Biologie moléculaire automatisée en microbiologie : quoi de neuf ?

De plus en plus de biologistes s'intéressent à la biologie moléculaire mais n'ont pas franchi le pas. Les automates d'extraction et de PCR en temps réel ainsi que les kits de réactifs simplifient et sécurisent de façon croissante la technique. Cet article présente les évolutions récentes dans ce domaine.

**Nathalie WILHELM, Frédéric FEVRIER,
Alain LE COUSTUMIER, Claude GRASMICK**

Service de biologie, Centre Hospitalier, 46005 CAHORS - E-mail : wilhelm@ch-cahors.fr

Les techniques de biologie moléculaire étaient jusqu'à récemment réservées à des laboratoires hautement spécialisés et leur sortie du domaine de la recherche a été la conséquence de l'apparition du virus VIH avec les premières troupes diagnostic de quantification du génome du VIH dans les années quatre-vingt dix. Depuis, la biologie moléculaire a connu un essor considérable avec le développement de nouvelles techniques, particulièrement la PCR en temps réel, l'automatisation des différentes étapes et l'apparition de kits diagnostic, ce qui a rendu ces **nouveaux outils accessibles** pour les laboratoires hospitaliers non universitaires et les LABM privés.

A titre d'exemple, les marchés européen et américain des systèmes de PCR en temps réel ont produit des revenus combinés à hauteur de 252 millions de dollars en 2001 et on estime qu'ils tripleront d'ici 2006.

L'intérêt des techniques de biologie moléculaire en microbiologie n'est plus à démontrer, ces techniques se sont en effet imposées comme un **outil complémentaire de la bactériologie conventionnelle**. C'est, par exemple, la technique recommandée par l'ANAES pour le dépistage de *Chlamydia trachomatis*, de part le gain en sensibilité qu'elle permet. Le diagnostic de coqueluche est désormais majoritairement réalisé par biologie moléculaire : la culture conventionnelle de *Bordetella pertussis* étant longue et difficile, ces techniques permettent un gain en sensibilité et en rapidité de rendu de résultat.

De nombreuses autres applications ont été développées, comme la détection du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (sensibilité encore inférieure à la culture mais rapidité de résultat), la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques (*mecA*, *vanA*...), la détection des légionelles dans les prélèvements respiratoires et dans l'eau (mais avec une variabilité du nombre de copies d'ADN par bactérie qui rend la quantification difficile), le diagnostic rapide des méningites bactériennes même déjà traitées (Meningocoque, pneumocoque, *Listeria*, Streptocoque du groupe B...), l'identification de bactéries inconnues par amplification et séquençage d'une partie du gène de l'ARN ribosomal 16S, etc.

La détection d'acides nucléiques passe classiquement par trois étapes : une extraction d'ADN ou d'ARN à partir d'un échantillon biologique, une phase d'amplification de l'acide nucléique extrait généralement par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et une dernière phase de détection de l'acide nucléique amplifié. La PCR conventionnelle est actuellement supplantée par la **PCR en temps réel** qui, en supprimant la phase post-PCR, présente le double avantage de diminuer très fortement les risques de contamination et la durée des manipulations. De plus, cette technique permet une véritable quantification des acides nucléiques. Des techniques alternatives à la PCR ont été décrites et certaines sont commercialisées sous forme de kits (NASBA, TMA, Hybrid Captur, ADN branché, SDA). Nous ne détaillerons pas ces techniques ici (voir BioTribune N°8, novembre 2003).

Enfin, des techniques complémentaires de la PCR se sont développées avec notamment l'apparition des séquenceurs automatiques. Ils permettent l'identification des micro-organismes non identifiables par les techniques conventionnelles parce qu'inertes, ne culti-

vant pas ou inconnus des thésaurus (amplification de fragments d'ADN spécifiques d'espèces à partir d'amorces spécifiques de parties très conservées du génome puis séquençage et comparaison aux bases de données de ces fragments). Ils donnent aussi accès à l'étude des mutations, notamment celles conférant une résistance du VIH aux antirétroviraux.

L'apparition des systèmes de PCR en temps réel est maintenant accompagnée en amont des automates (ou semi-automates) d'extraction et en aval de la commercialisation de kits diagnostics qui rendent accessibles ces techniques aux laboratoires polyvalents.

I. PRINCIPES

Extraction

L'extraction des acides nucléiques se fait classiquement par la **méthode de BOOM** en quatre étapes : **une lyse cellulaire, une adsorption des acides nucléiques sur des particules recouvertes d'un adsorbant** (exemple : silice), **des lavages et une élution**. Les techniques manuelles, très chronophages, utilisent à cet effet des colonnes contenant une membrane recouverte de silice et permettent à un technicien expérimenté de réaliser 24 extractions en 2 heures. Les techniques automatisées ont repris cette méthode d'extraction en remplaçant, pour certaines, les membranes par des billes magnétiques. Dans le cas d'acides nucléiques présents en faible quantité (recherche de virus dans un LCR par exemple), un «carrier» (poly-A de synthèse) peut être ajouté dans le tampon de lyse pour améliorer la sensibilité. Mais d'autres méthodes d'extraction manuelle existent, comme par exemple, l'extraction isopropanol / éthanol préconisée en amont de la quantification du VIH par Amplicor®. De part sa sensibilité aux nucléases, l'ARN, plus fragile que l'ADN, impose une rigueur technique encore plus importante.

