

Evaluation du système d'extraction d'ADN automatisée Tecan Freedom Evo® HSM et la chimie Reliaprep™ Large Volume (Promega) à partir de prélèvements de sang total

Mises au point pour la technique MLPA

Résumé :

La préparation d'ADN à partir de sang total est une étape cruciale pour les laboratoires hospitaliers de génétique, qui ont à la fois une activité de diagnostic moléculaire et de stockage (banking). Ces ADN doivent répondre à des exigences de qualité et de concentration pour les techniques d'analyse standards (PCR, qPCR, MLPA, CGH) et de nouvelles générations (séquençage haut débit). Afin de répondre à une activité croissante et assurer une parfaite traçabilité des échantillons, de nombreux laboratoires souhaitent automatiser cette étape d'extraction de l'ADN tout en répondant aux critères de qualité ci-dessus.

Dans cette étude, sont présentés les résultats de l'évaluation du système d'extraction automatisée d'ADN Tecan Freedom Evo® HSM et de la chimie en billes magnétiques Reliaprep™ Large Volume, sur des échantillons de sang total, en comparaison avec une technique colonne (manuelle). Un protocole d'extraction spécifique a été développé pour l'obtention d'ADN de haute qualité, compatible avec la technique MLPA.

C. Vignal et AL Fauret-Amsellem

Département de Génétique - UF de Génétique Moléculaire - Hôpital Robert Debré – 75019 PARIS

Date de publication : novembre 2013

Introduction

Une évaluation du système d'extraction automatisée Tecan Freedom Evo® HSM et du kit Reliaprep™ Large volume (Promega) a été effectuée au sein de notre laboratoire hospitalier pédiatrique réalisant déjà des extractions manuelles et connaissant une activité croissante. Les exigences de traçabilité des réactifs et des échantillons liées à l'accréditation des laboratoires mais aussi les risques d'erreurs liés à l'extraction manuelle des acides nucléiques nous ont orientés vers un processus d'automatisation de cette technique.

Plusieurs spécificités du laboratoire sont à prendre en compte dans le choix d'un extracteur automatique. Nous recevons des échantillons de l'hôpital R. Debré ou d'autres structures en France ou à l'étranger, ce qui engendre une grande hétérogénéité de tubes (tubes pédiatriques et tubes adultes) et de types de prélèvements. Le sang périphérique constitue cependant la majorité des prélèvements reçus. De plus, nous effectuons un grand nombre de techniques nécessitant une bonne qualité d'ADN comme notamment des PCR long fragment, TP-PCR, MLPA, CGH-array et séquençage nouvelle génération. Enfin, nous avons un rôle important de *banking* d'ADN ce qui nous impose d'avoir une quantité importante d'ADN.

Après divers tests, nous avons constaté que notre technique la plus sensible à la qualité de l'ADN était la technique MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Nous avons testé, dans un premier temps, la chimie en billes magnétiques Reliaprep™ Large Volume HT gDNA de Promega avec nos techniques MLPA. Les résultats n'étant pas satisfaisants, Promega nous a proposé plusieurs alternatives au protocole d'extraction standard, parmi lesquelles une nous a paru plus adaptée pour la technique MLPA. Ces résultats encourageants et l'ouverture d'un appel d'offre portant sur les extracteurs automatiques d'acides nucléiques, nous ont conduits à évaluer ce protocole, adapté pour la MLPA sur le robot d'extraction Freedom Evo® HSM, fruit de la collaboration de Tecan et Promega.

Ce robot traite des volumes de sang de 2 à 10 ml avec un volume d'éluion de 500 µL à 1500 µL. Les tubes primaires sont placés directement sur le robot puis l'automate se charge du transfert d'un volume fixe ou mesuré dans les tubes d'extraction situés sur le module HSM, où est réalisée l'extraction proprement dite. Un cycle permet d'extraire 32 échantillons en simultanément, au maximum, avec une durée totale d'environ 4h00. Les rendements annoncés, pour le protocole standard « sang » sont de 20 à 40 µg/mL sang. Pour nos besoins spécifiques, le protocole modifié « sang – MLPA » a été utilisé. Il comporte une étape de lavage supplémentaire.

