



Le service Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie de l'Hôpital Universitaire de Bicêtre : un exemple d'automatisation en recherche et diagnostic à travers l'utilisation du BioMek® BECKMAN-COULTER

Le service Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie de l'Hôpital Universitaire de Bicêtre – groupe hospitalier « Hôpitaux Universitaires Paris Sud » - offre un bel exemple de dynamisme. Accréditées COFRAC pour le séquençage du gène AIP depuis octobre dernier, ses activités bénéficient d'un engagement fort de toute son équipe et de son remarquable savoir-faire, fondé sur une expertise historique. Elles bénéficient d'un parc instrumental largement automatisé et de relations étroites développées avec des fabricants de premier rang mondial. BECKMAN-COULTER compte parmi les partenaires clés. Son système

robotisé Biomek® NXp et les kits Agencourt® associés sont aujourd'hui incontournables dans les protocoles du Laboratoire pour les purifications des produits de PCR et de séquençage Sanger et nouvel génération.

Le Dr Jérôme BOULIGAND - maitre de conférences au sein du Service - nous invite, en compagnie de plusieurs de ses collaborateurs et de M. François COSTANTINO, responsable Marketing Communication BECKMAN-COULTER, à faire le point sur l'actualité du Laboratoire et tout particulièrement sur son expérience de l'automatisation au travers

l'utilisation du BioMek® dans ses activités de recherche et de diagnostic.

De la recherche fondamentale au diagnostic : une large activité de recherche translationnelle !

Le Service Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie de l'Hôpital Universitaire de Bicêtre est l'héritier d'un laboratoire pionnier dans le domaine de la biologie moléculaire, auteur notamment du clonage de plusieurs récepteurs hormonaux à la fin des années 80. Sa structure actuelle date de 2005, suite à la réorganisation des activités de Génétique moléculaire,

Hormonologie et Pharmacologie. Affilié à l'Inserm et aux Hôpitaux Universitaires Paris Sud (Paris 11), il est également une des composantes de l'IFR 93, Institut Biomédical de Bicêtre (I2B).

Aujourd'hui, l'Unité de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie réunit sur 500 m² une dizaine de permanents hospitalo-universitaires : professeurs et docteurs ès sciences, chef de service, techniciens et assistants. Associant étroitement fondamentalistes et cliniciens, le Laboratoire développe une large activité de recherche translationnelle, de la physiologie à la pathologie, pour définir à terme de nouvelles stratégies thérapeutiques. « Une interface forte est développée avec l'Inserm et plusieurs services cliniques du groupe hospitalier Paris Sud », souligne le Dr BOULIGAND.

Parmi les axes de recherche, l'endocrinologie - thématique historique du Laboratoire - compte toujours comme l'un de ses grands domaines d'expertise. « En collaboration avec l'unité U693 Inserm / Paris Sud, nous étudions par exemple la caractérisation fonctionnelle de variants, et travaillons notamment à comprendre comment les mutations du gène AIP [Aryl hydrocarbon receptor Interacting Protein] participent à la prédisposition aux adénomes hypophysaires familiaux sécrétant l'hormone de croissance à l'origine de l'acromégalie » explique le Dr BOULIGAND. « Nous cherchons à caractériser les mécanismes qui prédisposent à ce type de tumeurs. Cette recherche est utile aux cliniciens pour à terme optimiser la pratique clinique et engager une stratégie de prévention efficace ».

Autre thématique importante du Service, en forte interaction avec l'Inserm : les pathologies de l'infertilité et, plus précisément la génétique des hypogonadismes, avec l'identification de nouveaux gènes impliqués dans ces dysfonctionnements. « Il y a deux ans, notre équipe a participé à la caractérisation de la neurokinine B et à la compréhension du rôle de cette hormone dans les problèmes de reproduction chez l'Homme », complète Jérôme BOULIGAND.

