



HAL
open science

Développement de PCRs multiplexes pour le diagnostic : microarrays analytiques

Stéphanie Cloux Boccoz

► **To cite this version:**

Stéphanie Cloux Boccoz. Développement de PCRs multiplexes pour le diagnostic : microarrays analytiques. Biotechnologies. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10282 . tel-01286987

HAL Id: tel-01286987

<https://theses.hal.science/tel-01286987>

Submitted on 11 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT (arrêté du 7 août 2006)

Spécialité

BIOTECHNOLOGIES

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé 205

Par

Stéphanie A. CLOUX BOCCOZ

Développement de PCRs multiplexes pour le diagnostic : microarrays analytiques

Soutenue publiquement le 11 décembre 2015

JURY

Prof Loïc BLUM

Président du Jury

Prof Jean-Marie FRANCOIS

Rapporteur

Dr Christoph NIEDERHAUSER

Rapporteur

Dr Christophe MARQUETTE

Directeur de Thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration	M. François-Noël GILLY
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Philippe LALLE
Directeur Général des Services	M. le Professeur Germain GILLET
	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme Caroline FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit de Thèse ont été réalisés au sein de l'équipe GEMBAS de l'ICBMS à l'Université Claude Bernard Lyon 1 sous la direction du Dr Christophe A.MARQUETTE ainsi qu'au sein de l'entreprise AXO Science dirigée par Mr Othello CHARTIER dans le cadre d'une convention CIFRE.

Equipe Génie Enzymatique Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires
Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires

UMR 5246 / Université Lyon 1
Bât CPE – Université Claude Bernard Lyon 1
43 Boulevard du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex – France

AXO Science SAS

66 Boulevard Niels Bohr
69100 Villeurbanne – France



Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé 205



Ecole Doctorale Interdisciplinaire
Sciences-Santé ED N°205

Remerciements

De nombreuses personnes ont participé, de près ou de loin, à la concrétisation de ce travail, et ont fait de cette thèse ce qu'elle est aujourd'hui. C'est pourquoi je tiens à exprimer toute ma gratitude à...

... Loïc, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

... Christophe pour l'autonomie accordée concernant les expériences à réaliser tout en étant présent lorsque cela était nécessaire. Chaque conversation était constructive et allait droit à l'essentiel, sans mots superflus (en particulier dans les e-mails), et toujours avec bonne humeur. Beaucoup d'étudiants aimeraient avoir un tel directeur de thèse (comme quoi l'habit ne fait pas le moine !).

... Christophe et Othello pour m'avoir fait confiance et confié la suite du projet initié par Gaëlle. J'ajoute une mention spéciale à Othello pour ta persévérance à tenter de comprendre les aspects scientifiques des conversations du secteur R&D. Je te remercie également tout particulièrement pour m'avoir accordé tout le temps nécessaire à la rédaction de ce manuscrit.

... Gaëlle, pour m'avoir briefée avant ton départ et avoir toujours su rester disponible pour répondre à mes interrogations tout au long de ma thèse, même de l'autre côté de l'Atlantique.

Je souhaite remercier également tous les membres d'AXO Science...

... Samuel pour réussir à vendre des tests dont je n'ai pas encore terminé ni même parfois commencé le développement.

... Benjamin pour tes blagues (de plus ou moins bon goût). Un manager R&D comme toi, il n'y en a qu'un ! (et un seul, ça suffit).

... Marion pour l'animation du bureau.

... Anne-Marie pour tenter de me mettre sur le droit chemin de la Qualité (et ce n'est pas une mince affaire...).

... Mamie Marine pour avoir initié avec moi les footings au parc de la tête d'or, et participé à mon baptême de gym suédoise, ainsi que pour toutes les pauses thés et tisanes. Même si tu es devenue responsable des affaires réglementaires, je t'aime bien quand même...

Partager les « AXO Lunch » (de boulot, de Noël...) avec vous furent toujours des moments très conviviaux. J'en profite pour vous remercier de la patience dont vous faites preuve lorsqu'il vous faut attendre que je termine mes repas. Sachez que je tente jour après jour de m'améliorer.

Plein de petits et gros mercis également à...

... Ophélie, pour nous avoir suivies Marine et moi aux footings et à la piscine, ainsi que pour ton énergie communicative.

... Julie pour tes cheesecakes, les mots fléchés du 20 minutes (même si la force n'était pas toujours avec nous) et les terribles muffins triple chocolat du double mixte.

... Céline pour les bons moments passés à AXO, et aussi pour les repas de midis entre filles, au Tracteur ou au Toï Toï (et le baba au rhum terminé à la paille lors de notre petit séjour à Paris).

... Lina pour tes gâteaux sublimes (d'ailleurs, ça fait longtemps que je n'en ai pas mangé...!!).

... Meriem à qui je peux dispenser mes avis et conseils de jeune maman et ça, c'est bien ! Je ne peux que te dire que la naissance d'un bébé change la vie (en bien, hein !), et te souhaite tout le bonheur possible.

... Chloé et Léa, merci encore pour l'organisation le jour J.

Chaque repas et chaque soirée partagés avec vous furent toujours des moments très agréables, agrémentés de gâteaux, de vins, et de rigolades.

Je n'oublie pas non plus ...

... Guillaume, pour avoir été le seul à me proposer de me ramener chez moi alors que c'était moi qui l'avais amené en voiture le matin même... (et aussi pour les proverbes ainsi que les mots et expressions d'antan). Je sais que ma carte d'étudiante te manque pour aller t'acheter des sandwiches au restaurant du personnel.

... Les stagiaires M1 et M2.

... Tous les membres du laboratoire que j'ai pu côtoyer, tous les jours ou occasionnellement, de près ou de loin.

... Une petite dédicace à Agnès pour le coaching à la machine à relier et Fred qui a quasiment fait tout le boulot à ma place.

A quoi aurait ressemblé cette thèse sans vous tous ... ? Sachez que vous avez transformé chaque jour de travail en moments de convivialité remplis de bonne humeur. Ce fut un plaisir de me lever le matin pour vous retrouver, au labo ou à AXO (et chacun sait que pourtant, le matin...c'est plutôt compliqué). Et pour ça, merci.

Je tiens évidemment à remercier...

... Ma famille.

... Mes parents, pour m'avoir permis d'arriver jusqu'ici, même si après 3 ans de thèse, mon père essaie toujours de comprendre sur quoi je travaille.

... Mon mari Cédric pour sa présence et sa patience (mais je tiens tout de même à préciser que j'ai été parfaitement vivable pendant la période de rédaction...).

... Mon fils Nathan, le plus beau cadeau auquel j'ai eu droit pour l'année 2015.

... Marlène pour être disponible dans la vie de tous les jours depuis 10 ans maintenant mais aussi pour ta présence dans les plus grandes étapes (témoin de mariage, marraine de Nathan, soutenance de thèse, je n'oublie pas tous les concerts d'Indochine partagés ensembles bien sûr !).

... Rémi (surnom FranceTVsport) pour le coaching et la découverte de nouveaux jeux de sociétés et ma balle de Roland Garros ayant foulé la terre battue. Je sais que je peux te confier mon appareil photo en toute tranquillité pour les grandes occasions.

Et pour terminer je souhaite bon courage à Marine, Julie, Meriem, Léa et Chloé pour la suite de leur thèse.

Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AP	Phosphatase Alcaline (Alkaline Phosphatase)
ARN	Acide RiboNucléique
AS-PCR	PCR spécifique de l'allèle (Allele Specific Polymerase Chain Reaction)
ATP	Adenosine Tri Phosphate
BCIP	5-bromo-4-chloroindolylphosphate
BET	Bromure d'éthidium
CCD	Charged Coupled Device = DTC : Dispositif à transfert de charge
CGR	Concentré de globules rouges
ddNTP	didésoxyribonucléotide
dNTP	désoxyribonucléotide
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EFS	Etablissement Français du Sang
EIR	Effet indésirable receveur
EMBL-EBI	Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire – Institut Européen de Bioinformatique (European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute)
ESBLs	β -Lactamases à spectre étendu (Extended Spectrum β -Lactamases)
FRET	Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (Förster Resonance Energy Transfert)
ISBT	Société Internationale de Transfusion Sanguine (International Society of Blood Transfusion)
MALDI-TOF MS	Spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry)
MRSA ou SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
MSSA ou SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méthicilline
NBT	NitroBlue Tetrazolium
NCBI	Centre national pour l'information sur les biotechnologies (National Center for Biotechnology Information)
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate Buffer Saline)
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PCR-RFLP	PCR – Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism)
PSL	Produit sanguin labile
RAI	Recherche d'anticorps irréguliers

RSV	Virus respiratoire syncytial (Respiratory Syncytial Virus)
RT-PCR	Transcription Réverse suivie d'une PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
RUO	Pour la recherche uniquement (Research Use Only)
SAP	Phosphatase Alcaline de crevette (Shrimp Alkaline Phosphatase)
SAV	Streptavidine
SNP	Polymorphisme d'un seul nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism)
SSP-PCR	PCR amorce spécifique de la séquence (Sequence Specific Priming - Polymerase Chain Reaction)
T _m	Température de fusion (Melting Temperature)

Table des matières

Table des matières	13
Liste des Tableaux.....	15
Liste des Figures	17
Résumé.....	19
Introduction	21
1 Le génotypage érythrocytaire.....	23
1.1 Compatibilité transfusionnelle et systèmes de groupes sanguins	23
1.1.1 Historique	23
1.1.2 Les différents types de transfusions et de Produits Sanguins Labiles (PSL)	24
1.1.3 Effets Indésirables Receveurs (EIR)	26
1.1.4 Compatibilité transfusionnelle : système ABO.....	28
1.1.5 Autres systèmes de groupes sanguins et notion de groupe sanguin « rare »..	30
1.1.6 Recherche d'anticorps irréguliers	34
1.1.7 Allo-immunisation	35
1.2 Méthodes de groupage	36
1.2.1 Sérologie : méthode conventionnelle	36
1.2.2 Emergence des méthodes de génotypage érythrocytaire.....	38
1.2.3 Applications du génotypage érythrocytaire étendu.....	39
1.2.4 Le génotypage érythrocytaire : une routine ?.....	40
1.3 Solutions de génotypage érythrocytaire.....	41
1.3.1 Etat de l'art	41
1.3.2 Tests basés sur la PCR.....	42
1.3.3 Tests non basés sur la PCR.....	47
1.3.4 Systèmes Intégrés.....	49
2 Développement d'une nouvelle plateforme de génotypage érythrocytaire haut débit : <i>HIFI BLOOD 96™</i>	63
2.1 Présentation de l'outil	64
2.1.1 Etudes préliminaires.....	64
2.1.2 Preuves de concept.....	65
2.1.3 Validation de l'outil sur 293 donneurs.....	66
2.1.4 Changement de support	68
2.2 Intégration de nouveaux systèmes de groupes sanguins.....	68