Les matrices peuvent être très diverses (liquides biologiques, tissus, sécrétions prélevées sur écouvillon...) et les micro-organismes recherchés difficiles à lyser. Il est parfois indispensable d'effectuer un **pré-traitement** de ces échantillons pour permettre une extraction de qualité : broyage fin des tissus, centrifugation, lyse à température élevée sous conditions hautement dénaturantes en présence de protéase ou protéinase K et de tampon contenant des sels chaotropes. Ces sels (de guanidinium le plus souvent) favorisent l'adsorption des acides nucléiques sur la phase solide.

La PCR en temps réel

Les systèmes de PCR en temps réel permettent de réaliser simultanément et dans la même cuvette réactionnelle l'amplification des acides nucléiques et leur détection. Ils jouent le rôle de thermocycleur très performant mais aussi celui de fluoromètre qui quantifie le produit d'amplification (amplicon) en temps réel.

Le principe de la PCR quantitative en temps réel repose sur le **suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification par l'augmentation de l'intensité de fluorescence émise**. La courbe intensité de fluorescence par rapport au temps obtenue se divise en 3 phases : la phase d'initiation pendant laquelle aucun signal n'est mesurable, la phase exponentielle, et la phase plateau. La phase exponentielle est la seule phase pendant laquelle l'efficacité d'amplification est supposée rester constante. Le point de départ de cette phase est appelé **cycle seuil optique ou «threshold cycle»**, inversement proportionnel au logarithme du nombre de molécules d'acide nucléique cible présentes avant amplification.

La détection peut se faire à l'aide d'un **agent intercalant**, le SYBR®Green I, qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. Ce système est simple et peu coûteux mais manque de spécificité. En effet, l'agent intercalant se lie aussi avec des dimères de «primers» ou des produits de PCR non spécifiques. Il importe alors de réaliser une

courbe de fusion post-PCR puis de déterminer la température de fusion des produits amplifiés. La détection des amplicons peut aussi se faire à l'aide de **sondes fluorogéniques**, synthétisées à la demande par les fabricants. Elles sont spécifiques d'un fragment de l'acide nucléique amplifié et sont couplées à un fluorophore d'un côté et à un absorbeur de fluorescence de l'autre. Les principaux types de sondes utilisées sont les sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman™, les sondes FRET™ (sondes en tandem), les balises moléculaires ou en épingles à cheveux (Molecular Beacon) et leur variante (les sondes scorpion). De part leur spécificité, elles sont de plus en plus utilisées en diagnostic médical et tendent à supplanter le SYBR™ Green I malgré leur coût.

II. LES SYSTÈMES

1) Systèmes d'extraction d'acides nucléiques (tableau I)

Le degré d'automatisation de la phase d'extraction est variable selon les systèmes. Avec le **semi-automate miniMAG (bioMérieux)**, l'opérateur ajoute encore manuellement les différents tampons (lyse, lavages, élution). Les autres systèmes présentés sont entièrement automatiques. Le **m1000 et le m2000sp (Abbott)**, le **Biorobot Mdx (Qiagen)** et le **COBAS AmpliPrep (Roche Diagnostics)** permettent de réaliser 24 à 96 extractions simultanées à partir des tubes primaires (sauf le COBAS AmpliPrep) avec une traçabilité des échantillons, des réactifs et des différentes étapes d'extraction. Le m2000sp et le COBAS AmpliPrep préparent le mélange des réactifs nécessaires à la PCR (mix PCR) et l'ajoutent aux éluats; la microplaque de 96 puits ou la plaque de 24 tubes peut alors être immédiatement transférée dans les thermocycleurs correspondants. Pour des séries d'extraction de taille moindre, l'**easyMAG (bioMérieux)**, le **M48 (Qiagen)** et le **MagNA Pur LC System (Roche Diagnostics)** permettent de réaliser jusqu'à 48 extractions simultanées. Leur sécurisation, en terme de traçabilité est relative et les tubes primaires non acceptés. Enfin, des automates de petite taille sont adaptés aux petites séries et aux demandes itératives : l'**EZ1 (Qiagen)** permet de réaliser 1 à 6 extractions en moins de 45 min; le **MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics)** permet quant à lui d'en réaliser jusqu'à 8.

Selon les fabricants, selon les matrices et l'acide nucléique recherché, le nombre de protocoles et de kits d'extraction proposés est parfois très différent. Il importe dans tous les cas de s'assurer de la validation de chaque paramètre de l'extraction en fonction des différentes matrices.

