



Application de Puces à ADN pour le Génotypage Erythrocytaire

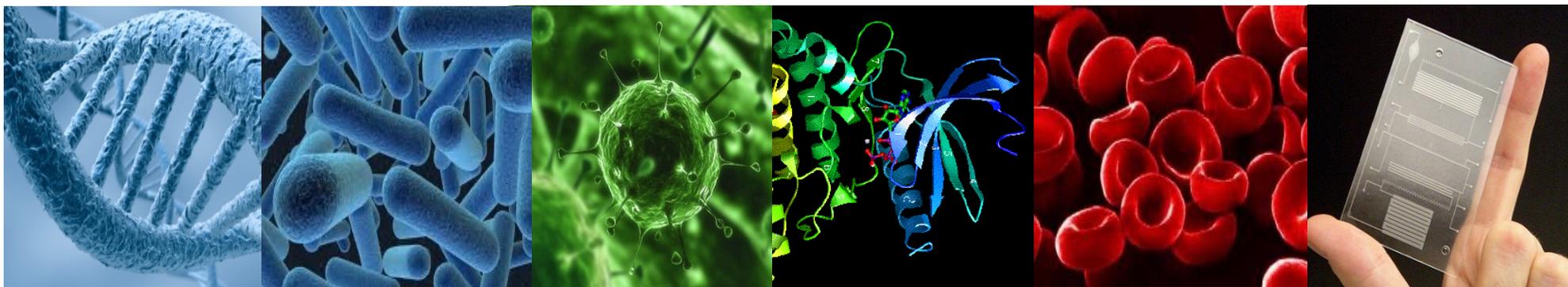
Jean-Charles Brès

TransDiag

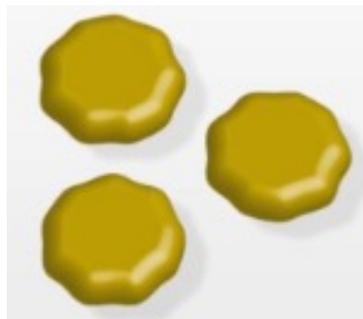
Sécurité transfusionnelle et innovation diagnostique (J. Coste)

EFS site P. Cazal / Parc Euromédecine, Montpellier

TACT 2013 – Montpellier



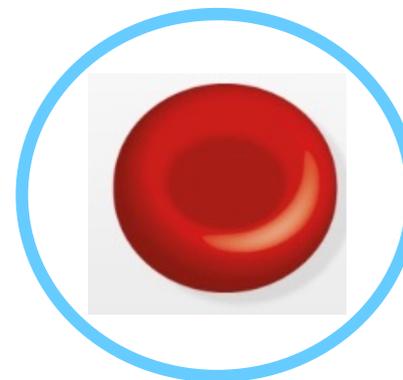
Les Groupes Sanguins



Plaquettes



Plasma



80 %

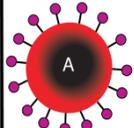
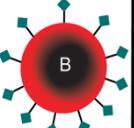
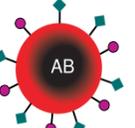
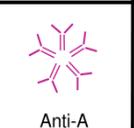
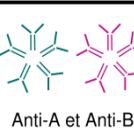
Globules Rouges

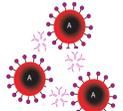
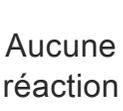
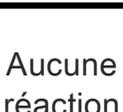
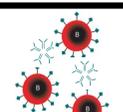
SYSTÈME ABO

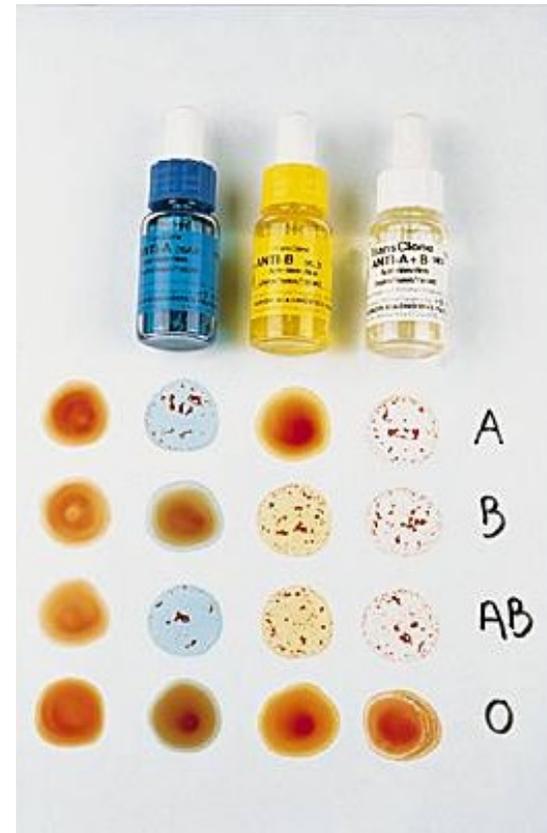


Système Rhésus: + et -

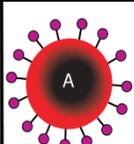
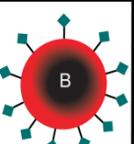
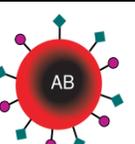
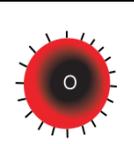
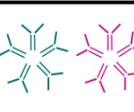
- **Phénotype Érythrocytaire : Antigènes à la Surface des Érythrocytes**
- **Test Hémagglutination : Réaction Antigènes/Anticorps**

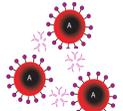
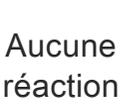
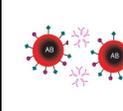
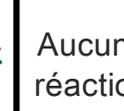
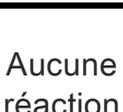
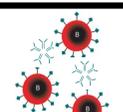
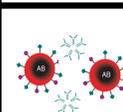
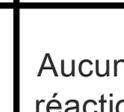
	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule Rouge				
Anticorps	 Anti-B	 Anti-A	Aucun	 Anti-A et Anti-B
Antigène	Antigène A	Antigène B	Antigène A et B	Pas d'antigène

 Anti-A		Aucune réaction		Aucune réaction
 Anti-B	Aucune réaction			Aucune réaction



- **Phénotype Érythrocytaire : Antigènes à la Surface des Érythrocytes**
- **Test Hémagglutination : Réaction Antigènes/Anticorps**

	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule Rouge				
Anticorps	 Anti-B	 Anti-A	Aucun	 Anti-A et Anti-B
Antigène	Antigène A	Antigène B	Antigène A et B	Pas d'antigène

 Anti-A	 Aucune réaction	 Aucune réaction	 Aucune réaction	 Aucune réaction
 Anti-B	 Aucune réaction	 Aucune réaction	 Aucune réaction	 Aucune réaction

- Anticorps Monoclonaux (Volume Limité, Inexistances...)

- Phénotype Érythrocytaire Étendu (plus Grand Nombre d'Ag)



Test Monoparamétrique



Technique Inadaptée Analyses Grandes Séries



Coûts Élevés



Limitation Nombre Dons Phénotypés Étendus



Réponse Incomplète Besoins Transfusionnels



Recherche Complémentaire Labo IHC

- Population Migrante (forte Variation Polymorphisme Génétique)



Difficultés Diagnostique (Absence de Réactifs)



Problèmes Transfusion Produits Compatibles

➤ Limitations Techniques

➤ Apparition Ac Anti-Érythrocytaires = 45% EIR Forte Imputabilité Transfusionnelle

- Réaction Hémolytique
- Augmentation Délais
- Impasses Transfusionnelles

Allo-Immunsation Problème Majeur

➤ Contextes Médical & Socio-Économique

- Amélioration Systèmes de Santé
- Augmentation Population
- Augmentation Espérance de Vie

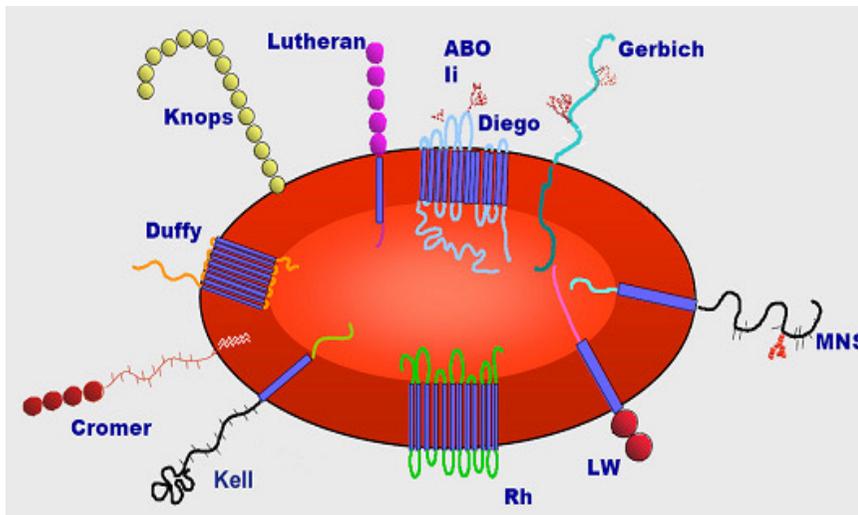
Accroissement
Nombre Transfusion Sanguine



Développement Nouveaux Outils Détermination Groupes Sanguins

- Adaptés Analyses "Haut-Débit" et Grande Échelle
- Génomotypage Érythrocytaire Donneurs Réguliers
 - Meilleure Gestion des Stocks
- Répondre Besoins Transfusionnels

➤ Génotypage : Séquences Spécifiques Antigènes Érythrocytaires



"Molecular Basis and Investigation of Blood Group Genes", Jill R. Storry

- Clonage / Séquençage Gènes
- Polymorphisme Nucléotide : SNP

Système Kell

```

5001 CTCCACGGAT CTTTATGCTC AGCCCCCTCT CTCTCCTTTA AAGCTTGGAG
5051 GCTGGCGCAT CTCTGGTAAA TGGACTTCCT TAAACTTTAA CCGAACCGCTG KEL 2
T KEL 1
5101 AGACTTCTGA TGAGTCAGTA TGGCCATTTT CCTTTCTTCA GAGCCTACCT
5151 AGGACCTCAT CCTGCCTCTC CACACACACC AGTCATCCAG GTGAGGGATG
    
```

