

Patrick MEREL*

Automatisation et biologie moléculaire : de l'extraction des acides nucléiques à la PCR temps-réel

RÉSUMÉ

La biologie moléculaire est longtemps restée une discipline dépourvue de solutions d'automatisation. Toutefois, depuis le début des années 2000, les efforts conduits par les industriels du domaine ont contribué au développement d'une offre instrumentale étoffée et à même de satisfaire un large nombre d'utilisateurs. Le lancement sur le marché d'instruments automatisant l'extraction des acides nucléiques et l'automatisation de la PCR temps réel associé à la disponibilité de différents kits, par exemple dans le domaine infectieux, contribue à une augmentation tangible du nombre de laboratoires réalisant des analyses de biologie moléculaire. Nous présentons dans cet article trois tableaux donnant un aperçu synthétique (informations compilées en Juin 2007) de l'offre disponible dans les domaines de l'extraction des acides nucléiques et de la PCR temps réel. Les grandes tendances de ce marché sont également abordées.

MOTS-CLÉS

Acides nucléiques, automatisation, extraction, PCR temps réel

I - Introduction

Le marché de l'instrumentation en biologie moléculaire s'était emballé il y a déjà quelques années, avec l'arrivée de la PCR temps réel. Il est vrai qu'en associant un extracteur d'acides nucléiques à ces nouveaux instruments de PCR, les biologistes pouvaient enfin accéder à un niveau d'automatisation jamais atteint en biologie moléculaire de façon générale, et en diagnostic moléculaire en particulier.

Cette frénésie instrumentale se poursuit, et aujourd'hui, pratiquement 50 machines se retrouvent dans la catégorie des plateformes robotiques dédiées aux extractions d'acides nucléiques (voir tableau I - Plateformes dédiées à l'extraction automatique des acides nucléiques Juin 2007, parties 1 à 4, page 90 à 92).

II - Automatisation de l'extraction des acides nucléiques

Depuis la première version de ce tableau en octobre 2001 (1), la part des machines basées sur l'utilisation des billes magnétiques a fortement augmenté. Les systèmes utilisant la technologie Magtration® de l'entreprise japonaise Precision System Science (Chiba, Japon - <http://pssbio.com/>), étant les plus représentés. L'utilisation de la technologie des « rod », tiges magnétiques, reste toutefois très importante chez des sociétés comme Chemagen, Bioer, Promega, Qiagen et ThermoLabsystems. Les

systèmes à filtration pure, n'ont pas vu de grandes innovations, si ce n'est l'arrivée de Fujifilm (Tokyo, Japon - <http://www.fujifilm.com/>) dans ce domaine avec une technologie baptisée QuickGene, pour des extractions par filtration sur membrane poreuse très mince (80 µm).

Il est cependant intéressant de noter que les extracteurs utilisant le principe de la centrifugation restent présents sur ce marché, avec même des innovations technologiques comme notamment celle exploitée dans l'Extragene de la société française Genomic (Archamps - <http://www.genomics-tools.com>). L'Extragene, avec une capacité de traitement simultané de 48 échantillons de 10 mL de volume, constitue l'extracteur « larges volumes » le plus performant aujourd'hui. Il utilise en outre un bras robotique tout à fait original, capable d'ouvrir et de fermer des tubes de 20 mL. D'une cadence plus faible, le dernier-né de la société Qiagen (Courtaboeuf, France - <http://www.qiagen.com>) le QiaCube, exploite une stratégie technique et commerciale pour le moins judicieuse. En effet, cet instrument, susceptible d'extraire 12 échantillons à la fois, utilise les kits « manuels » déjà connus de nombreux utilisateurs de la marque. Il permet donc un passage à l'automatisation « sans douleur », à des tarifs très abordables, tant au niveau de la plateforme que des réactifs.