2) Les thermocycleurs temps réel (tableau II)

Tous les systèmes combinent un thermocycleur et un module de détection pilotés par une station de travail informatique qui permet l'acquisition et le traitement des données obtenues. Ils se divisent en deux catégories : les **systèmes à plaques** qui permettent généralement l'analyse simultanée d'au moins 96 réactions [(**m2000rt (Abbott)**, **ABI 7500**, **ABI 7900 (Applied Biosystems)**, **IQ5**, **Chromo4... (Bio-Rad)**, **Mx3000P**, **Mx3500P**, **Mx-4000 (Stratagene)**, **COBAS TaqMan (48 réactions, Roche Diagnostics)**] et les **systèmes à moindre débit mais de plus grande flexibilité** [(**Rotor-Gene 3000 (Corbett-Research - Diatech)**, **LightCycler II (Roche Diagnostics)**, **Smart Cycler II (Cepheid - Instrumentation Laboratory)**].

2.1 Les thermocycleurs

Les **systèmes à plaques sont munis d'un module thermoélectrique à effet Peltier** et d'un couvercle chauffant. Tous les modèles récents sont équipés d'éléments supplémentaires pour limiter les gradients de température ou «effets de bord»; l'association d'un effet Joule à l'effet Peltier a permis une meilleure homogénéité de température et une augmentation de la vitesse des variations de température. L'**option «Fast» des systèmes ABI 7500 & ABI 7900** permet d'obtenir des durées d'amplification aussi courtes qu'avec les systèmes à air pulsé (inférieures à 40 min au lieu de 2 h) en combinant un nouvel élément Peltier et des parois de microplaques moins épaisses optimisant les variations de température et une enzyme plus rapide. Les thermocycleurs Bio-Rad permettent de réaliser des **gradients de température** entre les cupules d'une même plaque, ce qui est intéressant pour les phases de mise au point de techniques. Le support des échantillons est pour ces systèmes la microplaque, ce qui permet de réaliser de 96 à 384 PCR simultanément et ce qui

rend possible l'automatisation de l'étape de pré-PCR au moyen de stations de pipetage. C'est, par exemple, le cas du thermocycleur m2000rt avec une extraction sur les automates m2000sp ou m1000 (Abbott) ou du thermocycleur COBAS TaqMan associé au COBAS AmpliPrep (Roche Diagnostics).

Parmi les thermocycleurs à moindre débit, le LightCycler et le Rotor-Gene 3000 sont à air pulsé : l'air insufflé dans la chambre du carrousel est chauffé par une résistance électrique et homogénéisé par le ventilateur (LightCycler) ou par le rotor (Rotor-Gene 3000) ; le refroidissement est effectué par insufflation d'air ambiant. La répartition de la température entre les échantillons est plus homogène que dans les systèmes à plaques. Les capillaires de quartz du LightCycler lui confèrent une grande rapidité de transferts thermiques ce qui permet d'obtenir une durée de cycles d'amplification très courte. L'action combinée de l'air pulsé et de la rotation très rapide du Rotor-Gene 3000 offre aussi une grande rapidité de transferts thermiques et une uniformité de température maximale entre les échantillons.

Le **Smart Cycler se distingue quant à lui par ses 16 modules indépendants** iCore composés chacun d'un mini-thermocycleur équipé de plaques chauffantes en céramique, d'un ventilateur, d'un microspectrofluorimètre et d'un système d'analyse des données. Chaque module étant programmable indépendamment, il est possible de réaliser des PCR différentes simultanément, ce qui présente un avantage pour la mise au point de techniques et pour l'ajout d'analyses en urgence. Ce système permet donc la réalisation d'analyses différentes simultanément sur un même prélèvement. Six blocs peuvent être montés en série pour permettre l'analyse de 96 échantillons. Les consommables sont souvent captifs et leur coût doit être pris en compte dans le budget de fonctionnement.

2.2 les modules de détection

Les **sources lumineuses d'excitation sont de trois types : source laser-argon, lampes électroniques LED (light-emitting diodes) et lampes halogènes à filament de tungstène**. Les sources laser et LED produisent un faisceau lumineux très intense qui est ensuite généralement filtré à l'aide d'un filtre à bande passante étroite, ce qui limite le choix des fluorophores utilisables. Les lampes halogènes ont un domaine spectral étendu, ce qui permet, grâce à des filtres optiques optimisés pour éviter le chevauchement des spectres d'excitation, d'utiliser un très grand nombre de fluorophores différents. Elles produisent une intensité lumineuse plus faible que les sources laser et les LED ; elles sont donc moins sensibles, inconvénient compensé par un bruit de fond moindre.

Les **systèmes de détection peuvent être : une caméra CCD (charge coupled device), une barrette de photodiodes ou des tubes photomultiplicateurs**. Ces derniers ont une sensibilité supérieure aux caméras CCD et aux photodiodes, ce qui les rendraient particulièrement bien adaptés dans une PCR multiplex à la détection simultanée des signaux émis par plusieurs fluorophores.

La **plupart des systèmes sont multi-canaux** et permettent donc de réaliser des PCR multiplex. On peut considérer que l'existence de deux canaux est un minimum car cela permet la détection d'un contrôle interne simultanément de la cible (exemples : MiniOpticon et Opticon2, thermocycleurs à plaques de 48 et 96 échantillons proposés dans la gamme Bio-Rad).

