

La Solution Immucor pour l'Immuno-Hématologie moléculaire

Rencontres TACT

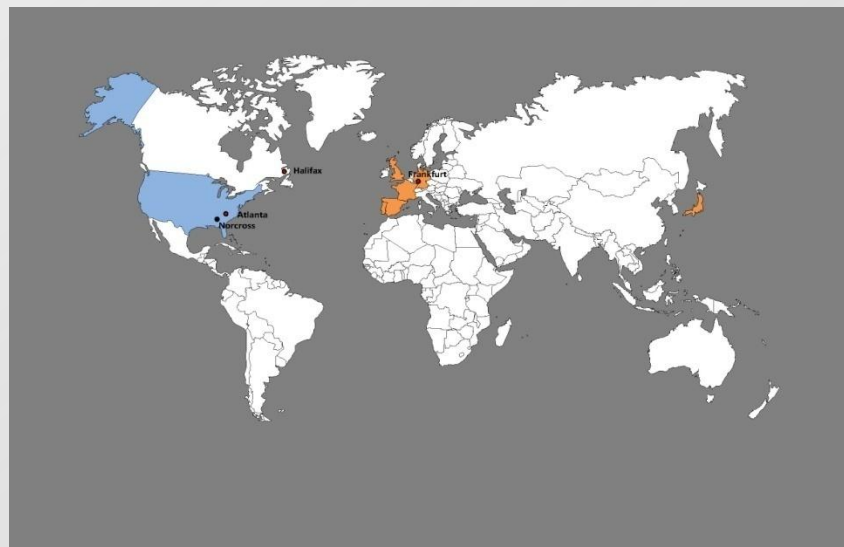
13 et 14 octobre 2011 – CAEN

Stéphanie THORIGNY

Alice ALEXANDRE

Présentation générale

- + Société fondée en **1982**- près de 30 ans d'expérience en Immuno-Hématologie
- + Présence en Amérique du Nord, Europe et Japon : filiales en Italie, Espagne, Portugal, Allemagne, Grande Bretagne, France et BeNeLux
- + **600 employés** à l'échelle mondiale dont 140 en Europe
- + Unités de production à Atlanta (USA), Halifax (Canada), Frankfort (Allemagne)
 - + Approuvé FDA
 - + Certifié ISO 13485
 - + Produits marqués CE selon la directive européenne IVD 98/79

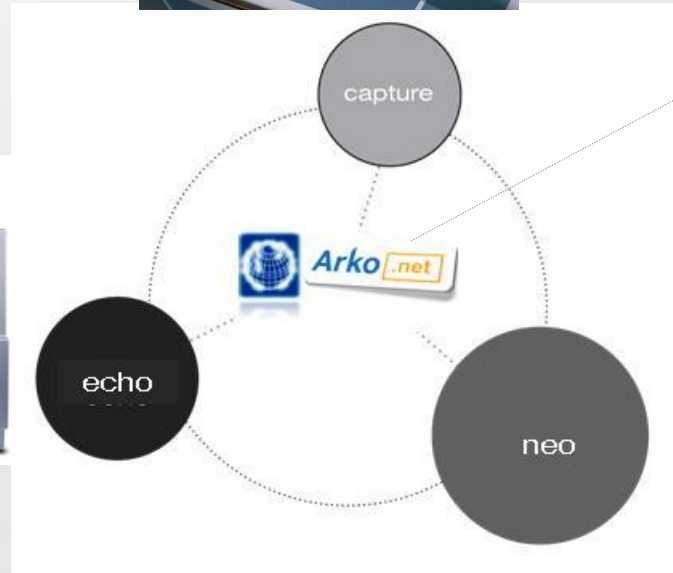


Présentation générale

Immucor France

- + Création le 1^{er} juillet 2008
- + **23 employés** en France dont 10 ingénieurs au service technique, répartis sur toute la France
- + Siège social à Paris (13^{ème})
- + Présence en EFS, CH et LABM : 42 Galileo, 28 Echo et 10 NEO
- + En EFS : 26 Galileo (6 en IHR et 20 en QBD), 5 Echo et 1 NEO
 - Réactifs manuels : CQ (Complement Control Cells), Phénotypage étendu (Lutheran, Colton, Diego..)
 - Kits : Elu-Kit, EGA-Kit, Kleihauer..

Une Solution Globale qui s'adapte à vos besoins



Module 1: Introduction à BioArray

BioArray Solutions – Principaux faits et chiffres

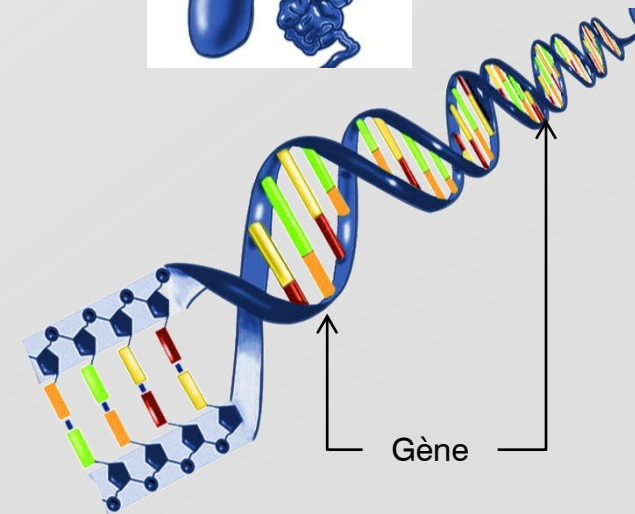
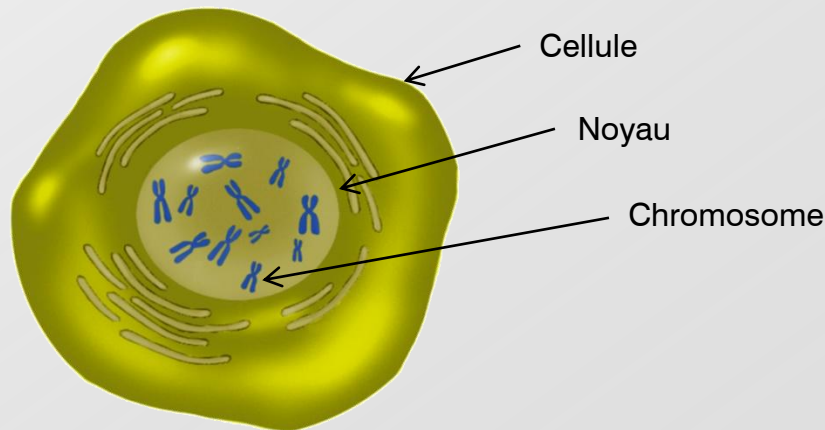
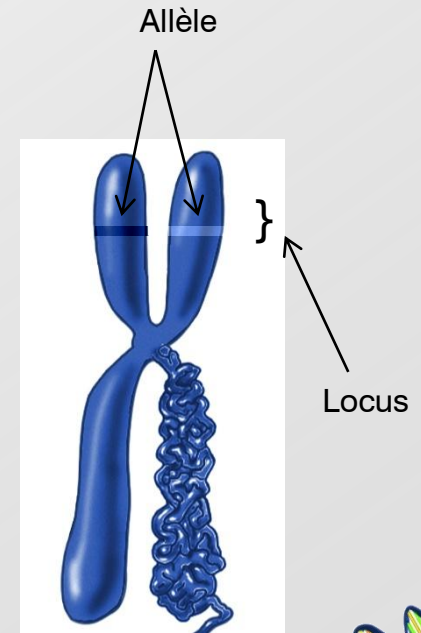
- ***BioArray Solutions est une filiale de Immucor située à Warren, NJ, USA***
- ***Fondée en 1996 et acquise par Immucor en 2008***
- ***A ce jour, plus de 200,000 tests BeadChip ont été réalisés par plus de 40 de nos clients***
- ***La plate-forme technologique BeadChip est soutenue par près de 100 brevets déjà délivrés ou en instance***
- ***Premier marquage CE pour HPA en 2009; le second pour HEA en 2010***
- ***Tous les produits BeadChip sont fabriqués dans des installations dédiées à Warren, NJ, USA conformément à la norme ISO 13485:2003***



Module 2: Bases de Biologie Moléculaire

Éléments constitutifs de la Biologie Moléculaire

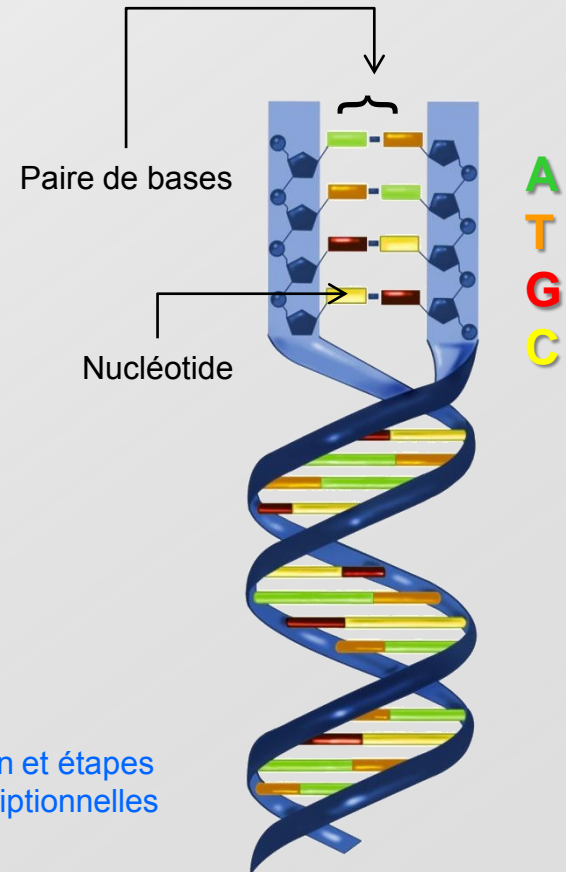
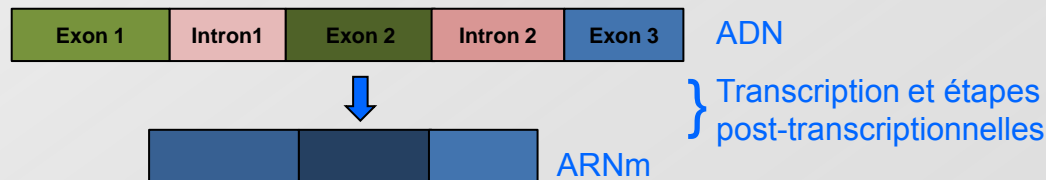
- + Les **Chromosomes** contiennent les unités d'hérédité (**gènes**) à des localisations spécifiques (**loci**)
- + Chaque **chromosome** contient une seule molécule d'ADN et les chromosomes vont par paires
- + Les variations héréditaires sont déterminées par les différentes formes d'un gène (**allèles**)
- + Deux copies d'un même allèle conduisent à l'**homozygotie** du caractère; deux allèles différents à l'**hétérozygotie**
- + Les **Gènes** sont des séquences spécifiques d'**ADN** qui codent pour les protéines



