion, no significant cross reaction between IgM and dengue EDIII recombinant protein was detected on a

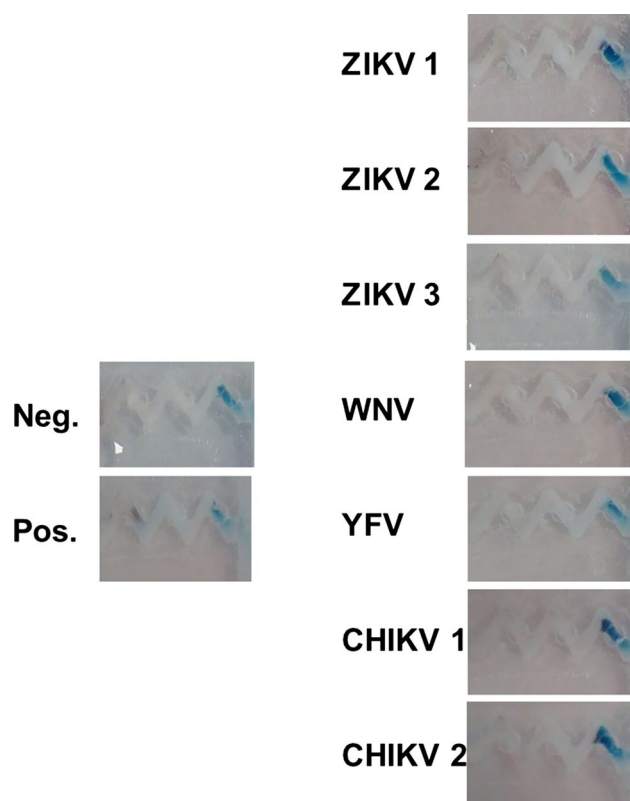


Fig. 4 PAD assayed for the detection of IgM in plasma of patients infected by different arboviruses. The PADs were functionalized with EDIII antigen. Neg.: dengue-negative plasma. Pos.: dengue-positive plasma. ZIKV 1-3: patients infected by the zika virus. CHIKV 1-2: patients infected by the chikungunya virus. YFV: patient infected by the Yellow-fever virus. WNV: patient infected by the West-Nile virus. The figure shows the reactive zone of the PAD

selection of samples corresponding to infections with different arboviruses.

Discussion

In the present paper, a novel laser-cut device made of glass-fiber paper was designed and tested for the detection of the dengue Non Structural NS1 viral protein and the specific IgM in blood and plasma.

In two simple steps (sample and then BCIP addition), it was possible to detect the dengue serotypes 1 and 3 (and possibly Zika) NS1 proteins both in plasma and in blood samples. It was also possible to detect specific IgM on plasma. In both cases, the limit of detection was close to those obtained on a commercial LFA. LFA was chosen as a reference assay because its operating principle, based on fluid flow, is similar to that of the PAD.

To reduce manufacturing costs and complexity, the composition of the PAD was greatly simplified by the choice

of glass-fiber paper as a unique and alternative material to cellulose or nitrocellulose. Glass-fiber paper is one of the components of LFAs that is used for the separation of red blood cells from the plasma [49].

An innovative design, including all functions necessary to an immunoassay (sample reservoir, blood separation, dried antibody-enzyme conjugate storage, test and control zones, and capillary pump) was developed.

The porous and hydrophilic glass-fiber paper has to ensure the motion of sample and other reagents by passive capillarity, i.e., without an external pumping device. The pattern of the PAD had to be precisely designed to provide reproducible and adequate liquid speed and a defined assay sequence.

In the literature, several methods are already described to achieve reliable patterns on paper [1, 12]. The most widely spread is wax printing patterning [8]. It consists of printing wax at the surface of paper, then heating it above the fusion temperature of wax to let it fuse inside the pores within the whole paper thickness, creating a hydrophobic circuit directing fluid movement.

It was previously demonstrated that wax printing on glass-fiber paper was possible using a modification of the original protocol. This method allowed virus protein detection in various biological samples [7]. Although it was possible to achieve, in less than 8 minutes, a limit of detection lower than the LOD obtained with a commercial LFA, the robustness of the wax-printed PAD needs to greatly improved. Moreover, the manufacturing process was hardly compatible with the production of a high number of similar PADs having the same required quality.

Consequently, a new PAD was designed and developed with the same material but using laser cutting. No wax printing and no wax transfer by heating were necessary, therefore preserving the integrity of the glass-fiber and its fluidic properties. The test robustness was thus greatly improved. As previously mentioned, capillary flow speed in glass-fiber paper is particularly high, which is interesting for reducing the time-to results, but can also have a negative impact on analytical sensitivity. Fortunately, laser cutting also offers the possibility of modulating fluidics inside the paper channel [4]. Indeed, a controllable portion of paper thickness can be etched through adjusting settings of laser power and displacement speed, typically high speed and low power.

With the same versatility, the laser cutting process is quicker—one step—and more reliable than wax fusion inside paper fibers, especially when thin channels are required.

The adhesives on both sides of the glass-fiber paper are included to ensure tightness during the assay, to strengthen the glass-fiber sheet, to make it easy to handle, and to facilitate reagent coating and fluid management, by adapting the hole position and size inside the top adhesive.

To be compatible with the finger prick test, the sample load and the blood separation zone are designed to receive around 25–30 μL of whole blood. MF1 glass-fiber paper is specifically sold to filter whole blood but has proven successful with plasma. Other samples such as serum, urine, and saliva can potentially be assayed. The sample load area is also used as a storage area for the enzyme conjugate, which is dried in an appropriate buffer to maintain biological activity and to be dissolved quickly when sample is added. These properties are essentially brought together through use of a high sugar concentration in the buffer. The zigzag-shaped zone has specially been designed to create three visually distinct areas (Test, Mock and Control) and control the speed of fluids within the paper.

Due to smaller budgets, via public financing, the money available to spend on medical diagnostic devices in emerging or developing countries is limited, when compared to that of developed countries. Thus, a very low-cost price strategy is crucial in these countries and thus the cost of a diagnostic device must be kept as cheap as possible. The use of a single material that fulfils all the necessary functions and the simplification of the PAD manufacturing process allow us to better control the cost price. In other words, by reducing the cost of goods and the manufacturing cost, it is possible to significantly reduce the market price of such a device [13].

In addition, as the PAD is approximately 17 times less voluminous than a traditional LFA, storage and waste management is facilitated and the associated costs are also reduced.

Stability tests are used to assess shelf life. To get an idea of their stability, PADs were functionalized and stored for several weeks at different temperatures before being tested with samples spiked by NS1. The results of this preliminary study showed that the PAD can be stored for at least seven weeks at 37°C without significantly affecting the value of the S ratio. In tropical and subtropical countries, where arboviruses are generally transmitted, it is essential to have kits that can be stored in extreme climatic conditions. Exploratory results also showed that several weeks of storage at 22°C or 37°C has a small impact on time-to-result, probably because of physical-chemical modifications to the glass fibers in contact with the acrylic adhesive. However, compared to commercial LFAs, the PAD remains around threefold faster.

A shorter time-to-result allows doctors to diagnose more patients and helps to deliver appropriate and prompt treatment and improve clinical outcomes. This is an advantage in the context of epidemics or when pathogens causing similar symptoms co-circulate in the same country (e.g. arboviruses) [13].

Previous studies have determined the median level of circulating NS1 in the serum of patients infected with DENV. The NS1 concentration varied among individuals during the

course of the disease, but it was generally around 120 ng/mL in serum, ranging from 10 ng/mL to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [2, 38]. The limit of detection estimated with the solution developed here, around 25 ng/mL, is compatible with these biological concentrations of the protein in the body fluids.

The diagnosis of DENV acute infection using NS1 LFA has been shown to be a good first-line test for dengue fever [17]. The NS1 antigen was found circulating from the first day after the onset of fever up to day 9, once the clinical phase of the disease is over [2]. In a secondary DENV infection, the antigen is rarely found at 5–7 days after the onset of symptoms in patients [45]. For Zika NS1, little data is currently available [43, 47].

The presence of dengue specific IgMs that appear early in the disease (4–5 days after the onset of symptoms) is indicative of infection. Assaying for their detection is recommended from the 5th day post-onset. They persist on average for 2 to 3 months. IgG appears at the same time (secondary dengue) or shortly after IgM (primary dengue), but persists throughout life. Therefore, in the presence of IgG alone (without IgM), the diagnosis of dengue fever can only be established in the case of an increase in the antibody titer (IgG) of successive samples. For secondary dengue, the IgM response may exist but remains discreet, brief or even undetectable.

During DENV infection, the antibody response has been shown to target mainly the E/prM structural proteins and the NS1 protein [10]. These proteins are involved in both primary and secondary immune responses. Immune responses against the NS2, NS3, NS4 and NS5 proteins are also observed but with a reduced intensity and frequency. Consequently, E (Envelope), prM (Precursor Membrane), and NS1 proteins are most useful in a serological test. After evaluating the E protein domain III (EDIII) or NS1 protein or both, EDIII alone was finally selected for IgM detection on PAD. EDIII is one of the three structural domains of the E protein. It has been proposed to be a putative receptor-binding domain. EDIII-reactive antibodies are found in convalescent sera from patients infected with dengue [11]. According to different studies, recombinant EDIII could allow differentiation of Japanese encephalitis, dengue and chikungunya viruses [6, 29, 37]. It is suggested that EDIII could be useful for the differentiation of the flaviviruses [30], but their specificity to Zika antibodies remains to be proved. These data are consistent with the negative results obtained on the PAD with samples from patients infected with arboviruses other than dengue virus (ZIKV, WNV, YFV and CHIKV).

Simultaneous detection of dengue NS1 and specific IgM could be considered by using a laser-cut PAD where the sample will be loaded on a unique loading zone divided downstream into two distinct channels (one for NS1, the other for IgM). The “multiplex” PAD could also be used for simultaneous dengue and Zika diagnostics. In tropical or subtropical

countries, such as Brazil where dengue and Zika represent significant health issues, a multiplexed assay might contribute to the management of testing campaigns at the point-of-care settings by minimizing the management of waste and simplifying the workflow in hospitals or dispensaries where many patients could be tested for the main arboviruses. Because transmission of many arboviruses, including flaviviruses, is carried out by the same *Aedes* mosquitoes that colonize the same countries, it could also be interesting to include other viruses such as chikungunya and yellow fever to this multiplex [3, 26].

Thereafter, it would be interesting to develop an improved version of the PAD capable of detecting all serotypes. Samples from a wide range of patients with acute dengue fever, including primary and secondary infections of all four serotypes, should then be tested. This study would determine the clinical performance of the PAD and compare it to existing *in-vitro* diagnostic kits.

The test readout corresponds to a color change in the Test zone that is usually seen by the naked eye. The calculation of the S ratio allowed us to objectify the PAD results. As previously shown for the wax-printed PAD, the S ratio can be calculated automatically from a picture of the test using a smartphone application. It was demonstrated that S values calculated by this application correlated with the S values obtained by the reference method of grey level quantification (i.e. using ImageJ software) [7]. To simplify the results rendering, a similar dedicated application could be developed for the laser-cut PAD.

In conclusion, the test developed here, as a proof of concept, has the potential to fulfill the ASSURED criteria defined by the World Health Organization. It could help health workers in the early diagnosis of dengue fever, or other tropical infectious diseases, which are characterized by undifferentiated fever during the acute phase that may require specific management.

Acknowledgements Authors wish to thank Marc Bossus, Celine Roesch, Michèle Guillote (Immunoassays department of bioMérieux) for antibody productions; Florence Bettworth, Blandine Le Levreur and Marie-Claire Cavaud (Immunoassays department of bioMérieux) for antibody purification and labeling. Special thanks to Maxime Combe and Fabien Fulmar for providing various raw materials. The final manuscript has been read and corrected by RWS life science, Lausanne, CH.

Author contributions All of the authors contributed to the study conception. AR and FF carried out the PAD design and manufacturing. GT, AR and FB performed research. FB, GT and AR wrote the manuscript. All of the authors analyzed data, read, corrected and approved the final manuscript. FB, PD, ILG and CR performed the study coordination and funding.

Compliance with ethical standards

Funding This study was funded by BioMérieux SA and Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (G. Theillet's grant CIFRE no 2015/0514).

Conflict of Interest All the authors (except I. Leparc -Goffart) are employed by bioMérieux SA.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. Ahmed S, Bui MPN, Abbas A (2016) Paper-based chemical and biological sensors: engineering aspects. *Biosens Bioelectron* 77:249–263
2. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flammant M (2002) Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol* 40:376–381
3. Althouse BM, Hanley KA, Diallo M, Sall AA, Ba Y, Faye O, Diallo D, Watts DM, Weaver SC, Cummings DA (2015) Impact of climate and mosquito vector abundance on sylvatic arbovirus circulation dynamics in Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 92:88–97
4. PS-M (2013) CO 2-laser cutting and ablative etching for the fabrication of paper-based devices. *J Micromech Microeng* 23:067003
5. Apilux A, Ukita Y, Chikae M, Chailapakul O, Takamura Y (2013) Development of automated paper-based devices for sequential multistep sandwich enzyme-linked immunosorbent assays using inkjet printing. *Lab Chip* 13:126–135
6. Batra G, Nemani SK, Tyagi P, Swaminathan S, Khanna N (2011) Evaluation of envelope domain III-based single chimeric tetravalent antigen and monovalent antigen mixtures for the detection of anti-dengue antibodies in human sera. *BMC Infect Dis* 11:64
7. Bedin F, Boulet L, Voilin E, Theillet G, Rubens A, Rozand C (2017) Paper-based point-of-care testing for cost-effective diagnosis of acute flavivirus infections. *J Med Virol* 89:1520–1527
8. Carrilho E, Martinez AW, Whitesides GM (2009) Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Anal Chem* 81:7091–7095
9. Cate DM, Adkins JA, Mettakoonpitak J, Henry CS (2015) Recent developments in paper-based microfluidic devices. *Anal Chem* 87:19–41
10. Cedillo-Barron L, Garcia-Cordero J, Bustos-Arriaga J, Leon-Juarez M, Gutierrez-Castaneda B (2014) Antibody response to dengue virus. *Microbes Infect* 16:711–720
11. Chen J, Wen K, Li XQ, Yi HS, Ding XX, Huang YF, Pan YX, Hu DM, Di B, Che XY, Fu N (2016) Functional properties of DENV EDIII-reactive antibodies in human DENV1-infected sera and rabbit antiserum to EDIII. *Mol Med Rep* 14:1799–1808
12. Cheung SF, Cheng SK, Kamei DT (2015) Paper-based systems for point-of-care biosensing. *J Lab Autom* 20:316–333
13. Chin C, Chin S, Laksanasopin T, Sia S (2013) Low-cost microdevices for point-of-care testing. In: Issadore D, Westervelt RM (eds) *Point-of-care diagnostics on a chip*. Springer, Berlin, pp 3–21
14. Choi JR, Hu J, Tang R, Gong Y, Feng S, Ren H, Wen T, Li X, Wan Abas WAB, Pingguan-Murphy B, Xu F (2016) An integrated paper-based sample-to-answer biosensor for nucleic acid testing at the point of care. *Lab Chip* 16:611–621
15. Combe M, Lacoux X, Martinez J, Mejan O, Luciani F, Daniel S (2017) Expression, refolding and bio-structural analysis of a

- tetravalent recombinant dengue envelope domain III protein for serological diagnosis. *Protein Expr Purif* 133:57–65
16. Cucunawangsih Lugito NP, Kurniawan A (2015) Immunoglobulin G (IgG) to IgM ratio in secondary adult dengue infection using samples from early days of symptoms onset. *BMC Infect Dis* 15:276
 17. Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremand L, Leduc A, Moua D, Matheus S, Baril L (2008) Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e280
 18. Fang X, Wei S, Kong J (2014) Paper-based microfluidics with high resolution, cut on a glass fiber membrane for bioassays. *Lab Chip* 14:911–915
 19. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V (1999) Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 73:6104–6110
 20. Fu E, Liang T, Houghtaling J, Ramachandran S, Ramsey SA, Lutz B, Yager P (2011) Enhanced sensitivity of lateral flow tests using a two-dimensional paper network format. *Anal Chem* 83:7941–7946
 21. Fu E, Liang T, Spicar-Mihalic P, Houghtaling J, Ramachandran S, Yager P (2012) Two-dimensional paper network format that enables simple multistep assays for use in low-resource settings in the context of malaria antigen detection. *Anal Chem* 84:4574–4579
 22. Gan W, Zhuang B, Zhang P, Han J, Li CX, Liu P (2014) A filter paper-based microdevice for low-cost, rapid, and automated DNA extraction and amplification from diverse sample types. *Lab Chip* 14:3719–3728
 23. Granger D, Leo YS, Lee LK, Theel ES Serodiagnosis of dengue virus infection using commercially available antibody and NS1 antigen ELISAs
 24. Mahato K, Srivastava A, Chandra P (2017) Paper based diagnostics for personalized health care: emerging technologies and commercial aspects. *Biosens Bioelectron* 96:246–259
 25. Mahmud M, Blondeel EJM, Kaddoura M, MacDonald BD (2016) Creating compact and microscale features in paper-based devices by laser cutting. *Analyst* 141:6449–6454
 26. Marcondes CB, Ximenes MF (2016) Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. *Rev Soc Bras Med Trop* 49:4–10
 27. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM (2008) Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19606–19611
 28. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E (2010) Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Anal Chem* 82:3–10
 29. Mathengtheng L, Burt FJ (2014) Use of envelope domain III protein for detection and differentiation of flaviviruses in the Free State Province, South Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis (Larchmont, NY)* 14:261–271
 30. Niu G, Pang Z, Guan C, Qi J, Li D (2015) Dengue virus envelope domain III protein based on a tetravalent antigen secreted from insect cells: potential use for serological diagnosis. *Virus Res* 201:73–78
 31. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A (2009) Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem* 393:569–582
 32. Priyamvada L, Hudson W, Ahmed R, Wrammert J (2017) Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology. *Emerg Microbes Infect* 6:e33
 33. Pryor MJ, Wright PJ (1993) The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. *Virology* 194:769–780
 34. Rodriguez-Morales AJ, Villamil-Gomez WE, Franco-Paredes C (2016) The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. *Travel Med Infect Dis* 14:177–179
 35. Saswat T, Kumar A, Kumar S, Mamidi P, Muduli S, Debata NK, Pal NS, Pratheek BM, Chattopadhyay S, Chattopadhyay S (2015) High rates of co-infection of Dengue and Chikungunya virus in Odisha and Maharashtra, India during 2013. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 35:134–141
 36. Shah P, Zhu X, Li CZ (2013) Development of paper-based analytical kit for point-of-care testing. *Expert Rev Mol Diagn* 13:83–91
 37. Shukla J, Khan M, Tiwari M, Sannarangaiah S, Sharma S, Rao PV, Parida M (2009) Development and evaluation of antigen capture ELISA for early clinical diagnosis of chikungunya. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65:142–149
 38. dIc-H SI, Flores-Aguilar H, Gonzalez-Mateos S, Lopez-Martinez I, Alpuche-Arand C, Ludert JE, del Angel RM (2013) Determination of viremia and concentration of circulating nonstructural protein 1 in patients infected with dengue virus in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 88:446–454
 39. Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS, Laiwattanaapaisa W (2012) Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices. *Lab Chip* 12:3392–3398
 40. Soni A, Jha SK (2015) A paper strip based non-invasive glucose biosensor for salivary analysis. *Biosens Bioelectron* 67:763–768
 41. Soo KM, Khalid B, Ching SM, Tham CL, Basir R, Chee HY (2017) Meta-analysis of biomarkers for severe dengue infections. *PeerJ* 5:e3589
 42. Steidel M, Fragnoud R, Guillotte M, Roesch C, Michel S, Meunier T, Paranhos-Baccala G, Gervasi G, Bedin F (2012) Nonstructural protein NS1 immunodominant epitope detected specifically in dengue virus infected material by a SELDI-TOF/MS based assay. *J Med Virol* 84:490–499
 43. Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van EM, Schinkel J, Grobusch MP, Goorhuis A, Warnecke JM, Lattwein E, Komorowski L, Deerberg A, Saschenbrecker S, Stocker W, Schlumberger W (2016) Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. In: *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.50.30426>
 44. Tsai WY, Youn HH, Brites C, Tsai JJ, Tyson J, Pedrosa C, Drexler JF, Stone M, Simmons G, Busch MP, Lanteri M, Stramer SL, Balmaseda A, Harris E, Wang WK (2017) Distinguishing secondary dengue virus infection from Zika virus infection with previous dengue by a combination of 3 simple serological tests. *Clin Infect Dis* 65:1829–1836
 45. Vazquez S, Ruiz D, Barrero R, Ramirez R, Calzada N, del Rosario PB, Reyes S, Guzman MG (2010) Kinetics of dengue virus NS1 protein in dengue 4-confirmed adult patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 68:46–49
 46. Vella SJ, Beattie P, Cademartiri R, Laromaine A, Martinez AW, Phillips ST, Mirica KA, Whitesides GM (2012) Measuring markers of liver function using a micropatterned paper device designed for blood from a fingerstick. *Anal Chem* 84:2883–2891
 47. Wong SJ, Furuya A, Zou J, Xie X, Dupuis AP 2nd, Kramer LD, Shi PY (2017) A multiplex microsphere immunoassay for Zika virus diagnosis. *EBioMedicine* 16:136–140
 48. Yen CW, de Puig H, Tam JO, Gomez-Marquez J, Bosch I, Hamad-Schifferli K, Gehrke L (2015) Multicolored silver nanoparticles for multiplexed disease diagnostics: distinguishing dengue, yellow fever, and Ebola viruses. *Lab Chip* 15:1638–1641
 49. Yetisen AK, Akram MS, Lowe CR (2013) Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab Chip* 13:2210–2251
 50. Zhang B, Salieb-Beugelaar GB, Nigo MM, Weidmann M, Hunziker P (2015) Diagnosing dengue virus infection: rapid tests and the role of micro/nanotechnologies. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 11:1745–1761

Article 3 : Sérologie IgM anti-chikungunya sur support microfluidique papier obtenu par découpe laser et utilisant des pseudoparticules virales comme antigène de capture.

Theillet Gérald, Grard Gilda, Galla Mathilde, Maisse Carine, Dalbon Pascal, Leparç-Goffart
Isabelle & Bedin Frédéric

Article soumis à *Journal of Medical Virology* (novembre 2018) : *Detection of chikungunya virus specific IgM on laser-cut paper-based device using pseudo-particles as capture antigen.*

Le PAD laser a permis de détecter de façon sensible et spécifique les antigènes des virus de la dengue et Zika, ainsi que les anticorps dirigés contre ces virus. Dans la précédente étude, ce PAD a également été évalué pour la détection des IgM spécifiques du virus de la dengue (DENV). Des expérimentations similaires ont par la suite été réalisées pour la détection du virus du chikungunya (CHIKV), qui représente le paramètre principal de cette thèse.

Dans un premier temps, des expérimentations ont portées sur la détection de la protéine de capsid du CHIKV. Des anticorps spécifiquement dirigés contre cette protéine ont été développés par bioMérieux. Des analyses en Biacore® et en ELISA ont permis de mettre en évidence des couples d'anticorps permettant de détecter efficacement cette protéine, après son ajout dans des échantillons de sérum et de sang. Dans les mêmes conditions, il a été possible de la détecter sur le PAD avec une limite de détection de 130,33ng de protéine par mL de sérum, et 520,83ng de protéine par mL de sang. Cependant, il n'a pas été possible de la détecter dans des échantillons biologiques de patients naturellement contaminés par le virus, malgré différentes tentatives pour augmenter la sensibilité de détection du PAD et améliorer la limite de détection.

La suite de l'étude s'est concentrée sur la détection des anticorps spécifiques du CHIKV. La méthode immunologique standardisée de détection de ces anticorps est le MAC-ELISA (*type M Immunoglobulin – Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), dans lequel est utilisé un lysat viral de CHIKV produit en laboratoire et inactivé chimiquement, ainsi qu'un anticorps anti-protéine d'enveloppe (E2) couplé à la PAL. Cette méthode est sensible, mais la production de lysat viral nécessite un laboratoire de sécurité de niveau 3. Le procédé est long et requiert du personnel qualifié. C'est pourquoi la recherche d'antigènes alternatifs au lysat viral représente une piste intéressante pour le développement d'un MAC-ELISA de nouvelle génération.

Ainsi, l'utilisation de *Virus-Like Particles* (VLPs) et de *PseudoParticles* (PPs) a été étudiée. Ces particules sont des structures multi-protéiques qui imitent l'organisation et la conformation du virus natif, mais qui ne possèdent pas le génome viral et sont donc non infectieuses. De ce fait, il n'est pas nécessaire de les produire en laboratoire de haute sécurité. Leur production en culture cellulaire est simple et des quantités importantes peuvent être obtenues. Ces « virus synthétiques » sont principalement utilisés comme base pour le développement de virus de nouvelle génération, mais très peu décrits dans le cadre du diagnostic *in vitro*. Une fois produites, ces particules peuvent être récoltées avec le milieu de

culture cellulaire pour être utilisées telles quelles, ou bien ultracentrifugées après un dépôt sur un coussin de saccharose pour être purifiées avant utilisation (p-VLPs ou p-PPs).

Les VLPs et PPs ont été testées en MAC-ELISA en microplaque 96 puits, sur des échantillons de sérums de patients ayant été contaminés par le CHIKV. Les résultats ont montré un signal 2 à 3 fois plus élevé avec les PP non purifiées qu'avec le lysat viral ou n'importe quel autre antigène alternatif. De plus, une analyse en Western-Blot a montré que cette différence de signal n'était pas due à une différence de concentration en protéine virale d'enveloppe entre les VLPs et les PPs utilisées.

Le format de détection MAC-ELISA utilisant des PP non purifiées (u-PPs) a ensuite été testé sur le PAD. Une valeur seuil de détection S_{seuil} a été définie sur 44 échantillons de patients sains, et a été fixée à $S_{\text{seuil}} = 1,039$. Les premiers résultats obtenus ont été décevants. Il a été décidé de concentrer les u-PPs en les lyophilisant avant de les resuspendre en eau purifiée pour les concentrer 20 fois (u-PP-lyo) et les utiliser sur le PAD. Les premiers résultats obtenus ont montré des réactions positives. Cependant, en raison de problèmes de sensibilité et de répétabilité des résultats, le format de détection a été simplifié. Les u-PP-lyo ont été déposées directement sur le papier pour être utilisées comme antigènes de capture, et la révélation a été faite avec un anticorps anti-IgM humaines couplé à la PAL. Avec ce format, nous avons observé une sensibilité de détection des IgM anti-CHIKV de 70,6% et une spécificité de 97,7% sur un total de 34 échantillons de sérums de patients positifs pour ces anticorps.

Nous avons ensuite évalué les réactions croisées de ce format de détection sur le PAD en utilisant des sérums de patients positifs en IgM dirigées contre d'autres arbovirus, tels que le virus de la dengue (DENV), le virus Zika (ZIKV), le virus Ross River (RRV) et le virus O'Nyong-Nyong (ONNV). Il est apparu quelques réactions croisées pour DENV et ZIKV, ainsi que pour RRV. Les mêmes échantillons ont été testés sur le test rapide commercial et une seule réaction croisée a été observée pour un échantillon positif en IgM anti-ZIKV. Le format MAC-ELISA, utilisé en parallèle comme test de référence, ne présente aucune réaction croisée.

Les résultats détaillés de ces expérimentations sont présentés ci-après.

Detection of chikungunya virus specific IgM on laser-cut paper-based device using pseudo-particles as capture antigen.

Theillet G rald^{1,2}, Grard Gilda^{2,3}, Galla Mathilde^{2,3}, Maisse Carine⁴, Enguehard Magot^{5,6}, Cresson Marie^{5,6}, Dalbon Pascal¹, Leparac-Goffart Isabelle^{2,3}, Bedin Fr d ric¹

1 : bioM ricieux, Innovation New Immuno-Concepts, Chemin de l'Orme, 69280 Marcy-l'Etoile, France.

2 : Unité des Virus Emergents (UVE: Aix-Marseille Univ – IRD 190 – Inserm 1207 – IHU Méditerranée Infection), Marseille, France.

3 : IRBA, Unité de virologie - CNR des Arbovirus, HIA Laveran - CS50004, 13384 Marseille, France.

4 : Viral Infections and Comparative Pathology, UMR754, INRA, Univ. Claude Bernard Lyon1, EPHE, F69007, Lyon, France.

5 : Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France; Ecologie Microbienne CNRS UMR 5557, INRA UMR1418 Villeurbanne, France.

6 : CAS Key Laboratory of Molecular Virology and Immunology, Unit of Interspecies transmission of arboviruses and antivirals, Institut Pasteur of Shanghai, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China.

Key words: virus-like particles, pseudotyped virus, field-flow fractionation, arbovirus, chikungunya.

ABSTRACT

The incidence of arbovirus infections has increased dramatically in recent decades affecting hundreds of millions of people each year. The *Togaviridae* family includes the chikungunya virus (CHIKV), which is typically transmitted by *Aedes* mosquitoes and causes a wide range of symptoms from flu-like fever to severe arthralgia. Although conventional

diagnostic tests can provide early diagnosis of CHIKV infections, access to these tests is often limited in developing countries. Consequently, there is an urgent need to develop performing, affordable, simple, rapid, and robust diagnostic tools that can be used at point-of-care settings. Early diagnosis is crucial to improve patient management and to reduce the risk of complications.

A glass-fiber laser-cut microfluidic device (PAD) was designed and evaluated, as a proof of concept, for the analysis of 30 µL of patient serum. Raw materials used for the functionalization of the PAD were first screened by MAC-ELISA for CHIKV IgM capture and then evaluated by the PAD on various human samples.

Compared to viral lysate traditionally used for chikungunya (CHIK) serology, CHIKV Pseudo-Particles (PPs) have proven to be powerful antigens for specific IgM capture. The PAD was able to detect CHIKV IgM in human sera in less than ten minutes. Results obtained in patient sera showed a sensitivity of 70.6% and a specificity of around 98%. The PAD showed few cross-reactions with other tropical viral diseases.

The PAD could help health workers in the early diagnosis of tropical diseases such as chikungunya, which require specific management protocols in at risk populations.

BACKGROUND

Chikungunya (CHIK) is an infectious disease caused by the chikungunya virus (CHIKV), an arbovirus (*arthropod-borne virus*) transmitted by infected *Aedes* mosquitos ¹. CHIKV belongs to the *Togaviridae* family (*Alphavirus* genus),

which also includes Ross River, Mayaro, Semliki Forest and O’Nyong-Nyong viruses ^{2,3}. CHIKV was first isolated in Tanzania in 1952 ^{4,5} and became endemic in large areas of Africa, the Middle East, India and Southeast Asia ^{6,7}. Between 2005 and 2007, CHIKV caused a massive epidemic on Reunion Island ⁸. Since 2013, the rapid spread of the virus has been reported in the Caribbean and Central and South America. CHIK is an acute highly symptomatic illness characterized by strong fever, headache, intense asthenia, rash, myalgia and severe arthralgia ⁹. Severe arthralgia that mainly affects hands, wrists, elbows, ankles and knees, can evolve to chronicity. To date, there is no specific and efficient treatment.

Arboviruses are mainly prevalent in developing countries of tropical and subtropical areas, and represent a serious public health concern for these countries ¹⁰. Diagnostic assays, such as polymerase chain reaction (RT-PCR), Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) can provide sensitive results and help to optimize patient care ¹¹⁻¹⁵. However, these assays are time-consuming, rarely affordable and require infrastructure and qualified operators, making them accessible to relatively few low-income countries ¹⁶.

The development of rapid and affordable diagnostics tests can be an interesting alternative to the use of traditional diagnostic tests.

Lateral Flow Assays (LFA) for arboviruses diagnostic have already been developed and are to date distributed by companies, both for viral proteins and the serological detection of type M Immunoglobulins (IgM) and/or type G Immunoglobulins (IgG) ^{15,17,18}. However, although their use is suitable for low-income countries ¹⁹, some issues mainly concerning reliability, performance, quality and regulatory approval, have been revealed in the utilization of these tests ²⁰⁻²⁴. Moreover, even with a controlled market price, they remain expensive and therefore relatively inaccessible to a great majority of the population living in the poorest countries.