2.2.1	Sélection des polymorphismes	69
2.2.2	Mise au point des nouveaux oligonucléotides	70
2.3	Validation de l'outil : étude à moyenne échelle.....	83
3	Développement et application de la technologie HIFI à la détection de pathogènes responsables de HAP (Pneumonies Acquisées à l'Hôpital) et VAP (Pneumonies Acquisées sous Ventilation)	93
3.1	Buts / Enjeux	93
3.2	Méthodes existantes.....	94
3.2.1	Méthodes conventionnelles.....	94
3.2.2	Méthodes moléculaires.....	95
3.3	Développement du test haut débit	106
3.3.1	Sélection des cibles	107
3.3.2	Conception des amorces et amplification des cibles	108
3.3.3	Conception des sondes.....	108
3.3.4	Preuve de concept.....	112
3.3.5	Optimisations du test	119
4	Matériel et méthodes.....	135
4.1	Matériel	135
4.1.1	Instruments	135
4.1.2	Logiciels.....	135
4.1.3	Réactifs.....	135
4.2	Méthodes.....	136
4.2.1	Préparation des échantillons.....	137
4.2.2	Extraction et amplification des acides nucléiques	137
4.2.3	Test d'hybridation haut débit automatisé	141
5	Conclusions et perspectives	145
	Liste des Publications associées à ces travaux de thèse	147
	Références	149
	Annexes.....	155

Liste des Tableaux

Tableau 1 - Répartition des EIR par diagnostic et selon le niveau d'imputabilité	27
Tableau 2 - Règles de compatibilité du système ABO	29
Tableau 3 - Effets indésirables d'incompatibilité ABO d'imputabilité 2 ou 3 déclarés en 2013 selon le type de PSL transfusé	30
Tableau 4 - Inventaire des systèmes de groupes sanguins répertoriés par l'ISBT	31
Tableau 5 - Liste des principaux phénotypes rares en France	33
Tableau 6 - Répartition des allo-immunisations isolées d'imputabilité 2 ou 3 déclarés en 2013 selon le type de PSL transfusé	35
Tableau 7 - Polymorphismes étudiés pour la preuve de concept	65
Tableau 8 - Polymorphismes pris en charge sur la plateforme <i>HIFI Blood 96™</i>	69
Tableau 9 - Représentations des structures secondaires possibles pour la sonde LU*1 à 55°C générées par la simulation Mfold	74
Tableau 10 - Représentations des structures secondaires possibles pour la sonde LU*2 à 55°C générées par la simulation Mfold	75
Tableau 11 - Propriétés thermodynamiques des amorces sélectionnées pour le gène <i>LU</i> ..	77
Tableau 12 - Représentations des structures secondaires possibles à 57°C pour l'amorce antisens générées par la simulation Mfold	78
Tableau 13 - Résultats de l'hybridation des produits de PCR multiplexes sur les cibles du panel 2	81
Tableau 14 - Propriétés thermodynamiques de la version 2 des sondes LU*1 et LU*2	82
Tableau 15 - Résultats de l'hybridation des produits de PCR multiplexes sur les cibles du panel 2 avec les sondes LU*1 et LU*2 version 2	83
Tableau 16 - Distribution caucasienne des génotypes du panel 1 (Badjie et al, 2011)	90
Tableau 17 - Distribution caucasienne des génotypes du panel 2 d'après Human Blood Groups 3rd edition de Geoff Daniels (Daniels, 2013).	90
Tableau 18 - Résultats obtenus lors de l'étude de validation, en fonction des couples d'allèles	91
Tableau 19 - Cibles du test ReSynPlex, les gènes associés et noms utilisés sur la matrice de dépôt	107
Tableau 20 - Représentations des structures secondaires possibles à 55°C pour la sonde <i>lytA</i> sélectionnée, obtenues avec la simulation Mfold	111

Tableau 21 - Gènes ciblés pour le test de PCR monoplexes et provenance des organismes (bactéries ou virus) dont l'ADN ou l'ARN a été extrait	113
Tableau 22 - Résultats obtenus après hybridation des produits de PCR monoplexes - Rampe de température 88 à 55°C	114
Tableau 23 - Récapitulatif des cibles détectées	116
Tableau 24 - Résultats obtenus après hybridation des produits de PCR monoplexes - Rampe de température 88 à 30°C	116
Tableau 25 - Récapitulatif des cibles détectées	118
Tableau 26 - Résultats obtenus après hybridation de pools de produits de PCR monoplexes - Rampe de température 88 à 30°C.....	119
Tableau 27 - Résultats après hybridations de produits de PCR monoplexes symétriques et asymétriques - Rampe de température de 88 à 30°C	120
Tableau 28 - Récapitulatif des cibles détectées	123
Tableau 29 - Résultats obtenus après hybridations de produits de PCR symétriques et asymétriques ciblant les carbapénémases - Rampe de température de 88 à 30°C	124
Tableau 30 - Composition des pools de produits de PCR asymétriques réalisés.....	125
Tableau 31 - Résultats obtenus après hybridation de pools de produits de PCR asymétriques (en rouge) / PCR symétriques (en vert) - Rampe de température de 88 à 30°C	126
Tableau 32 - Résultats obtenus après hybridation de produits de PCR monoplexes asymétriques avec différents rapports d'amorces (1/10, 4/10 et 6/10) et symétriques (10/10)	129

Liste des Figures

Figure 1 - Chronologie de la découverte des groupes sanguins (Daniels & Reid, 2010)	30
Figure 2 - Fréquence des accidents transfusionnels selon les systèmes de groupes sanguins (Anstee, 2009).....	35
Figure 3 - Exemple du système biallélique Kidd et ses génotypes associés	39
Figure 4 - Représentation des différentes étapes d'une PCR.....	43
Figure 5 - Principe de la technologie xMAP (Drago et al, 2009)	50
Figure 6 - Principe du système OpenArray® (www.thermofisher.com)	51
Figure 7 - Principe de la technologie SNaPshot (www.thermofisher.com)	53
Figure 8 - Principe du test BeadChip™ (Le Goff, 2011)	57
Figure 9 - Principe du test Genome Lab SNP Stream (Le Goff, 2011).....	59
Figure 10 - Cahier des charges du système à développer.....	63
Figure 11 - Déroulement du processus de la plateforme <i>HIFI Blood 96™</i>	67
Figure 12 – Distribution théorique et réelle des Pcores	68
Figure 13 - Capture d'écran de l'alignement de séquences codant pour le gène <i>LU</i> réalisé grâce au logiciel MEGA6.....	71
Figure 14 - Capture d'écran de l'alignement de séquences codant pour le gène <i>LU</i> réalisé grâce au logiciel MEGA6.....	72
Figure 15 - Schéma de la position des oligonucléotides sélectionnés	73
Figure 16 - Positions des oligonucléotides sur l'ADN codant le gène <i>LU</i>	77
Figure 17 - Dimère d'amorces possible généré par la simulation avec le logiciel de Thermofisher	78
Figure 18 - Photo du gel de migration des produits de PCR monoplexe sur le gène <i>LU</i> ..	80
Figure 19 - Résultat de l'hybridation des produits de PCR monoplexe sur le gène <i>LU</i>	80
Figure 20 - Distribution des valeurs de Pscore et indication des valeurs seuils choisies pour les systèmes de groupes sanguins du panel 1.....	85
Figure 21 - Distribution des valeurs de Pscore et indication des valeurs seuils choisies pour les systèmes de groupes sanguins du panel 2	86
Figure 22 - Répartition des valeurs de Pscore obtenues sur 583 échantillons pour les systèmes de groupes sanguins du panel 1.....	88
Figure 23 - Répartition des valeurs de Pscore obtenues sur 190 échantillons (85 pour Cartwright) pour les systèmes de groupes sanguins du panel 2.....	89
Figure 24 - La "FilmArray® Pouch" (Poritz et al, 2011)	99

Figure 25 – Principe de la technologie SmartFinder® (www.pathofinder.com).....	102
Figure 26 - Partie de la séquence d'ADN codant le gène <i>lytA</i> chez <i>Streptococcus pneumoniae</i>	109
Figure 27 - Paramètres thermodynamiques de la sonde potentielle (extraite de la littérature) <i>lytA</i> obtenus grâce au logiciel Primer3+	110
Figure 28 - Matrice des sondes déposées utilisée pour le test d'hybridation des PCR monoplexes.....	113
Figure 29 - Plan de la matrice des sondes déposées sur le support, après l'ajout des sondes de détection des carbapénémases, d'une 2 ^{ème} version des sondes ciblant les gènes <i>mip</i> et <i>fucK</i>	123
Figure 30 - Plan de plaque pour la disposition des sondes du panel 1.....	141
Figure 31 - Plan de plaque pour la disposition des sondes du panel 2.....	141
Figure 32 - Matrices déposées en fond de puits.....	142
Figure 33 - Plan de plaque pour la disposition des sondes ReSynPlex.....	142

Résumé

Les travaux présentés dans cette thèse font suite à celle de Melle LE GOFF. Ils se concentrent sur la technologie *HIFI* brevetée et développée pendant ses travaux.

Une première partie du travail présenté dans ce manuscrit concerne le test *HIFI Blood 96™* et plus particulièrement les améliorations et les évolutions apportées au test afin d'en faire un véritable outil de génotypage, multiparamétrique et haut-débit pouvant être installé dans les banques de sang dans le but de constituer des inventaires de sang génotypé de façon étendue, participant ainsi à améliorer la sécurité transfusionnelle. Il permet de caractériser 96 échantillons sur 15 polymorphismes (divisés en deux panels) associés aux groupes sanguins en approximativement 4h30. Cette plateforme a fait l'objet d'une étude de validation à moyenne échelle sur 583 donneurs pour le panel 1 et 190 donneurs pour le panel 2.

La deuxième partie des travaux décrit l'adaptation de la technologie *HIFI* appliquée au diagnostic des pathologies respiratoires, avec le développement d'une autre plateforme, ReSynPlex, en partenariat avec 3 équipes de recherche de Grenoble.

Development of multiplex PCR for diagnosis: analytical microarrays

Abstract

The work reported in this thesis follows the one undertaken by Ms LE GOFF. It is focused on *HIFI* technology, which is patented and developed during her thesis.

The first part of this work concerns the *HIFI Blood 96™* test, and particularly the improvements and developments adduced to the test to make it a real diagnostic tool, multiparametric and high-throughput which can be implemented in blood banks in order to constitute negative antigen inventories, thus contributing to improve blood safety. It allows to characterize 96 samples on 15 polymorphisms (divided in two panels) associated to blood group systems in approximately 4.5 hours. A mesoscale validation study has been conducted on 583 samples for panel 1 and 190 samples for panel 2.

The second part of this work describes the adaptation of *HIFI* technology applied to diagnosis of respiratory tract infections, with the development of another platform, ReSynPlex, in partnership with 3 research teams in Grenoble.