Un nombre restreint de ces machines permet d'enchaîner l'extraction des acides nucléiques et la réalisation de l'amplification. Seul le Vidiera™ NsP de Beckman Coulter, (Fullerton, CA, USA - <http://www.beckmancoulter.com>) non distribué

* Laboratoire de virologie – CHU Pellegrin – 33076 Bordeaux – E-Mail : patrick.merel@chu-bordeaux.fr

Automatisation et biologie moléculaire : de l'extraction des acides nucléiques à la PCR temps-réel

en Europe, est susceptible d'enchaîner extraction des ADN, quantification par spectrophotométrie UV, normalisation et préparation des réactions dans divers formats (plaque 96 tubes, carrousel LightCycler®, Cobas Taqman K-Carrier) pour des séries de 96 échantillons. Des fonctionnalités encore inégalées dans cette catégorie d'instrument. Ceci dit, on assiste au développement de nouvelles plateformes susceptibles d'enchaîner l'ensemble des étapes des procédures moléculaires, de l'extraction à la PCR et à la détection (voir *tableau II - Plateformes intégrant extraction des acides nucléiques et détection par amplification Juin 2007, parties 1 à 2, page 92*).

III - Intégration de l'extraction et de l'amplification

Le Tigris de Gen-Probe (San Diego, CA, USA – <http://www.gen-probe.com>) n'est pas une nouvelle machine, mais il fait office de précurseur. Susceptible de traiter jusqu'à 800 échantillons par jour pour des marqueurs comme CT/GC, HIV, HCV, HBV, WNV, en qualitatif, le TIGRIS enchaîne extraction préparation des réactions, amplification par Transcription Mediated Amplification (TMA) et détection par électroluminescence.

Roche Diagnostics (Meylan, France – <http://www.roche.com>) avec un assemblage de trois instruments déjà connus, Cobas AmpliPrep®, docking station et Cobas TaqMan® 96, dispose d'une offre permettant d'automatiser le traitement complet, sans aucune intervention humaine, de séries de 72 échantillons, tout ceci en flux continu. Enfin, BD (Sparks, MD, USA – <http://www.bd.com>) vient d'améliorer son automate BD Viper™, afin de permettre sur cette plateforme, l'automatisation complète de l'extraction puis de la détection par SDA (strand-displacement amplification) de CT/GC. Il est à noter que le BD Viper™ constitue une solution inédite et unique, pour cette discipline, grâce à l'utilisation d'un bras robotique de type industriel (SCARA, Selective Compliant Articulated Robot Arm). Des fonctionnalités qui nous rapprochent de l'instrumentation déjà disponible en chimie clinique.

A côté de ces systèmes imposants et déjà bien implantés dans les laboratoires de diagnostic, des instruments de plus faible capacité sont désormais disponibles comme ceux de la société Cepheid (Sunnyvale, CA, USA – <http://www.cephid.com>). Le GeneExpert, en effet, est susceptible d'extraire puis d'amplifier par PCR temps réel des échantillons pour la détection de plusieurs paramètres infectieux. Il est désormais disponible en trois versions à même de traiter 1, 4 ou 16 échantillons de façon indépendante. D'autres sociétés nord-américaines, HandyLab (Ann Arbor, MI, USA – <http://www.handylab.com>) et Iqum (Malborough, MA, USA – <http://www.iqum.com>) ont récemment présenté une nouvelle génération d'instruments, à base de microfluidique pour le premier, et de tube flexible (lab-in-a-tube) pour le second. Le Jaguar de HandyLab incorpore un extracteur d'acides nucléiques cou-

plé à un instrument de PCR temps réel, en cartouche microfluidique, pour le traitement de 24 patients en moins d'une heure. Le Liat™ de Iqum, de son côté, réalise pour un seul échantillon, l'extraction puis la PCR temps réel dans un tube ou se succèdent toutes les étapes du procédé. De très faible encombrement, ce type d'appareil préfigure vraisemblablement une toute nouvelle génération d'instruments notamment dédiés à la réalisation d'analyses au chevet du patient - on rentre là dans le domaine du « Point of Care » - et susceptibles de rendre des résultats moléculaires extrêmement rapidement (30 minutes pour un test génétique et 60 minutes pour un test infectieux, dans le cas du Liat™, par exemple).

