



# Application de Puces à ADN pour le Génotypage Erythrocytaire

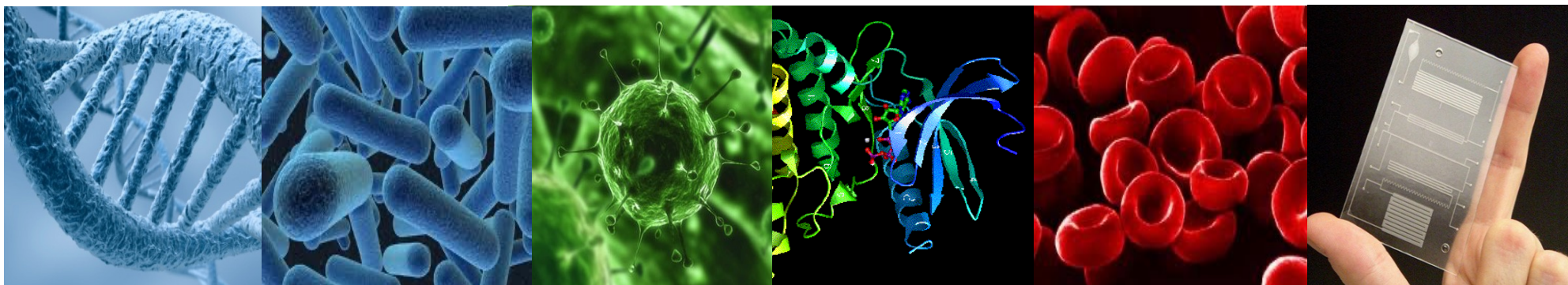
Jean-Charles Brès

TransDiag

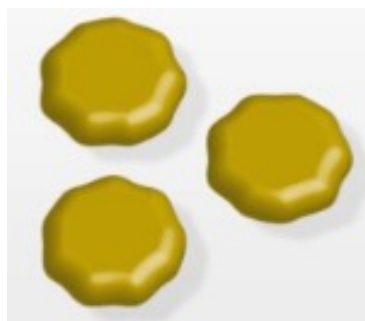
*Sécurité transfusionnelle et innovation diagnostique (J. Coste)*

EFS site P. Cazal / Parc Euromédecine, Montpellier

TACT 2013 – Montpellier



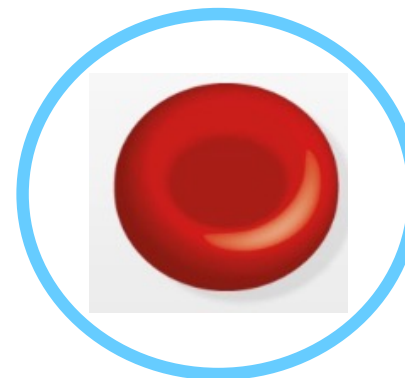
# Les Groupes Sanguins



Plaquettes



Plasma

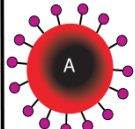
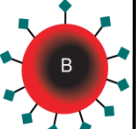
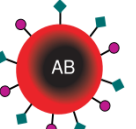




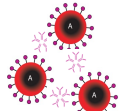
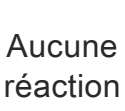

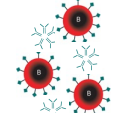
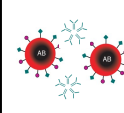
80 %

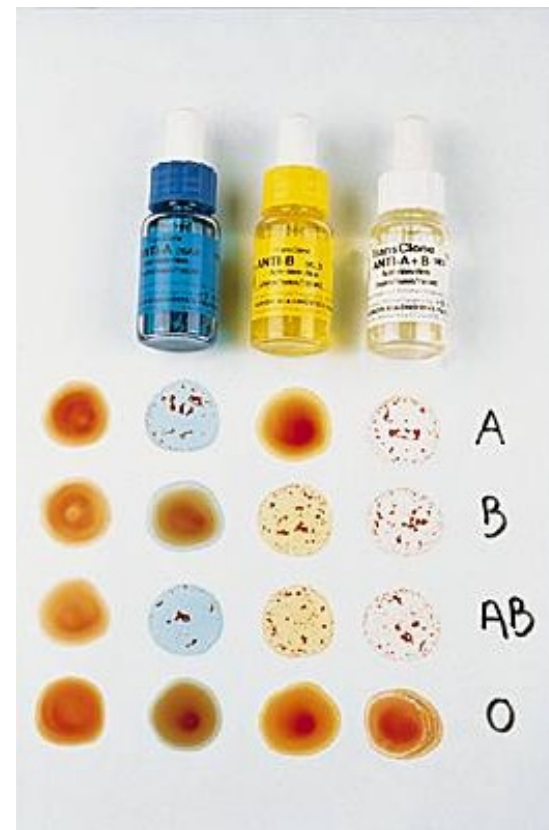
Globules Rouges



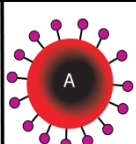
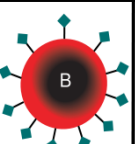
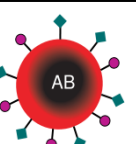
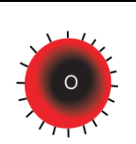
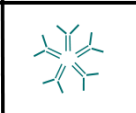

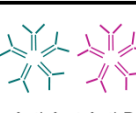
- **Phénotype Érythrocytaire : Antigènes à la Surface des Érythrocytes**
- **Test Hémagglutination : Réaction Antigènes/Anticorps**


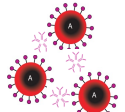
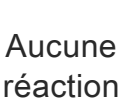
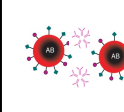
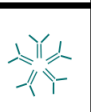
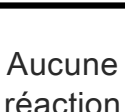
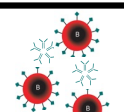
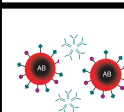
	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule Rouge				
Anticorps	Anti-B	Anti-A	Aucun	Anti-A et Anti-B
Antigène	Antigène A	Antigène B	Antigène A et B	Pas d'antigène

		Aucune réaction		Aucune réaction
	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
 Anti-B	 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

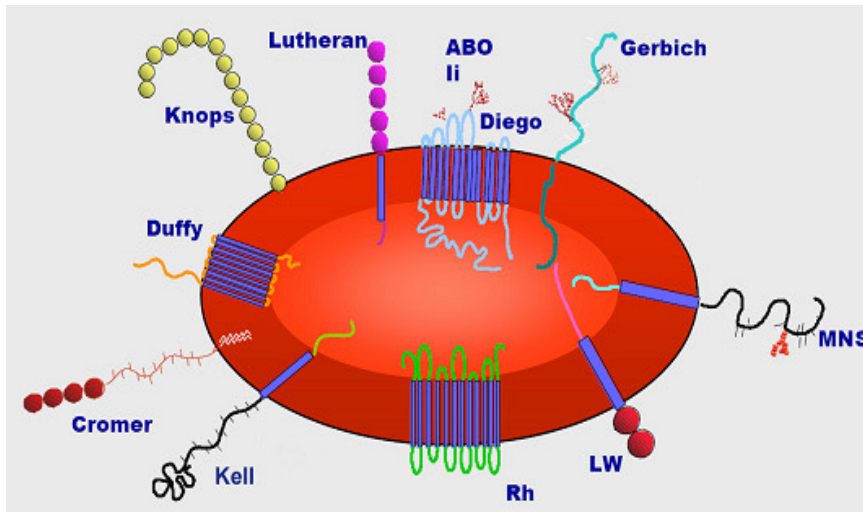


## Développement Nouveaux Outils Détermination Groupes Sanguins

- Adaptés Analyses "Haut-Débit" et Grande Échelle
- Génompage 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

