



NOUVELLE APPROCHE POUR LA DÉTERMINATION DE GROUPE SANGUIN : TEST VISUEL RAPIDE POUR LE GÉNOTYPAGE ÉRYTHROCYTAIRE

Jean-Charles BRÈS

DÉTERMINATION DES GROUPES SANGUINS

HEMAGGLUTINATION = TECHNIQUE SEROLOGIQUE



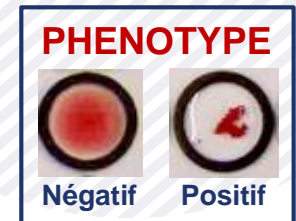
LES AVANTAGES

- ➔ Simple, facilité réalisation
- ➔ Faible coût
- ➔ Rapport sensibilité/spécificité adapté à la plupart des situations cliniques



LES LIMITATIONS

- ➔ Test monoparamétrique
- ➔ Anticorps monoclonaux performants
- ➔ Absence réactifs pour certains Ag
- ➔ **Détermination impossible**
 - Situations cliniques (Patients immunisés, transfusés chroniques..)
 - Ag faiblement exprimés
- ➔ **Complexification prise en charge transfusionnelle**



Vers le Génotypage érythrocytaire

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DES GROUPES SANGUINS

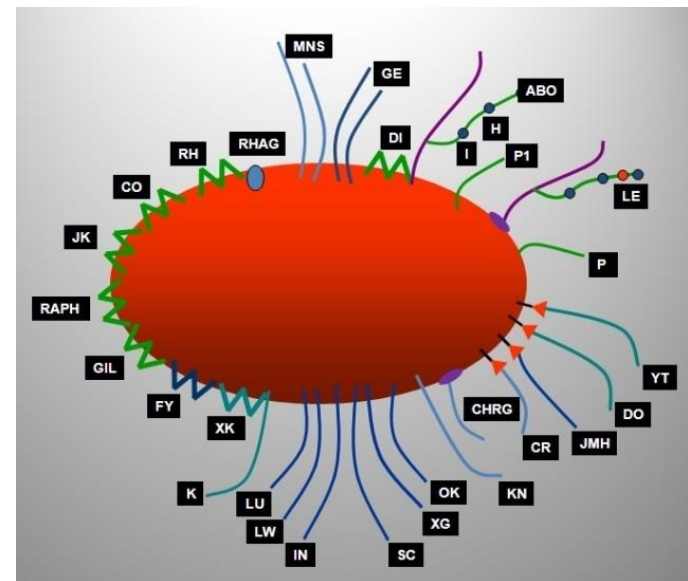
BIOLOGIE MOLÉCULAIRE EN IHE

- Exploration groupes sanguins érythrocytaires : ~300 Ag / 35 Systèmes
- Majorité des Ag résultent Polymorphisme Nucléotidique Simple = 1 SNP
- Indiquée lorsque la sécurité transfusionnelle l'exige

Tableau I. Polymorphismes nucléotidiques simples associés aux principaux antigènes érythrocytaires.

Système	Gène	Antigène	SNP*	Changement d'acide aminé**
ABO	<i>ABO</i>	A/B	526C>G, 703G>A, 796C>A, 803G>C	R176G, G235S, L266M, G288A
MNS	<i>GYP A</i>	MNS1/MNS2	59C>T, 71G>A, 72T>G	S1L***, G5E***
	<i>GYP B</i>	MNS3/MNS4	143T>C	M29T***
RH	<i>RHCE</i>	RH2/RH4	48C>G, 178A>C, 203G>A, 307T>C	C16W, I60L, S68N, S103P
		RH3/RH5	676C>G	P226A
LU	<i>LU</i>	LU1/LJ2	230A>G	H77R
		LU18/LU19	1615A>G	T539A
KEL	<i>KEL</i>	KEL1/KEL2	698T>C	M193T
		KEL3/KEL4	961T>C	W281R
		KEL5/KEL6	1910C>T	P597L
FY	<i>FY</i>	FY1/FY2	125G>A	G42D
		FY2/FY	-33T>C	non codant
JK	<i>SLC14A1</i>	JK1/JK2	838G>A	D290N
DI	<i>SLC4A1</i>	DI1/DI2	2561T>C	L854P
YT	<i>ACHE</i>	YT1/YT2	1057C>A	H353N
SC	<i>ERMAP</i>	SC1/SC2	169G>A	G57R
DO	<i>DO</i>	DO1/DO2	793A>G	N265D
CO	<i>AQP1</i>	CO1/CO2	134C>T	A45V
LW	<i>ICAM4</i>	LW5/LW7	308A>G	Q70R***
CROM	<i>DAF</i>	CHROM2/CHROM3	155G>T	R18L**
		KN1/KN2	4608G>A	V1561M
KN	<i>CR1</i>	KN3/KN6	4795A>G	K1590E
		KN4/KN7	4828A>G	R1601G
		IN1/IN2	252C>G	P46R

*Numéroté à partir du premier nucléotide du codon d'initiation de la traduction ; ** Numéroté à partir de la méthionine d'initiation de la traduction ou *** numéroté à partir du premier acide aminé de la protéine mature. Les différents SNP sont documentés en détails sur le site Blood Group AnNCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/home>



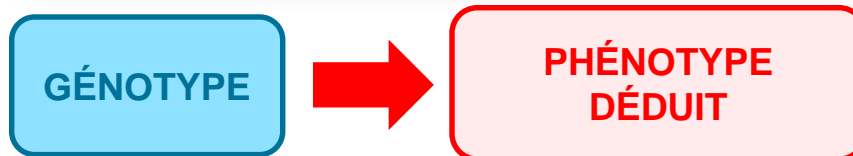
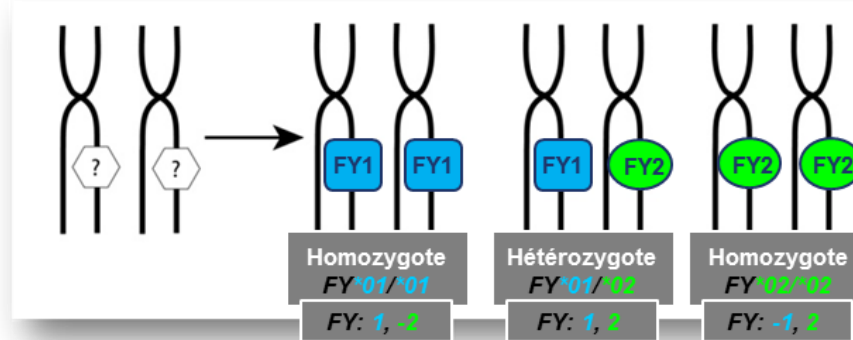
BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DES GROUPES SANGUINS