Nous avons donc testé l'extraction d'ADN avec le système Freedom Evo® HSM à partir de prélèvements de sang total sur EDTA en les comparant aux mêmes prélèvements extraits par notre technique de référence (extractions sur colonne). Nous avons évalué la quantité et la qualité de l'ADN obtenu, recherché la présence de contaminations intra- et inter-runs et comparé la qualité des résultats de différentes analyses effectuées au laboratoire.

Résultats

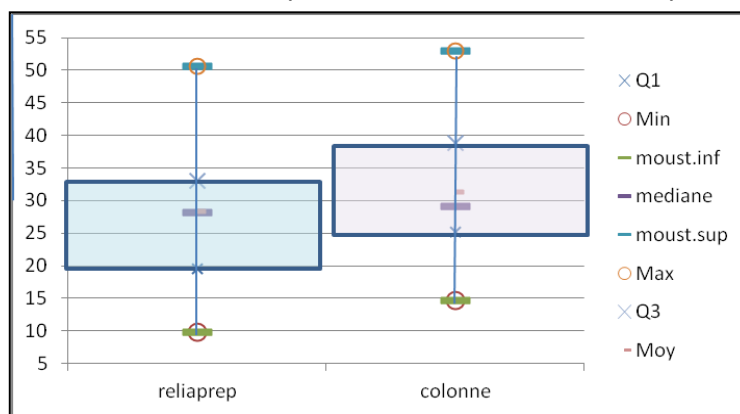
A. Quantité d'ADN extrait sur sang périphérique congelé

Nous avons étudié 28 prélèvements de sang prélevés sur tubes EDTA congelés, d'un volume entre 2 et 3mL. Ces mêmes échantillons ont été extraits en parallèle sur le robot et avec notre technique de référence sur colonnes à partir de 2mL de sang.

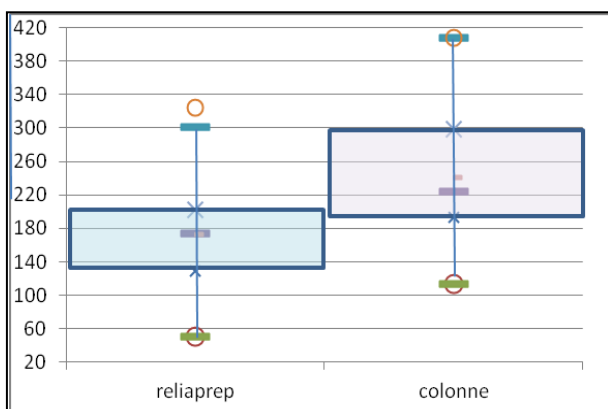
La quantité d'ADN est évaluée par la mesure de la concentration au spectrophotomètre (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000) des ADN extraits. Nos techniques et notre rôle de *banking* nous demandent une concentration minimale de 100ng/µL.

Les résultats sont présentés dans la figure 1.

Figure 1: Comparaison des 2 techniques d'extraction par colonnes (extraction manuelle) et par Reliaprep™ (billes magnétiques, extraction automatisée) à partir de 2 à 3 mL de sang



A. Concentration en ng/µL



B. Rendement en µg/mL de sang

Dans la grande majorité des cas (25 échantillons / 28), la chimie Reliaprep™ automatisée nous permet d'obtenir une concentration supérieure à 100 ng/µL. Dans cette série, 3 échantillons ont présenté une concentration entre 50 et 74 ng/µL; le volume initial des prélèvements était de 2, 2.3, 2.4mL. La comparaison des concentrations obtenues avec chaque technique permet de conclure que la concentration est plus faible avec le système automatisé (concentration moyenne de 172 ng/µL avec le robot vs 241 ng/µL avec les colonnes; figure 1A), ceci étant probablement lié au plus grand volume d'éluion utilisé : 500 µL minimum pour Reliaprep™ et 300 µL pour les colonnes.

Afin de s'affranchir de cette différence, nous avons comparé le rendement d'extraction par millilitre de sang (Figure 1B). Le rendement d'extraction avec la chimie Reliaprep™ est satisfaisant, inférieur de 10 % en moyenne (28 µg d'ADN/mL de sang) par rapport aux extractions sur colonnes (31 µg d'ADN/mL de sang). Rappelons que le protocole d'extraction automatisée utilisé comporte un lavage supplémentaire, pour que la technologie soit compatible avec nos techniques MLPA.