### Systeme Kell

```

5001 CTCCACGGAT CTTATGCTC 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®



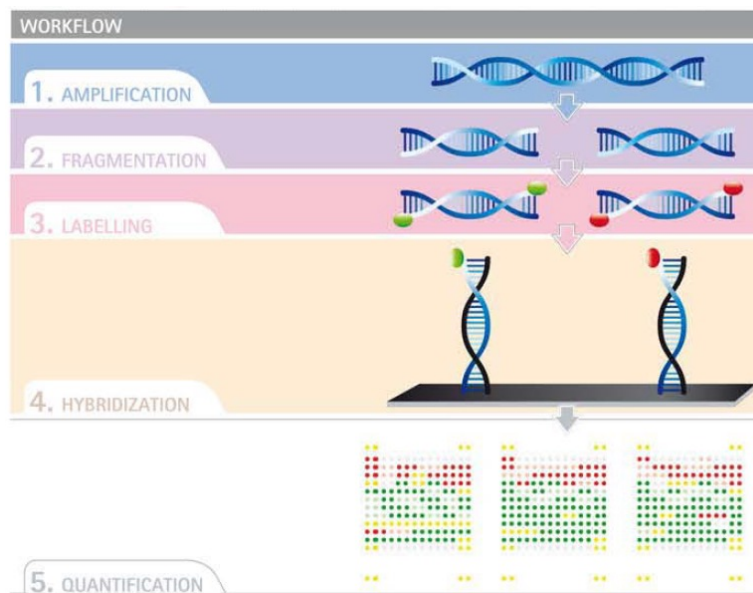
BLOODchip+



- Consortium Européen (5<sup>th</sup> 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®

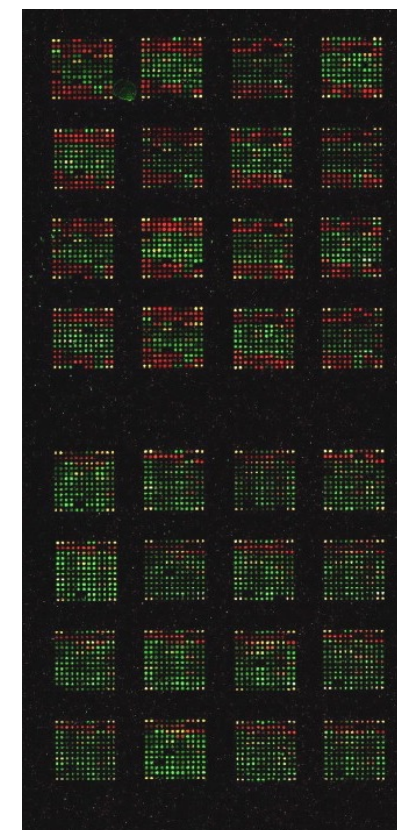


Image d'une puce BLOODChip®



**Technologie Luminex**

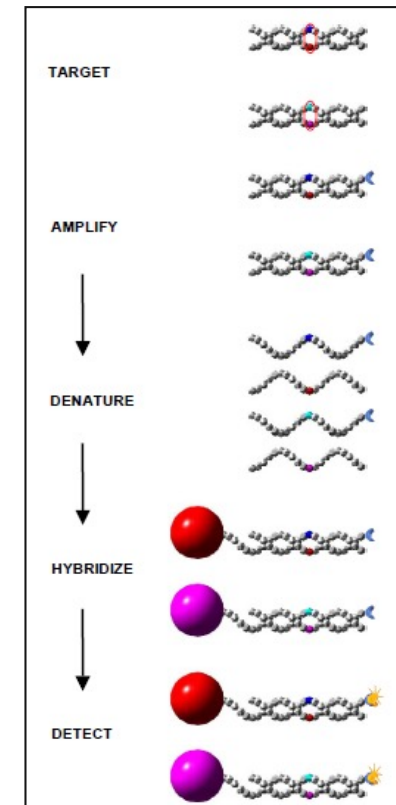
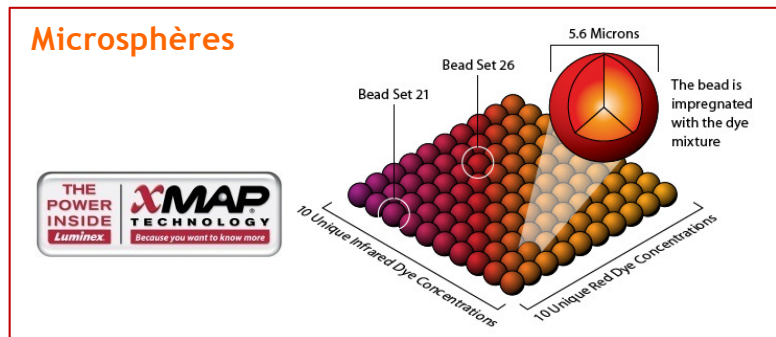
❖ IDCORE et IDCORE+



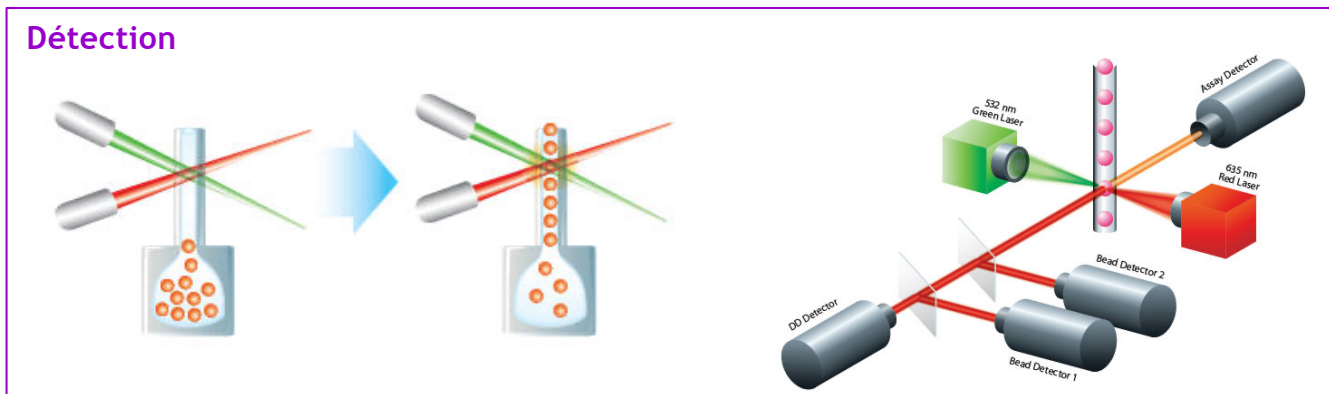
❖ LIFECODES RBC et LIFECODES RBC-R



➔ Technologie xMAP - Luminex



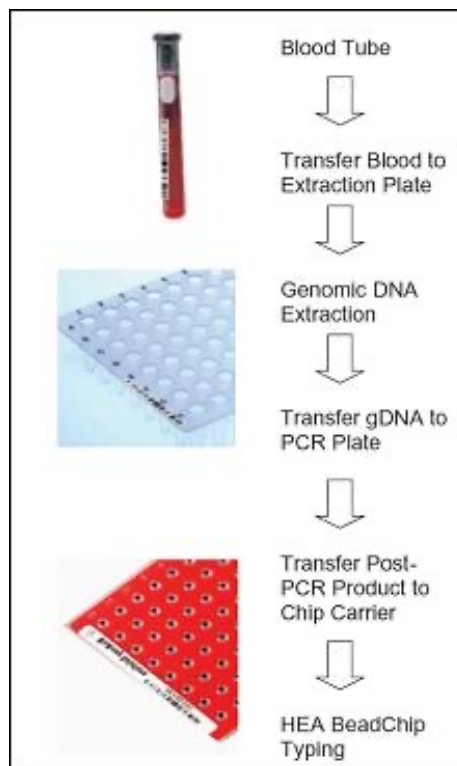
## Détection



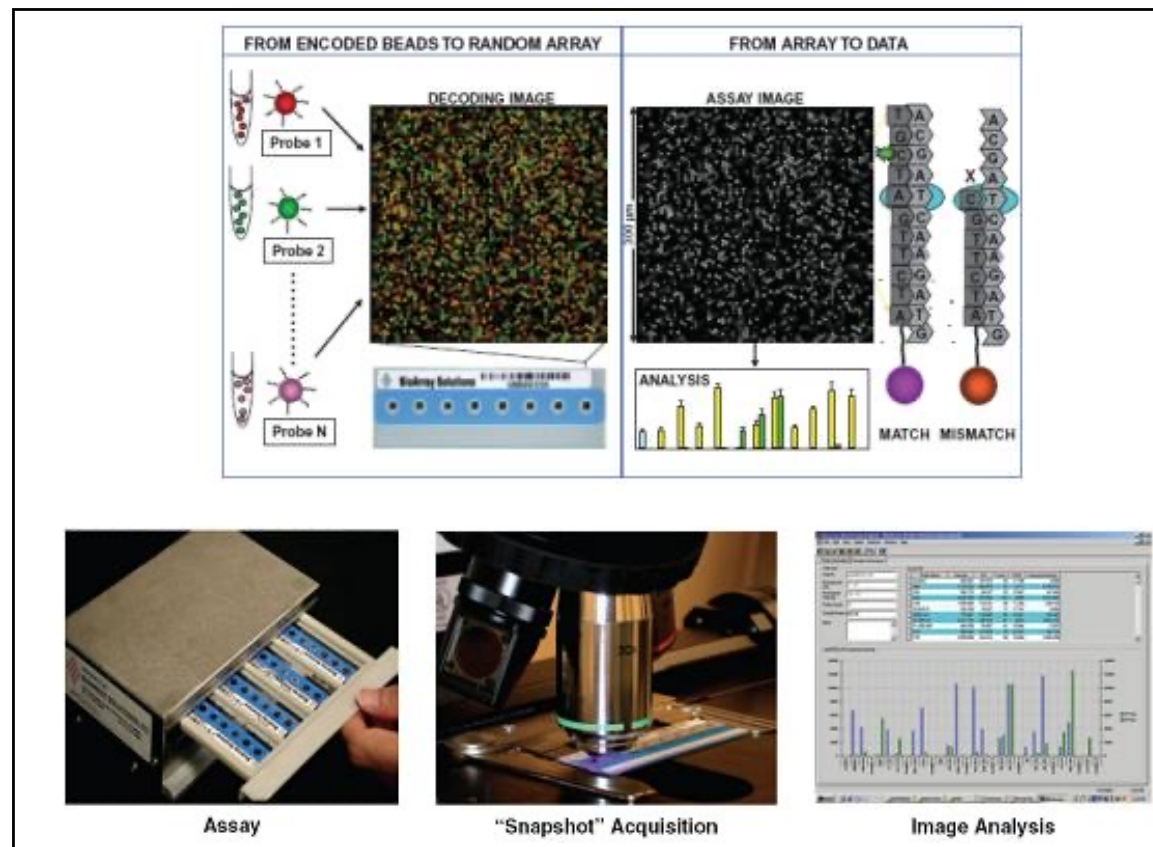


## ❖ BeadChip HEA™

- 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™