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE EN IHE

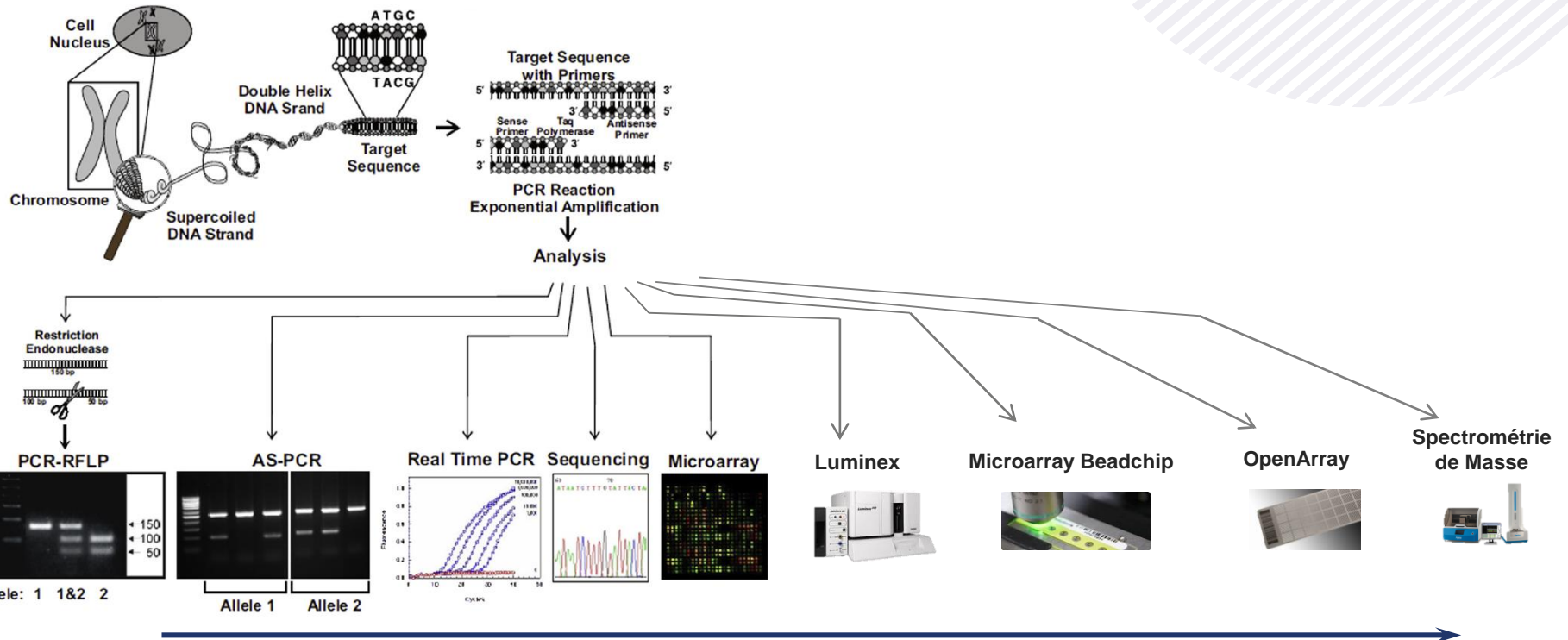
- Exploration groupes sanguins érythrocytaires : ~300 Ag / 35 Systèmes
- Majorité des Ag résultent Polymorphisme Nucléotidique Simple = 1 SNP
- Indiquée lorsque la sécurité transfusionnelle l'exige

Système FY

```
1801 TCAAGTCAGC TGGACTTCGA AGATGTATGG AATTCTTCCT ATGGTGTGAA
1851 TGATTCCTTC CCAGATGGAG ACTATGATGC CAACCTGGAA GCAGCTGCC
      FY*01
      A FY*02
1901 CCTGCCACTC CTGTAACCTG CTGGATGACT CTGCACTGCC CTTCTTCATC
1951 CTCACCAGTG TCCTGGGTAT CCTAGCTAGC AGCACTGTCC TCTTCATGCT
```



TECHNIQUES DE GÉNOTYPAGE APPLICATION AUX GROUPES SANGUINS



- **Augmentation Nbre SNPs : Monoplexe ➡ Multiplexe**
- **Augmentation Débit/Nbre Analyses : Manuel ➡ Automatisation**

TECHNIQUES DE GÉNOTYPAGE APPLICATION AUX GROUPES SANGUINS

TESTS COMMERCIAUX GÉNOTYPAGE ÉRYTHROCYTAIRE

- Precise Type™ HEA (Immucor, USA) 
- BloodChip® (Grifols - Progenika Biopharma SA, Espagne) 

➔ Coûts Élevés

➔ Protocole Complexe

➔ Incompatibles Analyses Ponctuelles, Situations Urgence



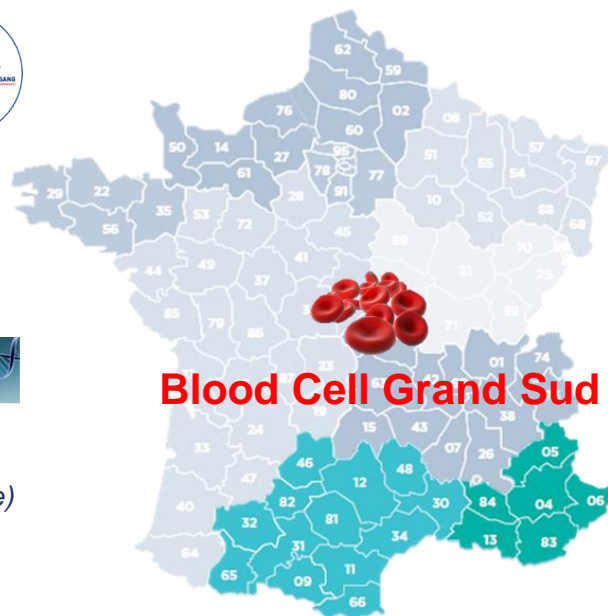
Proposer un Test Visuel Rapide et de Faible Coût



PATIENTS

BLOOD CELL GRAND SUD (2013)

REGROUPEMENT DES EXPERTISES (EFS Occitanie / EFS PACA-Corse)



Microsystèmes



Biologie Moléculaire



Chimie

EFS Occitanie

Dr F. Roubinet (*Dir. EFS-Occitanie*)

Dr J.C. Brès (*MdR, Coordinateur*)

J. Gomez-Martinez (*IE*)

Dr C. Fournier-Wirth (*DS*)



Biologie Moléculaire





Immuno-Hématologie

EFS PACA-Corse

Pr J. Chiaroni (*Dir. EFS-PACA-Corse*)

Dr P. Bailly (*DR, resp. BCGS*)

Dr M. Silvy (*MdR*)

- ➔ Développement Outils Innovants
- ➔ Dans le Domaine de l'Immuno-Hématologie 
- ➔ Répondent aux Besoins Laboratoires de Biologie de l'EFS
- ➔ Plus particulièrement aux Laboratoires d'IHR 

ID-BLOOD : TEST DE GÉNOTYPAGE VISUEL RAPIDE

LE PROJET ID-BLOOD

Partenaire : P. Bailly, M. Silvy, J. Chiaroni (EFS PACA-Corse, Marseille)



➔ DÉVELOPPEMENT PROTOTYPE TEST VISUEL RAPIDE (labo. IHR, Patient)

➔ OBTENTION RAPIDE GENOTYPE ERYTHROCYTAIRE

➔ TECHNOLOGIES « CLASSIQUES » FONT DÉFAUT :

- Hématies sensibilisées par des Ig
- Transfusions récentes
- Réactions faibles ou ambiguës
- Urgence transfusionnelle

➔ OPTIMISATION SÉCURITÉ TRANSFUSIONNELLE

- Prévention allo-immunisation anti-érythrocytaire
- Limiter risques d'incident transfusionnel



