



Université de Strasbourg
FACULTÉ DE PHARMACIE

N° d'ordre : 2491

MEMOIRE DE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

—

Le rôle des nanoparticules fluorescentes dans la détection des acides nucléiques en diagnostic *in vitro*

Présenté par
Théo MISLIN

Soutenue le 22/05/2024 devant le jury composé de

Pr. Béatrice Heurtault, Présidente du jury

Dr. Andreas Reisch, Directeur de thèse

Dr. Damien Reita, Membre du jury

Dr. Elisabete Silva, Membre du jury

Approuvé par le Doyen et
par le Président de l'Université de Strasbourg



Doyen	Esther ELLENBERGER
Directeurs adjoints	Julien GODET Béatrice NEESTAUZ Emilie SAN
Directeur adjoint étudiant	Lola FERREIRA-MOURAUX
Responsable administrative	Sacha NOUZY

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs :

Philippe	BOUCHER	Physiologie
Nathalie	BOULANGER	Parasitologie
Line	BOUREL	Chimie thérapeutique
Rémi	BOYER	Biophysique
Séif	ENNAHAR	Chimie analytique
Valérie	GEOFFROY	Microbiologie
Philippe	GEORGE	Bactériologie, Virologie
Béatrice	HEUSTAUZ	Pharmacie galénique
Esther	ELLENBERGER	Bio-informatique
Maxime	LEHANN	Biologie cellulaire
Eric	ARCHAMON	Chimie analytique
François	HEGOUIN	Droit en économie pharm.
Yves	HELF	Physique et Biophysique
Jean-Yves	INERT	Droit Economie pharm.
Françoise	POIN	Toxicologie
Valérie	SCHNEIDER	Pharmacologie
Florence	DOTI	Pharmacologie
Thierry	VANDAMME	Biophysique
Catherine	VAYTHYRON	Pharmacognosie
Rémi	WÉHILLÉ	Pharmacie galénique

Professeurs praticiens hospitaliers

Julien	GODET	Biostatistiques - science des données
Jean-Marc	LESURDIE	Biophysique
Bruno	MICHEL	Pharm. clinique santé publique
Fabrice	SOGLIO-SPRAUZI	Immunologie
Geneviève	USGAUD-SÉCURIER	Pharmacochimie

Enseignants contractuels

Alexandra	CHAMBERT	Pharmacie d'officine
Mathieu	POHED	Pharmacie d'officine
Philippe	GALAS	Droit en économie pharm.
Philippe	MAHÉ	Ingénierie pharmaceutique

Maîtres de Conférences :

Nicolas	AUTON	Pharmacie biogénérique
Farouk	BATTEL	Biophysique
Martine	BENJAMIN	Chimie analytique
Elise	BONABOUA	Biophysique
Aurélien	BOURDEAU	Pharmacochimie
Emmanuel	BOUTANT	Virologie et Microbiologie
Véronique	BRUBA	Physiologie et physiopath.
Anne	CAZET	Toxicologie
Thierry	CHATAIGNER	Pharmacologie
Hervé	CHER	Pharmacie biogénérique
Guillaume	CONJAT	Pharmacie galénique
Hassan	DE GORRE	Pharmacochimie
Jorge	DURANT	Biologie cellulaire
Guillaume	HAAN-ARCHEROFF	Recherches médicinales
Dillem	JACQUEMART	Cytochimie
Aïme	KARIM	Pharmacochimie
Sacha	MATZ-WEITHE	Pharmacologie
Nathalie	MEYERHOFFER	Pharmacologie
Jorge	ORTIZ AGUIRRE	Pharmacochimie
Sylvie	PERROTEY	Parasitologie
Scott	REITSCH	Chimie in flux
Frédéric	PRIVELLA	Biostatistiques
Samir	SALAH	Microbiologie
Stéphane	SEAL	Biophysique
Andreas	REICH	Biophysique
Ludivine	UFFALTI-VALLOU	Analyse du médicament
Carole	RODARI	Toxicologie
Emilie	SIC	Pharmacologie
Yasmina	SOUABOU	Pharmacochimie
Maria-Vittoria	SPANESSA	Chimie thérapeutique
Alimé	TERRAND	Physiopathologie
Nesrine	TOUNSI	Chimie physique
Aurélien	URBAN	Pharmacochimie
Bruno	SAN DIEGO DOP	Physiologie
Yolke	ZENOU	Chimie organique

Maîtres de conférences - praticiens hospitaliers

Aïme	BRUNET	Parasitologie
Nelly	ESPERRE-BELLUON	Pharmacologie - pharm. clinique
Vincent	GRÉ	Immunologie

Assistants hospitaliers universitaires

Abdelmalek	BENJAMIN	Production de médicaments anticancéreux
Naoum	FETT	Pharmacochimie
Samir	SETA	Biophysique

SERMENT DE GALIEN

JE JURE,

en présence des Maîtres de la Faculté,
des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens
et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit
dans les préceptes de mon art et de
leur témoigner ma reconnaissance en
restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique,
ma profession avec conscience et de respecter non
seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles
de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne dévoiler à personne les secrets
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,
que je sois moi-même honoré
et estimé de mes confrères
et de mes patients.



Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Mr Andreas Reisch pour le suivi de mon travail et pour ses conseils tout au long de la rédaction du mémoire. Votre expertise dans le domaine était une aide précieuse dans cet exercice.

Je remercie également Mme Béatrice Heurtault d'avoir accepté de présider le jury, ainsi que Mme Elisabete Silva et Mr Damien Reita pour évaluer mon travail. Merci pour l'intérêt que vous portez à ce sujet.

Merci à Hubert Meunier et à toute son équipe pour les années passées au sein de la pharmacie Meunier. Cette expérience était très formatrice pour moi et a grandement contribué à la réussite de mes études. Merci pour la confiance et pour le temps que vous m'avez accordé pendant ces cinq années.

Merci à mes parents pour m'avoir permis de réaliser ce parcours universitaire, pour m'avoir toujours accompagné et conseillé lors des moments de doute, ainsi que pour la confiance que vous m'accordez au quotidien. Les valeurs que vous m'avez transmises me permettent aujourd'hui de m'épanouir pleinement, professionnellement et personnellement.

Merci à ma grand-mère, l'un de mes plus grands soutiens depuis toujours. Merci pour les délicieux cookies, cakes, soupes et autres gourmandises que j'ai pu déguster chaque semaine pendant toutes mes études.

Merci à mes frères, mes cousins et à tous les autres membres de la famille pour tous ces moments si précieux qu'on a partagé depuis tant d'années.

Merci à mes amis, Mathieu, Thomas, Ludovic et Charlotte pour tous ces souvenirs de nos vies d'étudiants. Merci à Johanna pour m'avoir accompagné dans mon parcours à l'ESBS, tes conseils ont été une grande source d'inspiration. Merci à Guillaume, mon fidèle acolyte et frère de cœur, pour toutes nos aventures passées ensemble.

Enfin, merci à toi, Romane, de partager ma vie depuis tant d'années, pour ton soutien inconditionnel, pour tous nos projets passés et à venir et pour tout l'amour que tu me donnes au quotidien.

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	6
ABREVIATIONS.....	7
FIGURES ET TABLEAUX	8
INTRODUCTION	9
1. LES ACIDES NUCLEIQUES EN TANT QUE BIOMARQUEUR.....	11
1.1. BIOMARQUEURS.....	11
1.1.1. Définitions	11
1.1.2. Classification	11
1.2. LES ACIDES NUCLEIQUES	12
1.2.1. Définitions	12
1.2.2. Les ARNs non codants	13
1.2.3. Les micro-ARN comme biomarqueur en oncologie.....	15
2. LA DETECTION DES BIOMARQUEURS	18
2.1. LES DISPOSITIFS MEDICAUX DE DIAGNOSTIC <i>IN VITRO</i> (DMDIV)	18
2.1.1. Définitions réglementaires	18
2.1.2. Obtention du marquage CE	19
2.1.3. Classification des DMDIV.....	20
2.2. LES METHODES DE DIAGNOSTIC ACTUELLES	21
2.2.1. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	21
2.2.2. Rolling circle amplification	24
2.2.3. Séquençage	26
2.3. LIMITES ET DISCUSSION.....	28
3. LES NANOPARTICULES FLUORESCENTES : NOUVEL OUTIL POUR LA DETECTION D'ACIDES NUCLEIQUES SANS AMPLIFICATION	29
3.1. LES NANOPARTICULES	29
3.1.1. Définition	29
3.1.2. Classification	29
3.2. LA FLUORESCENCE	30
3.2.1. Le principe de la fluorescence	30
3.2.2. Diagramme de Jablonski.....	31
3.2.3. Förster Resonance Energy Transfert (FRET)	32
3.3. LES NANOPARTICULES FLUORESCENTES.....	33
3.3.1. Généralités	33
3.3.2. Exemples de nanoparticules fluorescentes organiques.....	35
3.4. LA FLUORESCENCE POUR LA DETECTION D'ACIDES NUCLEIQUE EN DIAGNOSTIC <i>IN VITRO</i>	36
3.4.1. Déplacement de séquences par compétition.....	37
3.4.2. Lateral-flow.....	41
3.4.3. Les balises moléculaires.....	44
CONCLUSION ET DISCUSSION	48
BIBLIOGRAPHIE.....	51

Abréviations

ADN – Acide Desoxyribo Nucléique (DNA en anglais)
ANSM – Agence Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARN- Acide Ribo Nucléique (RNA en anglais)
CCR – Cancer colorectal
Ct – Cycle Threshold (cycle seuil)
DMDIV – Dispositifs Médicaux de Diagnostic In Vitro
dNTP – désoxyribo nucleotide triphosphate
FDA – Food and Drug Administration
FRET – Transfert d’Energie par Résonance de Fluorescence
HAS – Haute Autorité de Santé
HC-FIA - Hybrid Capture Fluorescent Immunoassay
HDP - Hairpin DNA Probes
LOD – Limite de détection
NGS – Séquençage de nouvelle génération
NIH - National Institutes of Health
NP - Nanoparticule
PCR – Réaction de polymérisation en chaîne
PMMA - poly(méthyl methacrylate)
QD – Quantum Dots
RCA – Amplification en cercle roulant
RT-qPCR – Réaction de polymérisation en chaîne quantitative à transcription inverse
UCNP – Nanoparticule à conversion ascendante

Figures et tableaux

Figures :

Figure 1. Représentation schématique des molécules d'ADN et d'ARN	12
Figure 2. Classification des types d'ARN	14
Figure 3. Exemple de miARN prometteurs pour le diagnostic du cancer colorectal	16
Figure 4. Schéma représentatif de la réglementation des dispositifs médicaux selon le règlement 2017/745.	19
Figure 5. Représentation schématique des différents cycles de RT-qPCR.	22
Figure 6. Représentation de l'augmentation de l'intensité du signal de fluorescence lors d'une réaction RT-qPCR et détermination du « cycle seuil » Ct	23
Figure 7. Représentation simplifiée du mécanisme RCA.	24
Figure 8. Diagramme de Jablonski montrant les états d'énergie d'une molécule.	31
Figure 9. Mécanisme FRET	33
Figure 10. Représentation schématique de NP organiques.	34
Figure 11. Représentation schématique de NP de carbone.	34
Figure 12. Représentation schématique d'une NP polymérique chargée de fluorophores ioniques et de contre-ions.	36
Figure 13. Représentation schématique de la détection d'acides nucléique par déplacement de séquence.	37
Figure 14. Représentation schématique du système d'amplification du signal par un mécanisme de FRET	39
Figure 15. Schéma représentatif de la méthode de détection des miARN à partir d'une lignée cellulaire à l'aide des NP polymériques fonctionnalisées.	40
Figure 16. Représentation schématique d'un test lateral-flow standard (56).	42
Figure 17. Schéma du test lateral-flow pour détecter l'ARN du SARS-CoV-2.	43
Figure 18. Photo d'une bande contenant un échantillon positif (haut), faiblement positif (milieu) et négatif (bas).	44
Figure 19. Structure d'une balise moléculaire et son mécanisme de détection.	45
Figure 20. Représentation schématique de NP fonctionnalisées avec une sonde à ADN permettant la détection de miARN	46

Tableaux :

Tableau 1. Potentiels micro-ARN utilisés comme biomarqueurs diagnostique et pronostic en cancérologie	17
Tableau 2. Comparaison de la PCR, de la RT-PCR et de la RCA selon leurs principales caractéristiques	25
Tableau 3. Résumé des principales plateformes de séquençage de nouvelle génération.	26

Introduction

Le secteur du diagnostic *in vitro* est en plein essor depuis plusieurs années et son importance a notamment été démontrée lors de la pandémie du SARS-CoV-2. La détection et le dosage spécifique de séquences d'acides nucléiques représente une part importante du marché du diagnostic *in vitro* car ils permettent d'établir un diagnostic précoce et fiable de nombreuses pathologies. La prise en charge d'un patient repose sur le diagnostic clinique qui peut être confirmé par des résultats biologiques issus du diagnostic *in vitro*. Les secteurs de l'infectiologie pour l'identification d'un germe bactérien ou d'une souche virale, des pathologies cardiovasculaires pour l'identification de prédispositions génétiques associés à une augmentation des risques, ou encore de l'oncologie pour la caractérisation des mutations à l'origine de certains cancers sont concernés par l'utilisation de ces méthodes. Elles permettent de détecter et de quantifier des séquences spécifiques d'acides nucléiques pour orienter la prise en charge thérapeutique des patients. Parmi les acides nucléiques, les ARN non codants représentent un segment prometteur dans le domaine du diagnostic par leur diversité et leur spécificité dans certaines pathologies, notamment leur surexpression dans certains cancers colorectaux ou bronchiques. Aujourd'hui, plusieurs techniques de détection d'acides nucléiques existent sur le marché comme la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), l'amplification en cercle roulant (RCA) ou encore le séquençage. Elles présentent une sensibilité élevée et permettent d'obtenir des résultats fiables avec une limite de détection (LOD) faible. Ceci permet de détecter des dérégulations de certains biomarqueurs de manière très précoce, pouvant augmenter de manière significative la prise en charge du patient et l'efficacité des traitements.

Cependant, ces méthodes reposent généralement sur l'utilisation de marqueurs fluorescents peu brillants qui peuvent empêcher la détection d'un analyte faiblement concentré. Pour cela, la plupart des méthodes actuelles nécessitent une étape d'amplification pour augmenter la concentration de matériel génétique dans l'échantillon afin d'obtenir un signal détectable et quantifiable. Cette étape d'amplification complexifie les méthodes car elle doit être réalisée dans un laboratoire spécialisé, doté de matériel performant et de personnel qualifié. Cet environnement et ces contraintes entraînent un coût important et sont un frein à la réalisation d'analyses à haut débit. En effet, l'analyse répétée de plusieurs acides nucléiques simultanément sur une population importante est très complexe et coûteuse à mettre en œuvre aujourd'hui.

Récemment, de nouvelles solutions émergent et arriveront sur le marché dans les prochaines années notamment grâce à un nouvel outil, les nanoparticules fluorescentes. Elles permettent de s'affranchir de l'étape d'amplification en augmentant le signal émis à partir d'un seul fragment d'ADN ou d'ARN. De récentes études ont prouvé l'efficacité de ce principe dans le dosage de micro-ARN (miARN) avec un grand potentiel pour le diagnostic précoce de cancer.

Dans ce mémoire nous nous intéresserons au rôle de ces nanoparticules fluorescentes dans la détection d'acides nucléiques en diagnostic *in vitro*. Dans la première partie, nous examinerons le rôle des acides nucléiques en tant que biomarqueurs. Nous commencerons par définir les acides nucléiques, en mettant en lumière leur intérêt diagnostique. Nous explorerons également les miARN en tant que biomarqueurs, en particulier dans le domaine de l'oncologie. Dans un second temps nous nous intéresserons à la classification des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (DMDIV) ainsi qu'au cadre réglementaire pour leur mise sur le marché. Les avantages et les limites des méthodes actuelles de détection des acides nucléiques seront présentés. Enfin, dans la troisième partie, nous verrons comment les nanoparticules fluorescentes constituent un outil prometteur pour contourner les limites actuelles pour la détection des acides nucléiques. Nous commencerons par définir les nanoparticules et expliquerons leur classification, avant d'explorer les principes de la fluorescence et son utilisation dans la détection des acides nucléiques en diagnostic *in vitro*. Nous discuterons également des différentes stratégies utilisant les nanoparticules fluorescentes, telles que le déplacement de séquences par compétition, les tests de flux latéral et les balises moléculaires. Un exemple concret d'application sera détaillé pour chaque stratégie.

1. Les acides nucléiques en tant que biomarqueur

1.1. Biomarqueurs

1.1.1. Définitions

Les biomarqueurs sont essentiels à la fois pour le diagnostic biologique de pathologies, mais également pour la recherche et le développement de nouveaux médicaments. On entend par biomarqueur, selon la définition qui en est donnée par la Haute Autorité de Santé (HAS), elle-même inspirée de celle proposée par les « *National Institutes of Health* » (NIH), une « *caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique.* » (1). L'identification et l'analyse de ces biomarqueurs doit permettre, dans le cadre de la médecine dite « préventive, prédictive, personnalisée et participative », ou « 4P », de mieux cibler la stratégie thérapeutique aux caractéristiques du patient et de sa pathologie. (2). Il existe de nombreuses familles de biomarqueurs, chacune possédant des caractéristiques spécifiques selon leur contexte d'utilisation.