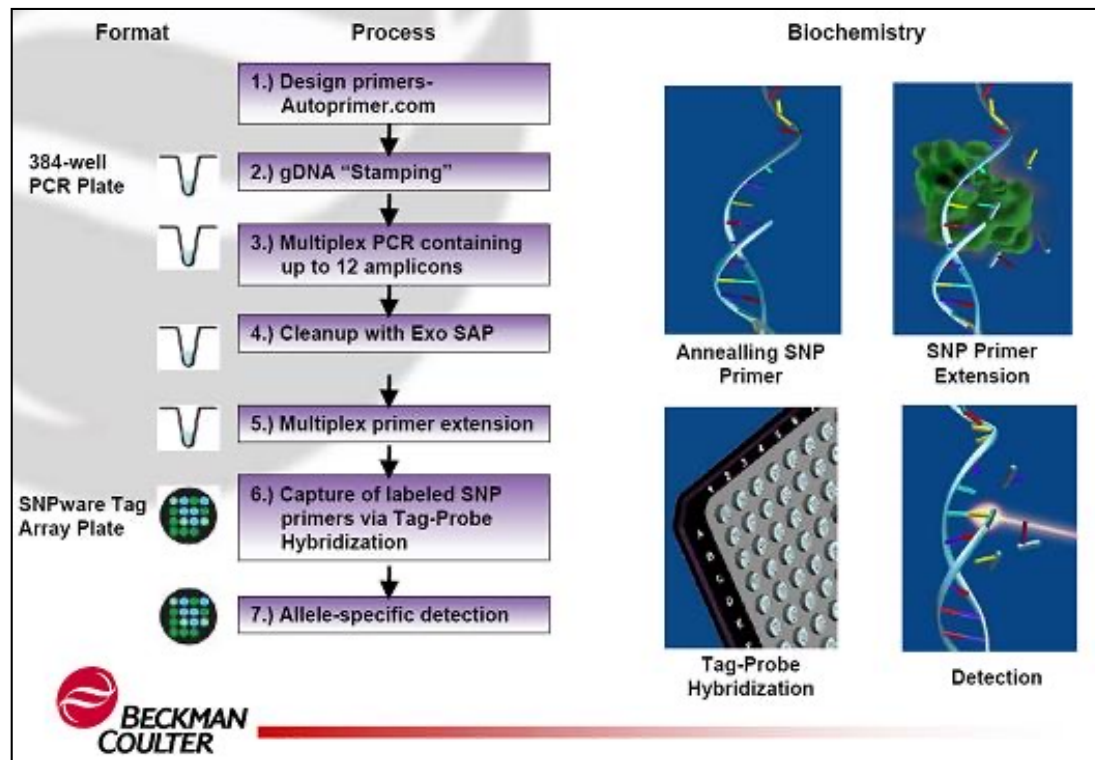
## ❖ GenomeLab™ SNPstream®

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

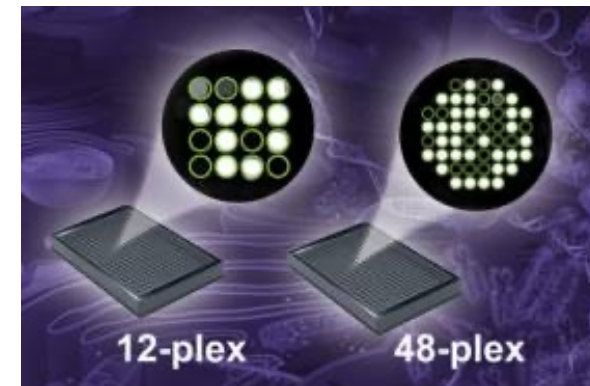
⇒ Mise en Place 2008 Donneurs « Réguliers »



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**



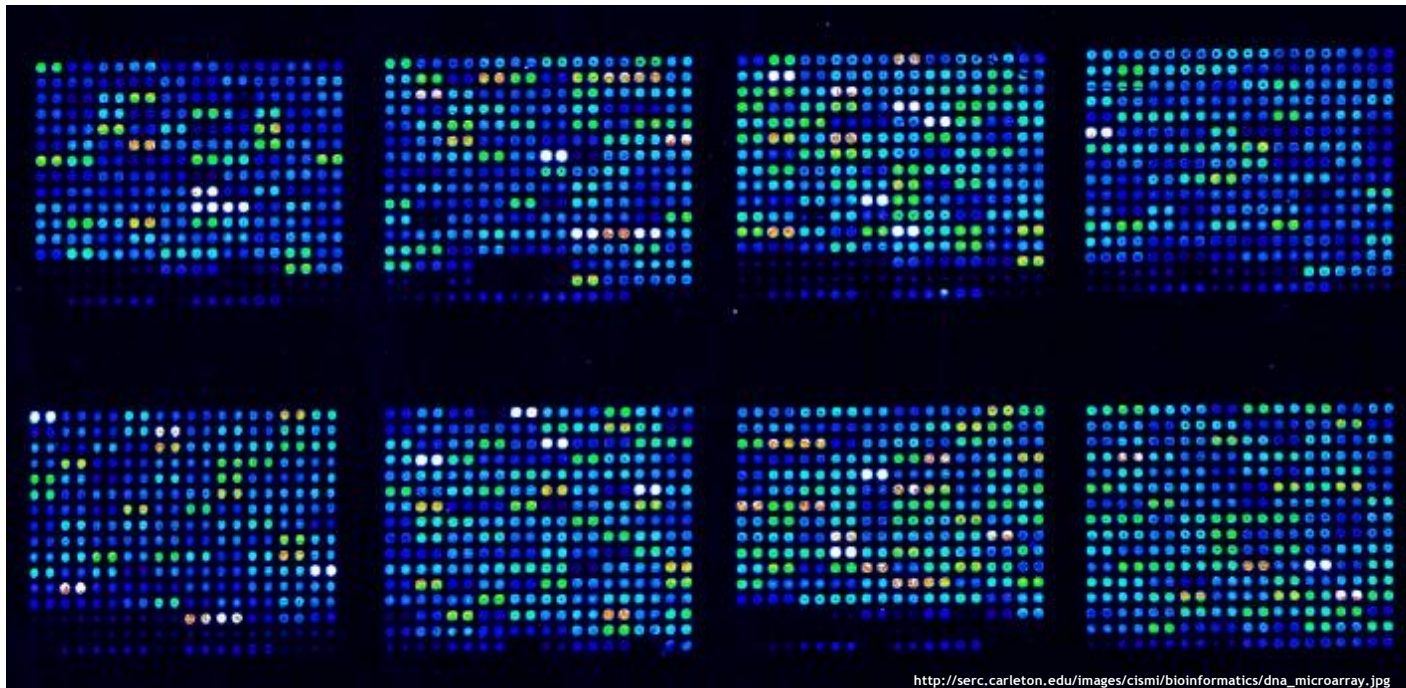
## Le Projet EFS Rhône-Alpes

- ✦ **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**

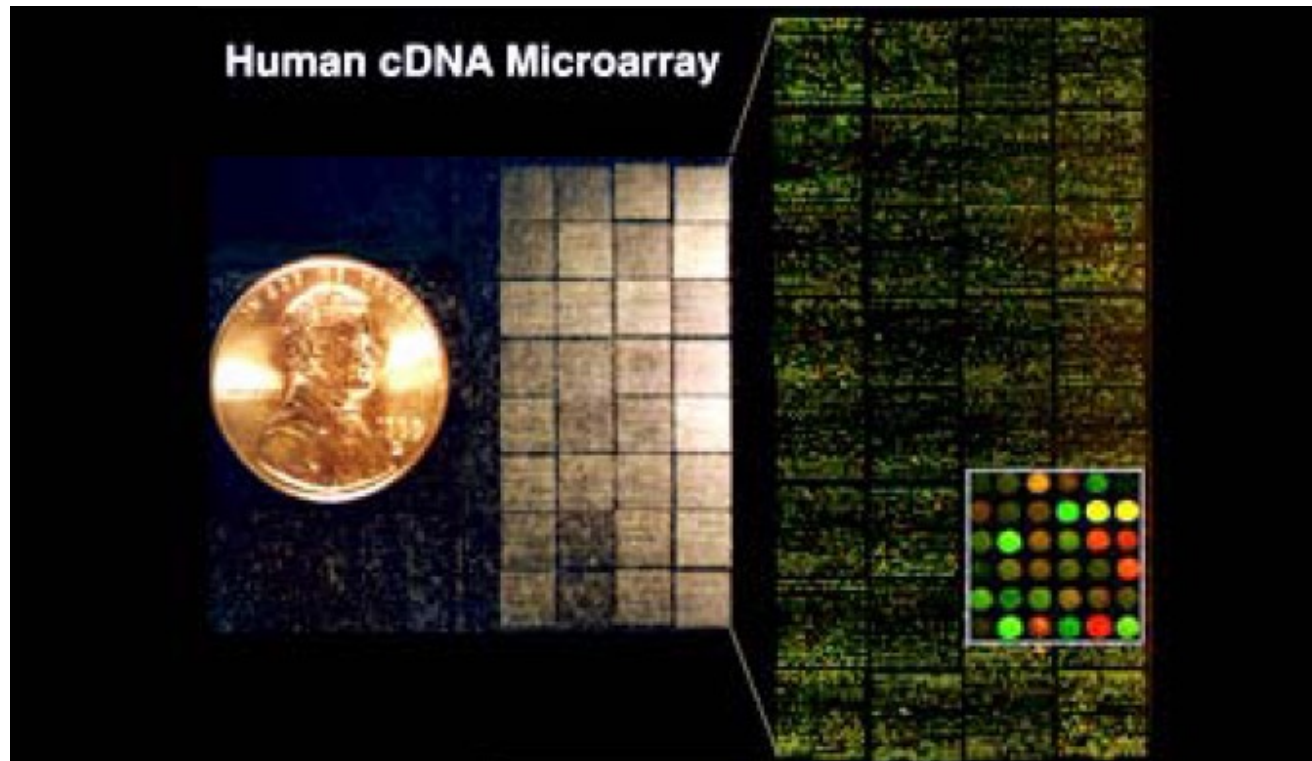


# Les Puces à ADN : Généralités

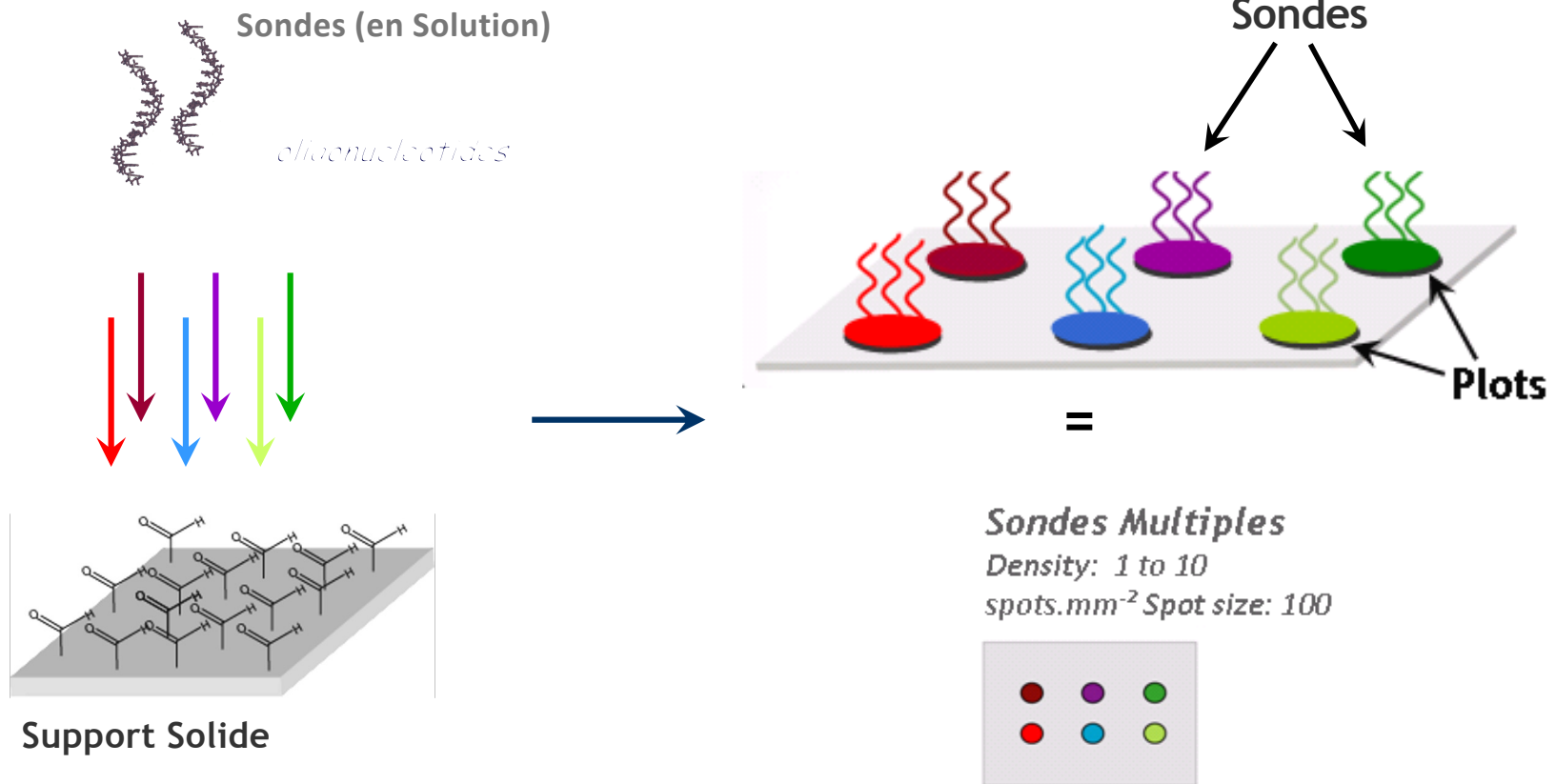


## ➤ Puce à ADN ou Biopuce

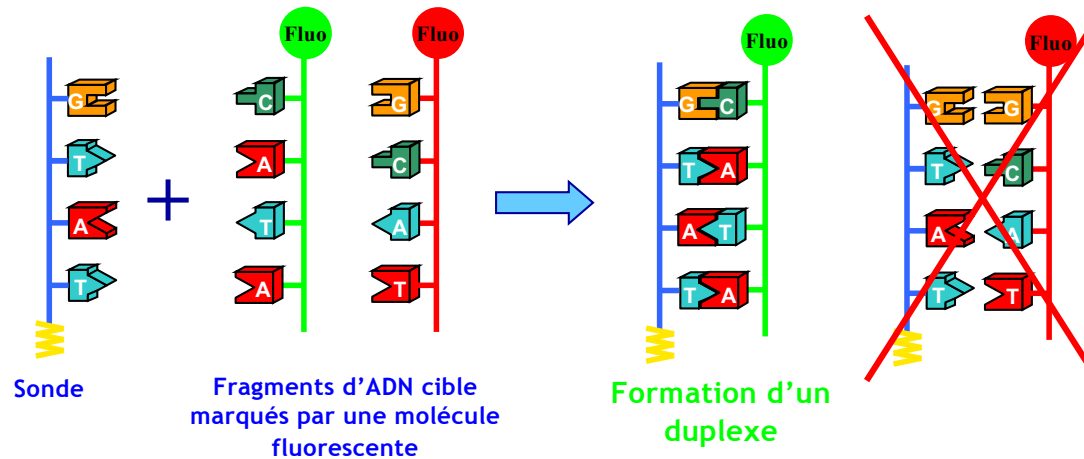
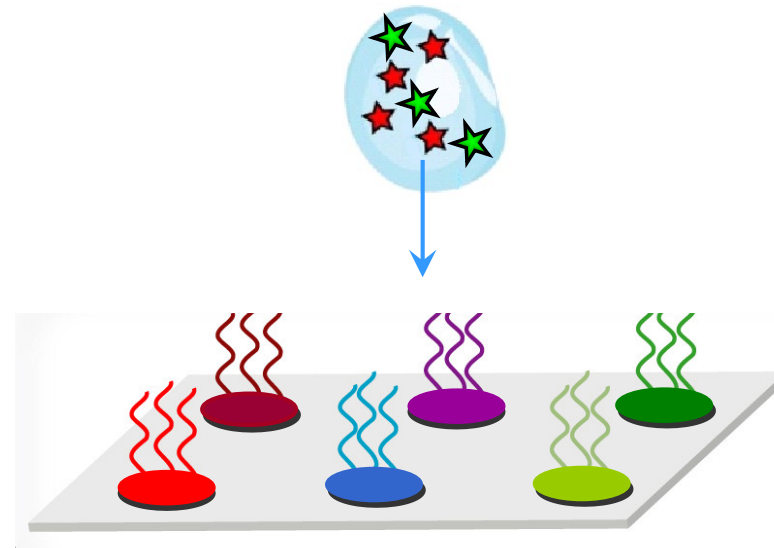
- Concept né en 1990
- Technologie Pluridisciplinaire
- Système Miniaturisé