Financements

- Chercheur(se)s d'Avenir 2013 – Région Occitanie Pyrénées-Méditerranée

- APR EFS 2014

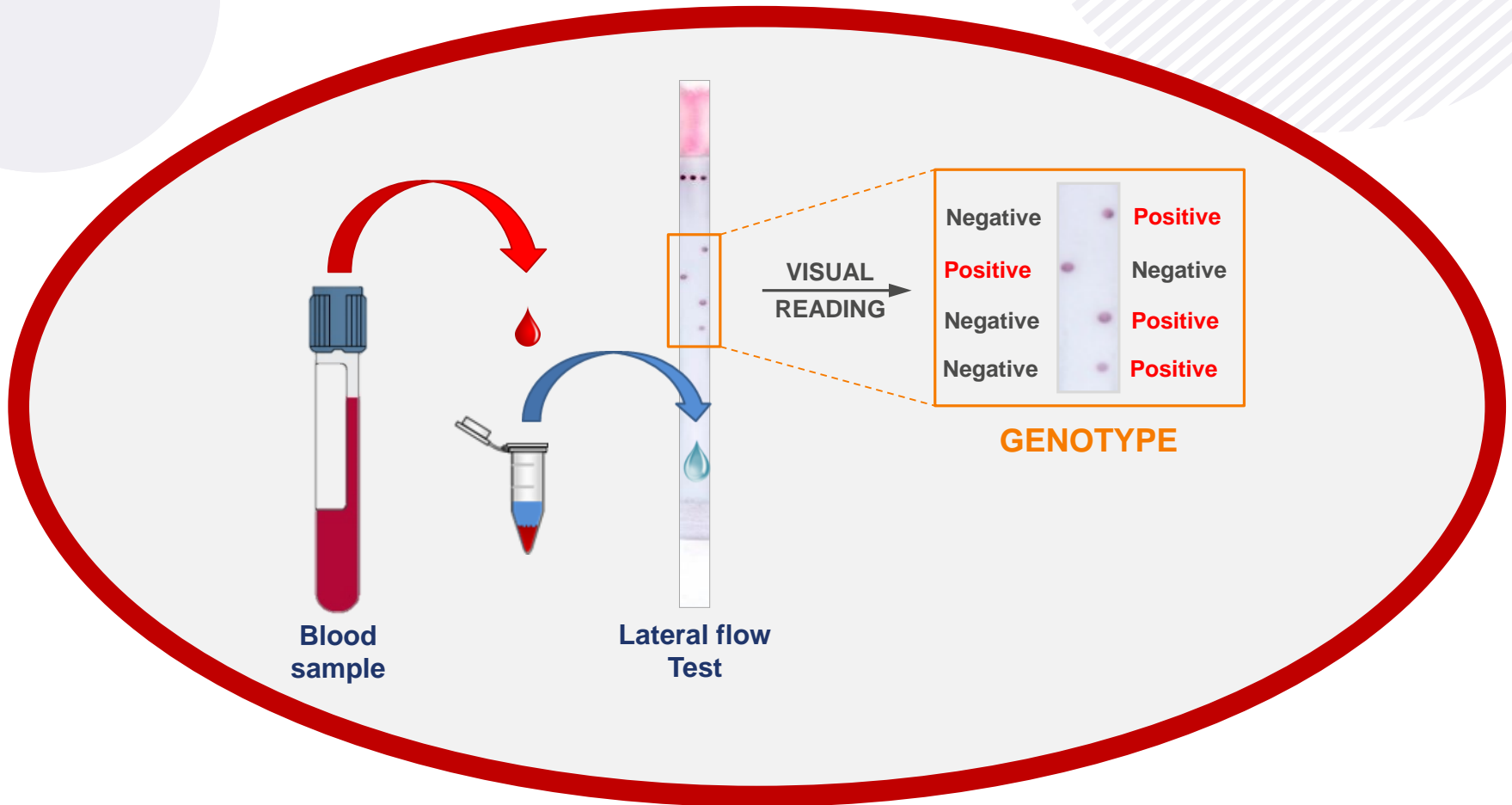


Valorisation

- Dépôt Demande Internationale PCT/FR2016/052272 le 09/09/2015
« Procédé et dispositif pour le génotypage de SNP »



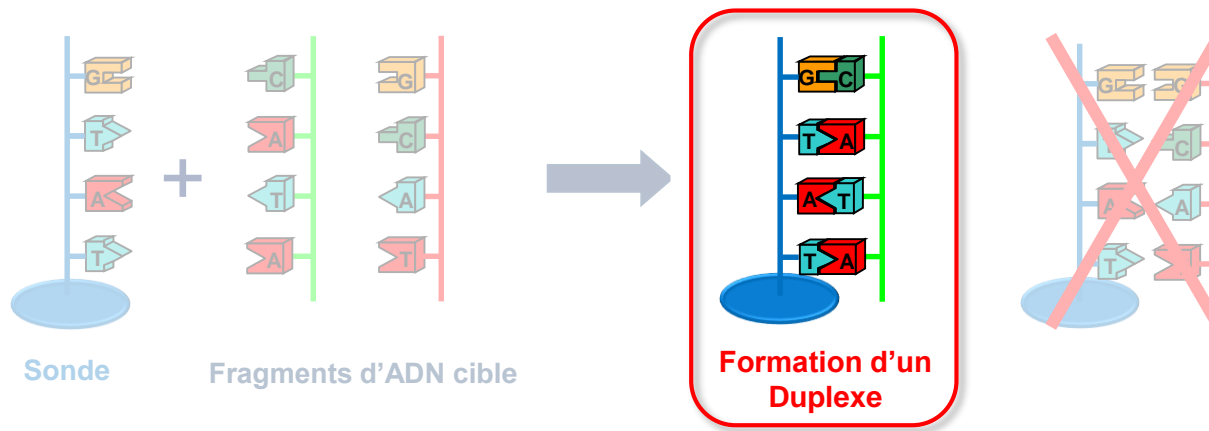
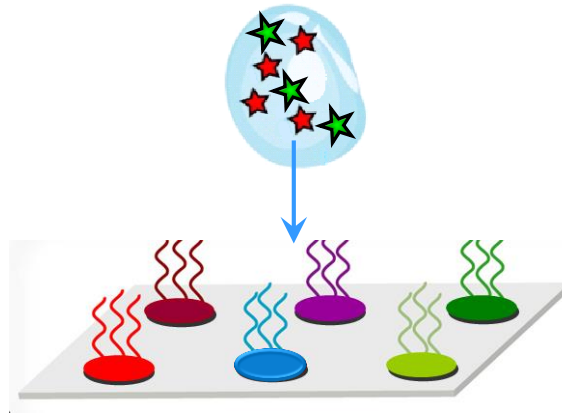
ID-BLOOD : TEST DE GÉNOTYPAGE VISUEL RAPIDE