<http://images.nigms.nih.gov/>

Éléments constitutifs de la Biologie Moléculaire

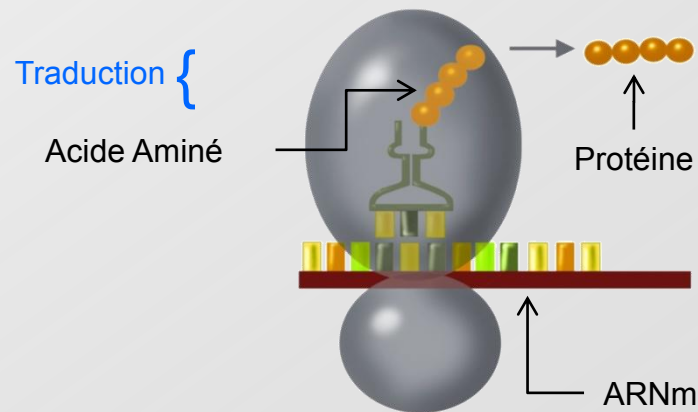
- + Les **Nucléotides** sont liés deux à deux pour former une **paire de bases**, créant ainsi la structure en double hélice
- + **L'ARN** est transcrit à partir du gène et les régions constituées par les **introns** sont épissées lors du processus post-transcriptionnel, laissant seulement les séquences d'acides nucléiques présentes dans les **exons** être traduites en protéines



<http://images.nigms.nih.gov/>

Éléments constitutifs de la Biologie Moléculaire

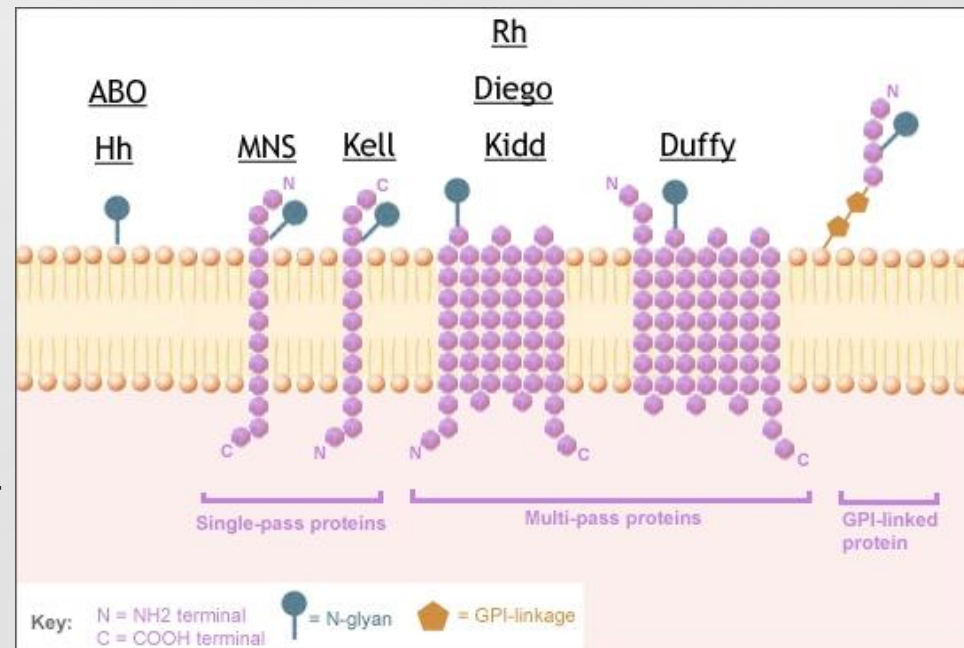
- + **Les Protéines** sont traduites à partir de l'ARNm en utilisant des acides aminés qui sont ensuite positionnés dans leur structure protéique correcte
- + 20 acides aminés sont spécifiés par 64 **codons** (3 nucléotides) dans le **code génétique**



<http://images.nigms.nih.gov/>

Détermination des antigènes de groupes sanguins

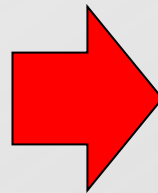
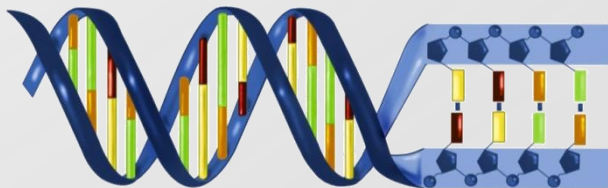
- La plupart des antigènes sont le résultats de SNPs
- Certains phénotypes peuvent être affectés par des mutations inhibant l'expression
 - Fyb (FY2), S (MNS3)
- D'autres systèmes sont plus complexes
 - RH: un antigène D est affecté par plus de 150 allèles
 - ABO: même si ABO possède 4 phénotypes primaires, il y a au moins 160 allèles différents qui les influencent



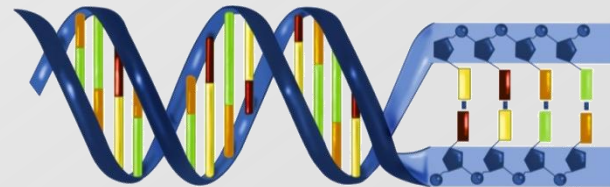
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=rbcantigen&part=ch2>
Transfusion Medicine and Hemotherapy Marion Reid

Détermination des gènes des groupes sanguins

+ Traditionnellement à l'aide de méthodes sérologiques pour déterminer le phénotype et déduire un génotype

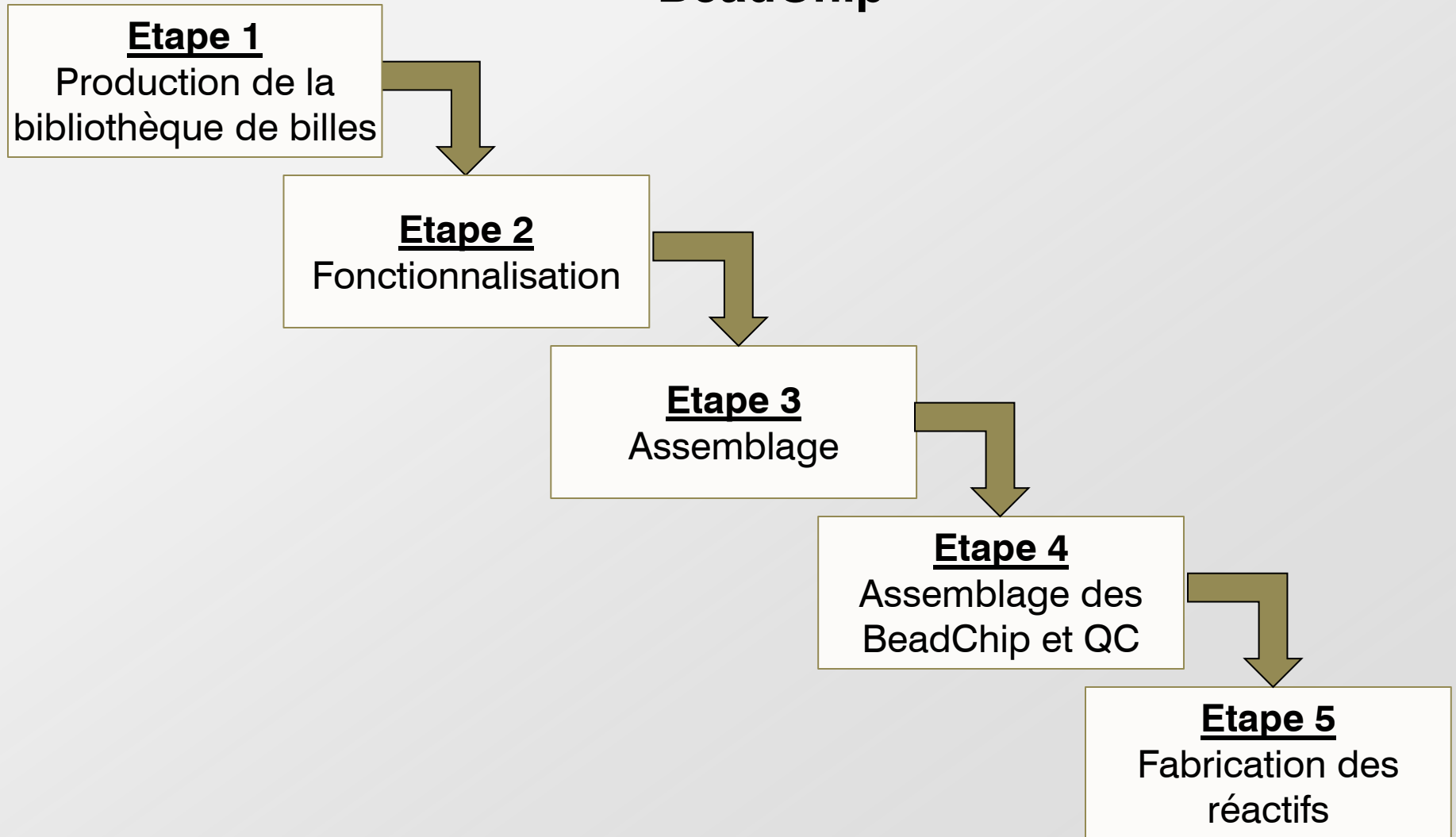


• Les technologies actuelles permettent d'utiliser l'ADN pour déterminer le génotype et prédire le phénotype