❖ BloodChip®



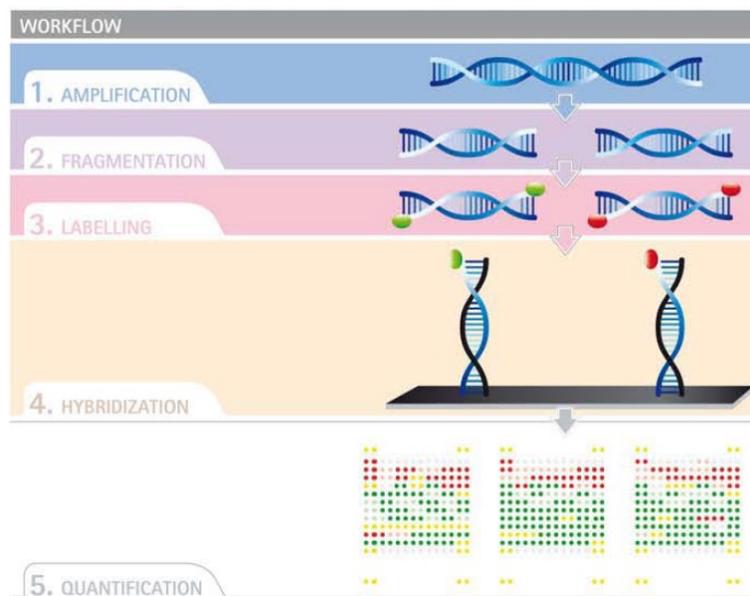
BLOODchip+



- Consortium Européen (5th PCRD, 2003-2007)
- Systèmes Détectés : ABO, RHD, RHCE, Kell, Kidd, Duffy, MNS, Colton, Diego et Dombrock
- Support : Lame Microscope Verre



Kit BLOODChip®, Progenika



Principe de Fonctionnement BLOODChip®



Technologie Luminex

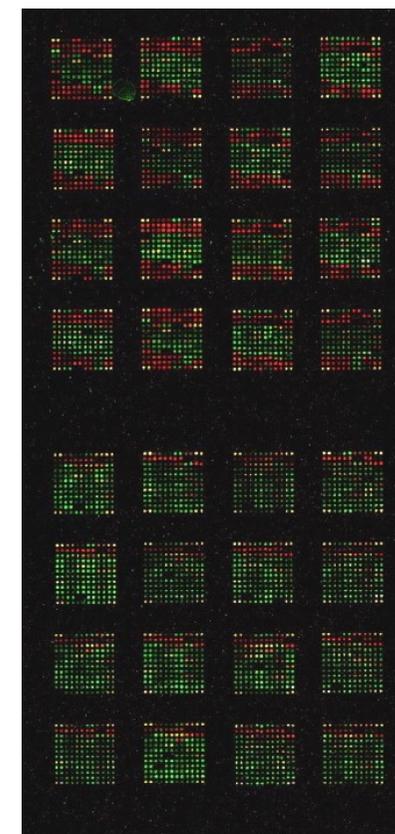


Image d'une puce BLOODChip®

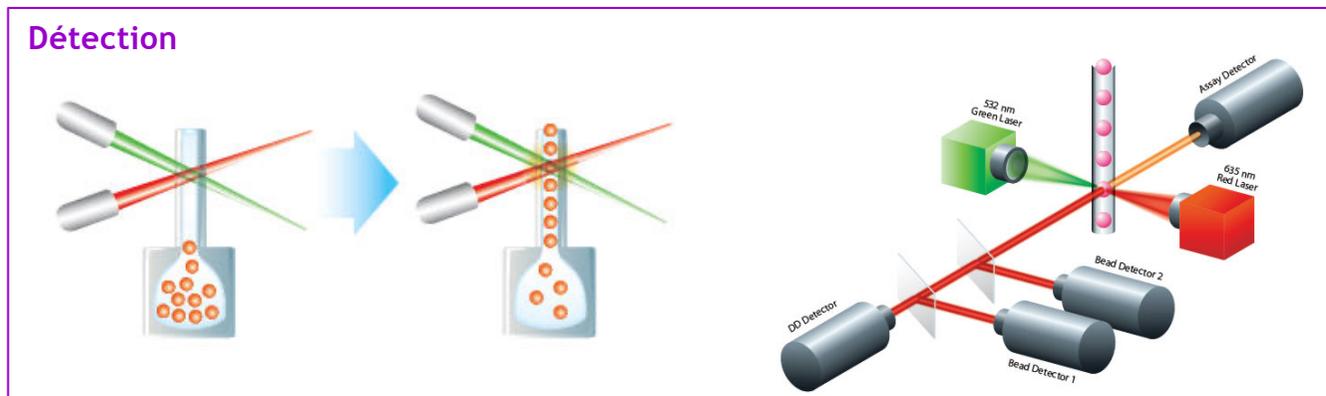
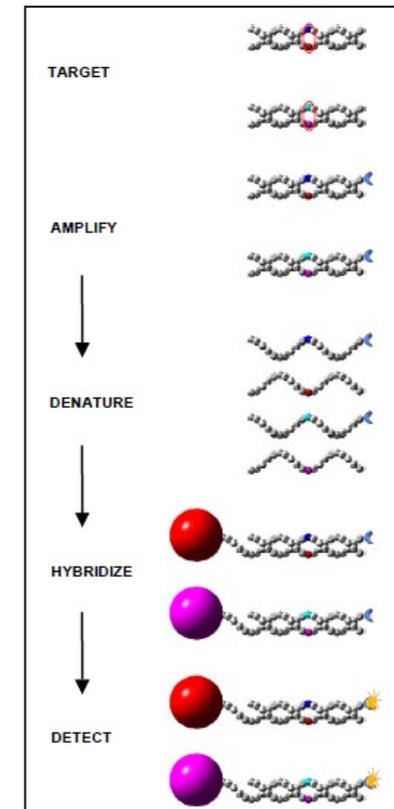
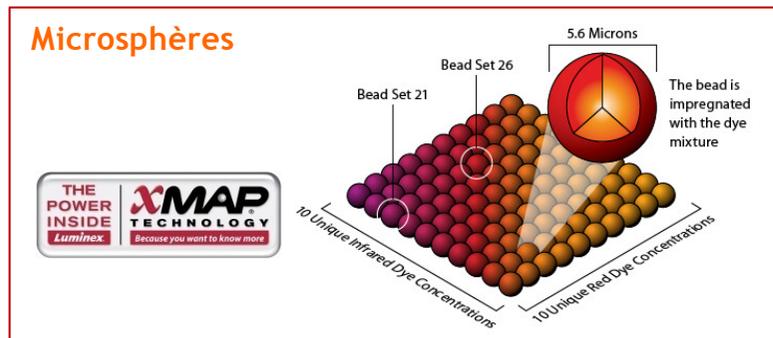
❖ IDCORE et IDCORE+



❖ LIFECODES RBC et LIFECODES RBC-R

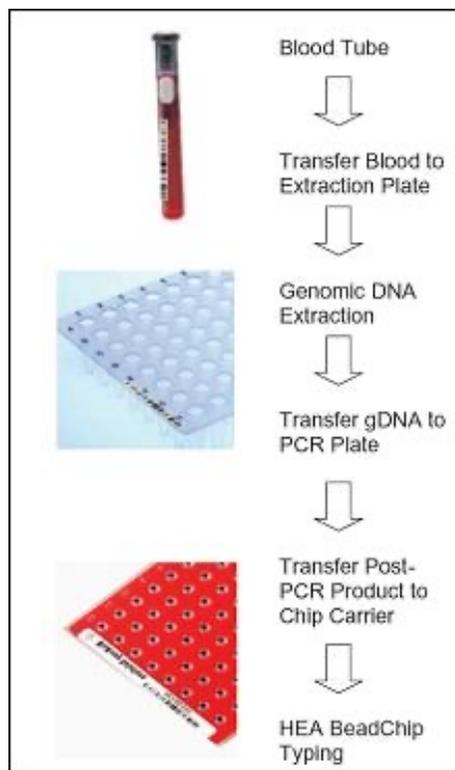


➔ Technologie xMAP - Luminex

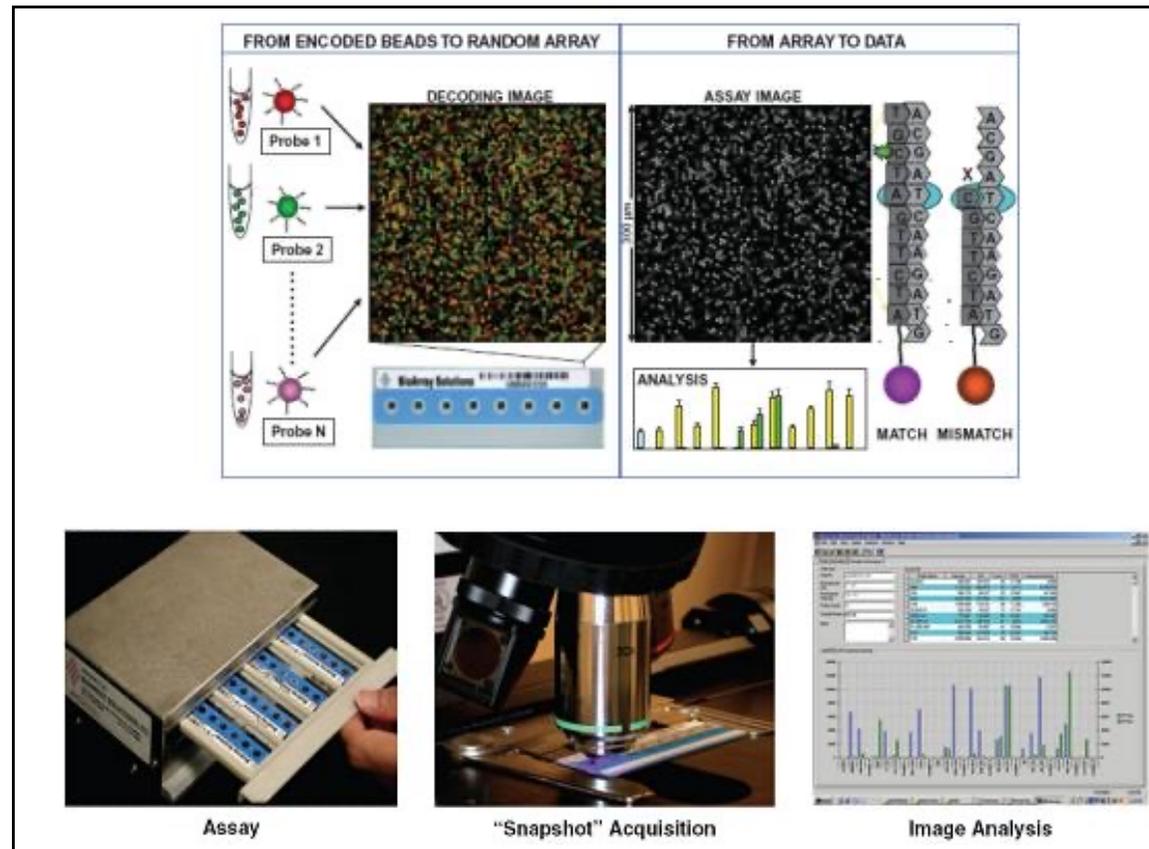


❖ BeadChip HEA™

- Association New York Blood Center / BioArray Solutions (USA)
- Systèmes Détectés : RHD, Kidd, Duffy, Luthéran, MNS, Colton, Diego, Dombrock, Lewis, Scianna et Hémoglobinopathie Hbs173
- Support : 96 échantillons



