

Hyperthermie magnétique et détection électrochimique pour le relargage et la détection de microARN sans amplification de type PCR

Résumé La réaction en chaîne par polymérase (PCR), méthode de référence pour la mesure d'acides nucléiques ADN en biologie clinique, est basée sur une amplification chimique du nombre des copies d'une ou plusieurs séquences ADN pour pouvoir les amener à un seuil détectable. Bien que robuste, la méthodologie PCR présente l'inconvénient majeur d'être inadaptée pour la biologie d'urgence car le rendu d'un résultat (préparation, extraction, amplification et quantification) peut atteindre entre 4 et 6 heures. L'autre inconvénient, dans le cas des séquences ARN, est une étape supplémentaire de transcription inverse (RT) (ARN en ADN), étape délicate rallongeant encore le temps du protocole. Enfin, la technologie PCR est très consommatrice en énergie à cause des systèmes de régulation nécessaires pour les cycles de températures jusqu'à 95 °C. Cet article présente la preuve de concept d'un nouveau procédé couplant l'hyperthermie magnétique et la détection électrochimique (HDE) en microfluidique pour le relargage et la détection directe en moins de 3 h, à un seuil de détection de 10^{-18} M, d'un microARN synthétique et spécifique des lésions du foie (miR 122). L'objectif est d'aboutir à une sorte de biopsie microfluidique liquide rapide (1 h 30) pour le diagnostic d'urgence.

Mots-clés Microfluidique, électrochimie, hyperthermie, nanoparticules magnétiques, acides nucléiques, PCR.

Abstract Magnetic hyperthermia and electrochemical detection for the release and detection of microRNAs without PCR type amplification

Polymerase chain reaction (PCR), the reference method for measuring DNA nucleic acids in clinical biology, is based on chemical amplification of the number of copies of one or more DNA sequences in order to bring them to a detectable threshold. Although robust, the PCR methodology has the major drawback of being unsuitable for emergency biology because the rendering of a result (preparation, extraction, amplification and quantification) can reach between 4 and 6 hours. The other drawback, in the case of RNA sequences, is an additional reverse transcription (RT) step (RNA to DNA), a delicate step which further lengthens the protocol time. Finally, PCR is a very energy-consuming technology because of the regulation systems required for temperature cycles up to 95 °C. This article presents the proof of concept of a new process coupling magnetic hyperthermia and electrochemical detection (HDE) in microfluidics for nucleic acids release and direct detection, in less than 3 hours and at a detection threshold of 10^{-18} M, of a synthetic microRNA specific for liver lesions (miR 122). The goal is to achieve a kind of rapid microfluidic biopsy (1h30) for emergency diagnosis.

Keywords Microfluidics, electrochemistry, hyperthermia, magnetic nanoparticles, nucleic acids, PCR.

La détection de séquences d'acides nucléiques

Ces derniers mois, du fait de la crise sanitaire due à la Covid-19, le sigle PCR (« polymérase chain reaction », réaction en chaîne par polymérase) a été rendu célèbre auprès du grand public comme méthode de référence pour détecter les séquences d'acides nucléiques (ADN, ARN). Actuellement, l'analyse des ARN dans un échantillon biologique se décompose généralement en quatre étapes. La première est l'extraction des ARN à partir de centaines de microlitres d'échantillon (plasma, sérum, salive...). La deuxième est la transcription inverse (« reverse transcription », RT) des ARN en ADN complémentaires. Elle est suivie d'une troisième étape d'amplification chimique des ADN complémentaires par PCR quantitative en temps réel. Enfin, la dernière étape consiste en l'exploitation des cinétiques d'amplification par PCR (analyse des cycles seuils). Bien que cette analyse permette au final d'atteindre un seuil de détection femtomolaire, le protocole reste très long (voir *tableau 1*), à savoir environ 2 à 3 heures pour l'extraction, 1 à 2 heures pour la RT (le temps de réaction pour la RT est d'1 heure), et 2 heures pour la PCR en temps réel (le temps de la réaction PCR est de 30 à 40 minutes) [1-2]. Un autre inconvénient majeur est l'étape d'amplification et de détection (étape 3). Bien qu'ayant beaucoup évolué ces