- Permet Réalisation de Plusieurs Analyses en Parallèle
- Une Seule et Même Opération



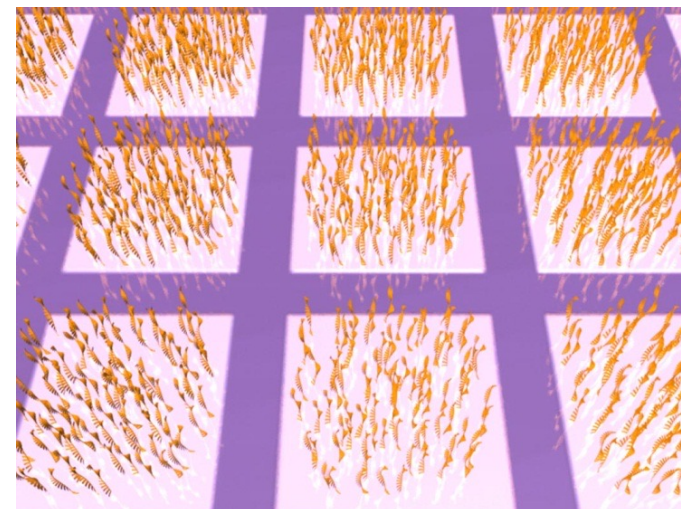
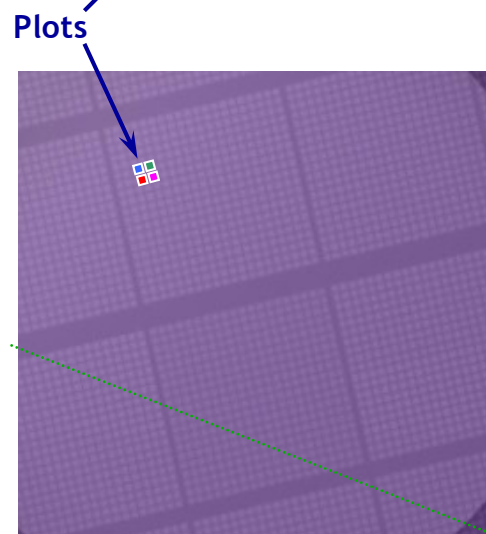
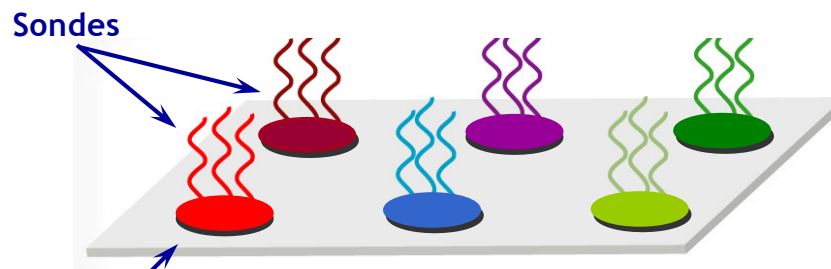
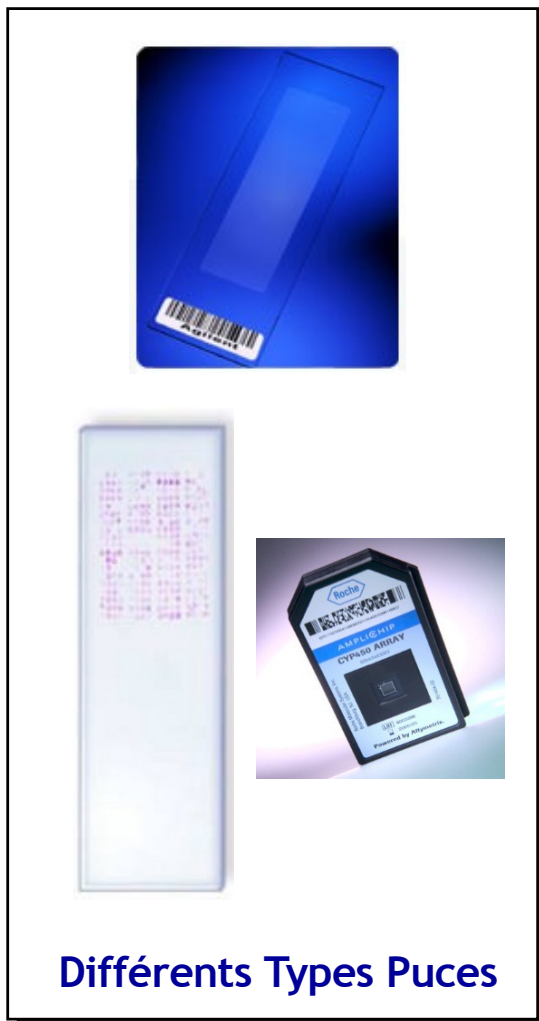
➔ Principe : Association 2 séquences complémentaires



➔ Principe : Association 2 séquences complémentaires



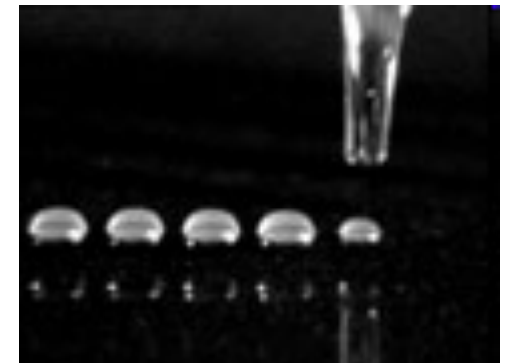
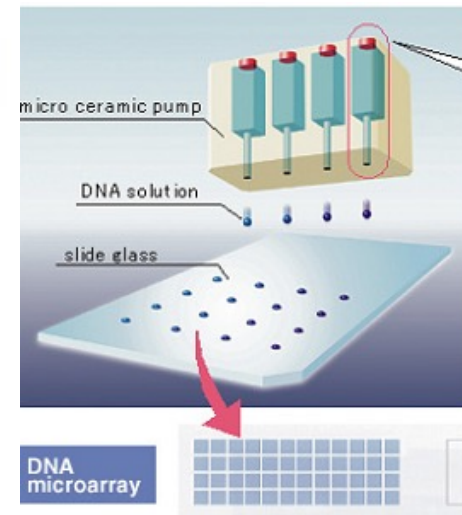




« Contact Printing »



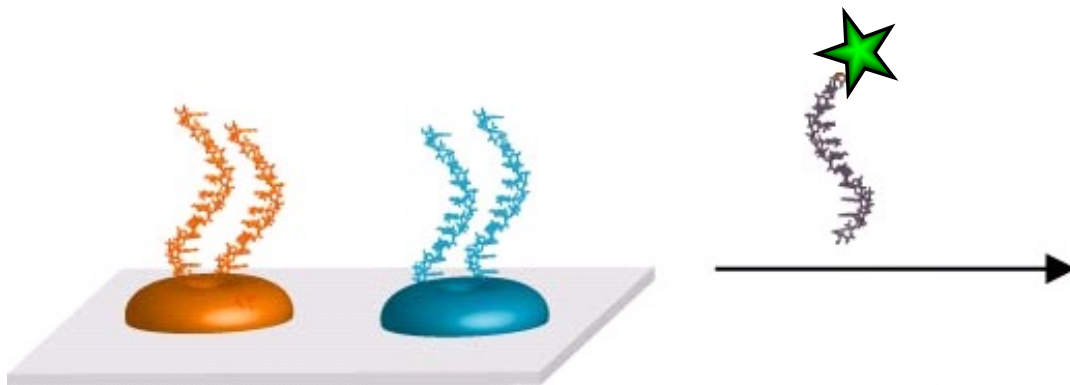
« Non Contact Printing »



## ➤ 1<sup>ère</sup> Étape : **PREPARATION ECHANTILLON**

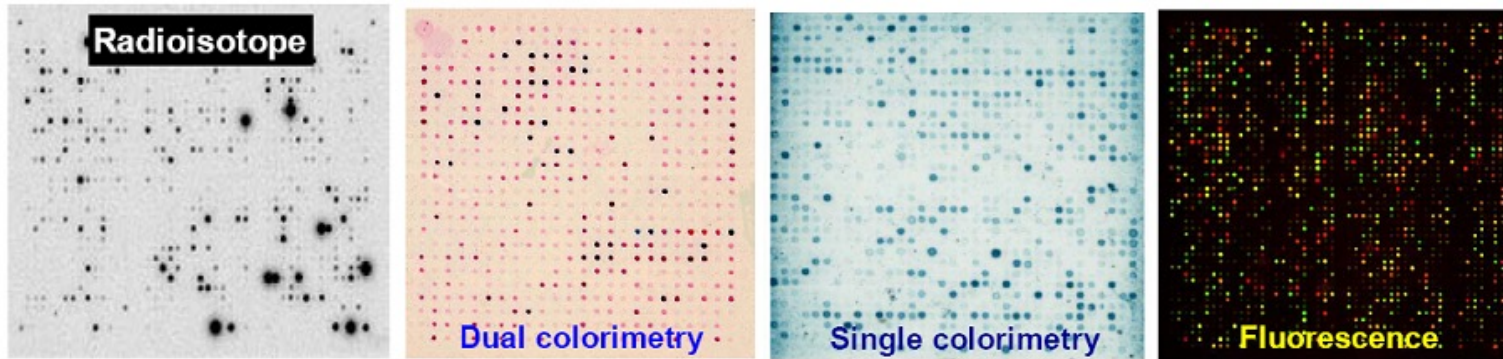
- Extraction ADN
- Amplification PCR
- Reverse-Transcriptase
- etc...