Protocole Opérateur BeadChip™



Principe Fonctionnement BeadChip™

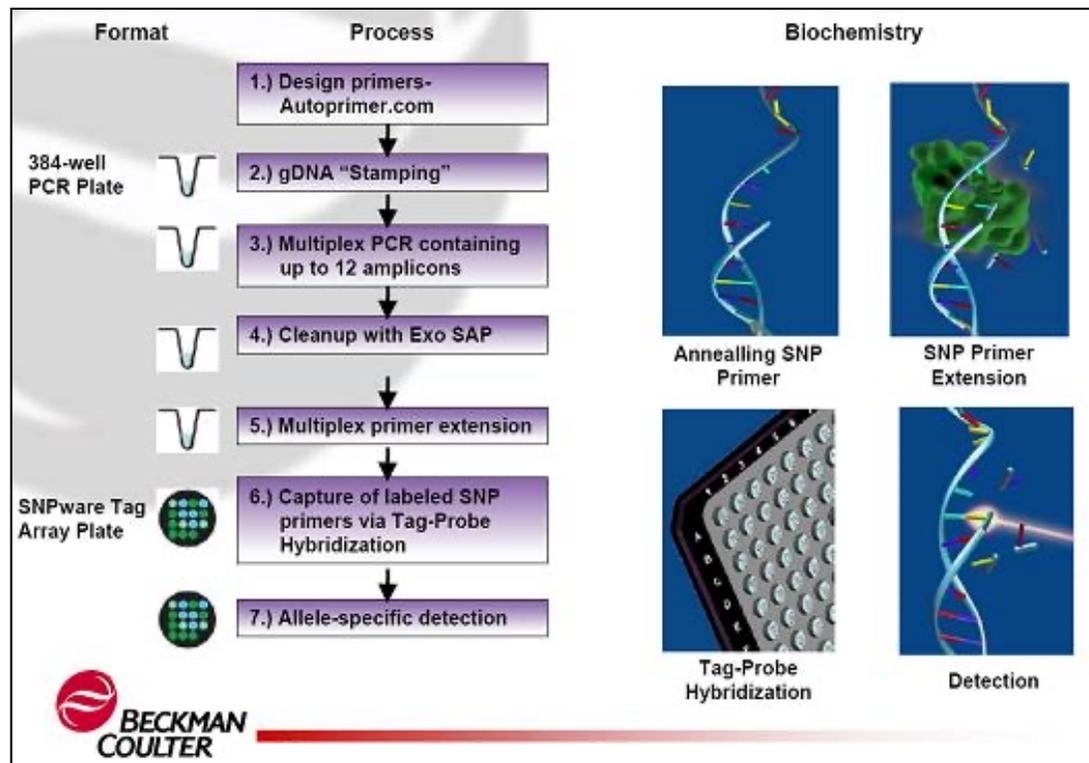
❖ GenomeLab™ SNPstream®

- Plate-forme Beckman-Coulter (USA)
- Systèmes Détectés : RHCE, Kell, Kidd, Duffy, MNS, HPA-1, HPA-5
- Support : Microplaques 96 à 384 puits

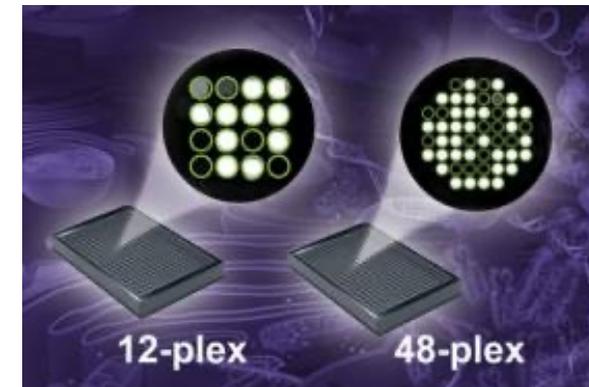
⇒ Mise en Place 2008 Donneurs « Réguliers »



CANADIAN BLOOD SERVICES
SOCIÉTÉ CANADIENNE DU SANG



Protocole Opérateur GenomeLab™ SNPstream®



Type de support GenomeLab™ SNPstream®

➤ Outils de Génotypage Érythrocytaire

- BloodChip®
- IDCORE IDCORE+ / LIFECODES RBC et LIFECODES RBC-R
- BeadChip HEA™
- GenomeLab™ SNPstream®

➡ **Protocoles Complexes**

➡ **Durée Test Importante (minimum 5h)**
Sans extraction ADN génomique

➡ **Coûts Élevés**

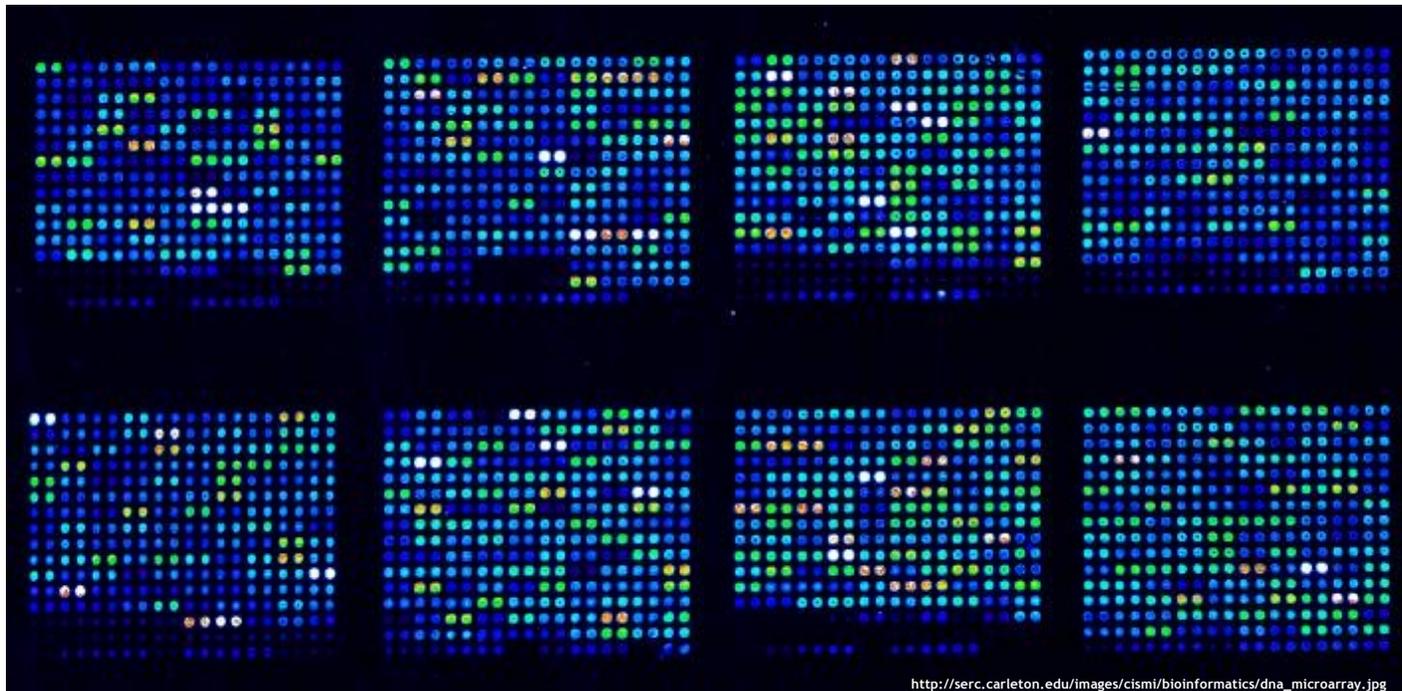


Le Projet EFS Rhône-Alpes

- ✦ **Méthode Détermination Groupes Sanguins**
- ✦ **Puces à ADN « Haut-Débit »**
- ✦ **Analyses Labo Qualification Biologique Don (Grande Échelle et Haut Débit)**
- ✦ **Détection Simultanée Plusieurs Systèmes**
- ✦ **Obtention Résultats Rapides / Complets**
- ✦ **Protocole Simple**
- ✦ **Répondre Exigences Économiques**