Mots-clés

biopuce ; diagnostic ; génotypage érythrocytaire ; haut-débit ; infections respiratoires ; microarrays ; PCR multiplexe ; polymorphisme d'un nucléotide ; puce à ADN

Keywords

biochip ; blood group genotyping ; diagnosis ; DNA biochip ; high-throughput ; microarray ; multiplex PCR ; respiratory tract infections ; single nucleotide polymorphism

Introduction

Les tests de diagnostic ne cessent d'évoluer. Ils se doivent de fournir des résultats toujours plus complets, rapides, précis, le tout à un coût modéré.

Dans le domaine de la transfusion sanguine, près de 108 millions de dons de sang sont collectés chaque année (source Organisation Mondiale de la Santé). Dix pays collectent 65% des dons totaux. Par ordre d'importance, il s'agit des Etats-Unis, de la Chine, de l'Inde, du Japon, de l'Allemagne, de la Russie, de l'Italie, de la France, de la Corée du Sud et du Royaume-Uni.

Les tests haut-débit sur biopuce sont d'ores et déjà utilisés par les banques de sang pour l'obtention du génotype étendu du sang du donneur afin d'améliorer la sécurité transfusionnelle. Dans cette optique de création d'un inventaire de sang génotypé de façon étendue, plusieurs tests sont déjà commercialisés mais ceux-ci présentent souvent plusieurs inconvénients, notamment au niveau de la durée du test et/ou du coût. Afin de pallier à ces inconvénients rencontrés avec les plateformes commercialisées, le projet ANR *HIFI*-assays a vu le jour, en collaboration avec l'EFS, et a initié le sujet de thèse de Melle LE GOFF.

Les travaux décrits dans ce manuscrit font suite aux développements entrepris pendant sa thèse.

La première partie de ce manuscrit sera donc consacrée à lister de façon non exhaustive les plateformes déjà existantes, puis une deuxième partie décrira les améliorations apportées afin d'obtenir un produit fini pouvant être installé dans les banques de sang pour réaliser un génotypage sanguin étendu de leurs poches de sang.

La troisième partie de ce manuscrit illustrera une deuxième application de la technologie *HIFI* sur laquelle repose la plateforme, utilisée pour le diagnostic des infections respiratoires HAP et VAP (Pneumonies Acquises à l'Hôpital et Pneumonies Acquises sous Ventilation). Une liste non exhaustive des plateformes et tests dédiés à ces diagnostics seront décrits.

Enfin, la quatrième partie de ce manuscrit présentera une description du matériel et des méthodes utilisés pour les travaux réalisés durant cette thèse.

1 Le génotypage érythrocytaire

1.1 Compatibilité transfusionnelle et systèmes de groupes sanguins

1.1.1 Historique

On nomme transfusion sanguine l'acte consistant à introduire du sang ou des dérivés sanguins par injection intraveineuse chez tout être vivant. Elle a pour but d'apporter à un patient (appelé receveur), les éléments du sang qui lui font défaut.

En médecine, le sang était d'abord considéré comme un composé devant être éliminé du corps humain : c'est le principe de la saignée, méthode thérapeutique développée par plusieurs médecins en Europe, au Moyen-Orient ou encore en Asie. Le concept même d'injecter du sang dans un organisme est beaucoup plus récent.

C'est le médecin anglais William Harvey (1578-1657) qui fut le premier à décrire la circulation sanguine dans ses travaux débutés en 1616 et qui ont fait l'objet de l'ouvrage *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus* en 1628.

La première transfusion sanguine a quant à elle été réalisée par le français Jean-Baptiste Denis (1635-1704) le 15 juin 1667. Son patient était un jeune homme d'environ 15 ans, fébrile depuis deux mois et ayant déjà subi plus de vingt saignées. De plus, il présentait des troubles de la mémoire et était incapable de réaliser le moindre effort. Ces deux derniers états étaient dus, pour Jean-François Denis, aux saignées répétées. Il a donc eu l'idée de transfuser à son patient environ 100 mL de sang de mouton. Le suivi à court terme a montré une évolution clinique favorable très rapide, ainsi qu'une reprise de l'activité. Cette même année, il transfusa au total quatre patients et c'est sur ce dernier patient qu'il observa des signes cliniques d'intolérance (accélération du pouls, sueurs, douleurs lombaires, nausées, urines noires). Malgré tout, sa récupération fut complète en quelques jours. Jean-Baptiste Denis décrit ici le premier accident hémolytique transfusionnel engendré par la destruction des globules rouges transfusés, par le système immunitaire du receveur.

Quelques années plus tard, en 1674, le terme « globule rouge » fut utilisé pour la première fois par le néerlandais Van Leeuwenhoek (1632-1723) : « J'ai observé le sang de ma main et j'ai trouvé qu'il consiste en globules rouges nageant dans un liquide clair ».

Tout au long du 18^{ème} siècle, des essais de transfusions de sang d'animal à Homme ont été réalisés en Europe, mais l'idée de transfuser du sang d'Homme à Homme n'avait toujours pas émergé.

C'est en 1818 qu'elle fit son apparition grâce à l'anglais James Blundell (1790-1878). En effet, il réalisa tout d'abord une approche expérimentale de la transfusion chez le chien et montra que tous ceux transfusés par leur propre sang survivaient. Il mit cette observation en pratique sur une patiente en lui transfusant son propre sang épanché lors d'une hémorragie obstétricale. Ses travaux furent publiés dans la revue « The Lancet ». Entre 1818 et 1829, il transfusa dix patients et conclut à une efficacité de la transfusion dans 50% des cas.

C'est en 1900 qu'une des plus grandes découvertes en lien avec le domaine de la transfusion sanguine fit son apparition. En effet, le groupe sanguin ABO fut découvert par l'autrichien Karl Landsteiner (1868-1943), en comparant le sang de différents individus. Dans certains cas, une agglutination des globules rouges fut observée en présence de sérum humain. Il conclut que ceci était dû la présence ou l'absence de deux antigènes sur les globules rouges (antigènes qu'il nomma A et B). Il obtint pour ses recherches le prix Nobel de médecine en 1930. Il participa également à une autre découverte de taille : celle du facteur Rhésus, en 1940, aux côtés d'Alexander S. Wiener (1907-1976).

Dès lors, les découvertes de nouveaux systèmes de groupes sanguins n'ont cessé de s'accroître. Actuellement 35 systèmes de groupes sanguins sont répertoriés par la Société Internationale de Transfusion Sanguine (ISBT).

1.1.2 Les différents types de transfusions et de Produits Sanguins Labiles (PSL)

1.1.2.1 Types de transfusions

Les transfusions sanguines peuvent être divisées en deux catégories : les transfusions homologues, et les transfusions autologues.

Une transfusion homologue est une transfusion sanguine où le sang provient de donneurs de sang. C'est la transfusion la plus utilisée de nos jours.

Une transfusion autologue désigne le type de transfusion où le sang provient du patient destiné à être transfusé (appelée aussi TAD pour Transfusion Autologue Différée).

Lorsqu'une chirurgie à risque hémorragique est programmée, il est possible de lui prélever des unités de sang en vue d'une éventuelle transfusion. Cette technique, bien que de moins en moins utilisée, présente certains avantages : pas de possibilité de contamination virale et aucun risque immunologique. En revanche, le risque bactérien est identique à celui d'une transfusion homologe. La transfusion autologue peut aussi être jugée utile lorsque le patient possède un groupe sanguin qualifié de « rare ».

1.1.2.2 PSL

Auparavant, les transfusions étaient réalisées avec le sang total. Ce n'est plus le cas aujourd'hui, et le sang total sert à extraire les différents composés pouvant faire l'objet de transfusions. Les trois principaux composés extraits sont les globules rouges (ou concentrés de globules rouges), les plaquettes (ou concentrés plaquettaires) et le plasma.

La transfusion de concentrés de globules rouges (CGR) a pour but d'éviter une baisse du taux d'hémoglobine, transporteur de l'oxygène, afin d'assurer l'acheminement du dioxygène vers les différents tissus de l'organisme. Elle remplace désormais la transfusion de sang total et est utilisée en règle générale pour soigner des anémies mal supportées par les patients en augmentant uniquement l'hématocrite, en évitant un risque de surcharge des autres composés sanguins, et en permettant de disposer du plasma pour la préparation des médicaments dérivés du sang par le Laboratoire français du fractionnement et des biotechnologies (LFB).

Concernant les transfusions de concentrés plaquettaires, elles ont pour but de maintenir une concentration de plaquettes suffisante afin d'éviter le risque hémorragique. Elles peuvent soit être concentrées à partir du sang de plusieurs donneurs, soit être prélevées directement chez un seul donneur par aphérèse. Ce type de produit sanguin labile est utilisé pour traiter notamment les thrombopénies et les thrombopathies.

Les transfusions de plasma sont de moins en moins utilisées aujourd'hui. Elles servaient auparavant à maintenir la pression artérielle d'un patient se trouvant en état de choc. Maintenant elles sont utilisées principalement lorsque le patient présente des troubles graves de la coagulation, et certaines pathologies rares comme une microangiopathie

thrombotique (désigne les maladies où des amas de plaquettes obstruent les petits vaisseaux sanguins). Ces patients nécessitent un remplacement quotidien de leur plasma par celui de différents donneurs.

En 2013, 3 204 883 produits sanguins labiles ont été distribués et délivrés en France. On dénombre 78% de CGR, 10% de concentrés plaquettaires, et 12% de plasma. 0,02% de ces produits sanguins labiles ont une origine autologue (données du Rapport d'activité hémovigilance 2013 de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), publié en septembre 2014).

1.1.3 Effets Indésirables Receveurs (EIR)

Les effets indésirables receveurs sont définis par l'apparition immédiate ou retardée de manifestations cliniques indésirables chez la personne transfusée, pouvant être consécutives à l'administration de PSL. Toute réaction nocive se produisant suite à une transfusion sanguine est considérée comme imputable à la transfusion, à moins que l'enquête qui en découle ne démontre qu'il n'y a aucun lien existant.

Plusieurs risques et complications peuvent survenir à la suite d'une transfusion de PSL :

- risque immunologique (incompatibilité transfusionnelle érythrocytaire, incompatibilité leuco-plaquettaire, purpura post-transfusionnel, inefficacité transfusionnelle...)
- risque infectieux (bactérien et viral)
- autres (surcharge transfusionnelle, hémochromatose, problèmes métaboliques...)