Paper-based analytical devices (PAD) provide an alternative technology to traditional diagnostic devices. They are simple, low-cost and suitable not only for infectious disease diagnosis, but also for food quality control and environmental monitoring ^{25,26}. PAD are good candidates to fulfill the ASSURED criteria ²⁷ as defined in 2003 by the World Health Organization (WHO). These criteria specify the ideal characteristics of a test that can be used at all levels of the health

system, and are defined as i) Affordable, ii) Sensitive, iii) Specific, iv) User-friendly, v) Rapid and robust, vi) Equipment-free, vii) Delivered to those who need them ²⁷⁻²⁹.

PAD manufacturing has been intensively explored and described in the literature. Techniques involving laser cutting, wax printing or photolithography are often cited ³⁰⁻³⁴. PAD were originally developed for the separation of plasma from whole blood - notably by using glass-fiber paper ³⁵, for the detection of heavy metal ions ^{36,37} or biomolecules such as uric acid and glucose in various biological samples ^{38,39}. PAD have also been used for bacterial diagnostics (e.g. *Mycobacterium tuberculosis*), ⁴⁰. More recently, PAD have been developed for arboviruses diagnostic, including Zika and dengue ^{34,41,42}. Until now, few data are available concerning the CHIK diagnostic.

The presence of CHIKV specific IgM that appear early in the disease is indicative of a recent infection. Assaying for their detection is recommended from the 5th day post-onset. Initially, the IgM capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (MAC-ELISA) developed by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, United States) for the serological diagnosis of chikungunya used either a chemically inactivated viral lysate (CHIK

VL)⁴³, or a CHIKV envelope recombinant protein⁴⁴.

In the present paper, a laser-cut glass-fiber PAD using chikungunya Pseudo-Particles (PPs) and Virus-like-Particles (VLPs) as alternative antigens to viral lysate, was evaluated as a proof of concept for CHIKV IgM serology in human samples. PPs and VLPs are multiprotein structures that mimic the organization and conformation of the authentic native virus but lack the viral genome and are therefore noninfectious⁴⁵.

METHODS

Materials and specimens. The anti-E2 monoclonal antibody (3E10A5) was internally produced. 3E10A5 was directed against a conformational epitope of E2. As needed, it can be labeled with alkaline phosphatase (AP) following conventional procedures. The chikungunya viral lysate (CHIK VL) was produced and purified by the *Centre national de Référence des arbovirus* (CNR Arbovirus, *Institut de Recherche Biomédicale des Armées*/IRBA, Marseille, France) using standard procedures⁴⁶.

CHIK negative sera and whole blood specimens were obtained from healthy donors from the French National Blood

Bank (*Etablissement Français du Sang*, Lyon, France). Patient serum specimens were obtained from Biomnis, ABO (Lyon, France) and IRBA (Marseille, France) through specific contracts with bioMérieux SA. Informed consent was obtained for any experimentation. All experiments were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki.

VLPs and PPs production and purification. The method for obtaining VLPs or PPs were adapted from previous studies^{45,47,48}. Briefly, for the PPs, 293T eukaryotic cells (ICAAC, Washington, USA) were co-transfected with plasmids encoding the Gag-Pol (core) proteins of Murine leukemia virus, the Green Fluorescent Protein (GFP) or the chikungunya viral envelope glycoproteins, by the CaCl₂ method (Clontech transfection kit, Clontech, Fremont, Ca, USA) following the manufacturer's instructions. After transfection, the cells were incubated overnight at 37°C. The transfection was checked the next day by controlling the presence of GFP in the cells using a flow cytometer (FACS Calibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). For VLPs, the same protocol was applied except that only one plasmid, containing the genes encoding the different

structural proteins of the CHIKV, was used. After an additional 24 h of incubation, the cell culture medium containing the unpurified VLPs or PPs (u-VLPs or u-PPs) was harvested and filtered using a 0.45 µM filtration unit (Merck-Millipore, Burlington, Mass, USA).

The filtered cell culture medium was either frozen at -80°C or purified by ultracentrifugation. In this case, the medium was loaded on a 2 mL sucrose cushion (20% W/V in PBS1x) and was ultracentrifuged at 107 000 g, 2 hours at 4 °C (SW 41T rotor, Beckmann Optima LE 80K ultracentrifuge, Indianapolis, ID, USA). The pellet containing the particles was resuspended in PBS1X and then frozen and stored at -30 °C. About 60 µL of purified VLPs (p-VLPs) or purified PPs (p-PPs) were recovered from a 10 cm Petri dish containing 7 mL of OPTIMEM medium (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA),.

Western-Blot. Antigens were analyzed in non-reducing conditions. Briefly, 2.5 µL of antigen were mixed with 2.5 µL of 4X NuPAGE® LDS Sample Buffer (ThermoFisher Scientific, Waltham, Mass, USA). Then, 5 µL of deionized water were added (q.s. 10 µL). Samples were heated at 70 °C for 10 minutes and transferred to a NuPAGE® 4-12% Tris-Bis 200M™ gel (Invitrogen). The sample migration

occurred in a 1X MES migration buffer (ThermoFisher Scientific) over 52 minutes at 200 volts, 400 mA and 100 W. The transfer of migrated proteins on a PVDF membrane (Merck Millipore) was performed thanks to an Invitrolon™ apparatus following the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific). Proteins were revealed with the 3E10A5 primary antibody and an AP-labeled anti-mouse secondary antibody (bioMérieux SA) using the Snap-iD® 2.0 Protein Detection System (Merck Millipore), and the addition of NBT/BCIP Substrates (nitro-blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate, ThermoFisher Scientific). Protein bands on the blots were analyzed using a GS-800 scanner (BioRad, Hercules, Ca, USA). The ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>) was used to quantify the gray intensity level of each band. The height of each band was also evaluated using the ImageJ software by measuring the distance between the upper and the lower zone of the bands.

MAC-ELISA. IgM antibody capture ELISA proceeded according to standardized methodology^{43,49-51}. Polystyrene 96-well plates were coated overnight at 4 °C with 5 µg.mL⁻¹ of goat anti-human IgM (Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike, PS, USA) in PBS1x. Plates were washed with

PBS1x containing 0.05% Tween-20 and blocked with a solution of PBS1x -0.5% BSA for 1 hour at 37 °C. Fifty microliters of patient serum 1:200 diluted were added and incubated for 1 hour at 37 °C. CHIKV antigens diluted in PBS1x -0.05% BSA – 0.05% Tween20® were then added and incubated for 2 hours at 37 °C. The optimal antigen concentration was experimentally determined for each antigen: p-VLPs or p-PPs were diluted 1:20, u-VLPs or u-PPs were used undiluted, the E2 recombinant protein (Aalto Bioreagent, Dublin, Ireland) was used at 2 µg.mL⁻¹, the viral lysate inactivated by beta-propiolactone was diluted at 1:400. Finally, 0.5 µg.mL⁻¹ of AP conjugated anti-E2 monoclonal antibody (3E10A5, bioMérieux SA) was added into each well and incubated for 1 hour at 37 °C. After intensive washing, the reaction was developed at room temperature 15 min after adding of a PNPP solution (P-NitroPhenyl Phosphate, ThermoFisher Scientific) and was stopped by adding 2N sodium hydroxide. The optical density (OD) was measured at 450 nm in a plate reader (Eon Biotek, Biotek Instruments, Winooski, Vt, USA).

Paper devices manufacturing. Laser-cut PAD manufacturing was accurately described in a previous publication ³⁴. Briefly, two ARcare7815 auto-adhesive plastic layers (Adhesive Research Inc.,

Limerick, Ireland) and a glass-fiber paper (MF1, GE Healthcare, Velizy, France) were cut using a 30W laser cutting machine (Speedy 100, Trotec, France) following a pattern designed with Inkscape v.0.92. The glass-fiber paper is then sandwiched between the two adhesive sheets, forming the final PAD.

PAD biological activation. The Test area was coated with a capture antibody directed against the human IgM (0.5 µL at 4 mg.mL⁻¹, Jackson ImmunoResearch) in PBS1x. The Control area was spotted with an anti-alkaline phosphatase monoclonal antibody (14A10B7, BioMérieux SA) (0.5 µL at 0.5 mg.mL⁻¹ in PBS1x). The Mock area was coated with 0.5 µL of PBS1x containing 0.5% BSA (PBS-BSA). One microliter of an anti-E2 AP-labeled monoclonal antibody (AP-3E10A5, bioMérieux SA), diluted to 0.05 mg.mL⁻¹ in a buffer containing detergent and sucrose (VIKIA® buffer, BioMérieux SA), was mixed with 1 µL of lyophilized unpurified PPs (u-PPs-lyo) for 5 minutes at room temperature, and the mix was loaded in the square-shaped sample hole (2 µL).

Alternatively, the Test area was directly coated with 0,5 µL of u-PPs-lyo. In that case, an AP-labeled anti-human IgM monoclonal antibody diluted in VIKIA®

buffer was loaded in the square-shaped sample hole (3 μL at 0.1 mg.mL^{-1}).

The functionalized PADs were dried for 1 minute 30 seconds at 60 °C. Then, 0.5 μL of PBS-BSA were added to the Test area, to minimize background noise. Finally, the PADs were dried for 1 minute 30 seconds at 60 °C again. Once functionalized, the PADs could be stored for several days at room temperature or at 4 °C before use.

RESULTS

Anti-CHIKV IgM detection on MAC-ELISA. It has previously been demonstrated that CHIK VL was the antigen of choice for sensitive IgM detection by MAC-ELISA⁴³. Logically, CHIK VL seemed to be the ideal antigen for the PAD. However, producing CHIK VL and using it for serology requires a Level 3 laboratory and can be problematic in terms of safety. The CHIK VL is traditionally inactivated by treatment with a chemical reagent (e.g. Beta-Propiolactone) that potentially has an impact on the viral protein structure. In order to find a safer and more convenient alternative solution to CHIK VL for CHIKV IgM serology, we compared a variety of other antigens, including CHIKV-PPs, CHIKV-VLPs and CHIKV E2 recombinant protein.

These antigens were first evaluated by MAC-ELISA. As the VLPs/PPs purifications steps (i.e. centrifugation; see Materials & Methods) were time-consuming and could result in a significant loss of material, VLPs and PP were tested either purified by ultracentrifugation (p-PPs and p-VLPs, around 0.1 $\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ in PBS1x), or unpurified (u-PPs and u-VLPs). In this case the cell culture supernatant that contained the VLPs/PPs was directly used. The E2 recombinant protein was used at 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Experiments were conducted on twenty CHIKV IgM positive patient sera tested in duplicate. Twenty samples from healthy patients (without CHIKV IgM) were used as negative control.

As illustrated in Figure 1a, the highest signal was observed for a MAC-ELISA using the non-purified PP, u-PP (OD= 2.86 +/- 0.140). The signal was approximately 2.4 times higher than for CHIK VL (OD=1.259 +/- 0.066), which is considered as the reference assay. The u-VLPs, presented a signal 1.4 times lower than the signal observed for the CHIK VL, and 3.2 times lower than for the u-PPs. Conditions using p-PPs or p-VLPs and E2 protein shared approximately the same signal level (OD between 0.461 and 0.602), i.e. approximately 2.4 times lower than the signal of the reference assay, and 5.5 times lower than the u-PPs condition.

Antibody 3E10A5, used in the MAC-ELISA as a detection antibody, is directed against a conformational epitope of the protein E2. To ensure that the signal observed in MAC-ELISA with u-PPs was not due to a difference in E2 protein concentration, the concentration for each antigen was estimated after a Western-Blot using the 3E10A5 antibody and a densitometry analysis. Figure 1b shows the values calculated from the Western-blot picture. The value of each bar of the graph corresponds to the formula [band gray value intensity] x [band surface]. The highest signal was observed for the VL (gray intensity relative value, $V=254$), which presented a value 1.4 times higher than for the recombinant protein E2 ($V=176.4$). In comparison, the signal calculated for u-PPs ($V=34.2$) was 7.4 times lower and 5.2 times lower than in the CHIK VL and the E2 recombinant protein, respectively. The same magnitude order was observed for p-VLPs. The p-PPs showed a signal 2.8 times higher than all others PP/VLPs antigens tested.

The results showed that, among the variety of antigens tested by MAC-ELISA, the CHIKV-u-PPs have the highest signal intensity and can be used as alternative antigen to VL.

Anti-CHIKV IgM detection on PAD using different antigens.

In order to confirm the results obtained with MAC-ELISA, the different CHIKV antigens were first evaluated on PAD (Figure 2a), functionalized as for CHIKV MAC-ELISA plates (i.e. with IgM-directed antibody as a capture tool) (Figure 2b) ⁵¹. A specific detection signal (S) was calculated for each experiment using the ImageJ software. The value of S corresponded to the formula [gray level calculated for Mock area]/[gray level calculated for Test area] ³⁴. Thus, S takes into consideration the background observed on the Mock area. For negative sera, S had values between 0.95 and 1.032. For positive samples, a dark blue signal appeared on the Test area (Figure 2c) and S could reach values up to 1.95. The presence of a blue color in the Control zone indicated that the test was successfully validated. The complete process, from the sample loading to the final picture, took around 8 minutes. Each antigen was tested in duplicate on three CHIKV IgM positive sera and one healthy CHIKV IgM negative serum.

Despite the encouraging results obtained on MAC-ELISA, the first results obtained on the PAD with u-PPs and u-VLPs were negative. To assess whether the signal could be improved by increasing the concentration of the u-PPs or u-VLPs, 2mL

of culture media containing the u-PPs or u-VLPs were lyophilized at 13 μ bar at -80 °C (Usifroid® lyophilisator, Société Nouvelle Usifroid, Elancourt, France). The lyophilisate was finally resuspended in 100 μ L of ultra-pure water in order to obtain a 20-fold concentrated antigen. For the IgM serology, the lyophilized/concentrated antigens (u-PPs-lyo or u-VLPs-lyo) were loaded on the Test zone of the PAD.

The PAD functionalized with u-PPs-lyo gave a positive result for the detection of the anti-CHIKV IgM ($S=1.302$). All the other antigens such as VLPs, E2 recombinant protein, diluted or not diluted, showed negative results on PAD (S values between 1.013 and 1.037). For CHIK VL, the PAD was negative when used diluted at 1:400 as in MAC-ELISA ($S = 1.000$), but was positive when the VL was used undiluted ($S = 1.117$). In comparison, S value for u-VLPs-lyo remained negative ($S = 1.037$), around 1.25 times lower than S value for u-PPs-lyo ($S = 1.302$).

Thus, for the CHIKV IgM serology on the PAD, u-PPs-lyo will preferably be used as a capture antigen.

CHIKV IgM PAD performances. In order to estimate the sensitivity of the PAD, a positivity threshold was first calculated. The Limit Of Detection (LOD) determines the threshold above which the test result

can be considered positive. Twenty-four PADs were loaded with 30 μ L of serum samples from healthy patients (without CHIKV IgM). For these PADs, the mean (M) of S was 1.027 and the standard deviation (SD) was 0.02. Consequently, for CHIKV IgM detection on sera, a PAD was considered positive when the S value was higher than $M+2SD = 1.067$.

PADs were evaluated by loading 30 μ L of 14 CHIKV IgM sera. 12 sera from patients without CHIKV IgM were also tested. Only 5 CHIKV sera of 14 (36.7%) were found positive on the PAD ($S_{max} = 1.096$ and $S_{min} = 1.077$; see Supplementary data 1).

Alternatively, the antigen (u-PPs-lyo) was directly spotted on the Test zone of the PAD, as capture tool (Figure 3a). The test was performed by loading 30 μ L of sample on the PAD. The detection was performed using an anti-human IgM AP-labeled monoclonal antibody.

For this new PAD format, a new positivity threshold was calculated as described above. Forty-four PADs were loaded with 30 μ L of serum samples from healthy patients (without CHIKV IgM).). For these PADs, the mean (M) of S was 1.002 and the standard deviation (SD) was 0.018. Thus, for CHIKV IgM detection on sera, the PAD was considered positive when the

S value was higher than $M+2SD = 1.039$. On the 44 negative sera tested, only one appeared positive, with an S value of 1.047. Thirty-four sera samples (21 females/13 males; mean age: 37 years-old) were tested on PAD for CHIKV IgM serology. All samples have previously been tested by a CHIKV MAC-ELISA and were confirmed to be CHIKV IgM positive by the providers.

The results illustrated by Figure 3b showed that among the 34 samples tested on PAD, 24 were found positive with an S mean of 1.110 and with an SD of 0.059 ($S_{\min} = 1.042$ and $S_{\max} = 1.527$). The PADs found negative presented an S mean of 1.008, with an SD of 0.008 ($S_{\min} = 0.992$ and $S_{\max} = 1.029$). Taken together, these data allowed to estimate that the PAD sensitivity was 70.6%. The specificity of the PAD was also calculated and was 97.7% (see Table I).

IgM detection on plasma specimens from patients infected by other arboviruses. The PAD was evaluated for patient sera that were IgM positive for other arboviruses such as dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) (see Table II). These sera were confirmed to be CHIKV IgM negative by sera providers. These viruses have been chosen because of their recurrent co-circulation with CHIKV

in tropical countries ⁵² and the capacity of the flavivirus genus to induce antibody cross-reactivity ⁵³. We also evaluated the sample from a patient infected with O'Nyong'Nyong (ONNV) viruses, an alphavirus known to cross-react with CHIKV ^{54,55}. Thus, a total of 26 specimens, consisting of recently infected DENV (n=11), ZIKV (N=14) and ONNV (n=1) patient samples, were evaluated in parallel by the CHIKV MAC-ELISA (i.e. the reference method), the CTK Biotech anti-CHIKV IgM LFA and the PAD. In addition, 18 healthy samples were tested as negative controls.

All the DENV IgM positive sera were found negative for CHIKV IgM with MAC-ELISA. When tested using the CTK Biotech rapid test, these samples were also found to be negative. Interestingly, by using the PAD, two sera were found lightly positive for CHIKV IgM ($S_1 = 1.093$; $S_2 = 1.056$).

As for the dengue samples, all the ZIKV IgM-positive sera were found negative by the CHIKV MAC-ELISA. However, one serum was observed to be positive on the CTK Biotech rapid test. On the PAD, three sera were found positive ($S_1 = 1.180$; $S_2 = 1.144$; $S_3 = 1.103$).

Concerning the ONNV IgM-positive serum, it was found negative with CHIKV MAC-ELISA.

The negative samples were always found to be negative.

DISCUSSION

The development of immunological rapid Point-Of-Care (POC) and home-based diagnostic tests, such as the lateral-flow assays, has greatly contributed to generate appropriate analytical results more rapidly, to accelerate patient management ⁵⁶. To this regard, it seems crucial to collect the biological sample within a short period of time, close to the patient location, with the aim to administrate or adjust quickly the most adequate treatment to the patient ⁵⁷.

In previous publications, a new type of POC test, the paper-based analytical device, called PAD, was successfully developed for dengue virus NS1 proteins and specific IgM detection in various human biological samples. In both cases, the limit of detection was close to that obtained with a commercial rapid test ^{33,34}.

In the present paper, the PAD was tested as a prototype for the detection of specific CHIKV IgM in sera. The reference method for specific CHIKV IgM detection is MAC-ELISA. In MAC-ELISA, CHIK VL

is generally used as antigen that binds specific IgM to detect. However, obtaining viral lysate is time consuming and requires that experiments be conducted in a Biosafety Level-3 laboratory ⁵⁸. Before any use, the virus must be inactivated using chemical treatment such as β -Propiolactone (BPL) ⁵⁹. It is generally recognized that BPL inactivates viruses through cross-linking of viral surface proteins. Consequently, BPL treatment could alter the overall structure of Envelope viral proteins, which may modulate the affinity of antibodies for these proteins and thus decrease the sensibility of the test ^{60,61}.

To overcome these drawbacks, alternative antigens to the viral lysate were produced and tested for specific CHIKV IgM detection ⁴³. Among these antigens, VLPs and PPs, two types of synthetic viruses, were chosen because of their innocuous nature due to the absence of viral genome. They can be produced in a simple Biosafety Level-2 laboratory. Moreover, they do not require chemical inactivation, as with viral lysate, reducing the risk of alterations of antigenic epitopes. Synthetic viruses are well characterized and have already been considered a powerful template to develop next-generation vaccines ^{47,62-64}. However, there are a few

references in the literature to the use of these antigens as diagnostic tools ^{65,66}.

Interestingly, using MAC-ELISA, a very strong detection signal for specific CHIKV IgM was observed for u-PPs in comparison with all other antigens, including CHIK VL. The difference of signal was apparently not due to the relative quantity of E2 protein present in each antigen. The differences could be explained by the intrinsic nature of the antigens used. For example, E2 recombinant protein was produced in sf9 insect cells, not in mammalian cells. Between these two expression systems, the nature and linkage of monosaccharides to *N*-glycosylation sites are different and can lead to changes in the folding and three-dimensional structure of the E2 protein ⁶⁷. To this regard, two potential *N*-glycosylation sites have been identified on the E2 protein sequence

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=279311>). To the contrary, VLPs and PPs were produced in 293T eukaryotic cells, closer to the natural production cycle of the virus, and allowed to more effectively mimic the native CHIKV.

It has previously been shown that the PAD sensitivity is generally lower than for the ELISA ³³. Here, it has been necessary to

concentrate the culture supernatant containing the PPs by a lyophilization step to obtain a specific signal on IgM-positive samples. Interestingly, a positive result for the detection of CHIKV IgM was also obtained with the CHIK VL. Preliminary experiments conducted on the wax-printed version of the PAD ³³ showed negative results with CHIK VL for CHIKV IgM serology. The antigen u-PPs-lyo showed positive results with all the PAD versions (wax-printed and laser-cut versions). In addition, the S value obtained for CHIK VL was lower than the S value for u-PPs-lyo. Finally, as previously discussed, obtaining the u-PPs-lyo is easier and safer than the CHIK VL. Consequently, u-PPs-lyo could be used as capture antigen on the PAD instead of the CHIK VL.

In a previous study, Prat et al. evaluated two CHIKV IgM rapid tests ²⁴: SD Bioline CHIKV IgM (Standard Diagnostics Inc., Yongin-si, South Korea), and OnSite Chikungunya IgM Combo Rapid Test (CTK Biotech Inc., San Diego, CA, USA). The SD Bioline showed poor sensitivity (30%) and specificity (73%) for CHIK patients. Authors calculated that 39% and 57% of the results were false negatives and false positives, respectively. Concerning the CTK biotech kit, results showed 20% sensitivity and 93% specificity for CHIKV, with 36% of false negatives and 33% of

false positives. These results lead the authors to state the ineffectiveness of these kits. A similar study conducted by Kosasih et al. showed similar sensitivity results, but a higher specificity for CTK Biotech test, evaluated at 100% ⁶⁸. However, for the SD Bioline kit, the sensitivity reached 68.2% by increasing the time-to-result to 20 minutes instead of 10 minutes. Arya SC et al. evaluated the performances of the CTK Biotech kit as well ⁶⁹, and calculated a sensitivity and a specificity of 71% and 100%, respectively. For the authors, these commercial kits are essential in health care centers for developing countries, to be used in routine early diagnosis and to initiate control measures for CHIK.

The sensitivity for the solution presented here (70.6%) was comparable to these performances, with an time-to-results of 10 minutes. The clinical performances were calculated from a small cohort of patients (N=78) and need confirmation on a larger cohort. Equivalent sensitivity was observed by Arya et al. for the same SD Bioline kit ⁶⁹. By increasing the reading time to 20 minutes, as suggested by the manufacturer, the sensitivity of the SD Bioline test dropped to 68.2% ⁶⁸. However, this value remains lower than that obtained with the PAD.

Rianthavorn et al. claimed that the sensitivity of these tests is correlated to the duration of symptoms ⁷⁰. Consequently, rapid tests should not be used as a screening diagnostic tool during the first week of the disease, when IgM are present at low titers in infected patients. That could explain their poor performances.

In comparison, commercial ELISA designed for CHIKV IgM serology, have better performances than the LFA or the PAD. Johnson et al. evaluated commercial kits from Abcam, EuroImmun and InBios, and found for each kit a sensitivity of 100%, and a specificity of 97% (Abcam, EuroImmun) and 100% (InBios) ¹⁸. Despite their improved detection performance, these commercial ELISAs do not exactly match the ASSURED criteria defined by WHO: they require qualified staff, incubators and readers, are expensive and time-consuming. This could be an obstacle to their use in the poorest countries.

The PAD can overcome these obstacles by offering a faster Time To Result (TTR) of 8 to 10 minutes, and much cheaper diagnostic solution than ELISA tests, and with clinical performances comparable to those of most commercialized rapid tests. Compared to a “traditional” LFA, the cost of goods of the PAD was found to be

between 5 and 10-fold lower. In addition, the PAD has a reduced size (9 cm² surface and 0.07 cm thick) and is composed of fewer materials, which is advantageous for storage and waste management ³⁴.

Some DENV and ZIKV IgM samples were found to be positive on the PAD for the detection of CHIKV IgM. In the literature there are no report describing cross-reactions between these viruses regarding IgM serology. This could be due in part to the folding similarities observed between the alphaviruses and flaviviruses envelope proteins. An atomic resolution crystal structure of an alphavirus E1 protein showed a folding pattern related to the E protein of flaviviruses, suggesting homology of at least some genes between flaviviruses and alphaviruses ⁷¹. In addition, flaviviruses were previously classified in the *Togaviridae* family, suggesting some similarities to the current members of this family. However, owing to viral co-circulation, improvements are required to lower the level of cross-reactivity observed with the PAD. It would be interesting to put flaviviruses specific antibodies upstream of the PAD Test area.

Cross-reactions between CHIKV, and ONNV have already been described ⁷². The two viruses belong to the same Semliki Forest Virus Complex ^{2,73,74}. Interestingly,

the PAD showed no cross-reaction with the ONNV sample. It will be necessary to test a larger panel of alphavirus patients other than CHIK patients, such as O'Nyong Nyon, Ross River or viral encephalitis patients. However, this type of patients is quite rare and difficult to find.

The clinical performances indicate that it would it be beneficial to improve the sensitivity of the PAD and reduce cross-reactions. Many ways were explored in order to enhance sensitivity detection of specific CHIKV IgM on PAD. Beside the nature of the antigens and their positions on the PAD, chemical pretreatments of the PAD were also studied. Thus, chitosan coating and glutaraldehyde cross-linking were used to modify the surface of the PAD to covalently immobilize antibodies on it. Moreover, these compounds simultaneously enhance the wet-strength of the PAD and the stability of immobilized antibodies, because chitosan is readily compatible with paper and imparts to the paper improved mechanical strength ⁷⁵⁻⁷⁹. However, no significant difference in sensitivity was observed in comparison to the PADs that were not functionalized with chitosan and glutaraldehyde.

Another way to enhance sensitivity performance was the addition of anti-Human IgG antibody or G protein on the

PAD, upstream of the Test area. These proteins should capture IgG from the sample tested, in order to decrease IgG binding on the Test area, and enhance the specific IgM detection signal. Unfortunately, in our hands, no significant improvement was observed.

Alternatively, the sensitivity could also be enhanced by testing various blocking agents such as Biolipidures^R (NOF America Corp., USA), known to reduce nonspecific adsorption and also enhance specific signal ⁸⁰.

The cut-off values of a serodiagnostic test were calculated to minimize the total cost of misdiagnoses ⁸¹. To determine the appropriate cut-off value above which a PAD will be regarded positive, many variability factors must be weighed: the nature and quality of the tested sample (serum or blood), the signal quantification procedure (use of a specific software, impact of natural or artificial light, user experience, test repeatability). All these factors have to be considered to determine the best threshold value. For serology on the PAD, it was decided to set the threshold at M+2SD, as described in literature ⁸². With this threshold, we obtained a good specificity but average sensitivity (97.7% and 70.6%, respectively). By setting the threshold at

M+1.5SD, the sensitivity does not change, but the specificity falls to 81.8%. At M+1SD, the sensitivity increases to 73.5%, but specificity decreases to 77.3%.

When using the gray-level analysis software (Image J), the manual selection of the different PAD areas may impact the S value calculation which may slightly differ from one reading to another. Automating the S value calculation can be an alternative way of improving PAD sensitivity. Many previous studies have demonstrated the benefits of a smartphone for reading and obtaining a quantitative and objective result for an accurate diagnostic ⁸³⁻⁸⁸. For the first version of the PAD ³³, an Android®-based application was developed on a smartphone for reproducible and quantitative results from the raw signals. This application calculated, from a simple picture of the PAD, the S value and compared it to the cut-off value, to determine if the test was positive or negative. By limiting the variations in measurement that can be observed by the manual method, the S values reproducibility was improved. A new version of this smartphone application will further be developed for use with the improved version of the PAD presented in this publication, in order to enhance both the reproducibility and the sensitivity of detection. Recently, Quesada-González

and Merkoçi predicted that the development of smartphone biosensing will probably decentralize existing care systems and laboratories, in the near future⁸⁹. They also foresee the rapid spread of POC diagnostic tests and other monitoring devices to be used as close to the patient as possible. The use of a smartphone as a tool for diagnostic tests is compatible with the ASSURED criteria, since the arrival of new phone manufacturers make smartphones accessible to the greatest number of people⁹⁰.

CONCLUSIONS

In the present publication, a new solution using PPs on laser-cut PAD was evaluated as proof of concept for the CHIKV IgM detection. The use of CHIK synthetic viruses, such as PPs, present an alternative way developing new serological diagnostic tests of CHIK, and could be applied to the diagnosis of other viral diseases. By conjugating CHIKV and DENV diagnostics, PAD could be a very useful tool for multiplexed arboviruses diagnosis in endemic regions of the world, in order to improve patient care at a very low price. However, it will be necessary to carry out a study on a larger cohort of samples to consolidate the performance obtained on the PAD. Moreover, the development of a

smartphone-based PAD reader, combined with a dedicated application, would provide faster and more accurate diagnostic results, while objectivizing the result obtained, helping the reading by the operator and/or the patient.

ETHICAL APPROVAL

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All the authors contributed to the study conception. GT, FB performed research. FB, GT wrote the manuscript. All the authors analyzed data, read, corrected and approved the final manuscript. FB, PD,

ILG and CP performed the study coordination and funding. PPs/VLPs were produced by GT and CMP. Samples screening was performed by GG and MG.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors wish to thank Celine Roesch, Michèle Guillote (Immunoassays department of bioMérieux) for antibody productions; Florence Bettsworth,

Blandine Le Levreur and Marie-Claire Cavaud (Immunoassays department of bioMérieux) for antibody purification and labeling; Sandrine Ducrot and Xavier Lacoux (Raw Materials department of bioMérieux) for the lyophilization process; Frederic Foucault for PAD manufacturing. The final manuscript has been read and corrected by RWS life science, Lausanne, CH.

LEGENDS

Figure 1. CHIKV IgM MAC-ELISA. a. CHIKV IgM MAC-ELISA using different CHIKV antigens. Viral lysate corresponds to the reference antigen. Black bars: test; gray bars: negative control using healthy patient serum (no CHIKV IgM). Each condition has been conducted at least twenty-fold in duplicate; b. Relative quantity of CHIKV E2 protein estimated for each antigen by Western-Blots and densitometry analysis. u-PPs / u-VLPs: unpurified PPs/VLPs; p-PPs / p-VLPs: purified PPs/VLPs.

Figure 2. CHIKV IgM detection on PAD. a. Picture of a ready-to-use PAD; b. Schematic depiction of the MAC-ELISA detection format (source: Jaime E. Castellanos et al., 2018); c. Examples of results obtained for IgM serology on PAD (for CHIKV IgM positive sera and negative sera). S (specific detection signal) corresponded to the formula $[gray\ level\ calculated\ for\ Mock\ area] / [gray\ level\ calculated\ for\ Test\ area]$.

Figure 3. CHIKV IgM PAD performances. a. Schematic depiction of the format using unpurified and lyophilized CHIKV Pseudo-Particules (u-PPs-lyo) as capture antigen, directly coated on the PAD; b. Detection of CHIKV IgM on PAD using u-PPs-lyo as capture antigen for 34 patient sera. Each test was conducted in duplicate or in triplicate. A PAD is considered positive when S is equal to or higher than 1.039 (positivity threshold).