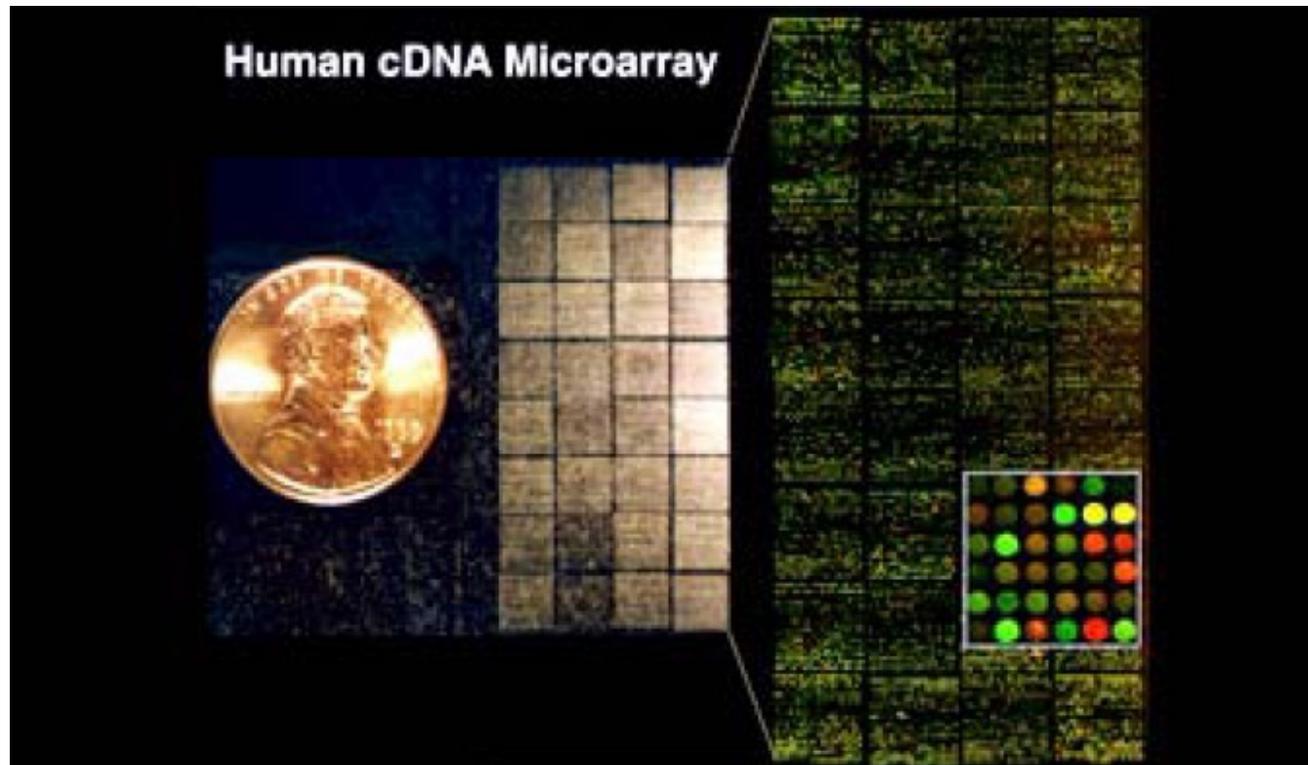
 **Utilisation Puces à ADN**

Les Puces à ADN : Généralités

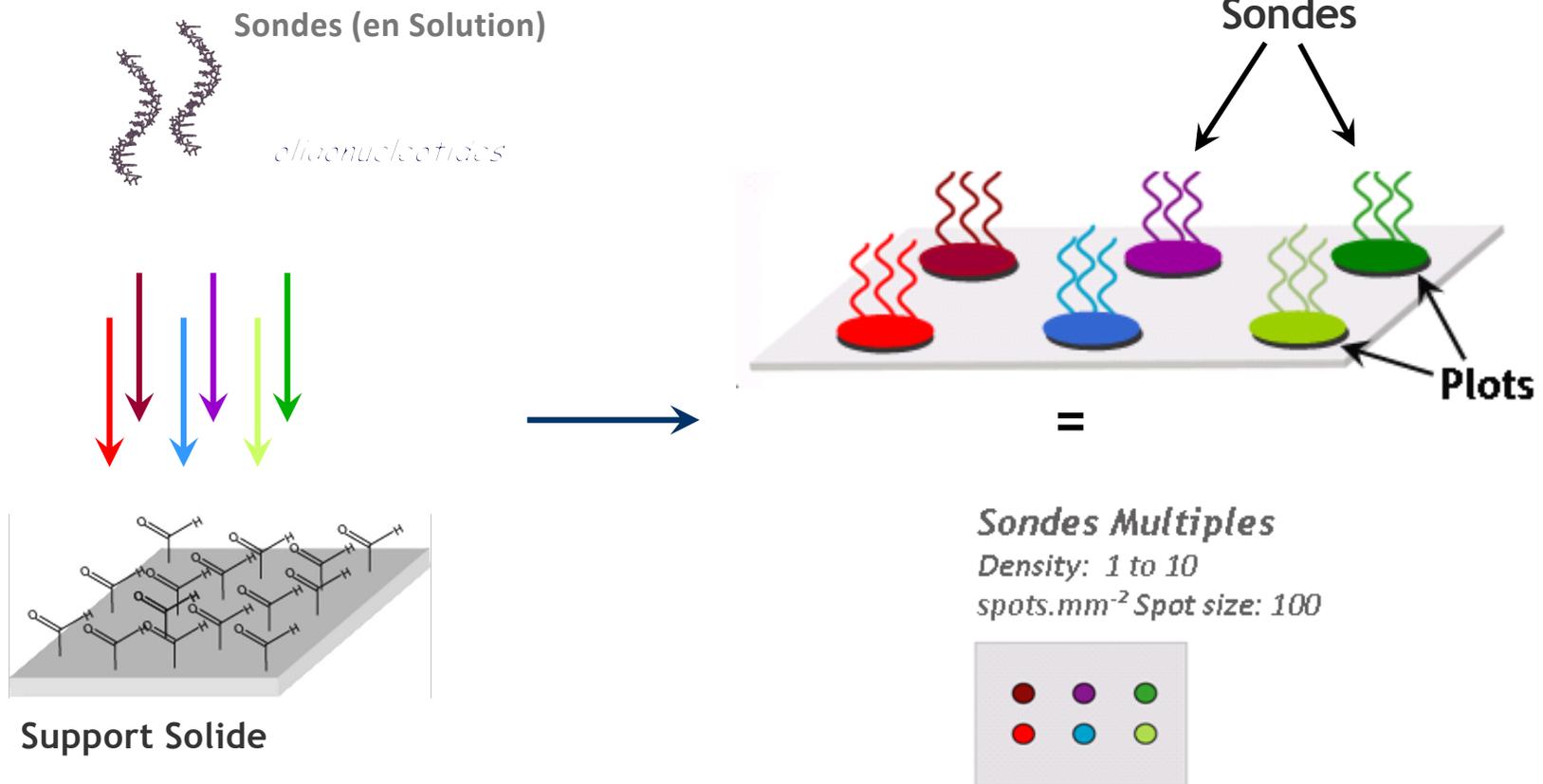


➤ Puce à ADN ou Biopuce

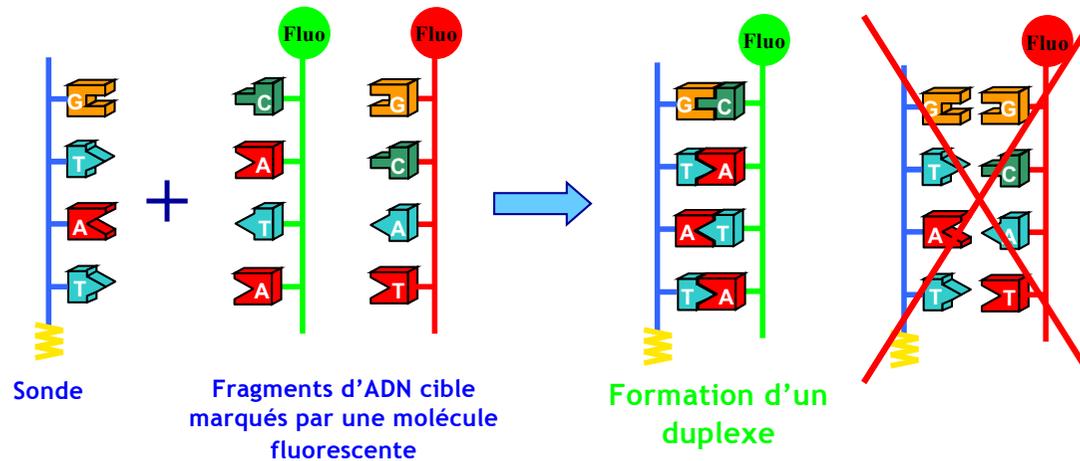
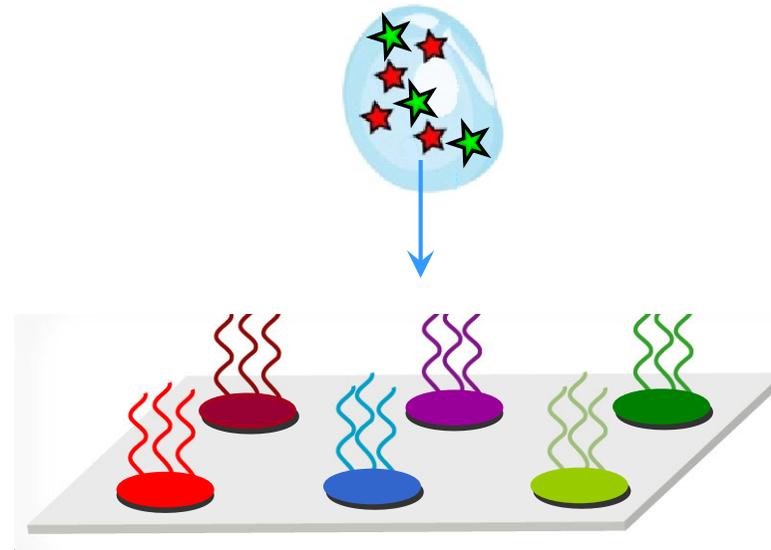
- Concept né en 1990
- Technologie Pluridisciplinaire
- Système Miniaturisé
- Permet Réalisation de Plusieurs Analyses en Parallèle
- Une Seule et Même Opération

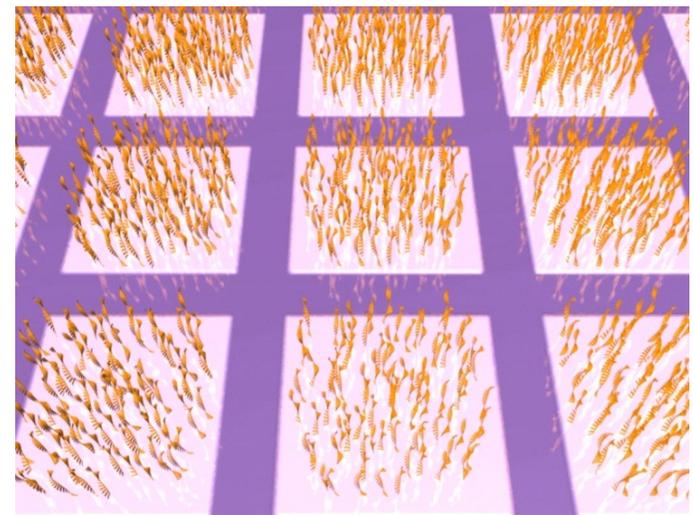
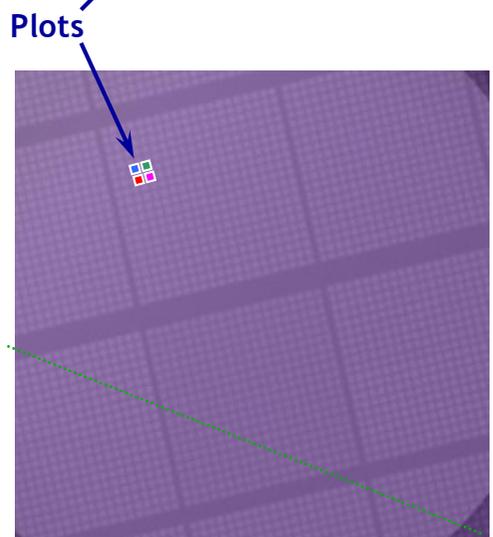
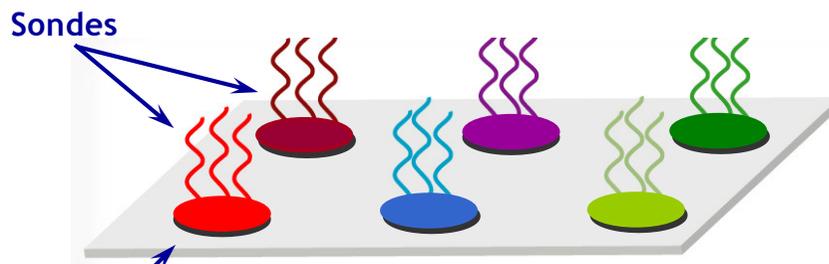