1.1.2. Classification

Afin de préciser et d'uniformiser le vocabulaire et les termes employés pour chaque type de biomarqueur, un groupe de travail commun entre la FDA et le NIH s'est formé pour créer un document en ligne, à destination du grand public, nommé BEST (3). Ce groupe de travail a permis de classer tous les biomarqueurs en 7 groupes distincts :

- Les **biomarqueurs diagnostics**, pour détecter ou confirmer la présence d'une pathologie ou pour identifier des individus avec un sous-type de pathologie.
- Les **biomarqueurs de monitoring**, mesurés de façon répétée pour évaluer le statut d'une pathologie, un état pathologique ou une preuve d'exposition à un médicament ou à un agent environnemental.
- Les **biomarqueurs de pharmacodynamie et de réponse**, pour montrer qu'une réponse biologique s'est produite chez un individu exposé à un composé ou traité par un médicament.
- Les **biomarqueurs prédictifs** pour identifier des individus qui sont plus à même de développer une réponse positive ou négative après une exposition à un composé par rapport à des individus qui ne possèdent pas ce biomarqueur.
- Les **biomarqueurs pronostics** pour évaluer la probabilité d'un événement, d'une récurrence ou d'une évolution pathologique.

- Les **biomarqueurs de sécurité**, mesurés avant ou après exposition à un médicament ou à un composé environnemental pour indiquer la probabilité, la présence ou la toxicité d'un effet indésirable
- Les **biomarqueurs de susceptibilité** pour indiquer la probabilité de développer une pathologie chez un individu qui n'a pour le moment aucune manifestation clinique de la pathologie.

Il existe de nombreux types de biomarqueurs : métabolites, protéines, anticorps ou acides nucléiques par exemple. Dans ce mémoire nous nous intéresserons principalement aux biomarqueurs diagnostics et aux biomarqueurs de monitoring de type acide nucléique.

1.2. Les acides nucléiques

1.2.1. Définitions

Les acides nucléiques sont les principales molécules qui contiennent l'information génétique et permettent leur transmission au fil des générations. Les structures des acides nucléiques et leurs mécanismes d'expression génétique ont été proposés dans les années 1950 par Francis Crick pour définir les deux mécanismes centraux : la transcription et la traduction (4). Les acides nucléiques sont des chaînes de nucléotides de différentes longueurs. La structure des nucléotides repose sur trois composants principaux : un sucre, un groupement phosphate et une base azotée (5) (voir Figure 1). Ils se subdivisent principalement en deux grandes catégories, l'ADN et l'ARN (respectivement DNA et RNA en anglais).

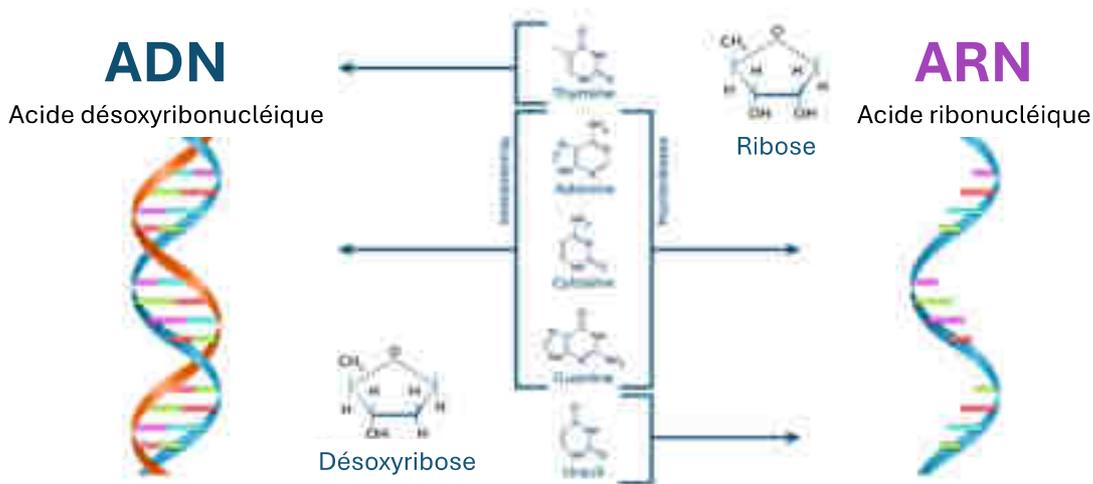


Figure 1. Représentation schématique des molécules d'ADN et d'ARN. Support de l'information génétique, ces molécules sont composées d'une base azotée, d'un sucre et un groupement phosphate. Elles se distinguent principalement par la nature de leur sucre. Adapté de (6).

Ces deux familles se différencient principalement par leur structure mais également par leur rôle. L'ADN assure le stockage de l'information génétique dans le noyau des cellules, il compose le génome des individus. L'ARN possède à lui seul de nombreux rôles, dont le principal est celui de messenger entre l'information génétique contenue dans les gènes et leur expression protéique, c'est l'ARN messenger (ARNm). Mais certains segments de l'ADN codent pour des ARN qui ne seront pas traduits en protéines, ce sont les ARN non codants. Dans ce mémoire, nous nous intéresseront principalement à ces ARN non codants et à leur intérêt majeur en diagnostic *in vitro*.

1.2.2. Les ARNs non codants

Outre les ARN codants pour des protéines représentés par les ARNm, il existe une autre famille d'ARN qui ne sont pas traduits en protéines, il s'agit des ARN non-codants (ARNnc). Longtemps sous-estimés, les ARNnc ont connu un regain d'intérêt considérable au cours des dernières années, en raison de leur très grand nombre et de leur fonction. Ils participent à la plupart des processus biologiques, depuis la réplication du matériel génétique et son expression dans la cellule, jusqu'au développement de l'organisme (7). Ils se distinguent principalement par leur taille, les petits ARNnc de moins de 200 nucléotides et les longs ARNnc de plus de 200 nucléotides.

Les petits ARNnc sont divisés en nombreuses sous familles avec des rôles bien définis (Figure 2) :

- Les micro-ARN (miARN)
- Les ARN interagissant avec les PIWI (ARNpi)
- Les ARN de transfert (ARNt)
- Les ARN ribosomiques (ARNr)
- Les petits ARN nucléolaires (ARNsno)
- Les petits ARN nucléaires (ARNsn)

Enfin, il existe la grande famille des longs ARNnc qui sont majoritairement des activateurs ou des répresseurs transcriptionnels.

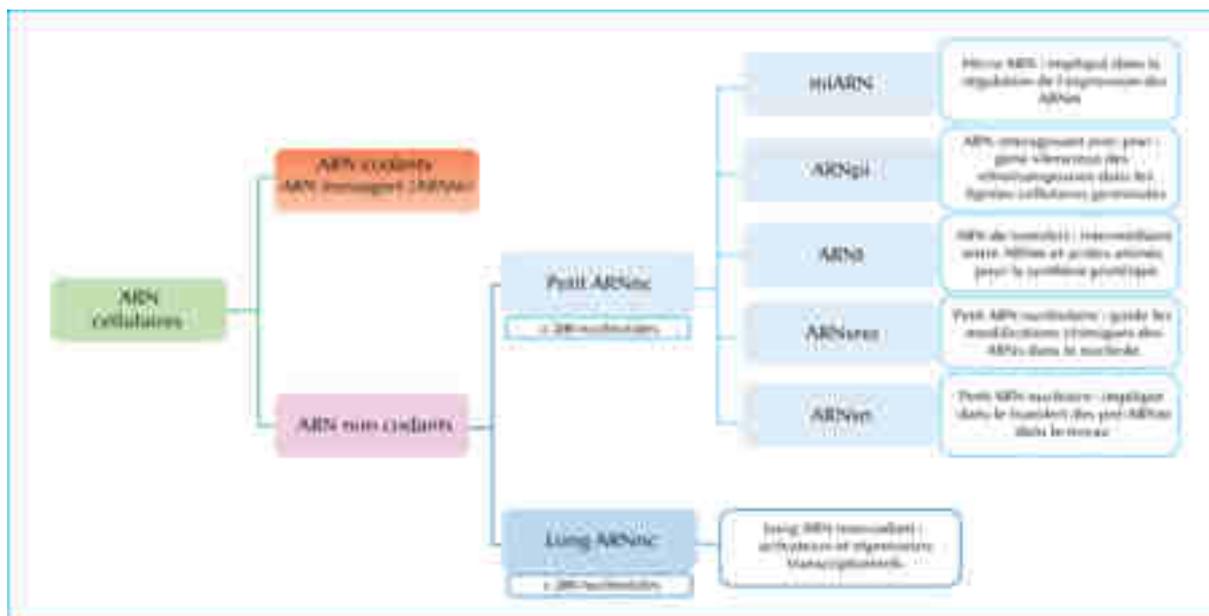


Figure 2. Classification des types d'ARN. Les ARN codants portent l'information génétique pour la synthèse des protéines. L'ARN messager (ARNm) est l'exemple le plus courant d'ARN codant. Les ARN non codants, quant à eux, n'ont pas de fonction directe dans la production de protéines, mais jouent des rôles essentiels dans la régulation de l'expression des gènes, la modification chimique de l'ARN et d'autres processus cellulaires (8).

Dans ce mémoire, nous nous intéresserons principalement à l'utilisation des miARN et l'intérêt croissant de leur dosage en diagnostic médical. Les miARN régulent environ 30% du génome au niveau post-transcriptionnel (9). L'un de leurs rôles est de réguler l'expression de l'ARNm pour réduire l'expression des gènes en inhibant la traduction des protéines ou en induisant le clivage de l'ARNm (10). La biogénèse des miARN repose sur de nombreux complexes protéiques servant à la reconnaissance, au transport et au clivage des ARN intermédiaires. Les modifications post-traductionnelles des protéines impliquées dans cette synthèse peuvent également affecter la production de miARN (11). Une dérégulation de la production de ces miARN peut donc être une conséquence d'une pathologie sous-jacente et un potentiel marqueur diagnostic.

Le premier miARN, lin-4, a été découvert en 1993 chez *C. elegans* (12). Cette séquence non codante de 22 nucléotides régule le développement post-embryonnaire chez *C. elegans* en réprimant l'expression de la protéine lin-14. À la suite de cette découverte, de nombreux autres miARN ont été référencés, on en compte aujourd'hui plus de 2000 avec une fonction précise dans l'organisme (13). Depuis quelques années, ces miARN ont été détectés dans de nombreux fluides biologiques (salive, sang, plasma, urine...) avec une forte stabilité, des méthodes d'extractions ont également été développées pour simplifier leur accès. Des bases de données sont aujourd'hui disponibles pour répertorier toutes les séquences et fonctions connues des miARN.

L'une des références est la base de données miRBase qui contient des séquences et des annotations de miARN publiées (14). Chaque entrée dans la base de données de la séquence miRBase représente une partie prédite d'une transcription miARN et des informations sur l'emplacement et la séquence de la séquence miARN mature. Parmi tous ces miARN, certains ont un intérêt majeur en diagnostic, notamment dans le domaine de l'oncologie.

1.2.3. Les micro-ARN comme biomarqueur en oncologie

Les connaissances sur la physiopathologie des cancers n'ont cessé d'évoluer au cours des dernières décennies, notamment à propos des mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN et les anomalies associées, mais ont également permis d'identifier des marqueurs diagnostic et pronostic par rapport à une thérapie (15). Ces informations sont cruciales en clinique pour déterminer avec précision le type de cancer et les potentielles résistances aux traitements médicamenteux. En tant qu'acteurs de la régulation de l'expression génétique, les miARN entrent dans la physiopathologie de nombreuses maladies multifactorielles, dont le cancer. Ils participent à la régulation de la majorité des processus cellulaires et des altérations dans leur niveau d'expression sont associées à de nombreuses pathologies et à de nombreux cancers.

Par exemple pour le cancer colorectal (CCR), les miARN ont été largement reconnus comme des candidats prometteurs pour son dépistage. Dans le cancer colorectal, la dérégulation des miARN est associée à différents stades cliniques et leur quantification permet d'évaluer la progression du cancer (Figure 3). Ces analyses peuvent être réalisées sur différents types d'échantillons biologiques, incluant le sang et les selles, constituant une méthode plus précise et non invasive pour les patients. Une étude a mis en évidence que plus de 100 miARN sont impliqués dans le cancer colorectal, environ 65% sont détectables dans le sang, 10% dans les selles et 25% dans les deux types d'échantillons (15).

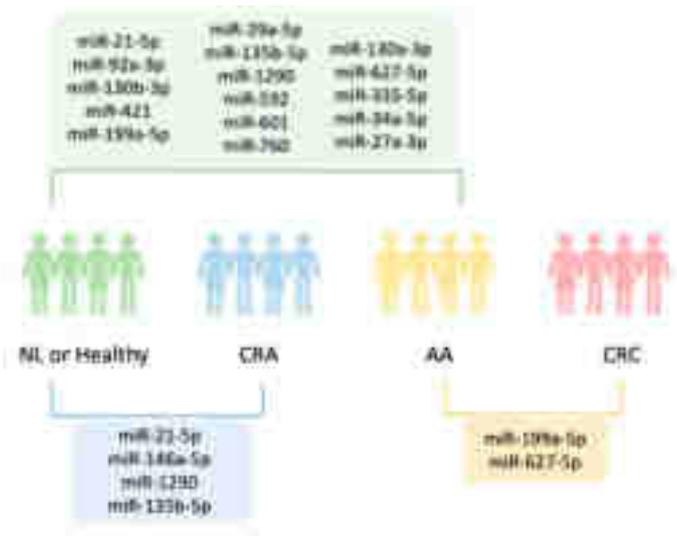


Figure 3. Exemple de miARN prometteurs pour le diagnostic du cancer colorectal. La présence plus ou moins importante de certains miARN permet de dresser un profil et d'estimer la progression du cancer. NL (pas de lésion) ; CRA (Adénome colorectal) ; AA (Adénome avancé) ; CRC (Cancer colorectal). (15)

Enfin, les chercheurs ont également montré que l'analyse de panels de plusieurs miARN simultanément offre la possibilité d'améliorer la précision par rapport à une analyse d'un miARN unique. Cette approche permet d'inclure des miARN impliqués dans différentes voies de signalisation, ce qui offre un moyen de surmonter les limites des méthodes actuelles de dépistage du CCR.

Aujourd'hui, leur détection est complexe car les méthodes actuelles ne permettent pas de les doser avec précision du fait de leur caractéristiques uniques comme leur petite taille, leur faible abondance et la similarité de séquence entre les membres de la famille. En effet la petite taille des miARN complique l'utilisation de la PCR car les amorces utilisées ont une longueur similaire aux miARN, il faut utiliser des amorces plus courtes et donc moins spécifiques (16). Par ailleurs, les miARN ne représentent qu'une petite fraction (environ 0,01%) de la masse de l'échantillon d'ARN total. La concentration de miARN dans les cellules peut être très faible et ne représenter que quelques molécules par cellule. La faible abondance nécessite un test très sensible, tandis que la grande similarité de séquence entre les membres de la famille rend la détection spécifique plus difficile (17). Enfin, le niveau d'expression des miARN varie de 4 ordres de grandeur, de quelques copies à plus de 50 000 copies par cellule. Une large gamme de détection est donc nécessaire pour le dosage des miARN.

Cancer type	miRNA	Diagnostics	Sample type	Detection method
Colorectal adenoma or polyps	miR-21	down	serum	qRT-PCR
Colorectal cancer (CRC)	miR-21a-3p, miR-27b-3p, miR-17a-3p, miR-17-3p, miR-10b-3p, miR-15b-3p and miR-148-3p the ratio between miR-21/10b and miR-22/136 (14)	up	plasma	qRT-PCR
Cervical cancer	miR-21	up	cellular specimens	Northern blot and TaqMan real-time PCR assays
Gastric cancer	miR-99b-3p	down	stoma and serum	qRT-PCR
Human breast cancer	miR-221-3p	up	plasma, exosomes	TaqMan real-time
Osteosarcoma	miR-21, miR-221 and miR-141-3p	up	serum exosomes	qRT-PCR
Head cancer	miR-14-3p	up	blood	microchemical immunoassay
Lung cancer	miR-21a-3p and miR-10b-3p	down	stoma and blood	qRT-PCR
Prostate cancer	miR-21	down	cell lines	qRT-PCR
Hepatocellular carcinoma (HCC)	miR-221	up	cell lines, serum, and plasma	qRT-PCR
Oral squamous cell carcinoma (OSCC)	miR-221-3p and miR-222-3p / miR-21-3p	down/up	plasma	qRT-PCR
Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)	miR-92-3p, miR-141-3p, miR-124-3p, miR-134-3p, miR-135b-3p, miR-137-3p and miR-146a-3p	up	serum, cell lines, exosomes	qRT-PCR
Primary central nervous system lymphoma (PCNSL)	miR-21, miR-146a and miR-145a	up	cerebrospinal fluid (CSF)	RT-qPCR
Gastric cancer (GC)	miR-21a-3p	up	serum	RT-qPCR
Cervical cancer (CC)	miR-125b-3p	up	serum and cell lines	miRNA immunoassay and RT-qPCR

Tableau 1. Potentiels micro-ARN utilisés comme biomarqueurs diagnostique et pronostic en cancérologie. (14)

La recherche de nouveaux biomarqueurs en cancérologie est un axe de recherche très étudié ces dernières années, notamment pour la recherche de nouveaux miARN d'intérêt. Le Tableau 1 indique plusieurs exemples de miARN potentiellement impliqués dans la régulation de différents types de cancers, indiquant que leur suivi peut présenter un intérêt informatif sur la progression de la pathologie. On remarque que de nombreux types de cancers sont concernés, ainsi que différents types d'échantillons comme des cellules, du tissu, du plasma, du sérum ou du sang complet. Aujourd'hui, l'analyse et la quantification des miARN ne sont que très peu utilisées en clinique, il s'agit pour la plupart de projets de recherche ou de résultats d'études cliniques. Cependant, certaines méthodes de diagnostic *in vitro* ont déjà été validées notamment pour les séquences d'acides nucléiques actuellement détectées par RT-qPCR en utilisant une sonde TaqMan (14).