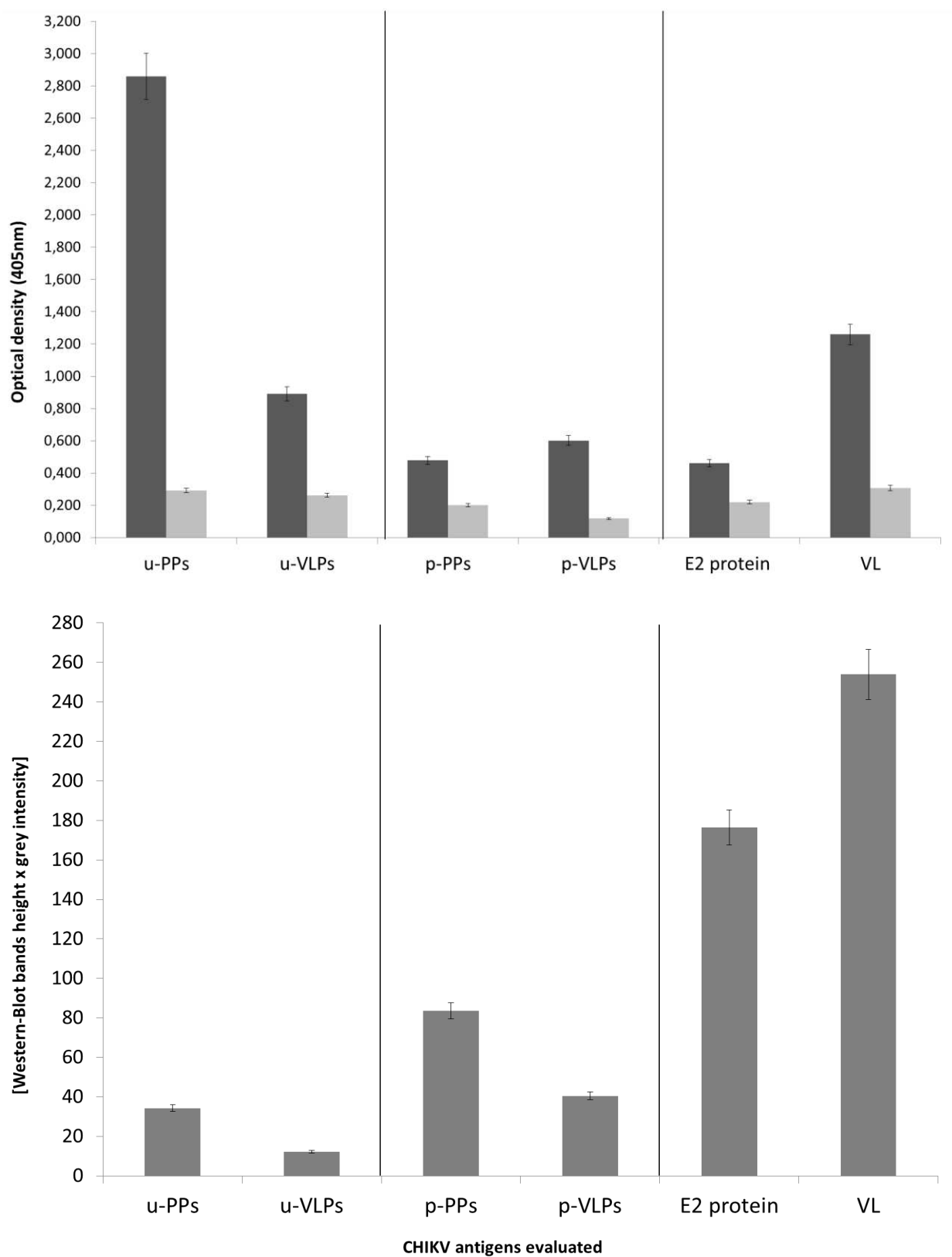


Figure 1

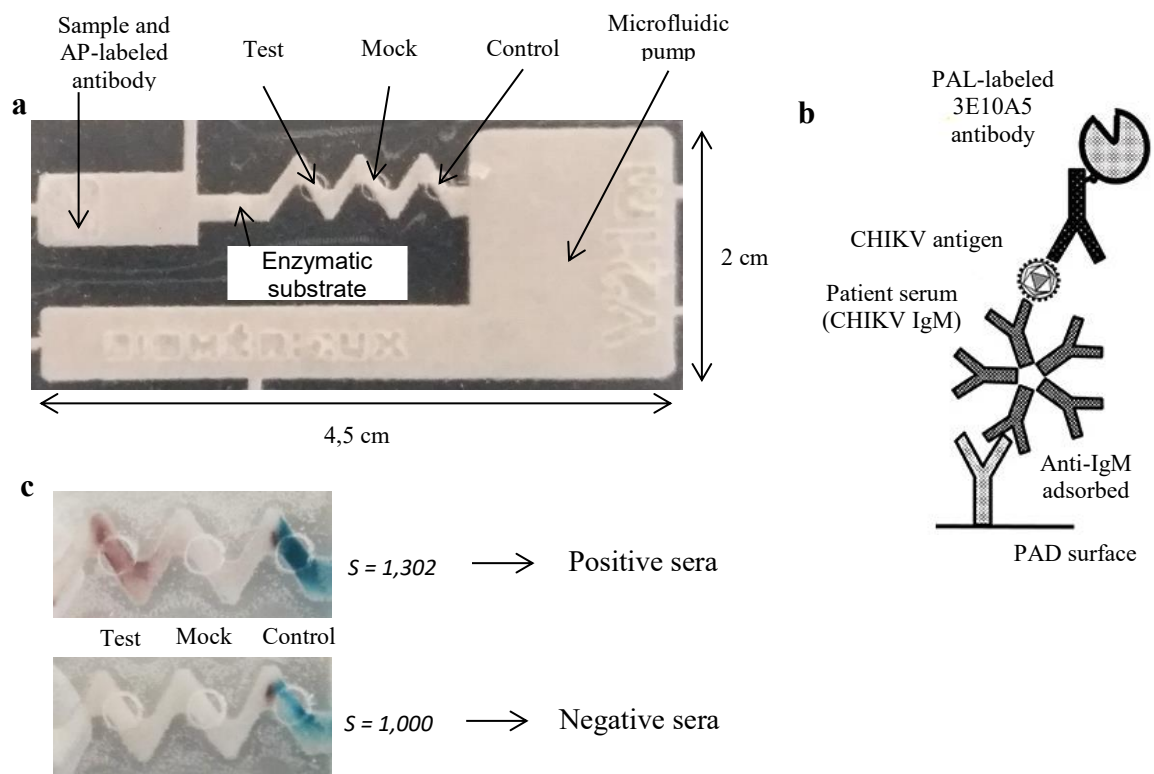


Figure 2

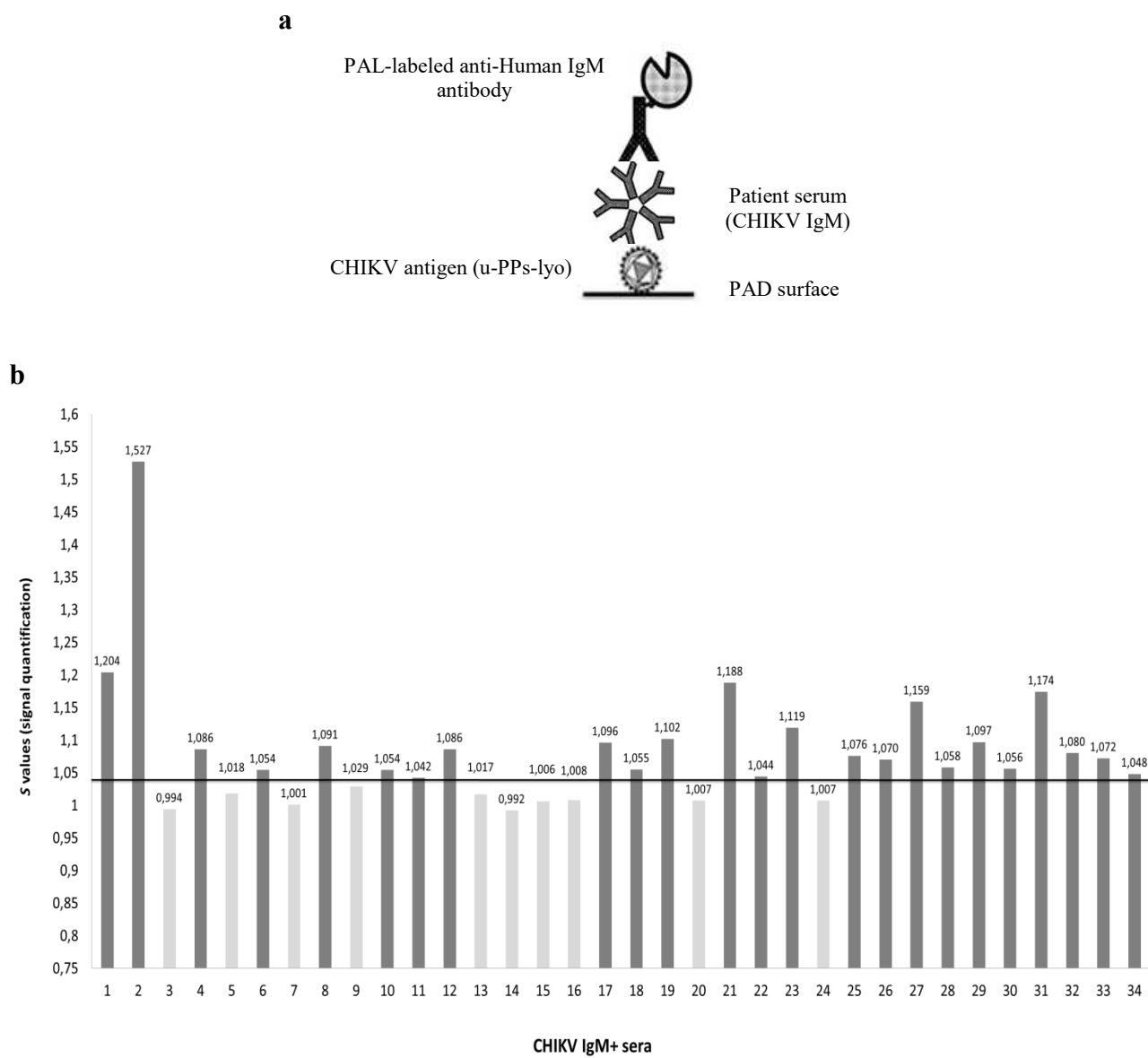


Figure 3

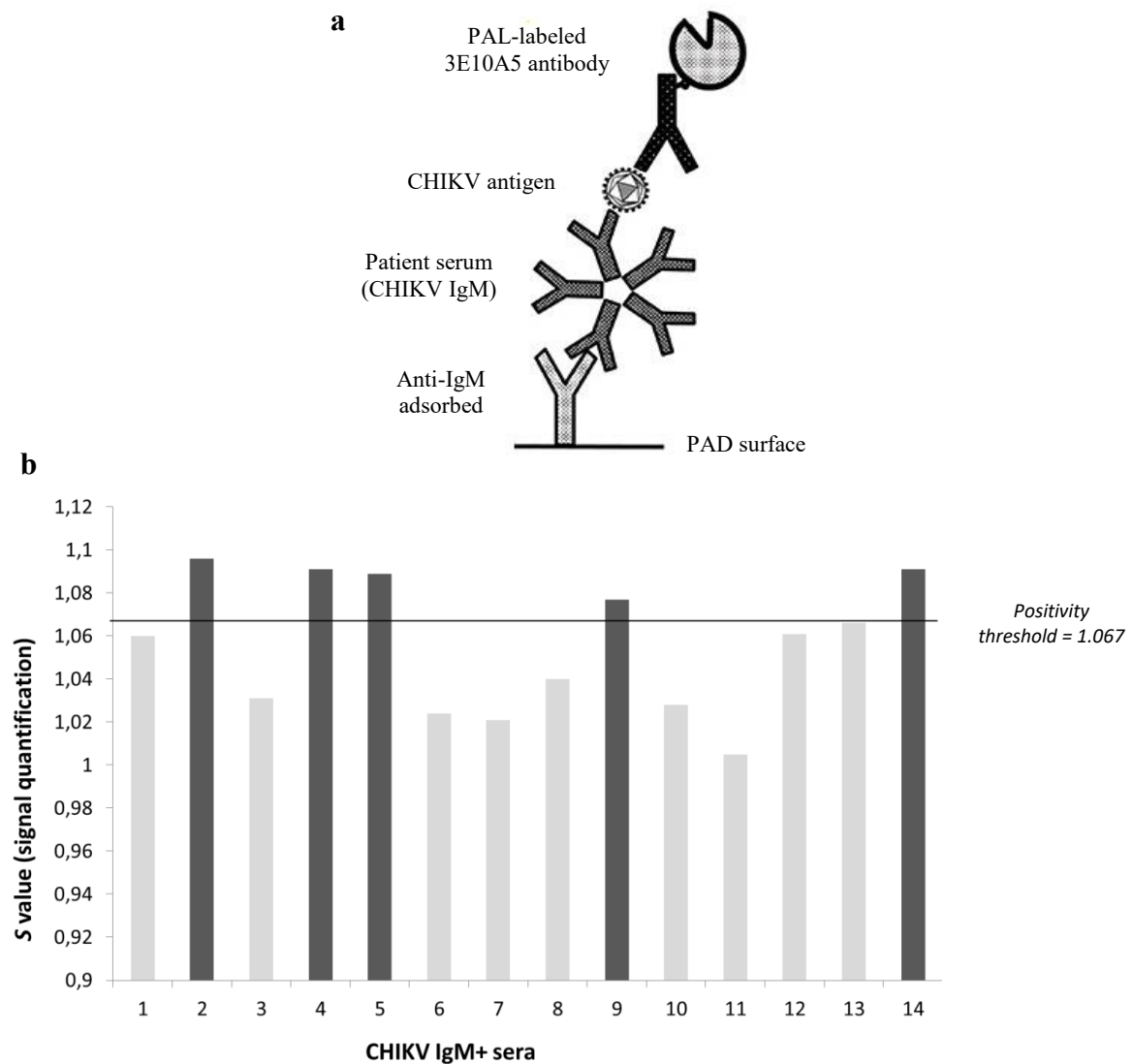
Table 1: PAD performances for CHIKV IgM detection.

Test to evaluate (PAD)	Reference test (MAC-ELISA)		Total
	Positive	Negative	
Positive	24	1	25
Negative	10	43	53
Total	34	44	78

Table 2 : Cross reaction with other arboviruses.

	PAD	LFA (anti-CHIKV IgM)	MAC-ELISA
DENV	2/11 (18%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)
ZIKV	3/14 (21.4%)	1/14 (7.1%)	0/14 (0%)
ONNV	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)
Negative sera	0/18 (0%)	0/18 (0%)	0/18 (0%)

Healthy negative sera, DENV, ZIKV, ONNV IgM positive sera were tested using the PAD functionalized for CHIKV IgM serology, a commercial lateral flow assay for the CHIKV IgM serology (CTK Biotech) and the CHIKV MAC-ELISA. The ratio and the percentage represent the number and the proportion of positive for each test. Each test has been conducted in triplicates.



S1. CHIKV IgM detection on PAD with MAC-ELISA format. a. Illustration of the MAC-ELISA detection format (source: Jaime E. Castellanos et al., 2018); b. detection of CHIKV IgM on PAD using unpurified and lyophilized CHIKV PseudoParticles (u-PP-lyo) in MAC-ELISA format, for 14 patient sera. Each test was conducted in duplicate. A PAD is considered positive when S is equal or higher than 1.067 (positivity threshold).

REFERENCES

1. Furuya-Kanamori L, Liang S, Milinovich G, Soares Magalhaes RJ, Clements AC, Hu W, Brasil P, Frentiu FD, Dunning R, Yakob L: **Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses**. *BMC Infectious Diseases* 2016, **16**(1):84.
2. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C: **Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus**. 2009(1096-0341 (Electronic)).
3. Rathore MH, Runyon J, Haque TU: **Emerging Infectious Diseases**. 2017(1878-1926 (Electronic)).
4. Robinson MC: **An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features**. 1955.
5. Lumsden WH: **An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology**. 1955.
6. Hammon W, Rudnick A, Sather GE: **Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand**. 1960.
7. Rougeron V, Sam IC, Caron M, Nkoghe D, Leroy E, Roques P: **Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk**. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2015, **64**:144-152.
8. Brouard C, Bernillon P, Quatresous I, Pillonel J, Assal A, De Valk H, Desenclos JC: **Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007**. 2008(0041-1132 (Print)).
9. Schwartz O, Albert ML: **Biology and pathogenesis of chikungunya virus**. *Nature reviews Microbiology* 2010, **8**(7):491-500.
10. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, Kohl A, Rudd PA, Taylor A, Herrero LJ *et al*: **Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen**. *The Lancet Infectious diseases* 2017.
11. Azami NA, Moi ML, Takasaki T: **Neutralization Assay for Chikungunya Virus Infection: Plaque Reduction Neutralization Test**. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2016, **1426**:273-282.
12. Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van EM, Schinkel J, Grobusch MP, Goorhuis A, Warnecke JM *et al*: **Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity**

- with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016.** *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 2016, **21**(50).
13. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M: **Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections.** *Journal of Clinical Microbiology* 2002, **40**(2):376-381.
 14. Ho PS, Ng MM, Chu JJ: **Establishment of one-step SYBR green-based real time-PCR assay for rapid detection and quantification of chikungunya virus infection.** *Virol J* 2010, **7**:13.
 15. Mishra N, Caciula A, Price A, Thakkar R, Ng J, Chauhan LV, Jain K, Che X, Espinosa DA, Montoya Cruz M *et al*: **Diagnosis of Zika Virus Infection by Peptide Array and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.** *mBio* 2018, **9**(2).
 16. Hu J, Wang S, Wang L, Li F, Pingguan-Murphy B, Lu TJ, Xu F: **Advances in paper-based point-of-care diagnostics.** *Biosens Bioelectron* 2014, **54**:585-597.
 17. Litzba N, Klade CS, Lederer S, Niedrig M: **Evaluation of serological diagnostic test systems assessing the immune response to Japanese encephalitis vaccination.** *PLoS Negl Trop Dis* 2010, **4**(11):e883.
 18. Johnson BW, Goodman CH, Holloway K, de Salazar PM, Valadere AM, Drebot MA: **Evaluation of Commercially Available Chikungunya Virus Immunoglobulin M Detection Assays.** *Am J Trop Med Hyg* 2016, **95**(1):182-192.
 19. Kafkova J: **Rapid diagnostic point of care tests in resource limited settings.** *International Journal of Infectious Diseases* 2016, **45**:56-57.
 20. Bissonnette L, Bergeron MG: **Diagnosing infections--current and anticipated technologies for point-of-care diagnostics and home-based testing.** *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2010, **16**(8):1044-1053.
 21. Huckle D: **Point-of-care diagnostics: an advancing sector with nontechnical issues.** *Expert Rev Mol Diagn* 2008, **8**(6):679-688.
 22. Jahn UR, Van Aken H: **Near-patient testing--point-of-care or point of costs and convenience?** *British journal of anaesthesia* 2003, **90**(4):425-427.

23. Fu E, Liang T, Houghtaling J, Ramachandran S, Ramsey SA, Lutz B, Yager P: **Enhanced sensitivity of lateral flow tests using a two-dimensional paper network format.** *Analytical Chemistry* 2011, **83**(20):7941-7946.
24. Prat CM, Flusin O, Panella A, Tenebray B, Lanciotti R, Leparac-Goffart I: **Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for chikungunya virus.** *Emerg Infect Dis* 2014, **20**(12):2129-2132.
25. Rozand C: **Paper-based analytical devices for point-of-care infectious disease testing.** *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2014, **33**(2):147-156.
26. Liana DD, Raguse B, Gooding JJ, Chow E: **Recent advances in paper-based sensors.** *Sensors (Basel, Switzerland)* 2012, **12**(9):11505-11526.
27. Kettler H, White K, Hawkes SJ: **Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections: key findings and recommendations.** 2004.
28. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E: **Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices.** *Analytical Chemistry* 2010, **82**(1):3-10.
29. Tay A, Pavesi A, Yazdi SR, Lim CT, Warkiani ME: **Advances in microfluidics in combating infectious diseases.** *Biotechnology advances* 2016, **34**(4):404-421.
30. Spicar-Mihalic P, Toley B, Houghtaling J, Liang T, Yager P, Fu E: **CO₂-laser cutting and ablative etching for the fabrication of paper-based devices.** *Journal of Micromechanics and Microengineering* 2013, **23**(6):067003.
31. Jiang X, Fan ZH: **Fabrication and Operation of Paper-Based Analytical Devices.** *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif)* 2016.
32. Xia Y, Si J, Li Z: **Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review.** *Biosensors & bioelectronics* 2016, **77**:774-789.
33. Bedin F, Boulet L, Voilin E, Theillet G, Rubens A, Rozand C: **Paper-based point-of-care testing for cost-effective diagnosis of acute flavivirus infections.** *Journal of Medical Virology* 2017.
34. Theillet G, Rubens A, Foucault F, Dalbon P, Rozand C, Leparac-Goffart I, Bedin F: **Laser-cut paper-based device for the detection of dengue non-structural NS1 protein and specific IgM in human samples.** *Arch Virol* 2018.

35. Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS, Laiwattanapaisa W: **Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices.** *Lab on a chip* 2012, **12**(18):3392-3398.
36. Lin Y, Gritsenko D, Feng S, Teh YC, Lu X, Xu J: **Detection of heavy metal by paper-based microfluidics.** *Biosensors and Bioelectronics* 2016, **83**:256-266.
37. Zhang M, Ge L, Ge S, Yan M, Yu J, Huang J, Liu S: **Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence device for simultaneous detection of Pb²⁺ and Hg²⁺ based on potential-control technique.** *Biosens Bioelectron* 2013, **41**:544-550.
38. Liu S, Su W, Ding X: **A Review on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Glucose Detection.** *Sensors (Basel)* 2016, **16**(12).
39. Wang X, Li F, Cai Z, Liu K, Li J, Zhang B, He J: **Sensitive colorimetric assay for uric acid and glucose detection based on multilayer-modified paper with smartphone as signal readout.** *Anal Bioanal Chem* 2018.
40. Tsai TT, Shen SW, Cheng CM, Chen CF: **Paper-based tuberculosis diagnostic devices with colorimetric gold nanoparticles.** *Science and technology of advanced materials* 2013, **14**(4):044404.
41. Bosch I, de Puig H, Hiley M, Carre-Camps M, Perdomo-Celis F, Narvaez CF, Salgado DM, Senthooor D, O'Grady M, Phillips E *et al*: **Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum.** *Sci Transl Med* 2017, **9**(409).
42. Meagher RJ, Negrete OA, Van Rompay KK: **Engineering Paper-Based Sensors for Zika Virus.** *Trends in Molecular Medicine* 2016.
43. Martin DA, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT: **Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections.** *Journal of clinical microbiology* 2000, **38**(5):1823-1826.
44. Yap G, Pok KY, Lai YL, Hapuarachchi HC, Chow A, Leo YS, Tan LK, Ng LC: **Evaluation of Chikungunya diagnostic assays: differences in sensitivity of serology assays in two independent outbreaks.** *PLoS neglected tropical diseases* 2010, **4**(7):e753.
45. Noranate N, Takeda N, Chetanachan P, Sittisaman P, Nuegoonpipat A, Anantapreecha S: **Characterization of chikungunya virus-like particles.** *PloS one* 2014, **9**(9):e108169.

46. Metz SW, Pijlman GP: **Production of Chikungunya Virus-Like Particles and Subunit Vaccines in Insect Cells.** *Chikungunya Virus: Methods and Protocols* 2016;297-309.
47. Wu J, Zhao C, Liu Q, Huang W, Wang Y: **Development and application of a bioluminescent imaging mouse model for Chikungunya virus based on pseudovirus system.** *Vaccine* 2017, **35**(47):6387-6394.
48. Peyrefitte CN, Pastorino BA, Bessaud M, Gravier P, Tock F, Couissinier-Paris P, Martial J, Huc-Anais P, Césaire R, Grandadam M: **Dengue type 3 virus, Saint Martin, 2003–2004.** *Emerging infectious diseases* 2005, **11**(5):757.
49. Khan M, Dhanwani R, Kumar JS, Rao PV, Parida M: **Comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant envelope proteins and native cell culture purified viral antigens of Chikungunya virus.** *Journal of Medical Virology* 2014, **86**(7):1169-1175.
50. Castellanos JE, Parra-Álvarez S, Calvo DEP: **Improving diagnosis of Zika virus infection: an urgent task for pregnant women.** *Orion* 2018.
51. Ruckert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna SM, Young MC, Byas AD, Murrieta RA, Fauver JR, Ebel GD: **Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by Aedes aegypti mosquitoes.** *Nat Commun* 2017, **8**:15412.
52. Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett AD, Smith DJ, Galbraith SE, Solomon T, Fooks AR: **Flavivirus-induced antibody cross-reactivity.** *J Gen Virol* 2011, **92**(Pt 12):2821-2829.
53. Smith JL, Pugh CL, Cisney ED, Keasey SL, Guevara C, Ampuero JS, Comach G, Gomez D, Ochoa-Diaz M, Hontz RD *et al*: **Human Antibody Responses to Emerging Mayaro Virus and Cocirculating Alphavirus Infections Examined by Using Structural Proteins from Nine New and Old World Lineages.** *mSphere* 2018, **3**(2).
54. Caglioti C, Castilletti C, Carletti F, Capobianchi MR, Bordi L: **Chikungunya virus infection: an overview.** 2013(1121-7138 (Print)).
55. Ehrmeyer SS, Laessig RH: **Point-of-care testing, medical error, and patient safety: a 2007 assessment.** *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2007, **45**(6):766-773.
56. Tolonen U, Kallio M, Ryhänen J, Raatikainen T, Honkala V, Lesonen V: **A handheld nerve conduction measuring device in carpal tunnel syndrome.** *Acta neurologica scandinavica* 2007, **115**(6):390-397.

57. McFee RB: **Selected mosquito-borne illnesses—Chikungunya.** *Disease-a-Month* 2018.
58. Perrin P, Morgeaux S: **Inactivation of DNA by beta-propiolactone.** *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 1995, **23**(3):207-211.
59. Fan C, Ye X, Ku Z, Kong L, Liu Q, Xu C, Cong Y, Huang Z: **Beta-propiolactone inactivation of coxsackievirus A16 induces structural alteration and surface modification of viral capsids.** *Journal of virology* 2017, **91**(8):e00038-00017.
60. Bonnafeous P, Nicolai MC, Taveau JC, Chevalier M, Barriere F, Medina J, Le Bihan O, Adam O, Ronzon F, Lambert O: **Treatment of influenza virus with beta-propiolactone alters viral membrane fusion.** *Biochimica et biophysica acta* 2014, **1838**(1 Pt B):355-363.
61. Urakami A, Sakurai A, Ishikawa M, Yap ML, Flores-Garcia Y, Haseda Y, Aoshi T, Zavala FP, Rossmann MG, Kuno S *et al*: **Development of a Novel Virus-Like Particle Vaccine Platform That Mimics the Immature Form of Alphavirus.** *Clin Vaccine Immunol* 2017, **24**(7).
62. Metz SW, Martina BE, van den Doel P, Geertsema C, Osterhaus AD, Vlak JM, Pijlman GP: **Chikungunya virus-like particles are more immunogenic in a lethal AG129 mouse model compared to glycoprotein E1 or E2 subunits.** *Vaccine* 2013, **31**(51):6092-6096.
63. Saraswat S, Athmaram TN, Parida M, Agarwal A, Saha A, Dash PK: **Expression and Characterization of Yeast Derived Chikungunya Virus Like Particles (CHIK-VLPs) and Its Evaluation as a Potential Vaccine Candidate.** (1935-2735 (Electronic)).
64. Zeltins A: **Construction and characterization of virus-like particles: a review.** *Molecular biotechnology* 2013, **53**(1):92-107.
65. Park JS, Cho MK, Lee EJ, Ahn KY, Lee KE, Jung JH, Cho Y, Han SS, Kim YK, Lee J: **A highly sensitive and selective diagnostic assay based on virus nanoparticles.** *Nature nanotechnology* 2009, **4**(4):259-264.
66. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J: **Essentials of glycobiology,** vol. 1; 1999.
67. Kosasih H, Widjaja S, Surya E, Hadiwijaya SH, Butarbutar DP, Jaya UA, Nurhayati, Alisjahbana B, Williams M: **Evaluation of two IgM rapid**

- immunochematographic tests during circulation of Asian lineage Chikungunya virus.** *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 2012, **43**(1):55-61.
68. Arya S, Agarwal N: **Rapid point-of-care diagnosis of chikungunya virus infection.** *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2011, **1**(3):230-231.
 69. Rianthavorn P, Wuttirattanakowit N, Prianantathavorn K, Limpaphayom N, Theamboonlers A, Poovorawan Y: **Evaluation of a rapid assay for detection of IgM antibodies to chikungunya.** *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 2010, **41**(1):92-96.
 70. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ: **A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly.** *Future microbiology* 2009, **4**(7):837-856.
 71. Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC: **Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships.** *Journal of General Virology* 2000, **81**(2):471-479.
 72. Schmaljohn AL, D. M: **Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae)** In: *Medical Microbiology 4th edition. Volume 4*, edn. Edited by Baron S e. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
 73. Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N: **Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community.** *Viruses* 2015, **7**(9):4911-4928.
 74. Pang B, Zhao C, Li L, Song X, Xu K, Wang J, Liu Y, Fu K, Bao H, Song D *et al*: **Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid Escherichia coli O157:H7 detection.** *Analytical Biochemistry* 2017.
 75. Liu W, Guo Y, Zhao M, Li H, Zhang Z: **Ring-Oven Washing Technique Integrated Paper-based Immunodevice for Sensitive Detection of Cancer Biomarker.** *Analytical chemistry* 2015, **87**(15):7951-7957.
 76. Van Toan N, Hanh TT: **Application of chitosan solutions for rice production in Vietnam.** *African Journal of Biotechnology* 2013, **12**(4).
 77. Gabriel EF, Garcia PT, Cardoso TM, Lopes FM, Martins FT, Coltro WK: **Highly sensitive colorimetric detection of glucose and uric acid in biological fluids using chitosan-modified paper microfluidic devices.** *Analyst* 2016, **141**(15):4749-4756.
 78. Wang S, Ge L, Song X, Yu J, Ge S, Huang J, Zeng F: **Paper-based chemiluminescence ELISA: lab-on-paper based on chitosan modified paper device and wax-screen-printing.** *Biosensors & bioelectronics* 2012, **31**(1):212-218.

79. Vizard AL, Anderson GA, Gasser RB: **Determination of the optimum cut-off value of a diagnostic test.** *Preventive Veterinary Medicine* 1990, **10**(1-2):137-143.
80. Jacobson R: **Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases.** *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 1998, **17**:469-486.
81. Lee S, Kim G, Moon J: **Performance improvement of the one-dot lateral flow immunoassay for aflatoxin B1 by using a smartphone-based reading system.** *Sensors (Basel)* 2013, **13**(4):5109-5116.
82. You DJ, Park TS, Yoon JY: **Cell-phone-based measurement of TSH using Mie scatter optimized lateral flow assays.** *Biosens Bioelectron* 2013, **40**(1):180-185.
83. Bates M, Zumla A: **Rapid infectious diseases diagnostics using Smartphones.** *Annals of translational medicine* 2015, **3**(15):215.
84. Ganguli A, Ornob A, Yu H, Damhorst GL, Chen W, Sun F, Bhuiya A, Cunningham BT, Bashir R: **Hands-free smartphone-based diagnostics for simultaneous detection of Zika, Chikungunya, and Dengue at point-of-care.** *Biomedical Microdevices* 2017, **19**(4):73.
85. Erickson D, O'Dell D, Jiang L, Oncescu V, Gumus A, Lee S, Mancuso M, Mehta S: **Smartphone technology can be transformative to the deployment of lab-on-chip diagnostics.** *Lab on a chip* 2014.
86. Priye A, Bird SW, Light YK, Ball CS, Negrete OA, Meagher RJ: **A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses.** *Scientific reports* 2017, **7**:44778.
87. Quesada-González D, Merkoçi A: **Mobile phone-based biosensing: An emerging “diagnostic and communication” technology.** *Biosensors and Bioelectronics* 2017, **92**:549-562.
88. **\$30 smartphones are here—and they’re getting better every day**
[<https://qz.com/314285/30-smartphones-are-here-and-theyre-getting-better-every-day/>]

Article 4 : Etude comparative de *Virus-Like Particles* et de *Pseudotyped-Particles* de chikungunya utilisées dans la détection sérologique d'Immunoglobulines de type M spécifiques.

