

les techniques d'extraction de l'ADN libre circulant

1 / Extraction ADN libre circulant

La prise en charge des patients atteints d'un cancer au stade métastatique passe aujourd'hui par une caractérisation des altérations somatiques tumorales à la recherche d'une cible thérapeutique potentielle.

L'isolement et l'analyse de l'ADN tumoral circulant issu de plasma est susceptible d'être utilisé comme approche non invasive pour détecter ces altérations. Mais les résultats analytiques sont très dépendants de l'étape d'extraction qui doit permettre d'isoler efficacement des quantités souvent faibles de matériel et être compatible avec les techniques mises en place en aval.

Ces méthodes d'extraction doivent également pouvoir être mises en place facilement à l'hôpital dans le cadre du soin courant.

2 / Différentes méthodes d'extraction

2-1 - Technologie : colonne avec membrane de silice

La technologie d'extraction sur colonne avec membrane de silice est une méthode largement répandue dans les kits d'extraction de laboratoire. L'ADN est adsorbé spécifiquement sur la membrane de silice en présence de certains sels et à un pH particulier. Les contaminants cellulaires sont éliminés par les différentes étapes de lavage. Des sels chaotropes sont inclus pour aider à la dénaturation de protéines et à l'extraction de l'ADN. L'ADN est finalement élué dans un tampon faible en sel ou tampon d'élution.

Depuis quelques années, nous utilisons au laboratoire le kit de la société Qiagen : QIAamp® Circulating Nucleic Acid kit, qui fonctionne sur ce principe. Il permet de récupérer des acides nucléiques fragmentés présents dans un volume de plasma allant de 1 à 5mL. Il faut 4 heures pour extraire 24 échantillons. Il est devenu notre kit de référence. C'est aussi le kit le plus référencé dans les publications concernant l'ADNtc.

2-2 - Technologie : séparation bille magnétique

La technologie d'extraction sur billes magnétique est une méthode basée sur la liaison réversible de l'ADN à une surface solide, des billes paramagnétiques recouvertes d'une couche de silice. Après liaison spécifique de l'ADN, les billes sont séparées des autres composants cellulaires contaminants, lavées et finalement l'ADN purifié est élué.

Les billes magnétiques lient l'ADN de manière plus efficace que les membranes de silice, ce qui entraîne des rendements supérieurs et plus uniformes. En outre, il n'y a pas de risque de colmatage de la membrane au cours du processus d'extraction. Ce problème de colmatage est particulièrement préoccupant avec des échantillons riches en protéines de grand volume tels que le plasma.

Les automates QIASymphony® SP de la société Qiagen et Maxwell® RSC de la société Promega fonctionnent sur ce principe, de même que le kit manuel MagMAX™.

2-2-1 – QIASymphony® SP : DSP Virus Pathogen

Qiagen a adapté son protocole manuel pour le mettre en place sur l'automate QIASymphony® SP.

A la différence du kit manuel, la capture des ADNlc ne se fait pas sur une membrane à base de silice mais sur des particules magnétiques à base de silice. Le pH des tampons de lavage et d'élution font que l'ADN reste fixé ou non aux billes.

Comme pour le kit manuel, le protocole comporte 4 étapes : une lyse, un accrochage de l'ADN sur les billes, des lavages et une élution (Figure 20). Il peut traiter 24 échantillons en parallèle. De même, l'utilisation d'un RNA carrier est fortement recommandée si on veut optimiser la récupération des acides nucléiques. Une extraction complète dure 3h00.

Le protocole est optimisé pour des grands volumes de plasma de l'ordre de 4mL avec une élution dans 70µL de tampon. Mais dans le cadre de notre étude nous avons décidé de tester ce kit dans les mêmes conditions que celles utilisées avec la technique manuelle Qiagen, c'est à dire à partir de 2mL de plasma et une élution dans 40µL de tampon.