## ➤ 2<sup>ème</sup> Étape : **HYBRIDATION**

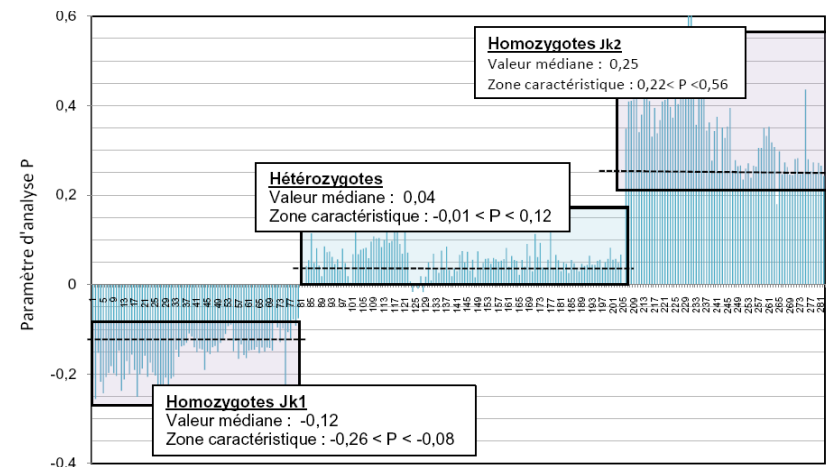
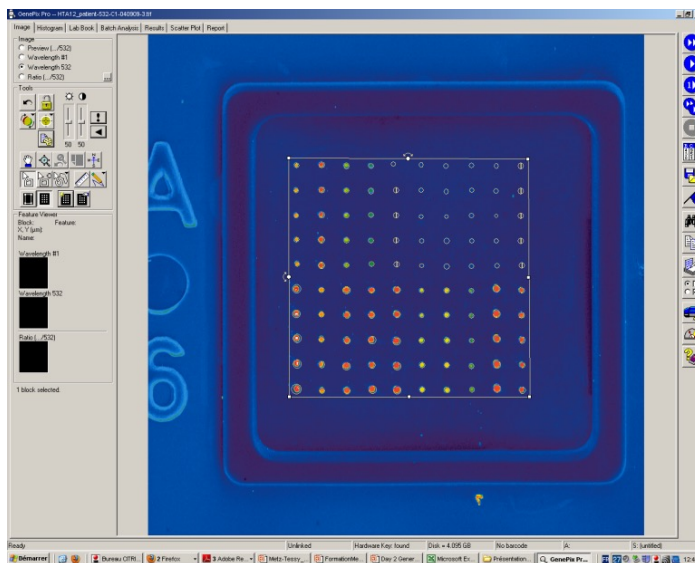




## ❖ 3<sup>eme</sup> Étape : DETECTION



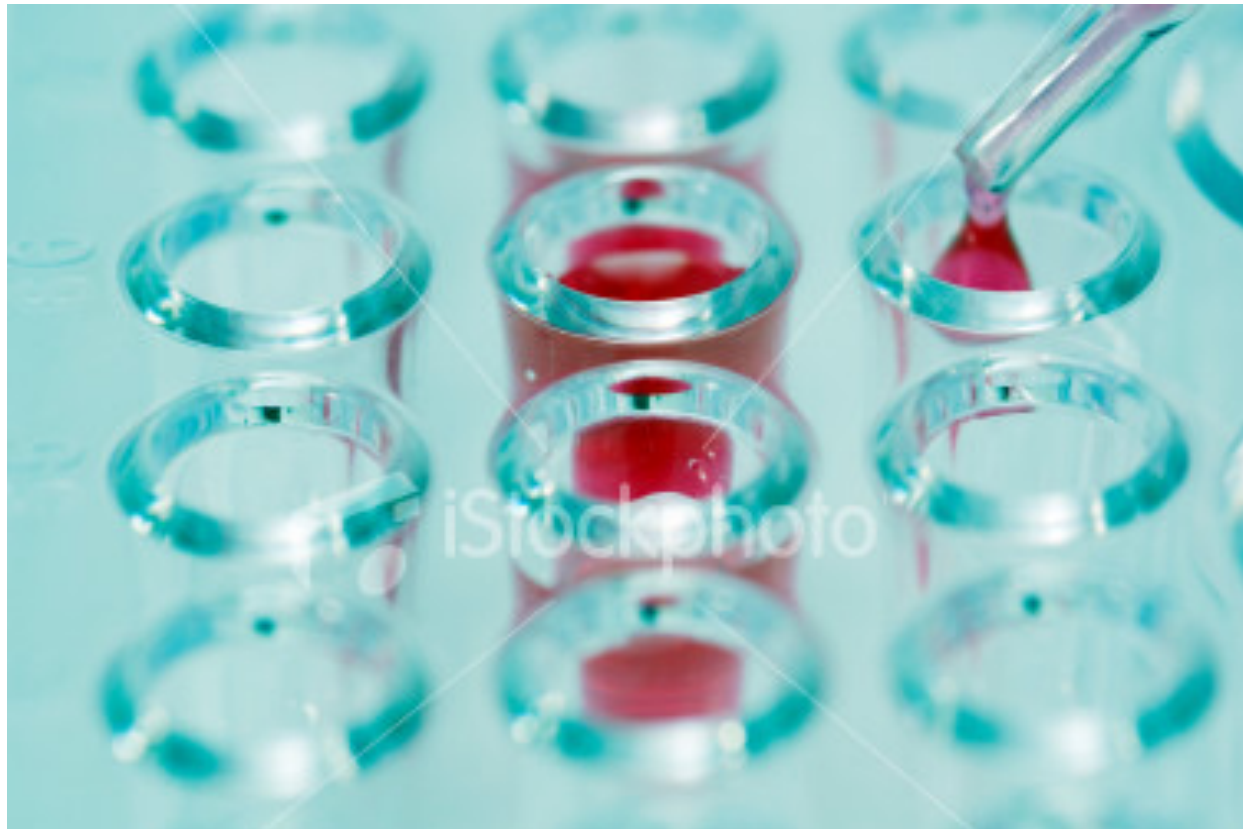
## ❖ 4<sup>eme</sup> Étape : TRAITEMENT DONNEES / ANALYSE





# Projet EFS Rhône-Alpes

## Développement de Puces à ADN pour le Génotypage Érythrocytaire

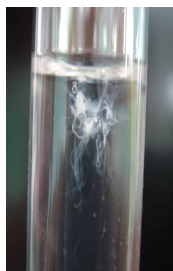


## ➤ Méthode :

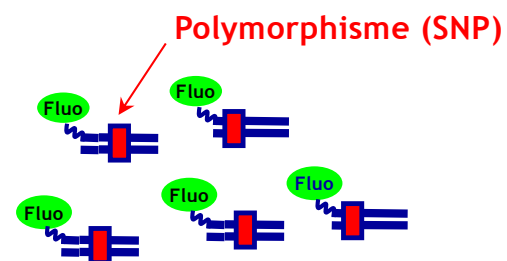
### 1- Préparation Cibles



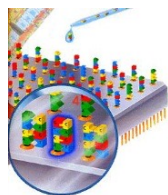
EXTRACTION  
ADN Génomique



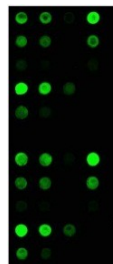
AMPLIFICATION  
PCR Multiplexe



### 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

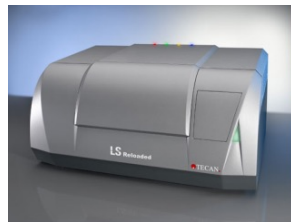
- Importance Clinique

