



HAL
open science

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

Marie Charlotte Horny, Pedro González-Losada, Claire Poujouly, Vincent Dupuis, Jean-Michel Siaugue, Jean Gamby

► **To cite this version:**

Marie Charlotte Horny, Pedro González-Losada, Claire Poujouly, Vincent Dupuis, Jean-Michel Siaugue, et al.. Hyperthermie magnétique et détection électrochimique pour le relargage et la détection de microARN sans amplification de type PCR. *L'Actualité Chimique*, 2021, 459, pp.31-34. hal-03146596

HAL Id: hal-03146596

<https://hal.science/hal-03146596>

Submitted on 24 Feb 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Magnetic hyperthermia and electrochemical detection for the release and detection of microRNAs without « polymerase chain reaction » type amplification

Marie-Charlotte Horny,^{1,2,3} Pedro Gonzalez-Losada,¹ Claire Poujouly,¹ Vincent Dupuis,²

Jean-Michel Siaugue,² and Jean Gamby^{1,*}

Abstract

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. In this article, we present 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 a synthetic microRNA (miR) 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

¹ Université Paris-Saclay, CNRS, Centre de Nanosciences et de Nanotechnologies, 91120, Palaiseau, France.

Corresponding author (J. Gamby): e-mail: jean.gamby@c2n.upsaclay.fr.

² Sorbonne Université, CNRS, Physico-chimie des Électrolytes et Nanosystèmes Interfaciaux, PHENIX, F-75005 Paris, France.

³ Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, LISE, F-75005 Paris, France.

Titre Français

Hyperthermie magnétique et détection Electrochimique pour le relargage et la détection de microARN sans amplification de type « réaction en chaîne par polymérase »

Résumé Français

La 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, c'est une étape supplémentaire de reverse transcription (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. Dans cet article, nous présentons la preuve de concept d'un nouveau procédé couplant l'hyperthermie magnétique et la détection électrochimie (HDE) en microfluidique pour le relargage et détection directe en moins de 3h et à un seuil de détection de 10^{-18} M d'un microARN (miR) synthétique et spécifique des lésions du foie (miR 122). Le but visé est d'aboutir à une sorte de biopsie microfluidique rapide (1h30) pour le diagnostic d'urgence.

Mots clés Français

Microfluidique, électrochimie, hyperthermie, nanoparticules magnétiques, acides nucléiques, PCR

1. Introduction : La détection de séquences d'acides nucléiques

Ces derniers mois, du fait de la crise sanitaire due au Covid-19, le sigle P.C.R « 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 4 étapes. La première étape est l'extraction des ARN à partir de centaines de microlitres d'échantillon (plasma, sérum, salive,...). La deuxième étape est la transcription inverse (RT) des ARN en ADN complémentaires. Elle est suivie d'une troisième étape d'amplification chimique des ADN complémentaires par P.C.R (réaction en chaîne par polymérase) 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 (Tableau 1). A 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 2h 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 évolué beaucoup ces dernières années, les techniques de PCR sont limitées par la nécessité de mener plusieurs cycles d'amplification en température (94°C, 55°C, 72°C 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 micro-ARN 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.

2. Principe de la méthode HDE

Notre approche alternative à la PCR est un procédé microfluidique récemment breveté.³ Il se base sur l'association de deux modules sur puce, l'un dédié à l'hyperthermie magnétique de nanoparticules d'oxyde de fer⁴ et l'autre à la détection électrochimique (H.D.E) pour la capture, la pré-concentration, le relargage et la détection électrochimique,^{5,6,7} 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)^{8,9,10} 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 adsorption sur les parois des microcanaux. A l'heure actuelle, le set-up expérimental nous permet de réaliser toutes les étapes de l'analyse en moins de 3h00 avec un seuil de détection attomolaire, meilleur qu'en PCR, et ce sans amplification. A court-terme le projet de valorisation de la méthodologie H.D.E 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.