dernières années, les techniques de PCR sont limitées par la nécessité de mener plusieurs cycles d'amplification en température (94, 55, 72 et 37 °C). Ce paramètre devient critique dès lors qu'il s'agit de le contrôler finement en systèmes miniaturisés. En cause, les contraintes liées au chauffage global (intégration d'une boucle de rétroaction pour compenser les pertes thermiques) d'une solution biologique, qui est un point délicat dans un processus d'amplification et/ou de détection d'une cible biologique, tel que celui utilisé dans le protocole PCR.

Les microARN sont des séquences d'acides nucléiques d'intérêt, composés de quelques dizaines de bases. Les données récentes de la littérature montrent que les microARN circulants sont des biomarqueurs précoces et spécifiques de certaines pathologies, musculaires en particulier. Ils sont classiquement mesurés par PCR, ce qui limite leur utilisation dans le cadre du diagnostic d'urgence, pour lequel le temps d'analyse est un élément clé pour une prise en charge efficace du patient.

Principe de la méthode HDE

Notre approche alternative à la PCR est un procédé microfluidique récemment breveté [3]. Il est basé sur l'association

Tableau I - Performances comparatives des temps de protocoles et seuils de détection (actuels et à venir) avec la technique classique PCR.

Comparaison/performances	Volume d'échantillon	Temps moyen de prétraitement	Temps moyen de détection	Limite de détection	Température de travail
PCR Extraction Transcription inverse (RT) Amplification et détection	200 µL	2 h [1] 3 h [12-13]	2 h	1×10^{-17} M [14]	Rampe (94 à 37 °C)
HDE Capture Relargage Détection	200 nL	1 h et 50 min 30 min	30 min [6]	1×10^{-18} M [3]	Ambiante

de deux modules sur puce, l'un dédié à l'hyperthermie magnétique de nanoparticules d'oxyde de fer [4], et l'autre à la détection électrochimique (HDE) pour la capture, la préconcentration, le relargage et la détection électrochimique [5-7], méthode qui ne nécessite aucune étape d'amplification pour quantifier des microARN cibles dans un volume de 200 nL. Les microARN cibles sont capturés et préconcentrés sur des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (NPS) recouvertes par une couche de silice (cœur-coquille) [8-10] et fonctionnalisées en surface par des ADN sondes complémentaires des microARN cibles. Dans l'écoulement fluide, grâce à l'application d'un champ magnétique alternatif, elles exhibent un pouvoir chauffant dont les pertes thermiques permettent de chauffer uniquement l'entourage de la nanoparticule sur quelques nanomètres, sans modifier la température globale de la solution. Ce procédé permet de déclencher sélectivement le relargage des microARN cibles au voisinage des microélectrodes en vue de leur détection, limitant ainsi les effets de dilution et/ou d'adsorption sur les parois des microcanaux.

À l'heure actuelle, le set-up expérimental nous permet de réaliser toutes les étapes de l'analyse en moins de 3 heures avec un seuil de détection attomolaire, meilleur qu'en PCR, et ce sans amplification. À court terme, le projet de valorisation de la méthodologie HDE est de réduire encore ce temps d'analyse par deux. Cela passe, d'une part, par une incrémentation du procédé technologique pour les mesures multiplexées sur puces et par une optimisation de la synthèse des NPS pour une meilleure efficacité des étapes de capture et de relargage des cibles et, d'autre part, par l'assemblage des différents appareillages de laboratoire actuellement placés autour de la puce microfluidique au sein d'un instrument compact pour actionner/chauffer les NPS, et pour récupérer le signal électrochimique lors de la détection par hybridation sonde-cible sur microélectrode.