- Systèmes Bialléliques

➤ Principe : Hybridation 2 Séquences Complémentaires

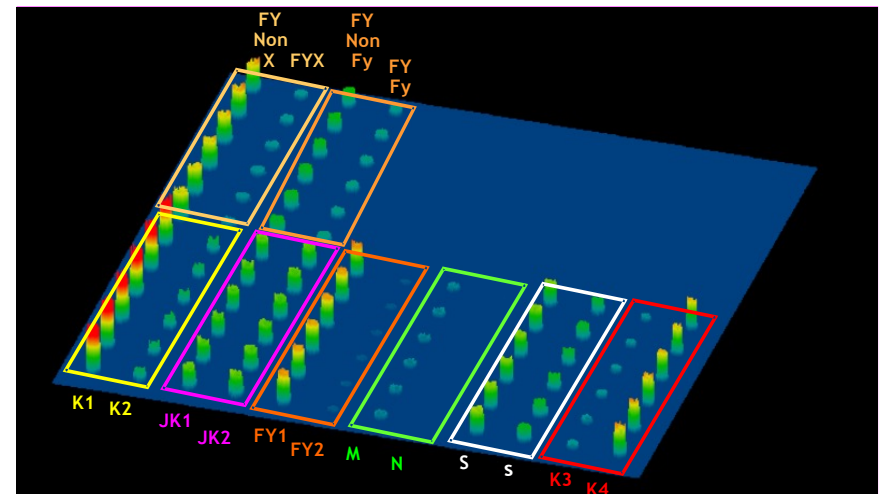
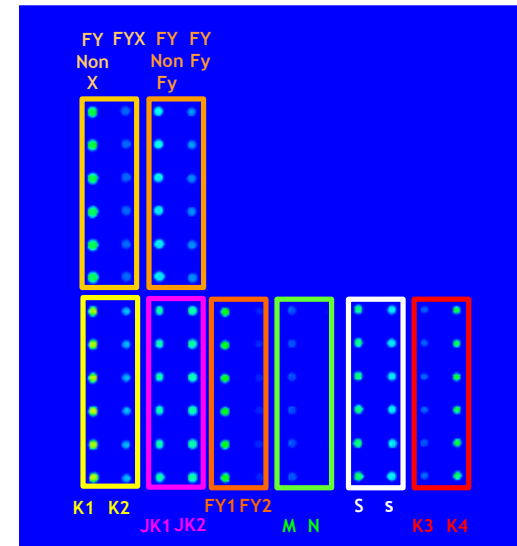
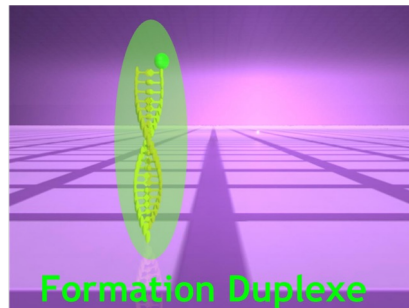


Puce à ADN Hybridée



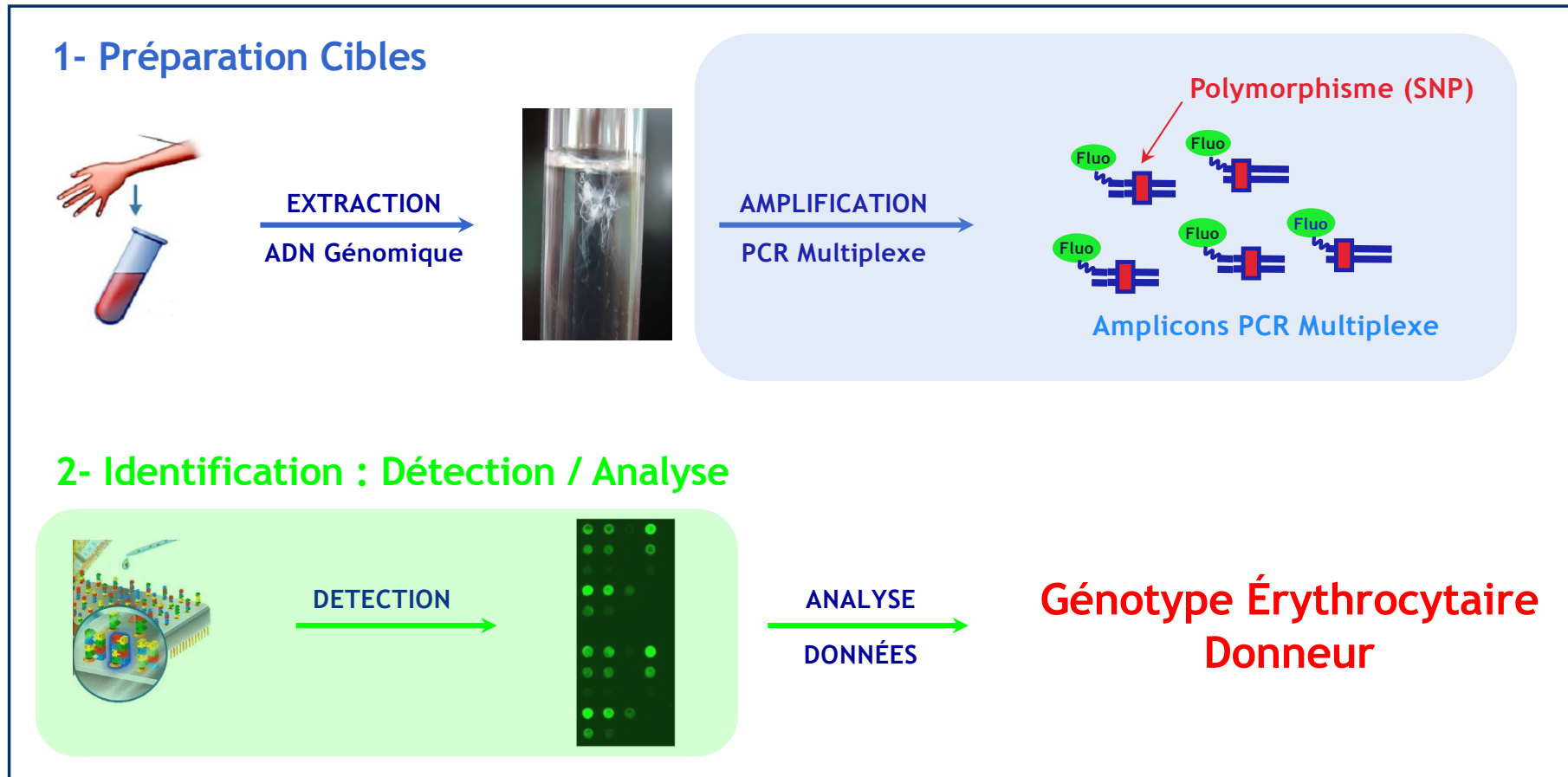
Scanner Fluorescence

Détection  
Cibles Hybridées



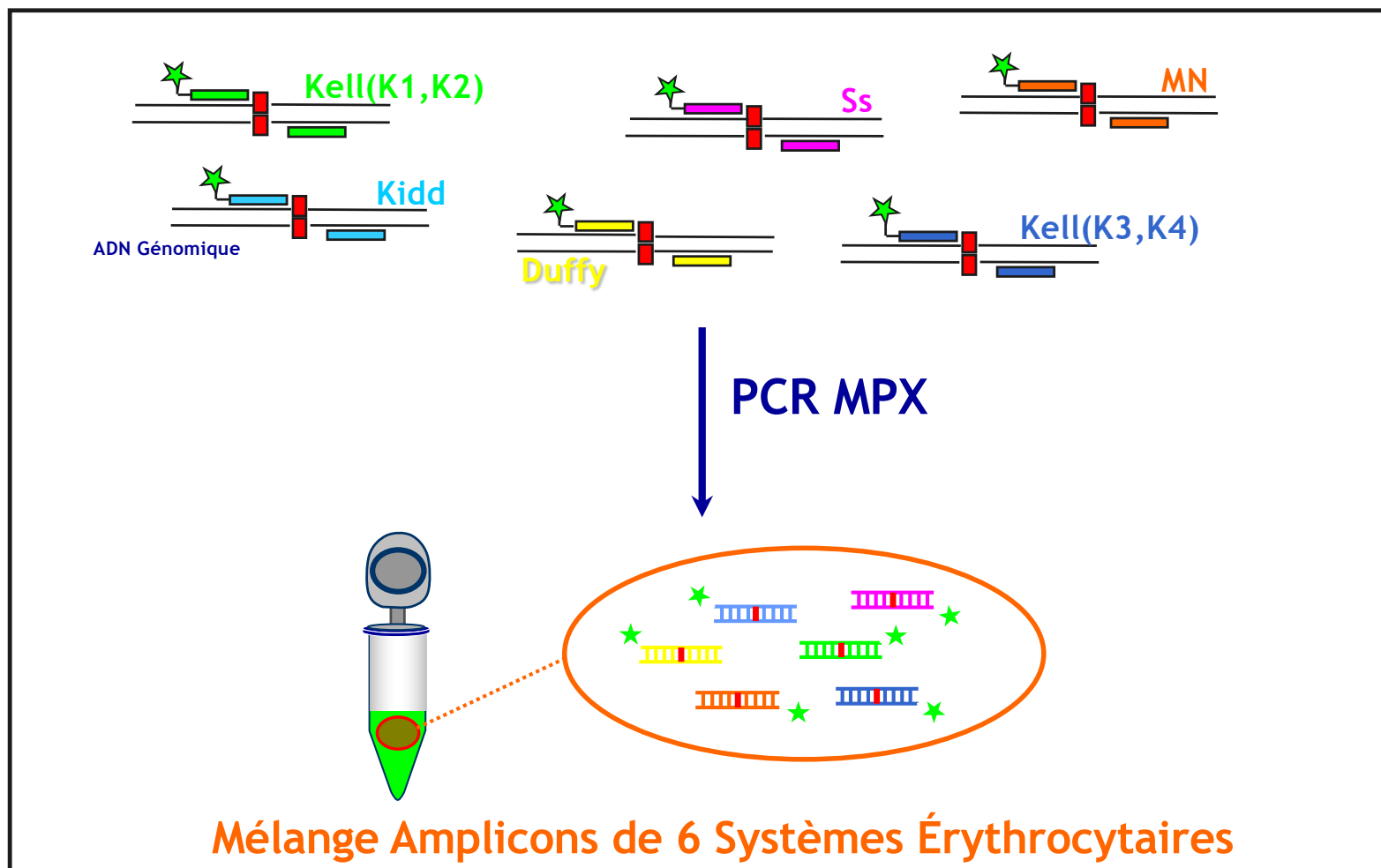


## ➤ Méthode :



➤ Développement / Optimisation Protocole :

- Conception Amorces
- Conditions Amplification



## OBJECTIFS

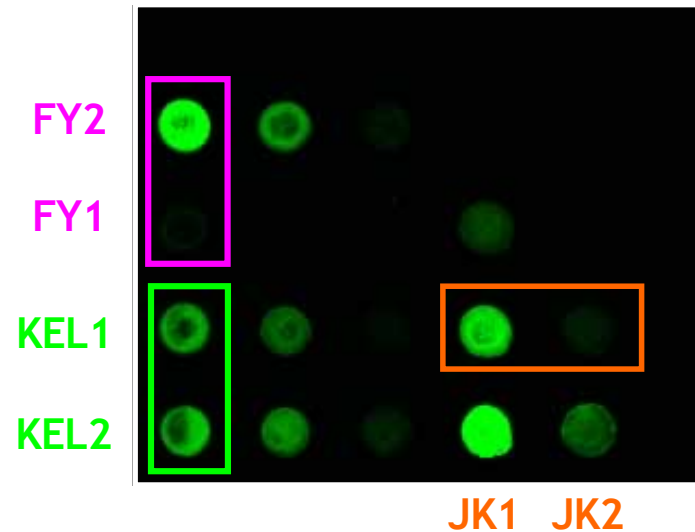
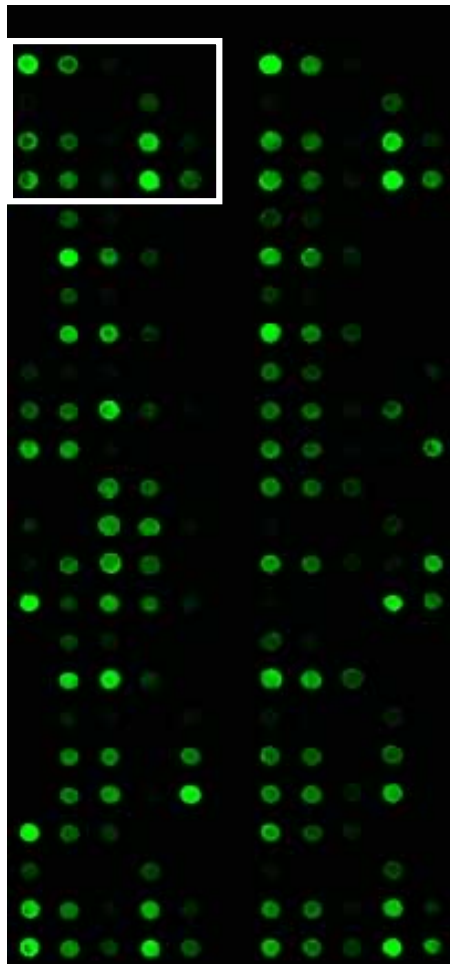
- ➔ Évaluation / Sélection Séquences (Sondes)
- ➔ Évaluation / Sélection Support

## COMMENT ?

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