3. Résultats

3.1. Procédés de synthèse des nanoparticules et de microfabrication des puces HDE

3.1.1. 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 $-NH_2$ à la surface des NP, 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).

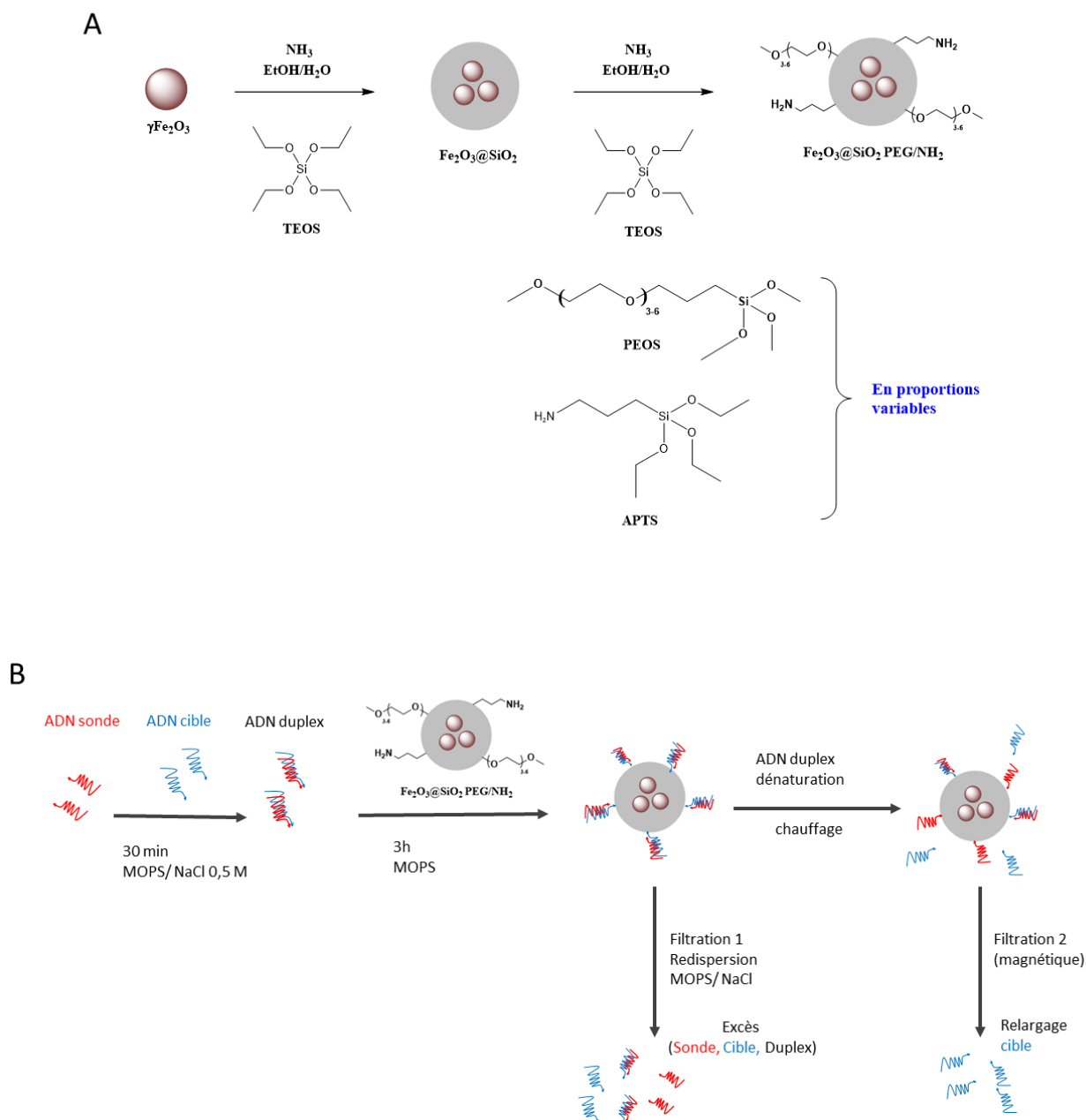


Figure 1. A. Schéma de l'encapsulation des cœurs de maghémite par de la silice, suivi de la fonctionnalisation de la surface avec des chaînes de PEG et des groupements amine, et caractérisation TEM des NPs (80 nm). **B.** Fonctionnalisation avec des ADN sondes pour la capture des ADN cibles. Abréviations : TEOS : tetraéthylorthosilicate; APTS : aminopropyltriéthoxysilane; PEOS : 3-[methoxy(polyéthylèneoxy) propyl] triméthoxysilane; MOPS : 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid.