Module 3: Fabrication des BeadChips

Les 5 étapes du processus de fabrication des kits BioArray BeadChip



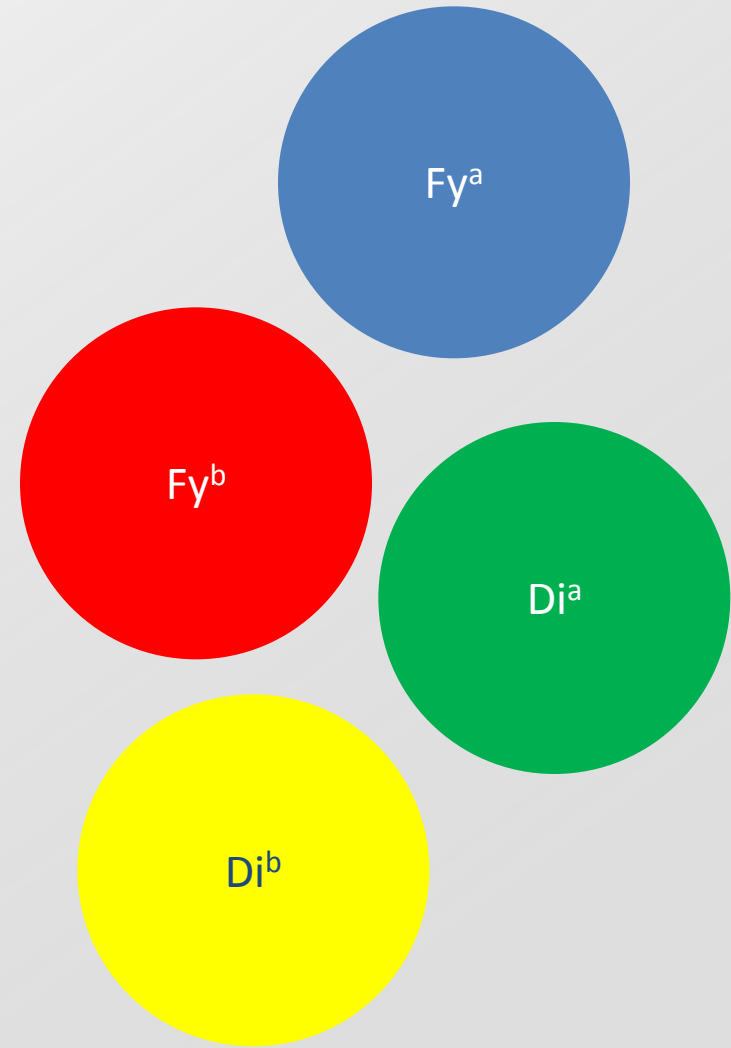
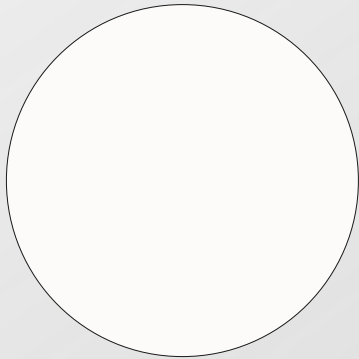
Etape 1

Production de la bibliothèque de billes

Des billes synthétiques sont teintées par des couleurs uniques.

Le diamètre des billes fait approximativement 3 μm .

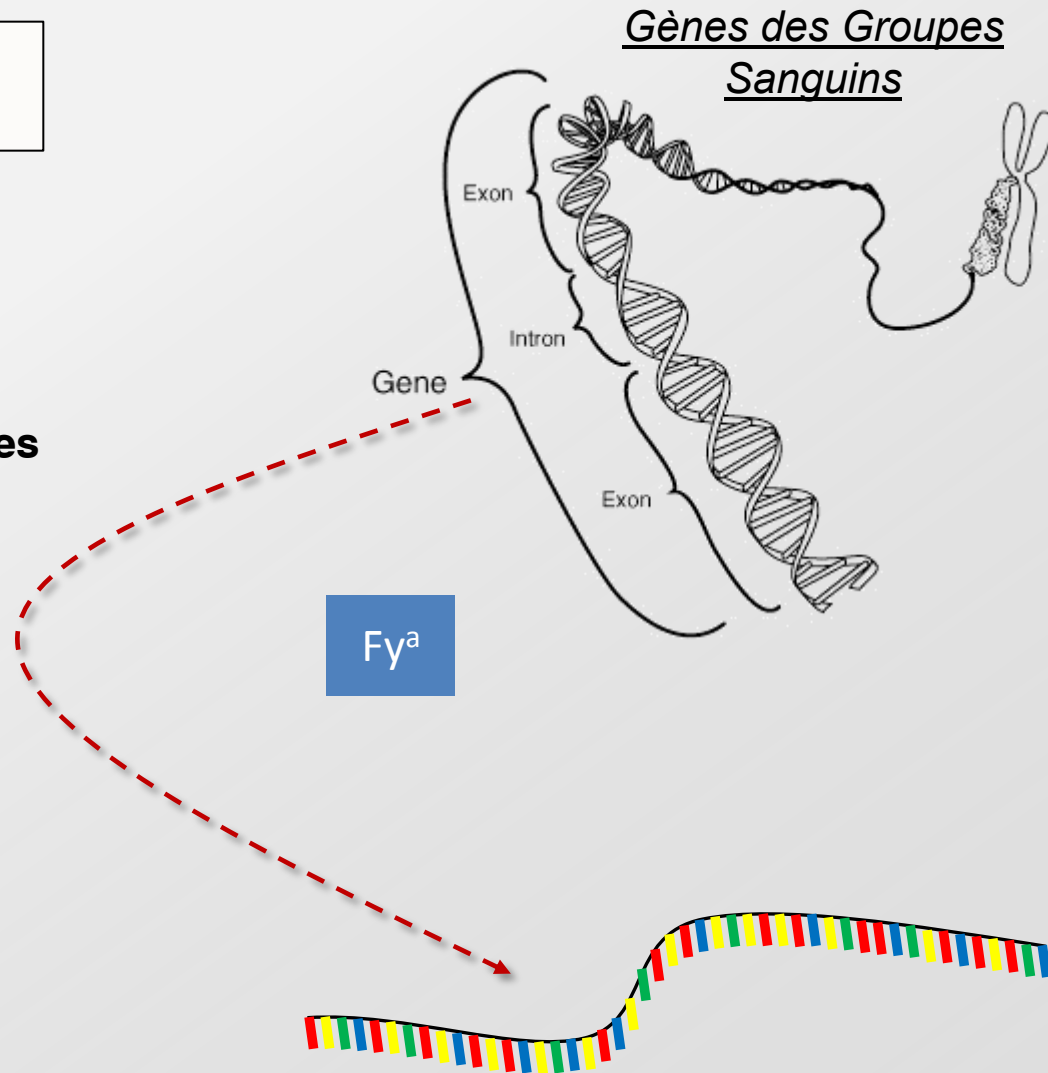
Chaque couleur unique correspondra à un allèle dans un des tests.