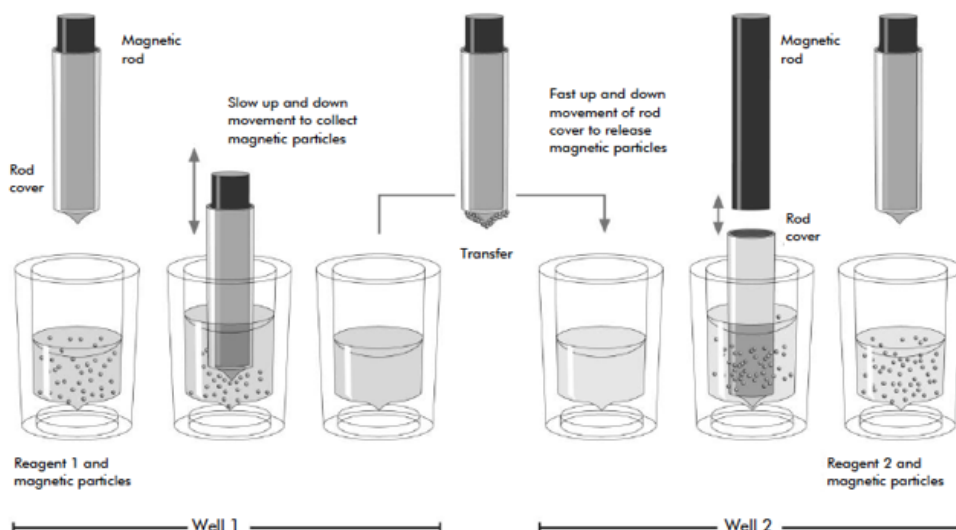


Figure 20 : Principe de fonctionnement du QIA Symphony® SP.

Un barreau magnétique (rod), recouvert d'une protection plastique (rod cover) plonge dans un puits avec des billes magnétiques, puis dans celui avec l'échantillon. S'en suit des étapes de lavage. Le barreau aimanté sur lequel les billes et l'ADN est accroché va plonger dans différents puits contenant des tampons de lavage. La dernière étape consiste à lâcher les billes dans le tampon d'élution, l'ADN va se décrocher et les billes vont être récupérées et jetées.

2-2-2 - Maxwell® RSC : ccfDNA Plasma

En 2015, la société Promega nous a proposé de tester avant commercialisation un nouveau kit d'extraction disponible sur leur automate Maxwell® RSC : le ccfDNA Plasma Kit. Il a pour objectif de récupérer l'ADNlc à partir d'un volume de plasma très faible : de 0,2 à 1mL. Le principe de ce kit repose sur une technologie de bille paramagnétique.

L'avantage de cet automate est sa simplicité d'utilisation. Une extraction permet de traiter 16 échantillons en 80 minutes, de plus il ne pipette aucun liquide, les barreaux aimantés se déplacent toujours au-dessus du même échantillon donc le risque de contamination inter-échantillons est très faible.

Nous avons testé ce kit sur 1mL de plasma, l'objectif étant d'avoir un meilleur rendement que le kit Qiagen manuel mais en utilisant un volume de plasma moins important et en automatisant l'extraction.

2-2-3 – Life Technologies : MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit

Courant 2016, la société Life technologies nous a proposé de tester avant commercialisation leur nouveau kit d'extraction destiné à la récupération de l'ADNlc à partir d'une faible quantité de plasma. Le MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit est optimisé pour les échantillons biologiques. C'est une technique d'extraction manuelle, mais l'accroche de l'ADNlc se fait sur des billes

paramagnétiques avec une chimie de surface à base de silice (Dynabeads MyOne Silane) et non sur des colonnes avec membrane.

Cette technique a l'avantage de pouvoir adapter le protocole en fonction du tube de prélèvement sanguin utilisé (EDTA ou Cell-Free DNA BCT® développé par la société Streck), de pouvoir choisir le volume de plasma à extraire ainsi que le volume d'élution, qui peut descendre jusqu'à 15µl.

Il existe deux protocoles différents pour ce kit, un protocole manuel standard avec une élution dans 50µl et un protocole dédié pour une utilisation en NGS de l'ADNlc, permettant de concentrer les ADNlc dans un volume d'élution plus faible de 15µl.

Le but de ce test est de maximiser la récupération de l'ADNlc à partir d'un volume de plasma faible et d'optimiser l'analyse en NGS grâce au protocole dédié.

3 / Comparaison de méthode et analyses

3-1 - Test du kit MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation

Nous avons testé le kit MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation, sur une série de 10 échantillons de plasma de patient avec un cancer du poumon non à petite cellule.

Ces échantillons avaient tous été extraits une première fois avec le kit manuel Qiagen, analysés en dPCR (Figure 21) et séquencés sur l'Ion Proton™. Ils sont tous mutés *EGFR*, avec une fréquence allélique du mutant allant de 0,4% à 28% (Tableau 4).

Les données présentées correspondent à une sélection de 3 échantillons parmi les 10 analysés : l'échantillon 42 PL 1, l'échantillon 48 PL 1 et l'échantillon 35 PL 7.