Pour exploiter pleinement le potentiel des biomarqueurs, il est nécessaire de disposer de dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (DMDIV) performants et fiables. La combinaison des biomarqueurs et des DMDIV offre un potentiel immense pour améliorer les soins de santé, en permettant un diagnostic plus rapide, plus précis et plus personnalisé, tout en ouvrant la voie à des approches thérapeutiques plus ciblées et plus efficaces.

2. La détection des biomarqueurs

L'identification et la méthode de détection d'un biomarqueur sont les prérequis à la mise au point d'un test diagnostique. Cependant, afin qu'un test puisse être réalisé à grande échelle et que les résultats obtenus puissent être utilisés en clinique, il est nécessaire de l'intégrer dans un dispositif médical de diagnostic *in vitro* (DMDIV) conforme à la réglementation en vigueur.

2.1. Les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (DMDIV)

2.1.1. Définitions réglementaires

Le terme dispositif médical de diagnostic *in vitro* (DMDIV) possède un champ d'application très large. En Europe, c'est le parlement européen qui édicte les principales dispositions pour les pays membres de l'union. Il a d'ailleurs publié en avril 2017 le règlement 2017/746 relatif aux DMDIV (Figure 4).

Dans ce document on entend par dispositif médical de diagnostic *in vitro*, « tout dispositif médical qui consiste en un réactif, un produit réactif, un matériau d'étalonnage, un matériau de contrôle, une trousse, un instrument, un appareil, un équipement, un logiciel ou un système, utilisé seul ou en association, destiné par le fabricant à être utilisé *in vitro* dans l'examen d'échantillons provenant du corps humain, y compris les dons de sang et de tissus, uniquement ou principalement dans le but de fournir des informations sur un ou plusieurs des éléments suivants:

- Concernant un processus ou état physiologique ou pathologique
- Concernant des déficiences congénitales physiques ou mentales
- Concernant la prédisposition à une affection ou à une maladie
- Permettant de déterminer si un traitement donné est sûr pour des receveurs potentiels et compatible avec eux
- Permettant de prévoir la réponse ou les réactions à un traitement
- Permettant de définir ou de contrôler des mesures thérapeutiques »

Ce texte réglementaire a pour but de revoir le fond de la législation pour établir un cadre commun pour le développement et l'utilisation de ces dispositifs médicaux en garantissant un niveau de sécurité et de protection suffisant. Il remplace et abroge la réglementation précédente dictée par la directive 98/79/CE.

C'est dans ce contexte que le droit français s'est récemment adapté avec l'ordonnance n°2022-1086 du 29 juillet 2022 pour intégrer au nouveau cadre qui vise à renforcer la sécurité et à prendre en compte les développements technologiques dans le secteur des DMDIV. Le calendrier du nouveau règlement européen s'étale sur 10 ans pour les dispositifs médicaux de manière générale, mais se concentre de mai 2017 pour la publication du règlement jusqu'à mai 2025 pour la fin de mise à disposition des DMDIV sous directive 98/79/CE.



Figure 4. Schéma représentatif de la réglementation des dispositifs médicaux selon le règlement 2017/746. Il établit des normes de sécurité et de qualité pour les DMDIV commercialisés dans l'Union européenne. Le règlement renforce les procédures d'évaluation et de certification des dispositifs médicaux. Ce texte définit les responsabilités des fabricants, des importateurs et des distributeurs dans la mise sur le marché des dispositifs médicaux (Schéma par ISOcèle Médical).

2.1.2. Obtention du marquage CE

En France c'est le marquage « CE » apposé par le fabricant qui est le garant de la conformité des dispositifs médicaux avec ce cadre européen. C'est une procédure beaucoup plus simple que celle de l'autorisation de mise sur le marché requise pour les médicaments. Pour obtenir ce marquage CE, le fabricant doit apporter la preuve documentaire permettant de démontrer la qualité et la sécurité de son dispositif. Un organisme indépendant peut intervenir dans ce processus pour évaluer la conformité et le système qualité du fabricant afin de délivrer un certificat de conformité nécessaire pour apposer le marquage CE. Une fois sur le marché, c'est le fabricant qui doit s'assurer de ses performances et de sa sécurité, et prendre des mesures préventives ou correctives si besoin. (18).

2.1.3. Classification des DMDIV

La classification des dispositifs médicaux est régie par l'annexe VIII du règlement européen 2017/746 « règles de classification ». Les DMDIV sont répartis en quatre classes de dispositifs allant de A à D en classant les dispositifs du moins à risque au plus à risque. Seules les classes B, C et D ainsi que les classes A stériles nécessitent une évaluation par un organisme notifié pour obtenir le marquage CE.

Les DMDIV de classe D sont destinés à être utilisés pour la détection de la présence d'un agent transmissible ou de l'exposition à un tel agent dans les liquides biologiques pour évaluer s'ils sont propres à être utilisés en transfusion ou en transplantation. Ils peuvent aussi permettre la détection d'un agent transmissible causant une maladie qui met en danger la vie du patient avec un risque de propagation élevé ou présumé élevé. Enfin, ils permettent également de déterminer la charge virale d'une maladie lorsqu'un suivi est essentiel pour la prise en charge du patient.

Les dispositifs de classe C sont destinés à être utilisés pour déterminer les groupes sanguins ou tissulaires afin d'établir une compatibilité immunologique (à l'exception des marqueurs ABO, Rhésus, Kell, Kidd et Duffy). Ils sont aussi destinés à la détection d'agents sexuellement transmissible, d'agents infectieux ne présentant pas un risque de propagation élevé ou s'il existe un risque important qu'un résultat erroné entraîne la mort de l'individu. Ils sont également utilisés pour le diagnostic prénatal de certaines pathologies congénitales, pour évaluer le stade d'une maladie ou dépister un cancer. L'analyse génétique humaine, la surveillance des niveaux de médicaments lorsqu'elle influence la prise en charge thérapeutique et les tests compagnons font également partie de cette classe de dispositifs. Enfin, tous les dispositifs destinés à l'autodiagnostic relèvent de la classe C, à l'exception des tests de grossesse et de fertilité ainsi que des bandelettes urinaires qui appartiennent à la classe B.

Les dispositifs de classe A sont des produits à usage général de laboratoire, les accessoires n'ayant pas de caractéristiques critiques, des solutions tampons ou de nettoyage, des milieux de cultures, des colorants destinés à un examen spécifique, ainsi que les instruments nécessaires à la réalisation des procédures de diagnostic.

Tous les autres dispositifs relèvent de la classe B ainsi que tous les dispositifs destinés à des contrôles sans valeur quantitative ou qualitative. Dans le cas où un dispositif répondrait à plusieurs règles, c'est la règle la plus contraignante qui s'applique.

Dans ce mémoire, les DMDIV étudiés ont principalement pour but de détecter la présence d'acides nucléiques dans des échantillons biologiques à des fins diagnostic pour confirmer la présence d'une pathologie ou obtenir des informations sur son évolution. De ce fait, ces DMDIV appartiennent à la classe D du règlement européen 2017/746.

2.2. Les méthodes de diagnostic actuelles

Les tests de diagnostic moléculaire sont basés sur la détection de séquences génétiques d'un agent pathogène ou d'une séquence génétique à l'origine d'une pathologie, présente dans un échantillon biologique. De nos jours, il existe de nombreuses méthodes de détection et de dosage d'acides nucléiques pour des applications de biologie médicale ou d'identification génétique. Chaque méthode présente des avantages spécifiques en termes de sensibilité, de spécificité, de rapidité et de coût, ce qui permet leur adaptation à divers besoins diagnostiques. En combinant ces techniques avancées, les professionnels de la santé et les chercheurs peuvent obtenir des informations précieuses sur la composition des acides nucléiques dans les échantillons biologiques étudiés. Nous nous intéresserons principalement à la PCR, à la RCA et au séquençage, principales méthodes utilisées pour la détection des miARN.

2.2.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est une méthode de diagnostic qui repose sur une amplification en chaîne par polymérisation. Développé par Kary Mullis en 1983, elle a mené à l'obtention du prix Nobel de chimie en 1993 et a révolutionné la biologie moléculaire, notamment dans le secteur du diagnostic (19). Elle présente trois principaux avantages, c'est une méthode rapide, sensible et robuste. Le principe général est de réaliser une succession de cycle de répllication pour amplifier une matrice double brin d'ADN de manière exponentielle afin de pouvoir la détecter. Cette réaction d'amplification comporte plusieurs paliers de température qui correspondent chacun à une phase précise de la réaction. Cet enchainement est géré de manière automatique par un thermocycleur qui permet de réaliser des analyses en séries et en grande quantité. La composition du milieu réactionnel est essentielle pour le bon déroulement de la réaction. Il est composé de dNTP, de magnésium, d'une ADN polymérase, d'une amorce sens et d'une amorce anti-sens. L'ADN à amplifier est ensuite ajouté au mélange pour démarrer la réaction (20).

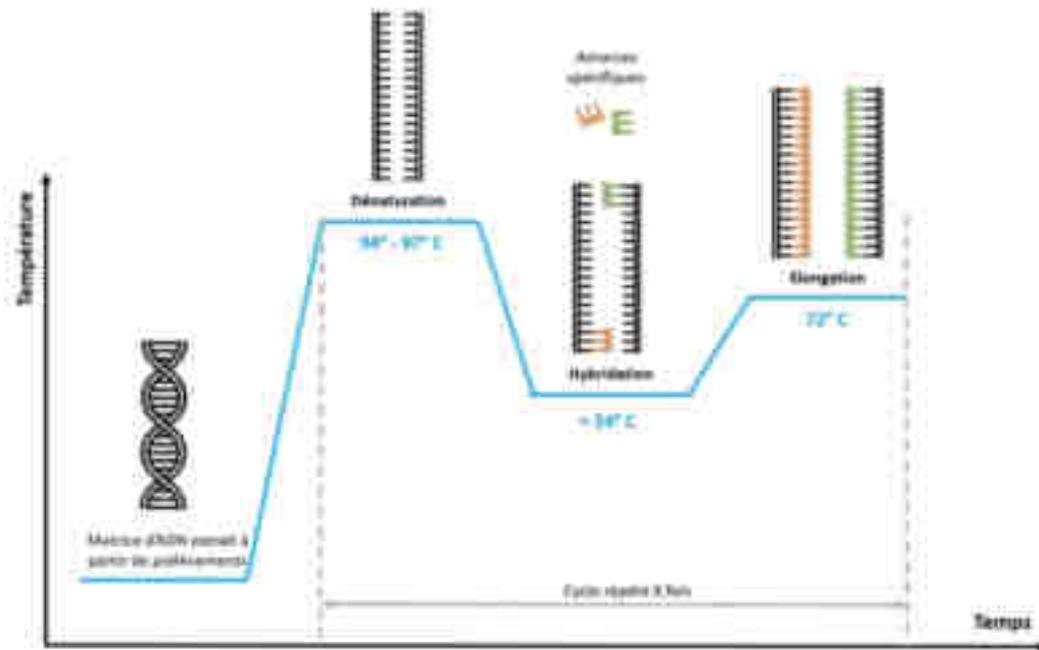


Figure 5. Représentation schématique des différents cycles de RT-qPCR. Le cycle de PCR comprend trois étapes principales : la dénaturation où l'ADN double brin est chauffé pour séparer les brins, l'hybridation où des amorces d'ADN spécifiques se lient à la séquence cible et l'extension où une enzyme ADN polymérase synthétise de nouveaux brins d'ADN complémentaires à partir des amorces. Ces cycles se répètent plusieurs fois, doublant ainsi la quantité d'ADN cible à chaque cycle. (20)

Les 3 phases réactionnelles sont présentées sur la Figure 5. La première phase est la phase de dénaturation qui permet de séparer les brins d'ADN en rompant les liaisons hydrogènes entre les nucléotides. La phase d'hybridation est réalisée à plus basse température pour permettre la reconnaissance et l'appariement des amorces avec les brins matrices. Cette température se situe entre 50 et 60°C en fonction de la composition et de la taille des amorces utilisées. Enfin l'étape d'élongation ou de polymérisation est réalisée à la température idéale de fonctionnement de l'ADN polymérase utilisée. Il existe de nombreuses polymérases naturelles sur le marché avec chacune des caractéristiques bien précises (21). En effet, chaque année de nombreux fournisseurs proposent de nouvelles versions de polymérases génétiquement modifiées pour mettre en avant des caractéristiques spécifiques telles que la haute-fidélité, la vitesse de polymérisation, la température de réaction, l'activité exonucléase par exemple.

Il existe plusieurs variantes de PCR en fonction du but recherché, cependant la plus répandue est la quantitative PCR (qPCR), également appelée PCR en temps réel. Cette méthode est désormais connue par le grand public suite à son utilisation massive pour le dépistage du SARS-CoV-2 (22). Contrairement à la PCR conventionnelle qui permet de détecter la présence d'ADN amplifié sur un gel d'agarose, elle permet de quantifier en temps réel l'ADN présent dans un échantillon biologique grâce à un marqueur fluorescent (23).

Il existe plusieurs types de marqueurs, les agents intercalants qui fixent l'ADN double brins ou la nouvelle génération de sondes TaqMan® qui permet l'émission de fluorescence grâce à l'activité exonucléases de la polymérase.

L'intensité du signal de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié. En connaissant le nombre de cycle, il est possible de déterminer la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon. A noter que cette technologie peut être appliquée pour la détection et la quantification d'ARN en ajoutant une étape de transcription inverse, cette méthode est appelée quantitative PCR à transcription inverse (RT-qPCR). Cette quantification repose sur plusieurs paramètres, notamment la ligne de base qui correspond au bruit de fond de fluorescence et la ligne seuil à partir de laquelle la variation de fluorescence est exponentielle. On peut donc définir un cycle seuil à partir duquel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond (Figure 6).

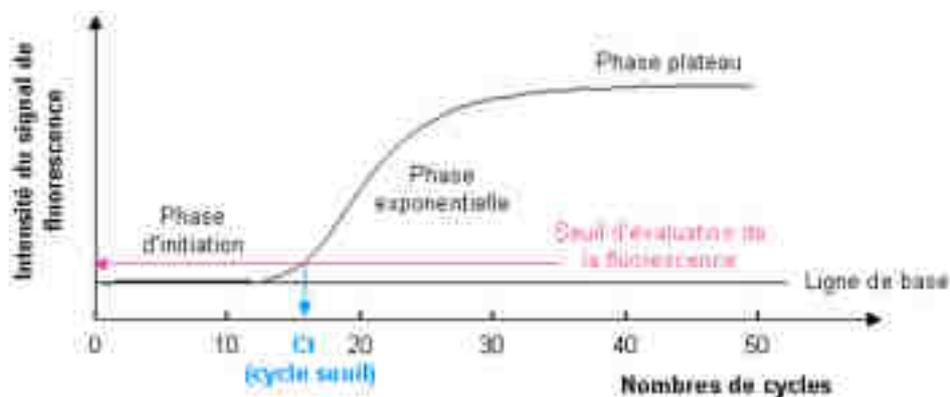


Figure 6. Représentation de l'augmentation de l'intensité du signal de fluorescence lors d'une réaction RT-qPCR et détermination du « cycle seuil » Ct. (24)

Au début de la qPCR, lors de la phase d'initiation, la fluorescence mesurée sera très faible. Si la fluorescence provient d'un agent intercalant, alors le petit nombre de molécules d'ADNdb marqués ne permettra pas d'obtenir un signal mesurable. De même si des sondes TaqMan sont utilisées, la plupart de ces amorces seront éteintes. Pendant la phase exponentielle de réplication d'ADN, la fluorescence commencera à augmenter linéairement à partir d'un certain nombre de cycle. Le point spécifique où la fluorescence est clairement mesurable est appelé le cycle de seuil (Ct). Enfin, plus le cycle seuil est faible, plus la concentration d'ADN initiale est élevée car le nombre de cycle pour amplifier l'ADN de manière significative est faible. A la fin de la réaction, la fluorescence finit par atteindre un plateau et cesse d'augmenter. Cela est dû à l'épuisement des matières premières présentent dans le milieu réactionnel pour la production d'ADN, comme les dNTP (19).

Afin de pouvoir comparer les quantités d'ADN présentes dans un échantillon, il est possible d'y ajouter une séquence de référence, de concentration connue, pour analyser la différence de cycle seuil avec la séquence contenue dans l'échantillon et déterminer sa concentration. Cette méthode est aujourd'hui appliquée en routine dans les laboratoires de biologie médicale pour le diagnostic d'un grand nombre de pathologies.

2.2.2. Rolling circle amplification

La méthode appelée *rolling circle amplification* (RCA, « amplification en cercle roulant ») est un procédé enzymatique isotherme qui permet d'obtenir un segment d'ADN simple brin contenant une séquence cible de manière répétée (25). Le principe de base de la méthode RCA repose sur l'utilisation d'une amorce d'oligonucléotide complémentaire à une séquence spécifique d'une matrice d'ADN circulaire. L'ADN polymérase est ensuite utilisée pour initier la synthèse de l'ADN à partir de cette amorce et amplifier la séquence. Ce processus de synthèse et d'hybridation se poursuit en boucle, générant ainsi une concatémère linéaire d'ADN composée de multiples copies de l'ADN cible (26).