Etape 2

Fonctionnalisation

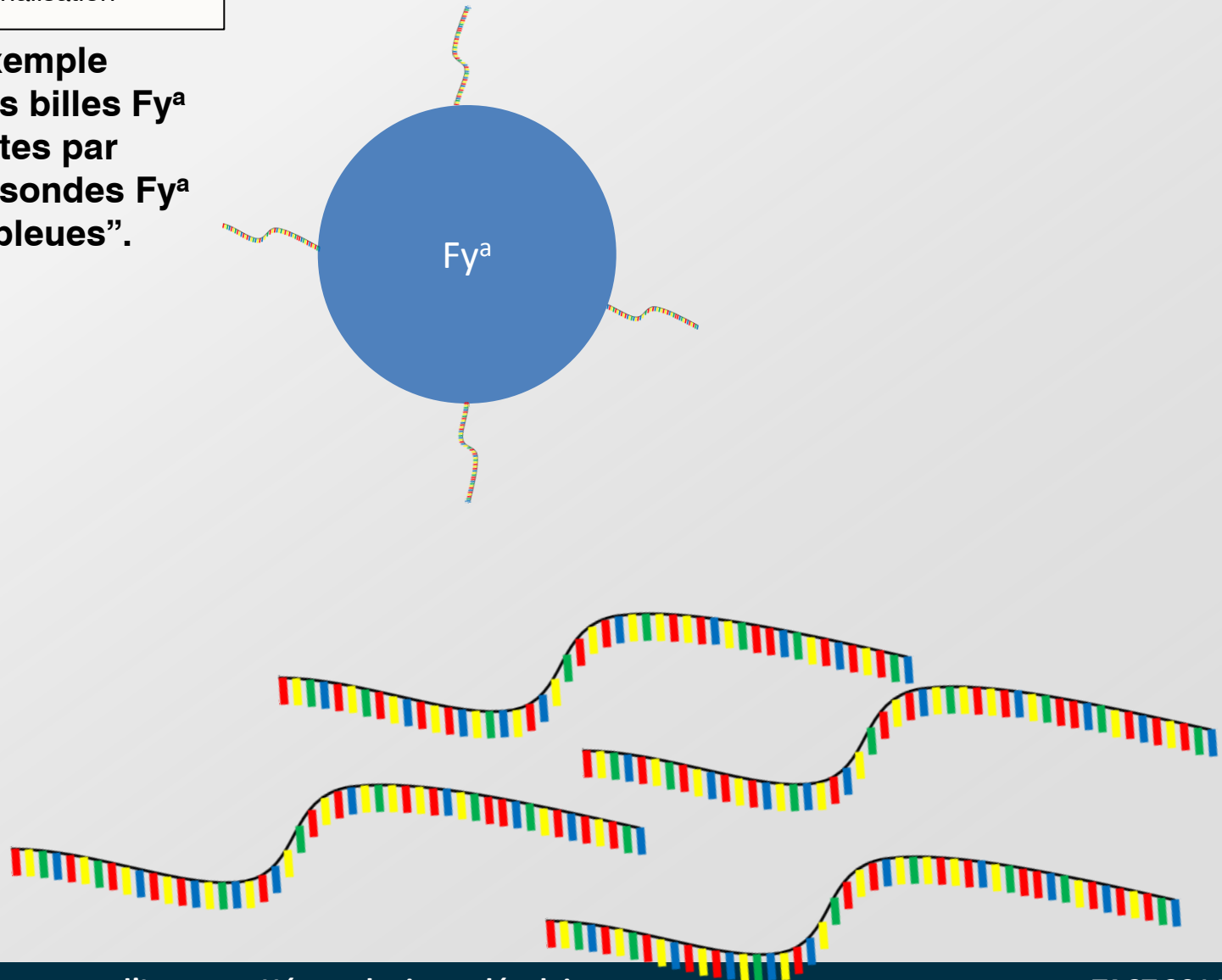
Des oligonucléotides allèle-spécifiques (sondes) complémentaires des allèles antigène-spécifiques de multiples systèmes de groupes sanguins sont synthétisés.



Etape 2

Fonctionnalisation

Dans cet exemple simplifié, les billes Fy^a sont produites par liaison des sondes Fy^a aux billes “bleues”.

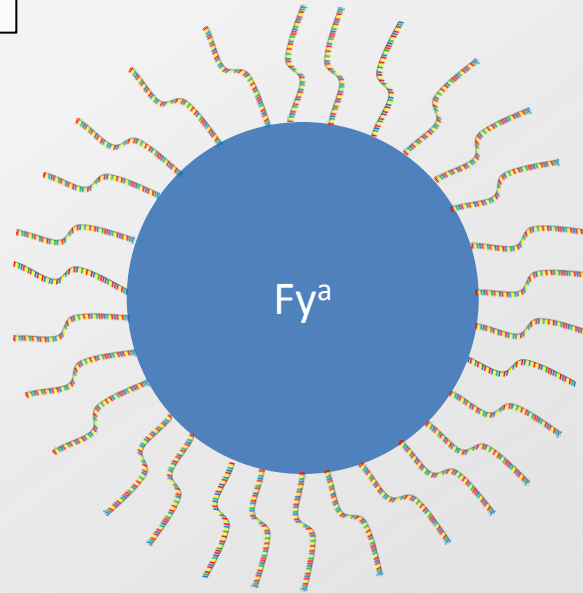


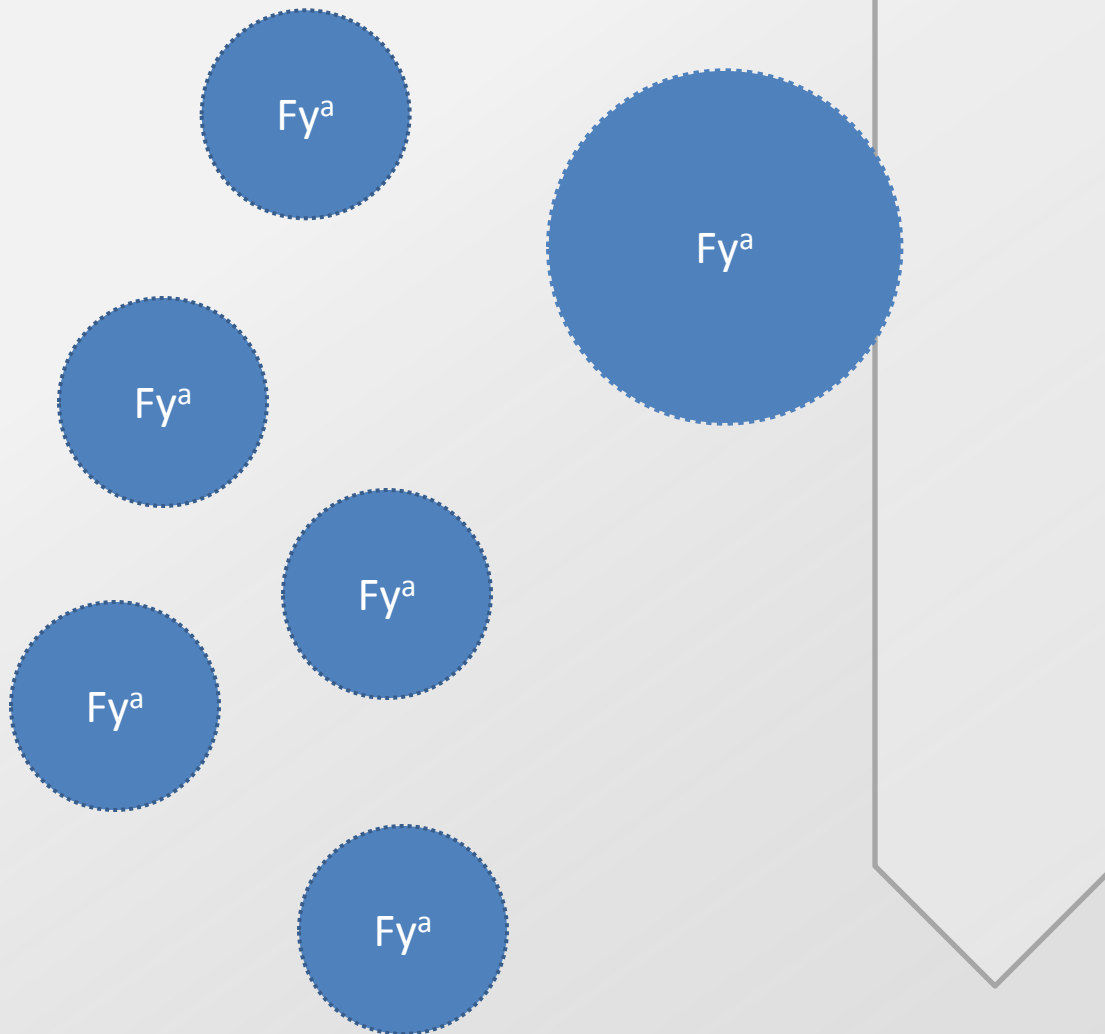
Etape 2

Fonctionnalisation

Les sondes recouvrent uniformément la surface totale de la bille.

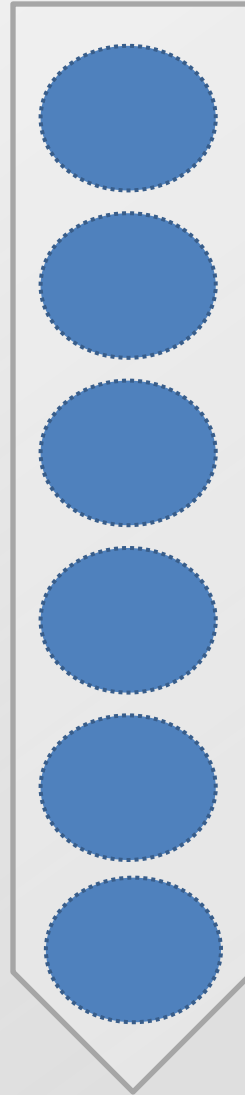
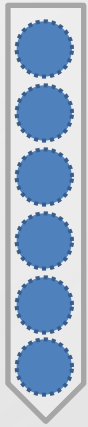
Chaque bille présente plus d'1 million de copies de la sonde.