La Figure 21 est une représentation graphique des résultats obtenus en dPCR des 3 échantillons extraient manuellement. Le tableau 5, regroupe les données de fréquence allélique du mutant analysé en dPCR et en NGS. Les valeurs sont très proches et valident la présence d'ADNlc analysable au sein d'ADNlc chez des échantillons extraits avec la technique manuelle Qiagen.

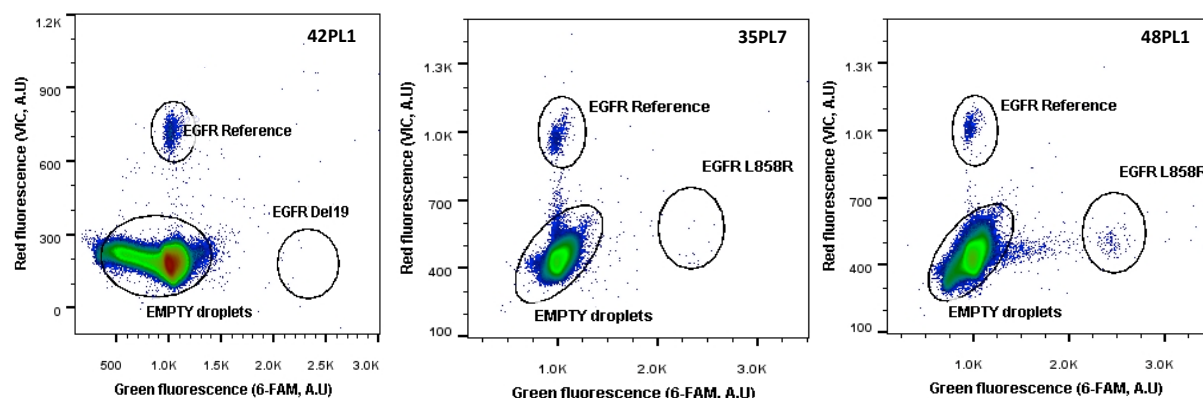


Figure 21 : Représentation graphique de la dPCR des échantillons 42PL1, 35PL7 et 48PL1.

dPCR sur les échantillons extraient avec le kit QIAamp® nucleic acid. L'échantillon 42PL1 est muté Del19 avec une fréquence allélique du mutant de 0,46%, l'échantillon 35PL7 est muté p.L858R avec une fréquence allélique du mutant de 2,21%, et l'échantillon 48PL1 est muté p.L858R avec une fréquence allélique du mutant de 28,21%.

échantillon	mutation	fréquence allélique du mutant - NGS - méthode extraction manuelle Qiagen	fréquence allélique du mutant - dPCR - méthode extraction manuelle Qiagen
42 PL 1	EGFR délétion exon 19	0,39%	0,46%
35 PL 7	EGFR mutation p.L858R	1,71%	2,21%
48 PL 1	EGFR mutation p.L858R	27,07%	28,21%

Tableau 5 : Comparaison des fréquences alléliques de 3 échantillons obtenues en NGS et en dPCR.

Comparaison de 3 des 10 échantillons extraient avec le kit QIAamp® nucleic acid. Fréquence allélique du mutant en NGS et en dPCR

Pour notre test, les 10 échantillons sont extraient à partir de 1mL de plasma, une première fois suivant le protocole « isolate cfDNA manuellement » et une seconde fois suivant le protocole « high concentration ». Ils sont ensuite dosés et séquencés sur l'Ion Proton™ avec le panel Colon-Lung.

Le dosage au Qubit® montre que la quantité d'ADNlc extraite mesurée au Qubit® et rapportée au 1ml de plasma extrait montre une diminution de moitié de la quantité d'ADNlc obtenue lorsque le plasma est extrait avec le kit MagMAX™ « isolate cfDNA manuellement » en comparaison avec le kit manuel QIAamp® nucleic acid (Tableau 6).

Les échantillons extraient avec la technique « high concentration » dédiée pour l'analyse en NGS ne sont pas suffisamment concentrés pour être dosés au Qubit.