ID-BLOOD : TEST DE GÉNOTYPAGE VISUEL RAPIDE

PRINCIPE DU TEST

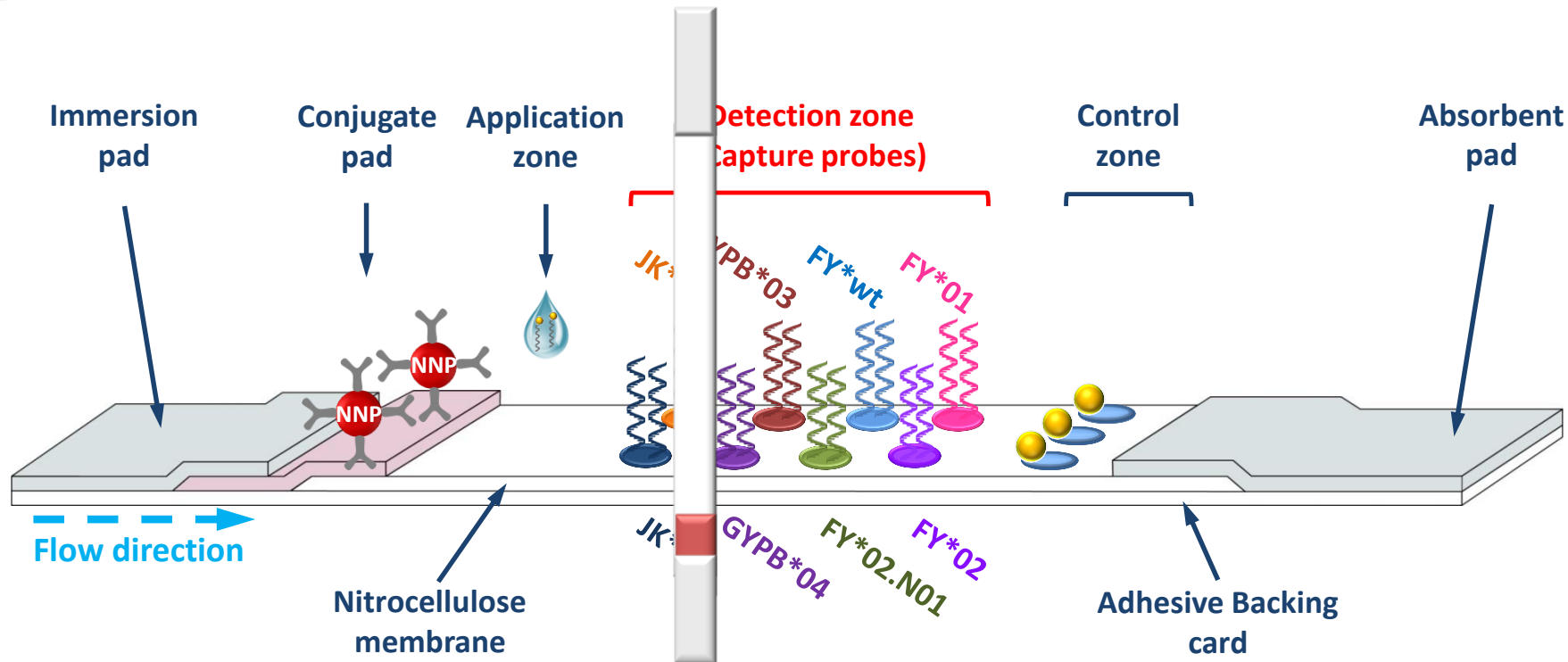
➔ Hybridation / Association 2 séquences ADN complémentaires



ID-BLOOD : TEST DE GÉNOTYPAGE VISUEL RAPIDE

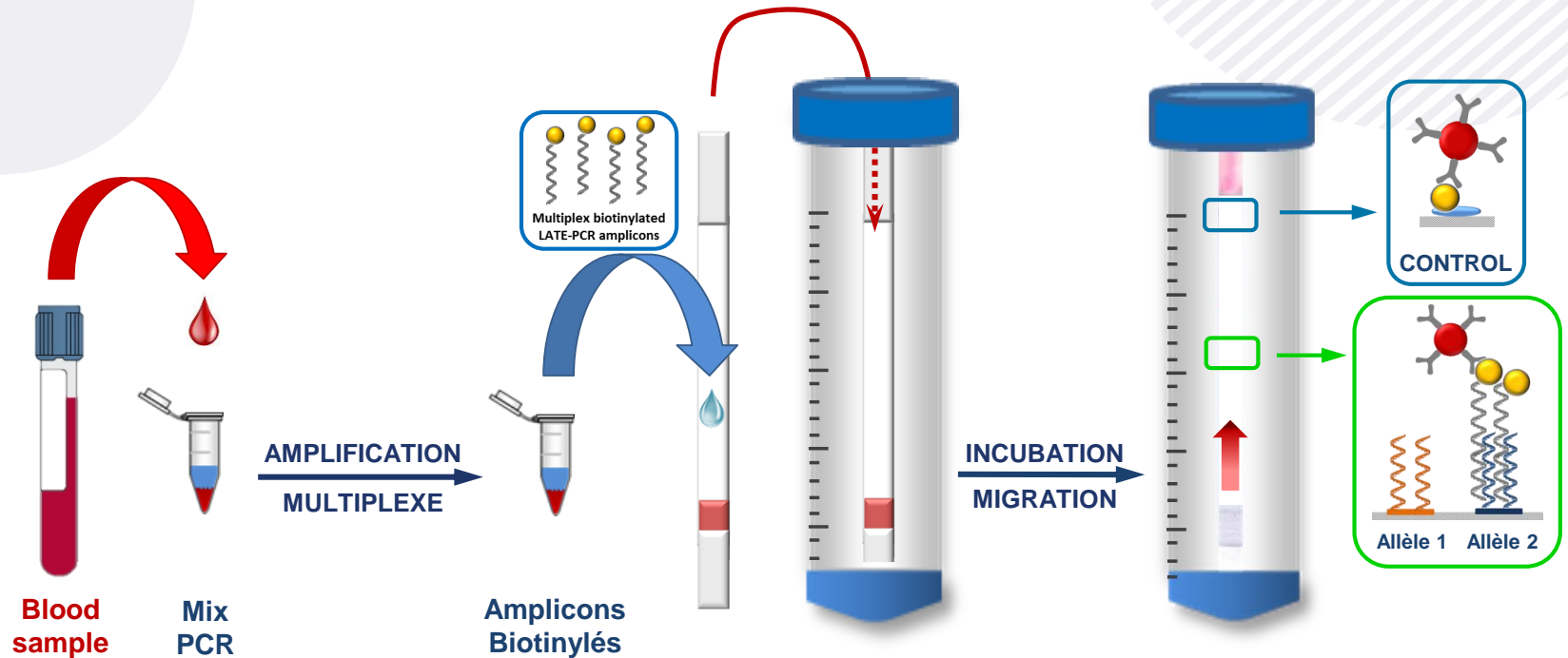
PRINCIPE DU TEST

- ➔ Hybridation / Association 2 séquences ADN complémentaires
- ➔ Utilisation Bandelette « Prête à l'emploi »