Nous avons également extraits, avec l'automate Freedom Evo® HSM, l'ADN de 101 prélèvements de sang congelés prélevés sur tubes EDTA, d'un volume entre 5 et 10mL. Ces échantillons ont été comparés à 101 prélèvements extraits en routine avec notre technique de référence, sur colonnes. Il n'était pas possible d'extraire les mêmes échantillons avec les 2 techniques d'extraction car nous ne disposions pas du volume de prélèvement nécessaire. Avec ces volumes extraits plus élevés, la chimie Reliaprep™ automatisée permet d'obtenir des concentrations supérieures à 100 ng/μL, minimum requis pour le laboratoire (Figure 2). Normalisé à un volume de sang identique, les deux techniques (colonnes et billes magnétiques) donnent des rendements d'extraction comparables (Figure 2).

Figure 2 : Comparaison des 2 techniques d'extraction par colonnes (extraction manuelle) et par Reliaprep™ (billes magnétiques, extraction automatisée) à partir de 5 à 10 mL de sang

	Concentration moyenne en ADN (ng/μL) +/- écart-type	Rendement moyen (μg d'ADN/mL de sang) +/- écart-type
Reliaprep™ n=101	232 +/- 90	36 +/- 11
Colonnes n=101	270 +/- 97	30 +/- 12

Outre le sang périphérique, nous sommes aussi amenés à extraire de l'ADN à partir de culots cellulaires après technique de séparation des cellules mononuclées pour l'activité hématologie-oncologie-greffe du laboratoire. Nous avons testé le protocole « sang-MLPA » pour des culots de 2,5 à 100 millions de cellules. Les résultats obtenus n'étaient pas satisfaisants par rapport à ceux obtenus sur colonnes : saturation du système pour les fortes quantités de cellules (>50 millions), concentration obtenue insuffisante pour les faibles quantités de cellules (<20 millions) en partie liée au volume d'élution de 500 μL minimum et rendement moyen inférieur d'au moins 25% par rapport aux extractions sur colonnes. Le protocole utilisé n'est donc pas adapté pour ce type de prélèvement. Des adaptations sont nécessaires pour l'utilisation de cette méthode d'extraction sur culots cellulaires.

B. Qualité de l'ADN extrait à partir de sang périphérique

La qualité de l'ADN a été analysée pour le sang périphérique par la comparaison des rapports d'absorbance significatifs de contaminants protéiques ou salins. Les valeurs des ratios A_{260}/A_{280nm} sont supérieures à 1.8 montrant l'absence de contamination protéique. L'analyse des rapports des absorbances à A_{260}/A_{230nm} montre l'absence de contamination par des sels.

Figure 3 : Analyse de la qualité des ADN extraits

	Moyenne rapport A_{260}/A_{280} +/- écart-type	Moyenne rapport A_{260}/A_{230} +/- écart-type
Reliaprep™ n=28	1,87 +/- 0.03	2,06 +/- 0.18
Colonnes n=28	1,88 +/- 0.02	2,37 +/- 0.30

La qualité de l'ADN a aussi été évaluée par migration en gel d'agarose 0,8% : aucune dégradation de l'ADN n'a été observée. Les ADN double brin ont été dosés en fluorescence (dosage par Qubit®). Enfin, l'amplificabilité des ADN extraits a été analysée par PCR quantitative avec une sonde TaqMan®. Les résultats sont comparables à ceux obtenus sur colonnes.

C. Recherche de contaminations

Nous avons vérifié l'absence de contaminations intra- et inter-runs en intercalant dans un run entre chaque patient un blanc (eau stérile). Nous avons testés 16 blancs et 16 échantillons de 3 mL disposés en alternance et réalisé un dosage au spectrophotomètre ainsi qu'une quantification de l'albumine par PCR quantitative en temps réel. Il n'a pas été observé de contaminations. Nous avons réalisé 4 mois plus tard une nouvelle recherche de contamination qui s'est avérée également négative sur 18 blancs testés.