2.3 La station de travail informatique

Tous les systèmes ouverts présentés permettent d'acquérir en temps réel et d'afficher les données mesurées. Les courbes d'amplification peuvent être suivies en direct. De nombreux systèmes proposent une traçabilité des utilisateurs avec des droits d'accès variables. Certains, particulièrement orientés vers le diagnostic clinique, possèdent un **module d'interprétation automatique** des séries avec validation des principales données et paramétrable ou non selon les systèmes par l'opérateur. Tous les systèmes supportent l'exportation des données permettant, par exemple, le suivi à distance du bon déroulement de la réaction et l'interrogation à distance d'un ingénieur d'application en cas de difficulté.

Tableau I : Descriptif des systèmes d'extraction

	m1000 & m2000sp	miniMAG	easy MAG	EZ1
distributeur	ABBOTT	bioMérieux	bioMérieux	QIAGEN
constructeur	TECAN			PSS (Japon)
type (automatique, semi-automatique)	Automatique; le m2000sp prépare et distribue le mix	Semi-automatique	Automatique	Automatique
nombre d'échantillons maxi	48 (m1000) & 96 (m2000sp)	12	24	6
nombre d'échantillons mini/série	24	1	1	1
durée d'une série complète (ADN génomique, ADN et ARN microbiens)	2h ARN / 2h à 3h ADN	1h avec lyse ; 45 min sans lyse	1h avec lyse ; 45 min sans lyse	17 à 45 min selon protocole (moy. 25 min)
type de consommables (barrettes prêtes à l'emploi, tubes...)	microplaques 96	Tubes 1,5 ml	Navettes prêtes à l'emploi	Tubes Sarstedt 2 ml
tubes primaires	oui	Non. Transfert sur tube de lyse 2 ml (format 15 ml)	Non. Transfert sur navettes codabarrées	non
volume échantillon (ADN/ ARN)	200 à 1000 µl	10 à 1000 µl	10 à 1000 µl	100 à 400 µl selon protocole
volume éluat (ADN/ ARN)	70 à 400 µl	minimum 10 µl	minimum 25 µl	50 à 200 µl selon protocole
Technologie				
extraction ADN	Captation ADN sur microparticules de silice magnétiques puis lavages et élution	Extraction B00M sur silice magnétique, utilisation possible de carrier	Extraction B00M sur silice magnétique, utilisation possible de carrier	particules magnétiques recouvertes de silice
extraction ARN	Captation ARN sur microparticules oxyde de fer magnétiques puis lavages et élution			
rendement maxi ADN et ARN en µg	non communiqué	environ 300 µg	environ 300 µg	> 70% des acides nucléiques microbiens (liquides biologiques) après lyse optimale
nombre de protocoles d'extraction différents (tissus, liquides...)	18	1 seul pour tout échantillon lysé	1 seul pour tout échantillon lysé	20 protocoles principaux + nombreuses variantes
Sécurisation et traçabilité				
- des étapes d'extraction (pipetage, élution)	contrôle par le logiciel	non	oui par détection de niveau	non
- des échantillons	contrôle par le logiciel	non	oui avec assistance au chargement	non
tubes codés à barres	oui	non	oui	non
- des réactifs (gestion numéros de lots, péremptions...)	oui	non	oui complète avec pesée en temps réel	non
coût/extraction (ex: extraction ADN bactérien sur liquide biologique)	non communiqué	non communiqué	non communiqué	5,50 à 6,50 €HT par échantillon
année d'introduction sur le marché	2003	2004	2005	2002
marquage CE IVD	oui	oui	oui	en cours

Tableau I : Descriptif des systèmes d'extraction

M48	Biorobot Mdx	MagNA Pure Compact	MagNA Pure	CobasAmpliprep
QIAGEN	QIAGEN	Roche	Roche	Roche
PSS (Japon)	QIAGEN Instruments	NC	NC	NC
Automatique	Automatique	Automatique	Automatique	Automatique
48	96	8	8	72
6	24	1	1	1
2h à 5h selon protocole	2h à 3h30 selon protocole	25-40min	30- 90 min	2h pour la première série de 24 1h pour les suivantes
Tubes Sarstedt 2 ml	Microplaques 96	barettes prêtes à l'emploi	consommables spécifiques	consommables spécifiques
non	oui	non	non	non
100 à 700 µl selon protocole	200 à 300 µl	100-1000 µl	20-1000 µl	200µl - 1 ml
50 à 400 µl selon protocole	50 à 200 µl	50-200 µl	50-200 µl	75 µl
Technologie				
particules magnétiques recouvertes de silice, possibilité d'utiliser un carier et/ou un contrôle interne	membrane de gel de silice, possibilité d'utiliser un carier et/ou un contrôle interne	billes magnétiques recouvertes de silice	billes magnétiques recouvertes de silice	billes magnétiques recouvertes de silice
> 70% des acides nucléiques microbiens (liquides biologiques) après lyse optimale	> 90% des acides nucléiques microbiens (liquides biologiques) après lyse optimale	NC	NC	NC
24 protocoles principaux + nombreuses variantes	5 protocoles principaux + ~20 protocoles spécifiques dérivés	NC	NC	NC
Sécurisation et traçabilité				
non	vérification automatique de la table de travail, détection du niveau de liquide, vitesse d'aspi- ration, aspiration d'un volume d'air après la prise d'essai, déplacement du bras optimisé, vérification du colmatage des membranes, traçabilité des étapes jusqu'à l'élution, compatibilité CFR 21-11	NC	NC	oui
traçabilité relative (saisie au clavier, lecteur code à barres manuel ou importation de liste de travail)	enregistrement automatique des codes à barres (avec possibi- lité de saisie au clavier, lecteur code à barres manuel ou impor- tation d'une liste de travail), zone de stockage protégée, détection du niveau de liquide, détection de caillots, invalida- tion documentée à la prise d'échantillon...	oui	NC	oui
oui, manuellement	oui	oui	NC	oui
non	oui	oui	NC	oui
~3 à 5 EHT en série de 48 échantillons	~3 à 5 EHT / extraction en série de 96 échantillons	NC	NC	NC
2002	2002	NC	NC	NC
en cours	oui	oui	oui	oui