3.2. 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). 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 serpentin fluidique).

3.3. 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.

3.4. 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 (Tableau 1).

A

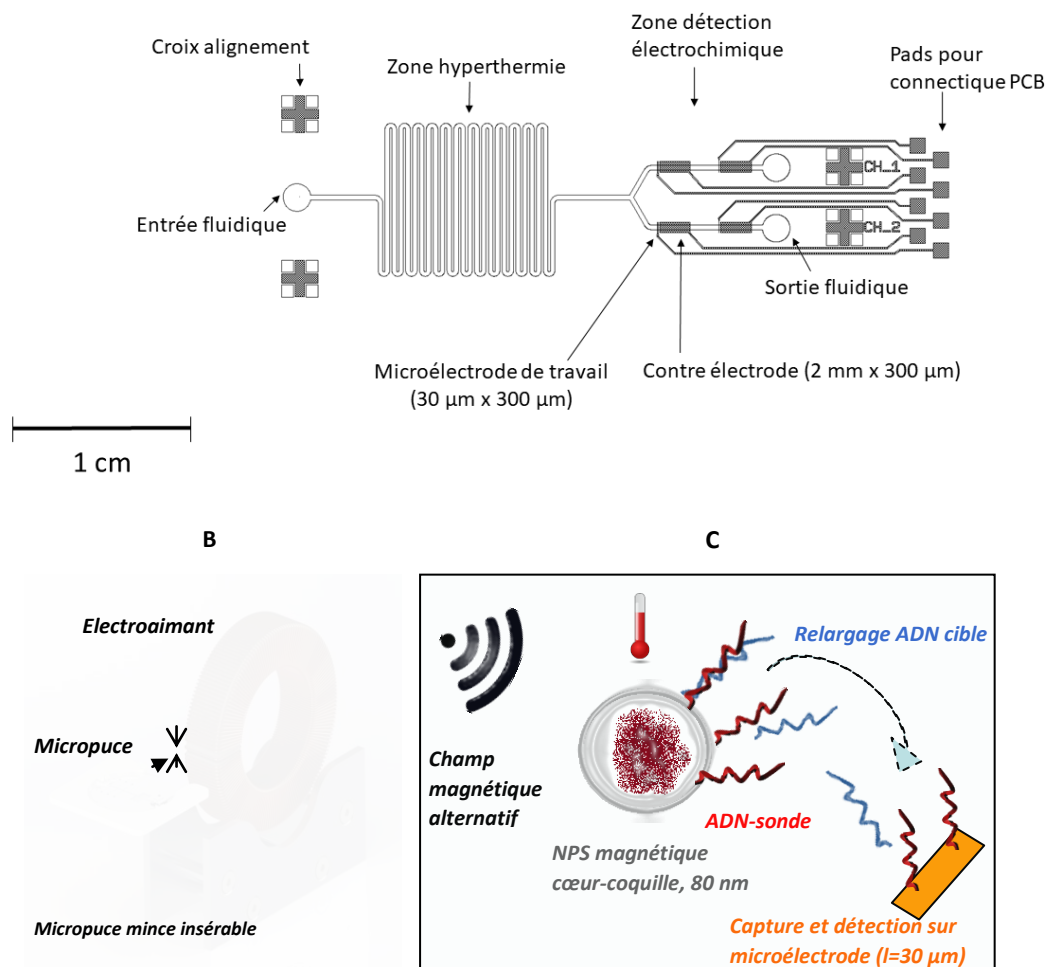


Figure 2. **A.** Vue schématique d'une puce microfluidique comportant un module d'hyperthermie magnétique et deux canaux microfluidiques comportant chacun 2 paires d'électrodes (WE et CE). **B.** Image d'une puce microfluidique insérable dans un entrefer dans lequel les NPS-sondes-cibles sont chauffées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