Dans le cas du Séquençage NGS, le volume de séquence obtenu avec les échantillons extraient avec le kit MagMAX™ est 4 fois inférieur à celui des échantillons extraient avec la technique de référence

(Tableau 7). Moins de 10% d'amplicons s'alignent sur le génome de référence, contrairement à un échantillon extrait avec le kit manuel Qiagen ou plus de 90% des amplicons séquencés s'alignent. Il pourrait s'agir d'une amplification non spécifique dans le cas de l'ADN extrait en MagMAX™. Le nombre de fois ou un amplicon est lu est inférieur à 250 dans le cas de notre test, il est de plus de 10 000 fois pour un échantillon classique.

Nous en avons conclu que le séquençage des 10 échantillons n'était pas interprétable, et au vu de ces résultats nous avons décidé de ne pas aller plus loin dans le test de ce kit.

échantillon	mutation	concentration ADNlc en ng/mL - méthode extraction manuelle Qiagen	concentration ADNlc en ng/mL méthode extraction MagMAX™ « isolate cfDNA manually »
42 PL 1	EGFR délétion exon 19	101	37,25
35 PL 7	EGFR mutation p.L858R	15,57	13,8
48 PL 1	EGFR mutation p.L858R	71,2	23,85

Tableau 6 : Dosage de 3 échantillons extraits manuellement ou avec le kit MagMAX™.

Code à barre	identifiant	nombre totale de séquence lue	pourcentage de séquence alignée sur le génome	moyenne du nombre de fois ou un amplicon est lu
lonXpress_074	42PL1	314549	7.71%	245.5
lonXpress_076	35PL7	10667	3.70%	3.609
lonXpress_075	48PL1	309683	4.61%	142.5
lonXpress_084	42PL1	779103	0.01%	0.777
lonXpress_086	35PL7	299566	0.06%	1.330
lonXpress_085	48PL1	264387	0.04%	0.931
lonXpress_094	94	1165982	91.73%	10668

Tableau 7 : Résultat de séquençage de 6 échantillons extraits avec le kit MagMAX et un échantillon témoin.

Lignes vertes : échantillons extraient avec le kit MagMAX™ protocole « isolate cfDNA manually ». Lignes rouges : échantillons extraient avec le kit MagMAX™ protocole « high concentration ». Ligne blanche : échantillon témoin extrait avec le kit QIAamp® nucleic acid. Tous les échantillons ont été séquencés sur la même puce.

3-2 - Comparaison des techniques Qiagen / Promega

Nous avons testé le kit ccfDNA Plasma Kit - Maxwell® RSC sur une série de 46 échantillons de plasma de patient avec un cancer du côlon métastatique.

Tous les plasmas avaient déjà été extraits une première fois avec le kit manuel Qiagen ou avec le kit DSP virus pathogen sur l'automate QIAasympy® SP. Cette première série d'extraction a été analysée en dPCR, toutes les tumeurs des patients sont mutées sur le gène *KRAS*, l'analyse de leur ADNlc montre une fréquence allélique du mutant variable allant de 0 à 212%. Certains échantillons ont une fréquence allélique du mutant supérieur à 100%, ceci est dû à un nombre de goutte mutantes supérieur au nombre de gouttes non mutantes au sein de l'échantillon. Certains échantillons ont une quantité d'ADNtc supérieur à la quantité d'ADNlc.

Pour notre test, nous avons extrait avec le kit ccfDNA Plasma Kit les 46 échantillons. Puis nous avons rapporté la quantité d'ADNlc mesuré au Qubit® au 1ml de plasma extrait. Les résultats en technique Maxwell® RSC montre une équivalence ou une supériorité par rapport à la technique manuelle sauf pour 5 échantillons.

Les échantillons ont ensuite été analysés en dPCR. Les rendements d'extraction mesurés sont tous supérieurs pour les échantillons extraits avec le Maxwell® RSC (Tableau 8). De plus, l'extraction automatisée sur le Maxwell® RSC permet de détecter la mutation recherchée dans 45,7% des échantillons. En comparaison, la méthode d'extraction de référence permet de détecter cette mutation pour 36,9% des mêmes échantillons (Figure 22 et Tableau 9).

On note 3 discordances : 2 échantillons mutés en méthode Maxwell® RSC retrouvés non muté en technique manuelle et un échantillon non muté en méthode Maxwell® RSC retrouvé muté en technique manuelle.

Les résultats montrent donc une bonne cohérence des deux méthodes d'extraction.

Aucun échec d'amplification n'a été constaté avec les échantillons extraits avec le Maxwell® RSC tandis que 4 échantillons n'ont pas permis d'obtenir d'amplification avec la méthode de référence.

Les données présentées correspondent à une sélection de 2 échantillons parmi les 46 analysés.