Depuis 2010, pour chaque EIR sont associés un grade de sévérité ainsi qu'un niveau d'imputabilité. Les grades de sévérité sont au nombre de quatre :

- Grade 1 : EIR non sévère
- Grade 2 : EIR sévère
- Grade 3 : menace vitale immédiate
- Grade 4 : décès

Tableau 1 - Répartition des EIR par diagnostic et selon le niveau d'imputabilité

Diagnostic	Imputabilité 1		Imputabilité 2		Imputabilité 3		Total	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
Allo-immunisation isolée	117	4,6%	884	35,6%	1354	81%	2355	35,1%
Réaction fébrile non hémolytique (RFNH)	1466	57,3%	586	23,6%	1	0,1%	2053	30,6%
Allergie	389	15,2%	507	20,4%	87	5,2%	983	14,6%
Incompatibilité immunologique	93	3,6%	149	6%	52	3,1%	294	4,4%
Œdème pulmonaire de surcharge (TACO*)	86	3,4%	150	6%	47	2,8%	283	4,2%
Réaction hypertensive	80	3,1%	99	4%	50	3%	229	3,4%
Diagnostic non précisé**	83	3,2%	11	0,4%	0	0%	94	1,4%
Réaction hypotensive	68	2,7%	19	0,8%	4	0,2%	91	1,4%
Diagnostic non listé***	65	2,5%	15	0,6%	0	0%	80	1,2%
Inefficacité transfusionnelle	14	0,5%	30	1,2%	10	0,6%	54	0,8%
Hémosidérose	3	0,1%	7	0,3%	40	2,4%	50	0,7%
Œdème pulmonaire lésionnel (TRALI****)	29	1,1%	10	0,4%	10	0,6%	49	0,7%
Infection bactérienne transmise par transfusion (IBTT)	21	0,8%	2	0,1%	4	0,2%	27	0,4%
Hémolyse autre	13	0,5%	6	0,2%	4	0,2%	23	0,3%
Hémolyse drépanocytaire	4	0,2%	6	0,2%	5	0,3%	15	0,2%
Dyspnée non liée à un œdème pulmonaire	13	0,5%	1	0%	0	0%	14	0,2%
Infection virale	6	0,2%	3	0,1%	2	0,1%	11	0,2%
Infection autre	4	0,2%	0	0%	0	0%	4	0,1%
Accidents métaboliques	3	0,1%	0	0%	0	0%	3	<0,1%
Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)	0	0%	0	0%	1	0,1%	1	<0,1%
Crise comitiale	1	<0,1%	0	0%	0	0%	1	<0,1%
Purpura	1	<0,1%	0	0%	0	0%	1	<0,1%
Total	2559	100%	2485	100%	1671	100%	6715	100%

*TACO : Transfusion Associated Circulatory Overload

**Diagnostic non précisé : diagnostic inconnu du déclarant

***Diagnostic non listé : diagnostic connu du déclarant mais non listé dans le thésaurus

****TRALI : Transfusion Related Acute Lung Injury

Quant aux niveaux d'imputabilité, ils sont au nombre de cinq :

- Imputabilité NE (non-évaluable) : données insuffisantes pour évaluer l'imputabilité
- Imputabilité 0 (exclus / improbable) : les éléments disponibles incitent clairement à attribuer l'EIR à une autre cause que la transfusion de PSL
- Imputabilité 1 (possible) : les éléments disponibles ne permettent pas d'attribuer clairement l'EIR ni à la transfusion, ni à une autre cause
- Imputabilité 2 (probable) : les éléments disponibles incitent clairement à attribuer l'EIR à la transfusion
- Imputabilité 3 (certaine) : les éléments disponibles sont probants et ne peuvent être mis en doute, permettant d'attribuer avec certitude l'EIR à la transfusion

En 2013 en France, 6715 EIR dont les enquêtes sont terminées, et d'imputabilité 1 à 3 ont été recensés. Leur répartition par diagnostic est indiquée dans le tableau 1.

Les trois principaux diagnostics d'EIR sont l'allo-immunisation isolée, la réaction fébrile non hémolytique (RFNH) et l'allergie, et ce depuis l'année 2006.

Parmi ces 6715 EIR figurent 9 décès : 4 d'imputabilité 1 et 5 d'imputabilité 2 ou 3. Le décès d'imputabilité certaine (3) est dû à une Infection Bactérienne Transmise par Transfusion (IBTT), et concernant les 4 décès d'imputabilité probable (2), 3 cas de TACO et 1 diagnostic non listé.

1.1.4 Compatibilité transfusionnelle : système ABO

Les globules rouges portent sur leur surface des molécules spécifiques appelées « antigènes de groupe sanguin ». Elles sont regroupées en différentes familles : ce sont les systèmes de groupes sanguins. La présence ou l'absence de ces molécules détermine notre appartenance à un groupe sanguin particulier. De ce fait, la poche de sang à transfuser ne doit pas être choisie au hasard, au risque de devoir faire face à une incompatibilité transfusionnelle dont les effets peuvent se révéler fatals.

En théorie cela signifie qu'un concentré de globules rouges possédant un antigène X à leur surface ne doit pas être transfusé chez un patient dont les globules rouges en sont dépourvus.

Ce phénomène d'incompatibilité a été mis en évidence par Karl Landsteiner en 1900, en lien avec sa découverte du système ABO, l'un des plus connus et l'un des plus importants relatif à la sécurité transfusionnelle. Un individu de groupe sanguin A possède des globules rouges présentant à leur surface l'antigène A. On note la présence d'anticorps dirigés contre l'antigène B dans son sérum. Les règles de compatibilité en transfusion sanguine établissent que cet individu ne pourra être transfusé qu'avec le sang d'un individu de groupe sanguin A ou O. En effet, les individus appartenant au groupe O ne possèdent aucun antigène à la surface de leurs globules rouges. Si cet individu est transfusé avec le sang d'un donneur issu du groupe B, caractérisé par la présence d'antigène B à la surface de ses hématies et des anticorps dirigés contre l'antigène A, les anticorps anti-B présents chez l'individu à transfuser vont interagir avec l'antigène B présent à la surface des hématies du donneur, et entraîner la destruction des globules rouges transfusés (tableau 2).

Tableau 2 - Règles de compatibilité du système ABO

Patient	A	B	AB	O
Génotype du patient	A/A ou A/O	B/B ou B/O	A/B	O/O
Antigènes présents sur les hématies du patient	A	B	A et B	aucun
Anticorps dans le sérum du patient	anti-B	anti-A	aucun	anti-A et anti-B
Donneur possible	A ou O	B ou O	AB, A, B ou O	O

Le patient de groupe sanguin AB pouvant recevoir le sang d'un individu appartenant à n'importe quel groupe sanguin ABO, est appelé « receveur universel ».

Le donneur de groupe sanguin O pouvant faire bénéficier de son sang un patient de n'importe quel groupe sanguin ABO est appelé « donneur universel ».

Parmi les 4156 EIR d'imputabilité 2 et 3 déclarés en 2013, 5% sont des incompatibilités immunologiques parmi lesquels 0,3% sont des incompatibilités ABO de grade 1 ou 2, comme le montre le tableau 3. Aucun EIR sur le système ABO de grade 3 ou 4 n'a été rapporté en 2013.

Tableau 3 - Effets indésirables d'incompatibilité ABO d'imputabilité 2 ou 3 déclarés en 2013 selon le type de PSL transfusé

Grade	CGR	Plaquettes	Plasma	Total
1	2	6	0	8
2	1	1	1	3
Total	3	7	1	11

1.1.5 Autres systèmes de groupes sanguins et notion de groupe sanguin « rare »

1.1.5.1 Autres systèmes de groupes sanguins

Suite à la découverte du système ABO, d'autres systèmes de groupes sanguins ont à leur tour été mis en évidence. Mais ces découvertes n'ont pu réellement se développer qu'à la suite de la mise au point du Test d'Antiglobuline Indirect (nommé à l'origine « réaction de Coombs indirecte », du nom de son découvreur).

En 2010, 30 systèmes de groupes sanguins étaient connus (Figure 1).

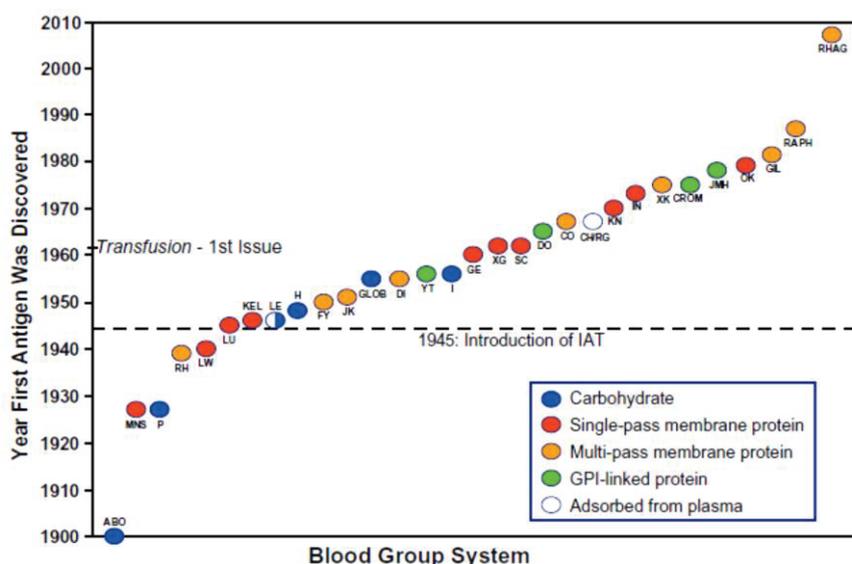


Figure 1 - Chronologie de la découverte des groupes sanguins (Daniels & Reid, 2010)

La couleur représente le type de composant membranaire portant l'antigène. La ligne horizontale en pointillés indique que la majorité des systèmes de groupes sanguins ont été mis en évidence après la mise au point du Test d'Antiglobuline Indirect.

Depuis, 5 autres systèmes de groupes sanguins ont été découverts, ce qui porte à 35 le nombre de systèmes connus à ce jour et répertoriés par l'ISBT (tableau 4). Ils représentent plus de 340 antigènes et 1568 allèles listés sur le site du NCBI Blood Group Gene Mutation Database.