Le diagnostic, également, représente une part importante des activités du Service, reconnues à l'échelle nationale, voire internationale pour certaines spécialités. Son large éventail d'analyses concerne en premier lieu l'endocrinologie, l'hépatologie et la neurologie, pour des pathologies telles que les syndromes de l'X-fragile et le syndrome de RETT, la myotonie de Steinert et l'hémochromatose ou encore deux maladies pour lesquelles le service de Bicêtre est le centre de référence nationale : la neuropathie amyloïde avec l'analyse de la protéine TTR (Transthyréline), et le syndrome d'Alagille, identifié à Bicêtre avec le séquençage de deux gènes (JAG-1 et NOTCH-2). Le laboratoire de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie de l'Hôpital Universitaire de Bicêtre est ainsi sollicité de toute la France et régulièrement de l'étranger.

Vers une plus grande automatisation et la mutualisation des équipements de biologie moléculaire...

« Nos travaux de recherche et analyses font notamment appel à la PCR et la méthode TaqMan®, ainsi qu'au génotypage et à toutes les technologies de séquençage, jusqu'au séquençage à haut débit, le next-generation sequencing – NGS, que nous sommes en train de mettre en oeuvre », explique Jérôme BOULIGAND.

Pendant longtemps, le Laboratoire a privilégié le développement d'approches manuelles pour la manipulation de l'ADN, puis s'est intéressé à leur automatisation avec la mise en place notamment de sa politique Qualité et la mutualisation des matériels au sein de l'AP-HP. Des étapes pré-PCR à celles de purification des produits de séquençage, l'équipe de Bicêtre a su faire



LightCycler®

LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Pour publier plus, plus vite... et plus encore



Nouveau

Performant, Intuitif, **Innovant**

Une connectivité en direct, et les résultats envoyés en temps réel par e-mail, pour une intégration parfaite dans votre organisation.



Découvrez notre nouveauté sur www.lightcycler96.com



actitudes.com - Rev. : 1D/2013 - PA-278-13



évoluer ses méthodologies et développer une réelle expertise dans le domaine. Le Dr BOULIGAND cite pour exemple la biobanque que constitue l'Unité à partir de prélèvements dont les premiers extraits ont été purifiés en 1992 avec une méthode « maison ».

« Depuis quelques mois, afin de répondre aux prérogatives de notre démarche d'accréditation, nous avons modifié nos pratiques et utilisons désormais les kits commerciaux tant pour les petits que les grands volumes, ainsi que le système Qiagen EasyOne® pour les petites quantités de sang ; l'extraction, quant à elle, est aujourd'hui toujours réalisée manuellement, mais sera aussi à terme robotisée... ».

Plusieurs autres automates sont venus compléter le parc instrumental du Laboratoire ces dernières années : un robot de transfert de liquides Hamilton Microlab® STARlet 4 pipettes pour la distribution des ADN et des réactifs en plaques ; un système PCR en temps réel Applied Biosystems ABI Prism 7900 HT, qui offre la possibilité de travailler avec des supports de 96 à 384 puits ; un séquenceur capillaire d'ADN 136 capillaires Applied Biosystems ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer, pour les applications séquençage Sanger et analyse de fragments ; un séquenceur moyen débit de type MISEQ illumina.

La purification des produits de PCR et de séquençage, constitue une autre étape clé, bien caractéristique de ces avancées en termes de robotisation pour l'Unité de Bicêtre. « Jusque-là, nous employions des kits enzymatiques faisant appel aux exonucléases, mais le pipetage était parfois fastidieux. D'autant plus que dans la logique de mutualisation des équipements de l'AP-HP, nous partageons aujourd'hui l'utilisation de notre plate-forme de séquençage avec les services Biochimie et Hématologie de l'Hôpital. L'acquisition en 2011 d'un système Biomek® NXP-96 BECKMAN-COULTER, associés aux kits Agencourt® Ampure XP and Agencourt® Cleanseq, nous a permis d'optimiser largement nos procédures en standardisant nos protocoles et en gagnant en productivité », explique M. BOULIGAND.