Procédés de synthèse des nanoparticules et de microfabrication des puces HDE

Synthèse des nanoparticules superparamagnétiques

Notre approche implique la synthèse et la bio-fonctionnalisation de nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer de type cœur-coquille ($\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2@ADN$ -sonde). La synthèse des nanoparticules magnétiques, constituées d'un cœur de maghémite protégé par une couche de silice, fonctionnalisées en surface par des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) et des groupes fonctionnels, est bien maîtrisée par le laboratoire PHENIX (figure 1). En utilisant des groupes fonctionnels $-\text{NH}_2$ à la surface des nanoparticules, un

couplage covalent des ADN sondes, modifiés par un groupement acide carboxylique terminal, est effectué via un couplage peptidique en présence de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et de *N*-hydroxysuccinimide (NHS).

Microfabrication du dispositif microfluidique pour l'hyperthermie sur NPS

Le dispositif microfluidique est composé de deux wafers en verre (1,5 pouces) de 300 µm d'épaisseur. Sur l'un est gravé le circuit microfluidique par gravure isotrope dans un mélange HF (acide nitrique (HNO_3) et acide fluorhydrique (HF)) à 50 µm de profondeur ; sur l'autre sont lithographiées les microélectrodes comme capot qui vient fermer hermétiquement le microdispositif (figure 2 p. 34). Le dispositif microfluidique en verre est inséré dans l'entrefer (gap de 1 mm) d'une bobine torique magnétique. Les nanoparticules comportant en surface les ADN doubles brins sonde-cible sont introduites à l'aide d'un pousse-seringue dans la puce microfluidique et voient un champ homogène de 370 G pendant 12 secondes (temps de séjour des NPS dans le serpentier fluide).

• Méthode de détection par fluorescence

Dans le cas où le capot inférieur ne contient pas de microélectrodes, la solution obtenue en sortie de canal est filtrée et analysée en fluorescence par un kit commercial (Oligreen de Life Technologies), calibré avec des standards de la cible. La méthode par fluorescence a comme principaux inconvénients une sensibilité de détection beaucoup plus faible et la nécessité d'une récupération de la solution en sortie de la puce microfluidique, d'une filtration et d'une dilution en cuvette en vue du dosage des cibles relarguées.

• Méthode de détection par électrochimie

Le module de détection électrochimique en aval du module d'hyperthermie a comme principaux avantages un seuil de détection beaucoup plus faible [5-6] et la diminution des temps entre les protocoles (filtration, dilution et dosage) hors puce microfluidique. La figure 2 décrit l'utilisation d'un système comprenant un réseau de paires de microélectrodes en or fonctionnalisées avec les séquences ADN sondes (dérivées avec une fonction thiol pour l'adsorption d'une monocouche sur l'or) pour détecter les cibles relarguées en solution dans le microcanal. La limite de détection (LOD) obtenue pour un type de microARN synthétique est de 10^{-18} M sans amplification PCR (voir tableau I).

Le tableau I compare les performances atteignables en temps de protocoles et en seuils de détection en comparaison avec le kit Qiagen® pour la technique PCR en temps réel et la