Tableau 4 - Inventaire des systèmes de groupes sanguins répertoriés par l'ISBT

Numéro	Nom du système	Symbole du système	Nom du ou des gène(s) *	Localisation chromosomique
001	ABO	ABO	<i>ABO</i>	9q34.2
002	MNS	MNS	<i>GYPA, GYPB, GYPE</i>	4q31.21
003	PIPK	PIPK	<i>A4GALT</i>	22q13.2
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	1p36.11
005	Lutheran	LU	<i>LU</i>	19q13.32
006	Kell	KEL	<i>KEL</i>	7q34
007	Lewis	LE	<i>FUT3</i>	19p13.3
008	Duffy	FY	<i>DARC</i>	1q23.2
009	Kidd	JK	<i>SLC14A1</i>	18q12.3
010	Diego	DI	<i>SLC4A1</i>	17q21.31
011	Yt	YT	<i>ACHE</i>	7q22.1
012	Xg	XG	<i>XG, MIC2</i>	Xp22.33
013	Scianna	SC	<i>ERMAP</i>	1p34.2
014	Dombrock	DO	<i>ART4</i>	12p12.3
015	Colton	CO	<i>AQP1</i>	7p14.3
016	Landsteiner-Wiener	LW	<i>ICAM4</i>	19p13.2
017	Chido/Rodgers	CH/RG	<i>C4A, C4B</i>	6p21.3
018	H	H	<i>FUT1</i>	19q13.33
019	Kx	XK	<i>XK</i>	Xp21.1
020	Gerbich	GE	<i>GYPC</i>	2q14.3
021	Cromer	CROM	<i>CD55</i>	1q32.2
022	Knops	KN	<i>CR1</i>	1q32.2
023	Indian	IN	<i>CD44</i>	11p13
024	Ok	OK	<i>BSG</i>	19p13.3
025	Raph	RAPH	<i>CD151</i>	11p15.5

026	John Milton Hagen	JMH	<i>SEMA7A</i>	15q24.1
027	I	I	<i>GCNT2</i>	6p24.2
028	Globoside	GLOB	<i>B3GALT3</i>	3q26.1
029	Gill	GIL	<i>AQP3</i>	9p13.3
030	Rh-associated glycoprotein	RHAG	<i>RHAG</i>	6p21-qter
031	FORS	FORS	<i>GBGT1</i>	9q34.13
032	JR	JR	<i>ABCG2</i>	4q22
033	LAN	LAN	<i>ABCB6</i>	2q36
034	VEL	VEL	<i>SMIM1</i>	1p36.32
035	CD59	CD59	<i>CD59</i>	11p13

* Conformément au comité de nomenclature des gènes HUGO (<http://www.genenames.org/>)

La plupart de ces systèmes de groupes sanguins ont été clonés et séquencés, permettant ainsi de connaître les bases moléculaires de ces systèmes, qui résultent pour la grande majorité de polymorphismes sur un seul nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism ou SNP).

1.1.5.2 Notion de groupe sanguin « rare »

Un groupe sanguin rare est défini par l'absence d'expression d'un antigène de fréquence élevée, qui serait présent chez la quasi-totalité de la population générale. La prévalence de ce phénotype dit « rare » est inférieure à 4‰. Cette notion ne concerne que les phénotypes pour lesquelles il s'avère difficile de trouver des produits sanguins labiles disponibles. Le tableau 5 liste les principaux phénotypes dits « rares » en France (Lefrère & Schved, 2010).

Toutefois, il est à noter que cette valeur de prévalence 4‰ en deçà de laquelle un phénotype érythrocytaire est considéré comme rare n'est pas une valeur universelle. En effet, aux Etats-Unis, cette valeur est portée à 1/200 pour le centre de transfusion de New-York, 1/400 pour la Croix Rouge américaine, et 1/1000 selon l'American Association of Blood Banking (AABB) pour un phénotype qualifié d'inhabituel et 1/5000 pour un phénotype qualifié de rare (Lefrère & Schved, 2010).

Tableau 5 - Liste des principaux phénotypes rares en France

Nomenclature internationale	Ancienne dénomination	Prévalence estimée en France	Anticorps potentiellement produit(s) correspondant à la spécificité rare	Immunisation naturelle
RH:-1,2,-3,-4,5	D-C+E-c-e+ (r'r')	4/10 000	Anti-RH1,-RH3,-RH4	non
RH:-1,-2,3,4,-5	D-C-E+c+e- (r''r'')	1/10 000	Anti-RH1,-RH2,-RH5	non
RH:1,2,3,-4,-5	D+C+E+c-e- (r _y r _y)	< 1/10 000	Anti-RH4,-RH5	non
RH:-1,2,3,-4,-5	D-C+E+c-e- (r _y r _y)	Exceptionnel	Anti-RH1,-RH4,-RH5	non
RH:1,-2,-3,-4,-5	D- -	Exceptionnel	Anti-RH17	non
RH:-1,-2,-3,-4,-5	Rh _{null}	Exceptionnel	Anti-RH29	non
RH:-18	Hr ^S -	Sujets d'origine afro-antillaise : prévalence non estimée en France	Anti-RH18	non
RH:-34	Hr ^B -		Anti-RH34	non
RH:-46	Sec-		Anti-RH46	non
KEL:-2	k- (Cellano)	2/1000	Anti-KEL2	non
KEL:-4	Kp(b-)	4/10 000	Anti-KEL4	non
KEL:-5	K _o	<5/100 000 (Réunion)	Anti-KEL5	non
KEL:-7	J _s (b-)	1/100 (afro-antillais)	Anti-KEL7	non
FY:-1,-2	F _y (a-b-)	70% (afro-antillais)	Anti-FY3 ou Anti-FY5	non
JK:-1,-2	Jk(a-b-)	Exceptionnel (Mélanésie)	Anti-JK3	non
MNS:-5	U-	15/1000 (afro-antillais)	Anti-MNS5	non
LU:-2	Lu(b-)	2/1000	Anti-LU2	non
YT:-1	Yt(a-)	2/1000	Anti-YT1	non
H:-1 et H:W1	Oh : Bombay	Exceptionnel (Réunion)	Anti-H1 ou Anti-I1	oui
GE:-2,3	Ge2-	2/10 000 (pourtour méditerranéen)	Anti-GE2	parfois
GLOB:-1,-2	Tj(a-)	Exceptionnel	Anti-GLOB1,-GLOB2,-P1	oui
I:-1	I-	<1/10 000	Anti-I1	oui
CO:-1	Co(a-)	2/1000	Anti-CO1	non
VEL:-1	Vel-	4/10 000	Anti-VEL1	non
Jr(a-)		Exceptionnel ("gens du voyage" et japonais)	Anti-Jr ^a	non
CO :-1,-2	Co(a-b-)	Exceptionnel	Anti-CO3	non

1.1.6 Recherche d'anticorps irréguliers

Ces anticorps sont qualifiés d'irréguliers car ils ne sont pas retrouvés spontanément chez tous les individus dépourvus de l'antigène correspondant.

A l'inverse, les anticorps du système ABO sont qualifiés d'anticorps réguliers car ils sont présents de façon naturelle dans le sérum de tous les individus, dès lors que ces derniers ne possèdent pas l'antigène correspondant.

En effet, chacun des antigènes de groupes sanguins est défini par la présence d'un anticorps dirigé contre lui, pouvant être impliqué dans un conflit immunologique en cas de transfusion incompatible, dont les conséquences sont variables et sont fonction de l'immunogénicité du ou des antigène(s) impliqué(s). L'immunogénicité désigne la capacité que possède un antigène à stimuler la synthèse d'anticorps dirigés contre lui. Cette rencontre antigène/anticorps peut être fatale, et doit à tout prix être évitée. C'est pourquoi une Recherche d'Anticorps Irréguliers (ou Agglutinines Irrégulières, RAI) doit être réalisée. Elle va permettre de détecter la présence dans le sérum du receveur d'anticorps dirigés contre des antigènes érythrocytaires.

Ce test est notamment effectué :

- chez tout patient préalablement à la transfusion afin d'éviter un choc transfusionnel.
- chez la femme enceinte en vue de prévenir d'une éventuelle incompatibilité foëto-maternelle pouvant aboutir à une allo-immunisation.
- après une transfusion, afin de s'assurer qu'aucun nouvel anticorps irrégulier ne s'est développé chez le patient (phénomène d'allo-immunisation).

Dans certains cas, en complément de la RAI, une Epreuve Directe de Compatibilité (EDC ou cross-matching) peut être pratiquée. Elle consiste à tester le sang du receveur vis-à-vis des globules rouges à transfuser. Ces produits, en cas d'absence de réactivité, sont déclarés compatibles.

En routine, le typage systématique des poches de sang ne concerne que trois systèmes de groupes sanguins : ABO, Rh et Kell, bien que d'autres systèmes aient un intérêt clinique et soient impliqués dans des réactions transfusionnelles (Figure 2).

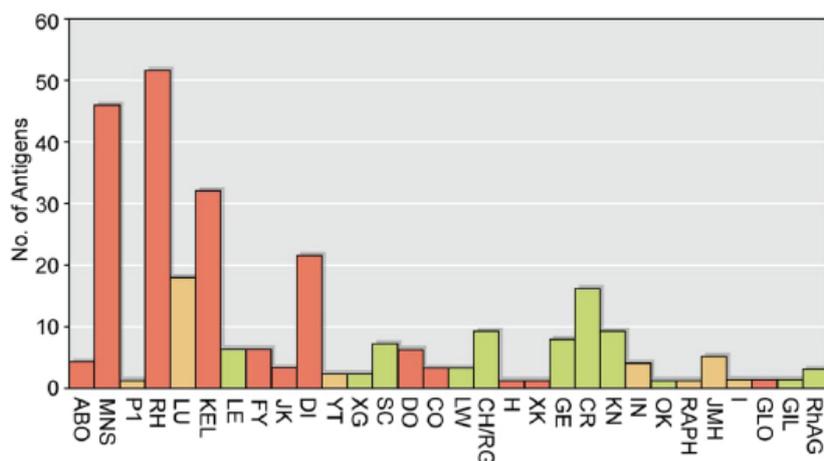


Figure 2 - Fréquence des accidents transfusionnels selon les systèmes de groupes sanguins (Anstee, 2009)
 Les différents systèmes de groupes sanguins sont classés en abscisse, et le nombre d'antigènes concernant chaque système est reporté en ordonnée. Un code couleur définit la fréquence des accidents transfusionnels pour les antigènes de chaque système : rouge = souvent ; orange = occasionnellement et vert = rarement.

1.1.7 Allo-immunisation

L'allo-immunisation caractérise l'apparition d'anticorps irréguliers chez le receveur, qui n'étaient pas présents auparavant.

Ce phénomène peut être consécutif à une transfusion sanguine, si le sang transfusé présente des caractéristiques antigéniques différentes de celles du receveur, ou bien encore à la suite d'une grossesse, lorsque les groupes sanguins de la mère et du fœtus sont différents.

Les allo-immunisations isolées font partie des 3 principaux diagnostics d'EIR d'imputabilité 2 ou 3. En 2013, elles représentent plus de la moitié des déclarations d'EIR : 54%, pour un nombre d'allo-immunisations isolées de 2238 de grade 1 ou 2, dont 1990 font suite à une transfusion de concentrés de globules rouges (tableau 6).

Tableau 6 - Répartition des allo-immunisations isolées d'imputabilité 2 ou 3 déclarés en 2013 selon le type de PSL transfusé

	CGR	Plasmas	Plaquettes	Total	%
Grade 1	1985	3	242	2230	99,6%
Grade 2	5	1	2	8	0,4%
Total	1990	4	244	2238	100%

Les enjeux de la prévention des allo-immunisations sont nombreux : éviter de compromettre un avenir obstétrical chez la femme, protéger de la survenue d'une réaction hémolytique retardée, ou bien parer un risque de blocage transfusionnel en situation d'urgence.

Des études portant sur la cinétique des anticorps ont démontré que certains n'étaient plus détectables dans les 3 mois suivant la transfusion. Cette cinétique de disparition est également fonction de la spécificité de l'anticorps (Lefrère & Schved, 2010).