Theillet Gérald, Martinez Jérôme, Steinbrugger Christophe, Coutard Bruno, Papageorgiou Nicolas, Dalbon Pascal, Leparc-Goffart Isabelle & Bedin Frédéric

Article soumis à *Virology* (septembre 2018) : *Comparative study of chikungunya Virus-Like Particles and Pseudotyped-Particles used for serological detection of specific Immunoglobulin M.*

L'intérêt des PPs de CHIKV comme outils de capture d'IgM anti-CHIKV sur le PAD a été démontré dans la précédente étude (cf. **Article 3**). De façon intéressante, la sensibilité de détection des anticorps d'intérêt était moindre avec les VLPs de CHIKV. Les PPs non-purifiées (u-PPs) présentaient de meilleurs résultats de détection des IgM anti-CHIKV que les VLPs non-purifiées (u-VLPs) et le lysat viral (VL). Les expérimentations avaient également montré que cette différence de signal n'était pas due à une différence de concentration en protéine virale E2 entre les deux types de bioparticules, et semblait liée à des différences de propriétés intrinsèques de ces particules.

Afin d'essayer de comprendre cette différence de signal de détection observé entre les PPs et les VLPs, différentes analyses ont été réalisées sur ces bioparticules.

Afin d'évaluer l'impact de l'étape de culture cellulaire (utilisée pour produire les particules) sur la valeur des signaux observés, des MAC-ELISA en microplaques, utilisant des bioparticules purifiées par ultracentrifugation puis resuspendues dans du milieu de culture (DMEMc), ont été réalisées. Les résultats obtenus ont montré que les PPs purifiées (p-PPs) resuspendues dans du DMEMc ne donnaient pas un signal de détection aussi élevé que celui obtenu avec les u-PPs. Au contraire, le signal observé était très proche de celui des p-PPs diluées en PBS1X. Cela démontrerait que le milieu DMEMc a peu d'incidence sur la valeur du signal de détection des IgM anti-CHIKV. Cependant, l'étape d'ultracentrifugation, nécessaire à l'obtention des p-PP, peut avoir un impact sur l'intégrité physique des particules.

Des analyses des p-PPs et p-VLPs en HF5-MALS ont ensuite été réalisées. Cette technologie utilise des mesures d'absorbances et de dépendance angulaire à la lumière pour caractériser finement des bioparticules, afin de déterminer leur taille, leur pureté, la polydispersion, leur morphologie, leur quantité et leur concentration. Les résultats obtenus ont montré une grande variabilité des bioparticules en termes de tailles, entre 80nm et 220nm de diamètre pour les VLPs et 140nm à 180nm de diamètre pour les PPs. Le pic correspondant aux bioparticules analysées est bien isolé, indiquant une assez bonne pureté de l'échantillon analysé. Cependant, il a été observé en amont de ces particules des pics correspondant à des contaminants. Ces contaminants ont été caractérisés comme étant principalement des protéines du milieu de culture (albumine sérique), ou de résidus de protéines virales issues des bioparticules ou relarguées par les cellules lors de la production du virus. La présence de ces contaminants permet de dire que l'étape d'ultracentrifugation ne permet pas une purification parfaite des bioparticules.

En parallèle, afin d'avoir une observation directe de nos bioparticules de CHIKV, une analyse en microscopie électronique à transmission (MET) a été réalisée sur les p-VLPs et les p-PPs. Ces observations ont permis de mettre en évidence la présence de bioparticules sphériques, confirmant ainsi les résultats précédemment obtenus avec le HF5-MALS. Le diamètre de ces bioparticules a été évalué entre 30nm et 150nm pour les VLPs, et 50nm à 200nm pour les PPs. De plus, en plus des particules isolées, il a été observé des particules couplées 2 à 2 voire par 3. L'analyse des p-PPs a été rendue plus difficile par la présence d'un plus grand nombre de contaminants dans la préparation, notamment des filaments d'actine issus des cellules en culture.

Des analyses ont enfin été effectuées afin de mesurer l'avidité des IgM anti-CHIKV pour chacune de bioparticules étudiées. Pour cela, des MAC-ELISA ont été réalisés en plaques 96 puits avec des bioparticules, et des concentrations croissantes d'urée ont été appliquées sur les formats de détection. Il a été observé un décrochage des IgM d'intérêt pour les VLPs pour des concentrations d'urée plus faibles que pour les PPs, indiquant très probablement des interactions plus fortes au sein du complexe IgM-PPs. Cette observation pourrait expliquer le signal plus important obtenu initialement en MAC-ELISA, comparé au format utilisant les VLPs. Nous avons voulu confirmer ces résultats par interférométrie. Cependant, malgré de nombreux essais, il a été impossible de détecter correctement l'attachement des IgM sur les particules.

La technologie HF5-MALS est une bonne méthode de caractérisation des VLP et des PPs. Les différents résultats recueillis semblent indiquer que le signal plus important obtenu avec les PPs en MAC-ELISA serait lié aux propriétés intrinsèques des particules, notamment à la présentation des protéines d'enveloppe virale à leur surface. Des expériences plus approfondies seraient nécessaires afin d'explorer plus en détail l'affinité des VLPs et des PPs pour les anticorps spécifiques du CHIKV, et confirmer les résultats préliminaires décrits dans cet article.

Comparative study of chikungunya Virus-Like Particles and Pseudotyped-Particles used for serological detection of specific Immunoglobulin M

Theillet Gérald^{1,2}, Martinez Jérôme³, Steinbrugger Christophe³, Coutard Bruno⁴, Papageorgiou Nicolas⁴, Dalbon Pascal¹, Leparç-Goffart Isabelle^{5,6}, Bedin Frédéric¹

1 : bioMérieux, Innovation New Immuno-Concepts, Chemin de l'Orme, 69280 Marcy-l'Etoile, France

2 : Unité des Virus Emergents (UVE: Aix-Marseille Univ – IRD 190 – Inserm 1207 – IHU Méditerranée Infection), Marseille, France

3 : bioMérieux, R&D Immunoassays dpt., Biomolecule Engineering – bioMAP, 69280 Marcy-l'Etoile, France

4 : Aix Marseille Université, CNRS, AFMB UMR 7257, Marseille, France

5 : Unité des Virus Emergents (UVE: Aix-Marseille Univ – IRD 190 – Inserm 1207 – IHU Méditerranée Infection), Marseille, France

6 : IRBA, Unité de virologie - CNR des Arbovirus, HIA Laveran - CS50004, 13384 Marseille, France

Key words : virus-like particles, pseudotyped virus, field-flow fractionation, arbovirus, chikungunya.

ABSTRACT

Background. The incidence of arbovirus infections, especially chikungunya virus (CHIKV) infection, has increased dramatically in recent decades, affecting hundreds of millions of people each year. Effective diagnostic methods must be available to optimize patient management. IgM-capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (MAC-ELISA) is routinely used for the detection of specific

CHIKV IgM. Although sensitive, this method requires inactivated CHIKV viral lysate (VL), which entails numerous technical constraints. The use of viral bioparticles such as Virus-Like Particles (VLPs) and Pseudotyped-Particles (PPs) could represent an interesting alternative to viral lysate because of their innocuity and their production facility in comparison to VL.

Methods. VLPs and PPs were compared to VL by MAC-ELISA to estimate their performance for specific CHIKV IgM detection.

Physico-chemical characterizations were performed by field-flow fractionation to separate and analyze the bioparticles, check their size and purity, and estimate their concentration. The structure of the bioparticles was confirmed by electron microscopy. Affinity of the specific IgM for the different particles was established using an avidity MAC-ELISA.

Results. Used non-purified, PPs give a detection signal higher than for VL, which can help to improve the detection sensitivity of MAC-ELISA. HF5-MALS technology has been found to be a good method for characterization of these bioparticles. Characterizations suggested that the signal difference observed in MAC-ELISA was probably due to the intrinsic antigenic properties of particles. More specifically, the CHIKV envelope protein presentation at the surface of the non-purified PPs seemed to be optimized compared to other antigens.

Conclusion. The use of CHIKV bioparticles such as VLPs and PPs represents an interesting alternative to the use of VL, which is traditionally employed in the MAC-ELISA format. Compared to viral lysate and VLPs, unpurified PPs have proven to be

more powerful antigens for specific IgM capture.

INTRODUCTION

The chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus (arthropod-borne virus) transmitted by infected *Aedes* mosquitoes [13]. Arboviruses are mainly prevalent in tropical and subtropical areas, and represent a serious public health concern for developing countries [5]. CHIKV belongs to the *Togaviridae* family (*Alphavirus* genus), which also contains Ross River, Mayaro, Semliki Forest and O’Nyong-Nyong viruses [37]. CHIKV was first isolated in Tanzania in 1952 [22, 38] and became endemic in large areas of Africa, the Middle East, India and Southeast Asia [15, 39]. Between 2005 and 2007, CHIKV caused a massive epidemic on the island of La Réunion [4]. Since 2013, the rapid spread of the virus has been reported in the Caribbean and Central and South America. CHIK is an acute, highly symptomatic illness characterized by strong fever, headache, intense asthenia, rash, myalgia and severe arthralgia [43]. Severe arthralgia that mainly affects hands, wrists, elbows, ankles and knees can evolve to chronicity. To date, there is no specific and efficient treatment.

In vitro diagnostic tests, either based on polymerase chain reaction (RT-PCR) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) can provide sensitive results and help to optimize patient care [26, 27].

For specific type M immunoglobulin (IgM) serological diagnostic, an IgM-capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (MAC-ELISA) is traditionally performed using viral lysate as antigen [23]. Viral lysate leads to good sensitivity of detection, and is used in reference laboratories [23]. However, obtaining viral lysate is time-consuming and requires that production be conducted in a Biosafety Level 3 laboratory by qualified persons [24]. Moreover, before lysis, the virus must be inactivated using chemical treatment such as β -propiolactone (BPL) before use [31]. BPL could alter the overall structure of viral envelope proteins, which could modulate the affinity of antibodies for these proteins and thus decrease the sensitivity of the test [11]. Consequently, finding alternative antigens for CHIKV serological diagnosis may be important. Among these alternative antigens, recombinant proteins are noninfectious and can be produced in quantity. However, hitherto, their performance has meant that they are rarely used instead of viral lysate [7, 34].

Virus-Like Particles (VLPs) and Pseudotyped-Particles (PPs) represent potential alternative antigens for CHIKV serological diagnosis. VLPs and PP are noninfectious multiprotein structures and represent an important class of biomolecular particles composed of self-assembling viral proteins [29, 46]. These particles have been used in many applications such as for bioluminescent imaging in a mouse model for the evaluation of vaccines and antiviral therapies against CHIKV [48], and for the development of new generation vaccines. Indeed, VLPs evoke effective immune responses without triggering the side effects associated with the native virus [28, 40]. Some vaccines based on VLPs or PP have been developed [9, 19, 46], for example for the Hepatitis B virus [44], the H5N1 influenza virus [35], strains of the human papilloma virus [18] and the chikungunya virus [6, 25, 41, 42]. The use of PP or VLPs in diagnostic, and more specifically for IgM or IgG serology, has not been the subject of much investigation [21].

In the present paper, PP and VLPs were compared to VL by MAC-ELISA. In order to better understand the differences of performance observed in CHIKV MAC-ELISA for these two types of particles, comparative physico-chemical and

immunological characterizations were performed.

MATERIALS AND METHODS

Materials and specimens. The anti-E2 monoclonal antibody (3E10A5) was internally produced by bioMérieux SA (Lyon, France). 3E10A5 was directed against a conformational epitope of E2. As needed, it can be labeled with alkaline phosphatase (AP) following conventional procedures. CHIKV VLPs and PPs were produced in the *Laboratoire d'infectiologie virale et de pathologie comparée*, UMR754, of the *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA, Université Claude Bernard, Lyon, France). The CHIK viral lysate (VL) was produced and purified by the *Centre national de référence des arbovirus* (CNR Arbovirus, *Institut de Recherche Biomédicale des Armées/IRBA*, Marseille, France) using standard procedures. CHIKV capsid recombinant protein was ordered from Immune Technology (New York, NY, USA), and CHIKV envelope proteins (E1 and E2) were ordered from Aalto Bio Reagents (Dublin, Ireland).

CHIKV-negative sera and whole blood specimens were obtained from healthy

donors from the French National Blood Bank (*Etablissement Français du Sang*, Lyon, France). Patient serum specimens were obtained from Biomnis, ABO (Lyon, France) and IRBA (Marseille, France) through specific contracts with bioMérieux SA. Informed consent was obtained for any experimentation. All experiments were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki.

VLPs and PPs production and purification. The method was inspired by previous studies (Noranate, Takeda et al. 2014, Metz and Pijlman 2016). In brief, for the PPs, 293T eukaryotic cells (ICAAC, Washington, USA) were transfected using plasmids encoding the Gag-Pol (core) proteins of murine leukemia virus, the Green Fluorescent Protein (GFP), and the chikungunya viral envelope glycoproteins by the CaCl₂ method (Clontech transfection kit, Clontech, Fremont, CA, USA) following the manufacturer's instructions. After transfection, the cells were incubated overnight at 37°C. The transfection was checked the next day by monitoring the presence of GFP in the cells using a flow cytometer (FACS Calibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). For

VLPs, the same protocol was applied except that only one plasmid, containing the genes encoding the different structural proteins of the CHIKV, was used. After an additional 24 h of incubation, the cell culture medium containing the unpurified VLPs or PPs (u-VLPs or u-PPs) was harvested and filtered using a 0.45 μ M filtration unit (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA).

The filtered cell culture medium was either frozen at -30°C or purified by ultracentrifugation. In the latter case, the medium was loaded on a 2 mL sucrose cushion (20% W/V in PBS1x) and was ultracentrifuged at 107 000 g for 2 hours at 4°C (SW 41T rotor, Beckmann Optima LE 80K ultracentrifuge, Indianapolis, ID, USA). The pellet containing the particles was resuspended in PBS1x and then frozen and stored at -30°C .

For a 10 cm Petri dish (containing 7 mL of DMEM medium supplemented with 10% of fetal bovine serum – DMEMc –, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), about 60 μ L of purified VLPs (p-VLPs) or purified PPs (p-PPs) were recovered.

MAC-ELISA. The IgM antibody capture ELISA proceeded according to standardized methodology (Martin, Muth et al. 2000, Peyrefitte, Pastorino et al. 2005, Khan,

Dhanwani et al. 2014). In brief, polystyrene 96-well plates were coated overnight at 4°C with 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of goat anti-human IgM (Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike, PS, USA) in PBS1x. Plates were washed with PBS1x containing 0.05% Tween-20 and blocked with a solution of PBS1x -0.5% BSA for 1 hour at 37°C . Fifty microliters of patient serum at 1:200 dilution were added and incubated for 1 hour at 37°C . CHIKV antigens diluted in PBS1x were then added and incubated for 2 hours at 37°C . The optimal antigen concentration was experimentally determined for each antigen: u-VLPs or u-PPs were used undiluted and the viral lysate inactivated by BPL was used at 1:400 dilution. Finally, 0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of APconjugated anti-E2 monoclonal antibody (3E10A5, bioMérieux SA) was added into each well and incubated for 1 hour at 37°C . After intensive washing, the reaction was carried out at room temperature 15 min after addition of a PNPP solution (P-NitroPhenyl Phosphate, ThermoFisher Scientific, Hillsboro, OR, USA) and was stopped by adding 2N sodium hydroxide. The optical density (OD) was measured at 450 nm in a plate reader (Eon Biotek, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

Hollow-fiber flow field-flow fractionation (HF5) with multiple-angle light scattering (MALS).

Studies were based on previous experiments, using HF5 and MALS detection [30, 47, 49]. HF5-MALS-UV-dRI analysis was conducted using the Eclipse Dualtec separation system device (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Germany), coupled with a ThermoFisher/Dionex Ultimate 3000 RS pump, a DAD-3000 Ultraviolet (UV)/visible photodiode array detector (ThermoFisher Scientific), a Heleos Dawn 8+ MALS detector (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA) and an Optilab T-rEX differential Refractive Index (dRI) detector (Wyatt Technology Corporation). The separation device consisted of a hollow-fiber 400 μm radius with a 10 kDa cut-off PES membrane and a 90 μL channel volume. All operations were conducted using phosphate saline buffer (7 mM PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7.2).

For each analysis run, 1 minute of elution and 1 minute of focus were carried out on the system at the beginning of the experiment. Then, the HF5 system was maintained in “Focus + Inject” mode for the next 6 minutes, with buffer injected into the channel from both the inlet and outlet points at 0.45 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Undiluted VLP and PP samples were injected into the channel

during this time. Then, the system was switched to “Elution + Cross-flow mode”, with flow through the channel set to 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ for 10 min. Finally, during the “Elution – Cross-flow” step, the elution was maintained but the cross-flow was decreased to 0.03 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ for 5 min and maintained at 0.03 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ for 20 min.

Eluant was passed through a sequence of UV absorbance, MALS and dRI detectors for concentration and size analysis. UV was monitored at 280 nm with a ThermoFisher/Dionex DAD-3000 detector. For the purposes of this study, the UV extinction coefficient (ϵ) for all proteins was assumed to be 1.1 $\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (theoretical value calculated from amino acid sequence of CHIKV envelope and capsid proteins) and the differential refractive index (dn/dc) for all proteins was assumed to be constant at 0.185 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ for all refractive index signals [16]. The root mean square geometric radius of eluted particles was determined using a MALS detector. Anisotropic light scattering signals for particles used a “sphere” regression in ASTRA 7 software, assuming that all encountered particles were VLPs or PPs and were perfectly spherical. This “sphere” regression enabled the density number calculations to have quantitative results. In

the case of non-spherical regression, the size was expressed in rms (root mean square) radius.

Electron microscopy. Purified VLPs and PPs were analyzed using electron microscopy and 2D image processing [2]. Samples were diluted to 0.05 mg.mL^{-1} , and a $4 \text{ }\mu\text{L}$ drop was applied to a glow-discharged formvar-carbon-coated grid (Copper 300, Polysciences Inc. Warrington, PA, USA). After 45 seconds of incubation, the grid was stained (2% uranyl acetate) with Nano-W® (Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, USA) and transferred into an FEI Tecnai Spirit G2 electron microscope (Thermo Fisher, Hillsboro, OR, USA) operated at 120 kV. 270 images were recorded with an EAGLE 2kX2k CCD camera (Raptor Photonics, Larne, Northern Ireland) with a range of $1.5 - 2.2 \text{ }\mu\text{m}$ under focus.

Avidity ELISA. For avidity ELISA, the steps until the addition of the antigens are identical to the MAC-ELISA protocol [23]. Then, $50 \text{ }\mu\text{L}$ of solutions of various molarity (from 0.5M to 3M) of urea (Sigma, Saint-Louis, MI, USA) were added and incubated for 15 minutes at room temperature. After intensive washing, $0.5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ of AP-conjugated anti-E2 monoclonal antibody (3E10A5, bioMérieux SA) was added into each well and incubated for 1 hour at 37°C .

After washing, the reaction was carried out at room temperature for 15 min after addition of a PNPP solution (P-NitroPhenyl Phosphate, ThermoFisher Scientific) and was stopped by adding 2N sodium hydroxide. The optical density (OD) was measured at 450 nm in a plate reader (Eon Biotek, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

RESULTS

CHIKV IgM detection by MAC-ELISA.

In order to find an alternative antigen to VL, which is usually used in CHIKV MAC-ELISA, a variety of other antigens, including CHIKV PPs and CHIKV VLPs, were assessed.

The VLPs/PPs purification steps (i.e. centrifugation; see Materials and Methods) were time-consuming and resulted in a significant loss of material. It has previously been demonstrated that unpurified PPs gave an enhanced signal compared to other alternative antigens, including the purified PPs (cf. publication n°3). When VLPs and PPs were tested unpurified (u-PPs and u-VLPs), the cell culture supernatant containing the VLPs/PPs was directly used. Samples from healthy patients (without CHIKV IgM) were used as negative control.

As illustrated in Figure 1, for experiments conducted on twenty CHIKV-IgM-positive patient sera tested in duplicate, a strong signal was observed for a MAC-ELISA using u-PPs (OD= 2.298 +/- 0.525). The signal was approximately 2.6 times higher than for viral lysate (OD= 0.900 +/- 0.369), which was considered as the reference assay. The non-purified VLPs, u-VLPs, presented a signal 1.34 times lower than the signal observed for the VL, and 3.4 times lower than for the u-PPs.

The results confirmed that, among the variety of antigens tested by MAC-ELISA, the CHIKV u-PPs gave the highest signal intensity for specific CHIK IgM detection, and can be used as an alternative antigen to VL in MAC-ELISA. VLPs can also be used but the signal intensity was close to that obtained for VL.

Impact of cell culture medium associated with PP on MAC-ELISA. In order to confirm that the signal associated with unpurified PPs was only due to the presence of PPs and not to viral proteins released in the cell culture supernatant, and to study the impact of the DMEMc medium on the signal, MAC-ELISAs were performed on purified PPs resuspended in PBS1x, and then diluted either (i) in PBS1x, (ii) in fresh, non-ultracentrifuged DMEMc medium, or (iii) in

the cell culture supernatant (DMEMc) after ultracentrifugation (Figure 2a). Particles were diluted 1:116. Each condition was studied on two specific CHIKV-IgM-positive human sera in duplicate, and on two healthy (CHIKV-negative) patient sera.

The results (Figure 2b) indicated that purified PPs, diluted in either ultracentrifuged DMEMc or fresh non-ultracentrifuged DMEMc, had a signal close to that of the Gold Standard using VL (OD= 1.384 +/- 0.026, OD= 1.323 +/- 0.063 and OD= 1.259 +/- 0.033, respectively). The signals corresponding to the conditions where p-PPs were diluted in DMEMc medium were approximately 1.18 times higher than the signal obtained with p-PPs diluted in PBS1x (OD= 1.145 +/- 0.177). Moreover, samples tested with p-PPs diluted in PBS1x remained 2 times lower than u-PPs (OD= 1.145 +/- 0.199 and OD= 2.298 +/- 0.525, respectively).

These results confirmed that the strong signal obtained with u-PPs was not linked to the cell culture medium or the presence of residual proteins, but was mainly associated with the presence of PPs. Moreover, PP purification by ultracentrifugation seemed to impact on the MAC-ELISA signal.

HF5-MALS-UV-DRI characterization of CHIKV VLPs and PPs. In order to compare the size, the morphology, and the purity of VLPs and PPs, HF5-MALS-UV-dRI technology was deployed.

The first analyses were conducted on unpurified VLPs/PPs. However, the results obtained had a high level of background noise due to the presence of proteins from DMEMc and cell debris and were uninterpretable. In consequence, HF5-MALS analyses were performed on purified CHIKV particles.

The most probable hypothesis was that the VLPs and PPs were spheres, so we used a spherical regression model applied to p-VLPs and p-PPs in order to reduce the background noise generated by components of the culture medium (DMEMc). The signals obtained for VLPs (Figure 3a) and PPs (Figure 3b) were of good quality (fit $R^2 = 0.9904$ for the VLPs data and fit $R^2 = 0.9998$ for the PPs data) with small calculation errors in the numerical value results. VLPs and PPs were detected from about 22 minutes to approximately 45 minutes after injection. Contaminants were detected between 8 and 16 minutes after the beginning of the experiment, both for VLPs and PPs conditions. The hypothesis was that these contaminants were proteins from cell

debris or culture medium that were not completely removed during the ultracentrifugation step.

The VLPs/PPs concentration was determined by a UV_{280nm} reading. The size of the bioparticles was determined by the light scattering (MALS monitor).

Considering all bioparticles analyzed between 25 and 45 minutes, the concentration for the VLPs was estimated at $0.75 \mu g$ for $20 \mu L$ injected. They were polydispersed (or coupled 2 by 2 and more), with a large range size. The particles had a geometric radius between 40 nm and 120 nm (see dotted curves in Figure 3a and Figure 3c) with an average radius of 73.3 nm ($\pm 0.1\%$), corresponding to particle sizes of 80-240 nm in diameter.

Purified PPs were also analyzed and were shown to have similar characteristics to VLPs. They were polydispersed, with a geometric radius between 50 nm and 120 nm (see black dotted curves in Figure 3b and Figure 3c), with an average radius of 75.1 nm ($\pm 0.7\%$), corresponding to particle sizes between 100 and 240 nm in diameter. The concentration was estimated at $3.45 \mu g$ of PPs in the $20 \mu L$ analyzed.

Light scattering showed that both VLPs and PPs were detected at the same time after

sample injection (Figure 3c). However, the curve representing the VLPs (gray curve) was more spread out over time than the PPs curve, indicating a greater polydispersion of VLPs than PPs, confirmed by the largest size scale being observed for VLPs (gray dotted curve).

In order to check the extent to which the preparations were contaminated with free viral proteins or proteins from the culture medium and compare the profiles obtained on these proteins with those obtained on VLPs and PPs, recombinant proteins (proteins E1, E2 and C, see Figure 4) were also analyzed in parallel by UV_{280nm} absorbance. Each protein was concentrated at $1\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ and 20 μL of each protein were analyzed. Pure Calf Serum Albumin (CSA) was also tested. Each protein was investigated in the same conditions as the CHIKV particles.

The analysis of the CSA showed a single peak, observed at approximately 11 minutes after injection. The same peak was observed in both VLPs and PPs profiles (Figure 3 and Figure 4), indicating that the CSA protein was not totally removed from the particle preparations by ultracentrifugation. In parallel, the recombinant proteins of CHIKV were quite distinct, and appeared between 8 and 14 minutes, upstream of the particle

peaks (Figure 4). Several peaks were observed for the E1 and E2 protein profiles, which could represent multimeric forms of these proteins. The capsid protein that appeared 10-12 minutes after injection could also be a potential contaminant of the VLPs preparations. All the results presented here were obtained repeatedly (more than 2 times).

Finally, a conformational plot (see Figure 5) indicated that two morphologically different populations existed for each type of bioparticle. The morphology of particles can be evaluated using the value of the slope of each regression curve. When the slope value is around 0.33, particles are considered spherical. When the slope is around 0.5-0.6, particles are a random coil, and when the slope value is approximately 1.0 or more, particles form rods [33]. The molecular weight range calculated for spherical PPs (2.10^7 to $6.10^7\ \text{g.mol}^{-1}$) was more restricted than for VLPs (10^7 to $6.10^7\ \text{g.mol}^{-1}$), for a similar size range. Thus, the PPs were generally denser than the VLPs.

In conclusion, purified VLPs or PPs preparations consisted essentially of whole particles, spheres and also rods (PPs) and random coils (VLPs), with few contaminant viral proteins. Residual CSA, originating

from fetal calf serum used in cell culture medium, was possibly present.

Electron microscopy. In order to confirm observations made on HF5-MALS and perform direct observation of the particles, purified CHIKV VLPs and PPs were observed by transmission electron microscopy (TEM). These experiments could help to confirm the previous results regarding the purity of the production, the morphology, the size heterogeneity, and the polydispersion of the particles (whether alone or clustered).

With regard to VLPs, TEM pictures showed a large heterogeneity in terms of the size and morphology of the particles (see Figure 6). Indeed, spherical or partially spherical particles of varying diameters (30-150 nm) were observed, confirming a large size heterogeneity. Moreover, particles were often coupled by 2 or 3, sometimes forming rod-shaped, non-spherical particles (see Figure 6, black arrow). No major contaminants such as actin or protein filaments were found, indicating a high purity of the preparations.

With regard to PPs, spherical particles larger than VLPs were observed, with a diameter between 50 and 200 nm, showing greater heterogeneity in terms of size. PPs seemed

rarely to be coupled and remained more often as single particles. However, due to poor purification (presence of actin filaments) the pictures were more difficult to interpret than the VLPs pictures. (see Supplementary data 1, white arrows).

Avidity ELISA. The strong signal difference observed between MAC-ELISAs conducted with PPs or VLPs could be due to a difference in the presentation of the viral proteins at the surface of the viral particles, and therefore to their accessibility with regard to the E2 antibody or the specific human IgM.

In order to compare the strength of interactions between CHIKV specific IgM and VLPs or PPs, an avidity ELISA was performed (Figure 7), inspired by previous studies [14, 45]. After a capture step of the specific antibodies, a progressive increase of urea molarity was used to progressively remove low avidity antibodies from antigen-antibody complexes [1]. Indeed, urea is a chaotropic agent traditionally used for removing low avidity antibodies. For each molarity of urea, an Avidity Index (AI) was calculated using the following formula : $AI = (OD \text{ with dissociating agent} / OD \text{ without dissociating agent}) * 100 (\%)$. The avidity ELISA was assessed on 6 different CHIKV

sera (with high titers of specific IgM), in triplicate.

For PPs, from 0.5M to 1.5M of urea, the OD signal intensity remained relatively stable (between 94.2% and 96.5% AI) but decreased to 87.3% at 2M of urea and 73.9% at 2.5M of urea. The equation of the regression curve was $y = -11.601x + 106.64$. For VLPs, the OD signal intensity remained relatively stable from 0.5M to 1M of urea, (between 100.503% and 101.614% AI) but decreased to 91.7% at 1.5M of urea, reaching 73.2% at 2.5M of urea. The linearization function of the various points of the curve was $y = -14.43x + 112.1$.

For VLPs, the correlation coefficient of the regression line connecting each urea molarity point was $R^2 = 0.9416$. In comparison, the same correlation coefficient for PPs was $R^2 = 0.7863$. For VLPs, and for PPs to a lesser extent, the regression equations were correctly adapted to describe the points distribution.

The slope of the VLPs curve (-14.43) was higher than for the PPs curve (-11.601), resulting in an earlier dropout of VLPs for IgM of interest than of PPs for the same antibodies. CHIKV IgM potentially had higher affinity for PPs than for VLPs.

DISCUSSION

The last few years have seen the emergence or re-emergence of tropical diseases carried by arthropods, such as the chikungunya (CHIK), transmitted by mosquitoes. The diagnosis of these diseases is crucial for optimal patient care, and different assays were developed for this purpose. For the detection of specific CHIKV IgM in patient sera, one of the current immunoassays is the MAC-ELISA. This format, although sensitive, used VL as IgM capture antigen and required L3 laboratory and equipment for the production of this antigen and its inactivation by chemical treatments before use. In order to overcome these issues, different alternative antigens to the VL were developed and tested in MAC-ELISA. Synthetic bioparticles, such as Virus-Like Particles (VLPs) and Pseudotyped-Particles (PPs) seemed to be good candidates as alternative antigens, because of their innocuity (no inactivation needed) and their production facility in comparison with the VL. In the present paper, CHIKV VLPs and PPs were tested as antigens for the detection of specific CHIKV IgM in patient sera. Comparative physico-chemical and immunological characterizations were also performed.

Because of their ease of production and use (no purification step needed), unpurified bioparticles (u-VLPs and u-PPs) were used in the MAC-ELISA format, and the first observation was that the signal detected using u-VLPs was not significantly different to that obtained with VL. Consequently, u-VLPs can be used as an alternative antigen to VL in MAC-ELISA. Interestingly, u-PPs presented a significantly stronger signal detection, approximately 2 to 3 times higher than the other antigens (u-VLPs and VL). PP seemed to be a better candidate for CHIK MAC-ELISA than VL. The signal observed in MAC-ELISA with u-PPs was not due to a difference in viral E2 protein concentration, as previously demonstrated by a Western Blot using the anti-E2 monoclonal antibody 3E10A5 used in MAC-ELISA (cf. publication n°3).

Then, to better understand the signal difference observed between these bioparticles, further characterizations were performed.

The MAC-ELISA used unpurified VLPs and PP as antigens, despite the fact that these particles are generally used purified after an ultracentrifugation step [12, 20, 21, 32]. However, results obtained with purified particles showed results comparable to VL in CHIK MAC-ELISA. Interestingly,

unpurified PPs generated a significantly stronger signal than VL or purified particles. It was suggested that one of the components of the DMEMc medium in which the particles were present would promote the binding of specific CHIKV IgM, and thus increase the detection signal in comparison to other antigens. However, compared to p-VLPs, no signal increase was observed for u-VLPs, invalidating this assumption. Alternatively, the production of PPs could lead to the release of viral components in culture supernatant that could enhance the signal. However, when purified PPs (p-PPs) were diluted either in fresh DMEMc medium or in clarified cell culture supernatant, and tested in MAC-ELISA, the signal was very close to that obtained with the MAC-ELISA using p-PPs, indicating that components of the cell culture medium, including released viral components, were not involved, or only involved to a small extent, in the signal increase. It cannot be excluded that the direct consequences of the purification step by ultracentrifugation are structural modifications of the particles that would impact on antigen presentation. (Minder, Schibli et al. 2011). These modifications could have an impact on particle conformation, infectivity, and antigenicity [10], indicating that the signal

difference observed would be due to the intrinsic properties of particles. However, no signal difference was observed between u-VLPs and p-VLPs when tested by MAC-ELISA. Drake, Keswani et al. showed that proteins of serum contained in culture medium could have an impact on VLPs formation and infectivity activity, and that particles produced in culture media without serum (e.g. Opti-MEM®, Invitrogen) were significantly more efficient than those produced in culture media with serum [10]. CHIKV VLPs and PPs have also been produced in Opti-Mem®, but no improved performance was observed compared to particles produced in DMEMc.