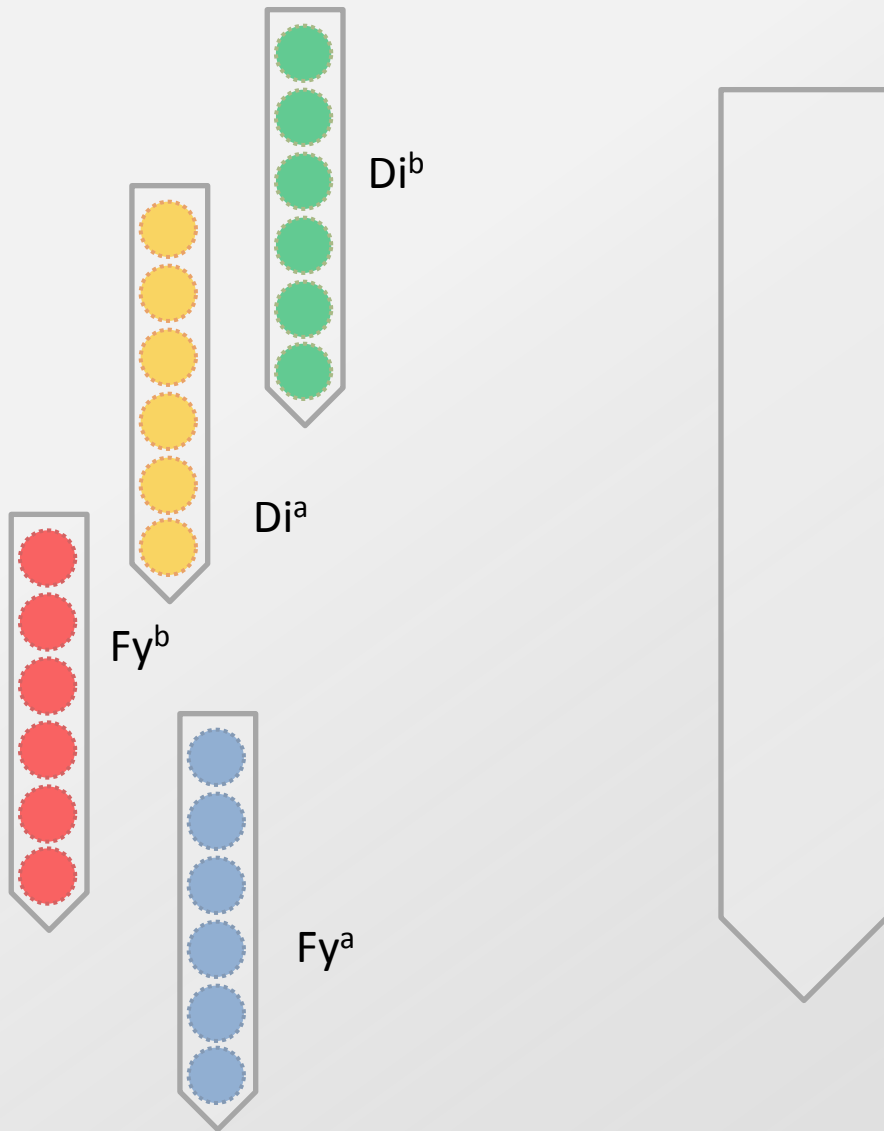




Etape 3
Assemblage

**Des milliers de billes
“bleues” Fy^a sont
couplées aux sondes
correspondantes Fy^a .**





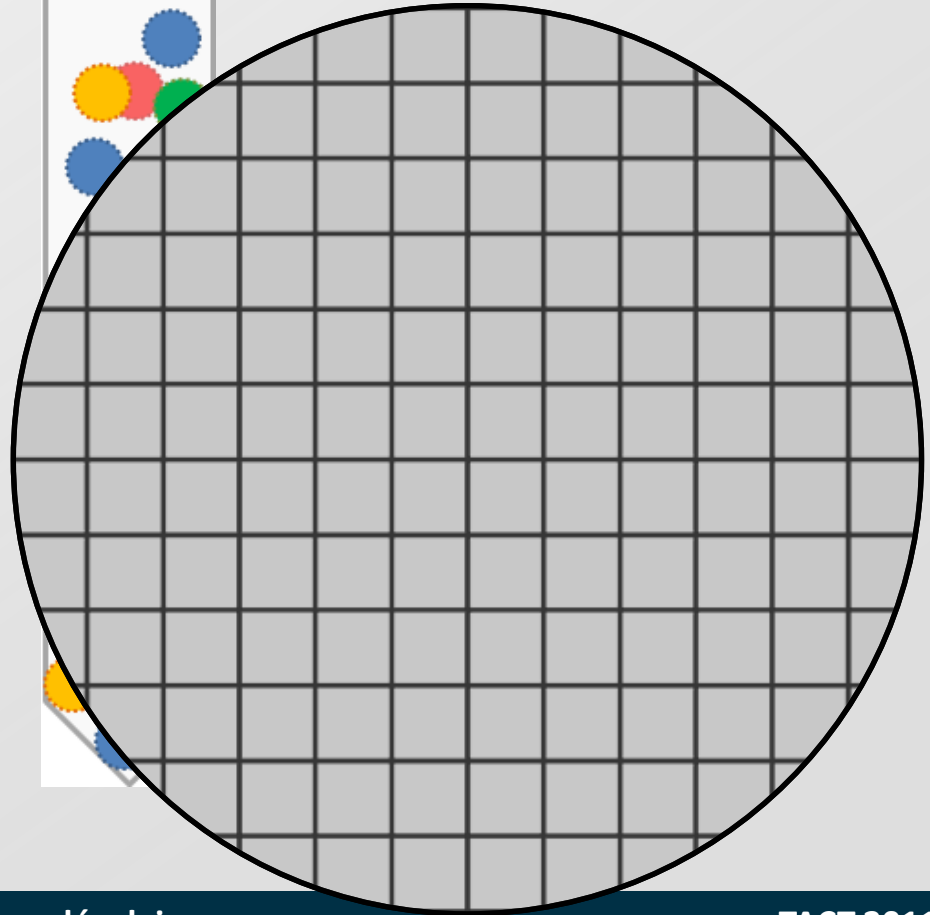
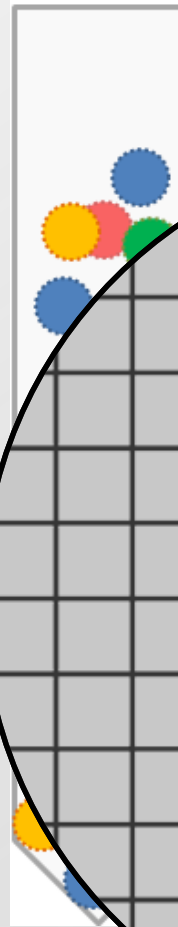
Etape 3
Assemblage

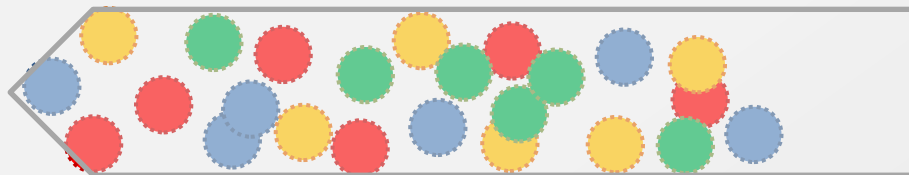
La production des billes est répétée pour chaque allèle d'un test.

Chaque allèle est représenté par sa bille de teinte unique.

Dans cet exemple, Bleu correspond à Fy^a, Rouge à Fy^b, Jaune à Di^a et Vert à Di^b.

Les billes finalisées sont mélangées.