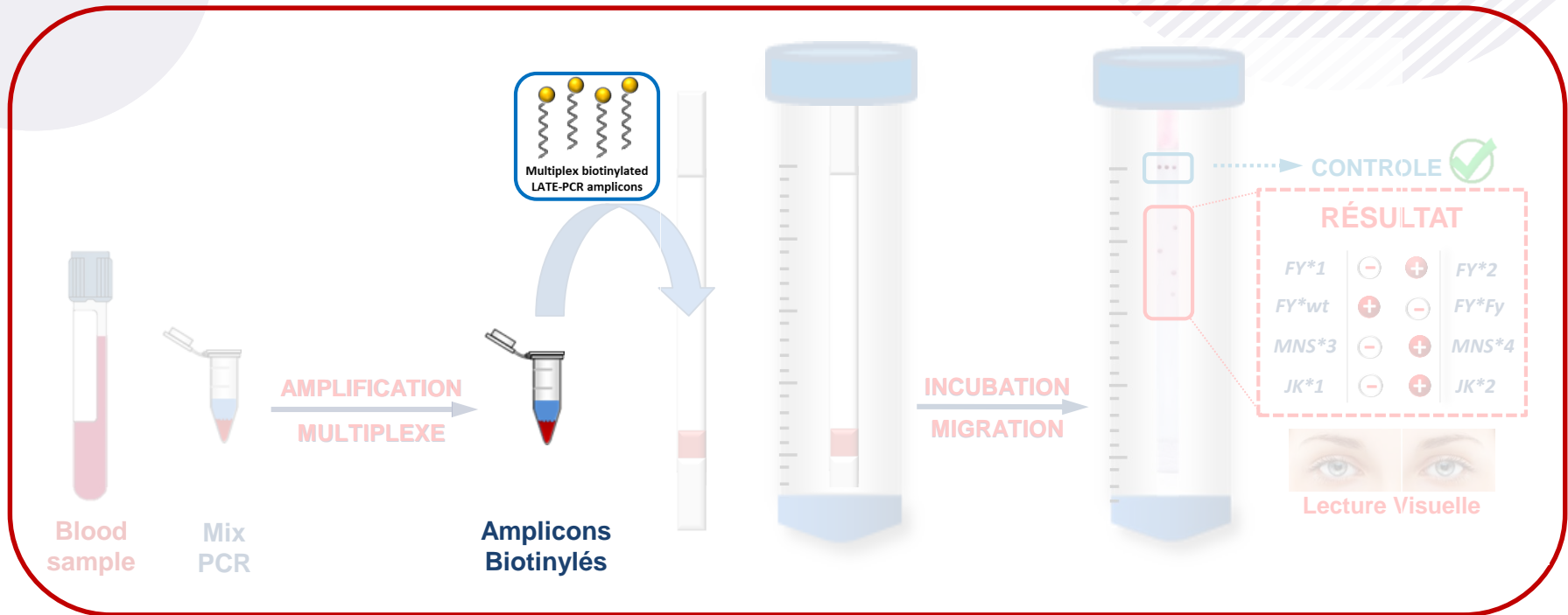
ID-BLOOD : TEST DE GÉNOTYPAGE VISUEL RAPIDE

PRINCIPE DU TEST



ID-BLOOD : TEST DE GÉNOTYPAGE VISUEL RAPIDE

PRINCIPE DU TEST



PREUVE DE CONCEPT

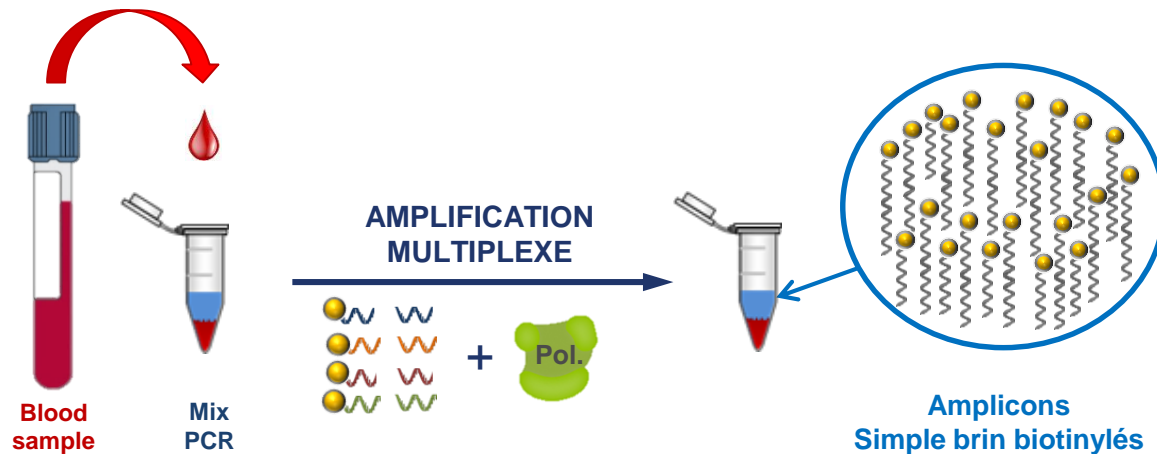
Antigènes Erythrocytaires Phénotype Étendu
JK1/JK2, FY1/FY2, MNS3/MNS4

MISE AU POINT DU TEST DE GÉNOTYPAGE

AMPLIFICATION PCR MULTIPLEXE DIRECTE SUR SANG TOTAL

➔ **Eliminer étape extraction ADN génomique**

- ➔ Simplification protocole opératoire
- ➔ Diminution durée analyse
- ➔ Réduction coût test



➔ **Polymérase stable en présence Inhibiteurs PCR : Enzyme 2nd Génération**

➔ **PCR Générer quantité suffisante Amplicons simple brin : PCR-LATE**

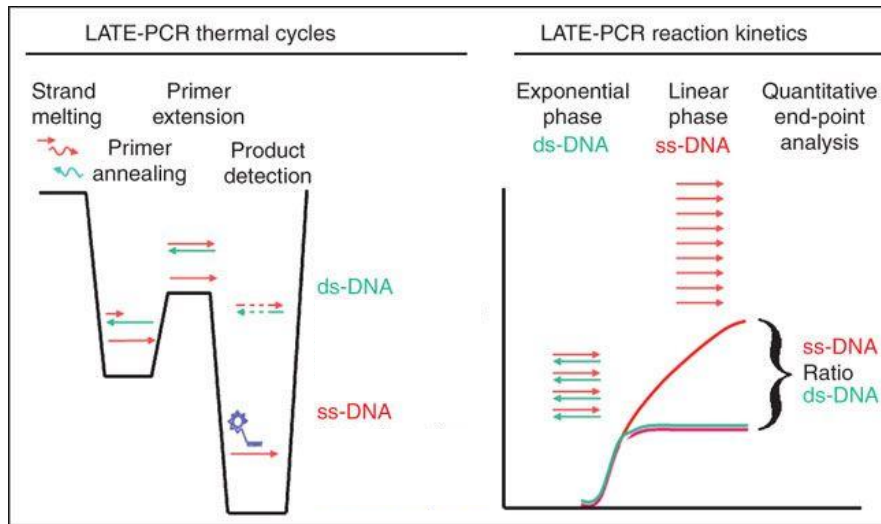
MISE AU POINT DU TEST DE GÉNOTYPAGE

AMPLIFICATION PCR MULTIPLEXE DIRECTE SUR SANG TOTAL

PCR-LATE (Linear After The Exponential)

➔ PCR asymétrique

➔ Produire amplicons simple brin



Rice, J. E.; Sanchez, J. A.; Pierce, K. E.; Reis, A. H.; Osborne, A.; Wangh, L. J. Nat. Protocols 2007, 2, 2429-2438.