- Détection Séquences Spécifiques
- Spécificité Hybridation
- Intensités Signaux Fluorescence

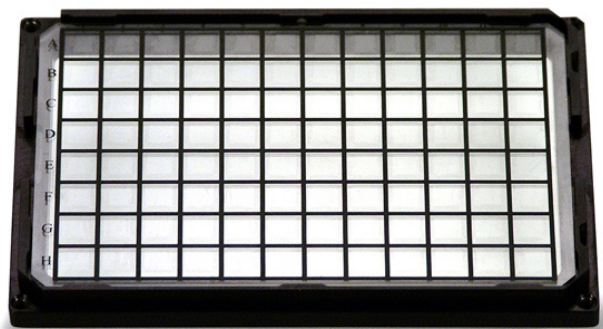
- Cibles : MPX PCR Amplicons, Phénotype Donneur **KEL: 1, 2** ; **JK: 1, -2** ; **FY: -1, 2**



**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

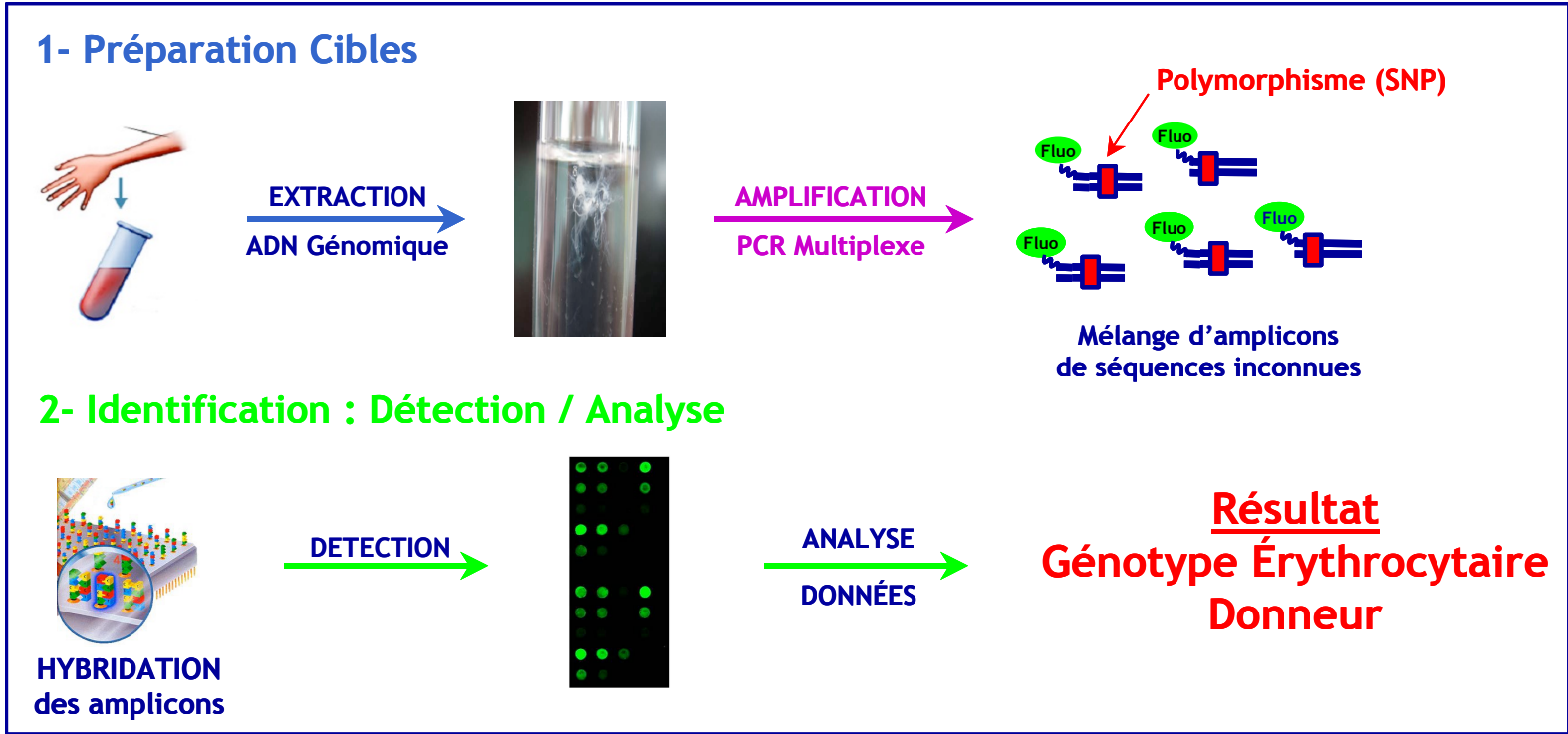
- Extraction ADN génomique MagNa Pure LC (Roche Diagnostics)
- Amplification PCR Multiplexe

✦ Puces à ADN

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



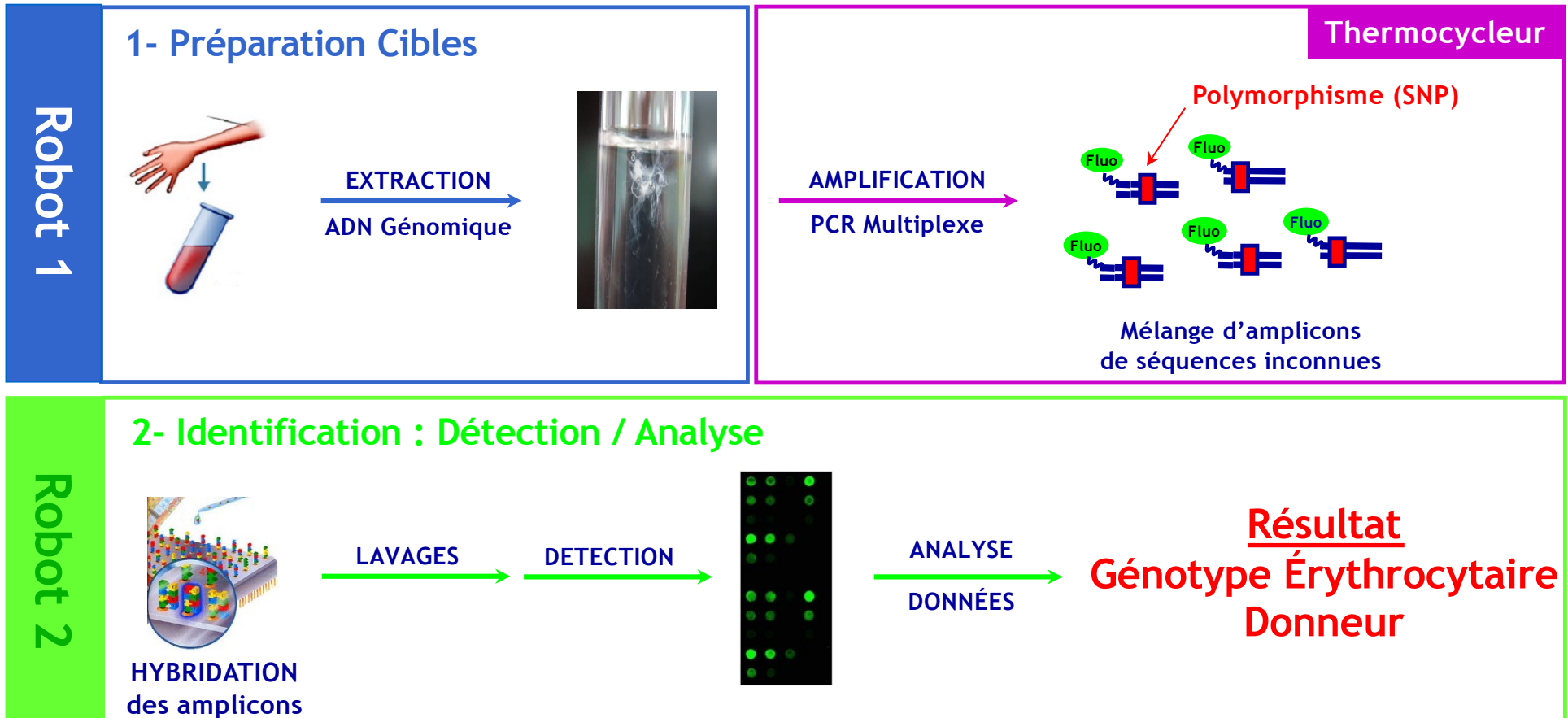
Système	Antigènes	Résultats Concordants	Résultats Discordants	Phénotype	Génotype
Kell	KEL1 / KEL2	1080	0		
	KEL3 / KEL4	1080	0		
Kidd	JK1 / JK2	1079	1	JK:-1,2	JK*1/*2 Génotype Confirmé**