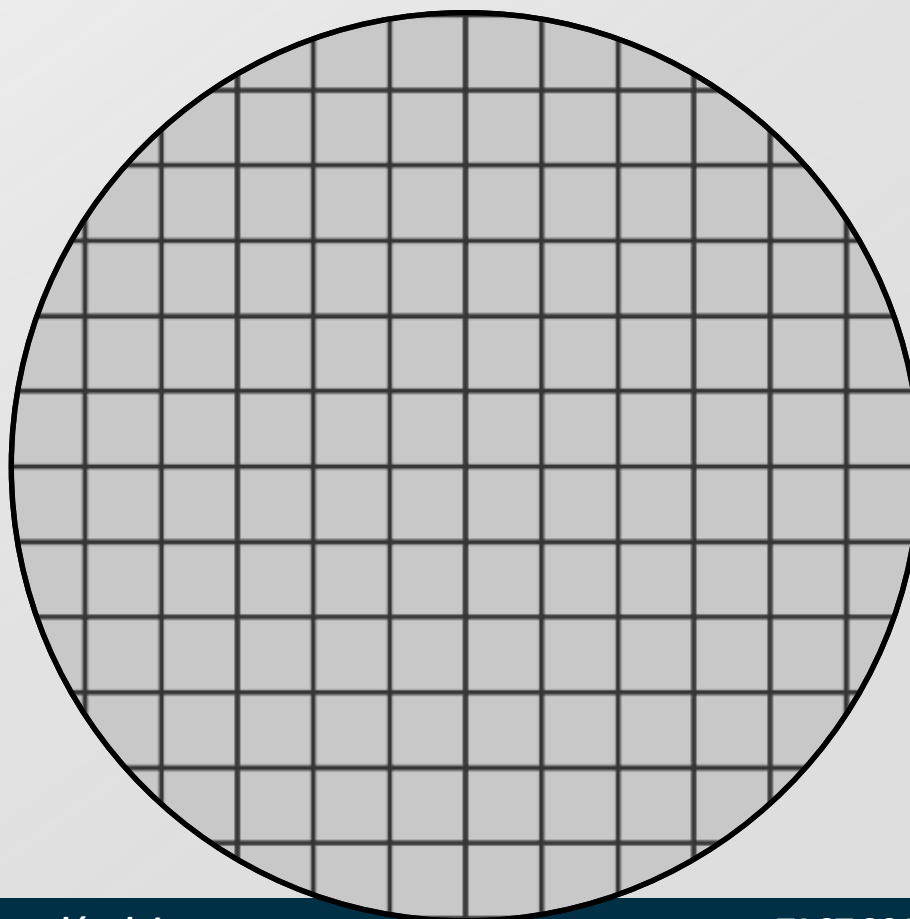


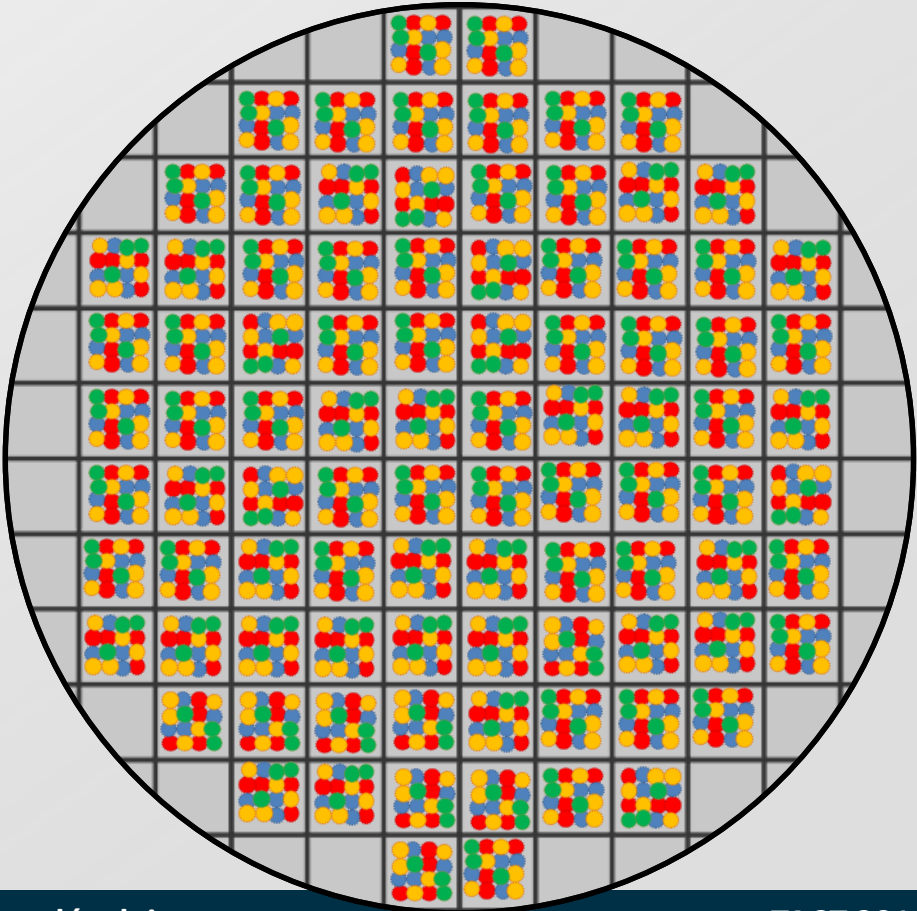
Etape 3
Assemblage

Les billes mélangées sont disposées aléatoirement sur une plaque de silicium.

Les billes sont assemblées sur la plaque de silicium.

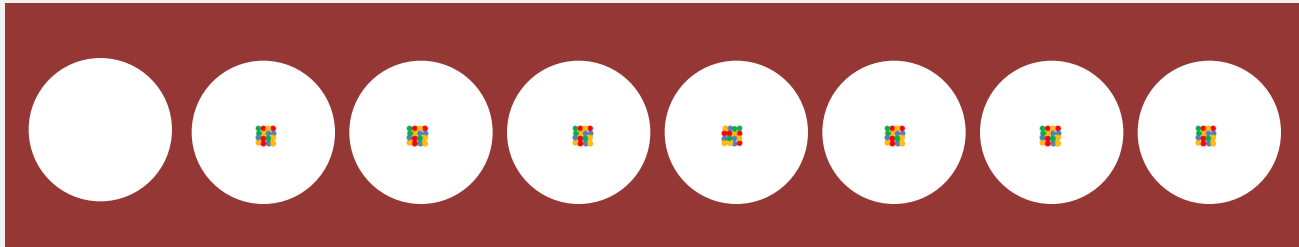
Chaque puce de 300 mm x 300 mm contient plus de 4000 billes disposées aléatoirement.







BioArray Solutions

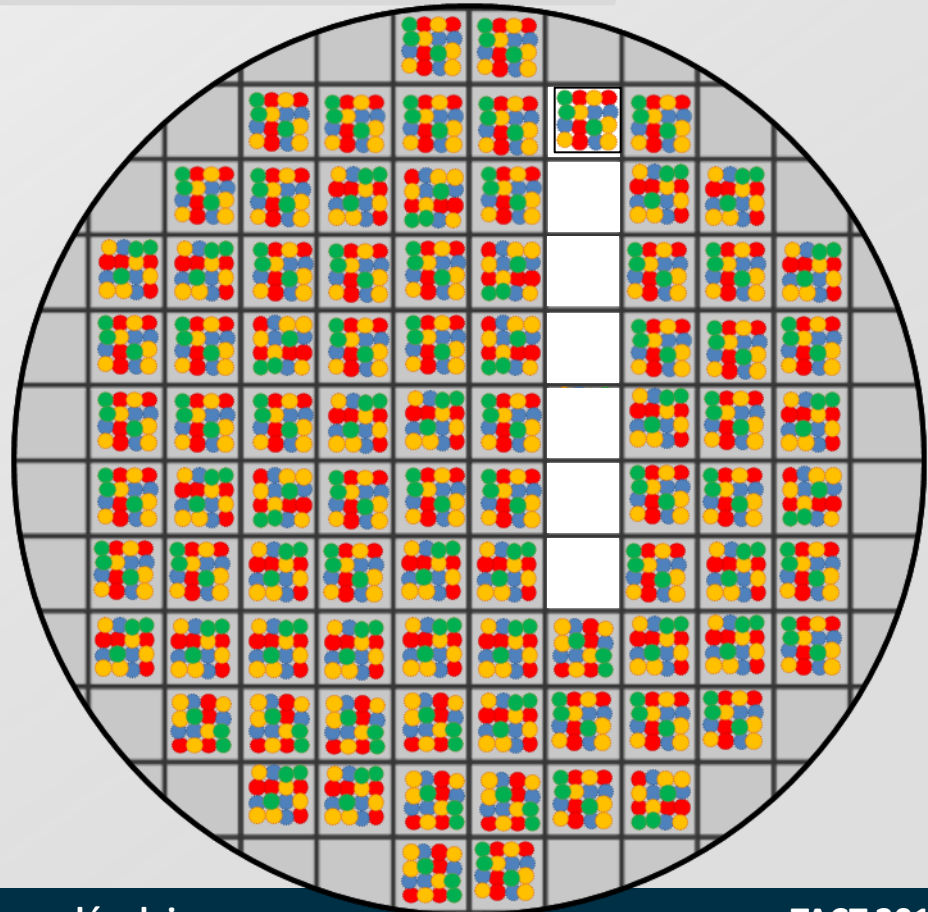


Etape 3
Assemblage

La plaque de Silicium est découpée en BeadChips (puces) individuels.

Chaque BeadChip est ensuite déposé sur un support en verre de 8 ou 96 puces.

Chaque support de BeadChip est identifié de manière unique par un code-barre.



Etape 4
Contrôle Qualité

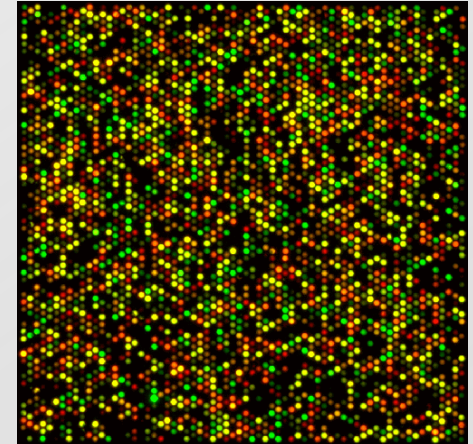
Dans la phase finale de production des BeadChips, une image en couleur de chaque puce est prise à l'aide d'un instrument fonctionnant en microscopie.

L'image en couleur est analysée pour localiser les types de billes (identifiées par leur couleur) dans la surface de la puce.

Les données sont analysées et les critères de qualité vérifiés, incluant le nombre minimum de chaque type de billes et le "taux d'occupation par les billes". Lorsqu'un support contient un BeadChip non conforme, il est éliminé.

Les informations de décodage des billes sont stockées dans le "decoding file" de la puce. Ces fichiers sont disponibles sur les CDs qui sont inclus dans chaque kit.

>4,000 BILLES ENCODEES



Etape 5
Fabrication des Réactifs

En plus des supports de BeadChip, les kits BioArray contiennent les réactifs nécessaires à la réalisation des tests

- **Protocole décrivant le processus pas-à-pas**
- **Mix PCR (Amorces – Oligonucléotides –, dNTPs en solution tampon)**
- **HotStarTaq™ polymérase^{1,2}**
- **Réactif Clean-up**
- **Lambda exonucléase**
- **Mix d'élongation eMAP (dNTPs, dNTPs fluorescents, ADN polymérase)**

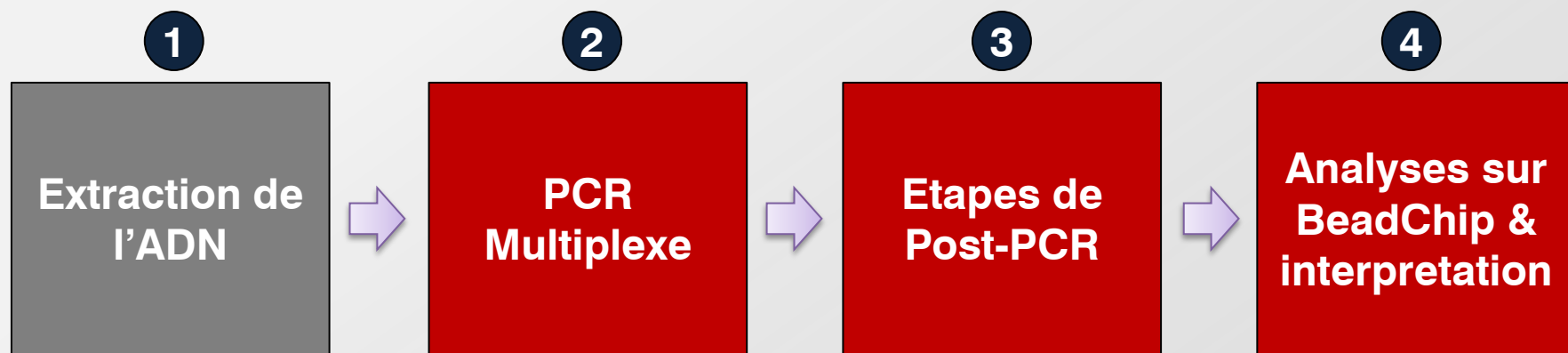
(1) HotStarTaq est une marque déposée de F. Hoffman-La Roche Ltd.