Une collaboration de longue date avec BECKMAN-COULTER

« Nous travaillons avec le service Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie de l'Hôpital Universitaire de Bicêtre depuis plusieurs années déjà. L'automatisation et la mise en place d'une démarche qualité rigoureuse dans un but d'amélioration continue, sont rapidement apparues comme des éléments importants de la stratégie de recherche et des choix d'investissement du Laboratoire », explique M. François COSTANTINO, responsable Marketing Communication BECKMAN-COULTER.

« Nos activités se caractérisent par une grande variété d'ADN à diverses concentrations. Les échantillons étudiés sont pour leur grande majorité des échantillons sanguins, mais ils peuvent être également par exemple du liquide amniotique, des fibroblastes, des trophoblastes ou encore de la salive », complète le biologiste. « Nous mettons donc en œuvre des procédés et des pratiques très hétérogènes, et travaillons véritablement à flux tendu avec pour certains appareils un fonctionnement 24h/24, 7j/7... »

Fort de l'expérience de ses collaborateurs, BECKMAN-COULTER a présenté à M. BOULIGAND et son équipe une offre correspondant à leurs besoins, offre centrée sur la robotisation et la manipulation de liquides pour la préparation des échantillons, les étapes pré-PCR et la purification des séquences.

« Nous avons bénéficié dans le cadre de l'AP-HP d'un appel d'offres AGEPS [Agence Générale des Équipements et Produits de Santé] pour la fourniture de différentes catégories d'appareils et d'automates de biologie moléculaire », souligne le Dr Jérôme BOULIGAND. « Le BioMek® NXP-96 BECKMAN-COULTER, mis à disposition sous

l'égide de l'Institut Biomédical de Bicêtre, nous aide aujourd'hui considérablement à optimiser le flux de nos analyses... »

Les atouts du Biomek® NXP-96 BECKMAN-COULTER

Rappelons que le système BioMek® BECKMAN-COULTER fait référence sur le marché mondial de l'automatisation de laboratoire depuis plus de 25 ans. « Sans cesse optimisé, il a cette année encore été au cœur de l'actualité du Groupe avec le lancement sur Forum LABO, en juin dernier, de sa nouvelle configuration : le BioMek® 4000 », souligne M. COSTANTINO.

Le Biomek® Nxp qui équipe le service Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie de l'Hôpital Bicêtre, est doté d'une tête multi-canaux 96). Il regroupe tous les aspects de la manipulation de liquides en un système entièrement automatisé, à la fois pratique, flexible, efficace, sécurisé et économique. Sa structure ouverte et modulaire permet une adaptation à différents débits et formats - des minitubes individuels aux plaques de 96, 384 et 1536 puits - et répond à de nombreuses applications telles que l'extraction et la purification d'ADN ou d'ARN, la culture de cellules automatisée, la cytométrie en flux à haut débit et les tests Elisa, la configuration de PCR et du séquençage, ou encore, les dilutions en série et les répliques de plaques...

« Le Biomek® est très simple d'utilisation. Pas de réglage complexe ! Et il n'a été nécessaire de le calibrer qu'une seule fois, lors de son installation », précise le Dr BOULIGAND. « De même, dès la moindre question ou difficulté technique, l'équipe BECKMAN-COULTER est toujours très réactive et à l'écoute de nos besoins. Elle est notamment intervenue quand nous avons mis au point une méthode pour le transfert de plaques de 96 à 384 puits. Nous purifions en effet en 96 puits et reformons en 384 le week-end pour permettre un fonctionnement continu du séquenceur... »

« Nous utilisons également depuis trois ans les kits Agencourt® CleanSEQ® et AMPure® XP », poursuit Jérôme BOULIGAND. « Nous les apprécions tout particulièrement pour leur très grande sensibilité ainsi que pour la qualité et le volume d'informations qu'ils nous permettent d'obtenir ».