IV - Instruments de PCR temps réel

Concernant les machines de PCR temps réel, la présence de celles-ci sur le marché du diagnostic moléculaire continue à s'accroître. (voir *tableau III - Instruments de PCR temps-réel Juin 2007, parties 1 à 3, page 95*).

On notera quand même que les machines de type « PCR rapide » sont en nette progression, avec l'apparition de plateformes à 96 tubes, voir interchangeables en 384 tubes pour le LightCycler 480 de Roche Diagnostics. Ce dernier avec une capacité d'intégration robotique, rejoint le Prism 7900 d'Applied Biosystems (Foster City, CA, USA – <http://www.appliedbiosystems.com>) qui longtemps est resté le seul thermocycleur « temps-réel » robotique. L'intégration de ces instruments avec des plateformes comme le Radius de Protodyne (Windsor, CT, USA – <http://www.protodyne.com>) comme pour le LightCycler 480, permet d'automatiser, extraction des acides nucléiques, préparation des PCR et PCR temps réel, pour de très hautes cadences.

Enfin, comme pour les extracteurs d'acides nucléiques, on assiste à une arrivée de plusieurs nouvelles sociétés d'instrumentation chinoises sur ce marché, avec des technologies nouvelles comme le bloc Peltier en ligne de la société Bioer (Hangzhou, Chine – <http://www.bioer.com.cn>) pour de meilleurs échanges thermiques.

V - Conclusion

Les instruments d'extraction d'acides nucléiques et de PCR temps réel sont devenus des incontournables dans les laboratoires de biologie moléculaire et de diagnostic. Leur marché est toujours en pleine évolution, et l'on retiendra surtout pour cette année 2007, l'arrivée et les annonces des nouvelles plateformes de taille moyenne pour l'automatisation complète de ces procédés.

(1) MEREL P, Instrumentation et biologie moléculaire. 1ère partie : l'automatisation de l'extraction des acides nucléiques, et la PCR quantitative, *Spectra Biologie*, 2001, 20, 49-57.

Tableau I Partie 1/4 - Plateformes dédiées à l'extraction automatique des acides nucléiques, Juin 2007. (d'Applied BioSystems à Chemagen)

Certains instruments peuvent être indisponibles en Europe. NS: non spécifié.

Société	Applied BioSystems		Autogen			
Instrument	ABI Prism 6100	ABI Prism 6700	AutoGenflex 3000	AutoGenPrep 2000	AutoGenPrep 245	AutoGenPrep 965
Technologie d'extraction ; Caractéristiques complémentaires	Filtration	Filtration ; archivage, préparation PCR	Centrifugation	Centrifugation	Centrifugation	Centrifugation
Nb. d'échantillons	96	96	48	48	24	4x96
Cadence	96/30 minutes	96/75 minutes	48/4-6 heures	48/4-6 heures	24/3,5 heures	384/4-6 heures
Volume d'échantillon	Jusqu'à 1 million de cellules		Jusqu'à 5 mL	1 mL	700 µL	Jusqu'à 250 µL ou 1mL
Kits disponibles	ARN, ADN	ARN, ADN	ADN, ARN, plasmides, cosmides	ADN, tissus, plasmides, cosmides, levures, plantes	ARN, ADN, tissus, plasmides	ADN, plasmides, cosmides
Site Web	appliedbiosystems.com/		autogen.com/			

Tableau I Partie 2/4 - Plateformes dédiées à l'extraction automatique des acides nucléiques, Juin 2007. (de Corbett Life Science à Promega)

Certains instruments peuvent être indisponibles en Europe. NS: non spécifié.

Société	Corbett Life science	Eppendorf	FujiFilm		
Instrument	X-tractor Gene	epMotion 5075 VAC	QuickGene-610	QuickGene-810	QuickGene-mini80
Technologie d'extraction ; Caractéristiques complémentaires	Filtration	Filtration	Filtration sur membrane poreuse de 80 µM		
Nb. d'échantillons	8-96	1-96	6	8	8
Cadence	8/45 minutes, 96/95 minutes	NS	12 minutes	6 minutes	6 minutes (manuel)
Volume d'échantillon	180 à 200 µL	NS	2 mL	200 µL	200 µL
Kits disponibles	ADN, ADN et ARN viral	ADN, ARN, tissus, plasmides	ADN	ADN, ARN, tissus, plasmides	ADN, ARN, tissus, plasmides, cellules
Site Web	corbettlifescience.com/	eppendorf.com/	lifescience.fujifilm.com/		

Tableau I Partie 3/4 - Plateformes dédiées à l'extraction automatique des acides nucléiques, Juin 2007. (de Precision System Science à Qiagen)

Certains instruments peuvent être indisponibles en Europe. NS: non spécifié.