➔ Principe : Association 2 séquences complémentaires

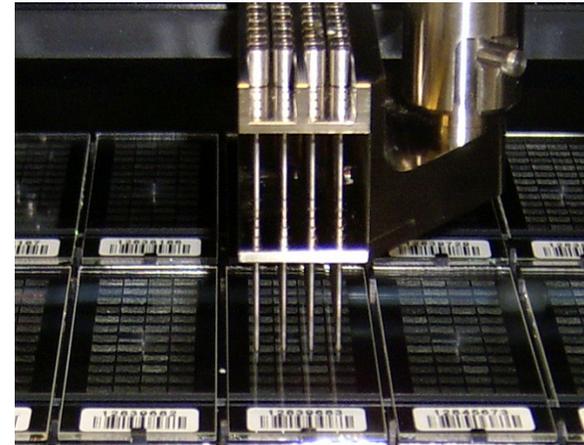


➔ Principe : Association 2 séquences complémentaires

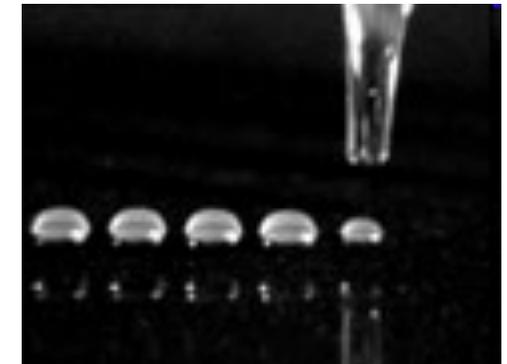
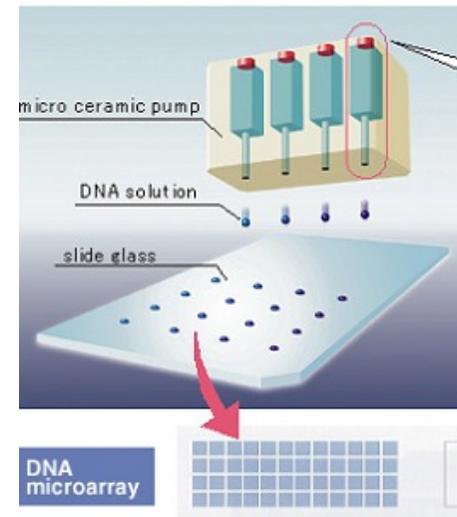




« Contact Printing »



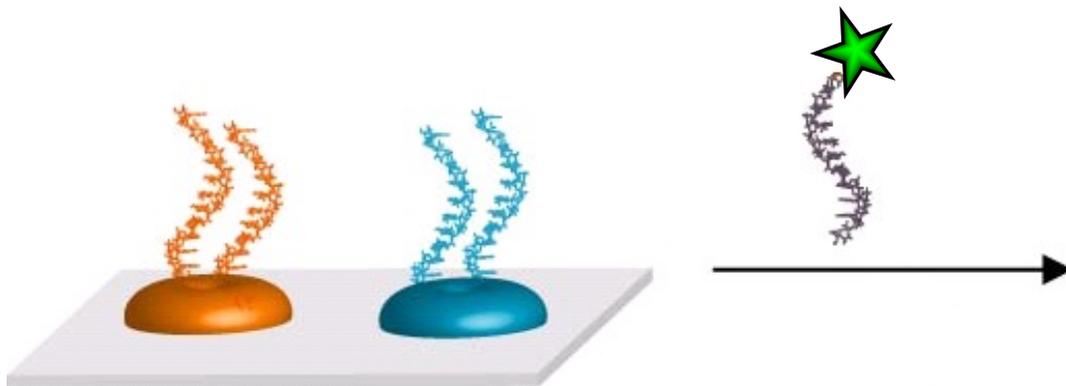
« Non Contact Printing »



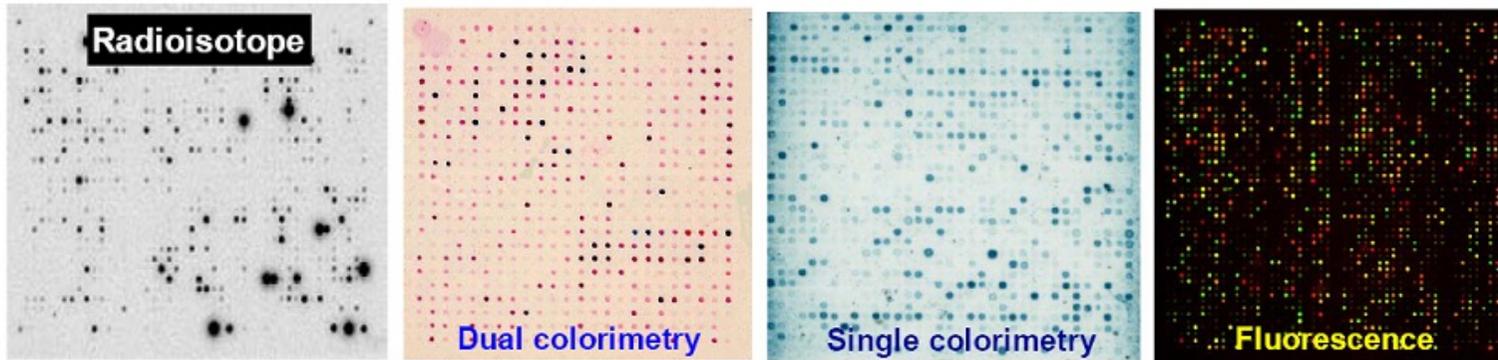
➤ 1^{ere} Étape : **PREPARATION ECHANTILLON**

- Extraction ADN
- Amplification PCR
- Reverse-Transcriptase
- etc...

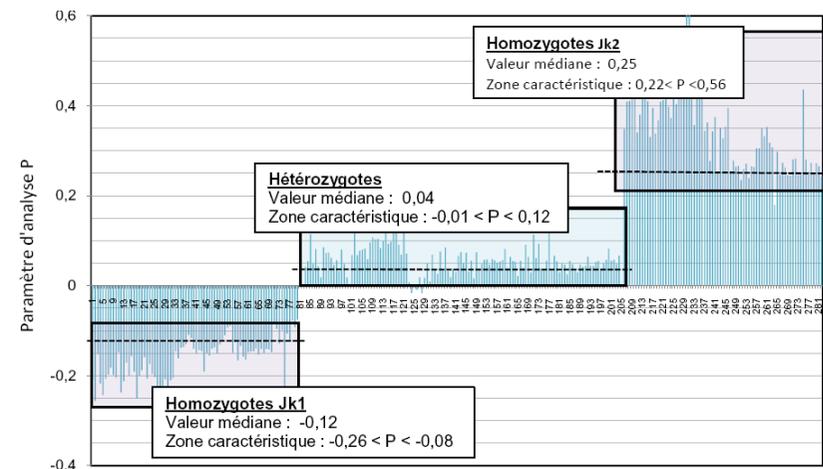
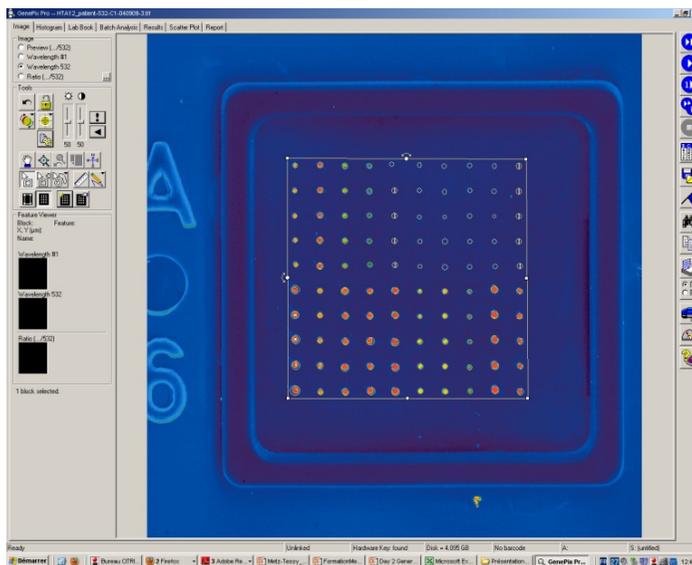
➤ 2^{eme} Étape : **HYBRIDATION**



❖ 3^{ème} Étape : DETECTION



❖ 4^{ème} Étape : TRAITEMENT DONNEES / ANALYSE



Projet EFS Rhône-Alpes

Développement de Puces à ADN pour le Génotypage Érythrocytaire



➤ Méthode :

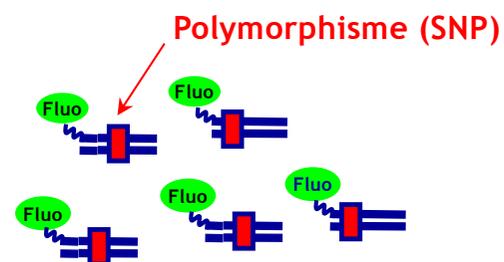
1- Préparation Cibles



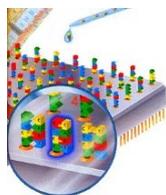
EXTRACTION
ADN Génomique



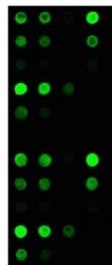
AMPLIFICATION
PCR Multiplexe



2- Identification : Détection / Analyse



DETECTION
FLUORESCENCE



ANALYSE
DONNÉES

**Génotype Érythrocytaire
Donneur**

➤ 4 Systèmes Érythrocytaires = 16 Antigènes

	Antigènes	SNP
Kell	KEL1 / KEL2	T / C
	KEL3 / KEL4	T / C
Kidd	JK1 / JK2	G / A
Duffy	FY1 / FY2	G / A
	FY*2 faible	T / C
	FY*2 nul	C / T
MNS	MNS1 / MNS2	C / T
	MNS3 / MNS4	T / C