Les kits Agencourt® AMPure® XP et Agencourt® CleanSEQ® sont des systèmes de purification des produits de PCR



Keerthana (stagiaire), Isabelle Boucly, Dilek Imanci, Odile Tinmar-Fofana, Anne Guiochon-Mantel (Chef de service), Bassim Tou, Elodie Dupuis, Lenaig Lamour (2nd plan), Jérôme Bouligand, Hélène (stagiaire), Christaline Saujot

(suppression de l'amorce) et des produits de séquençage (élimination des colorants). Le protocole ne comporte que trois étapes, ne nécessite ni centrifugation, ni filtration et donne des rendements et une qualité de séquence comparativement extraordinaires. Les kits Agencourt® AMPure® XP et CleanSEQ® offrent ainsi une méthode de purification extrêmement flexible, simple et facilitant l'automatisation, pour un rapport prix/performance remarquable.

Précisons qu'Agencourt Bioscience est une société innovante, du groupe BECKMAN-COULTER depuis 2006. Elle est aujourd'hui une composante de la division BECKMAN-COULTER Genomics, véritable centre d'expertises pour le Groupe. Implantée à Boston, elle y développe son activité de séquençage à façon et poursuit la mise au point de nouvelles solutions utilisant sa technologie propriétaire de billes magnétiques, SPRI®. « L'objectif est aujourd'hui de faire des kits Agencourt un standard sur le marché du séquençage », ajoute M. COSTANTINO. « Tous les fournisseurs de séquenceurs de nouvelle génération recommandent déjà ces kits dans leurs protocoles... ».

Laboratoire de référence pour BECKMAN-COULTER en tant qu'utilisateur du système BioMek®, le service Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie est au cœur d'un grand projet fédérant les hôpitaux de Bicêtre, Paul-Brousse et Antoine-Béclère.

En 2014, dans le cadre du groupe hospitalier Paris Sud et avec pour concept celui d'une unité de biologie unique, une plate-forme de Génétique moléculaire constitutionnelle sera créée à Bicêtre. Elle réunira sur près de 1000 m² les activités de génétique moléculaire, de cytogénétique et, à terme, de génétique somatique. La disposition des équipements et leur utilisation seront optimisées et de nouveaux investissements permettront au Laboratoire d'élargir encore davantage son parc technologique, autour notamment de notre nouveau séquenceur de nouvelle génération MISEQ d'Illumina.

Nous aurons l'occasion bientôt de vous présenter plus amplement ce projet ainsi que l'engagement Qualité tout à fait remarquable du Laboratoire et sa démarche d'accréditation. Un des enjeux importants du laboratoire étant d'accréditer à terme les tests génétiques basés sur le séquençage de nouvel génération.

Pour en savoir plus :
Service Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie de l'Hôpital Universitaire de Bicêtre
Dr Jérôme BOULIGAND
jerome.bouligand@bct.aphp.fr
Tél. : 01-45-21-71-55
Fax : 01-45-21-27-51
BECKMAN-COULTER
Christine DELENTE, cdelente@beckman.com
S. DENIS

A la pointe de la qualité pour des analyses fiables! **Le tout nouveau système de pointes BRAND!**

- **Pointes de pipette et pointes à filtre, standard ou Ultra Low Retention, stériles ou non.**
- **Nouvelles pointes**
Maintenant toutes les pointes jusqu'à 1000 µl sont exemptes de DNA, de RNase et d'ATP. Tailles supplémentaires!
- **Nouvelles boîtes**
TipBox avec couvercle rabattant/cloche pour ouverture et fermeture d'une seule main
- **Nouveaux racks**
TipRacks avec suremballage PET recyclable, réduction de déchets de plus de 20%
- **Nouvelles unités de recharge**
TipStack™ - système de recharge peu encombrant se composant de 5 racks et d'1 TipBox

BRAND GMBH + CO KG
www.brand.de - info@brand.de

NOUVEAU!