Le tableau 1 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 technique HDE pour la détection du microARN (miR-122) impliquée dans les maladies hépatiques (lésions du foie). En effet, la détection directe de miR, sans amplification PCR, constitue donc un défi majeur pour la réduction drastique des temps d'analyses et l'utilisation des miRs 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 minutes). Reste cependant le problème de la durée des expériences lors de l'étape de pré-traitement 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.

Tableau 1. Performances comparatives des temps de protocoles et seuils de détection (actuels et avenir) avec la technique classique PCR.

Comparaison / Performances	Volume d'échantillon	Temps moyen prétraitement	Temps moyen détection	Limite de détection	Température de travail
P.C.R Extraction Transcription inverse (RT) Amplification Détection et	200 µL	2h ⁽ⁱ⁾ 3h ^(ii,iii)	2h	1×10^{-17} M ^(iv)	Rampe (94 à 37°C)
H.D.E Capture Relargage Détection	200 nL	1h et 50 min 30 min	30 min ^(v)	1×10^{-18} M ^(vi)	Ambiante

(i) Liu, S., Zhang, Z. & Han, M. Gram-scale synthesis and biofunctionalization of silica-coated silver nanoparticles for fast colorimetric DNA detection. *Anal. Chem.* **77**, 2595–2600 (2005). (ii) Van Rooij, E. The art of MicroRNA research. *Circ. Res.* **108**, 219–234 (2011). (iii) Benes, V. & Castoldi, M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* **50**, 244–249 (2010). (iv) Ferguson, B. S., Buchsbaum, S. F., Swensen, J. S., Hsieh, K., Lou, X., & Soh, H. T. (2009). Integrated microfluidic electrochemical DNA sensor. *Analytical Chemistry*, **81**(15), 6503–6508. (v) Horny, M.-C., Lazerges, M., Siaugue, J.-M., Pallandre, A., Rose, D., Bedioui, F., Deslouis, C., Haghiri-Gosnet, A.-M., Gamby, J. 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* **7**, 307 (2016). (vi) Horny, M. C., Siaugue, J.-M., Dupuis, V., Lazerges, M., Gamby, J., *Procédé de détection de molécules d'acides nucléiques par hyperthermie magnétique et ensemble permettant une telle détection*. CNRS, UPMC, INSERM, Paris Descartes, FR Dépôt demande 1759346, 5 octobre 2017.

4. Conclusion et perspectives

L'association des compétences issues de **2 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 Nanosystèmes Interfaciaux (**PHENIX**), **UMR 8234 CNRS/Sorbonne Université** pour la synthèse des nanoparticules et la physique de ces nanoparticules fonctionnalisées. Les chercheurs impliqués J. Gamby (C2N), J.-M Siaugue et V Dupuis (PHENIX) ont bénéficié du soutien du programme CNRS prématuration et du labex Nanosaclay 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 brin d'acides 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 (i) d'extraire de l'échantillon patient directement sur puce les microARN cibles de maladies cardiovasculaires en utilisant des nanoparticules (NPS) fonctionnalisées pour la capture, la pré-concentration et le transport des microARN, (ii) de les relarguer localement par hyperthermie magnétique, et enfin (iii) de les détecter dans une matrice de microélectrodes pré-fonctionnalisées. La détection matricielle sera rendue possible grâce à un multi-potentiostat, 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 co-financé grâce au soutien du LABEX NANOSACLAY AAP 2020 Recherche (projet e-miRgency, maladies cardiovasculaires).