1.2 Méthodes de groupage

1.2.1 Sérologie : méthode conventionnelle

Les techniques utilisées en laboratoires dans le but d'établir des groupages sanguins reposent essentiellement sur le principe de l'agglutination. Elle peut être définie comme la formation d'amas de particules portant un antigène sous l'action d'un anticorps spécifique. Cette réaction antigène/anticorps qui est due à l'interaction entre les épitopes de l'antigène et les paratopes de l'anticorps, va permettre un rapprochement des particules portant l'antigène et ainsi former des agrégats, aussi appelés agglutinats. Ce principe d'agglutination immunologique a été découvert par Gruber et Durham à la fin du 19^{ème} siècle sur des suspensions bactériennes.

S'agissant des hématies, on parle alors d'hémagglutination, les antigènes de groupes sanguins étant portés par les érythrocytes.

Différentes variantes de ce test d'agglutination existent, selon ce qui doit être mis en évidence. On distingue notamment le Test Direct à l'Antiglobuline et le Test Indirect à l'Antiglobuline.

Le Test Direct à l'Antiglobuline (TDA), ou Test de Coombs Direct (anciennement appelé Réaction de Coombs directe) est utilisé pour mettre en évidence des anticorps déjà fixés sur les hématies. Ces hématies complexées aux anticorps sont directement incubées avec l'antiglobuline afin de détecter ou non une agglutination, dans le cadre de la maladie hémolytique du nouveau-né, du diagnostic des anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI), ainsi qu'à la suite d'une réaction transfusionnelle.

Le Test Indirect à l'Antiglobuline (TIA), ou Test de Coombs Indirect (anciennement appelé Réaction de Coombs indirecte) est caractérisé par une première étape de fixation : celle de l'anticorps recherché sur des globules rouges connus (pour la mise en évidence d'un anticorps dans un sérum et pour la réalisation d'Epreuve Directe de Compatibilité), ou bien celle de l'anticorps connu sur des globules rouges dont on souhaite déterminer le phénotype de groupe sanguin (pour la mise en évidence d'un antigène).

Concernant la mise en évidence d'un anticorps dans un sérum (RAI), le sérum inconnu est mis en présence d'érythrocytes portant un antigène connu afin que l'anticorps se fixe sur les globules rouges, qui sont alors qualifiés de « sensibilisés ». Puis une incubation avec de l'antiglobuline permet de mettre en évidence cette éventuelle sensibilisation. Si une agglutination peut être observée, la réaction est positive, l'anticorps s'est fixé sur les globules rouges et est donc présent dans le sérum.

Pour l'Epreuve Directe de Compatibilité, le sérum du patient est directement mis en présence des érythrocytes que l'on souhaite transfuser. Une réaction positive se traduit par le fait qu'il existe un anticorps dans le sérum du patient susceptible d'entraîner une hémolyse des globules rouges transfusés (sans avoir de précisions sur le groupe sanguin concerné). Il faut donc envisager d'utiliser un concentré de globules rouges provenant d'un autre donneur.

Enfin, concernant la mise en évidence d'un antigène, un anticorps connu est mis en présence de l'échantillon test contenant les érythrocytes à caractériser. Si la réaction est positive, l'antigène correspondant à l'anticorps connu est présent sur les globules rouges testés. Cette méthode est utilisée pour la détermination des phénotypes de groupes sanguins.

1.2.1.1 Avantages

Ces techniques sérologiques sont utilisées depuis plusieurs décennies en tant que techniques de référence concernant le groupage sanguin. En effet, les protocoles sont simples, rapides et peu onéreux du fait du peu d'équipement nécessaire. En outre, ces techniques présentent une spécificité et une sensibilité satisfaisantes pour la majorité des

transfusions, ce qui en fait une méthode appropriée à un environnement de diagnostic clinique (Reid, 2009). La sérologie reste donc la méthode de référence afin de s'assurer ou non de la présence d'antigènes de groupes sanguins à la surface des hématies (Tournamille, 2013).

1.2.1.2 Inconvénients

Toutefois, plusieurs inconvénients découlent des techniques sérologiques (Reid, 2009). Un matériel source à risque biologique (pour la production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux), un coût des réactifs qui ne cesse d'augmenter, l'indisponibilité de certains anticorps, limités en volume et/ou faiblement réactifs sont tout autant de problèmes ayant pour conséquence un petit nombre de donneurs typés sur un petit nombre d'antigènes de groupes sanguins, limitant ainsi la capacité à constituer des inventaires de sang antigène-négatif.

De plus, les techniques sérologiques ne donnent qu'un résultat indicatif sur le risque concernant la maladie hémolytique du nouveau-né, et montrent un caractère restrictif sur la détermination de la zygote RHD. Les patients polytransfusés ou récemment transfusés représentent une catégorie relativement compliquée à typer sérologiquement, dû à la présence d'hématies du donneur dans le sang du patient, ce qui rend l'interprétation difficile.

1.2.2 Emergence des méthodes de génotypage érythrocytaire

Cette émergence a été possible grâce à l'essor des connaissances moléculaires relatives aux groupes sanguins pour pallier aux limites de la sérologie. Le but est d'identifier des variations dans la séquence nucléotidique, pouvant concerner un ou plusieurs nucléotides. La plupart des systèmes de groupes sanguins sont des systèmes bialléliques et sont différenciés sur la base d'un seul nucléotide (Figure 3). Il est donc nécessaire d'analyser les séquences d'ADN afin de déterminer si le patient est homozygote ou hétérozygote pour chaque système de groupe sanguin d'intérêt.

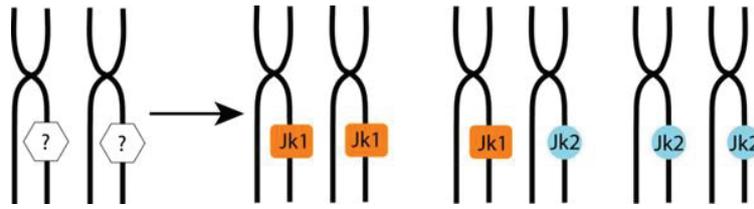


Figure 3 - Exemple du système biallélique Kidd et ses génotypes associés

Dans la mesure où le test serait raisonnable en coût et en durée, le génotypage érythrocytaire est un outil de choix par rapport aux méthodes sérologiques et présente certains avantages non négligeables (Reid, 2009) tels que :

- il peut être aisément automatisé, permettant ainsi un criblage en masse
- plusieurs marqueurs peuvent être testés simultanément sur un même échantillon, on qualifie alors le test de « test multiparamétrique »
- l'interprétation des résultats peut être informatisée et les données enregistrées dans une base de données donneurs/patients
- il présente un haut potentiel afin de faire correspondre génotypiquement le sang du donneur et le sang du patient
- il ne requiert pas de réactifs d'origine biologique et la plupart du temps ceux-ci peuvent être achetés prêts à l'emploi

1.2.3 Applications du génotypage érythrocytaire étendu

Que ce soit dans l'optique de compléter la sérologie, ou même de la remplacer complètement par des méthodes de typage moléculaire, les applications du génotypage érythrocytaire étendu sont nombreuses, outre le fait de pouvoir déterminer la fréquence des polymorphismes de groupes sanguins dans une population.

Chez un patient, il permettrait notamment (Anstee, 2009; Reid, 2009) :

- d'identifier un fœtus à risque pour la maladie hémolytique du nouveau-né
- de différencier les allo-anticorps des auto-anticorps
- de détecter un antigène faiblement exprimé pour lequel le patient est incapable de produire des anticorps face aux hématies antigène-positif transfusées
- d'identifier les bases moléculaires de résultats sérologiques peu communs
- de déterminer la zygote *RHD*

De plus, le typage moléculaire permettrait un groupage sanguin lorsque la solution d'anticorps est indisponible ou faiblement réactive, et lorsque le patient a subi une transfusion récente ou encore une transplantation de cellules souches allogéniques.

Concernant les donneurs, le génotypage érythrocytaire étendu revêt plusieurs avantages (Reid, 2009):

- le criblage en masse pour augmenter l'inventaire de sang antigène-négatif
- détecter des gènes codant des antigènes faiblement exprimés
- trouver des donneurs dont les érythrocytes sont dépourvus d'un antigène de haute prévalence

Le fait d'augmenter l'inventaire de sang antigène-négatif grâce au génotypage érythrocytaire étendu n'est pas sans intérêt dans l'optique d'améliorer le soin des patients (Reid, 2009). En effet, la morbidité et la mortalité dues aux réactions transfusionnelles seraient réduites, sans engendrer de coût supplémentaire puisque le coût d'investigation et de traitement d'un patient subissant une réaction transfusionnelle serait remplacé par le coût du criblage de sang antigène-négatif. Il serait désormais possible de trouver la poche de sang la plus adaptée pour les patients transfusés de façon chronique ou ceux présentant une anémie hémolytique auto-immune.

De plus, il pourrait être préconisé de fournir un concentré de globules rouges dépourvus de certains antigènes pour lesquels il n'y a pas d'anticorps pour le criblage.

Enfin, il serait possible de transfuser à un patient un concentré de globules rouges qui concorde pour des phénotypes comme RHD faibles et ainsi être en mesure de conserver les poches RHD négatif pour les patients RHD négatifs exclusivement.

1.2.4 Le génotypage érythrocytaire : une routine ?

Tout comme les méthodes sérologiques, les techniques de génotypage érythrocytaire présentent également des inconvénients (Reid, 2009; Tournamille, 2013) :

- le test peut prendre plusieurs heures

- plusieurs génotypes peuvent être responsables du même phénotype, en particulier avec les phénotypes qualifiés de « nuls », ce qui implique de connaître le fonctionnement des bases moléculaires des groupes sanguins
- des difficultés d'interprétation peuvent exister, notamment pour les gènes homologues comme *RHD* et *RHCE*

Enfin, la limite majeure des techniques de génotypage érythrocytaire est le fait que les résultats obtenus reflètent seulement une prédiction de la présence ou de l'absence d'un antigène donné. Il est d'ailleurs d'usage de recommander de confirmer le résultat par un test sérologique, surtout concernant l'absence d'un antigène.

Mais le diagnostic moléculaire basé sur les analyses ADN est déjà utilisé en routine afin de mettre en évidence plusieurs diagnostics : cancer, détection et classification des micro-organismes, diagnostic prénatal, et pharmacogénomique. Ces analyses impliquent souvent la détection de SNPs ou bien de mettre en évidence un nombre précis de copies d'un gène. Dans ce cadre, les puces à ADN sont un outil de premier choix. Leur utilisation est déjà relativement répandue en médecine transfusionnelle dans les banques de sang pour la détection des virus HIV, et des hépatites B et C.

Il existe cependant encore beaucoup de réticences concernant la mise en place du génotypage érythrocytaire en routine, et notamment sur le fait qu'il puisse se substituer à la sérologie. Aux vues des évolutions notables des techniques de génotypage face aux limites de la sérologie, atteintes depuis déjà plusieurs dizaines d'années, nul doute qu'à terme, le génotypage remplacera la sérologie, sauf peut-être pour le groupe ABO pour lequel la sérologie est très bien définie, simple et peu chère.

