

# Etude comparative des extractions ARN pour les analyses fonctionnelles en laboratoire de génétique moléculaire

Zaina AIT ARKOUB<sup>(1)</sup> technicienne de laboratoire et Fabienne Saint Jalmes<sup>(2)</sup> infirmière du centre de référence des surdités génétiques NECKER Enfants malades  
 (1) Service de médecine génomique des maladies rares site NECKER enfants malades APHP (2) centre de référence des surdités génétiques NECKER enfants malades APHP

## Objectifs de l'étude

L'analyse de l'expression génétique à partir de l'ARN isolé du sang total est une méthode diagnostique innovante. Plusieurs obstacles pré-analytiques sont rencontrés, tels que l'instabilité des transcrits et l'induction de gènes ex vivo sont de plus en plus utilisés dans les laboratoires pour étudier les VSI (variants de signification inconnue) diagnostiqués dans le cadre du séquençage au débit. Plusieurs tubes de prélèvement sanguin sont disponibles sur le marché.

Cependant, les dispositifs de prélèvement sanguin actuellement disponibles présentent certaines limites en matière de stabilisation de l'ARN et/ou de procédures d'extraction. SARSTEDT a développé un tube S-Monovette® qui permet de conserver les ARNs dans le sang lysé au moment du prélèvement au moins 5 jours à température ambiante, au moins 14 jours à 8 °C et au moins 36 mois à -80 °C en conservant l'intégrité des ARNs. Nous avons comparé les paramètres qualités et quantités de ce nouveau tube S-Monovette® au tube habituellement utilisé PAXgene Blood RNA (Becton Dickinson). Cette partie de l'étude répond au DPC technicien de laboratoire avec l'orientation prioritaire 283 : garantie de la cohérence d'un examen de biologie médicale du pré analytique à la validation technique. Lors de l'identification d'un VSI (variant de signification inconnue) sur l'ADN, il est possible de confirmer l'impact du variant et faire le diagnostic (signification) en mettant en évidence son effet sur l'ARN en séquençage haut débit, cette partie répond au DPC technicien de laboratoire avec l'orientation prioritaire 284 : séquençage haut débit.

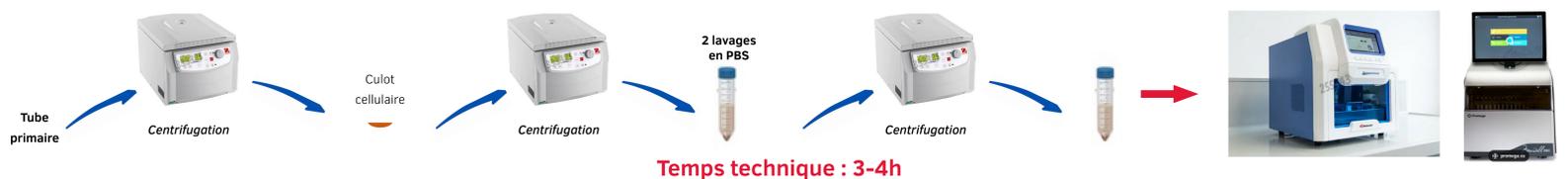
Il s'agit d'une technique avec un impact du pré-analytique crucial sur les résultats des analyses fonctionnelles des échantillons.

Objectif : évaluer si le nouveau tube S-Monovette® RNA Exact permet de fluidifier et simplifier les prélèvements sanguins en clinique, l'acheminement et l'extraction d'ARN au laboratoire, tout en préservant la qualité et la quantité des ARNs extraits.

## Protocole

### Extraction à partir du tube PAXgene BD :

PAXgene bouchon rouge/transparent : centrifugation avec frein pour «culotter» délicatement les GB (30mn) + 2 lavages culot au PBS (2x30 mn) + reprise culot en MR1 + TCEP puis extraction Magnetapure avec kit ARN ; NucleoMag® RNA réf : 744350.1 MACHEREY-NAGEL ou Maxwell



### Extraction à partir du tube S-Monovette® RNA Exact SARSTEDT :

Sarstedt RNA Exact bouchon vert : 850µlX3 sang total +pk (15 mn) + tampon, captation sur banc à billes (grand volume) des acides nucléiques AN (5 mn), puis extraction sur automate Magnetapure avec kit ARN spécial dédié ; NucleoMag® RNA blood réf : 744352.1 MACHEREY-NAGEL.

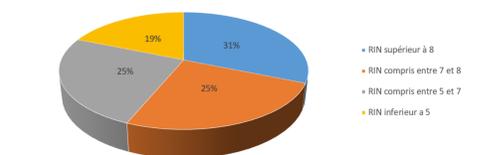


Un total de 16 patients ont été prélevés avec :

- 2 tubes PAXgene (comme habituellement demandé au service clinique)
- 1 tube -Monovette® RNA Exact SARSTEDT