Tableau II : Descriptif des systèmes de PCR temps réel

	SMART-CYCLER II	Rotor-Gene 3000	LightCycler 2.0	CobasTaqman 48	ABI 7500 Fast Real Time PCR System	ABI 7900 Fast Real Time PCR System
distributeur	Instrumentation Laboratory France (www.il-france.fr)	DiaTech France (www.diatech-networks.com)	Roche Diagnostics France	Roche Diagnostics France	Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com)	Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com)
constructeur	Cepheid	Corbett Research	Roche Diagnostics	Roche Diagnostics	Applied Biosystems	Applied Biosystems
système fermé/ouvert	Système ouvert	Système ouvert	fermé et ouvert	fermé et ouvert	Système ouvert	Système ouvert
Technologie						
type de chauffage	plaques en céramique	Élément chauffant (nickel) sur le dessus de la chambre	air-pulsé	effet Peltier	effet Peltier	effet Peltier
type de refroidissement	air pulsé	air pulsé	air-pulsé		effet Peltier	effet Peltier
précision de température	+/- 0,5 °C entre 60 et 95°C	+/- 0,1°C	NC*	NC	+/- 0,5 °C entre 60 et 95°C	+/- 0,5 °C entre 60 et 95°C
uniformité de température	+/- 0,5 °C entre 60 et 95°C	+/- 0,01°C	NC	NC	+/- 0,5 °C entre 60 et 95°C	+/- 0,5 °C entre 60 et 95°C
rampes de température maxi en degrés/sec en montée	10 °C/sec	2,5°C/s	20°C/s	NC	Option "Fast" plus de 3°C/s Modes standards/émulation 1,6 / 0,8°C/s	Option "Fast" plus de 3°C/s Modes standards/émulation 1,6 / 0,8°C/s
en descente	2,5 °C/sec	2,5°C/s		NC	Option "Fast" plus de 3°C/s Modes standards/émulation 1,6 / 0,8°C/s	Option "Fast" plus de 3°C/s Modes standards/émulation 1,6 / 0,8°C/s
durée d'un run (40 cycles : 95°/5s, 60°/15s, 72°/15s)	40 min	Environ 60 minutes (réduction possible par "dénaturation optique")	20 min	NC	37 min ("option fast")	37 min ("option fast")
capacité en nombre d'échantillons	de 16 à 96 selon configuration	Rotors de 36 ou 72 positions	32	48	96	blocs de 96 ou 384 échantillons
contenants (tubes standards, captifs; microplaques de 96, 384 ou plus)	Tubes captifs en polypropylène	Tubes standards PCR 100 et 200 µl	capillaires	K-tubes	Plaques 96 (non captif) et plaques Fast 96 (captif)	Plaques 96/384 (non captif) Plaques Fast 96 (captif)
volumes mini/maxi des échantillons-mix	25 et 100 µl	5 à 175 µl	5 à 100 µl	50 à 100 µl	25 µl	Format 96 puits : 25 µl Format 384 puits : 5 à 20 µl
possibilité de protocoles différents avec paramètres différents dans une même série	oui : 16 à 96 protocoles différents dans une même série selon configuration	non	non	non	non	non
lancement d'analyses d'urgence pendant une analyse en cours	oui	non	non	NC	non	non
Chimies	Agents intercalants, sondes d'hydrolyse - MGB, balises moléculaires, amorces amplifluor et scorpions...	Agents intercalants, sondes d'hydrolyse - MGB, FRET, scorpions, balises moléculaires	Agents intercalants, sondes d'hydrolyse, FRET	Sondes d'hydrolyse, FRET, balises moléculaires...	Agents intercalants, sondes d'hydrolyse - MGB, balises moléculaires, amorces amplifluor et scorpions...	Agents intercalants, sondes d'hydrolyse - MGB, balises moléculaires, amorces amplifluor et scorpions...