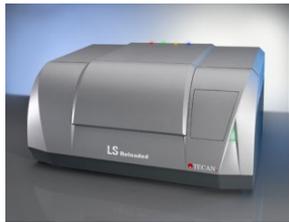
- Importance Clinique

- Systèmes Bialléliques

➤ Principe : **Hybridation 2 Séquences Complémentaires**

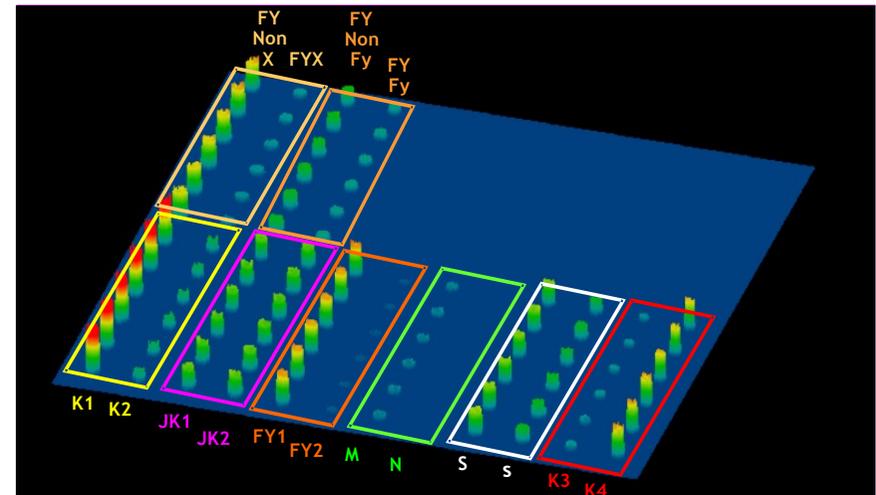
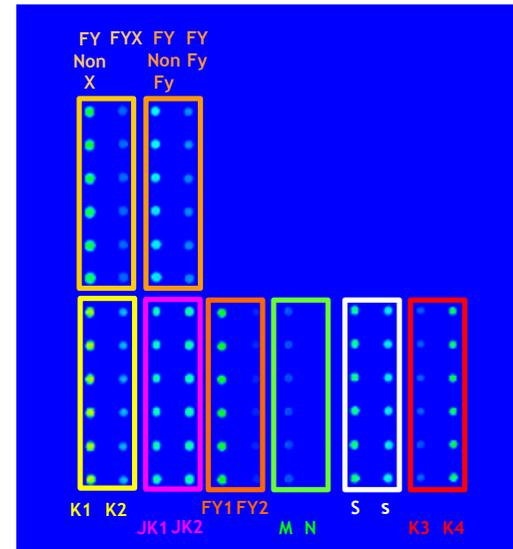
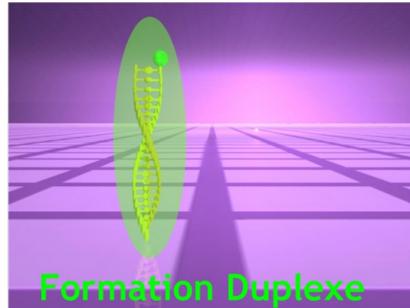


Puce à ADN
Hybridée

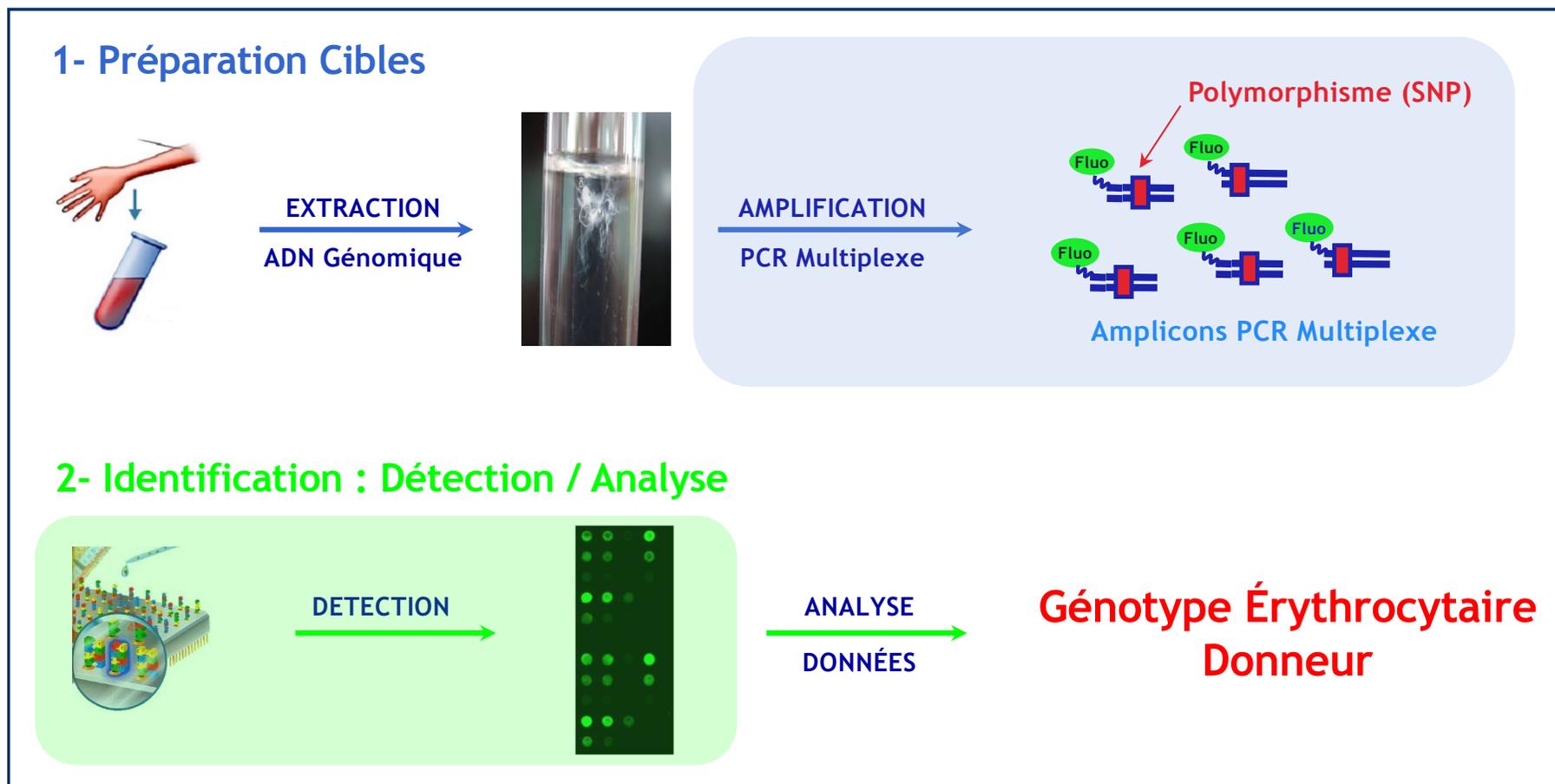


Scanner Fluorescence

Détection
Cibles Hybridées

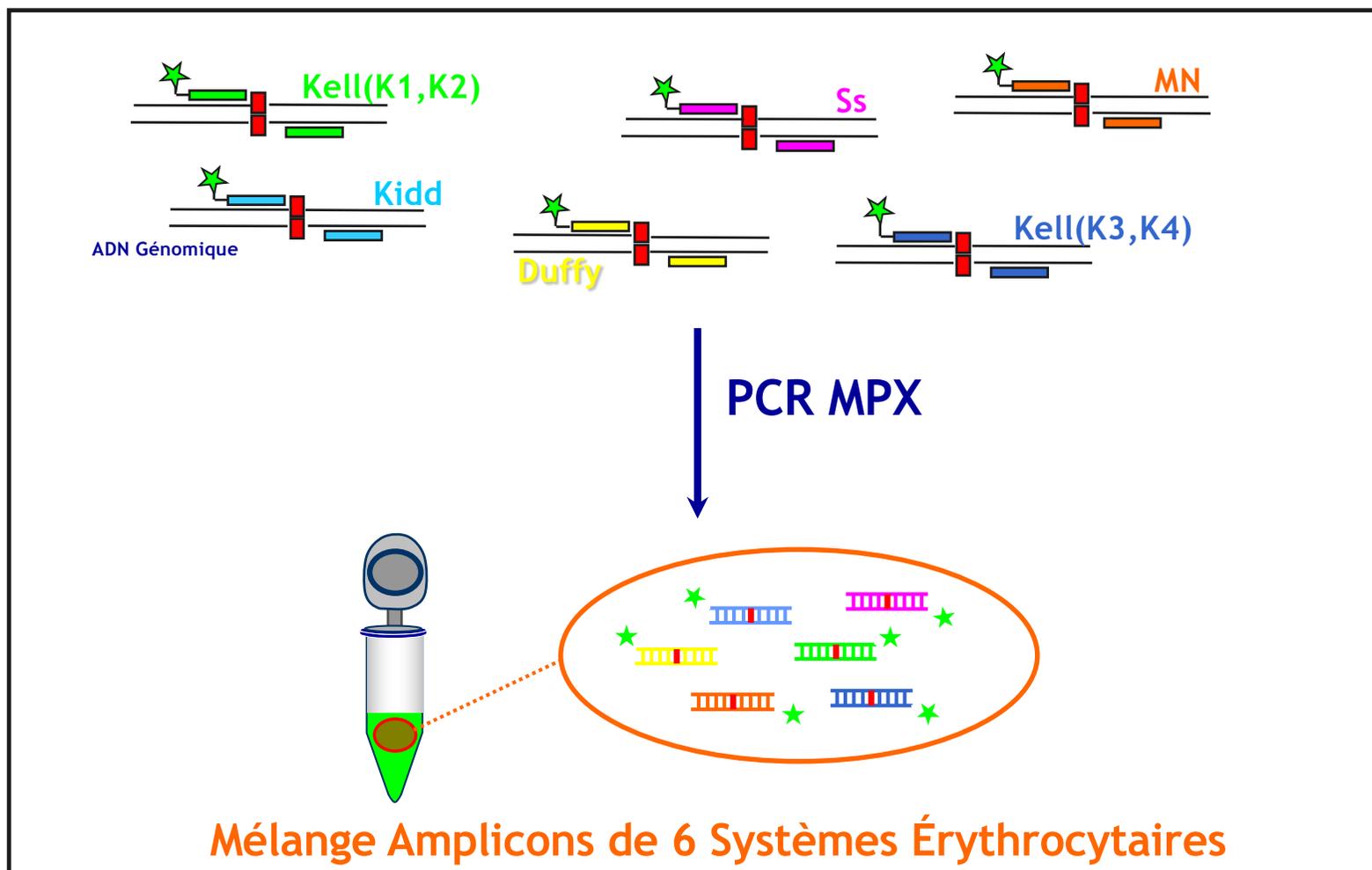


➤ Méthode :



➤ Développement / Optimisation Protocole :