## Résultats

### Répartition des indices RIN / Tubes Paxgene



### Répartition des indices RIN / Tubes S-Monovette RNA Exact

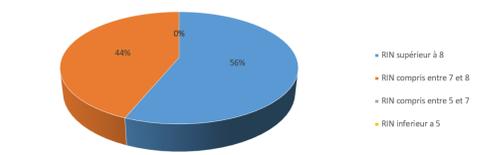


Fig 1 : Score d'intégrité de l'ARN

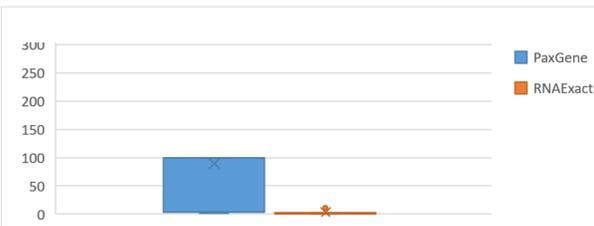


Fig 2 : Mesure de l'ADN génomique parasite avec QUBIT ADN

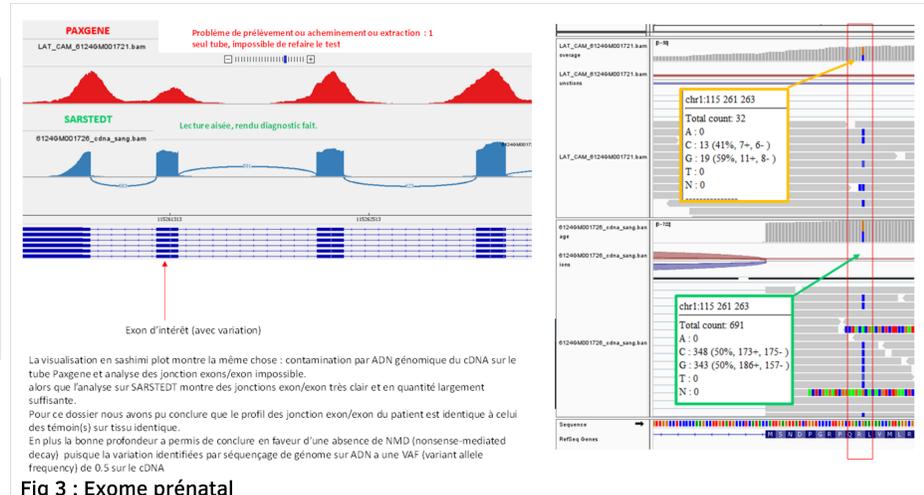


Fig 3 : Exome prénatal

### Indices RIN (N=16) :

La qualité des ARNs extraits à partir de S-Monovette® RNA exact est en moyenne sup. à la qualité des ARNs extraits à partir du tube PAXgene. (Fig 1).

### ADN génomique (N=16):

La contamination en ADN génomique est moins importante sur les ARNs avec le tube S-Monovette® RNA Exact. (Fig 2).

### Comparatif résultat NGS

#### EXOME prénatal urgent (Fig 3)

#### RNA Exact :

Lecture des datas NGS très facile  
Contamination par de l'ADNg parasite est très faible  
le diagnostic patient a pu être rendu

#### PAXgene : échec :

La contamination très élevée par l'ADNg a rendu impossible la lecture des transcrits.  
l'exome recherché était illisible  
(suspicion d'un problème lors de la phase pré-analytique ou lors de l'extraction de l'ARN)

#### NGS MCN : maladie neuro corticale

#### RNA Exact : Pseudo exon pathogène

Egalement un Pseudo exon non patho en taux très faible, retrouvé chez les parents et chez d'autres patients testés.

#### PAXgene : Pseudo exon pathogène détecté, pas d'autre évènement

#### NGS Métabolisme (Fig 4)

Même lecture sur PAXgene et RNA Exact, avec interprétation et rendu identique.

### Patient atteint d'acidémie propionique

Etude de l'ADNg 1 variant c.1057G>T (p.gly353\*) à l'état hétérozygote dans l'exon 10 du gène PCCB

Pas de 2<sup>nd</sup> variant

Etude de l'ARNm PCCB: tubes Paxgene Blood RNA et S-Monovette RNA Exact

Même lecture sur PAXGENE et SARSTEDT, avec interprétation et rendu identique :

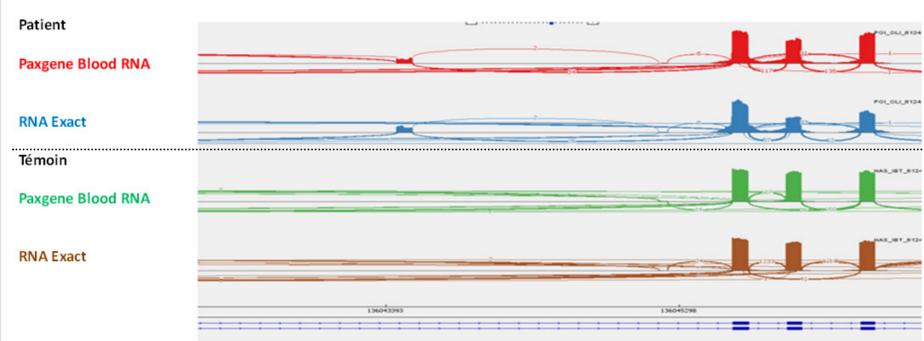


Fig 4 : NGS Métabolisme

## Conclusion

- Les résultats montrent que les ARNs extraits à partir du nouveau tube S-Monovette® sont de qualité et de quantité meilleure ou au moins équivalentes au tube PAXgene, avec une concordance des résultats d'analyses biologiques (Exome et NGS)
  - Le processus d'extraction est nettement raccourci et simplifié
  - Le volume prélevé de sang est moindre, et les déchets biologiques inhérents diminués
  - Logistique de l'échantillon simplifiée : date de péremption et stabilité des échantillons plus longues
  - Prélèvement adapté à tout type de veine (sous vide et aspiration)
- Ces résultats permettent la mise en place en routine de l'analyse des ARNs des patients, avec ce nouveau tube S-Monovette®, ce qui prend une place de plus en plus importante dans le laboratoire de génétique moléculaire, du fait de la montée en puissance du séquençage haut débit et des analyses pangénomiques.

Le laboratoire de génétique moléculaire de l'hôpital Necker a validé l'utilisation des tubes S-Monovette® RNA Exact Sarstedt pour les analyses fonctionnelles.