Quatre composants sont nécessaires à la réaction RCA :

- une ADN polymérase
- une amorce d'ADN ou d'ARN relativement courte
- une matrice circulaire
- des désoxynucléotides triphosphates (dNTP).

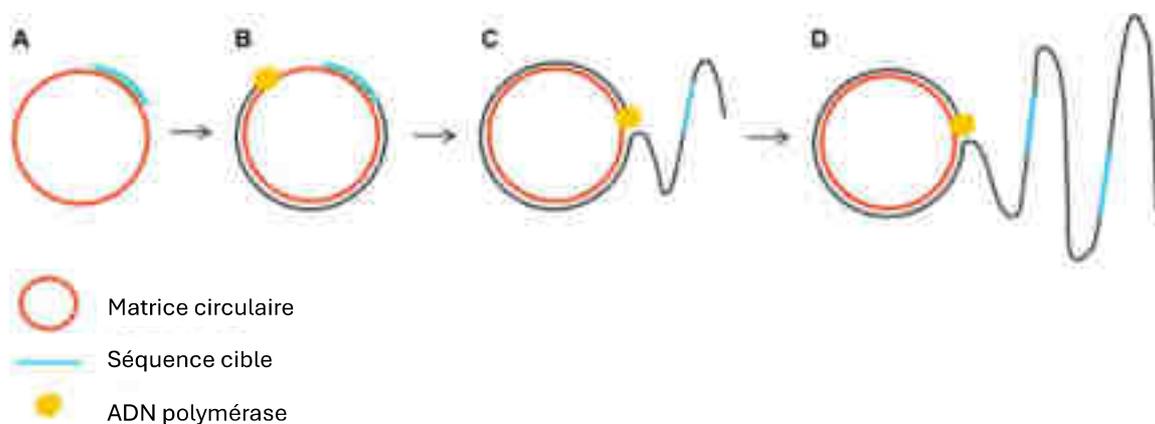


Figure 7. Représentation simplifiée du mécanisme RCA. (A) Une amorce complémentaire s'hybride à une séquence spécifique de la matrice d'ADN circulaire, (B) l'ADN polymérase démarre la synthèse du brin complémentaire, (C) Déplacement du brin complémentaire et poursuite de la synthèse, (D) Obtention d'un ADN simple brin à motif répété. Schéma adapté selon (27).

L'amplification en cercle roulant peut être réalisée en présence de nucléotides marqués ou de sondes spécifiques qui permettent la détection du produit amplifié (28). Les marqueurs peuvent être des fluorophores, des enzymes ou d'autres molécules qui permettent de visualiser le signal amplifié. Une fois l'amplification terminée, le produit RCA peut être analysé par diverses méthodes de détection, telles que l'électrophorèse sur gel, la fluorescence, la spectrophotométrie ou la microscopie à fluorescence (27).

La méthode RCA présente plusieurs avantages. Tout d'abord, elle permet d'amplifier l'ADN de manière isotherme, ce qui élimine la nécessité d'une étape de thermocyclage utilisée dans les techniques d'amplification telles que la PCR. De plus, la méthode RCA peut être utilisée pour détecter des séquences d'ADN spécifiques, notamment dans le diagnostic moléculaire, la génomique, la détection de pathogènes et la recherche en biologie cellulaire (25).

Features	Conventional PCR Assay	Real Time-PCR Assay	RCA Assay
Sensitivity	Sensitive	Highly sensitive	Highly sensitive
Specificity	Specific	Specific	Specific
Temperature conditions	Thermal cycle	Thermal cycle	Isothermal
Inhibition by biological samples	Yes	Yes	No
Instruments required	Thermocycler	Thermocycler	Not required
Post-assay analysis	Required	Required	Generally not required
Amplification detection methods	Gel electrophoresis	Real-time detection/ amplification graph	Gel electrophoresis, Turbidity measurement by visual inspection or using a real-time turbidimeter, dye-based visual detection
Qualitative detection	Yes	Yes	Yes
Quantitative detection	No	Yes	Semi-quantitative
Portability	Partially	Yes	Yes
Overall assay time	3-5h	25-4h	1-1.5h
Cost effectiveness	Low expensive	Expensive	Low expensive

Tableau 2. Comparaison de la PCR, de la qPCR (real time-PCR) et du la RCA selon leurs principales caractéristiques. (29)

Le Tableau 2 permet de comparer les principales caractéristiques de la PCR conventionnelle, de la qPCR et de la RCA. Les principaux points communs entre ces méthodes sont la nécessité d'une étape d'amplification du matériel génétique, la haute sensibilité et spécificité. En revanche, la RCA se démarque de la PCR par ses conditions expérimentales avantageuses qui lui permet de s'affranchir de l'utilisation du thermocycleur la rendant plus mobile. De plus on remarque que le temps moyen de réaction est beaucoup plus faible pour la RCA, environ 50% plus rapide que la PCR.

Cependant, bien que cette méthode semble être une alternative à la PCR, elle reste difficile à mettre en œuvre et nécessite de nombreuses étapes expérimentales. C'est la raison pour laquelle ce principe d'amplification est utilisé majoritairement à des fins de recherche.

2.2.3. Séquençage

Le séquençage de l'ADN est une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci (30). Étant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque individu, la séquence de l'ADN permet de nombreuses applications dans le domaine de la médecine, du diagnostic, des études génétiques, de la criminologie, de la compréhension de mécanismes physiopathologiques ou de la synthèse de médicaments (31). Nous nous intéresserons principalement aux mécanismes impliqués dans la détection d'acides nucléiques pour le diagnostic médical. Il existe plusieurs techniques de séquençages qui ont évoluées au fil du temps. Le développement rapide de la technologie de séquençage de nouvelle génération (NGS) a facilité sa large application clinique dans la médecine de précision. Les avantages de la NGS par rapport aux méthodes de séquençage traditionnelles sont notamment un débit plus élevé, une plus grande sensibilité, un délai d'exécution plus rapide et un coût plus faible (32). La NGS représente une véritable révolution technologique du séquençage après le séquençage Sanger. Le séquençage du premier génome humain à l'aide du séquençage de Sanger a nécessité de nombreuses années et des milliards de dollars mais avec l'émergence du NGS, un génome humain complet peut désormais être séquencé en quelques jours pour moins de 1 000 dollars (33). Le Tableau 3 ci-dessous résume les principales méthodes de séquençage NGS et leurs caractéristiques.

Company	Platform	Sequencing mechanism	Read length	Output/Run time
Illumina	GS FLX	Pyrosequencing	Up to 1,000 bp	700 reads/23 hr
Roche/454 Life Technologies/Toronto	PGM	Detection of hydrogen ion	Up to 400 bp	Up to 4 Gb/day (PGM110)
Nanopore	NGS	Reversible terminator	Up to 700 bp	Up to 15 Gb/24 hr
	HiSeq 2500		Can be up to 250 bp	60 hrs for up to 300 Gb (read mode)
	HiSeq 4000		Can be up to 150 bp	Up to 2.5 Tb/2 days
	Nanopore		150 bp	Up to 1,000 Gb/24 hr
Pacific Biosciences	Single	Real-time	10-15 kb (average)	20 Gb/day
Oxford Nanopore	Nanopore	Real-time	Largest read > 2 Mb	Up to 10 Gb/24 hr

Abbreviations: PGM, first generation sequencing; GS, genome sequencing; PCR, polymerase chain reaction.

Tableau 3. Résumé des principales plateformes de séquençage de nouvelle génération. (33).

Parmi ces méthodes de séquençage de nouvelle génération, plusieurs d'entre elles utilisent la fluorescence comme moyen de détection comme les méthodes Illumina® ou Pacific Biosciences®. Dans la méthode Illumina®, après la phase d'amplification, le séquençage se déroule par cycles avec une ADN polymérase modifiée et quatre nucléotides spécifiques. Ces nucléotides sont marqués avec un groupe rapporteur fluorescent clivable chimiquement à l'extrémité 3'-OH qui permet l'incorporation d'une seule base à chaque cycle. A chaque cycle, une seule base sera incorporée et le rapporteur fluorescent sera clivé pour permettre l'identification du nucléotide ajouté (34). La méthode de détection dans le séquençage Sequel de Pacific Biosciences® est proche de la précédente. Cette technologie utilise également des nucléotides contenant un label fluorescent, mais contrairement à la méthode précédente ils sont présents sur la chaîne phosphate du nucléotide. Ainsi, les nucléotides incorporés sont détectés sur la base du fluorophore associé qui est libéré et dissipé lors du clivage de la chaîne du phosphate, une étape naturelle dans le processus de synthèse de l'ADN (35).

Mais depuis quelques années, de nombreuses autres méthodes sont en développement et arrivent sur le marché du diagnostic afin de repousser les limites de détection, de gagner en précision et en sensibilité, diminuer le temps de réaction et réduire les coûts. Actuellement, le séquençage est utilisé principalement pour le dépistage de certaines mutations génétiques nécessaire à la caractérisation de certains cancers. La complexité de sa mise en œuvre et le coût élevé de réalisation est un frein à une utilisation en routine pour le diagnostic *in vitro* des acides nucléiques.

2.3. Limites et discussion

Toutes ces techniques sont des méthodes très robustes et permettent de détecter et de quantifier des quantités très faibles de matériel génétique. Malgré la diversité des techniques, la PCR s'est imposée comme le « gold standard » en matière de diagnostic médical et sert de référence pour prouver l'efficacité des nouveaux tests de diagnostic du fait de sa sensibilité très élevée. En revanche, toutes ces méthodes ont une limite commune, l'amplification génétique. Elles permettent théoriquement d'obtenir un signal dès la présence d'un seul fragment d'ADN ou d'ARN, à la seule condition de pouvoir l'amplifier afin d'obtenir plusieurs centaines ou milliers de copies du fragment initial. Cette étape est aujourd'hui utilisée en routine dans tous les laboratoires de recherche et de biologie médicale, mais soulève également plusieurs problématiques. La principale est la nécessité d'une étape d'amplification, nécessitant des réactifs, des enzymes et des conditions expérimentales particulières entraînant inévitablement des coûts élevés pour être réalisée dans des laboratoires spécialisés par du personnel qualifié avec du matériel performant. De plus, l'activité enzymatique de l'étape d'amplification est une réaction biologique qui présente une incertitude notamment sur la précision des polymérases qui permettent la synthèse des copies de la séquence initiale, qui peut varier selon la longueur et la composition de la séquence. L'étape d'amplification génétique complexifie les modes opératoires et freine l'utilisation des tests associés pour du suivi continu de nombreux biomarqueurs simultanés à grande échelle. Une solution pour contourner cette problématique serait de s'affranchir de l'amplification du matériel génétique pour la remplacer par une amplification du signal lumineux du test diagnostique. Cette méthode permet de réduire largement le nombre d'étapes nécessaires par rapport à une méthode avec amplification, réduire le coût en réactifs et en temps, ne nécessite pas beaucoup de préparation et ne requiert pas d'instrument spécifique à l'exception d'un lecteur de fluorescence (36). Depuis quelques années, de nouvelles entités font l'objet de nombreux articles scientifiques pour développer des méthodes ultra-sensibles de détection et de quantification sans amplification, les nanoparticules.

3. Les nanoparticules fluorescentes : nouvel outil pour la détection d'acides nucléiques sans amplification

Les nanoparticules (NP) fluorescentes ont émergé comme des outils polyvalents et puissants dans le domaine du diagnostic *in vitro*. Leur capacité à émettre une lumière fluorescente détectable lorsqu'elles sont excitées par une source externe les rendent extrêmement attractives pour une variété d'applications. Elles offrent une sensibilité élevée, une spécificité ajustable et une grande stabilité, ce qui en fait des candidats de choix pour le marquage et la détection de cibles d'intérêt. De plus, des avancées sur la composition et sur la chimie de surface des NP offrent aujourd'hui des performances de brillance dépassant celles des fluorophores de synthèse (37).

3.1. Les nanoparticules

3.1.1. Définition

Les progrès de la recherche en nanotechnologie ont conduit au développement rapide de nouveaux outils biomédicaux avec des applications dans l'administration de médicaments, l'imagerie médicale et les DMDIV (38). Les NP sont des entités dont la taille varie de 1 à 100 nm. Cette plage n'est pas fixe et certaines NP de plus de 100 nm peuvent être incluses dans cette classification. Pour la limite supérieure, il s'agit plutôt de la taille à partir de laquelle les propriétés physiques et chimiques de la NP sont différentes de celles du même composé macroscopique. Elles peuvent être de tailles de formes ou de structures différentes. Ces différences sont principalement dues à leur rapport surface/volume élevé (39). Les propriétés peuvent être très différentes, comme l'augmentation de la conductivité, la résistance, le rapport surface/volume et les propriétés optiques, en fonction des perspectives d'applications (40).

3.1.2. Classification

Il existe un nombre très important de nanoparticules, de composition et de propriétés physico-chimiques différentes. Elles peuvent être classées selon leur taille, leur forme mais également selon leur composition. On distingue habituellement 3 grandes familles : Les NP organiques, les NP de carbone et les NP inorganiques (41).

Parmi les différentes propriétés physicochimiques de ces NP, les propriétés optiques peuvent donner un intérêt majeur dans des applications de diagnostic *in vitro*. Dans ce mémoire, nous nous intéresseront principalement aux NP associées à la fluorescence.

3.2. La fluorescence

3.2.1. *Le principe de la fluorescence*

La fluorescence est un phénomène luminescent qui est aujourd'hui incontournable pour la recherche et la médecine pour détecter des marqueurs biologiques. La luminescence correspond à l'émission de photons à partir d'un atome ou d'une molécule dans un état électroniquement excité. Il dépend du processus physique qui a provoqué l'excitation de l'atome ou de la molécule (42).

On distingue plusieurs sous-catégories selon la nature de l'excitation :

- La chimiluminescence : une réaction chimique est à l'origine de l'excitation
- La bioluminescence : une réaction enzymatique est à l'origine de l'excitation
- La thermoluminescence : la chaleur est à l'origine de l'excitation
- La photoluminescence : l'énergie provient de l'absorption de photons. Cette catégorie regroupe la fluorescence et la phosphorescence.

Le mot « fluorescence » a été inventé en 1852 par le physicien anglais George Gabriel Stokes qui avait remarqué que les cristaux de fluorite émettent une lumière bleue quand on les éclaire avec de la lumière ultraviolette. Le terme « fluor » a donc inspiré « fluorescence ». La fluorescence est caractérisée par une émission de lumière qui se produit dans les nanosecondes suivant l'absorption d'un photon dont la longueur d'onde est généralement plus courte. La différence entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission, connue sous le nom de décalage de Stokes, est la principale caractéristique de la fluorescence.

Les molécules qui sont utilisées en vertu de leurs propriétés fluorescentes sont appelées fluorophores. Lorsque les composés fluorescents sont dans leur état dit « fondamental », ils absorbent de l'énergie lumineuse (photons) pour passer à un état « excité ». Une molécule à l'état excité n'est pas stable dans le temps, des modifications des états électroniques, vibrationnels et rotationnels de la molécule vont se produire pour revenir à l'état fondamental de faible énergie en libérant un photon (43). Il existe plusieurs voies de désexcitations pour passer de l'état excité à l'état fondamental selon le niveau d'énergie concerné. Ces niveaux d'énergie sont représentés sur le diagramme de Jablonski.

3.2.2. Diagramme de Jablonski

Le diagramme de Jablonski permet de schématiser le principe de l'émission de photons en fonction des états excités d'une molécule. Chaque molécule possède ses propres niveaux d'énergie qui sont représentés par les lignes noires de la Figure 8. Le principe de la fluorescence est facilement expliqué par ce diagramme.

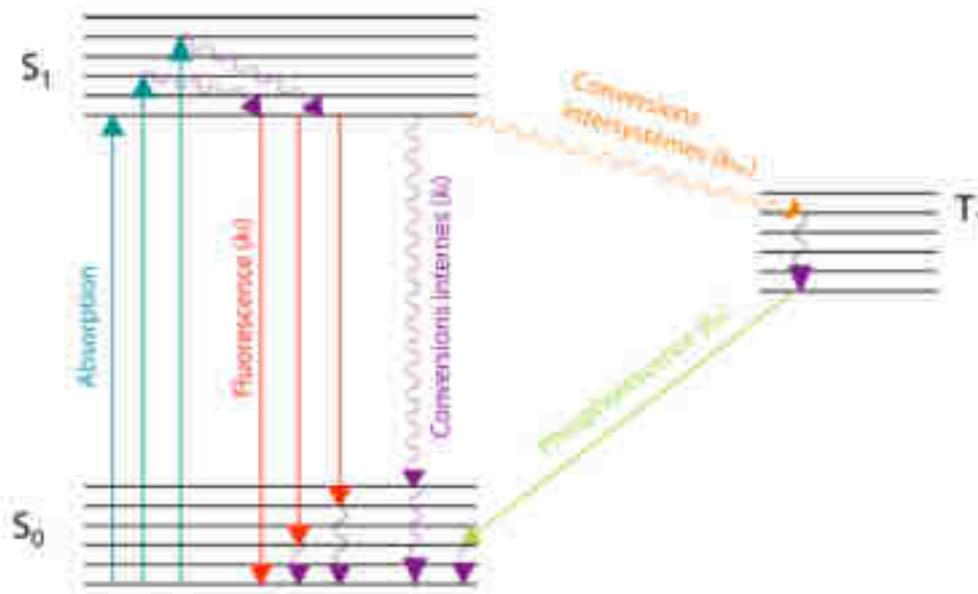


Figure 8. Diagramme de Jablonski montrant les états d'énergie d'une molécule. S0 est l'état fondamental et représente l'énergie d'une molécule qui n'est pas excitée par la lumière. S1 est un état singulet « excité » dans lequel un électron extérieur est propulsé dans une orbitale différente. Un photon de plus faible énergie est émis lorsqu'un électron des états excités retourne à l'état fondamental (44).