1.3 Solutions de génotypage érythrocytaire

1.3.1 Etat de l'art

Aujourd'hui, 35 systèmes de groupes sanguins, représentant plus de 300 antigènes sont répertoriés par l'ISBT. La plupart de ces systèmes de groupes sanguins ont été clonés et séquencés, permettant ainsi de connaître les bases moléculaires de ces systèmes, qui résultent pour la grande majorité de polymorphismes sur un seul nucléotide (SNP).

Les érythrocytes portant à leur surface un antigène particulier peuvent déclencher une réponse immunitaire s'ils sont introduits dans le système sanguin d'un receveur qui ne le possède pas. C'est cet anticorps produit durant la réponse immunitaire qui peut être problématique et impliqué dans les phénomènes d'incompatibilité donneur / patient, d'incompatibilité fœto-maternelle, ainsi que d'anémie hémolytique auto-immune. Cette réponse immunitaire peut être immédiate ou retardée et, dans certains cas, fatale. C'est la raison pour laquelle du sang antigène-négatif est requis pour permettre de minimiser les risques transfusionnels.

Depuis des décennies, la méthode de référence pour le groupage sanguin repose sur la technique de l'hémagglutination. C'est une méthode simple pour les groupes sanguins majeurs, dotée d'une sensibilité et d'une spécificité appropriées à un environnement de diagnostic clinique. Cependant, comme mentionné auparavant, cette méthode montre ses limites lorsqu'il s'agit de la détermination de groupes sanguins rares dans le but de respecter la meilleure concordance possible entre le patient et le donneur. Et lorsqu'il devient nécessaire de réaliser un typage moléculaire étendu de l'échantillon de sang, le recours aux techniques de biologie moléculaire s'avère nécessaire. Quelques une des techniques ci-après font l'objet d'un article de revue paru en 2013 (Boccoz *et al*, 2013), et d'un chapitre de livre paru en 2015 (Boccoz *et al*, 2015a) (en annexe).

1.3.2 Tests basés sur la PCR

Cette technique a révolutionné le domaine de la génétique moléculaire, permettant la reproduction d'une séquence spécifique d'ADN d'une manière exponentielle. A la suite de l'extraction de l'ADN, la réaction de PCR est composée de trois étapes (voir figure 4):

- Dénaturation : le double brin d'ADN est dissocié en deux molécules simples brins grâce à l'action de la chaleur. Cette étape est généralement réalisée à une température de 95°C pendant 30 secondes.
- Hybridation : lors de cette étape, des amorces spécifiques de la région à amplifier s'hybrident sur leur séquence complémentaire. La température dépend de la température de fusion des amorces choisies, mais l'intervalle classique utilisé s'étend de 55 à 65°C.

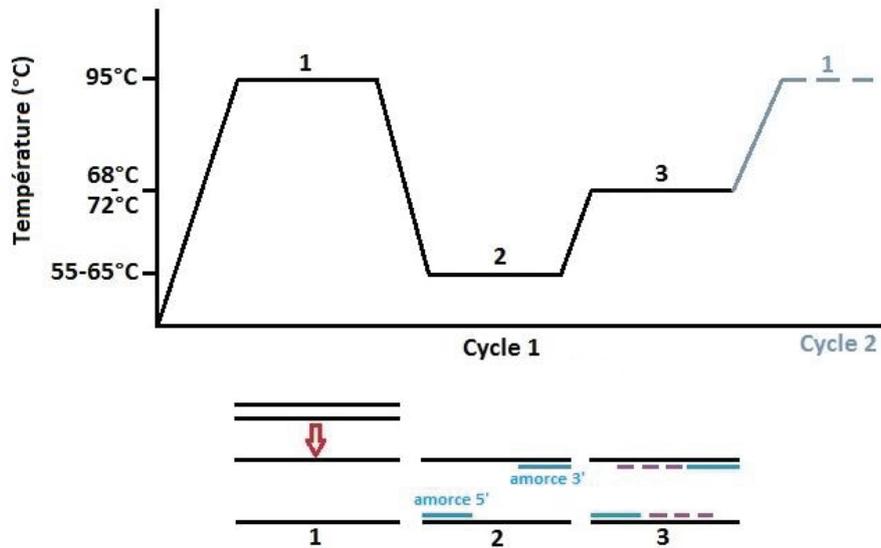


Figure 4 - Représentation des différentes étapes d'une PCR

- Extension : entre 68 et 72°C, une enzyme, l'ADN polymérase, synthétise le brin complémentaire suivant les amorces fixées. La durée de cette étape dépend de la longueur du brin à synthétiser, mais on considère une vitesse moyenne de l'ADN polymérase s'élevant à 1kb/minute.

Ces trois étapes sont répétées un nombre de fois défini (en moyenne 30 fois), ce qui résulte en un nombre de copies d'ADN augmentant de façon exponentielle au fur et à mesure des cycles.

Avant la première étape de dénaturation, une étape de dénaturation initiale est généralement réalisée afin de permettre aux longs fragments de se dissocier, surtout lorsque le matériel de départ est constitué d'ADN génomique. Cette étape permet aussi l'activation de la polymérase si cette dernière présente la caractéristique d'être activée par la chaleur (hot-start polymérase).

De la même manière, une étape d'extension finale est généralement ajoutée à la fin de la répétition des cycles pour permettre la terminaison de toutes les polymérisations en cours.

Après l'amplification, les produits synthétisés doivent être analysés. Différentes méthodes peuvent être utilisées, en partant de l'électrophorèse sur gel d'agarose qui est une technique à bas-débit, jusqu'au système haut-débit des puces à ADN.

1.3.2.1 *Bas débit*

1.3.2.1.1 PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism : Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction)

Cette technique est pertinente seulement si le SNP étudié fait apparaître ou disparaître un site de restriction. En effet, la PCR est utilisée pour amplifier la région d'intérêt incluant le SNP, suivie d'une étape de digestion à l'aide d'une enzyme de restriction. Ces enzymes sont hautement spécifiques et clivent l'ADN au niveau d'un site de restriction, caractérisé par une succession de nucléotides formant une séquence unique reconnue par l'enzyme.

Les résultats sont généralement visualisés par électrophorèse sur gel (agarose ou polyacrylamide) et des fragments de différentes tailles sont obtenus, reflétant la présence ou l'absence du site de restriction, et donc du SNP d'intérêt. Ces résultats sont comparés à des échantillons connus (homozygotes pour chaque allèle et hétérozygote) afin de calibrer l'analyse.

1.3.2.1.2 AS-PCR (Allele-Specific-PCR : PCR Allèle Spécifique) ou SSP-PCR (Sequence-Specific-Priming-PCR : PCR Amorce Spécifique de la Séquence)

Cette méthode requiert au minimum deux réactions par échantillons d'ADN. Chaque réaction contient une amorce spécifique du gène qui est commune aux deux allèles, et une amorce spécifique de la séquence d'un des deux allèles. Si la séquence complémentaire de l'amorce spécifique de l'allèle n'est pas présente, l'amorce ne s'hybride pas sur l'ADN et aucune polymérisation n'est réalisée. Les résultats des deux réactions sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose. Comme l'absence de produit PCR reflète l'absence de l'allèle en question, il est primordial d'inclure un contrôle positif afin de s'assurer que la non amplification provient bien de l'absence de l'allèle et non d'un problème dans la réaction ou le cycle de la PCR.

1.3.2.2 Moyen débit

1.3.2.2.1 PCR multiplexe

Cette technique a l'avantage de permettre l'analyse de plusieurs SNPs simultanément, contrairement à la PCR-RFLP et à l'AS-PCR, par l'utilisation de plusieurs couples d'amorces. Le nombre de réactions, le temps et les quantités de réactifs nécessaires sont donc réduits de façon drastique.

Le principal problème de la PCR multiplexe réside dans le degré de multiplexage. En effet, l'augmentation du nombre de couples d'amorces favorise l'émergence d'hybridations non spécifiques. L'optimisation de la réaction de la PCR multiplexe peut alors se révéler fastidieuse, notamment car les températures d'hybridation des amorces (T_m) doivent être similaires, afin de ne pas favoriser l'appariement d'un couple au détriment d'un autre.

En règle générale, les fragments générés sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose ou par électrophorèse capillaire où ils sont différenciés en fonction de leur taille.

En 2012, Jungbauer *et al.* ont publié un article dans lequel ils décrivent le développement d'un test de PCR multiplexe afin de génotyper 35 antigènes de groupes sanguins (Jungbauer *et al.*, 2012). Le protocole consiste en 6 réactions distinctes, chacune avec 5 à 7 couples d'amorces. Une amorce allèle-spécifique est utilisée dans chaque couple. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et différenciés selon leur taille. Sur une plaque 96 puits, seize patients peuvent ainsi être génotypés pour 35 antigènes de groupes sanguins. Pour tous les échantillons et marqueurs testés, une concordance de 100% a été mise en évidence en comparant les génotypes obtenus et les phénotypes préétablis. Ils ont également comparé le coût d'un typage par sérologie (35 à 39 euros par donneur pour 20 antigènes de groupes sanguins) par rapport à leur technique (15 euros par donneur pour 35 antigènes de groupes sanguins). Ramené à un antigène de groupe sanguin, le typage sérologique coûte entre 1,75 (typage automatisé) et 1,90 euros (typage manuel), et le génotypage approximativement 0,43 euros.

C'est l'une des nombreuses études démontrant la pertinence du génotypage en comparaison avec la sérologie, du point de vue du coût, du débit, et du fait qu'il n'y a qu'environ 20 antigènes de groupes sanguins pour lesquels des réactifs sérologiques permettent le typage (Jungbauer *et al*, 2012).

Kengkate et al. ont utilisé la même technique afin de génotyper les antigènes plaquettaires humains 1 à 7 et 15 dans la population Thaï (Kengkate *et al*, 2012). Wagner *et al*. l'ont aussi utilisée afin de cribler des donneurs possédant des phénotypes rares (Wagner *et al*, 2008).

1.3.2.2.2 PCR en temps réel

C'est un des systèmes pouvant être considéré comme un biocapteur du fait de son système de détection autonome. Le principe repose sur la technique d'amplification de l'ADN par PCR, mais l'étape d'extension est détectée et mesurée en temps réel. Pour cela, il existe trois méthodes principales :

- L'utilisation de SYBR® green, un agent intercalent non spécifique qui se positionne à l'intérieur de la double hélice en formation lors de l'extension et émettant de la fluorescence. Le multiplexage n'est ici pas possible mais la technique a déjà été utilisée pour le génotypage érythrocytaire (Novaretti *et al*, 2010; Sousa *et al*, 2007).
- Les sondes TaqMan, possédant un fluorophore à une extrémité, et un quencher à l'autre extrémité. Dans la configuration initiale, le quencher capte la fluorescence émise par le fluorophore et aucun signal n'est détecté. En présence de l'ADN cible, la sonde TaqMan s'hybride sur la région complémentaire au niveau du brin d'ADN et durant la phase d'extension, la sonde est hydrolysée par l'action de l'ADN polymérase. La proximité entre le fluorophore et le quencher est rompue, permettant ainsi la détection de la fluorescence émise par le fluorophore, directement proportionnelle à la quantité d'ADN cible et de fluorophore présents dans la réaction.