In order to characterize more precisely these bioparticles, additional analyses were performed on purified VLPs and PPs. Bioparticle recovery in the cell culture medium involved the presence of cell debris, in addition to the components of the cell culture medium. This meant that the bioparticle physical analyses required separation of VLPs or PPs from the other components (cell debris etc). A reliable advanced analytical tool was therefore needed to control the process and to assure the quality of the final product. The gentle separation mechanism of HF5, by which the structure and conformation of analytes is

preserved, make it a very valuable technique for the precise characterization of VLPs and PPs [49].

HF5 detects spherical particles with a large size range (between 80 nm and 240 nm in diameter for VLPs and 100 nm to 240 nm in diameter for PPs), with polydispersion, between 22 and 45 minutes after injection. The use of a spherical modeling with Astra 7 fits with >0.99 of R^2 , indicating that the spherical hypothesis used was relevant. VLPs were more concentrated than PPs for the same analyzed volume, and fewer contaminants were detected, suggesting a more efficient ultracentrifugation process for VLPs. Contaminant proteins were detected upstream of the spherical particles, between 8 and 14 minutes after the injection into the HF5. Calf serum albumin (CSA) could represent the majority of these contaminants because it was over-represented in DMEMc, the medium used for VLPs production. The weak UV_{280nm} signal did not impact on the accuracy of the radius calculations because the light scattering signals from MALS were still of good quality. However, a peak of particles was observed between 44 and 46 minutes for the PPs analysis.

The presence of CHIKV viral proteins could be due to a release of free viral proteins during the bioparticle production, in addition

to the serum albumin from the cell culture medium. For CHIKV proteins analyzed by HF5, the presence of a series of peaks was interpreted as multimeric forms of the proteins (homo- or heterodimers). For instance, during virus replication in target cells, the E1 and E2 envelope glycoproteins are assembled to form E1-E2 heterodimers, which will be transported to the cell membrane to form the envelope of the new virus [17]. This auto-assembling process could explain the peaks observed between 8 and 14 min of retention time on HF5-MALS fractograms (see Figure 3 and Figure 4). Moreover, no angular dependence was observed for these molecules, suggesting that it was not particles. Indeed, angular dependence starts to be observed at 30 nm for the Heleos Dawn 8+ MALS system (manufacturer's specifications). The analytes detected upstream of the bioparticle peak did not have angular dependence, indicating that bioparticles such as VLPs or PPs were not present, but proteins or large protein aggregates were. The largest bioparticles were fully eluted at 45 min when the crossflow was turned off.

To confirm the results obtained with HF5, transmission electron microscopy experiments were performed. Observations carried out on purified bioparticles

confirmed the presence of spherical VLPs and PPs, with a large range of size and heterogeneity. While the PPs were almost all single and well rounded, the VLPs often appeared paired 2 by 2 or 3 by 3, and were not always spherical, indicating morphological alterations. Contradictory observations were made with the HF5-MALS analysis of the bioparticles. It was deduced that there were spherical bioparticles but also elongated structures present in our preparation. Elongated structures could actually correspond to spherical particles coupled 2 by 2 or even 3 by 3, as observed on MET. However, the slope value representing elongated structures made of PPs (1.06) is higher than the slope value for VLPs elongated structures (0.55). This would mean that there are more PPs elongated structures than VLPs elongated structures. However, previous MET observations showed that PPs were more often present as single particles, indicating that some elongated structures deduced from conformational plots could be protein contaminants such as actin filaments. HF5 is considered to be a more robust method than MET for the fine characterization of these bioparticles [49].

Several hypotheses concerning the morphological deformation of these particles

have been issued. Pease, Lipin et al. made the assumption that structural deformation of bioparticles could be due to the absence of viral genome. Moreover, the deformations may also be the consequence of the fixing and staining methods used for electron microscopy [30]. Furthermore, it has already been reported that the incorporation of foreign proteins into bioparticles, from cell culture or culture medium, causes deformations within VLPs structures, as observed for mouse polyomavirus VLPs production [3]. Additionally, the purification steps (ultracentrifugation) could lead to morphological damage of particles. TEM observations for PPs were more difficult to read and understand because of the significant presence of contaminants from cell culture such as actin filaments. Fewer contaminants were observed for VLPs, which correlated with HF5-MALS observations, indicating that the purification step was more effective for VLPs than for PPs.

Studies concerning bioparticle characterization are rare [36]. It has been shown that field-flow fractionation technology is able to quantitatively determine bioparticle size distributions with greater rapidity and statistical significance than TEM, providing useful technologies for

product development and process analytics [8, 30].

All previous observations confirmed the presence of bioparticles in antigen solutions tested in MAC-ELISA, but could not reasonably explain the signal differences observed in MAC-ELISA between VLPs and PPs. Indeed, there are few morphological differences between the two types of particles. This would indicate that the signal difference would be due to the intrinsic antigenic properties of the particles. The self-assembly mode of bioparticle biosynthesis in cells could also explain the differences observed in MAC-ELISA between VLPs and PPs. VLPs are a self-assembly of viral proteins that tend to be as close as possible to the native virus, whereas PPs are structures composed of a backbone of murine leukemia virus (MULV) or human immunodeficiency virus (HIV), pseudotyped with CHIKV envelope proteins. It cannot be excluded that envelope proteins are presented differently depending on the type of bioparticle and that this has an impact on the detection of CHIKV IgM. To verify this hypothesis, analyses of the affinity of specific CHIKV IgM for both VLPs and PPs were evaluated using increasing concentrations of urea. Specific CHIKV IgM seemed to dissociate more easily from VLPs

than PPs because a lower urea concentration was able to dissociate the complex. This was confirmed by the slope of the VLPs curve which was higher than that for PPs, indicating a faster dissociation of the VLPs-antibody immunological complex. These results could partially explain the signal difference observed in MAC-ELISA between VLPs and PPs as antigens. To date, there is no study available concerning the comparative affinity of VLPs and PPs for specific antibodies in patient samples.

To consolidate the results obtained with the avidity ELISA, an affinity study of CHIKV bioparticles for their specific antibodies was carried out by Bio-layer Interferometry on an OCTET® rapid system (Pall FortéBio, Melon Park, CA, USA). Unfortunately, it was not possible to demonstrate clearly a difference in antibody specificity for bioparticles, partly due to difficulties in finding an effective detection format.

CONCLUSION

The use of CHIKV bioparticles such as VLPs and PPs represents an interesting alternative to the use of VL, which is traditionally employed in MAC-ELISA. This is primarily due to their innocuity and their ease of production. Used non-purified, PPs

give a detection signal higher than for VL, which can help to improve the detection sensitivity of MAC-ELISA. The HF5-MALS technology used in this study is a good method for characterizing these bioparticles. The results obtained seem to indicate that the remarkable signal obtained with PPs has to be linked with the viral antigen presentation at the surface of the particles. However, more in-depth experiments are necessary to explore the affinity properties of VLPs and PPs for specific antibodies and confirm the preliminary results described in the present paper.

ETHICAL APPROVAL

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

COMPETING INTERESTS

All the authors except ILG, CB and PN are employed by bioMérieux SA.

FUNDING

This study was funded by BioMérieux SA and Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (G. Theillet's grant CIFRE no 2015/0514).

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All of the authors contributed to the study conception. GT, FB performed research. GT, FB wrote the manuscript. All of the authors analyzed data, read, corrected and approved the final manuscript. FB, PD, and ILG performed the study coordination and funding. TEM experiments were conducted by CB and PN. VLPs/PPs characterizations

by HF5-MALS were performed by GT, JM and CS.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors wish to thank Celine Roesch, Michèle Guillote (Immunoassays department of bioMérieux) for antibody productions ; Florence Bettsworth, Blandine Le Levreur and Marie-Claire Cavaud (Immunoassays department of bioMérieux) for antibody purification and labeling. The final manuscript has been read and corrected by RWS life science, Lausanne, CH

LEGENDS

Figure 1. CHIKV IgM detection by MAC-ELISA using different CHIKV antigens. Black bars : test ; gray bars : negative control using healthy patient serum (no CHIKV IgM). Each condition has been conducted twenty folds in duplicate. u-PPs / u-VLPs : unpurified PP/VLPs; VL : viral lysate.

Figure 2. MAC-ELISA with purified PP resuspended in cell culture DMEMc medium or in fresh DMEMc. a) flowchart of the experiment. b) CHIKV IgM MAC-ELISA using purified PP resuspended in different buffer. u-PPs: unpurified PP; p-PPs: purified PP; VL: viral lysate.

Figure 3. Fractograms of CHIKV particles read on HF5-UV_{280nm}-MALS. a) purified VLPs ; b) purified PP. The fractograms show the particles separation by HF5-MALS through time, obtained with the UV photodiode array detector. The black dots curve represent the size distribution of the particles in each sample, obtained with the Multi-Angle Light Scattering (MALS) detector. c) Fractograms of CHIKV particles read on HF5-MALS. The fractograms show the particles separation by HF5-MALS through time, obtained with the Light Scattering (LS) monitor. The black dots curves represent the size distribution of the particles in each sample, obtained with the Multi-Angle Light Scattering (MALS) detector. Dark curves and dots : PP. Grey curve and dots : VLPs

Figure 4. Compilation of HF5-UV_{280nm} graphs of CSA, VLPs/PPs and chikungunya antigens. CSA: Calf serum albumin; CHIKV p-VLPs: chikungunya virus purified Virus-Like Particles; CHIKV p-PPs: chikungunya virus purified Pseudo-Particles; rec E1: CHIKV Envelop 1 recombinant protein; E2: CHIKV Envelop 2 recombinant protein.

Figure 5. Conformational plots of purified VLPs (a) and purified PP (b) obtained by absorbance analysis (UV_{280nm}), representing the log10 of rms radius of the bioparticles as a function of the log10 of their molar mass (MM). Morphology of the particles can be deduced with the value of the slope of each regression curve.

Figure 6. CHIKV purified VLPs observed by Transmission Electron Microscopy. Black arrows : coupled CHIKV VLPs. a) low magnification picture; b to j) high magnification pictures.

Figure 7. Avidity ELISA on CHIKV p-PPs and p-VLPs. Experiment has been made in triplicate on 6 different patients samples. Black squares: p-PPs ; X : p-VLPs.

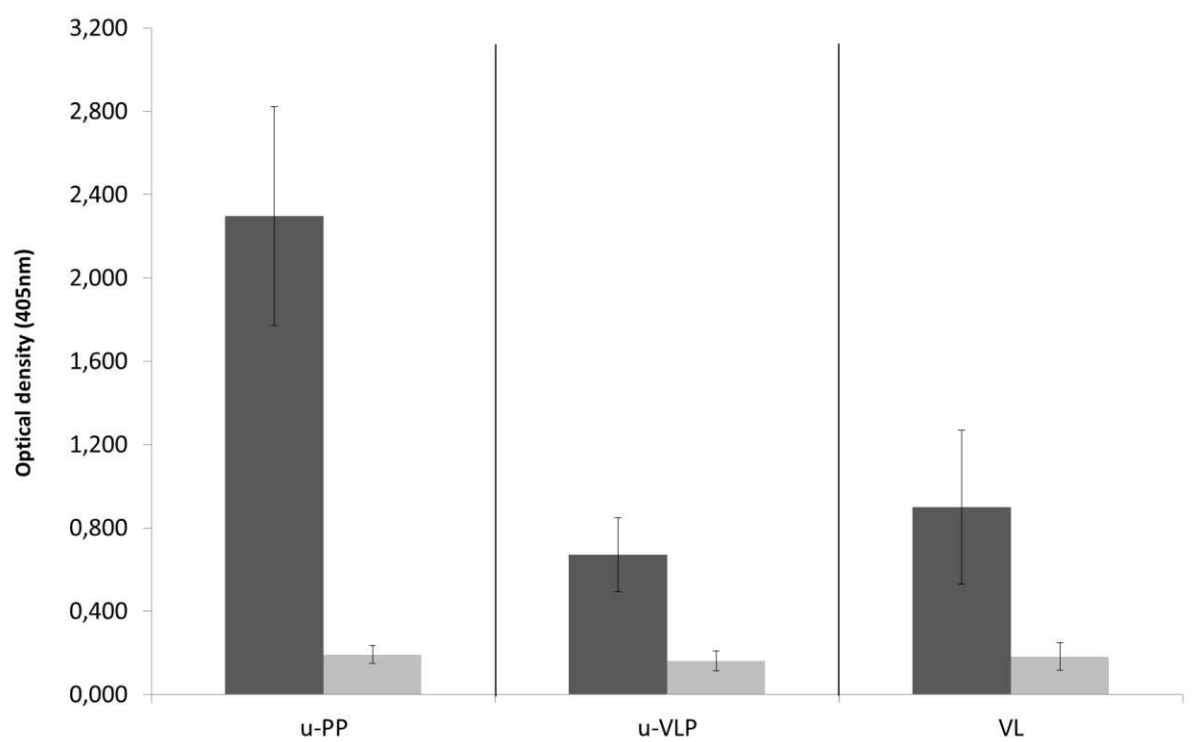


Figure 1

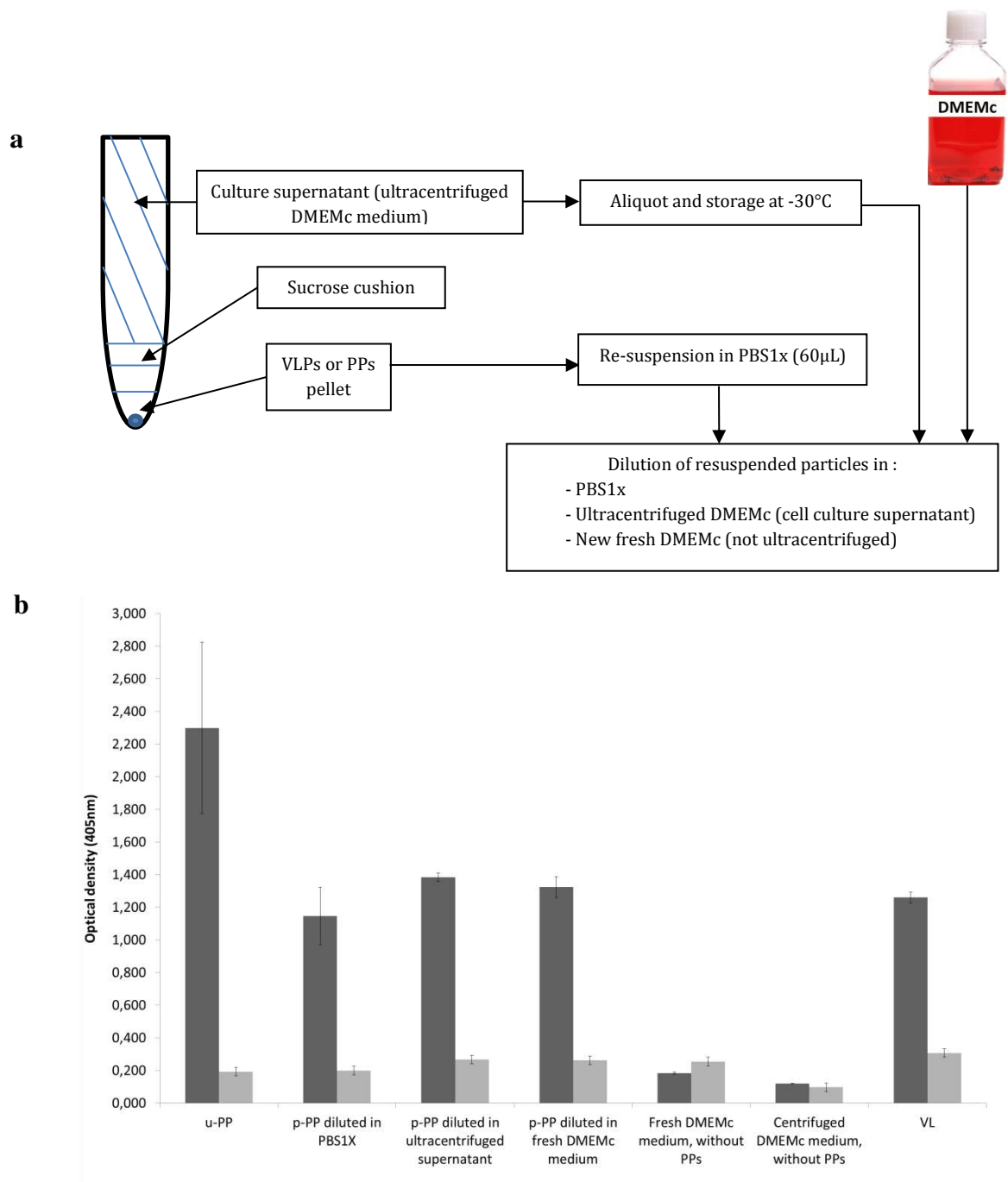


Figure 2

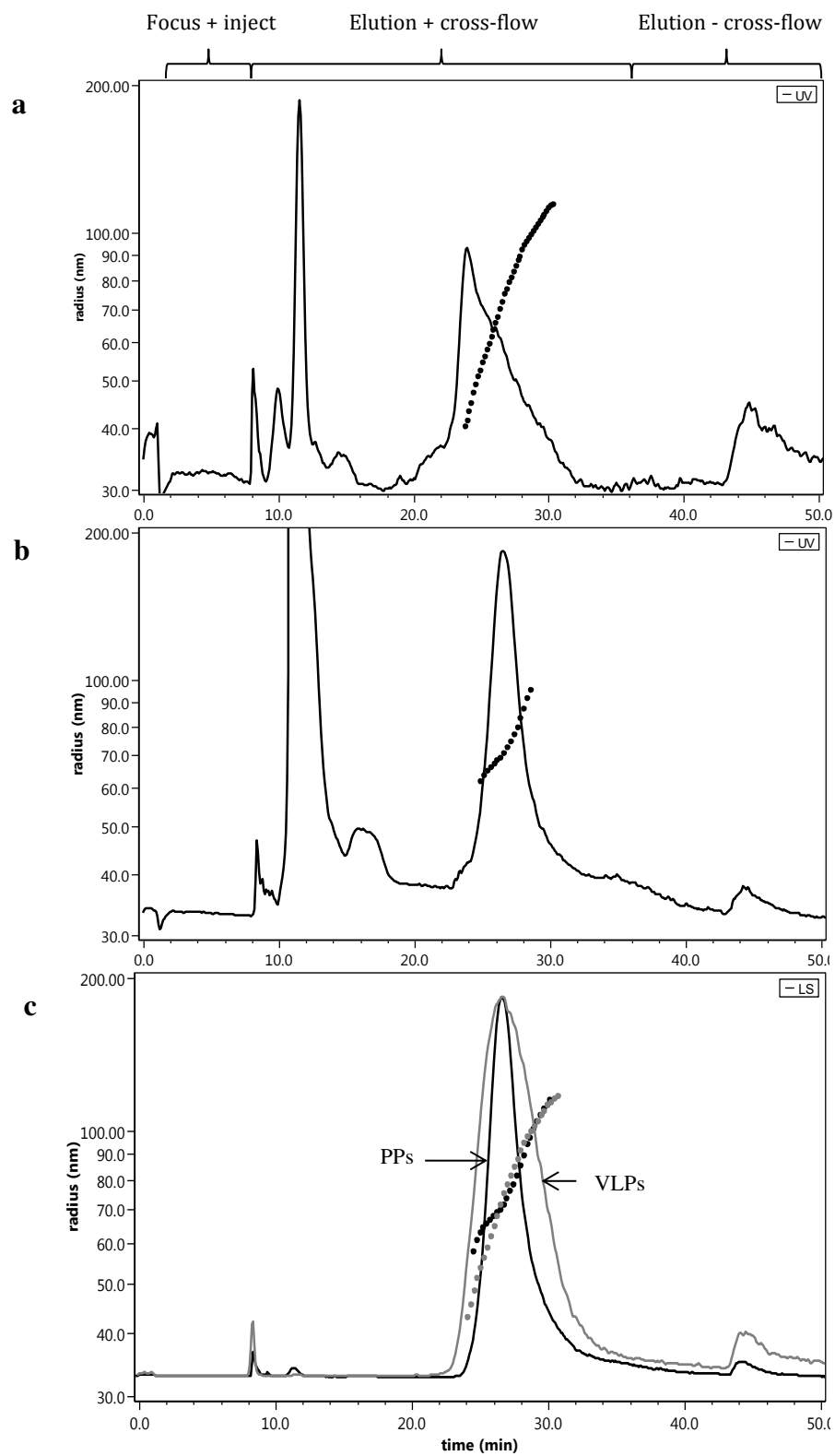


Figure 3

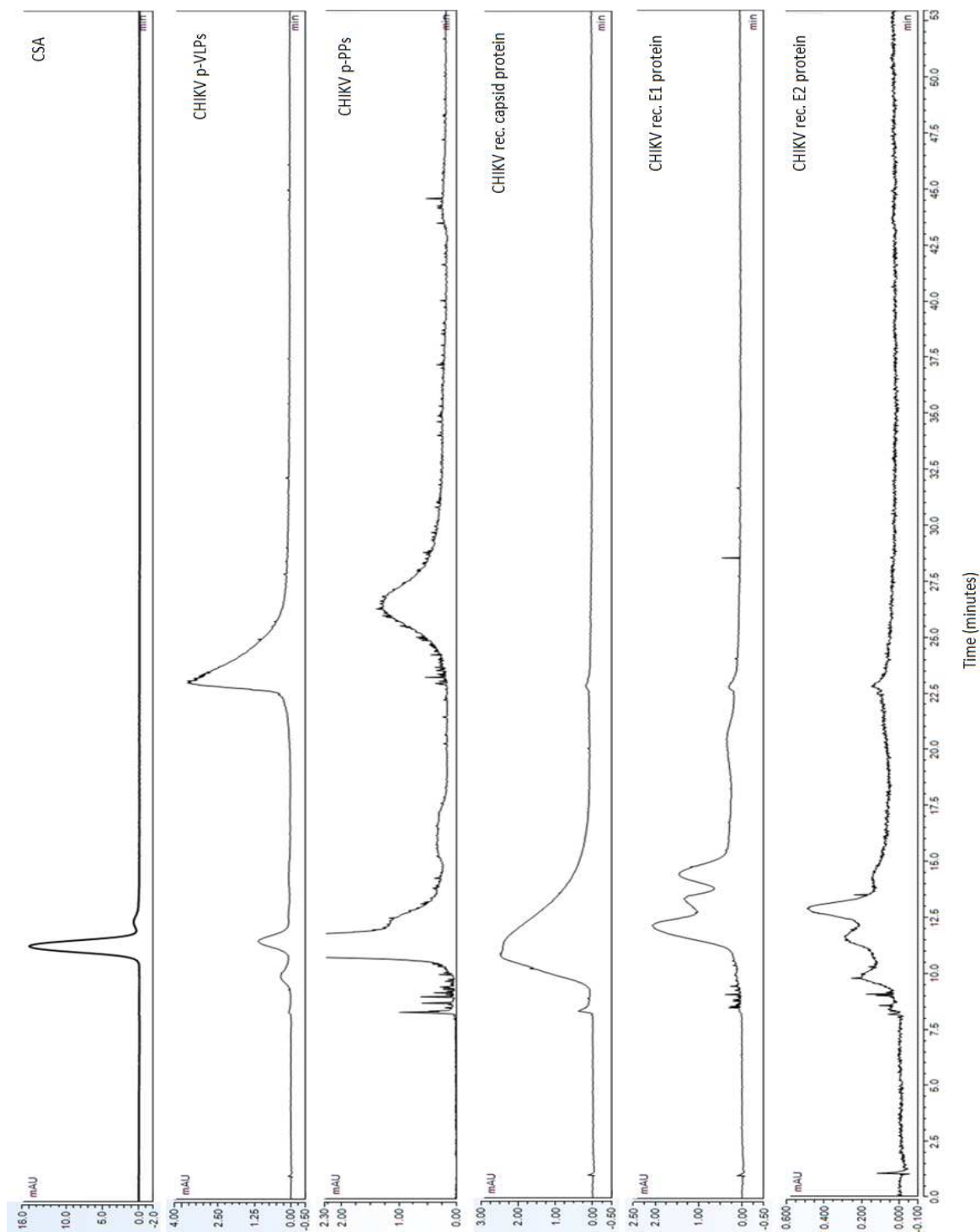


Figure 4

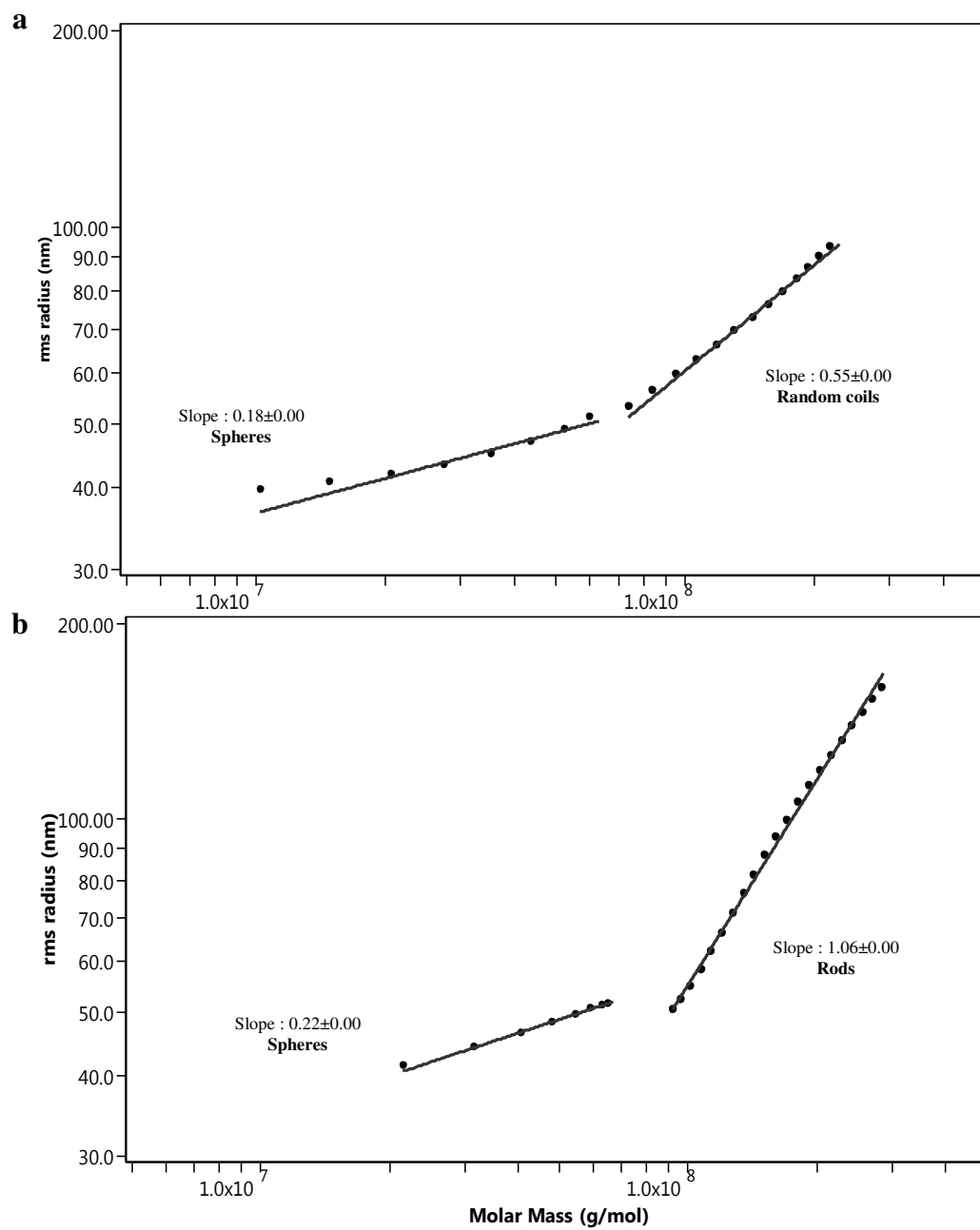


Figure 5

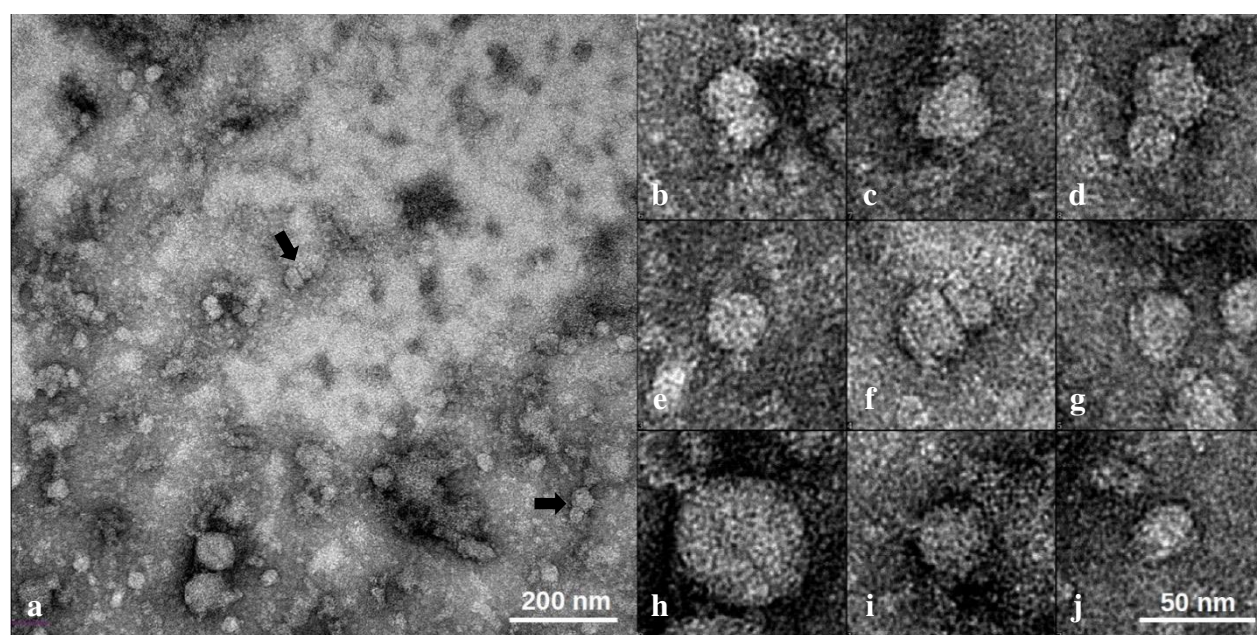


Figure 6

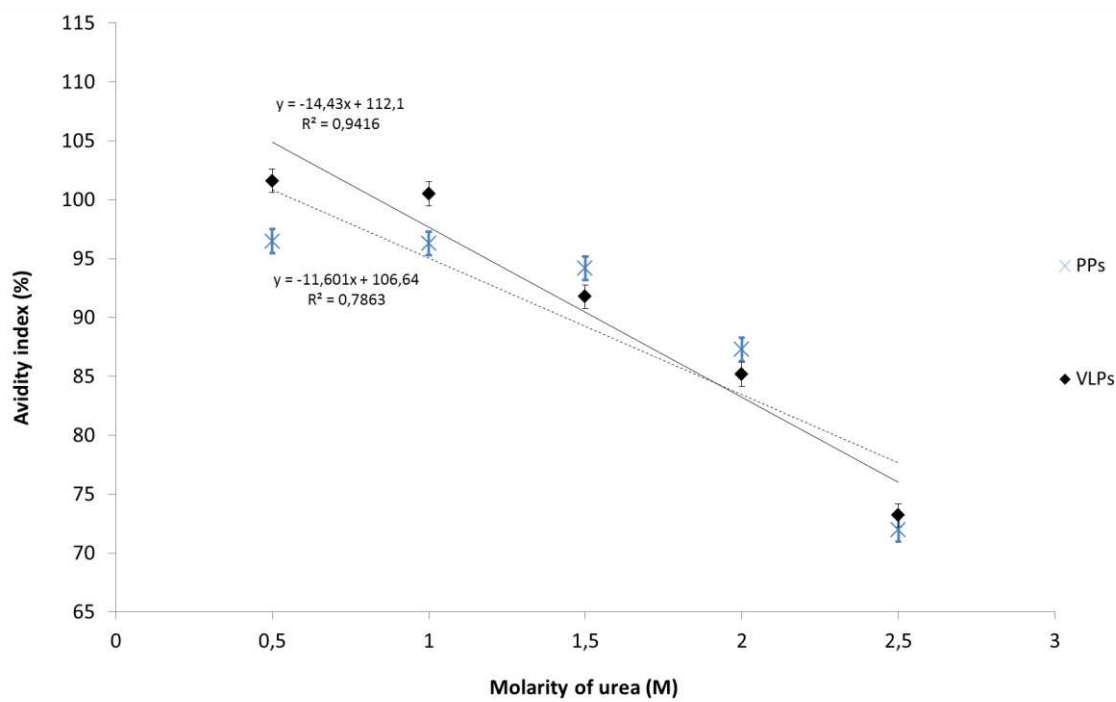
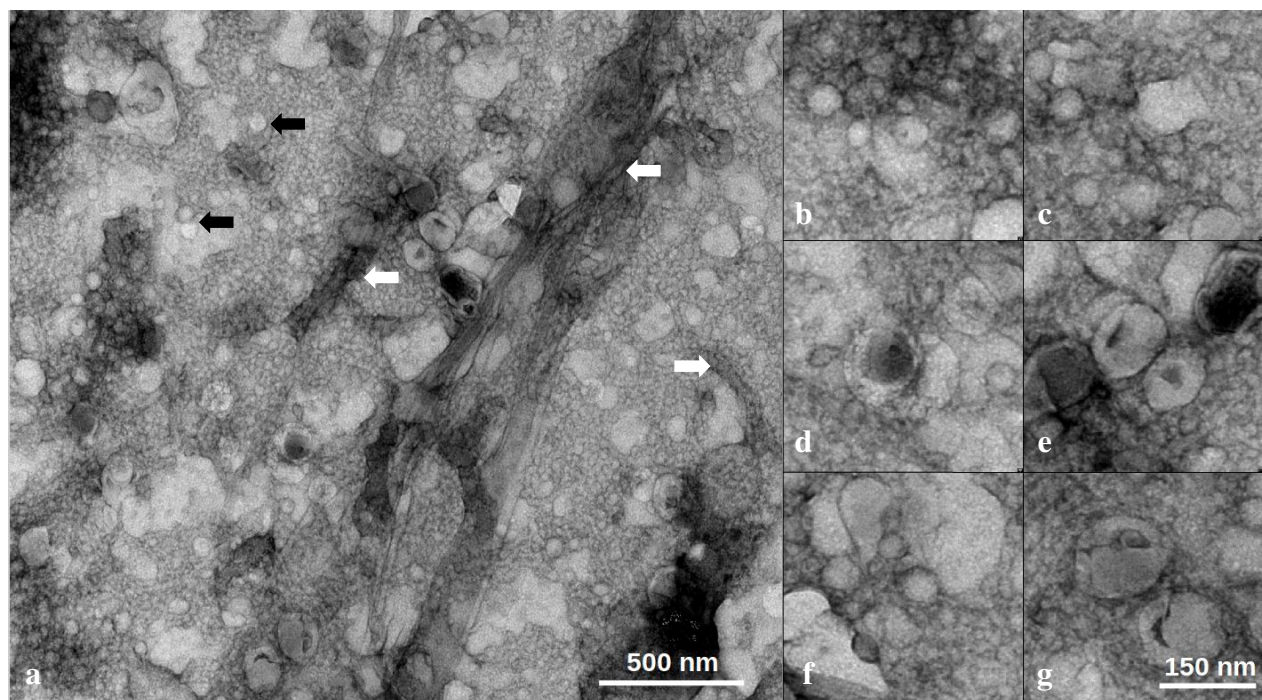


Figure 7



Supplementary data 1. CHIKV purified PPs observed by Transmission Electron Microscopy. Black arrows : spherical CHIKV PPs. White arrows : contaminants (actin filaments). a) low magnification picture; b to g) high magnification pictures.