Le diagramme de Jablonski représente l'énergie des états électroniques d'une molécule le long de l'axe vertical. La molécule est initialement dans son état fondamental S0. Lorsqu'un photon est absorbé, l'énergie de la molécule est augmentée, et elle est promue à un état excité électronique plus élevé S1. À partir de l'état excité, le retour à l'état fondamental peut se faire par des processus radiatifs ou non radiatifs (44) :

- Les processus **non radiatifs** ne sont pas associés à l'émission d'un photon. Il s'agit de conversion interne, de relaxation vibrationnelle ou de transfert d'électrons par exemple.
- Les processus **radiatifs**, comme la fluorescence ou la phosphorescence, permettent un retour à l'état fondamental en libérant un photon d'énergie correspond au niveau d'excitation de départ. La différence entre la fluorescence et la phosphorescence repose sur les niveaux d'excitations impliqués. La fluorescence est un mécanisme rapide (nanoseconde) et la phosphorescence est plus lente (jusqu'à la milliseconde).

En résumé, le diagramme de Jablonski est un outil graphique utile pour visualiser les processus électroniques qui se produisent dans les systèmes moléculaires après l'absorption d'un photon. Il représente les transitions entre les différents états électroniques, y compris la fluorescence.

Plusieurs caractéristiques entrent en jeu pour définir une méthode de fluorescence et le fluorophore associé (45):

- La **brillance** permet de comparer les fluorophores entre eux. Elle dépend du rendement quantique et de la probabilité des photons à être absorbés. Plus un fluorophore est brillant, plus la concentration nécessaire pour obtenir le même signal est faible.
- Le **temps de vie de fluorescence** est le temps pendant lequel le fluorophore reste à l'état excité. Plus le temps de vie est long, plus le fluorophore est efficace.
- Le **rendement quantique** est le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Plus ce rendement est proche de 1, plus le composé est fluorescent.

La compréhension de la théorie sur laquelle repose la fluorescence est essentielle pour développer des concepts qui permettront de passer d'un signal lumineux à un biomarqueur.

3.2.3. Förster Resonance Energy Transfer (FRET)

Le FRET est un transfert d'énergie non radiatif qui se produit par couplage dipôle-dipôle d'un fluorophore donneur à l'état excité (D) à un accepteur à l'état fondamental (A, un autre fluorophore ou un quencher) lorsque les conditions appropriées de chevauchement spectral et de proximité sont remplies (46). Lorsque ce transfert d'énergie se produit, l'intensité de l'émission du donneur et celle de l'accepteur augmente.

Ce transfert d'énergie est dépendant de la distance entre les deux molécules qui doivent être éloignées d'environ 1-10 nm (et jusqu'à ~20 nm pour certaines paires FRET atypiques) (46). La Figure 9 permet de visualiser le mécanisme de transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur.

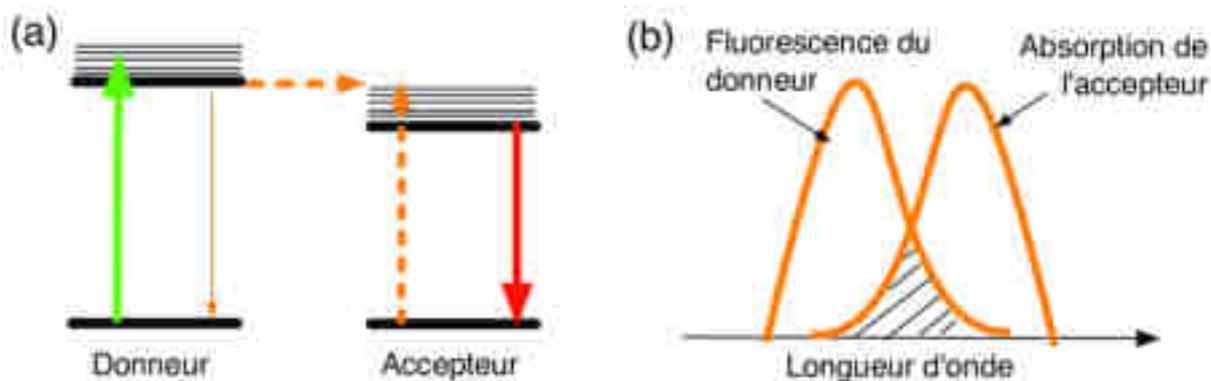


Figure 9. Mécanisme FRET. (A) Niveaux d'énergie des molécules "donneuse" et "acceptrice". En tiret sont figurées les désexcitations non radiatives. Le donneur, porté dans son état excité par une excitation laser, transfère son excitation de manière non-radiative à l'accepteur qui se désexcite ensuite par fluorescence. La lumière du laser d'excitation n'est pas absorbée par l'accepteur. (b) Recouvrement des spectres de fluorescence du donneur et d'absorption de l'accepteur permettant le FRET. Schéma selon (47).

L'efficacité du transfert d'énergie par FRET peut être calculée et permet de mesurer la distance entre l'accepteur et le donneur par exemple. Bien que d'autres techniques non optiques aient une résolution plus élevée (par exemple, la cristallographie aux rayons X), ces techniques sont généralement moins accessibles, plus complexes sur le plan technique et plus restrictives en ce qui concerne la préparation des échantillons et les conditions de mesure.

3.3. Les nanoparticules fluorescentes

Jusqu'à récemment, les fluorophores de synthèse et les protéines fluorescentes représentaient les principaux outils de fluorescence analytique, avec des bibliothèques très importantes, peu coûteuses et facilement accessibles. En revanche, ils étaient limités par une faible brillance (48). Le développement des NP fluorescentes a permis d'apporter de nouveaux outils plus brillants et avec une meilleure photostabilité que les fluorophores organiques et des protéines fluorescentes. Elles sont constituées de matériaux carbonés, organiques, biologiques et inorganiques. Les propriétés physiques de ces matériaux et leurs mécanismes de luminescence sont tout aussi variés. Ainsi, chaque type de NP présente des avantages et des inconvénients par rapport aux fluorophores classiques et aux autres types de NP (49).

3.3.1. Généralités

Les **nanoparticules organiques** se composent de protéines, carbohydrates, lipides ou polymères par exemple (50). Elles regroupent les micelles, les liposomes, les dendrimères ou des complexes protéiques (voir Figure 10). Elles peuvent être composées d'un cœur creux leur permettant de jouer un rôle de transporteur de médicaments.

Ce transport de molécule est possible par leur capacité à adsorber ou piéger des molécules spécifiques à leur surface ou dans leur noyau. De plus, ces NP sont biocompatibles, biodégradables et non toxiques. Ces caractéristiques en font de bons candidats pour des futures applications en thérapeutique, notamment dans le traitement de certains glioblastomes (51).

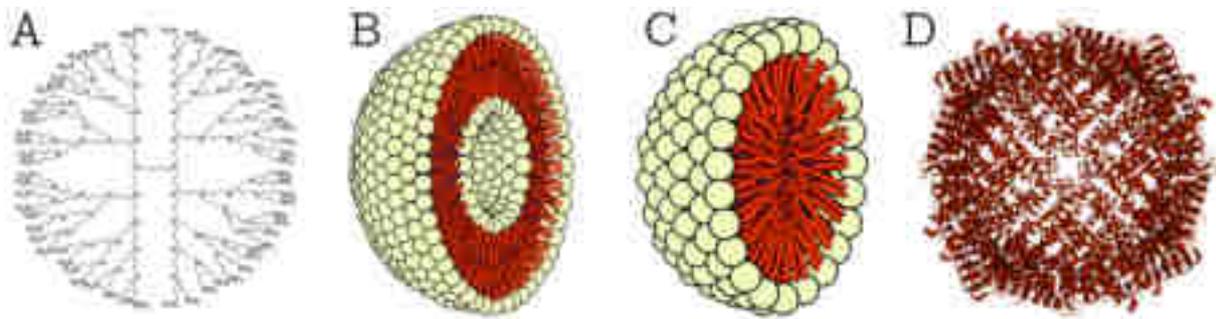


Figure 10. Représentation schématique de NP organiques. (A) Dendrimères ; (B) Liposomes ; (C) Micelles ; (D) Complexe protéique. (52).

Les **nanoparticules de carbone** sont composées uniquement d'atomes de carbone. Elles regroupent principalement les fullerènes, des particules noires de carbone (aussi appelées nanopoudre de carbone), et les Quantum Dots de carbone (voir Figure 11). Les QDs de carbone, aussi appelés carbon dots, sont les plus répandues de cette catégorie car leurs propriétés physicochimiques leur permettent d'être utilisées dans des domaines d'applications très variés tels que le stockage d'énergie, mais également pour l'imagerie médicale ou le diagnostic *in vitro* (53).

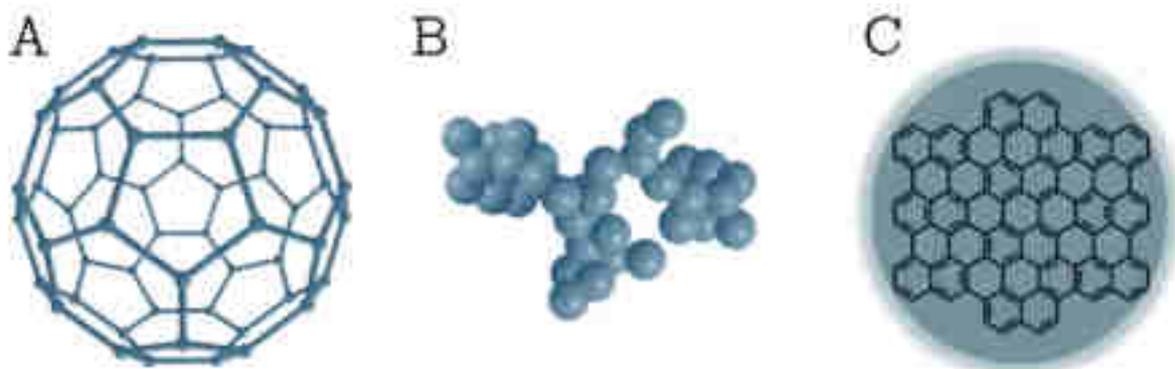


Figure 11. Représentation schématique de NP de carbone. (A) fullerènes ; (B) Nanoparticules noires de carbone ; (C) QDs de carbone. (52).

Les **nanoparticules inorganiques** sont composées de métaux, de céramique ou de semiconducteurs et possèdent une grande résistance mécanique. Elles sont très peu impactées par la dégradation enzymatique ce qui leur confère une grande stabilité dans leur milieu biologique.

Leur synthèse chimique permet de contrôler leur composition mais également de nombreux paramètres comme la taille, la forme et la porosité pour répondre à des applications biomédicales spécifiques, telle que le diagnostic (54). Dans le domaine de la bioimagerie, les NP métalliques (d'or ou d'argent) ont fait l'objet de recherches intensives en raison de leurs propriétés optiques exceptionnelles, ainsi que de leur grande stabilité chimique (55). D'autres structures émettant dans le proche infrarouge, telles que les nanotubes de carbone ou les NP de lanthanides sont également utiles pour la bioimagerie, cependant leur toxicité potentielle a jusqu'à présent limité leur utilisation.

Enfin, les quantum dots (QD), cristaux semi-conducteurs, occupent une place particulière parmi les NP en raison de leurs propriétés optiques uniques et de leur taille nanométrique. Ils peuvent être synthétisés avec une précision remarquable, ce qui leur confère un contrôle précis sur leurs propriétés optiques, notamment leur spectre d'émission lumineuse. Leur grande luminosité, leur stabilité et leur large gamme de couleurs en font des outils précieux pour diverses applications en imagerie biologique, médicale et cellulaire (56). De plus, les QD présentent une excellente biocompatibilité, ce qui en fait des candidats de choix pour le marquage et le suivi de biomolécules dans des environnements biologiques complexes. C'est une des raisons pour laquelle le prix Nobel de chimie 2023 a été décerné pour des avancés dans la recherche sur les QD, leur compréhension et le développement d'applications pratiques. Néanmoins, leur composition à base de matériaux souvent toxiques peut compromettre certaines applications *in vivo* (53).

3.3.2. Exemples de nanoparticules fluorescentes organiques

Dans ce mémoire, nous nous intéresseront exclusivement aux NP fluorescentes et à leurs applications en diagnostic. Parmi les NP décrites dans le §3.3.1, les NP fluorescentes sont composées presque exclusivement de NP organiques qui permettent d'atteindre des brillances encore plus élevées que les QD (48). Les NP constituées de polymères conjugués sont très étudiées car présentent un coefficient d'extinction molaire très élevé, une forte brillance, un rendement quantique élevé et une photostabilité suffisante pour des applications en diagnostic très variées (57). Par ailleurs, certaines NP fluorescentes sont composées de fluorophores ioniques comme la cyanine ou la rhodamine. L'intérêt d'encapsuler ces fluorophores dans une NP permet d'éviter le phénomène d'agrégation et de les rendre plus lumineux (Figure 12). Cependant, afin de compenser leur charge positive et réduire leur solubilité dans l'eau, il est nécessaire d'y ajouter des groupements hydrophobes à leur surface (58).

Enfin, l'association de fluorophores ioniques et de contre-ions permet à la fois de stabiliser la NP et d'augmenter sa brillance jusqu'à 1000 fois par rapport à un fluorophore classique (59).

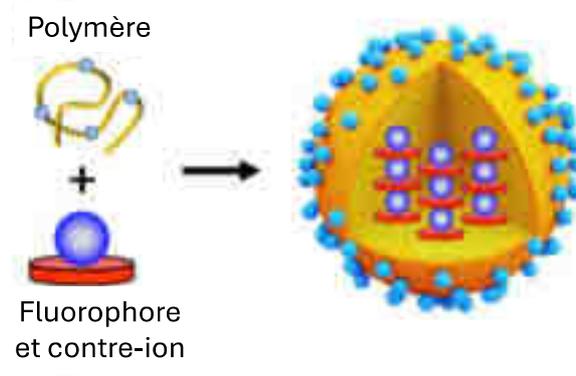


Figure 12. Représentation schématique d'une NP polymérique chargée de fluorophores ioniques et de contre-ions. Adapté selon (48).

Les caractéristiques des NP ont nécessité un développement important de leur chimie de surface. En effet, la découverte de nouvelles fonctions de couplage de surface permet de fonctionnaliser les NP avec des éléments biologiques permettant la détection d'antigènes, d'anticorps et de fragments d'acides nucléiques (60). L'activité de ciblage d'une NP fonctionnalisée repose dans la plupart des cas sur une molécule qui présente une affinité élevée pour sa cible (couple anticorps-antigène, ligand-récepteur, fragment complémentaire). Cependant, pour que le système fonctionne il faut que la molécule de ciblage soit fixée à la surface de la nanoparticule. Généralement, des groupements carboxylates, thiols ou amines sont utilisés pour attacher des ligands comme l'acide folique, la streptavidine, des anticorps ou des peptides (61). Enfin, les NP fluorescentes peuvent également être fonctionnalisées avec des oligonucléotides capables de détecter la présence de fragments d'acides nucléiques d'intérêt dans un échantillon biologique (62).

3.4. La fluorescence pour la détection d'acides nucléique en diagnostic *in vitro*

Les méthodes utilisant les NP fluorescentes sont nombreuses sur le marché du diagnostic *in vitro*. Dans ce mémoire nous nous intéresserons à celles qui peuvent être utilisées pour la détection d'acides nucléiques, et plus particulièrement les méthodes de déplacement de séquences par compétition, les tests de lateral-flow et l'utilisation de balises moléculaires.

En faisant varier le type de NP ainsi que la méthode de détection, les résultats et les domaines d'applications peuvent être très différents. Nous détaillerons ici 3 exemples utilisant des NP fluorescentes pour la détection d'ARN et de miARN.

3.4.1. Déplacement de séquences par compétition

L'une des méthodes les plus communément utilisée pour la détection d'oligonucléotides à l'aide de NP fluorescentes est le déplacement de séquences par compétition (« strand displacement » en anglais). Cette méthode présente de nombreux avantages, elle peut notamment être utilisée pour détecter des acides nucléiques en solution ou immobilisés sur une surface. En effet, les nanoparticules peuvent servir de substrat pour l'immobilisation de séquences d'oligonucléotides complémentaires à la séquence cible et permettent d'améliorer la sensibilité de l'essai (63). Ces tests sont basés sur le déplacement par compétition d'une séquence qui contient un quencher, par la séquence cible d'affinité plus élevée pour la séquence présente sur la NP (Figure 13).