D. Comparaison de la qualité des résultats d'analyses génétiques

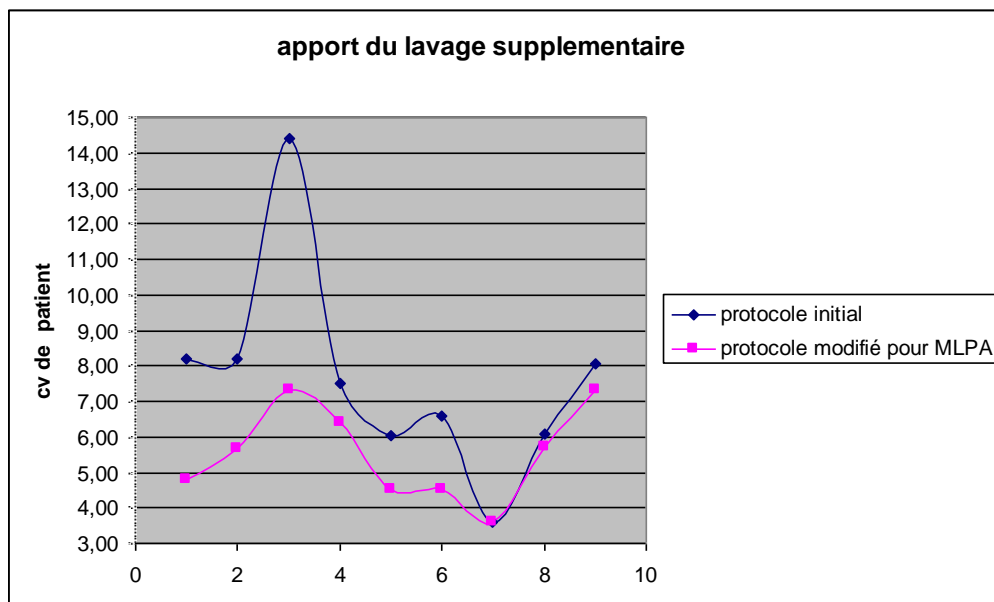
Nous avons ensuite comparé la qualité des résultats d'analyse obtenus à partir des échantillons extraits par la chimie Reliaprep™ automatisée et ces mêmes échantillons extraits par notre technique de référence (colonnes).

1- MLPA

Nous avons utilisé le kit SALSA® MLPA® probemix P036-E1 Human Telomer-3, MRC-Holland b.v, utilisé pour dépister certains cas de retard mental.

Les premiers tests réalisés avec le protocole standard du kit Reliaprep™ n'ont pas été satisfaisants (valeurs anormales pour plusieurs sondes chez des patients sans anomalie). Nous avons ensuite étudié 9 échantillons extraits avec le protocole standard et différents protocoles proposés par Promega puis comparé les coefficients de variation (CV) des patients et des sondes. Le protocole comportant une étape de lavage supplémentaire a permis d'améliorer les résultats : la moyenne des CV patient était de 5.5 pour l'extraction avec une étape de lavage supplémentaire (écart-type=1.3) contre 7.6 pour le protocole standard (écart-type=3.0), (Figure 4). Malgré le faible échantillonnage, nous avons retenu le protocole modifié ajoutant une étape de lavage supplémentaire pour l'évaluation de l'automate.

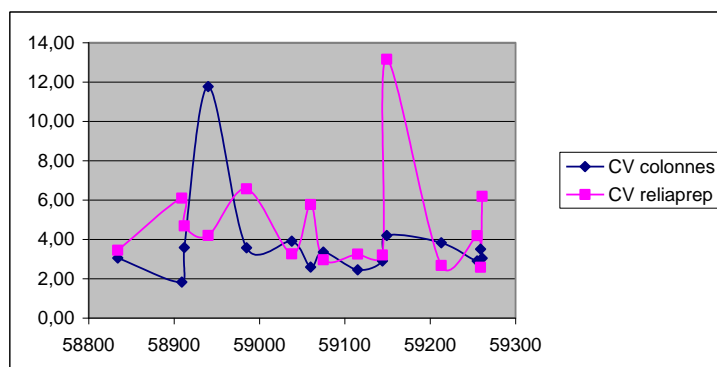
Figure 4 : Comparaison des CV de patients en MLPA, avant et après modification du protocole d'extraction par un lavage supplémentaire