Société	Precision System Science					
Instrument	Magtration System 6MxC	Magtration System 8Lx	Magtration System 12GC	SX-6G	SX-8G	SX-96GC
Technologie d'extraction ; Caractéristiques complémentaires	Magnétique/Magtration cartouches de réactifs			Magnétique/Magtration		
Nb. d'échantillons	6-48	1-8	1-12	48	96	4x96
Cadence	NS	50 minutes	30 minutes	80 minutes	80 minutes	NS
Volume d'échantillon	100 à 1000 µL	1-10 mL	100 à 200 µL	25 à 500 µL	5 à 40 µL	10 à 40 µL
Kits disponibles	ADN, ARN	ADN	ADN, ARN, ADN et ARN viral, tissus, plasmides	ADN, ARN	ADN, ARN	ADN, ARN
Site Web	pssbio.com/					

Automatisation et biologie moléculaire : de l'extraction des acides nucléiques à la PCR temps-réel

Beckman Coulter		Bee Robotics	Bioer	bioMérieux		Bioneer	Chemagen	
Vidiera NsP	UniCel NsP 10	QuatroProbe	Gene - Pure NPA-32	Extractor	EasyMag	HT-Prep Pro	Chemagic	Prepito
Filtration ; quantification, normalisation, préparation PCR	Magnétique/ Magtration; cartouches de réactifs	Magnétique	Magnétique/ Magnetic rod	Méthode de Boom	Magnétique/ Méthode de Boom	Filtration	Magnétique/Magnetic rod	
96	10	48	32	10	24	96	12, 96	1-12
96/2,5 heures	10/30 minutes	NS	NS	120/8 heures	60 minutes	60 minutes	150/8 heures 10 mL (45 minutes/12), 4000/8 heures 1,5mL (15 minutes/96)	30 minutes
Jusqu'à 300 µL	NS	200 µL à 1 mL	50 à 800 µl	ADN 100µL, jusqu'à 2mL	Jusqu'à 1mL	Jusqu'à 300 µL	10 µL à 10 mL	10 µL à 600 µL
ADN, ADN et ARN viral	ADN	NS	ADN, ARN	ADN, ARN	ADN, ARN	ADN, ARN	ADN, ADN et ARN viral	
beckman-coulter.com/		beerobotics.com/	bioer.com.cn/	biomerieux.com/		bioneer.co.kr/	chemagen.de/	

GeneSystems	Genomic	HandyLab	Invitrogen	Magnetic Biosolutions AB		Mole	Promega
GeneExtract	ExtraGene	Lynx	iPrep	Magnatrix 1200	Magnatrix 8000plus	GeneMole	Maxwell 16
Filtration	Centrifugation	Magnétique; cartouches de réactifs	Magnétique/Magtration; cartouches de réactifs	Magnétique/Magnatrix		Magnétique ; cartouches de réactifs	Magnétique/Magnetic rod ; cartouches de réactifs
6	48	24	12	12-96	8-192	16	16
Semi-automatique	240/jour	35 minutes	26 minutes	20 minutes/12	NS	NS	30 minutes
> 1 L de liquide	0,5 à 10 mL	NS	350 µL	NS	NS	50 µL à 1 mL	50 à 400 µL
ADN	ADN, ARN, Proteines	ADN, ARN	ADN	ADN, ARN	ADN, ARN	ADN, ARN, cellules, tissus	ADN
genesystems.fr/	genomics-tools.com	handylab.com/	invitrogen.com/	magbio.com/		molegenetics.com/	promega.com/