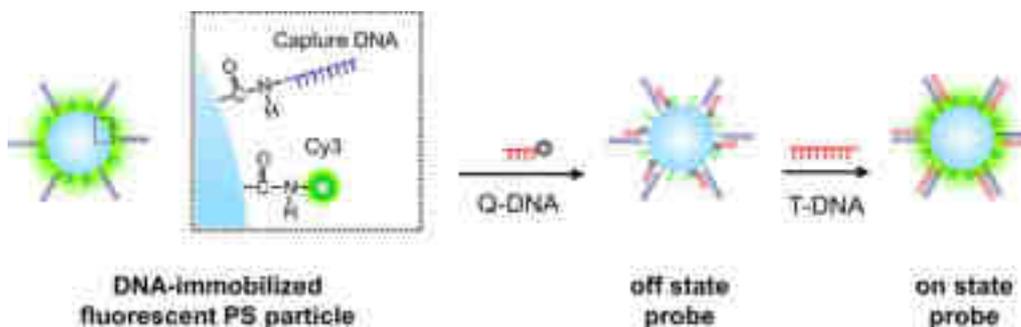


Figure 13. Représentation schématique de la détection d'acides nucléique par déplacement de séquence. La NP est fonctionnalisée avec une séquence complémentaire à la séquence cible (Capture DNA) et mis en présence d'une séquence dotée d'un accepteur de fluorescence (Q-DNA). Une compétition entre la séquence cible (T-DNA) et la séquence Q-DNA permet l'éloignement entre la NP et l'accepteur, provoquant l'émission d'un signal lumineux (64).

La NP est fonctionnalisée avec une séquence complémentaire à la séquence cible à détecter, nommée « capture DNA » sur le schéma ci-dessus. Ce complexe est mis en contact avec une séquence complémentaire à la séquence présente sur la NP, qui contient un accepteur de fluorescence (nommée « Q-DNA »). En présence de la NP, cette séquence va s'hybrider à la surface de la NP. Dans cette configuration, le signal fluorescent émis par la NP après excitation sera capté par l'accepteur et aucun signal ne sera perçu. Cependant, si ce complexe est mis en présence d'une séquence cible (« T-DNA »), complémentaire à la séquence présente sur la NP et présentant une meilleure affinité, une compétition entre les deux séquences provoquera le déplacement de la séquence Q-DNA. Dans ce cas, l'accepteur ne sera plus à proximité de la NP, libérant le signal lumineux en cas d'excitation de la NP.

Cette méthode permet de détecter des séquences d'acides nucléiques de manière spécifique, avec une limite de détection de l'ordre du femtomole (64).

Dans l'objectif de se passer de l'étape d'amplification génétique, il a été nécessaire de développer des NP d'une brillance beaucoup plus élevée que les fluorophores existants. Une équipe a synthétisé des NP dopées avec des molécules de rhodamine en forte concentration qui captent l'énergie et la transfèrent librement de molécule en molécule jusqu'à la surface de la NP (59). Dans ce cas, environ 10000 molécules transfèrent leur énergie à un unique receveur par un mécanisme de FRET permettant une augmentation du signal d'environ 1000 fois. Dans cette même étude, la NP polymère utilisée était composée de polyméthyl méthacrylate-co-méthacrylic acid (PMMA-MA), elle-même chargée de molécule de rhodamine et d'un contre-ion qui permet d'éviter les phénomènes d'agrégation des fluorophores. Afin de donner un intérêt diagnostique, ces NP doivent être fonctionnalisées avec des séquences complémentaires à la séquence cible pour obtenir un signal spécifique à une séquence donnée. L'exemple suivant a permis de développer une NP fonctionnalisée permettant de détecter la présence d'un fragment d'acide nucléique codant pour la survivine dans un échantillon. La survivine est un homodimère protéique, avec une structure bien décrite dans la littérature qui fait partie de la famille des inhibiteurs de l'apoptose. Elle est indétectable dans la majorité des tissus sains chez l'adulte, mais est surexprimée dans de très nombreux cancers. Ces caractéristiques en font un très bon biomarqueur (65) et donc une cible de choix pour le développement de test de détection.

Dans ce cas une séquence complémentaire à un fragment d'acide nucléique codant pour la survivine a été ajoutée à la surface de la NP ainsi que d'autres séquences d'oligonucléotide non-codant qui jouent un rôle de stabilisation. Enfin, la séquence complémentaire a été hybridée avec une petite séquence compétitive à la séquence cible et comportant un accepteur d'énergie, la Cyanine-5 (voir Figure 14).

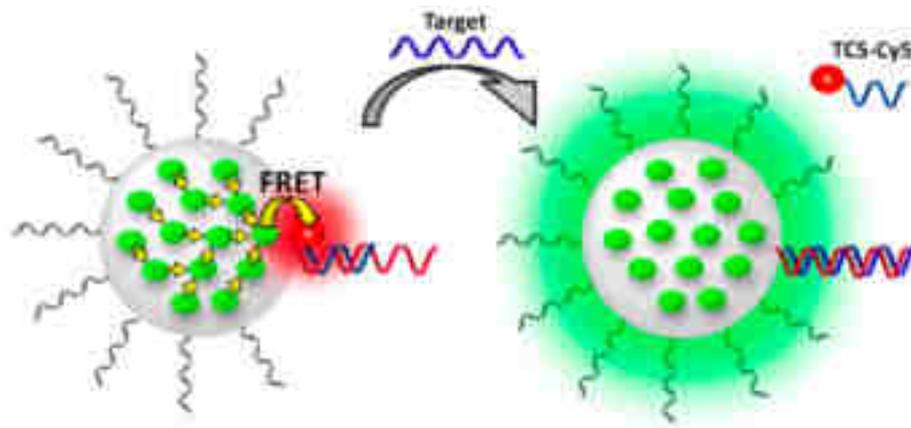


Figure 14. Représentation schématique du système d'amplification du signal par un mécanisme de FRET. En l'absence de séquence cible (gauche), l'énergie émise de la NP est transférée en totalité à l'accepteur qui se trouve à proximité, sur la séquence compétitive qui est hybridée à la séquence de capture et émet un signal rouge. Lorsque la séquence cible est présente dans le milieu (droite), elle déplace la séquence compétitive et éloigne l'accepteur empêchant le mécanisme FRET, libérant le signal vert de la NP (59).

Le mécanisme de détection de la séquence cible repose sur le déplacement de séquence par compétition. En effet, en l'absence de la séquence d'intérêt, la séquence à la surface de la NP restera hybridée à la séquence comportant l'accepteur d'énergie. De ce fait, l'énergie transmise par les milliers de molécules de rhodamine sera transférée aux quelques molécules de Cyanine-5 générant un fort signal de couleur rouge. En effet, le spectre d'émission de la rhodamine et le spectre d'absorption de la Cyanine-5 se chevauchent à 670 nm permettant un transfert FRET efficace. En revanche, en présence de la séquence cible, l'affinité avec la NP sera plus élevée et déplacera la séquence comportant l'accepteur. Le mécanisme FRET permettant le transfert de l'énergie de la NP vers l'accepteur sera interrompu et un puissant signal vert sera généré. Cette méthode permet de générer une émission à deux longueurs d'onde différentes selon la présence ou l'absence de la séquence cible, sans nécessiter une amplification enzymatique.

Suite au développement de cette méthode, une autre étude a été réalisée pour tester la détection simultanée de ces NP fonctionnalisées pour la détection de quatre miARN différents : miR-21, let-7f, miR-222 and miR-30a (66).

- **miR-21** régule l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeur et favorise ainsi la progression tumorale. La voie de signalisation principale associée au miR-21 est la voie PI3K/AKT.
- **miR-222** est impliqué principalement dans la voie PI3K/AKT mais peut être associé à d'autres voies. Dans le cancer du sein, le miR-222 est associé à la voie de signalisation de l'EGFR et de la MAPK.

- **Let-7f** joue un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de la tumorigenèse. Il peut réguler négativement l'activité de mTOR impliqué dans la croissance, la prolifération et le métabolisme cellulaire.
- **miR-30a** est également impliqué dans la voie de signalisation mTOR, mais également celle de ERK et du TGF- β , toutes trois impliquées dans la prolifération cellulaire.

La méthode développée par cette équipe a pour objectif de s'affranchir de l'amplification génétique en amplifiant le signal afin de réduire au maximum la limite de détection tout en simplifiant la méthode à une seule étape. Les NP utilisées étaient les mêmes que celles décrites précédemment, mais avec des accepteurs différents. Ces dernières ont été incubées avec des lysas cellulaires de lignées cancéreuses et de lignées saines. De la même manière que pour la RT-qPCR, il est nécessaire d'extraire l'ARN total de la lignée cellulaire concernée, puis d'incuber les NP dans des conditions expérimentales favorables à la reconnaissance et à l'hybridation des séquences (voir Figure 15).

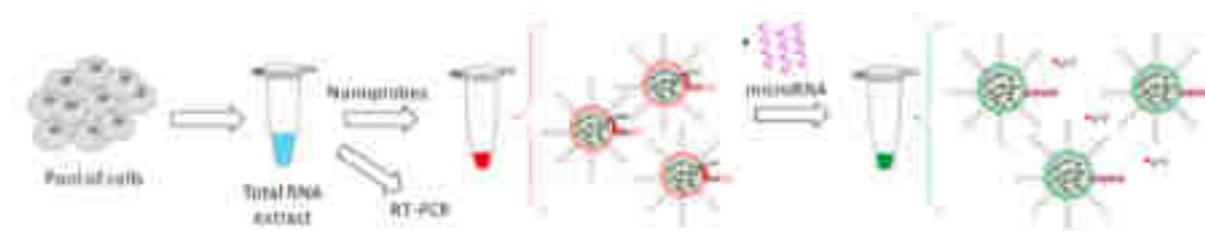


Figure 15. Schéma représentatif de la méthode de détection des miARN à partir d'une lignée cellulaire à l'aide des NP polymériques fonctionnalisées. L'ARN total des lignées cellulaires est extrait puis mixé avec les nanoparticules. Après 6h d'incubation à 20°C, le miARN cible a déplacé la séquence comportant l'accepteur par compétition et se lie à la NP, inhibant le mécanisme de FRET. Le changement de signal de fluorescence est mesuré après excitation à 530 nm (66).

Après incubation, le signal de fluorescence est mesuré après excitation à 530 nm. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité du miARN correspondant à la NP utilisée. Les résultats obtenus à l'aide des NP ont été comparés à ceux obtenus par RT-qPCR à l'aide d'un gène de référence. Les concentrations en miARN obtenus par les NP étaient corrélées aux quantités déterminées par RT-qPCR, même si les résultats n'étaient pas identiques. En effet la RT-qPCR permet une quantification relative suite à une reverse transcription du miARN, alors que les NP détectent les miARN de manière directe, en une seule étape.

Les résultats de ces études ont permis de mettre en évidence une autre vision de la détection d'acides nucléiques dans un échantillon biologique. Depuis de nombreuses années, la brillance des fluorophores disponibles n'était pas suffisamment importante pour s'affranchir d'une étape d'amplification enzymatique pour augmenter la concentration de matériel génétique avant sa

détection. L'augmentation de la détectabilité en utilisant les NP fluorescentes fonctionnalisées a permis de supprimer cette étape car la faible concentration n'est plus une entrave à la qualité du signal détecté. Aujourd'hui, cette méthode est toujours moins efficace que la RT-qPCR qui permet théoriquement de détecter un signal dès lors qu'un seul fragment d'intérêt est présent dans l'échantillon. La méthode utilisant les NP fluorescentes fonctionnalisées possède une limite de détection établie à l'échelle du pM. Malgré des résultats prometteurs, notamment en termes de simplification et de portabilité pour tendre vers des tests « point-of-care », une détection à partir d'une seule copie présente dans le milieu requiert encore l'utilisation d'un microscope et est moins robuste que les résultats de RT-qPCR.

3.4.2. *Lateral-flow*

Les tests à flux latéral (« lateral-flow » en anglais) sont une autre méthode pouvant impliquer des NP fluorescentes pour la détection d'acides nucléiques. La demande de test lateral-flow a explosé lors de la pandémie au SARS-CoV-2 dans le cadre de la campagne de diagnostic nationale et mondiale. Ces tests immuno-chromatographiques permettent d'obtenir un résultat rapide, à moindre coût, sans nécessiter de matériel spécifique. Jusqu'alors, ils étaient principalement utilisés pour détecter directement des protéines ou des fragments de protéines surexprimés dans le cadre d'une pathologie (67). Il existe plusieurs types de tests de lateral flow, les plus connus sont ceux utilisant des NP d'or pour la détection de la cible permettant une détection visuelle. Le principe est le même avec l'utilisation de NP fluorescentes et présente une meilleure sensibilité (68). Ces tests sont fabriqués sous forme de bandelettes (voir Figure 16), un format pratique pour l'utilisateur, d'une largeur comprise entre 4 et 6 mm et d'une longueur ne dépassant pas 7 cm.

Ces bandelettes se composent de quatre sections principales constituées de différents matériaux

- la zone de dépôt de l'échantillon (« sample pad » en anglais), en cellulose ;
- la zone de couplage, en fibre de verre, imprégnée de la solution de bioconjugués (souvent un anticorps couplé à un élément de détection)
- la zone de détection en feuille de nitrocellulose où sont imprimées la ligne de test (TL) et la ligne de contrôle (CL)
- la zone d'absorption, également en cellulose pour absorber le surplus.

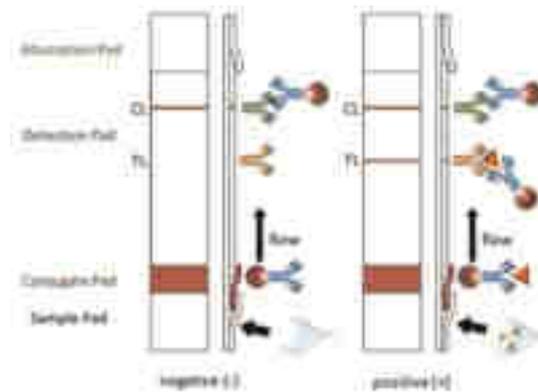


Figure 16. Représentation schématique d'un test lateral-flow standard (68). Lorsque l'échantillon ne contient pas l'analyte d'intérêt (gauche), la NP fonctionnalisée ne pourra pas interagir avec l'anticorps présent sur la bande test et seule la bande contrôle sera visible. Dans le cas où l'échantillon contient l'analyte, le complexe NP fonctionnalisée-analyte sera reconnu par l'anticorps présent sur la bande test et les deux bandes (test et contrôle) seront visibles.

Le principe d'utilisation est très simple, il repose sur la réalisation d'un prélèvement de l'échantillon biologique (sang, salive, urine...) et à son dépôt sur l'extrémité de la bande contenant la NP fonctionnalisée (sample pad). Les molécules d'intérêts présentes dans le milieu biologique vont migrer sur la bandelette et réagir avec les éléments biologiques spécifiques fixés sur la zone de couplage (anticorps et antigènes). Le couplage avec un marqueur coloré permettra d'obtenir un résultat visuellement. Il s'agit dans la plupart des cas de tests qualitatifs qui permettent de distinguer la présence ou l'absence de l'analyte d'intérêt.

Avec l'évolution de la médecine et la nécessité de pouvoir agir le plus précocement possible, l'utilisation des tests de lateral-flow conventionnels rend difficile l'obtention de sensibilités élevées et d'une quantification précise. Une simple inspection visuelle, fournissant uniquement des lectures « oui/non », n'est pas suffisante pour des déterminations précises et sensibles à de très faibles concentrations qui sont nécessaires pour un diagnostic précoce (69). Certaines études ont permis de montrer que l'utilisation de NP fluorescentes en lateral-flow permettent de diminuer la limite de détection de 10 fois par rapport à l'utilisation de NP d'or avec une limite de détection de l'ordre du ng/mL (70).

En 2020, une équipe a développé un test lateral-flow permettant de détecter directement l'ARN du SARS-CoV-2 dans un échantillon en utilisant des NPs fonctionnalisées avec des sondes à ADN qui peuvent s'hybrider directement à l'ARN à détecter (71). Cette méthode permet également d'amplifier le signal émis sans amplification génétique (voir Figure 17).

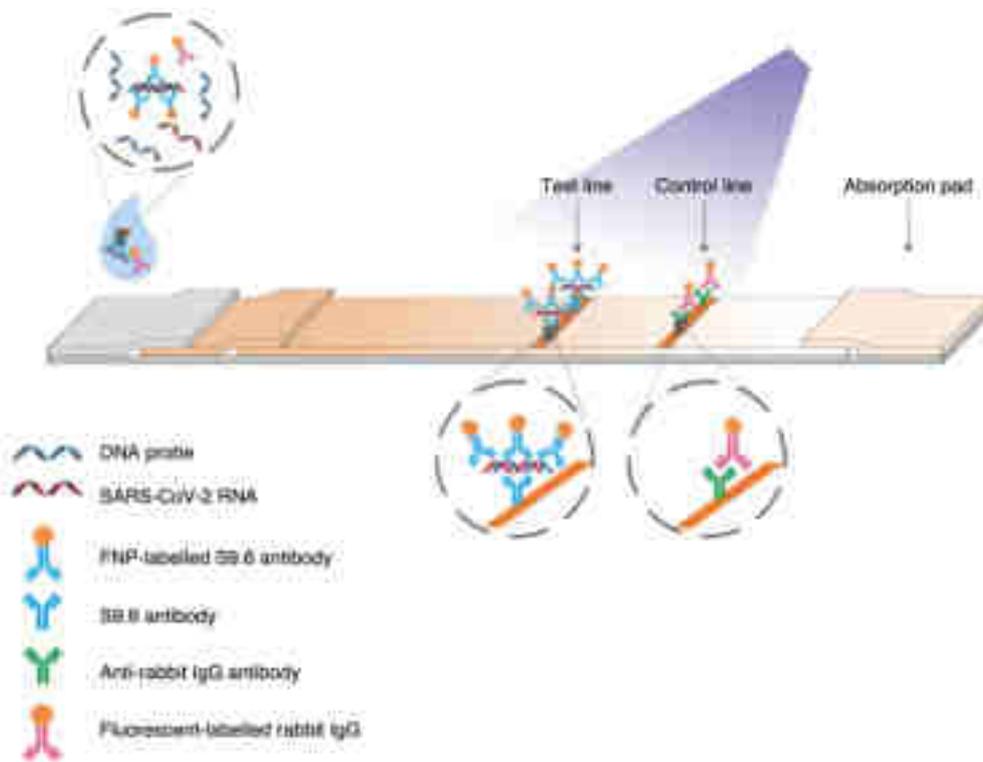


Figure 17. Schéma du test lateral-flow pour détecter l'ARN du SARS-CoV-2. L'échantillon est déposé sur le « sample pad » à gauche de la bande, le mélange réactionnel migre jusqu'à « l'absorption pad » en passant par la bande test et la bande contrôle. Si l'échantillon contient l'analyte d'intérêt, il sera capté par les anticorps S9.6 fixés sur la bande test. La bande contrôle est un indicateur de bon fonctionnement du test, les anticorps de lapin seront reconnus par les anticorps anti-lapin fixés sur la bande « contrôle ». Schéma de (71).