Duffy	FY1 / FY2	1078	2	FY:1,-2	FY*1/*2 6 FY*1/*X * ➡ 4 FY:1,2
MNS	MNS1 / MNS2	1076	5	MNS:1,2	4 MNS*1/*1 et MNS*2/*2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

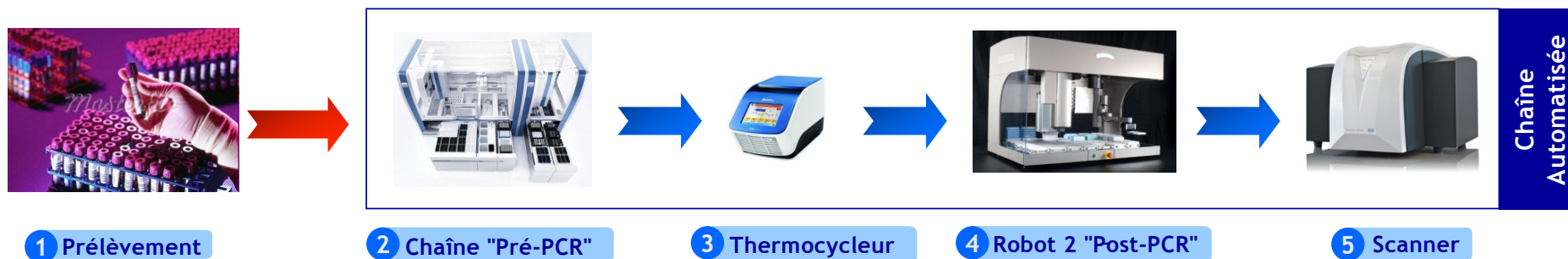
\* SNaPshot (Applied Biosystems), \*\* Gen-Probe, BioArray Solutions (Immucor) - EFS Alpes-Méditerranée

➡ 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**



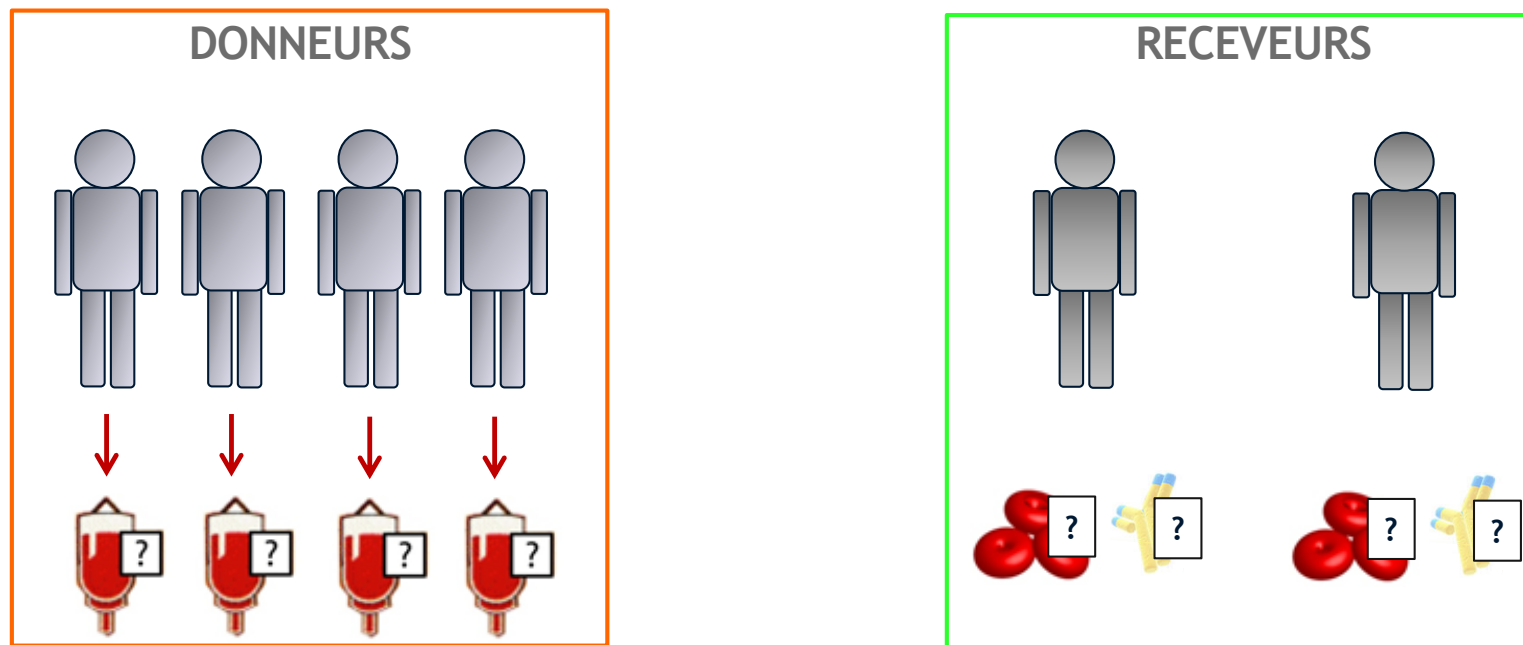


# Chaîne Automatisée Bilan

- ✦ 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



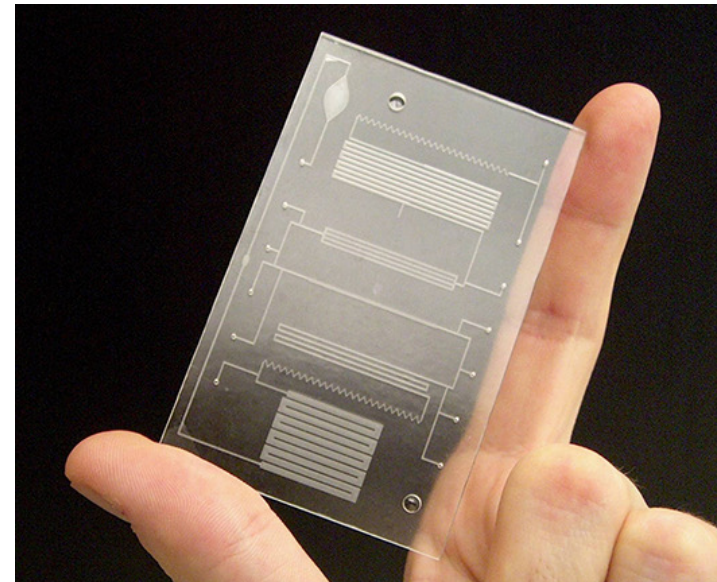
**Accroître Sécurité transfusionnelle**

**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](mailto:jean-charles.bres@efs.sante.fr)**

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