Qiagen							
BioRobot Universal System	BioRobot MDX DSP	BioRobot EZ1 DSP	BioRobot 48/96	BioSprint 15/96	AutoPure LS	QiaCube	
Filtration + centrifugation + Magnétique ; PCR setup	Filtration + centrifugation + Magnétique ; PCR setup ; CE IVD-D	Magnétique/Magtration ; cartouches de réactifs ; CE-IVD-D	Magnétique/Magtration	Magnétique/Magnetic rod	Centrifugation	Filtration + centrifugation	
4x96	4x96	6	48/96	15/96	16	12	
4x96/2-3 heures	4x96/2-3 heures	20min	48/2hr	20 minutes	96/jour	65 minutes	
jusqu'à 200 µL	jusqu'à 200 µL	100 à 300 µL	100 à 300 µL	10 µL à 1 mL	Jusqu'à 10 mL	Jusqu'à 200 µL	
ADN, ADN et ARN viral, plasmides	ADN, ADN et ARN viral	ADN, ADN et ARN viral, tissus	ADN, ADN/ARN, ARN, mARN			ADN	ADN, ADN et ARN viral, plasmide
qiagen.com/							

Tableau I Partie 2/4 - Plateformes dédiées à l'extraction automatique des acides nucléiques, Juin 2007. (de Roche Diagnostics à Thermo LabSystems). Certains instruments peuvent être indisponibles en Europe. NS: non spécifié.

Société	Roche Diagnostics			Thermo LabSystems	
Instrument	MagNAPure LC	MagNAPure Compact System	AmpliPrep	KingFisher	KingFisher ML/96
Technologie d'extraction ; Caractéristiques complémentaires	Magnétique/Magtration ; préparation PCR	Magnétique/Magtration ; cartouches de réactifs	Magnétique ; préparation PCR ; CE IVD-D ; flux continu	Magnétique/Magnetic rod	Magnétique/Magnetic rod
Nb. d'échantillons	32	8	1-72	2x12	15/96
Cadence	2 heures	20 minutes	24/1 heure	24/17 minutes, 29 minutes, 41 minutes	15/14 minutes, 36 minutes, 43 minutes
Volume d'échantillon	20 à 300 µL	100 µL à 1 mL	100 à 750µL	20 à 200 µL	10 µL à 1 mL
Kits disponibles	ADN, ARN, ADN/ARN, ARNm		ADN et ARN viral	ADN, ARNm, ARN, protéines, cellules	
Site Web	roche.com/			thermo.com/	

Tableau II Partie 1/2 - Plateformes intégrant extraction des acides nucléiques et détection par amplification, Juin 2007. (de BD à Cepheid) Certains instruments peuvent être indisponibles en Europe. NS: non spécifié.

Société	BD	Cepheid		
Instrument	Viper	GeneXpert GX1	GeneXpert GX4	GeneXpert GX16
Technologie d'extraction; Caractéristiques complémentaires	NS	Propriétaire ; Cartouches microfluidiques indépendantes, QPCR		
Nombre d'échantillons	NS	1	4	16
Cadence	564/8 heures	1 heure ; 2,5 heures ; 2 heures	1 heure ; 2,5 heures ; 2 heures	1 heure ; 2,5 heures ; 2 heures
Kits disponibles	CT, GC	MRSA, EV, BCR-ABL	MRSA, EV, BCR-ABL	MRSA, EV, BCR-ABL
Site Web	bd.com/	cepheid.com/		

Tableau II Partie 2/2 - Plateformes intégrant extraction des acides nucléiques et détection par amplification, Juin 2007. (de Gen-Probe à Roche Diagnostics). Certains instruments peuvent être indisponibles en Europe. NS: non spécifié.