REFERENCES

1. Aguado-Martinez A, Alvarez-Garcia G, Arnaiz-Seco I, Innes E, Ortega-Mora L (2005) Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 17:442-450
2. Baklouti A, Goulet A, Lichiere J, Canard B, Charrel RN, Ferron F, Coutard B, Papageorgiou N (2017) Toscana virus nucleoprotein oligomer organization observed in solution. *Acta crystallographica Section D, Structural biology* 73:650-659
3. Boura E, Liebl D, Spisek R, Fric J, Marek M, Stokrova J, Holan V, Forstova J (2005) Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS letters* 579:6549-6558
4. Brouard C, Bernillon P, Quatresous I, Pillonel J, Assal A, De Valk H, Desenclos JC (2008) Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007.
5. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, Kohl A, Rudd PA, Taylor A, Herrero LJ, Zaid A, Ng LF, Mahalingam S (2017) Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *The Lancet Infectious diseases*
6. Chang L-J, Dowd KA, Mendoza FH, Saunders JG, Sitar S, Plummer SH, Yamshchikov G, Sarwar UN, Hu Z, Enama ME (2014) Safety and tolerability of chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet* 384:2046-2052
7. Cho B, Jeon BY, Kim J, Noh J, Kim J, Park M, Park S (2008) Expression and evaluation of Chikungunya virus E1 and E2 envelope proteins for serodiagnosis of Chikungunya virus infection. *Yonsei medical journal* 49:828-835
8. Chuan YP, Fan YY, Lua L, Middelberg AP (2008) Quantitative analysis of virus-like particle size and distribution by field-flow fractionation. *Biotechnology and bioengineering* 99:1425-1433
9. Conner M, Zarley C, Hu B, Parsons S, Drabinski D, Greiner S, Smith R, Jiang B, Corsaro B, Madore H (1996) Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. *Journal of Infectious Diseases* 174:S88-S92

10. Drake DM, Keswani RK, Pack DW (2010) Effect of serum on transfection by polyethylenimine/virus-like particle hybrid gene delivery vectors. *Pharmaceutical research* 27:2457-2465
11. Fan C, Ye X, Ku Z, Kong L, Liu Q, Xu C, Cong Y, Huang Z (2017) Beta-propiolactone inactivation of coxsackievirus A16 induces structural alteration and surface modification of viral capsids. *Journal of virology* 91:e00038-00017
12. Fontana D, Etcheverrigaray M, Kratje R, Prieto C (2016) Development of Rabies Virus-Like Particles for Vaccine Applications: Production, Characterization, and Protection Studies. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 1403:155-166
13. Furuya-Kanamori L, Liang S, Milinovich G, Soares Magalhaes RJ, Clements AC, Hu W, Brasil P, Frentiu FD, Dunning R, Yakob L (2016) Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses. *BMC Infectious Diseases* 16:84
14. Gonzaga HT, Ribeiro VS, Feliciano ND, Manhani MN, Silva DA, Ueta MT, Costa-Cruz JM (2011) IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection. *Immunology Letters* 139:87-92
15. Hammon W, Rudnick A, Sather GE (1960) Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand.
16. Huglin MB MB (1972) Light scattering from polymer solutions. UK: Academic Press:165 - 331
17. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ (2009) A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future microbiology* 4:837-856
18. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU (2002) A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *New England Journal of Medicine* 347:1645-1651
19. Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V (2012) Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* 31:58-83
20. Lamounier TA, de Oliveira LM, de Camargo BR, Rodrigues KB, Noronha EF, Ribeiro BM, Nagata T (2015) Production of Brazilian human norovirus VLPs and comparison of purification methods. *Braz J Microbiol* 46:1265-1268

21. Li J, Zhang Q, Zhang S, Li C, Liu Q, Liang M, Li D (2014) Virus-like particle-based immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgM antibodies against Chikungunya virus. *Bing du xue bao= Chinese journal of virology* 30:599-604
22. Lumsden WH (1955) An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology.
23. Martin DA, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT (2000) Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *Journal of clinical microbiology* 38:1823-1826
24. McFee RB (2018) Selected mosquito-borne illnesses—Chikungunya. *Disease-a-Month*
25. Metz SW, Gardner J, Geertsema C, Le TT, Goh L, Vlak JM, Suhrbier A, Pijlman GP (2013) Effective chikungunya virus-like particle vaccine produced in insect cells. *PLoS neglected tropical diseases* 7:e2124
26. Mishra B, Sharma M, Pujhari SK, Ratho RK, Gopal DS, Kumar CN, Sarangi G, Chayani N, Varma SC (2011) Utility of multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction for diagnosis and serotypic characterization of dengue and chikungunya viruses in clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71:118-125
27. Mishra N, Caciula A, Price A, Thakkar R, Ng J, Chauhan LV, Jain K, Che X, Espinosa DA, Montoya Cruz M, Balmaseda A, Sullivan EH, Patel JJ, Jarman RG, Rakeman JL, Egan CT, Reusken C, Koopmans MPG, Harris E, Tokarz R, Briese T, Lipkin WI (2018) Diagnosis of Zika Virus Infection by Peptide Array and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *mBio* 9
28. Noranate N, Takeda N, Chetanachan P, Sittisaman P, Nuegoonpipat A, Anantapreecha S (2014) Characterization of chikungunya virus-like particles. *PloS one* 9:e108169
29. Pattenden LK, Middelberg AP, Niebert M, Lipin DI (2005) Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends in biotechnology* 23:523-529
30. Pease LF, 3rd, Lipin DI, Tsai DH, Zachariah MR, Lua LH, Tarlov MJ, Middelberg AP (2009) Quantitative characterization of virus-like particles by asymmetrical flow field flow fractionation, electrospray differential mobility analysis, and transmission electron microscopy. *Biotechnology and bioengineering* 102:845-855

31. Perrin P, Morgeaux S (1995) Inactivation of DNA by beta-propiolactone. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 23:207-211
32. Peyret H (2015) A protocol for the gentle purification of virus-like particles produced in plants. *J Virol Methods* 225:59-63
33. Podzimek S (2011) Light scattering, size exclusion chromatography and asymmetric flow field flow fractionation: powerful tools for the characterization of polymers, proteins and nanoparticles. John Wiley & Sons
34. Priya R, Khan M, Rao MK, Parida M (2014) Cloning, expression and evaluation of diagnostic potential of recombinant capsid protein based IgM ELISA for chikungunya virus. *Journal of Virological Methods* 203:15-22
35. Pushko P, Tumpey TM, Bu F, Knell J, Robinson R, Smith G (2005) Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. *Vaccine* 23:5751-5759
36. Qureshi RN, Kok WT (2011) Application of flow field-flow fractionation for the characterization of macromolecules of biological interest: a review. *Anal Bioanal Chem* 399:1401-1411
37. Rathore MH, Runyon J, Haque TU (2017) *Emerging Infectious Diseases*.
38. Robinson MC (1955) An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features.
39. Rougeron V, Sam IC, Caron M, Nkoghe D, Leroy E, Roques P (2015) Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 64:144-152
40. Saraswat S, Athmaram TN, Parida M, Agarwal A, Saha A, Dash PK Expression and Characterization of Yeast Derived Chikungunya Virus Like Particles (CHIK-VLPs) and Its Evaluation as a Potential Vaccine Candidate.
41. Saraswat S, Athmaram T, Parida M, Agarwal A, Saha A, Dash PK (2016) Expression and characterization of yeast derived chikungunya virus like particles (CHIK-VLPs) and its evaluation as a potential vaccine candidate. *PLoS neglected tropical diseases* 10:e0004782

42. Schwameis M, Buchtele N, Wadowski PP, Schoergenhofer C, Jilma B (2016) Chikungunya vaccines in development. *Human vaccines & immunotherapeutics* 12:716-731
43. Schwartz O, Albert ML (2010) Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature reviews Microbiology* 8:491-500
44. Scolnick EM, McLean AA, West DJ, McAleer WJ, Miller WJ, Buynak EB (1984) Clinical evaluation in healthy adults of a hepatitis B vaccine made by recombinant DNA. *Jama* 251:2812-2815
45. Smolander H, Koskinen JO, Vainionpää R, Meltola NJ, Lappalainen M, Hedman K, Soini AE (2010) A novel antibody avidity methodology for rapid point-of-care serological diagnosis. *Journal of Virological Methods* 166:86-91
46. Urakami A, Sakurai A, Ishikawa M, Yap ML, Flores-Garcia Y, Haseda Y, Aoshi T, Zavala FP, Rossmann MG, Kuno S, Ueno R, Akahata W (2017) Development of a Novel Virus-Like Particle Vaccine Platform That Mimics the Immature Form of Alphavirus. *Clin Vaccine Immunol* 24
47. Wagner M, Holzschuh S, Traeger A, Fahr A, Schubert US (2014) Asymmetric flow field-flow fractionation in the field of nanomedicine. *Anal Chem* 86:5201-5210
48. Wu J, Zhao C, Liu Q, Huang W, Wang Y (2017) Development and application of a bioluminescent imaging mouse model for Chikungunya virus based on pseudovirus system. *Vaccine* 35:6387-6394
49. Yohannes G, Jussila M, Hartonen K, Riekkola ML (2011) Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles. *Journal of Chromatography A* 1218:4104-4116

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de notre étude était de développer une solution de diagnostic bas coût pour le diagnostic d'arbovirus, plus particulièrement le virus du chikungunya et de la dengue. L'axe de recherche s'est focalisé sur le respect des critères ASSURED établis par l'OMS pour le développement de solutions de diagnostic à destination des pays en développement, où les arbovirus représentent à ce jour un véritable problème de santé publique. Le papier et ses dérivés, de par leurs nombreuses propriétés (simplicité d'utilisation, robustesse, recyclage...), est à la base des PAD (*Paper-based Analytical Device*) qui ont été développés tout au long de cette thèse.

Pour le diagnostic de ces virus, deux paramètres clefs ont été étudiés: la détection des protéines virales présentes dans l'organisme lors de la phase virémique de la maladie (protéine de capsid pour le chikungunya, protéine NS1 pour la dengue), et la détection des anticorps spécifiques du virus, et plus particulièrement des IgM, indicateurs d'une infection récente. Les premières expérimentations ont porté sur le diagnostic du virus de la dengue, car des matières premières (anticorps monoclonaux, sérums polyclonaux, protéines recombinantes, peptides) avaient été développées en interne et étaient disponibles dès le début de la thèse. Les avancées obtenues sur le modèle dengue ont ensuite servi au développement de la solution PAD pour le diagnostic du chikungunya, sujet principal de cette thèse.

Des anticorps dirigés contre la protéine NS1 des virus de la dengue ou du Zika ont été évalués en ELISA pour la détection de la protéine d'intérêt. Pour chaque virus, un couple d'anticorps (capture et détection), présentant le meilleur signal de détection de la protéine NS1, a été sélectionné puis évalué sur le PAD. La première version du PAD consistait en un circuit microfluidique hydrophobe, imprimé à la cire sur un support papier en microfibres de verre, transféré à l'aide d'une presse à chaud. Cette méthode bas coût a permis une détection sensible de la protéine NS1 des virus de la dengue et Zika, avec des performances équivalentes à celles obtenues sur les tests rapides commerciaux. De manière remarquable, le résultat sur PAD est interprétable en moins de 10 minutes contre 25 minutes pour les tests commerciaux évalués.

La deuxième étape a consisté à améliorer à la fois la reproductibilité du processus de fabrication des PADs et la robustesse des résultats obtenus. Pour ce faire, une nouvelle version a été développée. Celle-ci est obtenue par découpe laser automatisée du papier selon un schéma prédéfini, optimisé sur ordinateur. Ce nouveau PAD a été évaluée pour la détection de la protéine NS1 du virus de la dengue ainsi que pour les IgM spécifiques du virus. La limite de détection de NS1 avec ce PAD a été estimée à 25ng de protéine NS1 par mL de plasma, avec

un résultat obtenu en moins de 8 minutes. Le PAD « laser » a également été évalué en sérologie IgM dengue. Pour cela, le domaine III de la protéine d'enveloppe virale (protéine recombinante EDIII) a été utilisée comme antigène de capture des anticorps d'intérêts, et un anticorps anti-IgM humaines couplé à la PAL a été utilisé comme outil de détection. Il a été démontré qu'il était possible de détecter spécifiquement ces anticorps sur le PAD, toujours en moins de 10 minutes.

Par la suite, à partir de la version laser du PAD développé pour la dengue, une version du PAD dédiée au virus chikungunya a été conçue. Des anticorps anti-CHIKV ont été développés en interne, caractérisés puis évalués en MAC-ELISA, en microplaques. Afin de s'affranchir des contraintes inhérentes à l'utilisation du lysat viral traditionnellement utilisé dans le MAC-ELISA, des antigènes alternatifs tels que des protéines recombinantes du virus, ou des virus synthétiques comme les *Virus-Like Particles* (VLPs) ou *Pseudotyped-Particles* (PPs) ont été évaluées. Il s'est avéré que les PPs non-purifiées présentaient un signal de détection 2 à 3 fois plus important que l'ensemble des autres antigènes testés, faisant de cet antigène une alternative très avantageuse (facilité de production, innocuité, sensibilité) au lysat viral.

Le format MAC-ELISA a ensuite été transposé sur le PAD, en utilisant des PP non-purifiés comme outils de détection des IgM d'intérêt. Ce format a permis d'obtenir une sensibilité de détection de près de 71% et une spécificité de 97%. Cependant, quelques réactions croisées ont été constatées, notamment avec des IgM dirigées contre le virus Ross River.

Quelques caractéristiques propres aux PPs font de ces bioparticules des antigènes de choix dans la détection des IgM. Afin d'essayer de déterminer ces facteurs-clefs, des analyses physico-chimiques et des tests immunologiques ont été effectués en parallèle sur des PPs et des VLPs. Quelques différences de tailles et de morphologies ont été constatées, mais n'ont pas permis d'expliquer les différences de signal observées en MAC-ELISA entre ces particules. Des observations effectuées en microscopie électronique à transmission ont permis de visualiser ces bioparticules. Les données de tests d'avidité vont dans le sens d'une meilleure affinité des IgM de chikungunya pour les PPs, ce qui pourrait expliquer en partie leurs performances.

Pour consolider cette hypothèse, l'affinité des IgM anti-CHIKV pour les VLPs et les PPs a été évaluée par interférométrie (BioLayer OCTET® et Blitz®). Malheureusement, les difficultés rencontrées tout au long de l'expérimentation (format de détection employé, peu de

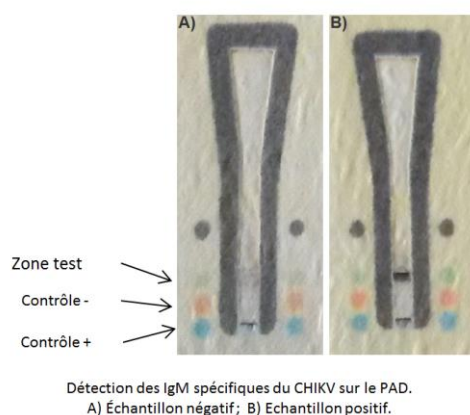
matières premières disponible, difficultés de l'optimisation...) n'ont pas permis d'aboutir à des résultats exploitables.

En parallèle à la détection des IgM spécifiques, le PAD a également été évalué pour la détection des protéines virales du virus du chikungunya. Après quelques essais de détection des protéines d'enveloppe E1, E2 et de la protéine de capsid en ELISA sur microplaque, il s'est avéré que cette dernière donnait de meilleurs résultats. Le couple d'anticorps sélectionné en microplaque a été testé sur le PAD et a permis de détecter la protéine d'intérêt (échantillons surchargés en protéine recombinante) à une concentration de 130ng de protéine par mL de sérum. Cependant, le niveau de sensibilité requis n'était pas au rendez-vous et la protéine n'a pas pu être détectée chez des patients virémiques.

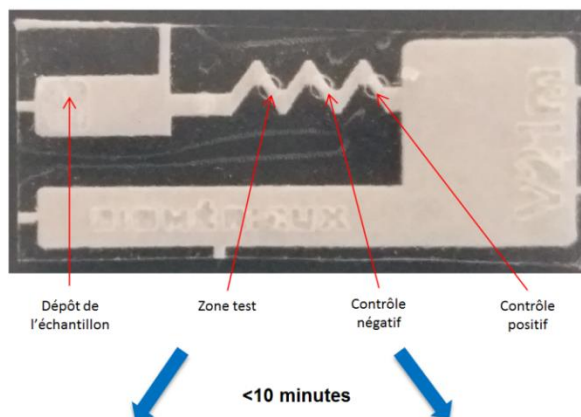
Une 3ème version du PAD, en cours de développement a pour objectif de permettre une détection multiplexée de plusieurs paramètres sur un même PAD découpé au laser, à partir d'un même échantillon. Le multiplexage avait déjà été expérimenté avec succès sur la 1ère version du PAD pour la détection des protéines NS1 des virus de la dengue et de Zika. Les premiers tests ont montré qu'il était possible de détecter à la fois la protéine NS1 de dengue et les IgM spécifiques. Il est envisageable de détecter sur un même PAD plusieurs pathologies, dengue et chikungunya par exemple.

Il est donc intéressant de considérer l'évolution du PAD au cours de nos travaux, de sa forme initiale très simple mais dont le processus de fabrication était laborieux et conduisait à des résultats peu reproductibles, à des designs successifs toujours plus complexes mais avec une maîtrise sans cesse grandissante du processus de fabrication et donc de la robustesse des résultats (cf. **figure ci-après**).

VERSION 1.0 (IMPRESSION À LA CIRE)



VERSION 2.0 (DÉCOUPE LASER)



VERSION 3.0



Evolution des différentes versions du PAD au cours du temps. Version 1 : impression à la cire d'un circuit microfluidique hydrophobe sur le support papier ; version 2 : découpe laser du support papier pour former le circuit microfluidique ; version 3 : détection multiplexée de deux paramètres à partir d'un même échantillon sur un même PAD.

En collaboration avec l'Ecole Centrale de Lyon, une application smartphone sous Android® a été développée pour l'aide à la lecture et à l'interprétation des résultats obtenus sur la première version du PAD. À partir d'une simple photo du test, l'application permettait de quantifier le signal obtenu en nuances de gris sur la zone de test et le contrôle négatif. Le rapport des 2 valeurs était calculé automatiquement et le résultat était rendu sous forme d'un ratio. Il a été estimé que les valeurs obtenues avec cette application étaient corrélées avec celles obtenues avec une méthode de référence. Cette application permet donc une lecture simplifiée du résultat obtenu, aidant le praticien effectuant le test à la prise de décision. Par la suite, le développement de cette application sur la version « laser » du PAD serait à envisager.

La solution PAD présentée dans cette thèse représente une technologie novatrice pour le développement de tests de diagnostic répondant aux critères ASSURED énoncés par l'OMS (cf. **Tableau ci-après**). En effet, le coût de fabrication d'un PAD prêt à l'emploi a été évalué à 9,45 centimes d'€, soit environ deux fois moins qu'un test LFA. Cependant, le coût du papier en microfibres de verre (MF1), qui est le composant principal du PAD et représente à lui seul

environ un tiers du cout global, n'a pas été négocié auprès du fournisseur. Ceci laisse présager que le cout de fabrication du PAD doit être très inférieur à celui d'un LFA classique.

Tableau de concordances des spécificités du PAD aux critères ASSURED énoncés par l'OMS.

Caractéristiques	Spécifications techniques
Abordable	Coût final de fabrication : 9,45 centimes d'€ par test, dont 2,88 centimes pour le papier, prix non-négocié
Sensible Spécifique	DENV : 25ng de protéine NS1 par mL de plasma, pas de réactions croisées CHIKV : 70,6% de sensibilité, spécificité de 97,7%
Utilisable facilement	Dépôt d'une goutte de sang capillaire, aide à la lecture avec une application Android®
Rapide et robuste	TTR = de 6 à 10 minutes Robustesse ?
Sans Équipement	Lecture à l'œil nu ou avec smartphone
Disponible facilement	Utilisable au chevet du patient

En ce qui concerne les performances du PAD pour le CHIK et la DENV, la sensibilité de détection obtenue est équivalente à celle des test LFA commerciaux. Pour DENV, il sera nécessaire de réaliser une étude sur un panel d'échantillons plus large afin d'avoir des performances plus précises. Pour le CHIKV, les résultats ont été obtenus sur un panel d'échantillons plus important, permettant d'estimer les performances avec plus d'acuité. Celles-ci sont proches des performances obtenues par la plupart des tests LFA présents sur le marché.

L'utilisation du PAD est simple, aisée, très proche de celle d'un test LFA classique de par le dépôt de l'échantillon et généralement d'un diluant, mais également dans la lecture du résultat (réaction colorée indiquant un résultat positif). Cependant, sa robustesse mériterait d'être évaluée à l'avenir sur un plus large panel d'échantillons. L'utilisation du PAD ne nécessite pas d'équipement dédié, la lecture du résultat peut se faire à l'œil nu. Cependant, comme évoqué plus haut, il est possible d'utiliser un smartphone couplé à une application

dédiée afin d'objectiver les résultats obtenus. Cette application permet l'obtention de données chiffrées afin de réaliser des analyses statistiques et d'améliorer ainsi la sensibilité du test.

Autres avantages du PAD : la gestion aisée des déchets car le papier est facilement dégradable, ainsi que le faible encombrement du PAD, dix-sept fois moins volumineux qu'un LFA classique.

Point important : il sera nécessaire de faire des tests de stabilité afin d'estimer le temps de stockage d'un PAD fonctionnalisé, dans des conditions de température et d'hygrométrie variées.

Selon les pays concernés, le PAD pourrait facilement être disponible en dispensaire, auprès des praticiens ou en pharmacie, sous forme d'autotest.

En conclusion, ces travaux ont permis de mettre en évidence que le papier pouvait être un support intéressant pour le développement de tests de diagnostic bas coût. La technologie permet une détection spécifique des virus étudiés avec un niveau de sensibilité honorable, et avec un temps d'obtention des résultats en moins de 10 minutes, tout en correspondant aux autres critères ASSURED définis par l'OMS. Ce test, couplé à une lecture par smartphone, permet d'améliorer la lecture et le rendu des résultats, aidant ainsi à la prise de décision. La spécificité du test permet de diagnostiquer de façon discriminante les virus à détecter (à savoir DENV et CHIKV), sur une version multiplex par exemple, améliorant ainsi la prise en charge du patient.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abbas, J. J., B. Smith, M. Poluta and A. Velazquez-Berumen (2017). "Improving health-care delivery in low-resource settings with nanotechnology: Challenges in multiple dimensions." Nanobiomedicine **4**: 1849543517701158.

Agarwal, A., D. Vibha, A. K. Srivastava, G. Shukla and K. Prasad (2017). "Guillain-Barre syndrome complicating chikungunya virus infection." J Neurovirol **23**(3): 504-507.

Al-Siyabi, T., K. Binkhamis, M. Wilcox, S. Wong, K. Pabbaraju, R. Tellier, T. F. Hatchette and J. J. LeBlanc (2013). "A cost effective real-time PCR for the detection of adenovirus from viral swabs." Virol J **10**: 184.

Amir, A., F. W. Cheong, J. R. De Silva and Y. L. Lau (2018). "Diagnostic tools in childhood malaria." Parasit Vectors **11**(1): 53.

Arya, S. and N. Agarwal (2011). "Rapid point-of-care diagnosis of chikungunya virus infection." Asian Pacific Journal of Tropical Disease **1**(3): 230-231.

Aubry, M., A. Teissier, R. C. V. Richard, Y. As, Z. K, E. Rouault, V. Maria, S. Lastere, Cao-Lormeau and D. Musso (2015). "Chikungunya outbreak, French Polynesia, 2014." (1080-6059 (Electronic)).

Azami, N. A., M. L. Moi and T. Takasaki (2016). "Neutralization Assay for Chikungunya Virus Infection: Plaque Reduction Neutralization Test." Methods Mol Biol **1426**: 273-282.

Bagherbaigi, S., E. P. Córcoles and D. H. Wicaksono (2014). "Cotton fabric as an immobilization matrix for low-cost and quick colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." Analytical Methods **6**(18): 7175-7180.

Baltimore, D. (1971). "Expression of animal virus genomes." Bacteriol. Rev. **35**(3): 235-241.

Bates, M. and A. Zumla (2015). "Rapid infectious diseases diagnostics using Smartphones." Ann Transl Med **3**(15): 215.

Bedin, F., L. Boulet, E. Voilin, G. Theillet, A. Rubens and C. Rozand (2017). "Paper-based point-of-care testing for cost-effective diagnosis of acute flavivirus infections." J Med Virol **89**(9): 1520-1527.

Bhalla, T. (2016). "10 things you should know about Google's new smartphone killer." from <https://yourstory.com/2016/05/google-modular-phone/>.

Bissonnette, L. and M. G. Bergeron (2010). "Diagnosing infections--current and anticipated technologies for point-of-care diagnostics and home-based testing." Clin Microbiol Infect **16**(8): 1044-1053.

Blacksell, S. D., A. Tanganuchitcharnchai, R. G. Jarman, R. V. Gibbons, D. H. Paris, M. S. Bailey, N. P. Day, R. Premaratna, D. G. Lalloo and H. J. de Silva (2011). "Poor diagnostic accuracy of commercial antibody-based assays for the diagnosis of acute chikungunya infection." Clinical and Vaccine Immunology **18**(10): 1773-1775.

Bonnafeous, P., M. C. Nicolai, J. C. Taveau, M. Chevalier, F. Barriere, J. Medina, O. Le Bihan, O. Adam, F. Ronzon and O. Lambert (2014). "Treatment of influenza virus with beta-propiolactone alters viral membrane fusion." Biochim Biophys Acta **1838**(1 Pt B): 355-363.

Booz, A., Hamilton Foundation

California Healthcare, Foundation, F. Robert Wood Johnson and C. von Liebig entrepreneurship (2012). "Accelerating commercialization of cost-saving health technologies."

Bosch, I., H. de Puig, M. Hiley, M. Carre-Camps, F. Perdomo-Celis, C. F. Narvaez, D. M. Salgado, D. Senthoo, M. O'Grady, E. Phillips, A. Durbin, D. Fandos, H. Miyazaki, C. W. Yen, M. Gelvez-Ramirez, R. V. Warke, L. S. Ribeiro, M. M. Teixeira, R. P. Almeida, J. E. Munoz-Medina, J. E. Ludert, M. L. Nogueira, T. E. Colombo, A. C. B. Terzian, P. T. Bozza, A. S. Calheiros, Y. R. Vieira, G. Barbosa-Lima, A. Vizzoni, J. Cerbino-Neto, F. A. Bozza, T. M. L. Souza, M. R. O. Trugilho, A. M. B. de Filippis, P. C. de Sequeira, E. T. A. Marques, T. Magalhaes, F. J. Diaz, B. N. Restrepo, K. Marin, S. Mattar, D. Olson, E. J. Asturias, M. Lucera, M. Singla, G. R. Medigeshi, N. de Bosch, J. Tam, J. Gomez-Marquez, C. Clavet, L. Villar, K. Hamad-Schifferli and L. Gehrke (2017). "Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum." Sci Transl Med **9**(409).

Branson, B. M. (2003). "Point-of-Care Rapid Tests for HIV Antibodies." Laboratoriums Medizin **27**(7-8): 288-295.

Bressanelli, S., K. Stiasny, S. L. Allison, E. A. Stura, S. Duquerroy, J. Lescar, F. X. Heinz and F. A. Rey (2004). "Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation." (0261-4189 (Print)).

Brighton, S. and I. W. Simson (1984). "A destructive arthropathy following Chikungunya virus arthritis--a possible association." (0770-3198 (Print)).

Brouard, C., P. Bernillon, I. Quatresous, J. Pillonel, A. Assal, H. De Valk and J. C. Desenclos (2008). "Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007." (0041-1132 (Print)).

Bruno, J. G., M. P. Carrillo, A. M. Richarte, T. Phillips, C. Andrews and J. S. Lee (2012). "Development, screening, and analysis of DNA aptamer libraries potentially useful for diagnosis and passive immunity of arboviruses." BMC research notes **5**: 633.

Bruzewicz, D. A., M. Reches and G. M. Whitesides (2008). "Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper." Anal Chem **80**(9): 3387-3392.

Caglioti, C., C. Castilletti, F. Carletti, M. R. Capobianchi and L. Bordi (2013). "Chikungunya virus infection: an overview." (1121-7138 (Print)).

Calba, C., M. Guerbois-Galla, F. Franke, C. Jeannin, M. Auzet-Caillaud, G. Grard, L. Pigaglio, A. Decoppet, J. Weicherding, M. C. Savaill, M. Munoz-Riviero, P. Chaud, B. Cadiou, L. Ramalli, P. Fournier, H. Noel, L. de, X, M. C. Paty and I. Leparç-Goffart (2017). "Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017." Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin **22**(39).