Remerciements

Ce travail a été soutenu par le LabEx MiChem, qui fait partie des fonds publics français gérés par l'ANR dans le cadre du programme Investissements d'Avenir sous la référence ANR-11IDEX-0004-02.

Les auteurs souhaitent également remercier le réseau français RENATECH dont dépend la plateforme de technologies salles blanches dont dépend le C2N une UMR CNRS/Université Paris-Saclay.

Références:

- (1) Liu, S.; Zhang, Z.; Han, M. Gram-scale synthesis and biofunctionalization of silica-coated silver nanoparticles for fast colorimetric DNA detection. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (8), 2595.
- (2) Hainque, B., Baudin, B., Lefebvre, P. *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*; Flammarion médecine-sciences: Paris, 2008.
- (3) Horny, M.-C.; Siaugue, J.-M.; Dupuis, V.; Lazerges, M.; Gamby, J.; Centre National de la Recherche Scientifique Cnrs , Fr.; Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale Inserm ; Sorbonne Université, Paris Descartes. Process for detecting nucleic acid molecules by magnetic hyperthermia. WO/2019/068844, 2019. .
- (4) Dias, J. T.; Moros, M. a. a. DNA as a molecular local thermal probe for the analysis of magnetic hyperthermia. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (44), 11526.
- (5) Faure, M.; Pallandre, A.; Chebil, S.; Le Potier, I.; Taverna, M.; Tribollet, B.; Deslouis, C.; Haghiri-Gosnet, A.-M.; Gamby, J. Improved electrochemical detection of a transthyretin synthetic peptide in the nanomolar range with a two-electrode system integrated in a glass/PDMS microchip. *Lab on a Chip* **2014**, *14* (15), 2800.
- (6) Horny, M. C.; Lazerges, M.; Siaugue, J. M.; Pallandre, A.; Rose, D.; Bedioui, F.; Deslouis, C.; Haghiri-Gosnet, A. M.; Gamby, J. 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**, *7*, 307.
- (7) Roy, E.; Pallandre, A.; Zribi, B.; Horny, M.-C.; Delapierre, F.-D.; Cattoni, A.; Gamby, J.; Haghiri-Gosnet, A.-M. In *Advances in Microfluidics - New Applications in Biology, Energy, and Materials Sciences*; Yu, X.-Y., Ed.; InTech: Rijeka, 2016, DOI:10.5772/65772 10.5772/65772.
- (8) Georgelin, T.; Bombard, S.; Siaugue, J.-M.; Cabuil, V. Nanoparticle-Mediated Delivery of Bleomycin. *Angew. Chem. Int. Ed* **2010**, *49*, 8897.
- (9) Mai, T. D.; d'Orlyé, F.; Ménager, C.; Varenne, A.; Siaugue, J.-M. Red blood cells decorated with functionalized core-shell magnetic nanoparticles: elucidation of the adsorption mechanism. *Chemical Communications* **2013**, *49* (47), 5393.
- (10) Schöneborn, H.; Raudzus, F.; Secret, E.; Otten, N.; Michel, A.; Fresnais, J.; Ménager, C.; Siaugue, J.-M.; Zaehres, H.; Dietzel, I. D. 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. *Journal of Functional Biomaterials* **2019**, *10* (3), 32.

- (11) **ANR Dimelec.** « Dispositifs microfluidiques intégrant des modules de capture, de relargage et de détection électrochimique matricielle de microARN » obtenu en 2019. Porteur et coordinateur scientifique (Jean Gamby, CR, CNRS Université Paris-Saclay) en collaboration avec le LISE (Alain Pailleret, MCF, CNRS Sorbonne Université), le laboratoire PHENIX (Jean-Michel Siaugue, MCF, CNRS Sorbonne Université), le laboratoire IRBA (Sébastien Banzet Médecin militaire, INSERM, Hôpital de Clamart) et avec un partenariat avec le laboratoire PASTEUR (Laurent Thouin, DR, CNRS, Ecole Normale Supérieure). Financement 1^{er} Janvier 2020 au 30 juin 2023.