Module de détection						
source lumineuse (laser, LED, halogène,...)	LED	LED	LED	Halogène	Lampe halogène	Laser Argon (centré à 488 nm: compatible avec la plupart des fluorophores disponibles)
nombre de canaux	4 canaux	4 canaux : 470 nm, 530 nm, 585 nm, 625 nm. (ROX inutile)	6 canaux de détection	4 canaux de détection	5 filtres d'excitation 5 filtres d'émission	
longueurs d'ondes fixes/variables	fixes	6 filtres de détection : 510/10, 550/10, 610/10, 580/hp, 610/hp, 660/hp nm.	530, 560, 610, 640, 670, 705 nm	Fixes Filtres d'émission (520, 575, 645 et 725 nm)	Détection sur longueur d'onde de chaque filtre +/- 20 nm	Détection sur le spectre d'émission 500 à 660 nm
détecteur (spectro, CCD,...)	4 Photodétecteurs	Tube photomultiplicateur	Fibre optique	Fibre optique	Caméra CCD bi-dimensionnelle refroidie	Caméra CCD bi-dimensionnelle refroidie (32 points de mesure réalisés entre 500 et 660 nm)
fluorophores utilisables	FAM, SYBRGreen, TET, CY3, VIC, HEX, JOE, ALEXA 532, TXR, ROX, CY5, ALEXA 634...	Tous types de fluorophores : SYBRGreen, FAM, TET, JOE, VIC, MAX, ROX, TAMRA, CY3, CY5, CY5.5, TEX RED	NC	FAM-HEX- Red 640, Red 705	FAM, SYBRGreen, VIC, JOE, TAMRA, NED, CY3, CY5, TEXAS RED & ROX	FAM, SYBRGreen, VIC, JOE, TAMRA, NED, CY3, CY5, TEXAS RED & ROX
Logiciel d'analyse						
sécurisation (nom d'utilisateur et mot de passe)	oui	oui	oui	oui	oui	oui
droits d'accès variables selon les utilisateurs	oui	non	oui	oui	oui	oui
interprétation automatique des séries (validation automatique des CI, Ct,...)	oui	non	oui	oui	oui	oui
poss. de piloter plusieurs modules PCR avec un même PC	oui	non	non	3	non	non
installation/formation sur site inclus/optionnel	inclus	inclus	inclus	inclus	Stage de formation aux Ulis (91) inclus / Formation sur site optionnelle	Stage de formation aux Ulis (91) inclus / Formation sur site optionnelle
SAV						
mise à jour du logiciel gratuit/payant	gratuite	Mise à jour gratuite illimitée sur le web pour les utilisateurs	gratuite	gratuite	gratuite	gratuite
machine de remplacement gratuite ou payante pendant réparation	gratuite	gratuite (les 2 premières années)	NC	oui	Réparation sur site	Réparation sur site
localisation du site SAV (France, Europe, autre)	France	Cambridge (Angleterre)	France	France	France (Les Ulis, 91)	France (Les Ulis, 91)
aide technique téléphonique / mail au démarrage par ingénieur d'application	oui	oui	oui	oui	oui	oui
possibilité de formation continue web	non	Abstracts, publications, protocoles techniques disponibles sur le web	non	non	oui	oui
Autres						
nombre de machines installées en diagnostic (France, Europe, autre)	France : 30, Europe : 300, USA >2000 (Tous domaines)	1500	NC	NC	France : 10 (+ recherche : 20)	France : 5 (+ recherche : 70)
la société dispose-t-elle des licences PCR diagnostic	oui	non	oui	oui	oui	oui
Marquage CE DMDIV	oui	non	oui	oui	non	non