Caminade, C., J. M. Medlock, E. Ducheyne, K. M. McIntyre, S. Leach, M. Baylis and A. P. Morse (2012). "Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios." J R Soc Interface **9**(75): 2708-2717.

Carletti, F., L. Bordi, R. Chiappini, G. Ippolito, M. R. Sciarrone, M. R. Capobianchi, A. Di Caro and C. Castilletti (2007). "Rapid detection and quantification of Chikungunya virus by a one-step reverse transcription polymerase chain reaction real-time assay." Am J Trop Med Hyg **77**(3): 521-524.

Carter, K. P., A. M. Young and A. E. Palmer (2014). "Fluorescent sensors for measuring metal ions in living systems." Chem Rev **114**(8): 4564-4601.

Cate, D. M., J. A. Adkins, J. Mettakoonpitak and C. S. Henry (2014). "Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices." Analytical Chemistry.

Cavalcanti, L. P. G., A. R. R. Freitas, P. Brasil and R. V. D. Cunha (2017). "Surveillance of deaths caused by arboviruses in Brazil: from dengue to chikungunya." (1678-8060 (Electronic)).

Chai, C., Z. Xie and E. Grotewold (2011). "SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment), as a powerful tool for deciphering the protein-DNA interaction space." Methods Mol Biol **754**: 249-258.

Chan, K., S. C. Weaver, P. Y. Wong, S. Lie, E. Wang, M. Guerbois, S. P. Vayugundla and S. Wong (2016). "Rapid, Affordable and Portable Medium-Throughput Molecular Device for Zika Virus." Sci Rep **6**: 38223.

Chandak, N. H., R. S. Kashyap, D. Kabra, P. Karandikar, S. S. Saha, S. H. Morey, H. J. Purohit, G. M. Taori and H. F. Daginawala (2009). "Neurological complications of Chikungunya virus infection." Neurol India **57**(2): 177-180.

Chen, H., L. Lin, H. Li and J.-M. Lin (2014). "Quantum dots-enhanced chemiluminescence: mechanism and application." Coordination Chemistry Reviews **263**: 86-100.

Chen, R., V. Puri, N. Fedorova, D. Lin, K. L. Hari, R. Jain, J. D. Rodas, S. R. Das, R. S. Shabman and S. C. Weaver (2016). "Comprehensive Genome Scale Phylogenetic Study Provides New Insights on the Global Expansion of Chikungunya Virus." J Virol **90**(23): 10600-10611.

Cheng, C., J. Dong, L. Yao, A. Chen, R. Jia, L. Huan, J. Guo, Y. Shu and Z. Zhang (2008). "Potent inhibition of human influenza H5N1 virus by oligonucleotides derived by SELEX." Biochem Biophys Res Commun **366**(3): 670-674.

Chitnis, G., Z. Ding, C. L. Chang, C. A. Savran and B. Ziaie (2011). "Laser-treated hydrophobic paper: an inexpensive microfluidic platform." Lab on a chip **11**(6): 1161-1165.

Cho, B., J. Kim, J. E. Cho, B. Y. Jeon and S. Park (2008). "Expression of the capsid protein of Chikungunya virus in a baculovirus for serodiagnosis of Chikungunya disease." J Virol Methods **154**(1-2): 154-159.

Cho, D. G. and J. L. Sessler (2009). "Modern reaction-based indicator systems." Chem Soc Rev **38**(6): 1647-1662.

Chow, A., Z. Her, E. K. S. Ong, J.-m. Chen, F. Dimatatac, D. J. C. Kwek, T. Barkham, H. Yang, L. Renia, Y.-S. Leo and L. F. P. Ng (2011). "Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor." (1537-6613 (Electronic)).

Christensen, C. (2013). The innovator's dilemma: when new technologies cause great firms to fail, Harvard Business Review Press.

Colonna, M., G. Trinchieri and Y. J. Liu (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-1226.

Comer, J. (1956). "Semiquantitative specific test paper for glucose in urine." Analytical Chemistry **28**(11): 1748-1750.

Cormier, M. (2013). Chemiluminescence and bioluminescence, Springer Science & Business Media.

Couderc, T., F. Chretien, C. Schilte, O. Disson, M. Brigitte, F. Guivel-Benhassine, Y. Touret, G. Barau, N. Cayet, I. Schuffenecker, P. Despres, F. Arenzana-Seisdedos, A. Michault, M. L. Albert and M. Lecuit (2008). "A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease." PLoS Pathog **4**(2): e29.

Couturier, E., G. F. M. Mura, L. Leon, J.-M. Virion, M.-J. Letort, H. De Valk, F. Simon, V. Vaillant and V. Vaillant (2012). "Impaired quality of life after chikungunya virus infection: a 2-year follow-up study." (1462-0332 (Electronic)).

Curto, V. F., N. Lopez-Ruiz, L. F. Capitan-Vallvey, A. J. Palma, F. Benito-Lopez and D. Diamond (2013). "Fast prototyping of paper-based microfluidic devices by contact stamping using indelible ink." Rsc Advances **3**(41): 18811-18816.

Damle, R. G., N. Jayaram, S. M. Kulkarni, K. Nigade, K. Khutwad, S. Gosavi and D. Parashar (2016). "Diagnostic potential of monoclonal antibodies against the capsid protein of chikungunya virus for detection of recent infection." Archives of Virology.

Das, T., M. C. Jaffar-Bandjee, J. J. Hoarau, P. Krejbich Trotot, M. Denizot, G. Lee-Pat-Yuen, R. Sahoo, P. Guiraud, D. Ramful, S. Robin, J. L. Alessandri, B. A. Gauzere and P. Gasque (2010). "Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus." Prog Neurobiol **91**(2): 121-129.

de Arruda, I. N. Q., V. A. Pereira and R. Stefani (2017). "Application of chitosan matrix for delivery of rutin." Journal of the Iranian Chemical Society **14**(3): 561-566.

de Groot, R. J., W. R. Hardy, Y. Shirako and J. H. Strauss (1990). "Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the non-structural proteinase. Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo." (0261-4189 (Print)).

Deepak, S., K. Kottapalli, R. Rakwal, G. Oros, K. Rangappa, H. Iwahashi, Y. Masuo and G. Agrawal (2007). "Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes." Curr Genomics **8**(4): 234-251.

Delang, L., C. Li, A. Tas, G. Querat, I. C. Albulescu, T. De Burghgraeve, N. A. Guerrero, A. Gigante, G. Piorkowski, E. Decroly, D. Jochmans, B. Canard, E. J. Snijder, M. J. Perez-Perez, M. J. van Hemert, B. Coutard, P. Leyssen and J. Neyts (2016). "The viral capping enzyme nsP1: a novel target for the inhibition of chikungunya virus infection." (2045-2322 (Electronic)).

Delisle, E., C. Rousseau, B. Broche, I. Leparac-Goffart, G. L'Ambert, A. Cochet, C. Prat, V. Foulongne, J. B. Ferre, O. Catelinois, O. Flusin, E. Tchernonog, I. E. Moussion, A. Wiegandt, A. Septfonds, A. Mendy, M. B. Moyano, L. Laporte, J. Maurel, F. Jourdain, J. Reynes, M. C. Paty and F. Golliot (2015). "Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014." Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin **20**(17).

Dhanwani, R., M. Khan, A. S. Bhaskar, R. Singh, I. K. Patro, P. V. Rao and M. M. Parida (2012). "Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: role of apoptosis in neuronal cell death." Virus Res **163**(2): 563-572.

Dinkar, A., J. Singh, P. Prakash, A. Das and G. Nath (2017). "Hidden burden of chikungunya in North India; A prospective study in a tertiary care centre." J Infect Public Health.

Dou, M., D. C. Dominguez, X. Li, J. Sanchez and G. Scott (2014). "A versatile PDMS/paper hybrid microfluidic platform for rapid and sensitive infectious diseases diagnosis." Analytical Chemistry.

Doughan, S., M. O. Noor, Y. Han and U. J. Krull (2017). "Resonance Energy Transfer-Based Nucleic Acid Hybridization Assays on Paper-Based Platforms Using Emissive Nanoparticles as Donors." Methods Mol Biol **1571**: 301-326.

Dullaert-de Boer, M., O. W. Akkerman, M. Vermeer, D. L. J. Hess, H. A. M. Kerstjens, R. M. Anthony, T. S. van der Werf, D. van Soolingen and A. G. M. van der Zanden (2018). "Variability and cost implications of three generations of the Roche LightCycler(R) 480." PLoS One **13**(1): e0190847.

Dungchai, W., O. Chailapakul and C. S. Henry (2009). "Electrochemical detection for paper-based microfluidics." Analytical chemistry **81**(14): 5821-5826.

Dungchai, W., O. Chailapakul and C. S. Henry (2011). "A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing." The Analyst **136**(1): 77-82.

Dupuis-Maguiraga, L., S. Brun, M. Noret, G. Gras and P. Roques (2011). "Physiopathologie du chikungunya: les marqueurs de l'infection de la phase aiguë à l'atteinte chronique." Virologie **15**(4): 251-268.

Dupuis-Maguiraga, L., M. Noret, S. Brun, R. Le Grand, G. Gras and P. Roques (2012). "Chikungunya Disease: Infection-Associated Markers from the Acute to the Chronic Phase of Arbovirus-Induced Arthralgia." PLOS Neglected Tropical Diseases **6**(3): e1446.

Ehlert, U. (2015). "Adaptive cycles and innovation – first contact." from <https://understandinginnovation.blog/2015/08/04/adaptive-cycles-and-innovation-first-contact/>.

Ehrmeyer, S. S. and R. H. Laessig (2007). "Point-of-care testing, medical error, and patient safety: a 2007 assessment." Clin Chem Lab Med **45**(6): 766-773.

Ellenbecker, M., L. Sears, P. Li, J. M. Lanchy and J. S. Lodmell (2012). "Characterization of RNA aptamers directed against the nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus." Antiviral Res **93**(3): 330-339.

Elsharkawy, M., T. M. Schutzius and C. M. Megaridis (2014). "Inkjet patterned superhydrophobic paper for open-air surface microfluidic devices." Lab on a chip **14**(6): 1168-1175.

Esposito, D. L. A. and B. Fonseca (2017). "Sensitivity and detection of chikungunya viral genetic material using several PCR-based approaches." Rev Soc Bras Med Trop **50**(4): 465-469.

Fang, R., L. S. Blanton and D. H. Walker (2017). "Rickettsiae as Emerging Infectious Agents." Clin Lab Med **37**(2): 383-400.

Farkas, C. and T. v. Biesen (2011). "The new cost-conscious doctor: Changing America's healthcare landscape."

Fenton, E. M., M. R. Mascarenas, G. P. Lopez and S. S. Sibbett (2009). "Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping." ACS Appl Mater Interfaces **1**(1): 124-129.

Focke, M., D. Kosse, C. Muller, H. Reinecke, R. Zengerle and F. von Stetten (2010). "Lab-on-a-Foil: microfluidics on thin and flexible films." Lab Chip **10**(11): 1365-1386.

Foster, L. S. and I. J. Gruntfest (1937). "Demonstration experiments using universal indicators." Journal of Chemical Education **14**(6): 274.

Français, O. and H. H. Molinaro (2016). "La microfluidique : principes physiques et mise en œuvre d'écoulements continus." EducScol Education.

Frintz, A. (2015). "Les pays en voie de développement sont-ils «connectés»? ."

Fu, E., T. Liang, J. Houghtaling, S. Ramachandran, S. A. Ramsey, B. Lutz and P. Yager (2011). "Enhanced sensitivity of lateral flow tests using a two-dimensional paper network format." Analytical Chemistry **83**(20): 7941-7946.

Fu, E., T. Liang, P. Spicar-Mihalic, J. Houghtaling, S. Ramachandran and P. Yager (2012). "Two-dimensional paper network format that enables simple multistep assays for use in low-resource settings in the context of malaria antigen detection." Analytical Chemistry **84**(10): 4574-4579.

Fu, E., B. Lutz, P. Kauffman and P. Yager (2010). "Controlled reagent transport in disposable 2D paper networks." Lab on a chip **10**(7): 918-920.

Fu, H., J. Yang, L. Guo, J. Nie, Q. Yin, L. Zhang and Y. Zhang (2017). "Using the Rubik's Cube to directly produce paper analytical devices for quantitative point-of-care aptamer-based assays." Biosensors & bioelectronics **96**: 194-200.

Funke, M., A. Buchenauer, U. Schnakenberg, W. Mokwa, S. Diederichs, A. Mertens, C. Muller, F. Kensy and J. Buchs (2010). "Microfluidic biolector-microfluidic bioprocess control in microtiter plates." Biotechnol Bioeng **107**(3): 497-505.

Furuya-Kanamori, L., S. Liang, G. Milinovich, R. J. Soares Magalhaes, A. C. Clements, W. Hu, P. Brasil, F. D. Frentiu, R. Dunning and L. Yakob (2016). "Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses." BMC Infectious Diseases **16**(1): 84.

Gabriel, E. F., P. T. Garcia, T. M. Cardoso, F. M. Lopes, F. T. Martins and W. K. Coltro (2016). "Highly sensitive colorimetric detection of glucose and uric acid in biological fluids using chitosan-modified paper microfluidic devices." Analyst **141**(15): 4749-4756.

Gabriel, E. F., P. T. Garcia, E. Evans, T. M. Cardoso, C. D. Garcia and W. K. Coltro (2017). "Enhanced Performance of Colorimetric Biosensing on Paper Microfluidic Platforms Through Chemical Modification and Incorporation of Nanoparticles." Methods Mol Biol **1571**: 327-341.

Gaibani, P., M. P. Landini and V. Sambri (2016). "Diagnostic Methods for CHIKV Based on Serological Tools." Methods Mol Biol **1426**: 63-73.

Galán-Huerta, K. A., A. M. Rivas-Estilla, I. Fernández-Salas, J. A. Farfan-Ale and J. Ramos-Jiménez (2015). "Chikungunya virus: A general overview." Medicina Universitaria **17**(68): 175-183.

Ganoza, C. A., M. A. Matthias, M. Saito, M. Cespedes, E. Gotuzzo and J. M. Vinetz (2010). "Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by Leptospira." PLoS Negl Trop Dis **4**(2): e612.

Gardner, C. L., C. W. Burke, M. Z. Tesfay, P. J. Glass, W. B. Klimstra and K. D. Ryman (2008). "Eastern and Venezuelan equine encephalitis viruses differ in their ability to infect dendritic cells and macrophages: impact of altered cell tropism on pathogenesis." J Virol **82**(21): 10634-10646.

Gardner, J., I. Anraku, T. T. Le, T. Larcher, L. Major, P. Roques, W. A. Schroder, S. Higgs and A. Suhrbier (2010). "Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice." J Virol **84**(16): 8021-8032.

Garmashova, N., G. R., E. Volkova, P. S., E. Frolova and I. Frolov (2007). "The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff." (0022-538X (Print)).

Garnier, P., E. Blanchet, G. Reix, S. Kwiatek, A. Reboux, B. Huguenin, B. Faulques, B. Gaüzere and J. Becquart (2006). "Severe acute hepatitis during Chikungunya virus infection on Reunion Island: case report from 14 observations." Journal of Clinical Virology **36**: S60.

Gasque, P., T. Couderc, M. Lecuit, P. Roques and L. F. Ng (2015). "Chikungunya virus pathogenesis and immunity." Vector Borne Zoonotic Dis **15**(4): 241-249.

Ge, L., S. Wang, X. Song, S. Ge and J. Yu (2012). "3D origami-based multifunction-integrated immunodevice: low-cost and multiplexed sandwich chemiluminescence immunoassay on microfluidic paper-based analytical device." Lab on a chip **12**(17): 3150-3158.

Ge, S., Y. Zhang, M. Yan, J. Huang and J. Yu (2017). "Fabrication of Lab-on-Paper Using Porous Au-Paper Electrode: Application to Tumor Marker Electrochemical Immunoassays." Methods Mol Biol **1572**: 125-134.

Gérardin, P., V. Guernier, J. Perrau, A. Fianu, K. Le Roux, P. Grivard, A. Michault, X. De Lamballerie, A. Flahault and F. Favier (2008). "Estimating Chikungunya prevalence in La Reunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic." BMC infectious diseases **8**(1): 99.

Gervais, L., R. N. de and E. Delamarche (2011). "Microfluidic chips for point-of-care immunodiagnostics." Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.) **23**(24): H151-H176.

Giokas, D. L., G. Z. Tsogas and A. G. Vlessidis (2014). "Programming fluid transport in paper-based microfluidic devices using razor-crafted open channels." Analytical chemistry **86**(13): 6202-6207.

Giokas, D. L., G. Z. Tsogas and A. G. Vlessidis (2014). "Programming fluid transport in paper-based microfluidic devices using razor-crafted open channels." Anal Chem **86**(13): 6202-6207.

Glasgow, L. A. (1966). "Leukocytes and interferon in the host response to viral infections II. Enhanced interferon response of leukocytes from immune animals." Journal of bacteriology **91**(6): 2185-2191.

Godino, N., R. Gorkin, III, K. Bourke and J. Ducree (2012). "Fabricating electrodes for amperometric detection in hybrid paper/polymer lab-on-a-chip devices." Lab on a chip **12**(18): 3281-3284.

Goh, L. Y., J. Hobson-Peters, N. A. Prow, K. Baker, T. B. Piyasena, C. T. Taylor, A. Rana, M. L. Hastie, J. J. Gorman and R. A. Hall (2015). "The Chikungunya Virus Capsid Protein Contains Linear B Cell Epitopes in the N- and C-Terminal Regions that are Dependent on an Intact C-Terminus for Antibody Recognition." (1999-4915 (Electronic)).

Goh, L. Y., J. Hobson-Peters, N. A. Prow, J. Gardner, H. Bielefeldt-Ohmann, A. Suhrbier and R. A. Hall (2015). "Monoclonal antibodies specific for the capsid protein of chikungunya virus suitable for multiple applications." The Journal of general virology **96**(Pt 3): 507-512.

Grandadam, M., V. Caro, S. Plumet, J. M. Thiberge, Y. Souares, A. B. Failloux, H. J. Tolou, M. Budelot, D. Cosserat, I. Leparç-Goffart and P. Despres (2011). "Chikungunya virus, southeastern France." Emerg Infect Dis **17**(5): 910-913.

Grifantini, K. (2009). "TR10 : paper diagnostics." MIT technology review.

- Hahon, N. and W. D. Zimmerman (1970). "Chikungunya virus infection of cell monolayers by cell-to-cell and extracellular transmission." Applied microbiology **19**(2): 389-391.
- Hammon, W., A. Rudnick and G. E. Sather (1960). "Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand."
- Hatai, J., S. Pal, G. P. Jose and S. Bandyopadhyay (2012). "Histidine based fluorescence sensor detects Hg²⁺ in solution, paper strips, and in cells." Inorganic chemistry **51**(19): 10129-10135.
- Hattersley, S. M., J. Greenman and S. J. Haswell (2013). "The application of microfluidic devices for viral diagnosis in developing countries." Methods in molecular biology (Clifton, N. J.) **949**: 285-303.
- Hay Burgess, D. C., J. Wasserman and C. A. Dahl (2006). "Global health diagnostics." Nature **444 Suppl 1**: 1-2.
- He, P. J., I. N. Katis, R. W. Eason and C. L. Sones (2016). "Laser direct-write for fabrication of three-dimensional paper-based devices." Lab on a chip.
- Her, Z., B. Malleret, M. Chan, E. K. Ong, S. C. Wong, D. J. Kwek, H. Tolou, R. T. Lin, P. A. Tambyah, L. Renia and L. F. Ng (2010). "Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response." J Immunol **184**(10): 5903-5913.
- Ho, P. S., M. M. Ng and J. J. Chu (2010). "Establishment of one-step SYBR green-based real time-PCR assay for rapid detection and quantification of chikungunya virus infection." Virology **7**: 13.
- Houghtaling, J., T. Liang, G. Thiessen and E. Fu (2013). "Dissolvable bridges for manipulating fluid volumes in paper networks." Analytical chemistry **85**(23): 11201-11204.
- Hsiung, G. D. (1989). "The impact of cell culture sensitivity on rapid viral diagnosis: a historical perspective." Yale J Biol Med **62**(2): 79-88.
- Hu, J., S. Wang, L. Wang, F. Li, B. Pingguan-Murphy, T. J. Lu and F. Xu (2014). "Advances in paper-based point-of-care diagnostics." Biosens Bioelectron **54**: 585-597.
- Ibrahim, S. and T. Ito (2010). "Surface chemical properties of nanoscale domains on UV-treated polystyrene-poly(methyl methacrylate) diblock copolymer films studied using scanning force microscopy." Langmuir **26**(3): 2119-2123.
- Jaffar-Bandjee, M. C., T. Das, J. J. Hoarau, P. Krejbich Trotot, M. Denizot, A. Ribera, P. Roques and P. Gasque (2009). "Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis." (1769-714X (Electronic)).
- Jiang, X. and Z. H. Fan (2016). "Fabrication and Operation of Paper-Based Analytical Devices." Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.).
- Johnson, B. W., C. H. Goodman, K. Holloway, P. M. de Salazar, A. M. Valadere and M. Drebot (2016). "Evaluation of Commercially Available Chikungunya Virus Immunoglobulin M Detection Assays." The American journal of tropical medicine and hygiene.
- Johnson, B. W., C. H. Goodman, K. Holloway, P. M. de Salazar, A. M. Valadere and M. A. Drebot (2016). "Evaluation of Commercially Available Chikungunya Virus Immunoglobulin M Detection Assays." Am J Trop Med Hyg **95**(1): 182-192.

Johnson, B. W., B. J. Russell and C. H. Goodman (2016). "Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays." J Infect Dis **214**(suppl 5): S471-s474.

Jokerst, J. C., J. A. Adkins, B. Bisha, M. M. Mentele, L. D. Goodridge and C. S. Henry (2012). "Development of a paper-based analytical device for colorimetric detection of select foodborne pathogens." Analytical Chemistry **84**(6): 2900-2907.

Jolly, D. R. (2013). "Comment évaluer vos technologies?" L'Expansion Management Review(2): 122-130.

Jose, J., J. E. Snyder and R. J. Kuhn (2009). "A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly." (1746-0921 (Electronic)).

Kafkova, J. (2016). "Rapid diagnostic point of care tests in resource limited settings." International Journal of Infectious Diseases **45**: 56-57.

Kam, Y. W., E. K. Ong, L. Renia, J. C. Tong and L. F. Ng (2009). "Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention." Microbes Infect **11**(14-15): 1186-1196.

Kettler, H., K. White and S. J. Hawkes (2004). "Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections: key findings and recommendations."

Khan, M., R. Dhanwani, J. S. Kumar, P. V. Rao and M. Parida (2014). "Comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant envelope proteins and native cell culture purified viral antigens of Chikungunya virus." Journal of Medical Virology **86**(7): 1169-1175.

Khoury, V. J. and P. R. Camilo (2015). "Chikungunya virus (CHIKV): what can be expected after the acute phase?" Reumatologia clinica **12**(1): 1-3.

Kikuchi, K., T. Umehara, F. Nishikawa, K. Fukuda, T. Hasegawa and S. Nishikawa (2009). "Increased inhibitory ability of conjugated RNA aptamers against the HCV IRES." Biochem Biophys Res Commun **386**(1): 118-123.

Kondratieff, N. D. (1929). "The long waves in economic life." Review (Fernand Braudel Center): 519-562.

Kosasih, H., S. Widjaja, E. Surya, S. H. Hadiwijaya, D. P. Butarbutar, U. A. Jaya, Nurhayati, B. Alisjahbana and M. Williams (2012). "Evaluation of two IgM rapid immunochromatographic tests during circulation of Asian lineage Chikungunya virus." The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health **43**(1): 55-61.

Krejebich-Trotot, P., M. Denizot, J. J. Hoarau, M. C. Jaffar-Bandjee, T. Das and P. Gasque (2011). "Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses." Faseb j **25**(1): 314-325.

Krejebich-Trotot, P., B. Gay, G. Li-Pat-Yuen, J. J. Hoarau, M. C. Jaffar-Bandjee, L. Briant, P. Gasque and M. Denizot (2011). "Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication." Virol J **8**: 432.

Krishnamoorthy, K., K. Harichandrakumar, A. Krishna Kumari and L. K. Das (2009). "Burden of chikungunya in India: estimates of disability adjusted life years (DALY) lost in 2006 epidemic." (0972-9062 (Print)).

Kucharz, E. J. and I. Cebula-Byrska (2012). "Chikungunya fever." European journal of internal medicine **23**(4): 325-329.

Kumar, J., M. Khan, G. Gupta, M. Bhoopati, P. V. Lakshmana Rao and M. Parida (2012). "Production, characterization, and application of monoclonal antibodies specific to recombinant (E2) structural protein in antigen-capture ELISA for clinical diagnosis of Chikungunya virus." Viral Immunology **25**(2): 153-160.

Kumar, P., K. Y. Pok, L. K. Tan, C. Angela, Y. S. Leo and L. C. Ng (2014). "Development and evaluation of baculovirus-expressed Chikungunya virus E1 envelope proteins for serodiagnosis of Chikungunya infection." J Virol Methods **206**: 67-75.

Kuo, S. C., Y. J. Chen, Y.-M. Wang, P.-Y. Tsui, M.-D. Kuo, T.-Y. Wu and S. J. Lo (2012). "Cell-based analysis of Chikungunya virus E1 protein in membrane fusion." (1423-0127 (Electronic)).

Kwong, P. and M. Gupta (2012). "Vapor phase deposition of functional polymers onto paper-based microfluidic devices for advanced unit operations." Anal Chem **84**(22): 10129-10135.

Labadie, K., T. Larcher, C. Joubert, A. Mannioui, B. Delache, P. Brochard, L. Guigand, L. Dubreil, P. Lebon, B. Verrier, X. de Lamballerie, A. Suhrbier, Y. Cherel, R. Le Grand and P. Roques (2010). "Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages." J Clin Invest **120**(3): 894-906.

Lamb, K., G. L. Lokesh, M. Sherman and S. Watowich (2010). "Structure of a Venezuelan equine encephalitis virus assembly intermediate isolated from infected cells." (1096-0341 (Electronic)).

Laras, K., N. C. Sukri, R. P. Larasati, M. J. Bangs, R. Kosim, Djauzi, T. Wandra, J. Master, H. Kosasih, S. Hartati, C. Beckett, E. R. Sedyaningsih, H. J. Beecham, 3rd and A. L. Corwin (2005). "Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia." Trans R Soc Trop Med Hyg **99**(2): 128-141.

Laurent, P., K. Le Roux, P. Grivard, G. Bertil, F. Naze, M. Picard, F. Staikowsky, G. Barau, I. Schuffenecker and A. Michault (2007). "Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus." (0009-9147 (Print)).

Laurichesse, J.-J., C. H. Do and C. Leport (2009). "Complications neurologiques de l'infection à virus Chikungunya." Neurologie.com **1**(1): 8-11.

Lee, D. E. (2007). "Development of micropump for microfluidic applications."

Lee, L. G., E. S. Nordman, M. D. Johnson and M. F. Oldham (2013). "A low-cost, high-performance system for fluorescence lateral flow assays." Biosensors (Basel) **3**(4): 360-373.

Lee, S., G. Kim and J. Moon (2013). "Performance improvement of the one-dot lateral flow immunoassay for aflatoxin B1 by using a smartphone-based reading system." Sensors (Basel) **13**(4): 5109-5116.

Lee, W. G., Y. G. Kim, B. G. Chung, U. Demirci and A. Khademhosseini (2010). "Nano/Microfluidics for diagnosis of infectious diseases in developing countries." Adv Drug Deliv Rev **62**(4-5): 449-457.

Leland, D. S. and C. C. Ginocchio (2007). "Role of cell culture for virus detection in the age of technology." Clin Microbiol Rev **20**(1): 49-78.

Leung, J. Y., M. M. Ng and J. J. Chu (2011). "Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells." (1687-8647 (Electronic)).

- Li, G. and C. M. Rice (1993). "The signal for translational readthrough of a UGA codon in Sindbis virus RNA involves a single cytidine residue immediately downstream of the termination codon." Journal of virology **67**(8): 5062-5067.
- Li, X., J. Tian, G. Garnier and W. Shen (2010). "Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **76**(2): 564-570.
- Li, Y., P. Fan, S. Zhou and L. Zhang (2017). "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens." Microbial pathogenesis **107**: 54-61.
- Liana, D. D., B. Raguse, J. J. Gooding and E. Chow (2012). "Recent advances in paper-based sensors." Sensors (Basel, Switzerland) **12**(9): 11505-11526.
- Lien, K. Y., W. C. Lee, H. Y. Lei and G. B. Lee (2007). "Integrated reverse transcription polymerase chain reaction systems for virus detection." Biosens Bioelectron **22**(8): 1739-1748.
- Lin, Y., D. Gritsenko, S. Feng, Y. C. Teh, X. Lu and J. Xu (2016). "Detection of heavy metal by paper-based microfluidics." Biosensors and Bioelectronics **83**: 256-266.
- Litzba, N., C. S. Klade, S. Lederer and M. Niedrig (2010). "Evaluation of serological diagnostic test systems assessing the immune response to Japanese encephalitis vaccination." PLoS Negl Trop Dis **4**(11): e883.
- Litzba, N., I. Schuffenecker, H. Zeller, C. Drosten, P. Emmerich, R. Charrel, P. Kreher and M. Niedrig (2008). "Evaluation of the first commercial chikungunya virus indirect immunofluorescence test." J Virol Methods **149**(1): 175-179.
- Liu, H. and R. M. Crooks (2011). "Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami." Journal of the American Chemical Society **133**(44): 17564-17566.
- Liu, W., C. L. Cassano, X. Xu and Z. H. Fan (2013). "Laminated paper-based analytical devices (LPAD) with origami-enabled chemiluminescence immunoassay for cotinine detection in mouse serum." Analytical Chemistry **85**(21): 10270-10276.
- Lo, S. J., S. C. Yang, D. J. Yao, J. H. Chen, W. C. Tu and C. M. Cheng (2013). "Molecular-level dengue fever diagnostic devices made out of paper." Lab on a chip **13**(14): 2686-2692.
- López Marzo, A. M., J. Pons, D. A. Blake and A. Merkoçi (2013). "All-integrated and highly sensitive paper based device with sample treatment platform for Cd²⁺ immunodetection in drinking/tap waters." Analytical chemistry **85**(7): 3532-3538.
- Lucas, R. (2015). "Les pays émergents : nouvel eldorado du smartphone."
- Lum, F. M. and L. F. Ng (2015). "Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis." Antiviral Research **120**: 165-174.
- Lumsden, W. H. (1955). "An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology."
- Lusa, S., H. Garoff and P. Liljestrom (1991). "Fate of the 6K membrane protein of Semliki Forest virus during virus assembly." (0042-6822 (Print)).
- Ma, Y., H. Li, S. Peng and L. Wang (2012). "Highly selective and sensitive fluorescent paper sensor for nitroaromatic explosive detection." Anal Chem **84**(19): 8415-8421.
- Mabey, D., R. W. Peeling, A. Ustianowski and M. D. Perkins (2004). "Diagnostics for the developing world." Nat Rev Microbiol **2**(3): 231-240.

Mahato, K., A. Srivastava and P. Chandra (2017). "Paper based diagnostics for personalized health care: Emerging technologies and commercial aspects." Biosensors & bioelectronics **96**: 246-259.

Malet, H., B. Coutard, S. Jamal, H. Dutartre, N. Papageorgiou, M. Neuvonen, T. Ahola, N. Forrester, E. A. Gould, D. Lafitte, F. Ferron, J. Lescar, A. E. Gorbalenya, X. de Lamballerie and B. Canard (2009). "The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket." J Virol **83**(13): 6534-6545.

Manimunda, S. P., P. Vijayachari, R. Uppoor, A. P. Sugunan, S. S. Singh, S. K. Rai, A. B. Sudeep, N. Muruganandam, I. K. Chaitanya and D. R. Guruprasad (2010). "Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **104**(6): 392-399.

Marano, G., S. Pupella, I. Pati, F. Masiello, M. Franchini, S. Vaglio, C. Velati and G. M. Liunbruno (2017). "Ten years since the last Chikungunya virus outbreak in Italy: history repeats itself." Blood Transfus **15**(6): 489-490.

Mardekian, S. K. and A. L. Roberts (2015). "Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses." BioMed research international **2015**: 834371.