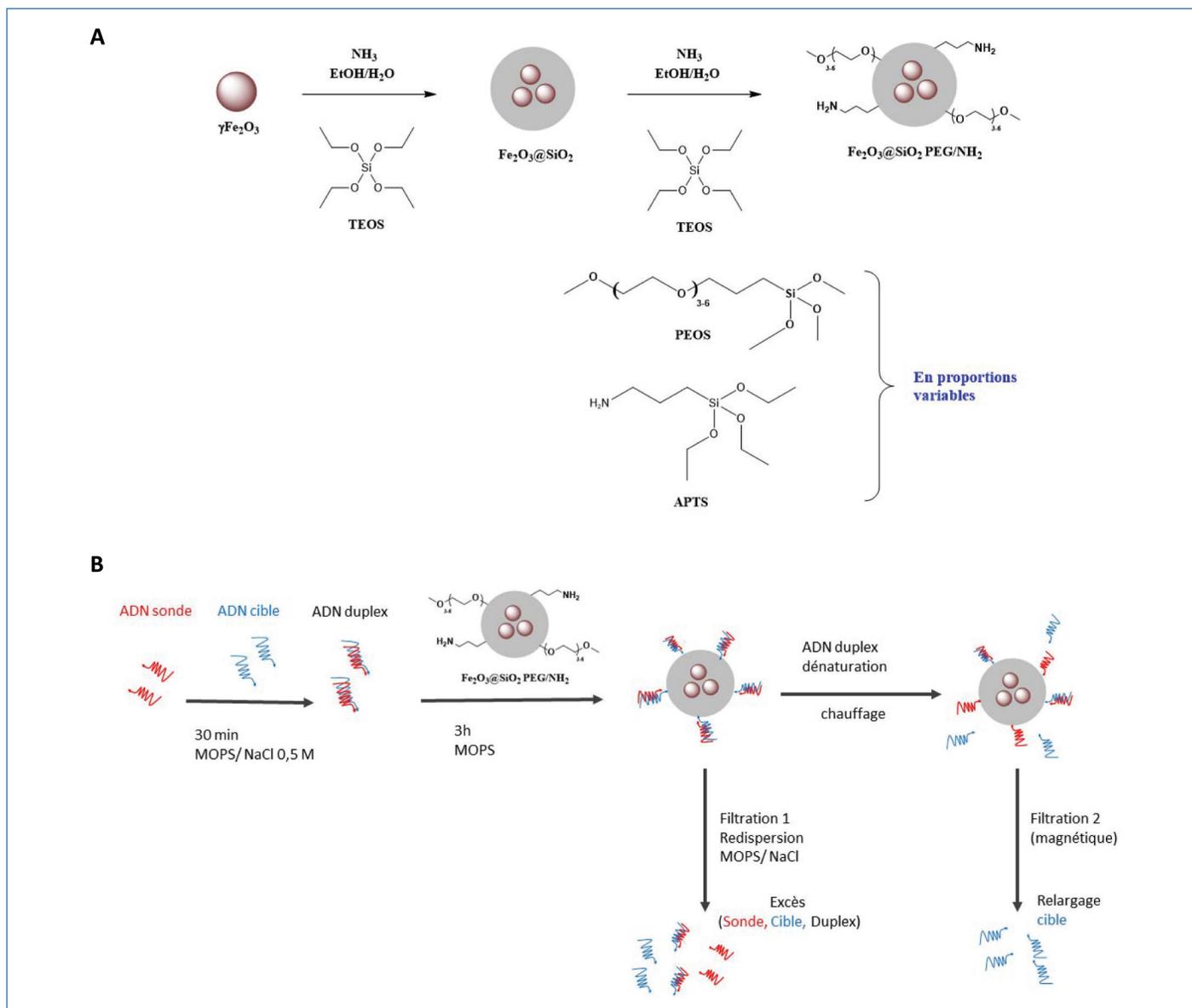


Figure 1 - A) Schéma de l'encapsulation de nanoparticules de maghémite par de la silice, suivie de la fonctionnalisation de la surface avec des chaînes de PEG et des groupements amine. B) Fonctionnalisation de la surface par doubles brins d'ADN (ADN sonde/ADN cible).
 TEOS : tetraéthylorthosilicate ; APTS : aminopropyltriéthoxysilane ; PEOS : 3-[méthoxy(polyéthylèneoxy) propyl] triméthoxysilane ; MOPS : 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid.

technique HDE pour la détection du microARN (miR 122) impliqué dans les maladies hépatiques (lésions du foie). En effet, la détection directe du miR, sans amplification PCR, constitue un défi majeur pour la réduction drastique des temps d'analyses et l'utilisation des miR comme biomarqueurs en médecine d'urgence. Dans ce contexte, nous avons montré qu'il est possible de coupler microfluidique et électrochimie pour minimiser le volume d'analyte (~ 200 nL) et d'optimiser la durée la détection (< 30 min). Reste cependant le problème de la durée des expériences lors de l'étape de prétraitement de l'échantillon par le biais de kits standards d'extraction des cibles (pré-PCR) ou par le biais de nanoparticules magnétiques pour la capture des cibles (HDE), qui demeurent longues.