Nous avons ensuite étudié 15 prélèvements de sang périphérique prélevés sur tube EDTA avec le protocole ajoutant une étape de lavage supplémentaire au protocole standard du kit Reliaprep™. La qualité de l'ADN est satisfaisante : la moyenne des CV patients est de 4.8 pour la chimie Reliaprep™ vs 3.8 pour l'extraction sur colonnes (cf figure 5). La moyenne des CV des sondes est également satisfaisante : CV Colonnes=4.2 (écart-type=1.6) vs CV Reliaprep=5.1 (écart-type=2.2). Les résultats sont interprétables avec l'ADN extrait par l'automate et comparables à ceux obtenus avec la technique d'extraction sur colonnes.

Figure 5 : Comparaison des résultats MLPA avec 2 techniques d'extraction par colonnes (extraction manuelle) et par Reliaprep™ (billes magnétiques, extraction automatisée)

patients	CV colonnes	CV reliaprep
58834	3,05	3,44
58909	1,82	6,09
58912	3,58	4,68
58940	11,77	4,20
58985	3,57	6,56
59038	3,91	3,27
59060	2,60	5,77
59075	3,35	2,95
59115	2,45	3,25
59144	2,90	3,20
59149	4,20	13,16
59213	3,83	2,67
59255	2,90	4,19
59259	3,50	2,58
59261	3,04	6,19
moyenne	3,76	4,81
ecart type	2,30	2,68



2- Autres techniques de biologie moléculaire

Nous avons étudié différents échantillons par TP-PCR pour la recherche du syndrome de l’X-fragile (4 patients négatifs et 4 patients positifs), PCR par extension d’amorces pour le diagnostic de l’amyotrophie spinale infantile (5 patients) et PCR long-range suivie d’un séquençage sur séquenceur ABI3130xl utilisé dans le cadre du dépistage de la β -thalassémie (4 patients). Les résultats étaient satisfaisants et comparables à ceux obtenus avec la technique d’extraction sur colonnes. La méthode d’extraction automatisée Reliaprep™ est donc adaptée pour ces types de techniques.

E. Conclusion

Pendant 6 mois, nous avons pu utiliser l’extracteur Freedom Evo® HSM et la chimie Reliaprep™ pour notre activité d’extraction d’ADN à partir de sang total. Nous l’avons trouvé convivial, facile d’utilisation avec la possibilité d’utiliser un système de scanner permettant une traçabilité des échantillons et des tubes d’élution. Suite aux échanges avec Promega et Tecan et aux différentes améliorations apportées à la chimie et au robot, nous avons pu utiliser cet extracteur sur un grand nombre d’échantillons, en obtenant une concentration d’ADN minimale de 100 ng/ μ l et une qualité suffisante pour réaliser l’ensemble des techniques effectuées au laboratoire y compris la technique MLPA.

L’utilisation de l’automate sur plusieurs mois nous a permis de soulever différents axes d’amélioration à apporter : la durée totale d’un run (actuellement environ 4h), l’utilisation de la fonction « safe move » pour éviter le survol des tubes d’extraction par les cônes, le suivi des niveaux des réactifs et leur traçabilité, la possibilité d’acheter à l’unité les réactifs limitants, la gestion des déchets liquides et la mise en place de programmes de maintenance. Divers points ont déjà été pris en compte avec notamment la modification du packaging des réactifs Reliaprep™ LV désormais prêts à l’emploi permettant également un meilleur suivi. Chaque réactif du kit peut être acheté seul, pour répondre aux adaptations éventuelles de protocole. Le système PosID a été développé pour permettre la traçabilité automatique des échantillons. Un programme de rinçage des différents cônes et aiguilles a été mis en place afin d’éviter qu’ils ne se bouchent.

Enfin, de nouveaux protocoles ont été développés et validés par Promega : buffy coat, culots cellulaires et salive. Ces protocoles devront être évalués sur site, par le laboratoire qui utilisera cet automate.