- Conception Amorces
- Conditions Amplification



OBJECTIFS

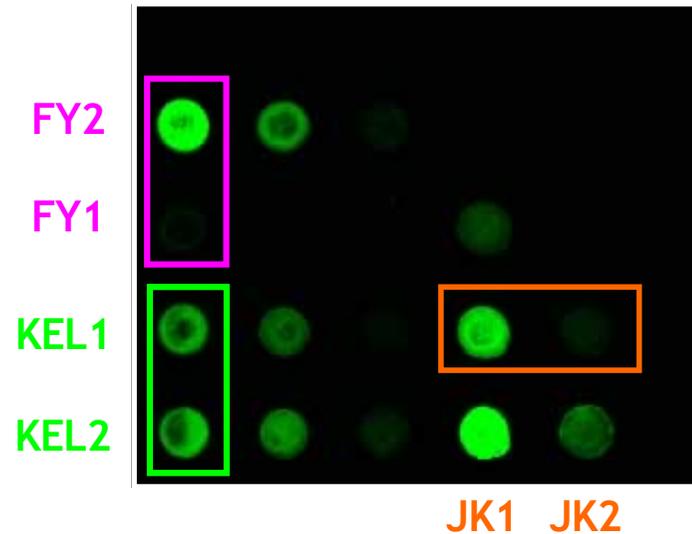
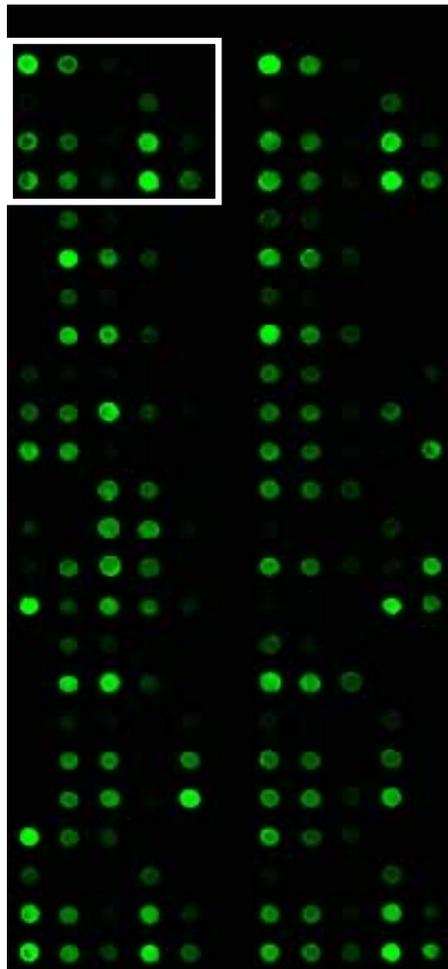
- ➔ Évaluation / Sélection Séquences (Sondes)
- ➔ Évaluation / Sélection Support

COMMENT ?

- ➔ Hybridation Cibles
- ➔ Différents Supports (Chimie Surface)
- ➔ Différentes Sondes

- Détection Séquences Spécifiques
- Spécificité Hybridation
- Intensités Signaux Fluorescence

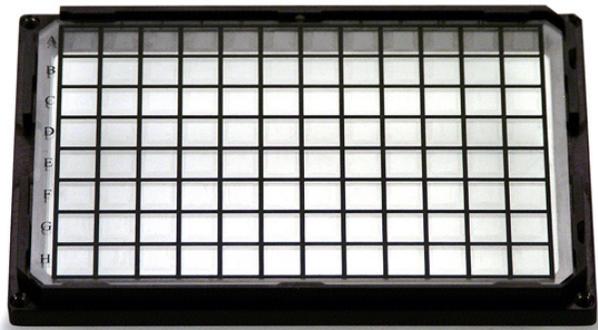
- Cibles : MPX PCR Amplicons, Phénotype Donneur **KEL: 1, 2** ; **JK: 1, -2** ; **FY: -1, 2**



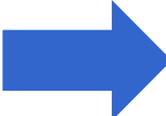
Corrélation Phénotype / Génotype

Prototype : Support Polymère

- Moyen à Haut-Débit
- Format 96 Puits Automatisable
- Coût « Faible »



Format Microplaque 96 puits

 Validation Panel Echantillons



Validation du Prototype

Protocole Semi-Automatisé

✦ Date Réalisation : 2008-2009

✦ Échantillons

- Panel 1080 Donneurs Sang Région Rhône-Alpes
- Phénotypage Érythrocytaire Étendu = Labo QBD Metz-Tessy (EFS Rhône-Alpes)

Total = 6480 phénotypes

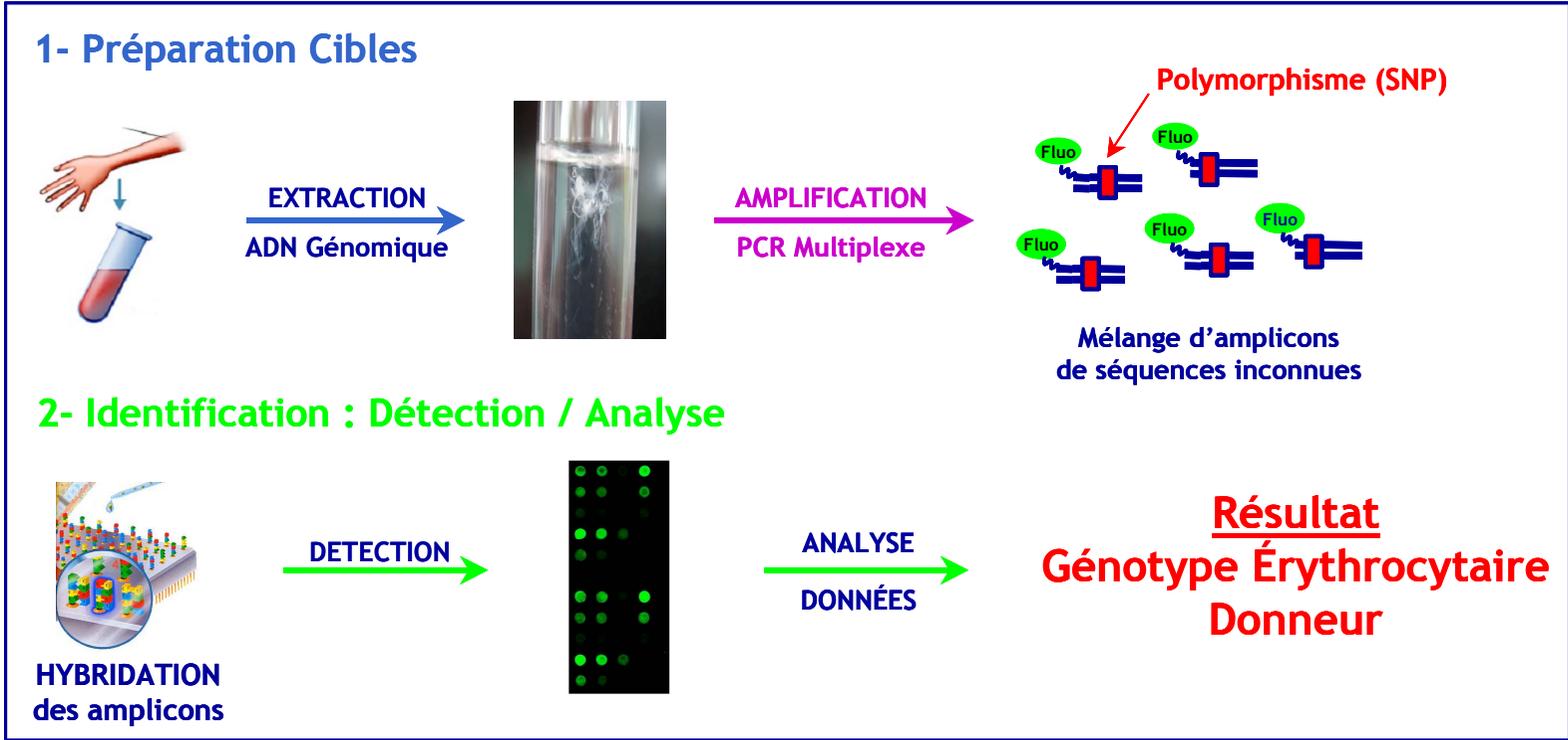
- Extraction ADN génomique MagNa Pure LC (Roche Diagnostics)
- Amplification PCR Multiplexe

✦ Puces à ADN

- Puces « Haut-Débit » (Microplaque 96 puits)
- 14 Antigènes = 16 Sondes (Variants Duffy inclus)
- Lavages par Laveur μ plaques

➤ Méthode

- Étape 1 Extraction ADN Génomique
- Étape 2 Amplification PCR Multiplexe
- Étape 3 Hybridation Puce à ADN
- Étape 4 **Lavages Puce à ADN**
- Étape 5 **Détection Scanner Puce à ADN**
- Étape 6 Analyse / Obtention Résultats



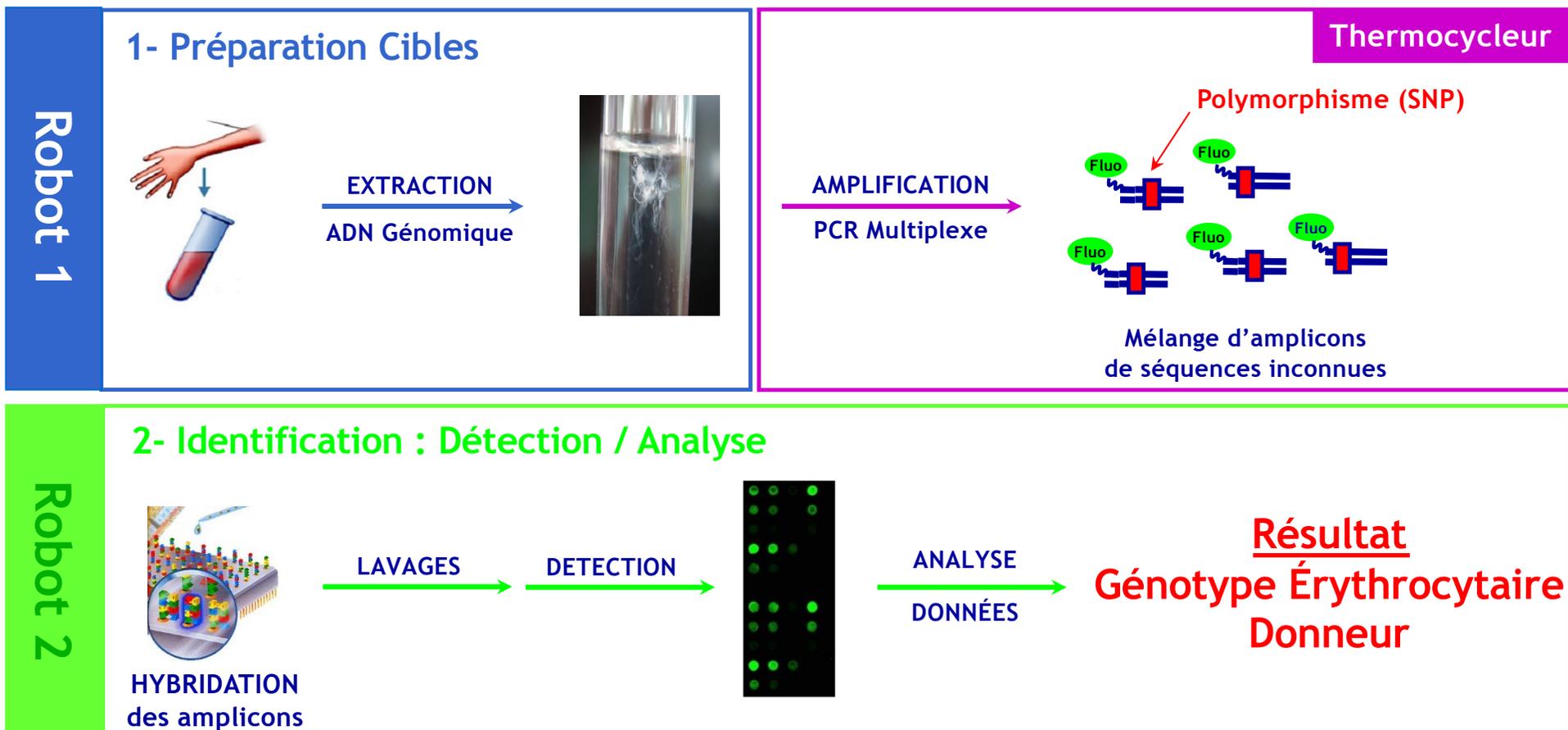
Système	Antigènes	Résultats Concordants	Résultats Discordants	Phénotype	Génotype
Kell	KEL1 / KEL2	1080	0		
	KEL3 / KEL4	1080	0		
Kidd	JK1 / JK2	1079	1	JK:-1,2	JK*1/*2 Génotype Confirmé**
Duffy	FY1 / FY2	1078	2	FY:1,-2	FY*1/*2 6 FY*1/*X * ➡ 4 FY:1,2
MNS	MNS1 / MNS2	1076	5	MNS:1,2	4 MNS*1/*1 et MNS*2/*2 Génotypes Confirmés**
	MNS3 / MNS4	1077	3	MNS:3,-4	MNS*3/*4 Génotypes Confirmés**