Tableau II : Descriptif des systèmes de PCR temps réel

m2000rt	Stratagene Mx3000P & Mx3005P	Stratagene Mx4000	BIO-RAD Chromo4	BIO-RAD iQ5
ABBOTT (www.abbott.com)	Stratagene (www.stratagene.com)	Stratagene (www.stratagene.com)	Bio-Rad (www.bio-rad.com)	Bio-Rad (www.bio-rad.com)
ABBOTT	Stratagene	Stratagene	Bio-Rad	Bio-Rad
fermé au lancement-ouvert en 2006	Système ouvert	Système ouvert	Système ouvert	Système ouvert
Technologie				
effet Peltier	effet Peltier	effet Peltier	effet Peltier/Joule	effet Peltier/Joule
effet Peltier	effet Peltier	effet Peltier	effet Peltier/Joule	effet Peltier/Joule
0,1° C	+/- 0,25°C	+/- 0,25°C	+/- 0,3°C	+/- 0,3°C
+/- 0,5 ° C	+/- 0,25°C	+/- 0,25°C	+/- 0,4°C	+/- 0,4°C
3,5°C /s	max. 2,5°C/s	de 0,1 à 2,2°C/s	jusqu'à 3°C/s	3,3°C/s
3,5°C/s	max. 2,5°C/s	de 0,1 à 2,2°C/s	jusqu'à 3°C/s	2,2°C/s
3h (HIV/HCV)	non communiqué	non communiqué	< 50 min	< 50 min
96	96	96	96	96
Plaques de 96	Plaques 96 puits, barrettes et tubes individuels 200 µl (standard)	Plaques 96 puits, barrettes et tubes individuels 200 µl (standard)	Tubes 200 µl standards, barrettes, plaques	Tubes 200µl standards, barrettes, plaques
2 à 100 µl	10-50 µl	10-50 µl	10 - 100 µl	15 - 100 µl
non au lancement	non	non	non	non
non au lancement	non	non	non	non
Toutes chimies compatibles dès ouverture logiciel	Agents intercalants, sondes d'hydrolyse, MGB, balises moléculaires, scorpions	Agents intercalants, sondes d'hydrolyse, MGB, balises moléculaires, scorpions	Agents intercalants, sondes hydrolyse, hybridation	Agents intercalants, sondes hydrolyse, hybridation
Module de détection				
Lampe halogène	Lampe halogène	Lampe halogène	LED	Lampe halogène
5 filtres d'excitation 5 filtres d'émission	Mx3000P : 4 couleurs & Mx3500P : 5 couleurs, filtres déterminés lors de l'achat	4 couleurs, filtres déterminés lors de l'achat, possibilité de modifications par l'utilisateur	4	5
variables	Excitation 350-750 nm	Excitation 350-750 nm	fixes	fixes
caméra CCD	Tube Photomultiplicateur, 350-700 nm	4 Tubes Photomultiplicateurs, 350-830 nm	Photodiodes	CCD
FAM™, VIC™, JOE, ROX™, NED™, TAMRA™, SYBRGreen, CY3, CY5, TEXAS RED	Ensemble des fluorophores disponibles dans le commerce, sauf CY7	Ensemble des fluorophores disponibles dans le commerce	FAM, HEX, TET, VIC, JOE, CY3, TAMRA, TEXAS RED, ROX, CY5, SYBRGreen	FAM, HEX, TET, VIC, JOE, CY3, TAMRA, TEXAS RED, ROX, CY5, SYBRGreen
Logiciel d'analyse				
oui	non	non	non	non
oui	non	non	non	non
oui	oui	oui	en partie	oui
non	oui, jusqu'à 5	oui, jusqu'à 5	oui	non
inclus	Installation réalisée par l'utilisateur, formation continue au logiciel via Internet	Installation réalisée par un ingénieur d'application, formation au logiciel sur site	inclus	inclus
SAV				
gratuite	gratuite	gratuite	gratuite	gratuite
oui	oui, selon contrat de maintenance	Réparation sur site	oui, sous garantie	oui, sous garantie
Rungis	Kassel, Allemagne	Réparation sur site ou Kassel, Allemagne	France	France
oui	oui, en Français	oui, en Français	oui	
non	oui, http://www.stratagene.com/tradeshows/fasttrack.aspx	oui, http://www.stratagene.com/tradeshows/fasttrack.aspx	non	non
Autres				
France : 9, autres : 45	non communiqué	non communiqué	non communiqué	non communiqué
oui	non	non	non	non
oui	oui	oui	non	non

III. LES KITS DIAGNOSTIC (tableau III)

Les techniques «maisons» ou réalisées à partir de publications internationales représentent encore une partie importante des techniques réalisées dans les laboratoires de biologie moléculaire. Malgré les simplifications apportées par la PCR en temps réel, elles ne peuvent être effectuées que par des opérateurs expérimentés et requièrent la plus grande rigueur. L'apparition de kits à visée diagnostique qui, à notre sens, doivent contenir un contrôle interne, permet de diminuer les manipulations en réduisant le nombre de réactifs. **Ces kits permettent donc en général un gain de temps et présentent un risque de contamination moindre** et une meilleure traçabilité. Leur apparition sur le marché constitue une étape importante dans le passage en routine des techniques de biologie moléculaire dans les laboratoires non spécialisés.

De plus en plus de ces kits sont commercialisés mais leur degré de validation est très variable. Bien peu d'entre eux portent la **mention CE** pour l'instant. Beaucoup ne sont pas validés par le fabricant pour un usage diagnostique ; il incombe alors au biologiste d'assumer cette validation lui-même. Aux USA, pour pallier le fossé considérable entre les exigences réglementaires pour les kits marqués FDA et ceux «for research only, not for diagnostic use» mais néanmoins utilisés en diagnostic, il a été introduit une **norme «ASR»** qui correspond à la fois à une garantie de fabrication selon les bonnes pratiques et de validation scientifique par des études publiées. Cepheid (fabricant du Smart Cycler) propose une gamme intégrée de kits «ASR». Ces kits contiennent les amorces, les sondes spécifiques et le contrôle interne sous forme d'une bille lyophilisée ainsi que le mix PCR sous la même forme : d'utilisation très facile, ces coffrets ne contiennent pas de témoins et ne dispensent pas d'une validation. Dans le même esprit, certains fabricants proposent des tubes ou plaques pré-remplis dans lesquels il suffit d'ajouter le produit d'extraction (Biotools).