(2) HotStarTaq est seulement incluses dans les produits marqués CE en Europe,

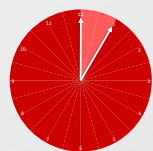


Module 4: Comment utiliser les BeadChips

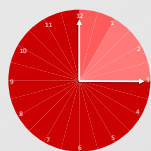
Il existe 4 étapes majeures nécessaires lors de la réalisation d'un test sur BeadChip



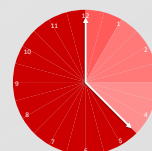
Temps
écoulé



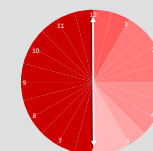
~1 heure



~2 heures



~2 heures



~1 heure

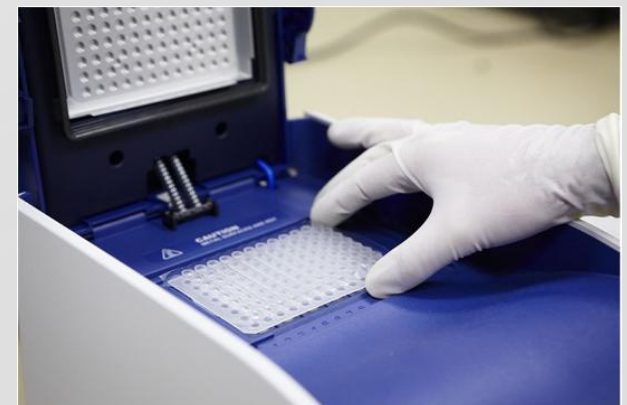
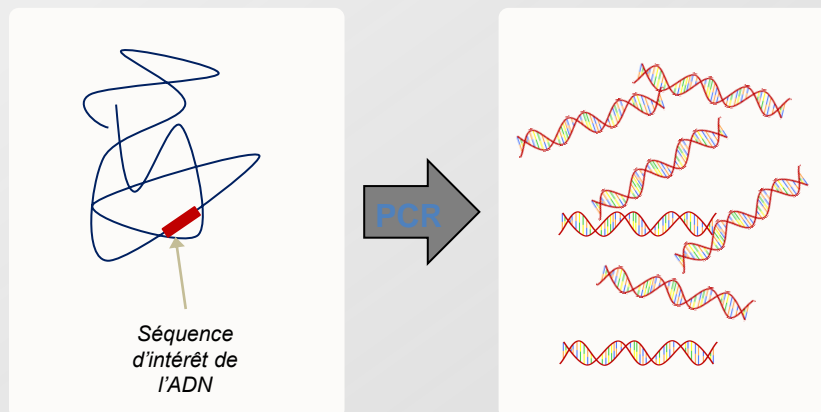
1 Extraction ADN

- + **L'ADN peut être extrait à partir d'environ 200 μ L d'un échantillon de sang total.**
 - + D'après notre notice technique:
Une concentration de 10 à 80 ng/ μ L d'ADN extrait avec un ratio 260/280 de 1.5 à 1.95 sont requis pour une amplification par PCR optimale.
- + **Des systèmes automatisés pour l'extraction de l'ADN sont disponibles et peuvent être utilisés sans problème avec les tests BeadChip**
 - + Une grande variété de méthodes sont disponibles incluant les colonnes de silice et les billes magnétiques
 - + Les méthodes automatisées permettent de traiter de 1 à 96 échantillons simultanément



2 Polymerase Chain Reaction (PCR) Multiplexe

- + Grâce au thermocycleur, l'étape de PCR permet l'amplification des régions d'ADN contenant les polymorphismes qui déterminent les antigènes de groupe sanguin
 - + Des millions de copies de ces régions d'ADN (amplicons) sont produites
- + Les tests BioArray BeadChips utilisent une PCR multiplexe qui permet l'amplification de plusieurs régions-cibles d'ADN génomique extrait dans un processus unique
- + La PCR nécessite des amorces (oligonucléotides complémentaires de séquences ADN) pour identifier les régions-cibles, des dNTPs et une enzyme, la Taq ADN polymérase

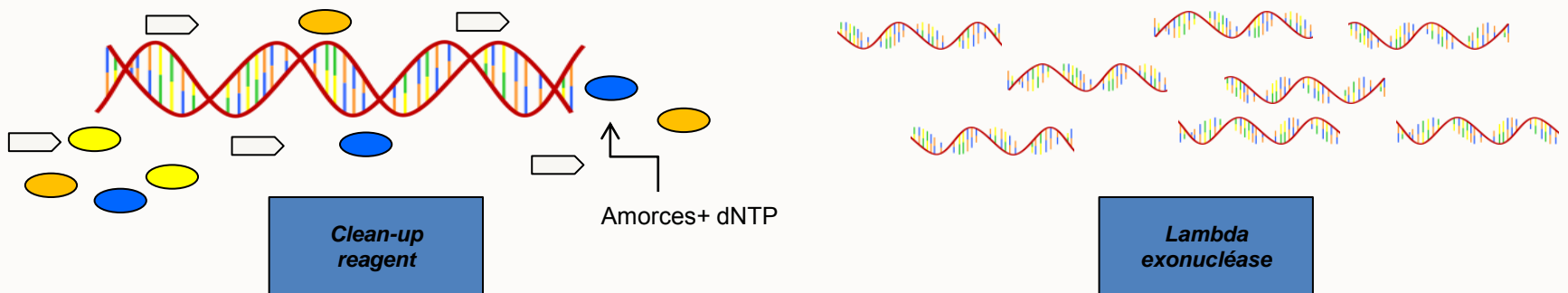


3 Etapes de post-PCR

- Après la PCR multiplexe, les produits sont traités de manière à éliminer les amorces et dNTPs résiduels grâce au réactif “Clean-Up Reagent”
- Ensuite, les ADN simple brin sont générés par la Lambda Exonucléase qui détruit sélectivement un brin de chaque amplicon.

Processus

1. Incubation (37 °C) → 2. Inactivation (80 °C) → 3. Incubation (37 °C) → 4. Inactivation (80 °C)



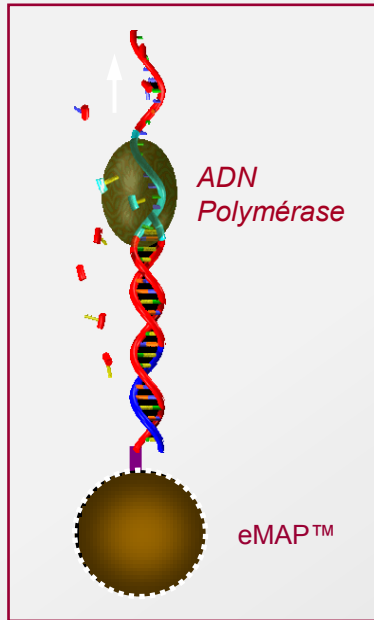
4 Analyse sur BeadChip (I)

- + **Les amplicons simple brin sont mélangés au réactif d'élongation**
 - + Ce réactif contient des dNTPs, des dNTPs fluorescents et une ADN polymérase
- + **Ce mélange est transféré sur le BeadChip et incubé (température et durée spécifiques en fonction du test)**



- **Lors de l'incubation, les amplicons simple-brin se lient complémentaires aux séquences des sondes sur les billes correspondantes**

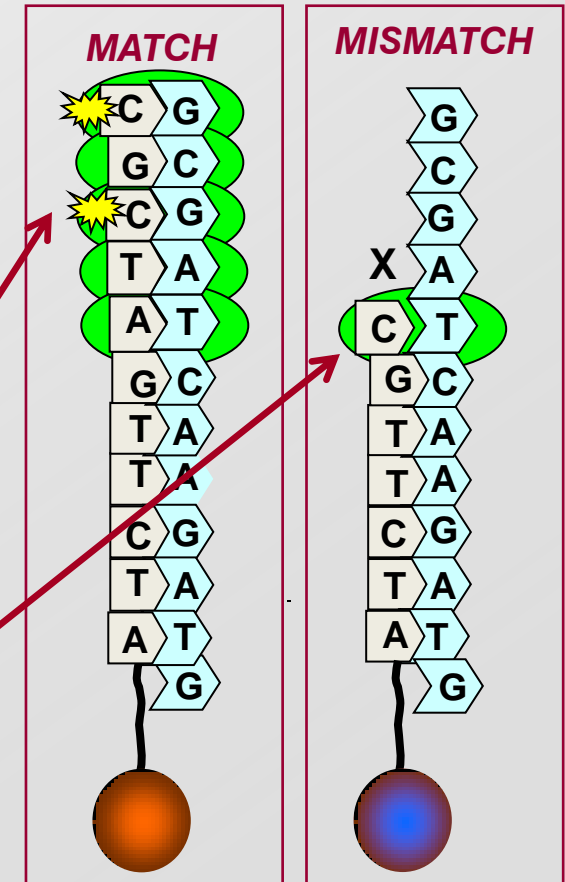
4 Analyse sur BeadChip (II)