- Couple amorce : amorce **L**imitante + amorce **E**xcess
- Calcul T_m en fonction de la séquence + $[c]$
- $\Delta T_m = T_m (L) - T_m (E) \geq 5^\circ C$



Dépôt Direct Amplicons sur Bandelette



Aucune Etape Dénaturation des Amplicons

MISE AU POINT DU TEST DE GÉNOTYPAGE

OPTIMISATION PCR-LATE MULTIPLEXE

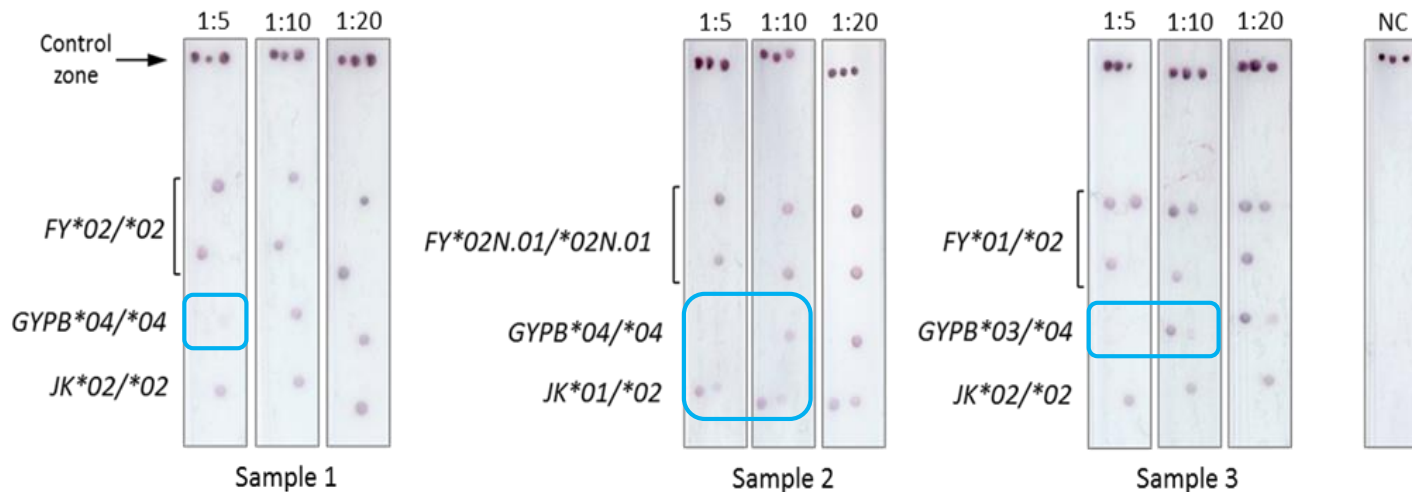
PRIMER RATIO



- Panel Echantillons Donneurs (QBD Grand Sud)
 - Phénotypes Etendus → **FY1/FY2, JK1/JK2, MNS3/MNS4**



DÉTECTION VISUELLE



Guide de lecture

	• • •	CONTROLE
FY*01	• •	FY*02
FY*-wt	• •	FY*02N.01
GYPB*03	• •	GYPB*04
JK*01	• •	JK*02

➔ **Primer ratio 1:20**

MISE AU POINT DU TEST DE GÉNOTYPAGE

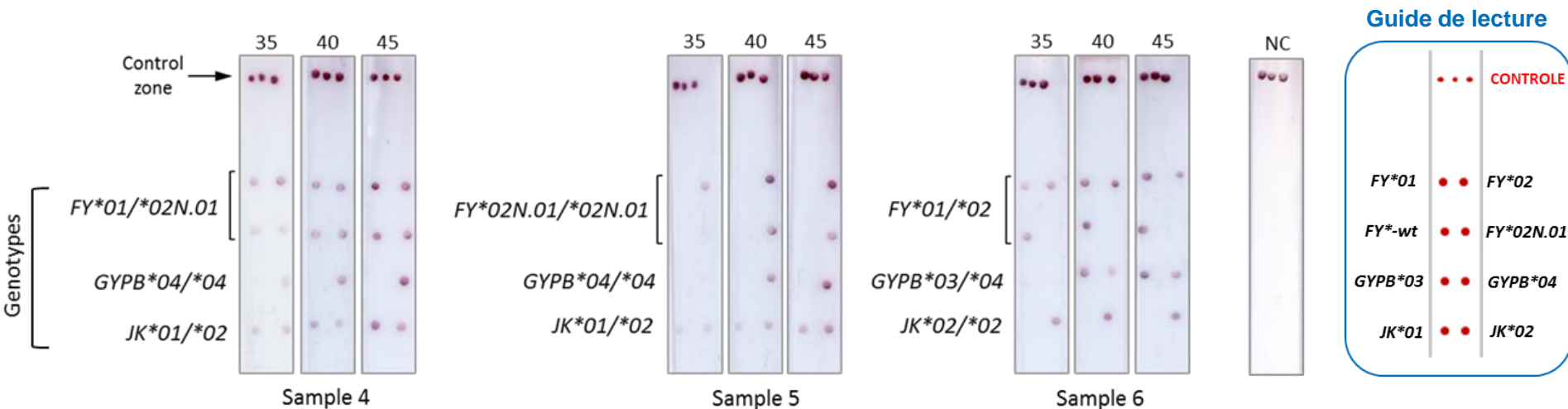
OPTIMISATION PCR-LATE MULTIPLÈX

➔ NOMBRE DE CYCLES

- Panel Echantillons Donneurs (QBD Grand Sud)
 - Phénotypes Etendus ➔ **FY1/FY2, JK1/JK2, MNS3/MNS4**



DÉTECTION VISUELLE



➔ **Nombre de cycles : 45**

➔ **Mise au point conditions de migration**

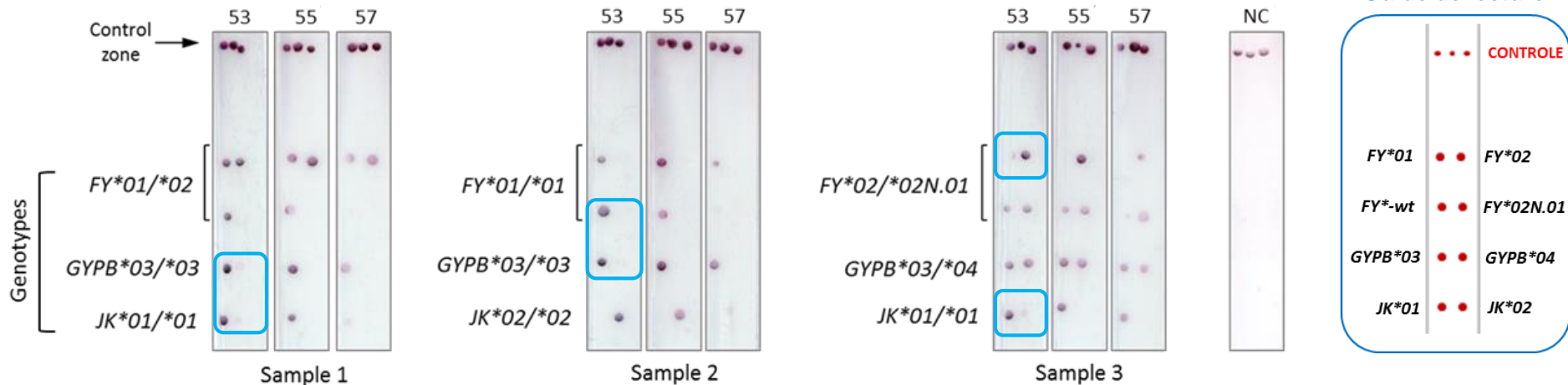
MISE AU POINT DU TEST DE GÉNOTYPAGE

OPTIMISATION CONDITIONS MIGRATION LATERAL-FLOW

➔ Elimination Signaux Non Spécifiques

➔ TEMPÉRATURE MIGRATION/HYBRIDATION 

- Panel Echantillons Donneurs (QBD Grand Sud)
 - Phénotypes Etendus ➔ **FY1/FY2, JK1/JK2, MNS3/MNS4**