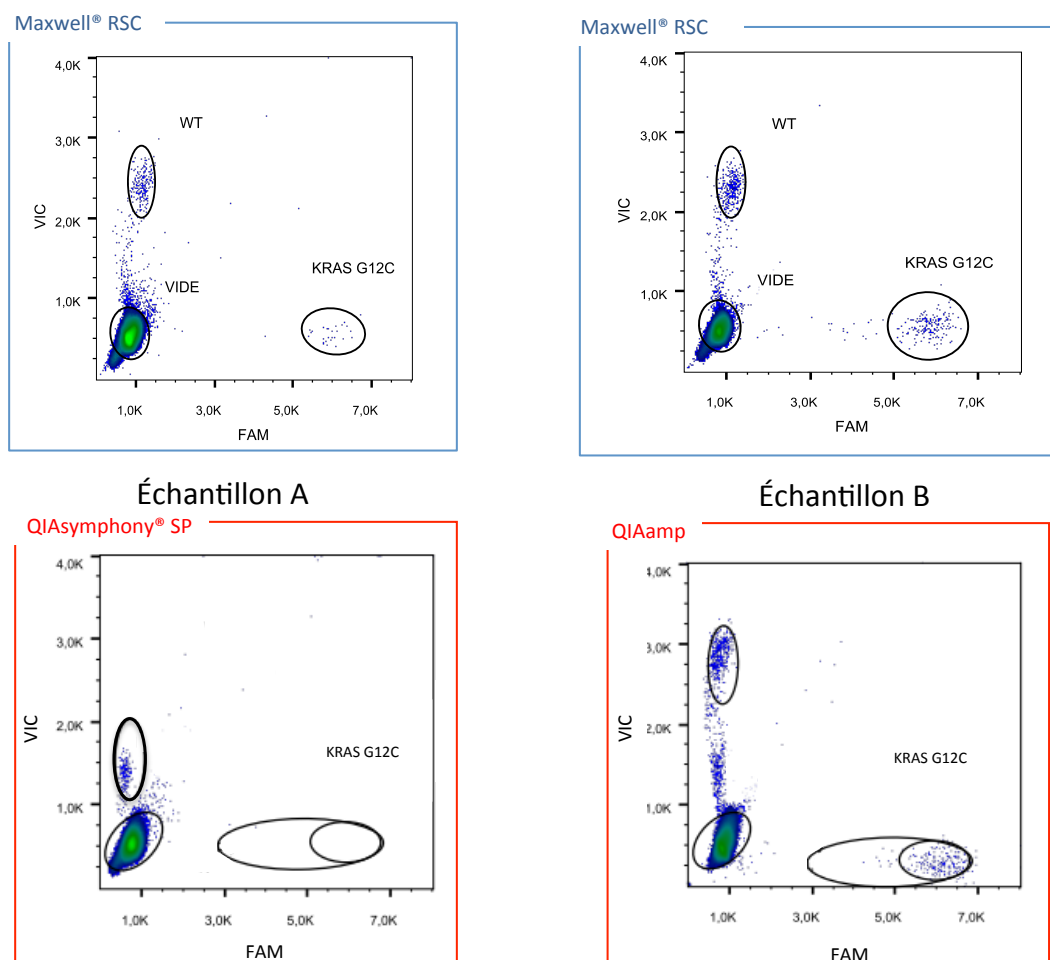


Figure 22 : dPCR de deux échantillons extraient avec une technique Qiagen ou la technique Maxwell® RSC.

Echantillon A : Extrait une première fois avec le QIAasympy® SP, kit DSP Virus Pathogen, en rouge. Et une seconde fois avec l'automate Maxwell® RSC, kit ccfdNA Plasma, en bleu. Echantillon B : Extrait une première fois avec le kit manuel QIAamp® nucleic acid, en rouge. Et une seconde fois avec l'automate Maxwell® RSC, kit ccfdNA Plasma, en bleu.

Analyse en dPCR de l'ADNtc. Les gouttes mutées KRAS G12C sont en bas à droite (coordonnée (1 ;0)), en haut à gauche les gouttes non mutées (coordonnée (0 ;1)), en coordonnée (0 ;0) les gouttes vides.