Société	Gen-Probe	HandyLab	Iqum	Roche Diagnostics
Instrument	Tigris	Jaguar	Liat	Cobas AmpliPrep+Cobas Taqman 96 +Docking Station
Technologie d'extraction; Caractéristiques complémentaires	Magnétique "Target Capture", SDA	Propriétaire; Cartouche microfluidique, QPCR	Billes de Silice; Technologie Lab-in-a-tube, QPCR	Magnétique; Flux continu, QPCR
Nombre d'échantillons	250	24	1	72
Cadence	1000/14 heures	360/8 heures	1/30 minutes, 1/1 heure	144/jour
Kits disponibles	HIV, HCV, HBV, WNV, CT, GC	NS	NS	HIV, HBV, HCV, WNV
Site Web	gen-probe.com/	handylab.com/	iquum.com	roche.com/

Automatisation et biologie moléculaire : de l'extraction des acides nucléiques à la PCR temps-réel

Tableau III Partie 1/3 - Instruments de PCR temps-réel, Juin 2007. (d'AlphaHelix à Bioneer)

Certains instruments peuvent être indisponibles en Europe. NS: non spécifié., Plq. : Plaque

Société	AlphaHelix	Applied Biosystems				Bioer Technology			Biogene	Bioneer
Instrument	QuanTyper	StepOne	7300	7500	7900HT	Line-Gene	Line-Gene2	Line-GeneK	InSyte	Exicycler
Capacité	48 tubes	Plq. 48 tubes	Plq. 96 tubes	Plq. 96 tubes	Plq. 96 tubes, Plq. 384 tubes ou Array	33 tubes	66 tubes	48 tubes	Plq. 96 tubes	Plq 96 tubes
Type de Thermocycleur	SuperConvection, Cycleur rapide	Bloc Peltier, option rapide	Bloc Peltier	Bloc Peltier, option rapide	Bloc Peltier, option rapide	Bloc Peltier sandwich thermo-electronique			Cycleur rapide	Bloc Peltier
Robotique	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	NS	NS
Site Web	alphahelix.com/	appliedbiosystems.com/				bioer.com.cn/			biogene.com/	bioneer.com/

Tableau III Partie 2/3 - Instruments de PCR temps-réel, Juin 2007. (de Bio-Rad à Evogen)

Certains instruments peuvent être indisponibles en Europe. NS: non spécifié., Plq. : Plaque

Société	Bio-Rad		Cepheid	Corbett Research		Eppendorf	Evogen
Instrument	MyiQ, iQ5	MiniOpticon, Chromo4	SmartCycler	Rotor-Gene 3000	Rotor-Gene 6000	Mastercycler ep realplex	Evocycler
Capacité	Plq. 96 tubes	Plaq. 48/96 tubes	16 unités indépendantes; tubes dédiés	36 tubes ; 72 tubes dédiés	36 tubes ; 72 tubes ; 100 tubes dédiés	Plaque 96 tubes	12 tubes dédiés
Type de Thermocycleur	Bloc Peltier	Bloc Peltier	Cycleur rapide	Cycleur rapide	Cycleur rapide	Bloc Peltier	Cycleur rapide
Robotique	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Site Web	bio-rad.com/		cepheid.com	corbettlifescience.com/		eppendorf.com/	evogen.com/

Tableau III Partie 3/3 - Instruments de PCR temps-réel, Juin 2007. (de GeneSystems à TianLong)

Certains instruments peuvent être indisponibles en Europe. NS: non spécifié., Plq. : Plaque

Société	GeneSystems	Osmetech	Roche Diagnostics				Stratagene	TianLong
Instrument	GeneDisc Cyclor	Opti Gene	LightCycler V1, V2	LightCycler 480	Cobas Taqman 48	Cobas Taqman 96	Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	TL988
Capacité	6 échantillon-6 tests; format CD	3 positions indépendantes x 4 échantillons, capillaires plastique	32 capillaires verre	Plq. 96 ou 384 tubes	2x24 tubes dédiés	4x24 tubes dédiés	Plq. 96 tubes	48 tubes
Type de Thermocycleur	Cycleur rapide	Cycleur rapide	Cycleur rapide	Cycleur rapide; bloc Peltier + Therma-Base	Bloc Peltier	Bloc Peltier	Bloc Peltier	Bloc Peltier
Robotique	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui	Non	Non
Site Web	genesystems.fr/	osmetech.com/	roche.com/				stratagene.com/	medtl.com/