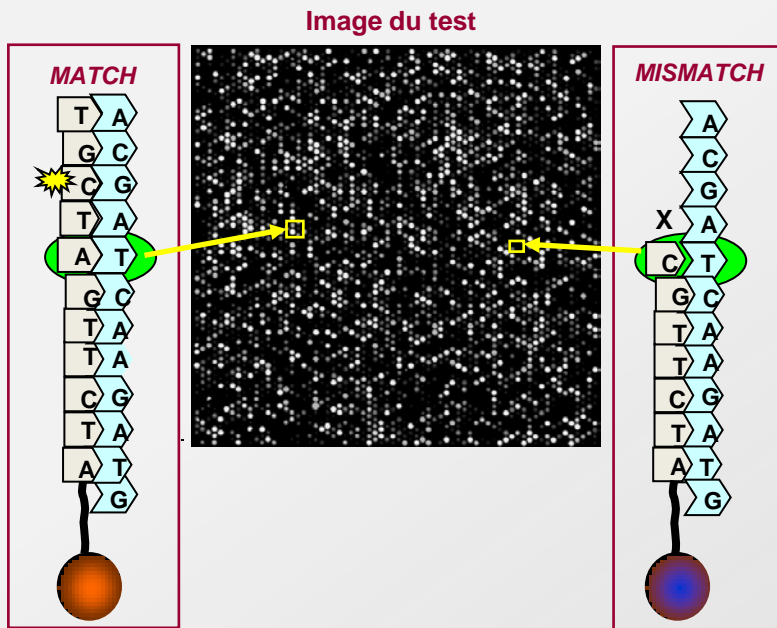
- Les ADN amplifiés s'hybrident sur les sondes oligonucléotidiques présentes sur les billes-cibles

- + Si la séquence de l'ADN amplifié correspond parfaitement à l'extrémité 3', la sonde est alors allongée, incorporant les dNTPs fluorescents
- Si la séquence de l'ADN amplifié ne correspond pas parfaitement, la sonde n'est pas allongée et les dNTPs fluorescents ne sont pas incorporés

DISCRIMINATION PAR ELONGATION ALLELE-SPECIFIQUE

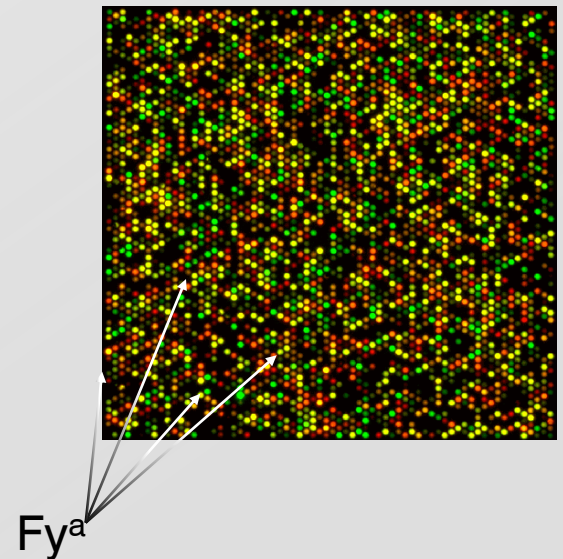


4 Analyse sur BeadChip (III)

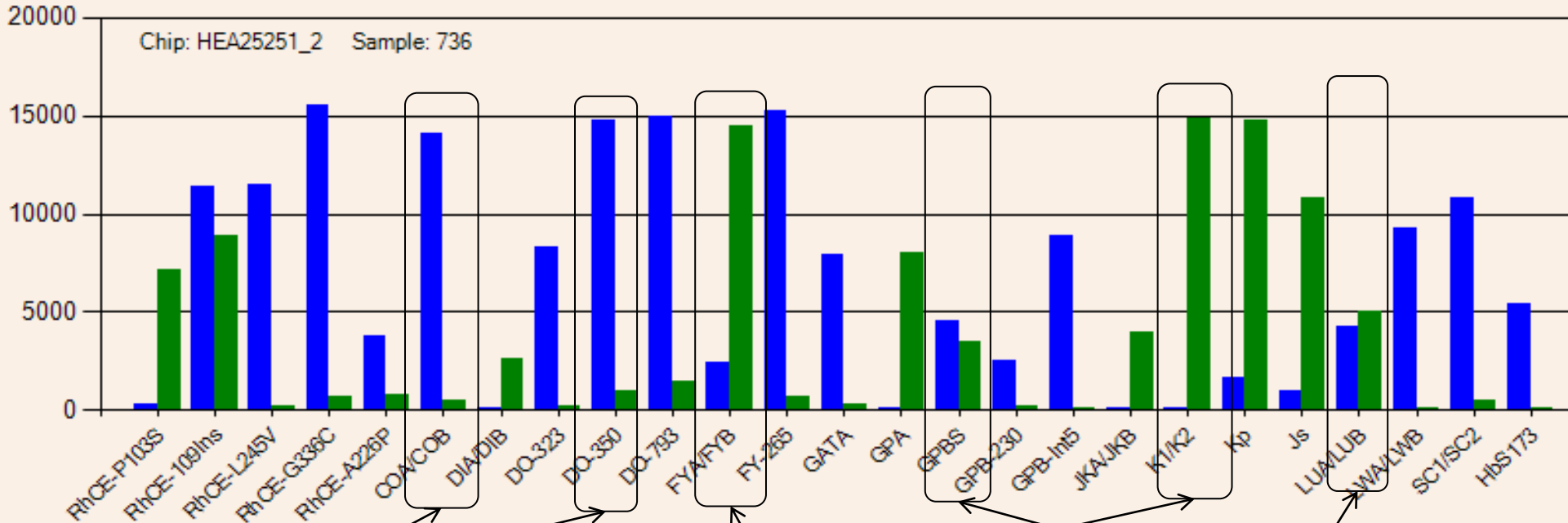


- Le système AIS400 (Array Imaging System) acquiert une image de la puce contenant des billes fluorescentes (positives) et non-fluorescentes (negatives)

- Le logiciel BASIS (BioArray Information System) superpose l'image du test sur la "decoding" image (fourni avec le kit dans le CD) pour localiser les séquences correspondantes aux allèles des groupes sanguins par type de bille
 - Cette cartographie est réalisée pour chacune des 4000 billes de la puce BeadChip



4 Interprétation du BeadChip (intensités des signaux)



Intensité de A plus importante que celle de B
Genotype = AA

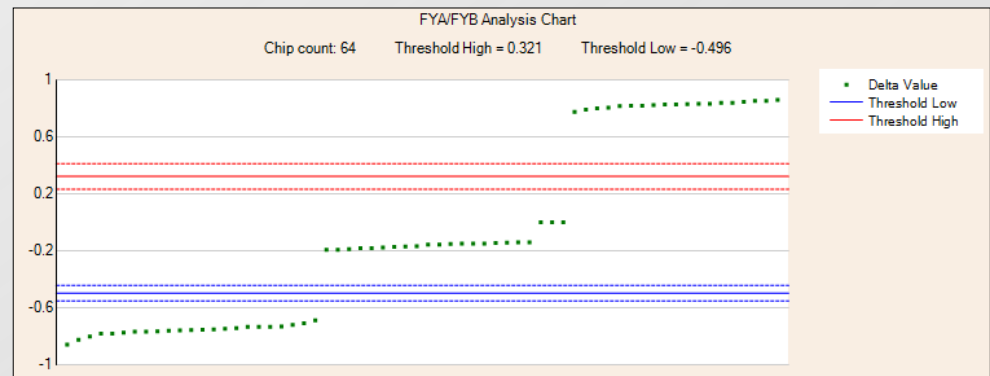
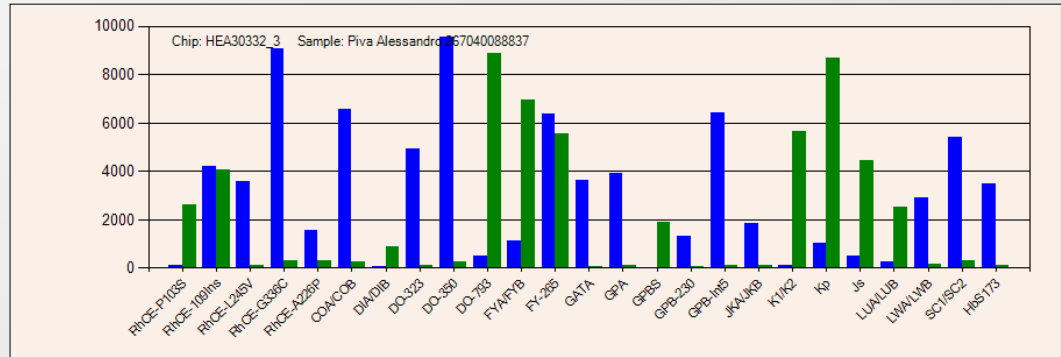
Intensité de A plus faible que celle de B
Genotype = BB

Intensité de A similaire à celle de B
Genotype = AB

Analyse de données par BASIS: les intensités sont déterminées et normalisées, un ratio de discrimination est généré et un algorithme est utilisé pour prédire le type d'allèle

4 Interprétation d'un BeadChip

- Les données sont analysées, les résultats interprétés et reportés dans le logiciel BASIS
 - BASIS interprète et stocke les données localement sur le PC liés au système AIS



Chip	Sample	Notes	Status	Detail	RH2 C	RH3 E	RH4 c	RH5 e	KEL1 K	KEL2 k	KEL3 Kp ^a	KEL4 Kp ^b	KEL6 Js ^a	KEL7 Js ^b	FY1 Fy ^a	FY2 Fy ^b	JK1 Jk ^a	JK2 Jk ^b	MNS1 M	MNS2 N	MNS3 S	MNS4 s	LU1 Lu ^a	LU2 Lu ^b	DI1 Di ^a	DI2 Di ^b	CO1 Co ^a	CO2 Co ^b	DO1 Do ^a	DO2 Do ^b	DO4 Hy	DO5 Jo ^a	LW5 Lw ^a	LW7 Lw ^b	SC1 Sc1	SC2 Sc2	_	HbS		
HEA46817_1	3732482				+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0		
HEA46817_2	3731512				+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	
HEA46817_3	3732139				+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	
HEA46817_4	3732538				+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	
HEA46817_5	3731910				+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0
HEA46817_6	3732222				+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0
HEA46817_7	3732325				+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0
HEA46817_8	3731096				+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0

Merci pour votre attention



www.immucor.com