Echantillon A	QIAasymphony® SP	Maxwell® RSC
Condition extraction	2 ml – 40µl	1 ml – 60µl
Nb. Gouttes NM	212	206
Nb. Gouttes M	0	26
% Mutant	0 %	12,6 %
C. ng/ml plasma extrait ADNlc	2,3	9,1
Échantillon muté oui/non	NON	OUI

Rendement 4 fois supérieur

Echantillon B	QIAamp® nucleic acid	Maxwell® RSC
Condition extraction	2 ml – 50µl	1 ml – 60µl
Nb. Gouttes NM	500	335
Nb. Gouttes M	201	174
% Mutant	40 %	52 %
C. ng/ml plasma extrait ADNlc	10,8	20,0
Échantillon muté oui/non	OUI	OUI

Rendement 1,9 fois supérieur

Tableau 8 : Détails des échantillons A et B.

Information sur les conditions d'extraction, le nombre de gouttes mutées M, le nombre de gouttes non mutées NM, la fréquence allélique du mutant, la concentration d'ADNlc en ng/mL, la conclusion sur le statut mutationnel de l'échantillon et le rendement de la technique d'extraction du Maxwell® RSC par rapport à une technique d'extraction Qiagen manuelle ou avec le QIAasymphony® SP.

	n	Mutation -	Mutation +	Non interprétable
Méthode de référence du laboratoire	46	25 (54,3%)	17 (36,9%)	4 (8,7%)
Promega Maxwell® RSC ccfDNA Plasma kit		25 (54,3%)	21 (45,7%)	0

Tableau 9 : Taux de mutation détecté en dPCR avec la méthode manuelle Qiagen et le kit ccfDNA plasma de Promega.

Bilan des 46 échantillons testés. 25 échantillons négatifs en dPCR pour les deux techniques d'extraction, 21 échantillons retrouvés mutés avec le kit Promega contre 17 pour le kit Qiagen. 4 échantillons non interprétable avec le kit Qiagen contre 0 pour le kit Promega.

3-3 - Conclusions

Conclusions MagMAX™ : Les quantités d'ADNlc obtenues sont plus faibles que celles obtenues lors d'une extraction avec le kit de référence. Mais le problème majeur est l'impossibilité d'interprétation des données de séquençage.

Conclusions QIAasymphony® SP : Les quantités d'ADNlc obtenues sont sensiblement les mêmes qu'avec la technique manuelle mais les échantillons contiennent moins d'ADN amplifiable. De plus, le tampon d'élution contient du sel, mauvais pour la PCR digitale, ce qui pourrait expliquer les problèmes d'amplification observés.

Conclusions technique manuelle Qiagen : La quantité d'ADNlc récupérée est suffisante pour être dosée, et les fragments d'ADN sont amplifiables. La concentration d'ADNlc varie entre 1-1000 ng/mL de plasma extrait avec une moyenne à 50 ng/mL. La variabilité des concentrations obtenue témoigne de la variabilité « vraie » de concentration en ADNlc des plasmas et non d'un problème technique aléatoire. En effet quelques échantillons ont été extraits 2 fois et il existe une bonne corrélation entre les aliquots d'un 1 même prélèvement. Cette méthode a plusieurs avantages, il est possible de traiter 24 échantillons en parallèle et les volumes de plasma et d'élution sont adaptables au cas par cas. Par contre la durée de l'extraction et la praticité du kit font qu'il est difficile d'envisager un passage en routine hospitalière : il faut en moyenne 4 heures pour réaliser une extraction de 24 plasmas.

Conclusions Maxwell® RSC : L'ADNlc extrait à partir de 1ml de plasma permet d'obtenir de bons résultats de typage dans la série de plasma test par comparaison à la méthode manuelle qui nous sert de référence. Au total, les performances, la facilité d'utilisation du kit ccfDNA Plasma et la semi-automatisation de la méthode sont des points importants dans le cadre de la mise en place de ces tests en pratique de soin.

Depuis ces tests, le service de biochimie de l'HEGP a mis en place l'extraction de plasma sur le Maxwell® RSC en routine de soin.

Les échantillons de plasma des projets en cours vont continuer à être extraits avec la technique de référence du laboratoire tandis que les nouveaux projets concernant l'ADN tumoral circulant seront menés avec le kit ccf DNA plasma.

Le typage sur de l'ADNlc extrait à partir de 1mL de plasma peut être néanmoins limitant pour les prélèvements peu concentrés. L'optimisation du système sur un volume plasmatique de départ plus important apporterait un plus pour ces échantillons limites. Nous devons prochainement tester avant commercialisation le kit ccfDNA Plasma de Promega destiné à l'extraction de 2 à 4mL de plasma.