Martelli, R. (2015). "Vestigen creates healthcare modules for Project Ara phone." from <http://www.modularphonesforum.com/news/vestigen-creates-healthcare-modules-for-project-ara-phone-1239/>.

Martin, D. A., D. A. Muth, T. Brown, A. J. Johnson, N. Karabatsos and J. T. Roehrig (2000). "Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections." Journal of clinical microbiology **38**(5): 1823-1826.

Martinez, A. W., S. T. Phillips, M. J. Butte and G. M. Whitesides (2007). "Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays." Angewandte Chemie (International ed. in English) **46**(8): 1318-1320.

Martinez, A. W., S. T. Phillips and G. M. Whitesides (2008). "Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(50): 19606-19611.

Martinez, A. W., S. T. Phillips, G. M. Whitesides and E. Carrilho (2010). "Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices." Analytical Chemistry **82**(1): 3-10.

Martinez, A. W., S. T. Phillips, B. J. Wiley, M. Gupta and G. M. Whitesides (2008). "FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices." Lab on a chip **8**(12): 2146-2150.

Masrinoul, P., O. Puiprom, A. Tanaka, M. Kuwahara, P. Chaichana, K. Ikuta, P. Ramasoota and T. Okabayashi (2014). "Monoclonal antibody targeting chikungunya virus envelope 1 protein inhibits virus release." Virology **464-465**: 111-117.

Mat Jusoh, T. N. A. and R. H. Shueb (2017). "Performance Evaluation of Commercial Dengue Diagnostic Tests for Early Detection of Dengue in Clinical Samples." Journal of Tropical Medicine **2017**: 4687182.

Mauk, M. G., J. Song, C. Liu and H. H. Bau (2018). "Simple Approaches to Minimally-Instrumented, Microfluidic-Based Point-of-Care Nucleic Acid Amplification Tests." Biosensors (Basel) **8**(1).

Mavalankar, D., P. Shastri, T. Bandyopadhyay, J. Parmar and K. V. Ramani (2008). "Increased mortality rate associated with chikungunya epidemic, Ahmedabad, India." Emerg Infect Dis **14**(3): 412-415.

Melton, J. V., G. Ewart, R. C. Weir, P. G. Board, E. Lee and P. W. Gage (2002). "Alphavirus 6K proteins form ion channels." (0021-9258 (Print)).

Messaoudi, I., J. Vomaske, T. Totonchy, C. N. Kreklywich, K. Haberthur, L. Springgay, J. D. Brien, M. S. Diamond, V. R. Defilippis and D. N. Streblow (2013). "Chikungunya virus infection results in higher and persistent viral replication in aged rhesus macaques due to defects in anti-viral immunity." PLoS Negl Trop Dis **7**(7): e2343.

Moi, M. L. and T. Takasaki (2016). "Chikungunya Virus Growth and Fluorescent Labeling: Detection of Chikungunya Virus by Immunofluorescence Assay." Methods Mol Biol **1426**: 143-152.

Morbioli, G. G., T. Mazzu-Nascimento, A. M. Stockton and E. Carrilho (2017). "Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (muPADs) - A review." Analytica Chimica Acta **970**: 1-22.

Morgeaux, S., N. Tordo, C. Gontier and P. Perrin (1993). "Beta-propiolactone treatment impairs the biological activity of residual DNA from BHK-21 cells infected with rabies virus." Vaccine **11**(1): 82-90.

Morris, D. Z. (2016). "Why Google Canceled Project Ara." Fortune.

Moulin, E., K. Selby, P. Cherpillod, L. Kaiser and N. Boillat-Blanco (2016). "Simultaneous outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections: diagnosis challenge in a returning traveller with nonspecific febrile illness." New Microbes New Infect **11**: 6-7.

Murray, C. J. and A. K. Acharya (1997). "Understanding DALYs (disability-adjusted life years)." J Health Econ **16**(6): 703-730.

Murray, C. J. and A. D. Lopez (1996). "Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study." (0036-8075 (Print)).

Musso, D., A. Teissier, E. Rouault, S. Teururai, J. J. de Pina and T. X. Nhan (2016). "Detection of chikungunya virus in saliva and urine." Virology journal **13**: 102.

Newman, J. and K. E. Thomas-Alyea (2012). Electrochemical systems, John Wiley & Sons.

Nie, J., Y. Zhang, L. Lin, C. Zhou, S. Li, L. Zhang and J. Li (2012). "Low-cost fabrication of paper-based microfluidic devices by one-step plotting." Analytical Chemistry **84**(15): 6331-6335.

Nilghaz, A., D. H. Wicaksono, D. Gustiono, F. A. Abdul Majid, E. Supriyanto and M. R. Abdul Kadir (2012). "Flexible microfluidic cloth-based analytical devices using a low-cost wax patterning technique." Lab Chip **12**(1): 209-218.

Nilsson, L. (2014). "Unblenders, Dremelfuges, and Optical Tweezers."

Nilsson, L. and T. Greenwald (2013). "Lowering the cost of basic biological research."

Noiphung, J., T. Songjaroen, W. Dungchai, C. S. Henry, O. Chailapakul and W. Laiwattanapaisal (2013). " " Anal Chim Acta **788**: 39-45.

Noiphung, J., T. Songjaroen, W. Dungchai, C. S. Henry, O. Chailapakul and W. Laiwattanapaisal (2013). "Electrochemical detection of glucose from whole blood using paper-based microfluidic devices." Anal Chim Acta **788**: 39-45.

Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase (2000). "Loop-mediated isothermal amplification of DNA." Nucleic acids research **28**(12): e63-e63.

Nunes, M. R., N. R. Faria, J. M. de Vasconcelos, N. Golding, M. U. Kraemer, L. F. de Oliveira, R. S. Azevedo, D. E. da Silva, E. V. da Silva, S. P. da Silva, V. L. Carvalho, G. E. Coelho, A. C. Cruz, S. G. Rodrigues, J. L. Vianez, Jr., B. T. Nunes, J. F. Cardoso, R. B. Tesh, S. I. Hay, O. G. Pybus and P. F. Vasconcelos (2015). "Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil." BMC medicine **13**: 102.

Okabayashi, T., T. Sasaki, P. Masrinoul, N. Chantawat, S. Yoksan, N. Nitatpattana, S. Chusri, R. E. Morales Vargas, M. Grandadam, P. T. Brey, S. Soegijanto, K. C. Mulyantno, S. Churrotin, T. Kotaki, O. Faye, O. Faye, A. Sow, A. A. Sall, O. Puiprom, P. Chaichana, T. Kurosu, S. Kato, M. Kosaka, P. Ramasoota and K. Ikuta (2015). "Detection of chikungunya virus antigen by a novel rapid immunochromatographic test." Journal of Clinical Microbiology **53**(2): 382-388.

Olkkonen, J., K. Lehtinen and T. Erho (2010). "Flexographically printed fluidic structures in paper." Anal Chem **82**(24): 10246-10250.

Ong, R.-Y., F.-M. Lum and L. F. Ng (2014). "The fine line between protection and pathology in neurotropic flavivirus and alphavirus infections." Future Virology **9**(3): 313-330.

Osborn, J., B. Lutz, E. Fu and P. Yager (2011). Novel sample processing modules for enhanced paper-based diagnostics. 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 2011, MicroTAS 2011.

Overvelde, J. T., T. A. de Jong, Y. Shevchenko, S. A. Becerra, G. M. Whitesides, J. C. Weaver, C. Hoberman and K. Bertoldi (2016). "A three-dimensional actuated origami-inspired transformable metamaterial with multiple degrees of freedom." Nat Commun **7**: 10929.

Ozden, S., M. Huerre, J. P. Riviere, L. L. Coffey, P. V. Afonso, V. Mouly, J. de Monredon, J. C. Roger, M. El Amrani, J. L. Yvin, M. C. Jaffar, M. P. Frenkiel, M. Sourisseau, O. Schwartz, G. Butler-Browne, P. Despres, A. Gessain and P. E. Ceccaldi (2007). "Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection." PLoS One **2**(6): e527.

Panning, M., M. Hess, W. Fischer, K. Grywna, M. Pfeffer and C. Drosten (2009). "Performance of the RealStar Chikungunya virus real-time reverse transcription-PCR kit." J Clin Microbiol **47**(9): 3014-3016.

Park, E. and D. E. Griffin (2009). "The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice." Virology **388**(2): 305-314.

Pastorino, B., M. Bessaud, M. Grandadam, S. Murri, H. J. Tolou and C. N. Peyrefitte (2005). "Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses." J Virol Methods **124**(1-2): 65-71.

Peeling, R. and D. Mabey (2010). "Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world." Clinical microbiology and infection **16**(8): 1062-1069.

Pelton, R. (2009). "Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics." TrAC Trends in Analytical Chemistry **28**(8): 925-942.

Perry, A. K., G. Chen, D. Zheng, H. Tang and G. Cheng (2005). "The host type I interferon response to viral and bacterial infections." (1001-0602 (Print)).

Petersen, L. R. and A. M. Powers (2016). "Chikungunya: epidemiology." F1000Research **5**.

Pialoux, G., B. Gauzere, S. Jaureguiberry and M. Strobel (2007). "Chikungunya, an epidemic arbovirolosis." (1473-3099 (Print)).

Piepenburg, O., C. H. Williams, D. L. Stemple and N. A. Armes (2006). "DNA detection using recombination proteins." PLoS biology **4**(7): e204.

Powers, A. M., A. C. Brault, R. B. Tesh and S. C. Weaver (2000). "Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships." Journal of General Virology **81**(2): 471-479.

Powers, A. M., B. A. C., Y. Shirako, E. G. Strauss, W. Kang, J. H. Strauss and S. C. Weaver (2001). "Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses." (0022-538X (Print)).

Powers, A. M. and C. H. Logue (2007). "Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus." (0022-1317 (Print)).

Prat, C. M., O. Flusin, A. Panella, B. Tenebray, R. Lanciotti and I. Leparç-Goffart (2014). "Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for chikungunya virus." Emerg Infect Dis **20**(12): 2129-2132.

Priya, R., M. Khan, M. K. Rao and M. Parida (2014). "Cloning, expression and evaluation of diagnostic potential of recombinant capsid protein based IgM ELISA for chikungunya virus." Journal of Virological Methods **203**: 15-22.

Quesada-González, D. and A. Merkoçi (2017). "Mobile phone-based biosensing: An emerging "diagnostic and communication" technology." Biosensors and Bioelectronics **92**: 549-562.

Rathore, M. H., J. Runyon and T. U. Haque (2017). "Emerging Infectious Diseases." (1878-1926 (Electronic)).

Rattanarat, P., W. Dungchai, D. Cate, J. Volckens, O. Chailapakul and C. S. Henry (2014). "Multilayer paper-based device for colorimetric and electrochemical quantification of metals." Analytical chemistry **86**(7): 3555-3562.

Reynolds, O. (1884). "XXIX. An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels." Philosophical Transactions of the Royal Society of London **174**: 935-982.

Rianthavorn, P., N. Wuttirattanakowit, K. Prianantathavorn, N. Limpaphayom, A. Theamboonlers and Y. Poovorawan (2010). "Evaluation of a rapid assay for detection of IgM antibodies to chikungunya." The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health **41**(1): 92-96.

Rinaldo, C., J. Overall and L. A. Glasgow (1975). "Viral replication and interferon production in fetal and adult ovine leukocytes and spleen cells." Infection and immunity **12**(5): 1070-1077.

Robinson, M. C. (1955). "An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features."

Rossini, G., M. P. Landini and V. Sambri (2016). "Evolution and Epidemiology of Chikungunya Virus." (1940-6029 (Electronic)).

Rougeron, V., I. C. Sam, M. Caron, D. Nkoghe, E. Leroy and P. Roques (2015). "Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk." Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology **64**: 144-152.

Rozand, C. (2014). "Paper-based analytical devices for point-of-care infectious disease testing." European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **33**(2): 147-156.

Ruckert, C., J. Weger-Lucarelli, S. M. Garcia-Luna, M. C. Young, A. D. Byas, R. A. Murrieta, J. R. Fauver and G. D. Ebel (2017). "Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by Aedes aegypti mosquitoes." Nat Commun **8**: 15412.

Sam, I. C. and S. AbuBakar (2006). "Chikungunya virus infection." (0300-5283 (Print)).

Sameenoi, Y., P. N. Nongkai, S. Nouanthavong, C. S. Henry and D. Nacapricha (2014). "One-step polymer screen-printing for microfluidic paper-based analytical device (muPAD) fabrication." Analyst **139**(24): 6580-6588.

Sanchez-San Martin, C., C. Y. Liu and M. Kielian (2009). "Dealing with low pH: entry and exit of alphaviruses and flaviviruses." (1878-4380 (Electronic)).

Santhiago, M. and L. T. Kubota (2013). "A new approach for paper-based analytical devices with electrochemical detection based on graphite pencil electrodes." Sensors and Actuators B: Chemical **177**: 224-230.

Santhiago, M., E. W. Nery, G. P. Santos and L. T. Kubota (2014). "Microfluidic paper-based devices for bioanalytical applications." Bioanalysis **6**(1): 89-106.

Schilte, C., T. Couderc, F. Chretien, M. Sourisseau, N. Gangneux, F. Guivel-Benhassine, A. Kraxner, J. Tschopp, S. Higgs, A. Michault, F. Arenzana-Seisdedos, M. Colonna, L. Peduto, O. Schwartz, M. Lecuit and M. L. Albert (2010). "Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells." J Exp Med **207**(2): 429-442.

Schilte, C., F. Staikowsky, T. Couderc, Y. Madec, F. Carpentier, S. Kassab, M. L. Albert, M. Lecuit and A. Michault (2013). "Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study." PLoS Negl Trop Dis **7**(3): e2137.

Schumpeter, J. (1942). "Creative destruction." Capitalism, socialism and democracy **825**.

Schwameis, M., N. Buchtele, P. P. Wadowski, C. Schoergenhofer and B. Jilma (2016). "Chikungunya vaccines in development." Hum Vaccin Immunother **12**(3): 716-731.

Schwartz, O. and M. L. Albert (2010). "Biology and pathogenesis of chikungunya virus." Nature reviews. Microbiology **8**(7): 491-500.

Shabman, R. S., T. E. Morrison, C. Moore, L. White, M. S. Suthar, L. Hueston, N. Rulli, B. Lidbury, J. P. Ting, S. Mahalingam and M. T. Heise (2007). "Differential induction of type I interferon responses in myeloid dendritic cells by mosquito and mammalian-cell-derived alphaviruses." J Virol **81**(1): 237-247.

Shirako, Y. and J. H. Strauss (1994). "Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis." J Virol **68**(3): 1874-1885.

Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko and Y. J. Liu (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-1837.

Solignat, M., B. Gay, S. Higgs, L. Briant and C. Devaux (2009). "Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus." (1096-0341 (Electronic)).

Song, Q. (2015). "Restoration of obliterated engraved marks on steel surfaces by chemical etching reagent." Forensic Sci Int **250**: 33-36.

Songjaroen, T., W. Dungchai, O. Chailapakul and W. Laiwattanapaisa (2011). "Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping." Talanta **85**(5): 2587-2593.

Songok, J., M. Tuominen, H. Teisala, J. Haapanen, J. Makela, J. Kuusipalo and M. Toivakka (2014). "Paper-based microfluidics: fabrication technique and dynamics of capillary-driven surface flow." ACS Appl Mater Interfaces **6**(22): 20060-20066.

Sourisseau, M., C. Schilte, N. Casartelli, C. Trouillet, F. Guivel-Benhassine, D. Rudnicka, N. Sol-Foulon, K. Le Roux, M. C. Prevost, H. Fsihi, M. P. Frenkiel, F. Blanchet, P. V. Afonso, P. E. Ceccaldi, S. Ozden, A. Gessain, I. Schuffenecker, B. Verhasselt, A. Zamborlini, A. Saib, F. A. Rey, F. Arenzana-Seisdedos, P. Despres, A. Michault, M. L. Albert and O. Schwartz (2007). "Characterization of reemerging chikungunya virus." PLoS Pathog **3**(6): e89.

Spicar-Mihalic, P., B. Toley, J. Houghtaling, T. Liang, P. Yager and E. Fu (2013). "CO₂-laser cutting and ablative etching for the fabrication of paper-based devices." Journal of Micromechanics and Microengineering **23**(6): 067003.

Strauss, J. H. and E. G. Strauss (1994). "The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution." Microbiol Rev **58**(3): 491-562.

Stroock, A. D., S. K. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. A. Stone and G. M. Whitesides (2002). "Chaotic mixer for microchannels." Science **295**(5555): 647-651.

Sun, S., Y. Xiang, W. Akahata, H. Holdaway, P. Pal, X. Zhang, M. S. Diamond, G. J. Nabel and M. G. Rossmann (2013). "Structural analyses at pseudo atomic resolution of Chikungunya virus and antibodies show mechanisms of neutralization." eLife **2**: e00435.

Suopanki, J., D. L. Sawicki, S. G. Sawicki and L. Kaariainen (1998). "Regulation of alphavirus 26S mRNA transcription by replicase component nsP2." (0022-1317 (Print)).

Swanick, K. N., S. Ladouceur, E. Zysman-Colman and Z. Ding (2012). "Bright electrochemiluminescence of iridium(III) complexes." Chem Commun (Camb) **48**(26): 3179-3181.

Tang, J., J. Jose, P. Chipman, W. Zhang, R. J. Kuhn and T. S. Baker (2011). "Molecular links between the E2 envelope glycoprotein and nucleocapsid core in Sindbis virus." (1089-8638 (Electronic)).

Tay, A., A. Pavesi, S. R. Yazdi, C. T. Lim and M. E. Warkiani (2016). "Advances in microfluidics in combating infectious diseases." Biotechnology advances **34**(4): 404-421.

Thayan, R., M. A. Yusof, Z. Saat, S. D. Sekaran and S. M. Wang (2016). "Molecular Epidemiology of Chikungunya Virus by Sequencing." (1940-6029 (Electronic)).

Thiberville, S. D., N. Moya, L. Dupuis-Maguiraga, A. Nougaiere, E. A. Gould, P. Roques and X. de Lamballerie (2013). "Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy." Antiviral Res **99**(3): 345-370.

Thom, N. K., G. G. Lewis, K. Yeung and S. T. Phillips (2014). "Quantitative Fluorescence Assays Using a Self-Powered Paper-Based Microfluidic Device and a Camera-Equipped Cellular Phone." RSC advances **4**(3): 1334-1340.

Thomas, L. J., Jr. and S. P. Bessman (1975). "Prototype for an implantable micropump powdered by piezoelectric disk benders." Trans Am Soc Artif Intern Organs **21**: 516-522.

Toley, B. J., B. McKenzie, T. Liang, J. R. Buser, P. Yager and E. Fu (2013). "Tunable-delay shunts for paper microfluidic devices." Analytical Chemistry **85**(23): 11545-11552.

Tripathi, N. K., R. Priya and A. Shrivastava (2014). "Production of recombinant Chikungunya virus envelope 2 protein in Escherichia coli." Appl Microbiol Biotechnol **98**(6): 2461-2471.

Tsai, T.-T., S.-W. Shen, C.-M. Cheng and C.-F. Chen (2013). "based tuberculosis diagnostic devices with colorimetric gold nanoparticles." Science and technology of advanced materials **14**(4): 044404.

Tsai, T. T., S. W. Shen, C. M. Cheng and C. F. Chen (2013). "Paper-based tuberculosis diagnostic devices with colorimetric gold nanoparticles." Sci Technol Adv Mater **14**(4): 044404.

Tsai, W. Y., H. H. Youn, C. Brites, J. J. Tsai, J. Tyson, C. Pedrosa, J. F. Drexler, M. Stone, G. Simmons, M. P. Busch, M. Lanteri, S. L. Stramer, A. Balmaseda, E. Harris and W. K. Wang (2017). "Distinguishing Secondary Dengue Virus Infection From Zika Virus Infection With Previous Dengue by a Combination of 3 Simple Serological Tests." Clin Infect Dis **65**(11): 1829-1836.

Tsai, Y. C., S. J. Yang, H. T. Lee, H. P. Jen and Y. Z. Hsieh (2006). "Fabrication of a flexible and disposable microreactor using a dry film photoresist." Journal of the Chinese Chemical Society **53**(3): 683-688.

Tsetsarkin, K. A., D. Vanlandingham, C. E. McGee and S. Higgs (2007). "A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential." (1553-7374 (Electronic)).

UNITAID and W. World Health Organization (2018). "INTEGRATED MANAGEMENT OF HIV, HCV, TB AND OTHER COINFECTIONS."

Urbaniak, S. and M. A. Greiss (1980). "ADCC (K-Cell) Lysis of Human Erythrocytes Sensitized with Rhesus Alloantibodies III. COMPARISON OF IgG ANTI-D AGGLUTINATING AND LYTIC (ADCC) ACTIVITY AND THE ROLE OF IgG SUBCLASSES." British journal of haematology **46**(3): 447-453.

Vashist, S. K., O. Mudanyali, E. M. Schneider, R. Zengerle and A. Ozcan (2014). "Cellphone-based devices for bioanalytical sciences." Analytical and Bioanalytical Chemistry **406**(14): 3263-3277.

Veigas, B., E. Fortunato and P. V. Baptista (2015). "Mobile based gold nanoprobe TB diagnostics for point-of-need." Methods Mol Biol **1256**: 41-56.

Veigas, B., J. M. Jacob, M. N. Costa, D. S. Santos, M. Viveiros, J. Inacio, R. Martins, P. Barquinha, E. Fortunato and P. V. Baptista (2012). "Gold on paper-paper platform for Au-nanoprobe TB detection." Lab on a chip **12**(22): 4802-4808.

Venturi, G., L. Zammarchi, C. Fortuna, M. E. Remoli, E. Benedetti, C. Fiorentini, M. Trotta, C. Rizzo, A. Mantella, G. Rezza and A. Bartoloni (2016). "Authors' reply: diagnostic challenges to be considered regarding Zika virus in the context of the presence of the vector *Aedes albopictus* in Europe." Euro Surveill **21**(10): 30163.

Voss, J. E., M. C. Vaney, S. Duquerroy, C. Vonnrhein, C. Girard-Blanc, E. Crublet, A. Thompson, G. Bricogne and F. A. Rey (2010). "Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography." Nature **468**(7324): 709-712.

Wahlberg, J. M., R. Bron, J. Wilschut and H. Garoff (1992). "Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein." (0022-538X (Print)).

Wallace, P. K., A. L. Howell and M. W. Fanger (1994). "Role of Fcγ receptors in cancer and infectious disease." Journal of Leukocyte Biology **55**(6): 816-826.

Wang, X., F. Li, Z. Cai, K. Liu, J. Li, B. Zhang and J. He (2018). "Sensitive colorimetric assay for uric acid and glucose detection based on multilayer-modified paper with smartphone as signal readout." Anal Bioanal Chem.

Wauquier, N., P. Becquart, D. Nkoghe, C. Padilla, A. Ndjoi-Mbiguino and E. M. Leroy (2011). "The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation." J Infect Dis **204**(1): 115-123.

Weaver, S. and M. Lecuit (2015). "Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease." (1533-4406 (Electronic)).

Weaver, S. C. and N. L. Forrester (2015). "Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread." Antiviral Research **120**: 32-39.

Werts, M. H., V. Raimbault, R. Texier-Picard, R. Poizat, O. Francois, L. Griscorn and J. R. Navarro (2012). "Quantitative full-colour transmitted light microscopy and dyes for concentration mapping and measurement of diffusion coefficients in microfluidic architectures." Lab Chip **12**(4): 808-820.

Wikan, N., P. Sakoonwatanyoo, S. Ubol, S. Yoksan and D. R. Smith (2012). "Chikungunya virus infection of cell lines: analysis of the East, Central and South African lineage." PLoS One **7**(1): e31102.

World Health Organization, W. (2009). Guidelines for prevention & control of Chikungunya Fever [Internet]. South-East Asia: World Health Organization; 2009 [cited 2015 Jan 15]. W. H. Organization. Internet, World Health Organization.

World Health Organization, W. (2011). "Increasing access to diagnostics through technology transfer and local production."

Wu, G. and M. H. Zaman (2012). "Low-cost tools for diagnosing and monitoring HIV infection in low-resource settings." Bulletin of the World Health Organization **90**(12): 914-920.

Wu, S. J., G. Grouard-Vogel, W. Sun, J. R. Mascola, E. Brachtel, R. Putvatana, M. K. Louder, L. Filgueira, M. A. Marovich, H. K. Wong, A. Blauvelt, G. S. Murphy, M. L. Robb, B. L. Innes, D. L. Birx, C. G. Hayes and S. S. Frankel (2000). "Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection." Nat Med **6**(7): 816-820.

Wu, Y., P. Xue, Y. Kang and K. M. Hui (2013). "Paper-Based Microfluidic Electrochemical Immunodevice Integrated with Nanobioprobes onto Graphene Film for Ultrasensitive Multiplexed Detection of Cancer Biomarkers." Analytical Chemistry **85**(18): 8661-8668.

Yadav, V. and V. Yadav (2015). "Challenging and oppourtunities of project ara." IT INTELLIGENCE INNOVATIONS-2015: 1.

Yager, P., G. J. Domingo and J. Gerdes (2008). "Point-of-care diagnostics for global health." Annu Rev Biomed Eng **10**: 107-144.

Yager, P., T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam and B. H. Weigl (2006). "Microfluidic diagnostic technologies for global public health." Nature **442**(7101): 412-418.

Yamada, K., T. G. Henares, K. Suzuki and D. Citterio (2015). "Paper-based inkjet-printed microfluidic analytical devices." Angewandte Chemie (International ed. in English) **54**(18): 5294-5310.

Yan, J., M. Yan, L. Ge, J. Yu, S. Ge and J. Huang (2013). "A microfluidic origami electrochemiluminescence aptamer-device based on a porous Au-paper electrode and a phenyleneethynylene derivative." Chem Commun (Camb) **49**(14): 1383-1385.

Yap, G., K. Y. Pok, Y. L. Lai, H. C. Hapuarachchi, A. Chow, Y. S. Leo, L. K. Tan and L. C. Ng (2010). "Evaluation of Chikungunya diagnostic assays: differences in sensitivity of serology assays in two independent outbreaks." PLoS neglected tropical diseases **4**(7): e753.

Yaseen, H., F. Simon, X. Deparis and C. Marimoutou (2012). "Estimation of lasting impact of a Chikungunya outbreak in Reunion Island." Epidemiol S2 **3**: 2161-1165.

You, D. J., T. S. Park and J. Y. Yoon (2013). "Cell-phone-based measurement of TSH using Mie scatter optimized lateral flow assays." Biosens Bioelectron **40**(1): 180-185.

Yu, L. and Z. Z. Shi (2015). "Microfluidic paper-based analytical devices fabricated by low-cost photolithography and embossing of Parafilm(R)." Lab Chip **15**(7): 1642-1645.

Zarei, M. (2018). "Infectious Pathogens Meet Point-of-Care Diagnostics." Biosensors and Bioelectronics.

Zeming, K. K., T. Salafi, S. Shikha and Y. Zhang (2018). "Fluorescent label-free quantitative detection of nano-sized bioparticles using a pillar array." Nat Commun **9**(1): 1254.

Zhang, M., L. Ge, S. Ge, M. Yan, J. Yu, J. Huang and S. Liu (2013). "Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence device for simultaneous detection of Pb²⁺ and Hg²⁺ based on potential-control technique." Biosens Bioelectron **41**: 544-550.

Zhang, Y., P. Zuo and B. C. Ye (2015). "A low-cost and simple paper-based microfluidic device for simultaneous multiplex determination of different types of chemical contaminants in food." Biosensors and Bioelectronics **68**: 14-19.

Zhao, W., M. M. Ali, S. D. Aguirre, M. A. Brook and Y. Li (2008). "Paper-based bioassays using gold nanoparticle colorimetric probes." Analytical Chemistry **80**(22): 8431-8437.

Zheng, M., H. Tan, Z. Xie, L. Zhang, X. Jing and Z. Sun (2013). "Fast response and high sensitivity europium metal organic framework fluorescent probe with chelating terpyridine sites for Fe³⁺." ACS applied materials & interfaces **5**(3): 1078-1083.

Zhong, Z. W., R. G. Wu, Z. P. Wang and H. L. Tan (2015). "An investigation of paper based microfluidic devices for size based separation and extraction applications." J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci **1000**: 41-48.

Zhu, W.-J., D.-Q. Feng, M. Chen, Z.-D. Chen, R. Zhu, H.-L. Fang and W. Wang (2014). "Bienzyme colorimetric detection of glucose with self-calibration based on tree-shaped paper strip." Sensors and Actuators B: Chemical **190**: 414-418.

Résumé

L'incidence des infections à arbovirus (*arthropod born virus*) a augmenté de façon spectaculaire au cours des dernières décennies dans les régions tropicales et subtropicales du globe, touchant des centaines de millions de personnes chaque année. Les virus de la dengue et du chikungunya sont transmis par les moustiques du genre *Aedes* et peuvent causer un large panel de symptômes, allant parfois jusqu'au décès. Bien que les tests de diagnostic conventionnels fournissent un diagnostic précoce des infections aiguës à arbovirus, l'accès à ces tests est souvent limité dans les pays en développement. Un diagnostic précoce et rapide est crucial pour améliorer la prise en charge du patient et réduire le risque de complications. Il y a donc un besoin urgent de développer des outils peu chers, simples d'utilisation, rapides, robustes, et utilisables auprès du patient. Les tests de diagnostic sur support papier (PAD) ont ces caractéristiques.

Dans un premier temps, un PAD imprimé à la cire a été développé et évalué pour la détection de la protéine Non Structurale 1 (NS1) de la dengue, dans du sang et du plasma. Le PAD a été en mesure de détecter spécifiquement 10 ng.mL^{-1} de protéines dans divers types d'échantillons, en 6 à 8 minutes. Par la suite, une version améliorée du PAD obtenue par découpe laser a été conçue et testée pour la détection de la protéine NS1 de la dengue et des IgM spécifiques du virus, dans le sang et le plasma. Ces deux paramètres ont pu être détectés en 8 minutes. Les travaux de mise au point du PAD effectués sur la dengue ont ensuite été appliqués à la détection des IgM du virus du chikungunya dans des sérums humains, en utilisant des Particules virales Pseudotypées (PPs). Ces antigènes synthétiques se sont avérés être des outils puissants pour la capture des IgM spécifiques. Les résultats obtenus ont montré une sensibilité de 70,6% et une spécificité d'environ 98% avec un temps d'obtention des résultats de moins de 10 minutes. Le PAD a montré peu de réactions croisées avec d'autres arboviroses. Les PPs ont enfin été caractérisées par différentes méthodes physico-chimiques dans le but de déterminer les éléments clef de leurs performances.

Le PAD pourrait être utilisé pour le diagnostic précoce de la dengue et du chikungunya, qui nécessitent des protocoles de gestion spécifiques pour les populations à risque.

Abstract

The incidence of arboviruses infections has increased dramatically in recent decades in tropical and sub-tropical areas worldwide, affecting hundreds of millions of people each year. Dengue and chikungunya viruses are typically transmitted by mosquitoes and can cause a wide range of symptoms, and sometimes death. Although conventional diagnostic tests can provide diagnosis of acute infections, access to these tests is often limited in developing countries. Early and prompt diagnosis is crucial to improve patient management and reduce the risk of complications. Consequently, there is an urgent need to develop affordable, simple, rapid, and robust tools that can be used at 'Point of Care' settings. Paper-based Analytical Devices (PAD) have these attributes.

Firstly, we developed and evaluated a PAD for the detection of the dengue Non Structural 1 (NS1) viral protein in blood and plasma samples. Experiments have been carried out to increase specificity, while maintaining the required sensitivity. The PAD was able to detect specifically 10 ng.mL^{-1} of NS1 protein in various sample types and in 6-8 minutes. Secondly, an improved version of the PAD obtained by laser cutting was designed and tested for the detection of dengue NS1 protein and virus-specific IgM in blood and plasma. Each parameter could be detected in 8 minutes. PAD development performed on dengue fever was then applied to the detection of chikungunya virus IgM in human sera, using viral Pseudo-Particles (PPs). These synthetic antigens have proven to be powerful tools for specific IgM detection. The results obtained showed a sensitivity of 70.6% and a specificity of approximately 98% with a time to results of less than 10 minutes. The PAD showed few cross reactions with other arboviruses. The PPs were finally characterized with different physico-chemical methods in order to determine the key factors of their performances.

The PAD could help health workers in the early diagnosis of tropical diseases such as dengue and chikungunya that require specific management protocols on risk populations.