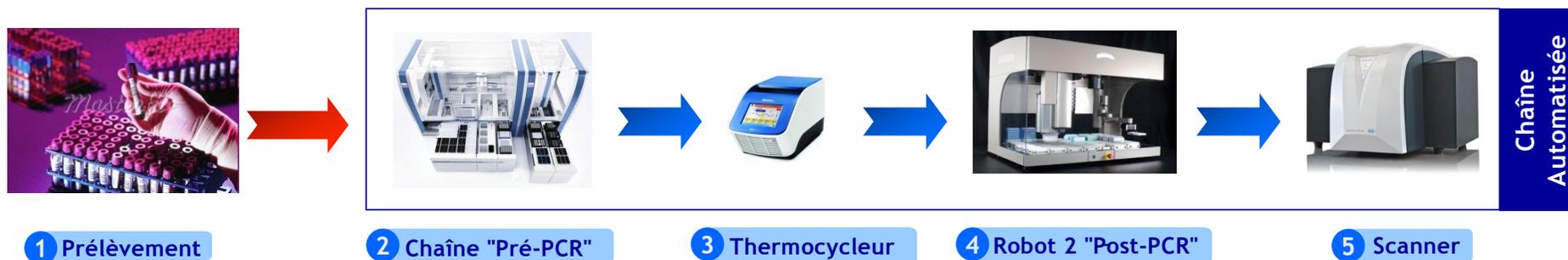
* SNaPshot (Applied Biosystems), ** Gen-Probe, BioArray Solutions (Immucor) - EFS Alpes-Méditerranée

➡ **Concordance Phéno/Géno = 99,83 %**

➡ **Création d'une Chaîne Automatisée**

➤ Méthode





Évaluation

✦ Date Réalisation : 2012

✦ Échantillons

- Panel 1000 Donneurs Sang Région Rhône-Alpes
- Phénotypage Érythrocytaire Étendu (EFS Rhône-Alpes)

➡ **Concordance Phéno/Géno > 99,9 %**

➡ **Confirmation Génotypes EFS Alpes-Méditerranée**

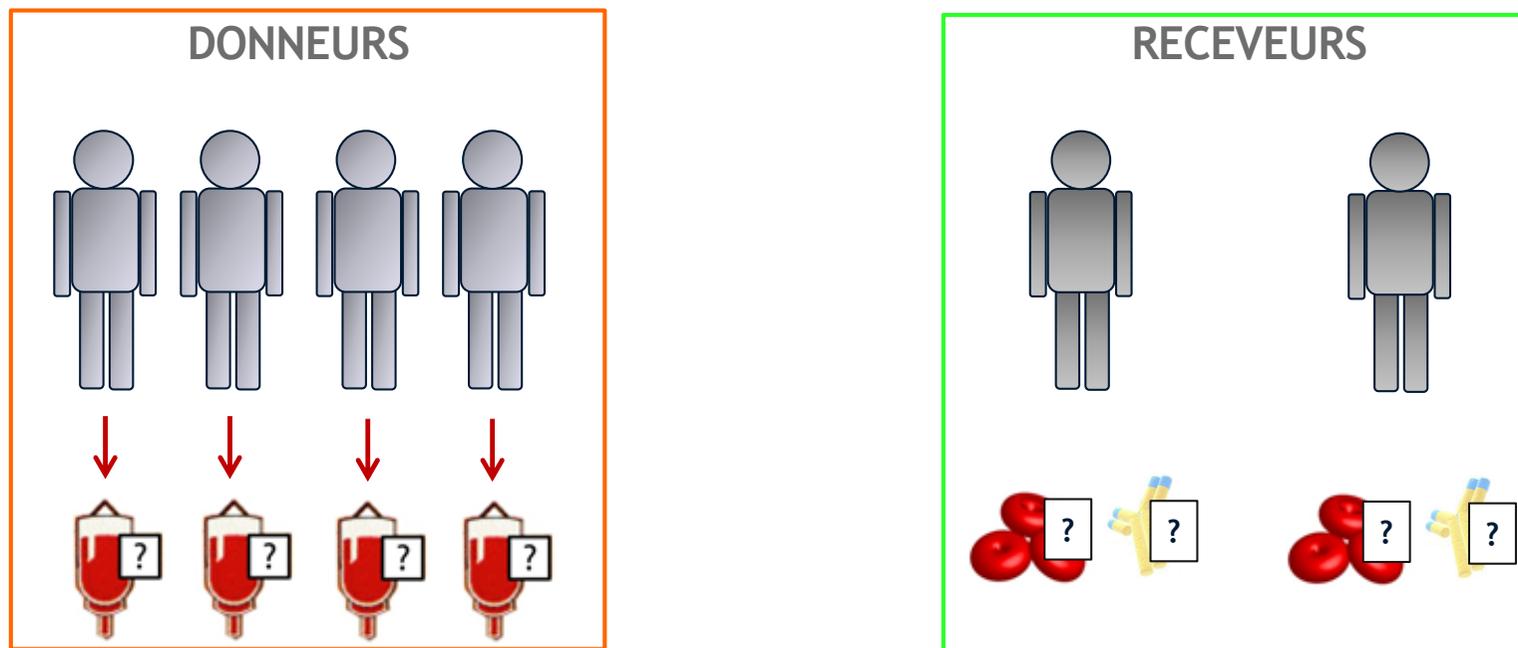


Chaîne Automatisée Bilan

- ✦ Technique « Robuste »
- ✦ Systèmes Érythrocytaires Intérêt Transfusionnel
- ✦ Automatisation
- ✦ Analyses « Moyen-Débit »
- ✦ Protocole Simple
- ✦ Coût Faible

Le Futur en l'Immuno-Hématologie





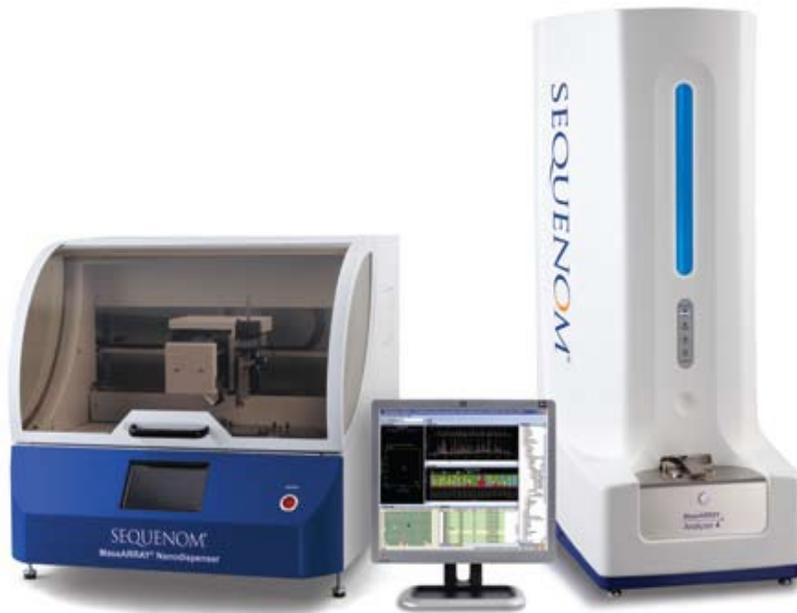
Améliorer les bases de données



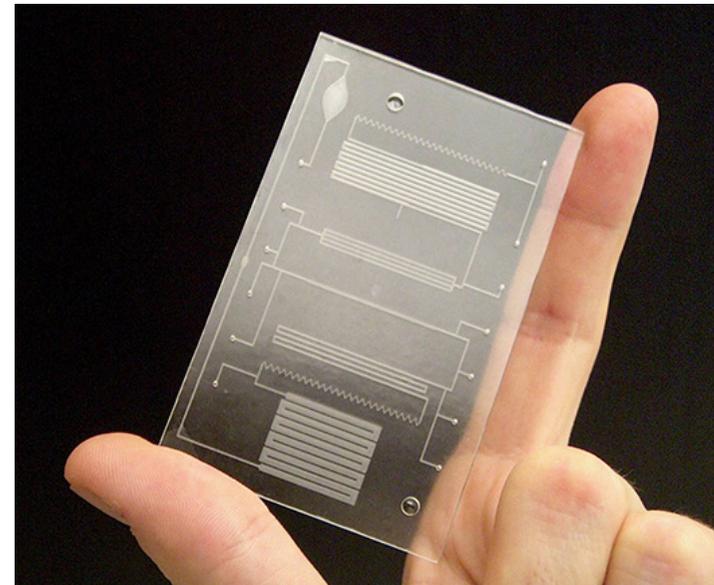
Accroître Sécurité transfusionnelle

Technologies Innovantes

Miniaturisées "tout intégrés"



MASSARRAY system, Sequenom



Lab-On-Chip

Automatisées + Coûts Faibles

Technologies Innovantes

Miniaturisées "tout intégrés"





Remerciements



Conseil Scientifique Établissement Français du Sang (2005 -2010-2011)



ANR - BiotecS 2010



Prix Arnauld Tzanck 2010



Association Recherche et Transfusion (2008)



Merci de votre attention

Jean-Charles Brès

Mail : jean-charles.bres@efs.sante.fr

**EFS Pyrénées Méditerranée site Pierre Cazal
Laboratoire TransDiag**