Vers un laboratoire sur puce

L'association des compétences issues de deux UMR CNRS dans ce programme a été indispensable pour la réussite de ce projet ambitieux : le Centre de Nanosciences et de Nanotechnologies (C2N, UMR 9001 CNRS/Université Paris-Saclay) pour l'électrochimie et la fabrication des microdispositifs, le

laboratoire Physico-chimie des Electrolytes et Nano-systèmes Interfaciaux (PHENIX, UMR 8234 CNRS/Sorbonne Université) pour la synthèse des nanoparticules et la physique de ces nanoparticules fonctionnalisées. Les chercheurs impliqués – Jean Gamby (C2N), Jean-Michel Siaugue et Vincent Dupuis (PHENIX) – ont bénéficié du soutien du programme CNRS prématurité et du labex Nanosacly pour la consolidation de la technologie HDE sur la période 2018-2020.

Les retombées directes de la méthode HDE se distribueront entre les domaines de la microfluidique, de la chimie de surface et des colloïdes (fonctionnalisations d'électrodes, synthèse et fonctionnalisation de NPS), de la chimie analytique (comparaison des techniques de détection HDE vs PCR...) et de la chimie-physique fondamentale (étude et modélisation de l'hyperthermie, et de la cinétique du processus de transfert de brins d'acide nucléique d'une particule vers une électrode).

Dans le cadre du projet ANR Dimelec [11], nous voulons développer une plateforme microfluidique intégrant différents modules sur un laboratoire sur puce capable : d'extraire de l'échantillon patient directement sur puce les microARN