➔ **Température de Migration : 55°C**

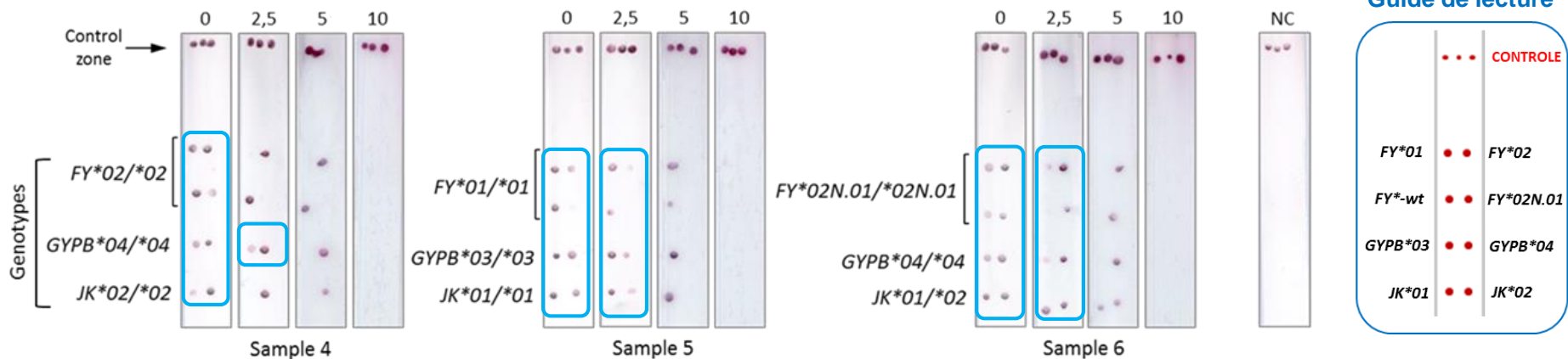
MISE AU POINT DU TEST DE GÉNOTYPAGE

OPTIMISATION CONDITIONS MIGRATION LATERAL-FLOW

➔ Elimination Signaux Non Spécifiques

➔ COMPOSITION TAMPON DE MIGRATION - FORMAMIDE

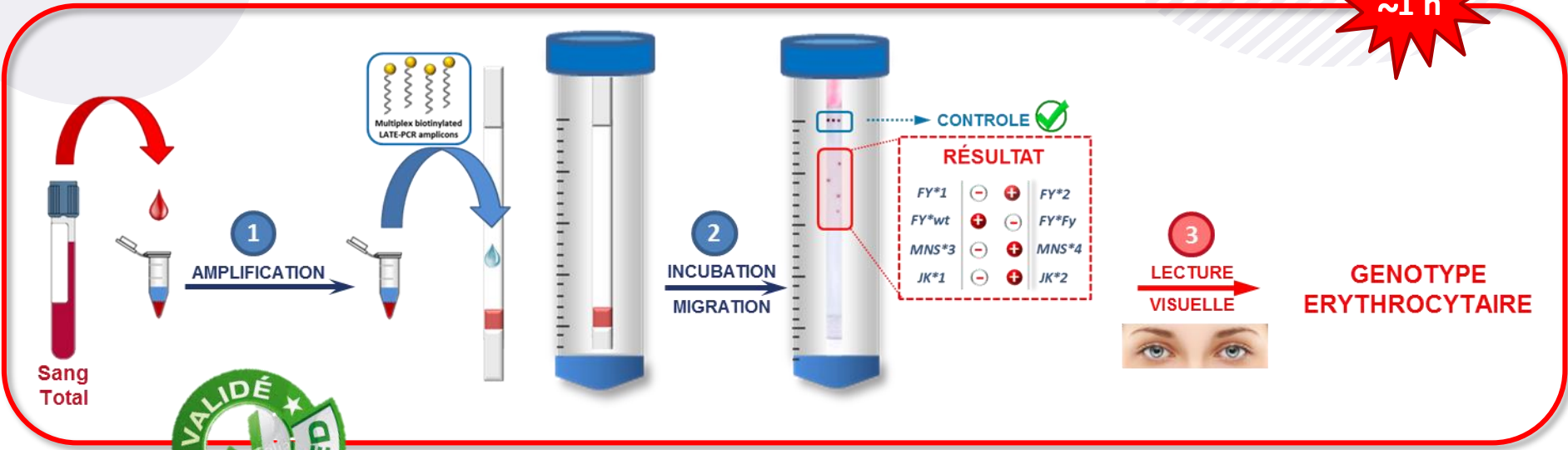
- Panel Echantillons Donneurs (QBD Grand Sud)
 - Phénotypes Etendus ➔ **FY1/FY2, JK1/JK2, MNS3/MNS4**



➔ Composition Formamide : 5 %

MISE AU POINT DU TEST DE GÉNOTYPAGE

~1 h

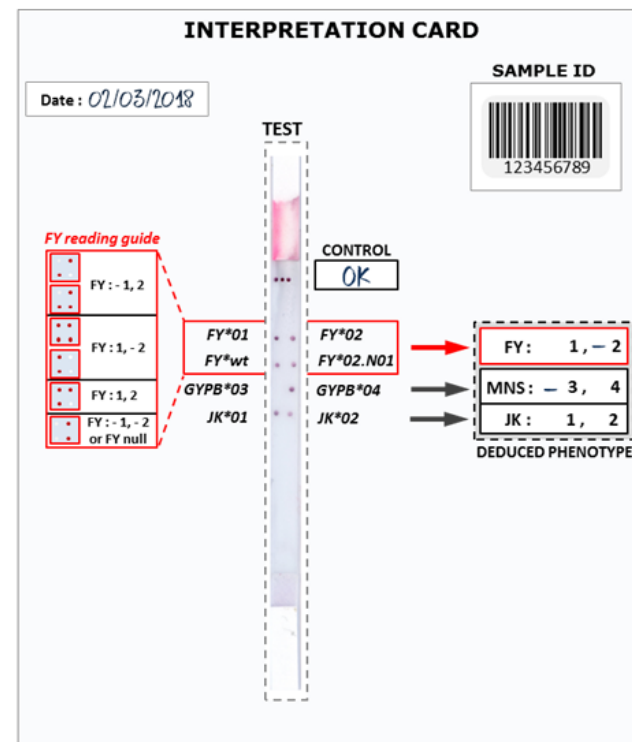
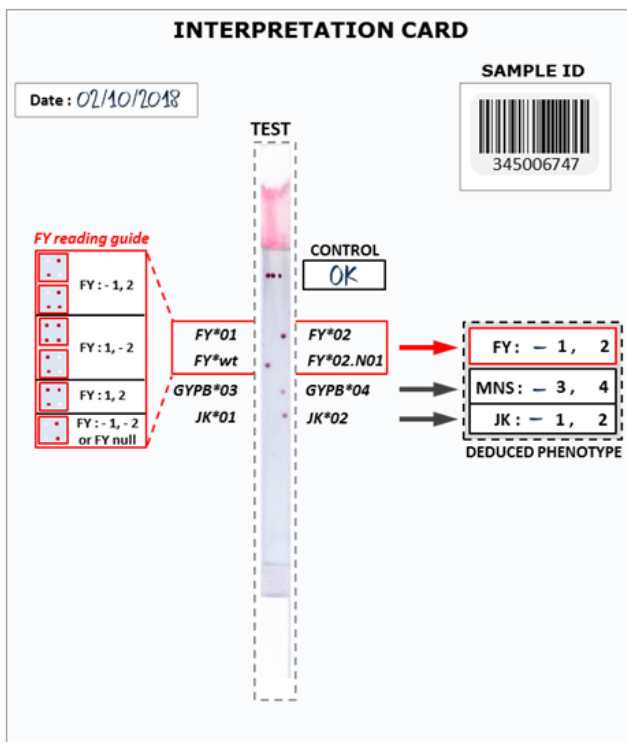