IV. CONCLUSION

Les thermocycleurs évoluent vers une **miniaturisation** des chambres réactionnelles permettant à la fois une économie de réactifs et un **raccourcissement des cycles** grâce à une inertie thermique moindre. Dans les derniers appareils sortis en recherche, le SpeedCycler (Eppendorf Analytik Jena) est capable d'effectuer un protocole de 40 cycles en 13 min et le Biotrove OpenArray NT Cycler, s'appuyant

sur les nanotechnologies, permet de réaliser plus de 9000 réactions dans un volume de 33 nanolitres chacune et pour un coût dix fois moindre qu'une réaction de PCR temps réel classique.

L'automatisation de l'extraction est de plus en plus poussée et devient accompagnée de la préparation et de l'ajout du mix PCR par le même automate : les échantillons peuvent alors être directement transférés dans le système de PCR temps réel. La **traçabilité** de toutes les étapes est en progression, y compris sur les modèles les plus petits.

Enfin, le biologiste est conduit à préférer des kits et des machines marqués CE pour se conformer aux exigences de l'assurance qualité obligatoire, ce qui conduit naturellement au choix de **systèmes de plus en plus fermés**. Le modèle le plus abouti à l'heure actuelle est le GeneXpert (Cepheid) qui effectue en son sein l'extraction, l'amplification et la détection de la cible et qui permet aux postiers américains de vérifier eux-mêmes pluri-quotidiennement l'absence de spore de charbon dans leur environnement.

Dans les laboratoires de diagnostic, il est donc temps de ne plus considérer la PCR en temps réel comme une technique dispendieuse réservée à une élite mais de l'intégrer dans la panoplie des outils d'aujourd'hui. ■

RÉFÉRENCES GÉNÉRALES

1. Pray L. New Thermocyclers hit the street. The Scientist. 2005; 6: 30-31. www.the-scientist.com
2. Tse C., Capeau J.. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. Ann Biol Clin. 2003; 61 : 279-293
3. Yang S., Rothman R. PCR based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. Lancet Infect Dis. 2004; 4 : 337-348. <http://infection.thelancet.com>
4. Poitras E., Houde A. La PCR en temps réel : principe et applications. Rev in Biol and Biotech. 2002; 2 : 2-11. <http://www.collegeahuntsic.qc.ca/pagesdept/biologie/Programmes/Biotechnologies/210-113-AH/PCR.pdf>
5. BioTribune magazine. Numéro spécial "Biologie moléculaire et Bactériologie". Numéro 8 novembre 2003.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leurs plus vifs remerciements aux responsables commerciaux et techniques des différentes sociétés pour les précisions fournies sur leurs produits.

1. Guide de Bonne Exécution des Analyses Médicales : Arrêté du 26 novembre 1999, publié le 11 décembre 1999.

Tableau III : Kits diagnostics commercialisés pour chaque thermocycleur

	Smart Cycler	Rotor-Gene	m2000rt	ABI 7500 / 7900	Stratagène	Chromo4/IQ5	Light Cycler	Cobas TaqMan 48
<i>Chlamydia trachomatis</i>	non	RealArt C. trachomatis PCR KIT (Artus CE)	RealTime Chlamydia (ABBOTT CE)	non	non	non	non	oui
<i>Bordetella pertussis</i>	oui (ASR)	non	non	non	non	non	non	non
HSV ou HSV1, HSV2	oui (ASR)	RealArt HSV1/2 RG PCR KIT (Artus)	non	non	non	non	LC HSV 1/2 Detection Kit	non
VIH	non	RealArt HIV-1 RNA PCR KIT (Artus)	RealTime HIV-1 (ABBOTT CE)	non	non	non	non	Cobas TaqMan HIV-1 (CE-IVD)
VHC	non	non	RealTime HCV (ABBOTT CE)	non	non	non	non	Cobas TaqMan HCV (CE-IVD)
autres (disponibles 08/2005)	Enterovirus, ParvoB19, Influenzae virus A/B, VRS, spa (Staphylococcus aureus), mecA (SAMR), Mycoplasma pneumoniae (Cepheid, ASR) StreptoB, SAMR (IDI), 0157, Legionella, Salmonella (Takara)	CMV, EBV(CE), HBV(CE), Campylobacter, Listeria monocytogenes, complexe M. tuberculosis(CE), Salmonella, Plasmodium(CE), SARS, ParvoB19 (CE), E. histolytica(CE) (Artus); HPV, CMV (Biotools)	non	Salmonella, Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni, E. coli 0157 (Applied Biosystems)	non	non	Bacillus anthracis, Enterococcus, Staphylococcus, MRSA, VREPsseudomonas, Candida Parvo B19, HAV, EBV, SARS-CoV, Salmonella, Listeria monocytogenes, Listeria sp, E. coli 0157, Campylobacter	Cobas TaqMan HBV (CE-IVD)
disponibles 03/2006	vanA/B, Bordetella pertussis/parapertussis, C. difficile, toxine PVL, StreptoA, Chlamydia pneumoniae, Legionella, VZV (Cepheid, ASR)	Legionella (Biotools)	04/2006 : HBV(ABBOTT, CE), CMV, EBV, ParvoB19, VZV, HSV1/2, complexe M. tuberculosis (Artus, CE)		non	non	Parvovirus B19 (CE-IVD)	Mycobacterium tuberculosis (CE-IVD), HPV (CE-IVD)