Le principe de cette méthode, appelée *hybrid capture fluorescent immunoassay* (HC-FIA), repose sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre le complexe ADN-ARN du SARS-CoV-2. Les anticorps S9.6 sont spécialement conçus pour reconnaître uniquement le complexe ADN-ARN, sans se lier à l'ADN simple brin, double brin ou à l'ARN seul. Afin de s'affranchir de l'étape d'amplification, les chercheurs ont fonctionnalisés des NP fluorescentes à base de chélate d'euporium avec ces anticorps, ceci permettant d'amplifier le signal émis à partir d'une très faible concentration d'analyte. Dans cet exemple, les anticorps S9.6 de souris sont fixés sur la ligne « test », et la ligne « contrôle » est coâtée avec des anticorps de chèvre anti-lapin. Les NPs fonctionnalisées avec des anticorps S9.6 ainsi que des IgG fluorescents de lapin sont ajoutées dans le milieu réactionnel avec la sonde d'ADN complémentaire à l'ARN à détecter. Après un frottis naso-pharyngé, l'ARN est extrait et incubé dans le milieu réactionnel. Ceci permet l'hybridation entre la sonde d'ADN et l'ARN cible pour former un complexe reconnu par les NPs fonctionnalisées à l'aide de leur anticorps S9.6. Ce mélange est ensuite déposé sur la membrane de nitrocellulose pour migrer et se fixer sur les bandes « test » et « contrôle ». En effet, le complexe ADN-ARN-NPs se fixera sur la bande « test » grâce aux anticorps S9.6 fixés sur la membrane.

Les anticorps de lapin présent dans le milieu réactionnel initial migreront et seront captés par les anticorps anti-lapin présents sur la bande « contrôle ». La présence ou l'absence d'ARN de SARS-CoV-2 sera déterminée par une valeur seuil de fluorescence, déterminée à partir du ratio d'intensité de fluorescence de la bande « test » par rapport à la bande « contrôle ».

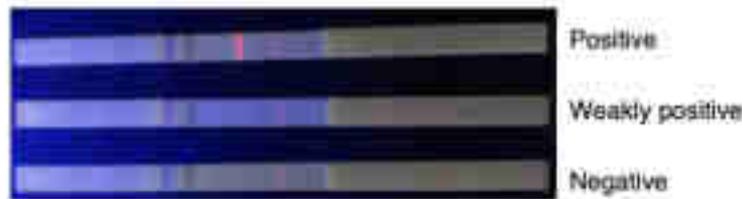


Figure 18. Photo d'une bande contenant un échantillon positif (haut), faiblement positif (milieu) et négatif (bas). Ce résultat est obtenu en éclairant les bandes avec une lumière UV (environ 380nm), la lecture est visible à l'œil nu car les nanoparticules d'euporium émettent dans le rouge lorsqu'elles sont excitées en UV. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration du complexe ADN-ARN-NP présente dans l'échantillon. Illustration de (71)

Les résultats obtenus (Figure 18) ont été comparés à la qPCR. Malgré l'absence d'amplification génétique, les résultats obtenus lors de cette étude indiquent que la limite de détection obtenue avec l'HC-FIA est d'environ 500 copies/mL alors que celle de la qPCR commerciale est située entre 200 et 1000 copies/mL. Cette étude a mis en évidence plusieurs avantages à utiliser la HC-FIA comme méthode diagnostic notamment la rapidité car les résultats sont disponibles en moins d'une heure. De plus, cette méthode requiert uniquement un lecteur de fluorescence et rend l'utilisation accessible à du personnel moins qualifié car elle repose uniquement sur deux étapes. Enfin, le risque de contamination est réduit car un test correspond à un échantillon unique. Ces résultats encourageants permettront d'envisager le déploiement de cette méthode rapide, adaptable, peu coûteuse et très sensible dans les hôpitaux, au plus proche du patient.

3.4.3. Les balises moléculaires

La dernière décennie a été marquée par le développement rapide des sondes à bases d'ADN en raison de leurs applications considérables en biologie, en médecine, en sciences de l'environnement et en ingénierie (72). Les balises moléculaires, « molecular beacon » en anglais, sont des sondes d'ADN en épingle à cheveux, « Hairpin DNA Probes » en anglais, (HDP). Elles sont composées d'ADN monocaténaire spécialement conçus pour obtenir une excellente spécificité de détection d'une séquence cible, ainsi que d'un donneur et d'un accepteur de fluorescence. Cette technologie repose sur le principe de FRET. En l'absence de séquence cible, la structure de la sonde est sous forme d'épingle à cheveux (Figure 19). Le donneur et l'accepteur de fluorescence sont très proches ce qui garantit un faible signal de fond en atténuant efficacement l'émission de fluorescence du donneur. En présence de cibles de séquences complémentaires, celles-ci s'hybrident avec la boucle de la balise moléculaire et

ouvrent la structure en épingle à cheveux, ce qui entraîne la séparation du donneur et de l'accepteur. Ce changement de structure entraîne la restauration du signal de fluorescence.

D'une manière générale, une balise moléculaire peut être considérée comme un capteur qui passe d'une conformation de signalisation à l'autre (état fermé et état ouvert) en fonction de la cible. Le signal optique généré lors de l'ajout d'un analyte est proportionnel à la quantité d'analytes.

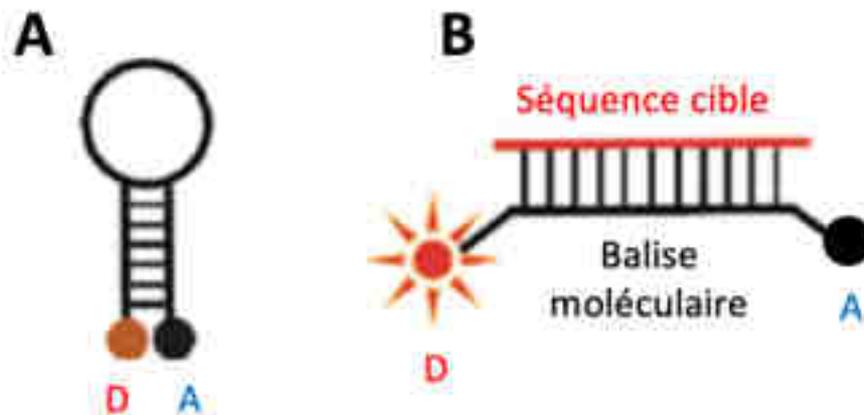


Figure 19. Structure d'une balise moléculaire et son mécanisme de détection. (A) La structure en épingle à cheveux est composée d'une boucle qui reconnaîtra la séquence cible, ainsi qu'un donneur de fluorescence D et un accepteur de fluorescence A. (B) En présence d'une séquence complémentaire à celle de la boucle de la sonde ADN, l'épingle à cheveux s'ouvre et le signal de fluorescence est émis. Figure adaptée selon (72).

Les balises moléculaires sont prometteuses en raison de leur facilité de synthèse chimique et de modification fonctionnelle, de la spécificité de l'appariement des bases et de la prévisibilité des interactions intermoléculaires ou intramoléculaires (73). Cette méthode peut être utilisée pour la détection d'acides nucléiques notamment pour les miARN. Certaines balises ont montré une forte stabilité, une sensibilité élevée et une limite de détection de 100 pM pour la détection de certains miRNA (74). Enfin, cette méthode peut être adaptée au multiplexing, c'est-à-dire à la détection simultanée de plusieurs séquences en utilisant plusieurs sondes différentes.

En 2023, une équipe de chercheurs a mis au point une méthode utilisant des NP fluorescentes fonctionnalisées avec une sonde à ADN en forme d'épingle à cheveux comportant un accepteur de fluorescence permettant la détection de miARN en solution (75). Cette équipe s'est intéressée à la détection de miR-21, miARN surexprimé dans certains types de cancers. Sa détection précoce et à très faible concentration dans un échantillon complexe comme le plasma représente un atout majeur pour la prise en charge de patients.

Le système utilisé comporte deux types de NP différents :

- Des nanoparticules à conversion ascendantes (UCNP) comme fluorophore. Ces nanoparticules absorbent la lumière à 980 nm (proche infra-rouge) et émettent un signal à environ 541 nm.
- Des nanoparticules d'or qui jouent un rôle d'accepteur de fluorescence (quencher) avec un pic d'absorbance à 546 nm.

Le système de détection repose sur les interactions entre ces deux nanoparticules. En effet, la NP d'or est fonctionnalisée avec une sonde à ADN en forme d'épingle à cheveux, dont son extrémité est liée à la NP UCNP. Cette sonde à ADN possède une séquence spécifique, complémentaire à la séquence cible du miR-21 à détecter (Figure 20). Lorsque la sonde à ADN reconnaît la séquence du miR-21 dans l'échantillon, les deux séquences complémentaires vont s'hybrider, modifiant la conformation de l'épingle à cheveux et éloignant le donneur et l'accepteur de fluorescence. En présence de la séquence cible, la NP d'or est distante de la NP UCNP, empêchant le transfert FRET entre elles, libérant l'émission du signal à 541 nm. L'intensité de ce signal permet de quantifier la concentration de miR-21 dans l'échantillon.

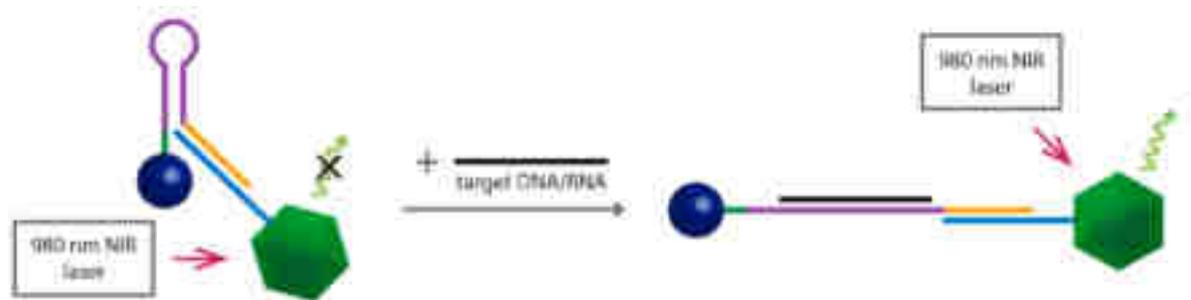


Figure 20. Représentation schématique de NP fonctionnalisées avec une sonde à ADN permettant la détection de miARN. En l'absence de la séquence cible complémentaire de la sonde à ADN, la fluorescence émise par la NP UCNP (en vert) est entièrement absorbée par la NP d'or et le signal n'est pas détecté. Si la séquence complémentaire à la sonde à ADN est présente dans l'échantillon, la conformation de l'épingle à cheveux s'ouvre, éloignant l'accepteur du donneur et libérant la fluorescence de la NP UCNP. Cette fluorescence permet de quantifier la séquence cible (75).

Cette méthode présente plusieurs avantages, elle permet tout d'abord de détecter des miARN sans purification préalable de l'échantillon. En effet, la caractéristique des NP à conversion ascendante est de générer un signal d'une longueur d'onde plus faible que la longueur d'onde d'excitation. Cette propriété permet de réduire fortement le bruit de fond et permet la détection de la séquence cible dans des milieux biologiques tels que le sang, le plasma ou les urines. De plus ces NP sont très stables dans le temps à température ambiante, le risque de dégradation et de photoblanchiment est très faible.

Enfin, cette étude a mis en évidence que cette méthode permet de détecter le miR-21 dans un échantillon de plasma avec une limite de détection approchant les 10 aM après une heure d'incubation. Les résultats de cette étude montrent une nouvelle fois la capacité des NP fluorescentes à détecter des acides nucléiques, sans amplification enzymatique, en une seule étape et dans un échantillon biologique brut. Cependant, des investigations complémentaires devront être réalisées pour comparer ces résultats à ceux obtenus par PCR.

Ces différentes méthodes présentent toutes leurs avantages, mais sont encore au stade de développement. Depuis quelques années, et notamment depuis la pandémie du SARS-CoV-2, de nouveaux modes d'analyses biologiques se sont développés afin de permettre une détection de masse. Ces nouveaux tests, appelés tests *point-of-care*, ont pour but de s'adresser le plus directement au patient. Ils sont réalisés par un professionnel de santé ou par le patient lui-même et permettent d'obtenir des résultats plus rapidement que les tests classiques, avec une fiabilité comparable. Le développement du diagnostic *in vitro* utilisant les NP s'inscrit dans cette démarche. Si l'on garde l'exemple de l'oncologie, l'objectif est de simplifier le dépistage de certain type de cancer à partir d'une goutte de sang ou d'une biopsie d'un organe. L'apparition d'un signal lumineux ou fluorescent serait directement liée à la présence de certains biomarqueurs spécifiques de la pathologie recherchée. Ce type de détection permettrait une accélération de la prise en charge du patient à l'aide d'un outil d'orientation diagnostic pour le médecin et une réduction des coûts (76). Actuellement ces technologies sont au stade de recherche mais les récentes avancées offrent des résultats prometteurs pouvant mener à la mise sur le marché de DMDIV intégrant les NP fluorescentes dans les prochaines années.

Conclusion et discussion

L'étude approfondie des acides nucléiques en tant que biomarqueurs a révélé leur importance cruciale dans le diagnostic médical, ouvrant la voie à des avancées significatives dans les méthodes de détection et de suivi des maladies. Dans ce mémoire, nous avons exploré divers aspects de cette recherche, en mettant en lumière l'utilisation des NP fluorescentes comme outil d'amplification du signal pour la détection des acides nucléiques. Nous avons souligné le rôle essentiel des acides nucléiques en tant que biomarqueurs, en mettant particulièrement l'accent sur les miARN et leur utilisation potentielle en oncologie. Nous avons également mis en évidence l'intérêt majeur du suivi des miARN dans la prise en charge du cancer colorectal ainsi que les avantages du multiplexing pour détecter des profils types d'expression de miARN.

Afin de pouvoir être utilisée en routine et par le plus grand monde, il est nécessaire d'intégrer la méthode diagnostic dans un DMDIV. La réglementation européenne en matière de mise sur le marché de DMDIV évolue depuis 2017 pour intégrer au nouveau cadre qui vise à renforcer la sécurité et à prendre en compte les développements technologiques dans le secteur des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. Nous avons ensuite abordé les méthodes de diagnostic d'acides nucléiques actuelles, en identifiant leurs avantages et leurs limites en mettant en évidence la complexité de réalisation des tests pour amplifier le matériel génétique initial. Ceci engendre des coûts importants qui sont un frein à une utilisation pour un suivi régulier d'un nombre important de patients et d'échantillons.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux nanoparticules fluorescentes comme nouvel outil d'amplification du signal pour la détection des acides nucléiques. Nous avons discuté en détail du principe de fluorescence et de son application dans la détection en diagnostic *in vitro*. Les différentes stratégies utilisant les nanoparticules fluorescentes ont été présentées, démontrant leur potentiel pour simplifier les modes opératoires des tests de diagnostic. Le développement de nanoparticules ultrabrillantes et fonctionnalisées permet de s'affranchir de l'étape d'amplification du matériel génétique contre une amplification du signal lumineux.

Les miARN en tant que régulateurs clés de l'expression des gènes, jouent un rôle crucial dans le développement, la progression et la métastase des cancers. Leur détection précise et sensible peut fournir des informations précieuses pour la classification des tumeurs, la prédiction du

pronostic, la surveillance de la réponse au traitement et l'évolution de la pathologie. L'utilisation des nanoparticules fluorescentes pour la détection de miARN en oncologie représente une avancée prometteuse dans le domaine de la recherche et du diagnostic du cancer. Leur capacité à détecter plusieurs miARN simultanément dans un seul échantillon permet une approche plus complète pour l'identification des miARN et de la signature de certains cancers. En détectant plusieurs cibles à la fois, cette technologie offre des informations plus riches sur les modèles d'expression des miARN, ce qui peut contribuer à une meilleure compréhension des différents types de cancers. Cette approche multiplexée permet d'économiser du temps, des échantillons et des ressources, ce qui est particulièrement important dans le domaine du diagnostic médical où l'efficacité et la rentabilité sont essentielles.