Evaluation Test sur un Panel Echantillons Donneurs de Sang

EVALUATION DU TEST DE GÉNOTYPAGE

PANEL DONNEURS

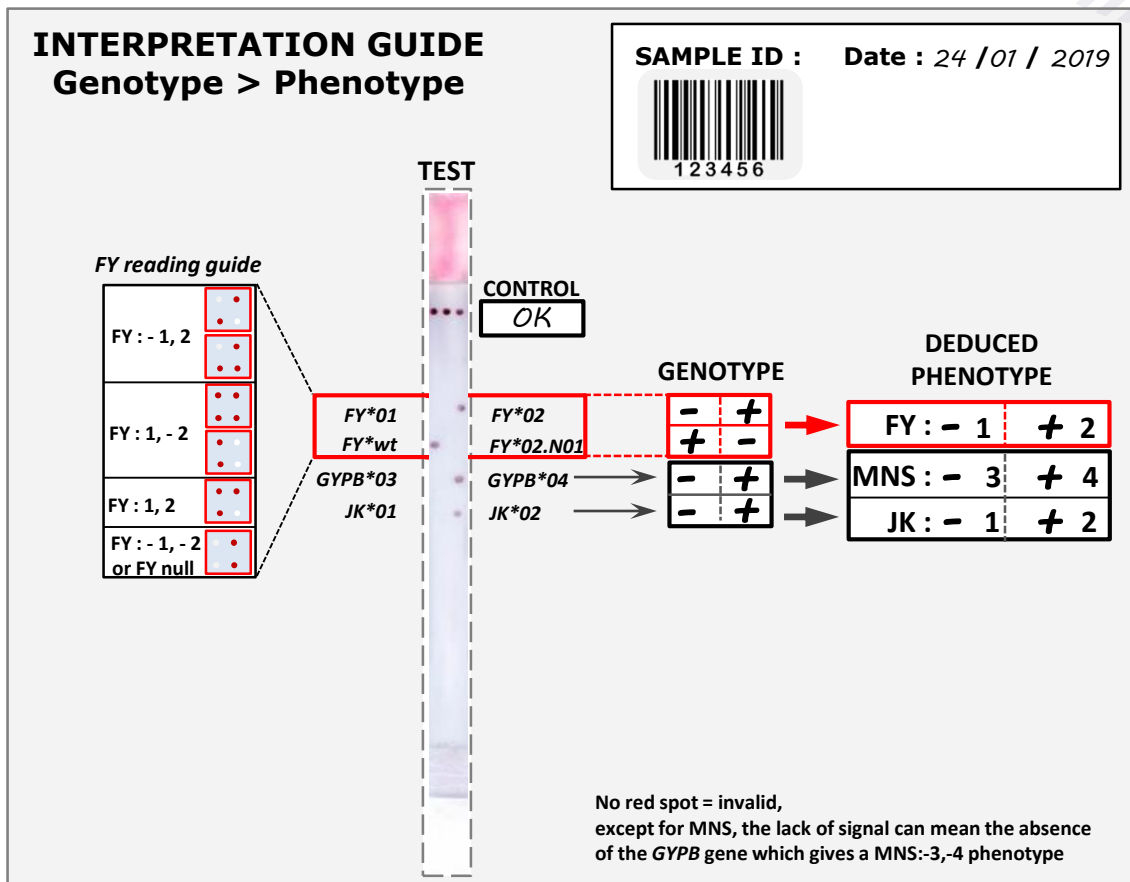
- 100 Echantillons Donneurs (QBD Grand Sud)
 - Phénotypés Etendus ➡ **FY1/FY2, JK1/JK2, MNS3/MNS4**



EVALUATION DU TEST DE GÉNOTYPAGE

PANEL DONNEURS

- 100 Echantillons Donneurs (QBD Grand Sud)
 - Phénotypés Etendus ➡ **FY1/FY2, JK1/JK2, MNS3/MNS4**



EVALUATION DU TEST DE GÉNOTYPAGE

PANEL DONNEURS

- 100 Echantillons Donneurs (QBD Grand Sud)
 - Phénotypés Etendus ➡ FY1/FY2, JK1/JK2, MNS3/MNS4

SÉROLOGIE



TEST LATERAL-FLOW
EFS Occitanie

Taux de réalisation : 100/100 échantillons (100 %)

Concordance : 600 / 600 Ag (100 %)

➡ Test Lateral Flow Validé

➡ Directement à Partir Sang Total

CONCLUSION

TEST VISUEL RAPIDE GÉNOTYPAGE ERYTHROCYTAIRE

- 3 Premiers Systèmes Erythrocytaires (KIDD, DUFFY, MNS)
- Protocole Simple et Rapide :
 - Amplification Rapide PCR Multiplexe
 - A partir de Sang Total
 - Migration Echantillons sur Bandelette
- Lecture Visuelle du Résultat
- Détermination Génotype Erythrocytaire
- Faible Coût

➡ Intérêt pour l'IH Receveur

➡ Autres « Kits » SNPs en cours de développement

➡ Transfert de la technologie vers un industriel en cours



TECHNOLOGIE

« Procédé et dispositif pour le génotypage de SNP »



... de nombreux domaines applications





REMERCIEMENTS



EFS Occitanie

Dr F. Roubinet
Dr C. Fournier-Wirth
J. Gomez-Martinez
Dr JF. Cantaloube

EFS PACA-Corse

Pr J. Chiaroni
Dr P. Bailly
Dr M. Silvy

Laboratoire QBD Grand Sud

Dr C. Maugard
Dr MC. Calloix
Dr J. Relave
Dr F. Wind
Techniciens QBD

Cabine Fixe Montpellier EFS Occitanie

Dr L. Meriadec de Byans
Infirmières de prélèvement

Laboratoire IHR Montpellier

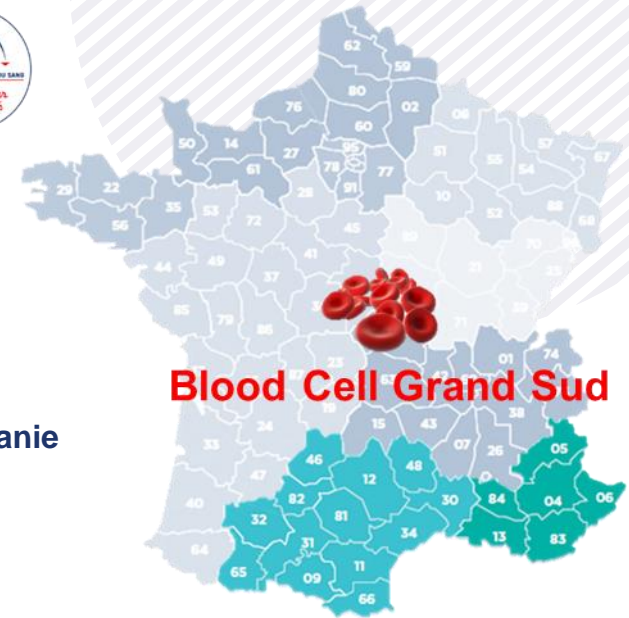
Dr O. Bouix
Dr A. Conté
M. Chevalier
A. Julien
Techniciens IHR

Les Donneurs de Sang

Direction de la Recherche et de la Valorisation EFS

Pr JC Pagès
Dr K. Belhaj
B. Bonneaudau
N. Matos-Fernandes

Région Occitanie Pyrénées-Méditerranée





**MERCI
DE VOTRE ATTENTION**

Jean-Charles Brès
jean-charles.bres@efs.sante.fr