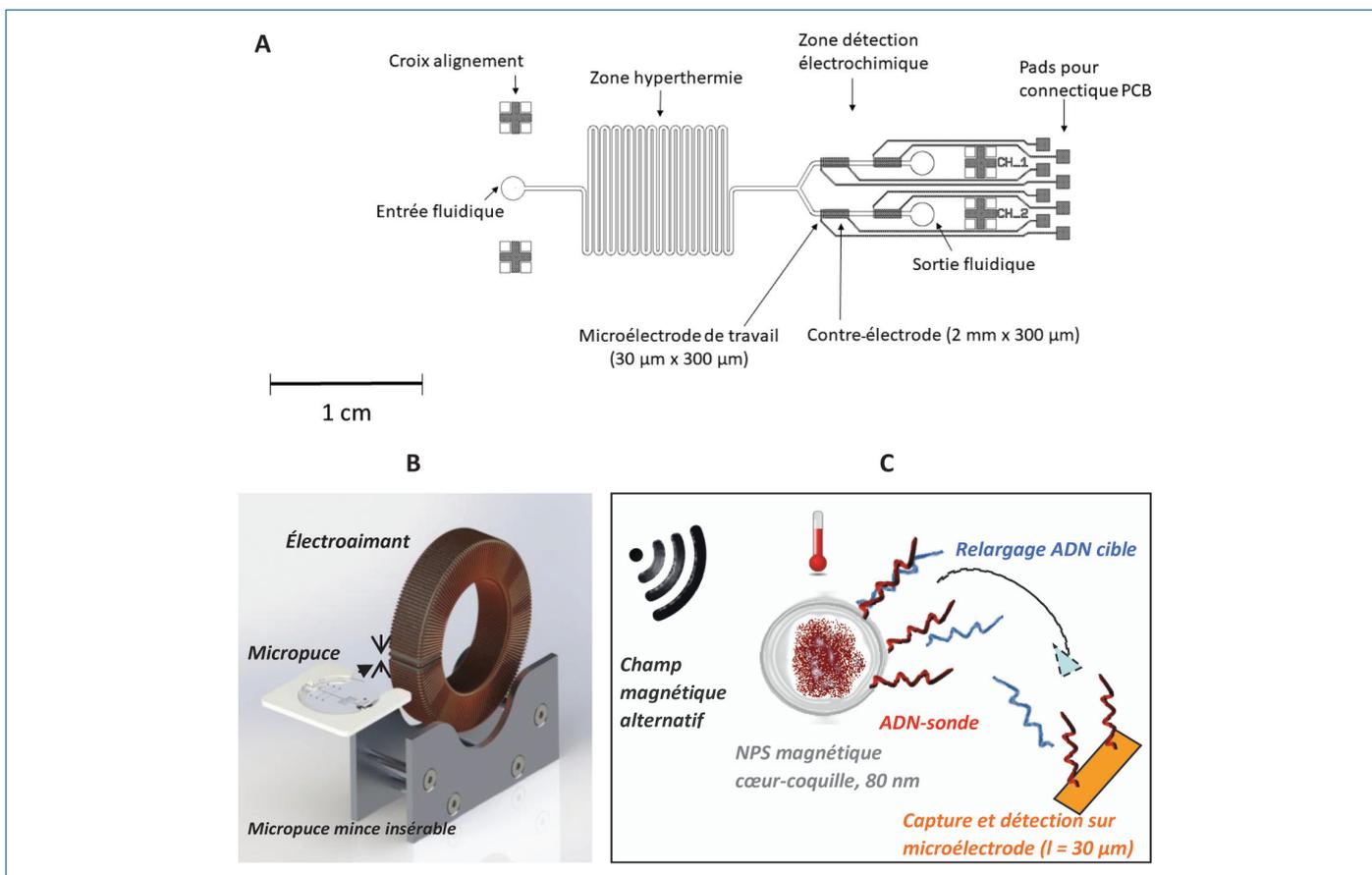


Figure 2 - A) Vue schématique d'une puce microfluidique comportant un module d'hyperthermie magnétique et deux canaux microfluidiques ayant chacun deux paires d'électrodes (WE et CE). B) Image d'une puce microfluidique insérable dans un entrefer dans lequel les NPS-sondes-cibles sont chauffées pour le relargage des cibles dans le module de détection. C) Protocole d'extraction et de détection mis en œuvre dans le dispositif HDE : préconcentration par capture spécifique des cibles sur NPS, relargage thermosensible par hyperthermie magnétique et détection ultrasensible sur microélectrodes sondes.

cibles de maladies cardiovasculaires en utilisant des nanoparticules (NPS) fonctionnalisées pour la capture, la préconcentration et le transport des microARN ; de les relarguer localement par hyperthermie magnétique ; et enfin, de les détecter dans une matrice de microélectrodes préfonctionnalisées. La détection matricielle sera rendue possible grâce à un multipotentiostat développé lors de ce projet, adapté aux matrices de microélectrodes en termes de spécificités et d'ergonomie d'utilisation, module qui n'existe pas actuellement pour les applications couplant électrochimie et microfluidique. Ce programme de recherche est cofinancé grâce au soutien du Labex NanoSaclay AAP 2020 Recherche (projet e-miRGency, maladies cardiovasculaires).