En outre, les NP fluorescentes offrent une grande sensibilité de détection, ce qui permet la détection de faibles concentrations de miARN présents dans les échantillons biologiques complexes, pouvant atteindre l'atto-molaire. Grâce à leur sensibilité élevée, les NP fluorescentes se placent comme un outil puissant pour une détection précoce du cancer, ce qui est essentiel pour améliorer les taux de survie et la prise en charge des patients. Un autre avantage majeur des NP fluorescentes est leur spécificité de détection. Grâce au développement de la chimie de surface, la fonctionnalisation des NP avec des séquences d'acides nucléiques spécifiques permet leur liaison aux miARN cibles, garantissant ainsi une détection précise et spécifique. Cette spécificité permet de distinguer les miARN pertinents des autres ARN présents dans l'échantillon, améliorant ainsi la fiabilité des résultats.

Cependant, malgré les progrès réalisés, certaines limites persistent. Les défis liés à la standardisation des techniques, à la complexité des échantillons cliniques et à la nécessité de valider cliniquement ces nouvelles méthodes restent des obstacles à surmonter. En effet, les méthodes actuelles très sensibles telles que la PCR permettent de détecter la présence d'acides nucléiques à de très faibles concentrations, mais la comparaison des résultats avec ceux obtenus à l'aide de NP fluorescentes est complexe. La quantification relative de la PCR liée à la comparaison d'un signal avec celui d'une séquence de référence ne permet pas d'obtenir une limite de détection précise. Le manque d'informations sur les limites de détection dans la littérature est un frein pour le développement et la validation des tests utilisant les NP fluorescentes. De plus, des questions réglementaires doivent être abordées pour garantir l'acceptation et l'adoption généralisée de ces technologies, notamment pour répondre au nouveau règlement européen en matière de DMDIV.

L'utilisation des nanoparticules fluorescentes pour la détection de miARN en oncologie, mais également de manière plus large à la détection d'acides nucléiques, représente une avancée prometteuse et un nouvel outil de diagnostic à destination des cliniciens, des chercheurs mais également des patients. Actuellement ces tests sont encore en cours de développement, mais leur arrivée sur le marché dans les prochaines années permettra de compléter l'arsenal diagnostic et thérapeutique actuel pour la détection des acides nucléiques.

Bibliographie

1. Haute Autorité de Santé. Test compagnon associé à une thérapie ciblée : définitions et méthode d'évaluation. 2014;27.
2. Proposition de loi relative à l'innovation en santé [Internet]. [cited 2022 Nov 14]. Available from: <https://www.senat.fr/rap/l21-498/l21-4986.html>
3. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. 2017;55.
4. Watson D, Crick FHC. GENETICAL IMPLICATIONS OF THE STRUCTURE OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID. 1953;
5. Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids.
6. ADN vs ARN - Introduction et différences entre l'ADN et l'ARN [Internet]. [cited 2024 May 1]. Available from: <https://www.geeksforgeeks.org/difference-between-dna-and-rna/>
7. Mathieu R. Une approche originale de sélection de nouveaux ARN non codants. 2011;27:3.
8. Assou S, Martin C, Bouckenheimer J, Vos JD. Rôle des longs ARN non codants dans le développement précoce de l'embryon humain et dans les cellules souches pluripotentes : perspectives en assistance médicale à la procréation. 2019;21:10.
9. Zendjabil M, Favard S, Tse C, Abbou O, Hainque B. Les microRNA comme biomarqueurs : quelles perspectives ? *Comptes Rendus Biologies*. 2017 Feb;340(2):114–31.
10. Ho PTB, Clark IM, Le LTT. MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *IJMS*. 2022 Jun 28;23(13):7167.
11. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009 Mar;11(3):228–34.
12. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-4*. *Cell*. 1993;75:843–54.
13. Seal RL, Chen L, Griffiths-Jones S, Lowe TM, Mathews MB, O'Reilly D, et al. A guide to naming human non-coding RNA genes. *EMBO J* [Internet]. 2020 Mar 16 [cited 2022 Nov 21];39(6). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embj.2019103777>
14. He B, Zhao Z, Cai Q, Zhang Y, Zhang P, Shi S, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *Int J Biol Sci*. 2020;16(14):2628–47.

15. Santos DAR, Gaiteiro C, Santos M, Santos L, Dinis-Ribeiro M, Lima L. MicroRNA Biomarkers as Promising Tools for Early Colorectal Cancer Screening—A Comprehensive Review. *IJMS*. 2023 Jul 3;24(13):11023.
16. Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X. MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chem Rev*. 2013 Aug 14;113(8):6207–33.
17. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*. 2003 Apr 15;17(8):991–1008.
18. ANSM. Mise sur le marché des dispositifs médicaux et des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. ANSM; 2021 May.
19. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006 Apr;27(2–3):95–125.
20. Biomnigene [Internet]. [cited 2023 Mar 6]. PCR (Biomnigene). Available from: <https://www.biomnigene.fr/fr/nos-solutions/pcr.html>
21. Nikoomanzar A, Chim N, Yik EJ, Chaput JC. Engineering polymerases for applications in synthetic biology. *Quart Rev Biophys*. 2020;53:e8.
22. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* [Internet]. 2020 Jan 23 [cited 2023 Mar 6];25(3). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
23. Écouvillons floqués Medico,Écouvillon en mousse,Bâtonnet d'écouvillon CHG,Applicateurs,Fabricant d'écouvillons d'échantillonnage [Internet]. 2022 [cited 2024 Apr 27]. Quelles sont les différences entre la PCR, qPCR et RT-PCR? - »IZ. Available from: <https://www.medicoswab.com/what-are-the-differences-between-pcr-qpcr-and-rt-pcr/>
24. Quemeneur M. Les processus biogéochimiques impliqués dans la mobilité de l'arsenic: recherche de bioindicateurs. 2018 Mar 29;
25. Davari M, Van Diepeningen AD, Babai-Ahari A, Arzanlou M, Najafzadeh MJ, Van Der Lee TAJ, et al. Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using Rolling Circle Amplification (RCA). *Journal of Microbiological Methods*. 2012 Apr;89(1):63–70.
26. Gu L, Yan W, Liu L, Wang S, Zhang X, Lyu M. Research Progress on Rolling Circle Amplification (RCA)-Based Biomedical Sensing. *Pharmaceuticals*. 2018 Apr 21;11(2):35.
27. Lau HY, Botella JR. Advanced DNA-Based Point-of-Care Diagnostic Methods for Plant Diseases Detection. *Front Plant Sci*. 2017 Dec 6;8:2016.

28. Mohsen MG, Kool ET. The Discovery of Rolling Circle Amplification and Rolling Circle Transcription. *Acc Chem Res.* 2016 Nov 15;49(11):2540–50.
29. Zhang K, Zhang H, Cao H, Jiang Y, Mao K, Yang Z. Rolling Circle Amplification as an Efficient Analytical Tool for Rapid Detection of Contaminants in Aqueous Environments. *Biosensors.* 2021 Sep 23;11(10):352.
30. Su Z, Ning B, Fang H, Hong H, Perkins R, Tong W, et al. Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2011 Apr;11(3):333–43.
31. Lamoril J, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P, Bogard M. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* 2008 Oct;23(5):260–79.
32. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013 Dec;98(6):236–8.
33. Zhong Y, Xu F, Wu J, Schubert J, Li MM. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann Lab Med.* 2021 Jan 1;41(1):25–43.
34. Emiyu K, Lelisa K. Review on Illumina Sequencing Technology. 2022;9(1).
35. Pacbio Sequencing | DNA Technologies Core [Internet]. [cited 2023 Mar 13]. Available from: <https://dnatech.genomecenter.ucdavis.edu/pacbio-sequencing/>
36. Qiu X, Hildebrandt N. Rapid and Multiplexed MicroRNA Diagnostic Assay Using Quantum Dot-Based Förster Resonance Energy Transfer. *ACS Nano.* 2015 Aug 25;9(8):8449–57.
37. Zhang J, Yu J, Jiang Y, Chiu DT. Ultrabright Pdots with a Large Absorbance Cross Section and High Quantum Yield. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2022 Mar 23;14(11):13631–7.
38. Tong S, Fine EJ, Lin Y, Cradick TJ, Bao G. Nanomedicine: Tiny Particles and Machines Give Huge Gains. *Ann Biomed Eng.* 2014 Feb;42(2):243–59.
39. Dorais MC. Développement de nanoparticules inorganiques luminescentes dopées aux lanthanides. p. 94.
40. Thorley AJ, Tetley TD. New perspectives in nanomedicine. *Pharmacology & Therapeutics.* 2013 Nov;140(2):176–85.

41. Anu Mary Ealia S, Saravanakumar MP. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng.* 2017 Nov;263:032019.
42. Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods.* 2005 Dec;2(12):910–9.
43. Liu G, Zhao Y. Switching between Phosphorescence and Fluorescence Controlled by Chiral Self-Assembly. *Adv Sci.* 2017 Sep;4(9):1700021.
44. Balme S. Spectroscopie de fluorescence dynamique confocale : réalisation du dispositif optique et application à l'étude de l'adsorption de protéines aux interfaces solide/liquide. 2006;
45. Wolfbeis OS. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem Soc Rev.* 2015;44(14):4743–68.
46. Algar WR, Hildebrandt N, Vogel SS, Medintz IL. FRET as a biomolecular research tool — understanding its potential while avoiding pitfalls. *Nat Methods.* 2019 Sep;16(9):815–29.
47. Treussart F. Lumière issue d'émetteurs individuels, applications.
48. Ashoka AH, Aparin IO, Reisch A, Klymchenko AS. Brightness of fluorescent organic nanomaterials. *Chem Soc Rev.* 2023;52(14):4525–48.
49. Algar WR, Massey M, Rees K, Higgins R, Krause KD, Darwish GH, et al. Photoluminescent Nanoparticles for Chemical and Biological Analysis and Imaging. *Chem Rev.* 2021 Aug 11;121(15):9243–358.
50. Pan K, Zhong Q. Organic Nanoparticles in Foods: Fabrication, Characterization, and Utilization. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2016 Feb 28;7(1):245–66.
51. Gujrati M, Malamas A, Shin T, Jin E, Sun Y, Lu ZR. Multifunctional Cationic Lipid-Based Nanoparticles Facilitate Endosomal Escape and Reduction-Triggered Cytosolic siRNA Release. *Mol Pharmaceutics.* 2014 Aug 4;11(8):2734–44.
52. Joudeh N, Linke D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *J Nanobiotechnol.* 2022 Jun 7;20(1):262.
53. Bera D, Qian L, Tseng TK, Holloway PH. Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review. *Materials.* 2010 Mar 24;3(4):2260–345.

54. Jiao M, Zhang P, Meng J, Li Y, Liu C, Luo X, et al. Recent advancements in biocompatible inorganic nanoparticles towards biomedical applications. *Biomater Sci.* 2018;6(4):726–45.
55. Jin R, Zeng C, Zhou M, Chen Y. Atomically Precise Colloidal Metal Nanoclusters and Nanoparticles: Fundamentals and Opportunities. *Chem Rev.* 2016 Sep 28;116(18):10346–413.
56. Liu Y, Kannegulla A, Wu B, Cheng LJ. Quantum Dot Fullerene-Based Molecular Beacon Nanosensors for Rapid, Highly Sensitive Nucleic Acid Detection. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018 Jun 6;10(22):18524–31.
57. Verma M, Chan YH, Saha S, Liu MH. Recent Developments in Semiconducting Polymer Dots for Analytical Detection and NIR-II Fluorescence Imaging. *ACS Appl Bio Mater.* 2021 Mar 15;4(3):2142–59.
58. Reisch A, Didier P, Richert L, Oncul S, Arntz Y, Mély Y, et al. Collective fluorescence switching of counterion-assembled dyes in polymer nanoparticles. *Nat Commun.* 2014 Jun 9;5(1):4089.
59. Melnychuk N, Klymchenko AS. DNA-Functionalized Dye-Loaded Polymeric Nanoparticles: Ultrabright FRET Platform for Amplified Detection of Nucleic Acids. *J Am Chem Soc.* 2018 Aug 29;140(34):10856–65.
60. Sreenivasan VKA, Zvyagin AV, Goldys EM. Luminescent nanoparticles and their applications in the life sciences. *J Phys: Condens Matter.* 2013 May 15;25(19):194101.
61. Runser A. Nanoparticules de polymères fluorescentes, ultrapetites, ultrabrillantes et furtives pour le suivi intracellulaire et l'imagerie super-résolutive. 2020;
62. Egloff S, Melnychuk N, Reisch A, Martin S, Klymchenko AS. Enzyme-free amplified detection of cellular microRNA by light-harvesting fluorescent nanoparticle probes. *Biosensors and Bioelectronics.* 2021 May;179:113084.
63. Lu W, Chen Y, Liu Z, Tang W, Feng Q, Sun J, et al. Quantitative Detection of MicroRNA in One Step *via* Next Generation Magnetic Relaxation Switch Sensing. *ACS Nano.* 2016 Jul 26;10(7):6685–92.
64. Shin JS, Li S. DNA-Immobilized Fluorescent Polystyrene Nanoparticles as Probes with Tunable Detection Limits. *ACS Omega.* 2022 Dec 27;7(51):48310–9.
65. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer.* 2008 Jan;8(1):61–70.

66. Egloff S, Melnychuk N, Reisch A, Martin S, Klymchenko AS. Enzyme-free amplified detection of cellular microRNA by light-harvesting fluorescent nanoparticle probes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2021 May;179:113084.
67. Wang N, Zhang J, Xiao B, Sun X, Xie R, Chen A. Recent advances in the rapid detection of microRNA with lateral flow assays. *Biosensors and Bioelectronics*. 2022 Sep;211:114345.
68. Quesada-González D, Merkoçi A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015 Nov;73:47–63.
69. Gong X, Cai J, Zhang B, Zhao Q, Piao J, Peng W, et al. A review of fluorescent signal-based lateral flow immunochromatographic strips. *J Mater Chem B*. 2017;5(26):5079–91.
70. Bai Y, Tian C, Wei X, Wang Y, Wang D, Shi X. A sensitive lateral flow test strip based on silica nanoparticle/CdTe quantum dot composite reporter probes. *RSC Adv*. 2012;2(5):1778.
71. Wang D, He S, Wang X, Yan Y, Liu J, Wu S, et al. Rapid lateral flow immunoassay for the fluorescence detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nat Biomed Eng*. 2020 Dec 3;4(12):1150–8.
72. Huang J, Wu J, Li Z. Biosensing using hairpin DNA probes. *Reviews in Analytical Chemistry*. 2015 Jan 1;34(1–2):1–27.
73. Wang K, Tang Z, Yang CJ, Kim Y, Fang X, Li W, et al. Molecular Engineering of DNA: Molecular Beacons. *Angew Chem Int Ed*. 2009 Jan 19;48(5):856–70.
74. Bidar N, Oroojalian F, Baradaran B, Eyvazi S, Amini M, Jebelli A, et al. Monitoring of microRNA using molecular beacons approaches: Recent advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2020 Oct;131:116021.
75. Sun Y, Qu X, Qiu P, Mao C. A nanoparticle-based molecular beacon for directly detecting attomolar small RNA from plasma without purification. *Talanta*. 2023 Aug;260:124602.
76. Huang L, Qian K. Precision Diagnosis for the Era of Personalized Medicine. *Small Methods*. 2020 Apr;4(4):1900717.

Nom : Mislin

Prénom : Théo

Titre du mémoire : Le rôle des nanoparticules fluorescentes dans la détection des acides nucléiques en diagnostic *in vitro*

Mots-clés : nanoparticules, fluorescence, acides nucléiques, micro-ARN, détection

Résumé :

Le secteur du diagnostic *in vitro* est en plein essor depuis plusieurs années et son importance a notamment été démontrée depuis la pandémie du SARS-CoV-2. La détection et le dosage spécifiques de séquences d'acides nucléiques est un segment important de ce marché qui permet un diagnostic précoce et fiable de nombreuses pathologies. La majorité des méthodes actuelles sont confrontées à la même problématique : amplifier le matériel génétique présent dans l'échantillon afin d'obtenir un signal suffisant. Cette étape d'amplification complexifie les méthodes car elle doit être réalisée dans un laboratoire spécialisé, doté de matériel performant et de personnel qualifié. Aujourd'hui, de nouvelles solutions émergent et arriveront sur le marché dans les prochaines années. Les nanoparticules fluorescentes permettent de s'affranchir de l'étape d'amplification en augmentant le signal émis à partir d'une concentration très faible en acides nucléiques. De récentes études ont prouvé l'efficacité de ces méthodes dans le dosage de micro-ARN avec un grand potentiel pour le diagnostic précoce de nombreux cancers.

Résumé en anglais :

The *in vitro* diagnostics field has been growing rapidly for several years, and its importance has been highlighted during the SARS-CoV-2 pandemic. The specific detection of nucleic acid sequences is an important part of this market, enabling early and reliable diagnosis of numerous pathologies. Most of current methods face the same problem: amplifying the genetic material present in the sample to obtain a sufficient signal. This amplification step complicates the methods, as it must be carried out in a specialized laboratory, with high-performance equipment and qualified technicians. Today, new solutions are emerging and will reach the market in the next few years. Fluorescent nanoparticles make it possible to bypass the amplification step by increasing the signal emitted from a very low nucleic acid concentration. Recent studies have demonstrated the effectiveness of these methods in microRNAs assays, with great potential for the early diagnosis of many cancers.