- [8] T. Georgelin, S. Bombard, J.-M. Siaugue, V. Cabuil, Nanoparticle-mediated delivery of bleomycin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, p. 8897-8901.
- [9] T.D. Mai, F. d'Orlyé, C. Ménager, A. Varenne, J.-M. Siaugue, Red blood cells decorated with functionalized core-shell magnetic nanoparticles: elucidation of the adsorption mechanism, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, p. 5393-95.
- [10] H. Schöneborn *et al.*, Novel tools towards magnetic guidance of neurite growth: (I) Guidance of magnetic nanoparticles into neurite extensions of induced human neurons and in vitro functionalization with RAS regulating proteins, *J. Funct. Biomater.*, **2019**, *10*(3), 32.
- [11] ANR Dimelec, « Dispositifs microfluidiques intégrant des modules de capture, de relargage et de détection électrochimique matricielle de microARN », **2019**. Porteur et coordinateur scientifique : Jean Gamby (CNRS, Université Paris-Saclay), en collaboration avec le LISE (Alain Pailleret, CNRS Sorbonne Université), le laboratoire PHENIX (Jean-Michel Siaugue, CNRS Sorbonne Université), le laboratoire IRBA (Sébastien Banzet, Inserm, Hôpital de Clamart), et en partenariat avec le laboratoire PASTEUR (Laurent Thouin, CNRS, ENS). Financement : 1^{er} janvier 2020 au 30 juin 2023.
- [12] E. Van Rooij, The art of MicroRNA research, *Circ. Res.*, **2011**, *108*, p. 219-234.
- [13] V. Benes, M. Castoldi, Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available, *Methods*, **2010**, *50*, p. 244-249.
- [14] B.S. Ferguson *et al.*, Integrated microfluidic electrochemical DNA sensor, *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, p. 6503-08.

[1] S. Liu, Z. Zhang, M. Han, Gram-scale synthesis and biofunctionalization of silica-coated silver nanoparticles for fast colorimetric DNA detection, *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, p. 2595-2600.

[2] B. Hainque, B. Baudin, P. Lefebvre, *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*, Flammarion Médecine-Sciences, **2008**.

[3] M.-C. Horny, J.-M. Siaugue, V. Dupuis, M. Lazerges, J. Gamby, Process for detecting nucleic acid molecules by magnetic hyperthermia and assembly enabling such detection, CNRS, Inserm, Sorbonne Université, Paris Descartes, WO/2019/068844, **2019**.

[4] J.T. Dias *et al.*, DNA as a molecular local thermal probe for the analysis of magnetic hyperthermia, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, p. 11526-29.

[5] M. Faure, A. Pallandre, S. Chebil, I. Le Potier, M. Taverna, B. Tribollet, C. Deslouis, A.-M. Haghir-Gosnet, J. Gamby, Improved electrochemical detection of a transthyretin synthetic peptide in the nanomolar range with a two-electrode system integrated in a glass/PDMS microchip, *Lab Chip*, **2014**, *14*, p. 2800-05.

[6] M.C. Horny, M. Lazerges, J.M. Siaugue, A. Pallandre, D. Rose, F. Bedioui, C. Deslouis, A.-M. Haghir-Gosnet, J. Gamby, Electrochemical DNA biosensors based on long-range electron transfer: investigating the efficiency of a fluidic channel microelectrode compared to an ultramicroelectrode in a two-electrode setup, *Lab Chip*, **2016**, *16*, p. 4373-81.

[7] E. Roy, A. Pallandre, B. Zribi, M.-C. Horny, F.-D. Delapierre, A. Cattoni, J. Gamby, A.-M. Haghir-Gosnet, Molecular microfluidic bioanalysis: recent progress in preconcentration, separation, and detection, in *Advances in Microfluidics - New Applications in Biology, Energy, and Materials Sciences*, X.-Y. Yu (ed.), IntechOpen, **2016**, doi: 10.5772/65772.

Marie-Charlotte HORNY, docteure de Sorbonne Université (laboratoires C2N, PHENIX, LISE), **Pedro GONZÁLEZ LOSADA**, ingénieur de recherche au C2N, **Claire POUJOLY**, doctorante de l'Université Paris-Saclay (C2N), **Vincent DUPUIS** et **Jean-Michel SIAUGUE***, maîtres de conférences, Sorbonne Université, CNRS, Physico-chimie des Électrolytes et Nanosystèmes Interfaciaux (PHENIX), UMR 8234, Paris, et **Jean GAMBYS****, chargé de recherche au CNRS, Université Paris-Saclay, CNRS, Centre de Nanosciences et de Nanotechnologies (C2N), UMR 9001, Palaiseau.

*jean-michel.siaugue@sorbonne-universite.fr

**jean.gamby@universite-paris-saclay.fr