Le multiplexage est possible mais limité au nombre de molécules fluorescentes différentes actuellement commercialisées mais également au nombre de signaux fluorescents différents pouvant être détectés simultanément sans interférence.

En 2009, Atamaniuk *et al.* ont comparé trois méthodes de biologie moléculaire dans le but de prédire le génotype *RhD* du fœtus dans le plasma maternel et ont conclu que la méthode faisant intervenir ce type de sonde était l'une des plus fidèles (Atamaniuk *et al.*, 2009).

- La détection par FRET (Förster Resonance Energy Transfert ou Transfert d'Énergie entre molécules fluorescentes) où deux sondes sont utilisées : l'une avec un fluorophore transmetteur lié à son extrémité 3', et l'autre avec un fluorophore accepteur lié à son extrémité 5'. Ces deux sondes sont choisies pour s'hybrider à leur séquence cible de sorte que les deux fluorophores sont séparés par seulement quelques nucléotides (1 à 5 nucléotides). Lorsque les deux sondes sont séparées, le fluorophore transmetteur n'émet qu'une fluorescence de faible intensité alors que lorsqu'elles sont hybridées et proches (moins de 10 nucléotides d'espacement), la proximité des deux fluorophores permet le transfert d'énergie du transmetteur à l'accepteur. La fluorescence est mesurée durant l'hybridation et est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée. Etant donné que les sondes ne sont pas hydrolysées, il est possible de réaliser des courbes de fusion à la fin de la réaction. Ansart-Pirenne *et al.* ont utilisé cette méthode pour génotyper l'allèle *FY*X* sur 199 échantillons d'ADN (Ansart-Pirenne *et al.*, 2007).

D'autres sondes existent permettant une mesure en temps réel de la fluorescence comme les sondes Molecular Beacons ou Scorpions, mais leur conception est fastidieuse et le coût élevé.

1.3.3 Tests non basés sur la PCR

L'inconvénient majeur de ces techniques de séquençage réside dans l'investissement conséquent à réaliser afin d'acquérir l'équipement nécessaire. La prise en main et le traitement des données peuvent se révéler fastidieux et nécessiter du temps, du fait du nombre de séquences obtenues à la fin de l'essai.

Cependant, l'avantage incontestable de ces deux techniques se tient dans le fait que le résultat observé ne reflète pas la présence de tel ou tel nucléotide à la position du SNP

(à contrario de l'hybridation ou non d'une sonde) mais est un résultat direct puisque c'est la séquence nucléotidique qui est déterminée à l'aide de ces méthodes.

1.3.3.1 Séquençage Sanger

Pour cette méthode, une amorce complémentaire de la région d'intérêt est utilisée. La polymérisation est réalisée par le fragment de Klenow (ADN polymérase sans son activité exonucléase 5'-3'). Des didésoxynucléotides sont ajoutés. Ils ne possèdent pas de groupement OH en 3' et donc ne permettent pas l'addition d'un nouveau nucléotide et stoppent la réaction d'élongation. Chaque didésoxynucléotide est marqué d'un fluorophore spécifique émettant à une longueur d'onde définie. Le système de détection mesure la fluorescence émise et un profil spécifique est obtenu en fonction des didésoxynucléotides incorporés, permettant ainsi la détermination de la séquence recherchée.

1.3.3.2 Pyroséquençage

Ici, les désoxynucléotides ne sont pas introduits ensembles dans la réaction, mais les uns après les autres. Si le nucléotide ajouté correspond à celui attendu par l'ADN polymérase, il est incorporé par cette dernière et un pyrophosphate est libéré. Ce dernier est transformé en ATP par l'action de l'ATP sulfurylase et est ensuite utilisé par la luciférase pour convertir la luciférine en oxyluciférine et produire ainsi de la lumière. L'enzyme apirase élimine constamment les nucléotides non incorporés ainsi que l'ATP, permettant ainsi d'entamer un nouveau cycle avec l'addition d'un nouveau désoxynucléotide. Un Dispositif à Transfert de Charge (DTC) capture le signal émis et le reproduit sous forme de pics sur un pyrogramme. La hauteur des pics est fonction de l'intensité de la lumière émise et la séquence du fragment d'intérêt peut en être déduite. Dans le cas de l'analyse de SNPs, différents nucléotides sont incorporés à la même position et la hauteur des pics aide à identifier la présence de SNPs.

1.3.4 Systèmes Intégrés

1.3.4.1 Moyen débit

1.3.4.1.1 Technologie xMAP (Luminex)

Cette technologie (<http://www.luminexcorp.com>) est basée sur l'utilisation de matrices en suspension. Des microbilles de polystyrène jouent le rôle de support d'immobilisation pour les sondes oligonucléotidiques. Chaque bille (5,6 μM de diamètre) possède son propre codage optique permettant son identification pendant l'analyse des résultats. Deux fluorophores sont incorporés en différentes proportions dans chaque bille, leur conférant une signature optique unique. Jusqu'à 500 codes optiques différents peuvent ainsi être générés. Les billes possédant le même code forment un set, et chaque set porte une sonde oligonucléotidique spécifique.

Ces dernières sont synthétisées avec une amine à l'extrémité 5' et sont immobilisées de façon covalente à la surface des microbilles de polystyrène qui sont stables pendant au moins 6 mois (Colinas *et al*, 2000).

Le principe de cet essai est représenté figure 5. Une PCR multiplexe ciblant les régions d'intérêt est réalisée, et génère des fragments biotinylés. Le mélange réactionnel est alors transféré dans une plaque 96 puits et dénaturé à 99°C. Les produits de PCR marqués sont ensuite hybridés avec les microbilles de polystyrène pendant 45 minutes. La plaque est lavée 3 fois et incubée avec une solution de streptavidine conjuguée à la R-phycoérythrine. L'analyse est basée sur le principe de la cytométrie en flux. Lorsqu'une bille passe à travers la chambre de détection, un laser excite les fluorophores rouge et infrarouge, permettant de classer la bille parmi les différents sets existants. Un autre laser excite le fluorophore orange associé au fragment lié à la bille.

Drago *et al.* ont utilisé cette technique afin d'identifier des polymorphismes de groupes sanguins (Drago *et al*, 2009). Ils ont typé plus de 2000 patients dont 493 avec des essais en multiplex et n'ont observé aucune divergence entre les résultats obtenus et ceux de la sérologie, sauf lorsqu'un phénotype faible ou nul était en jeu.

Selon les auteurs, cette méthode comporte plusieurs avantages : une cinétique réactionnelle et une acquisition des données rapide ainsi qu'une excellente sensibilité.

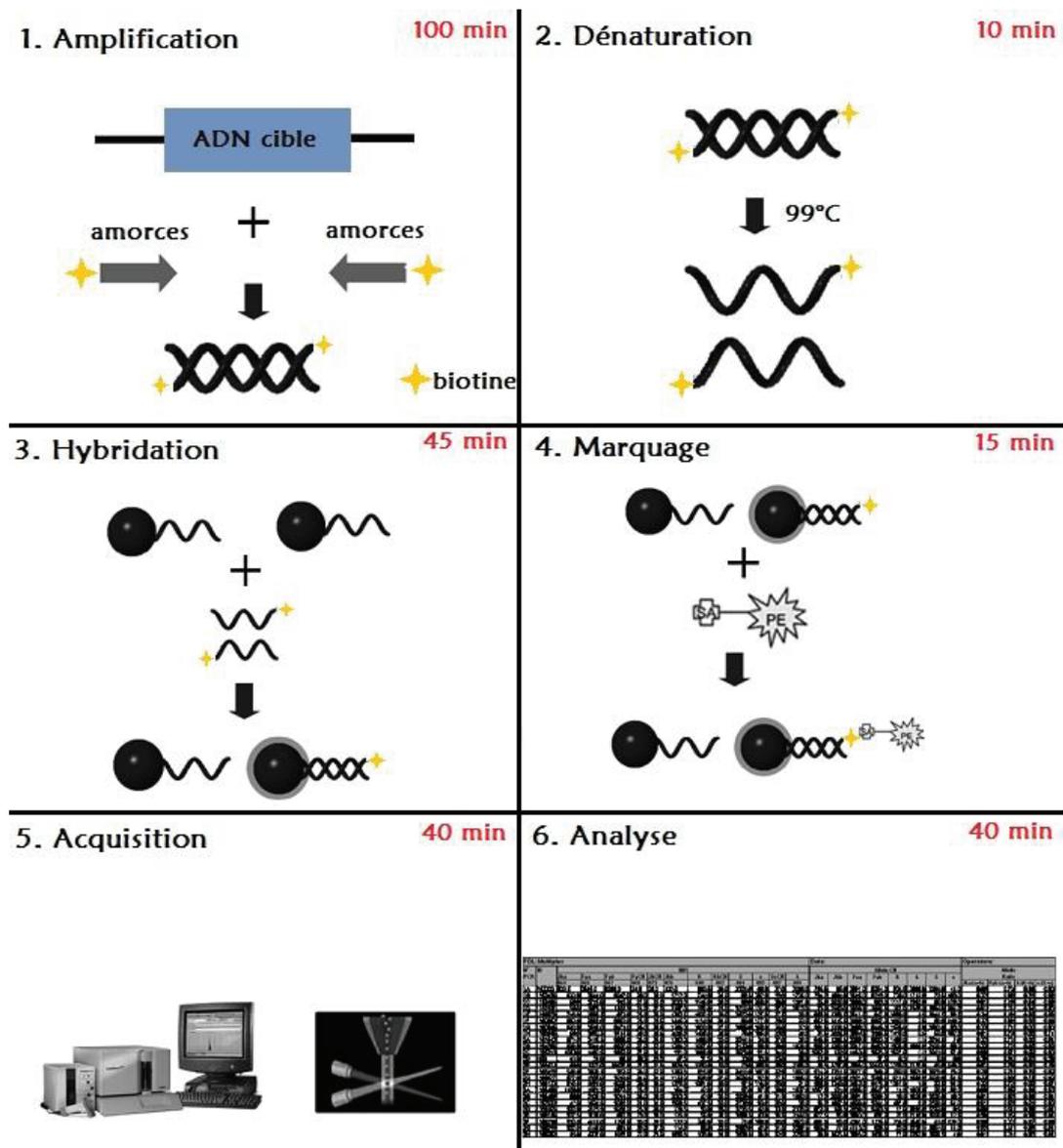


Figure 5 - Principe de la technologie xMAP (Drago et al, 2009)

En raison de sa flexibilité, les sets de sondes peuvent être adaptés selon les besoins du laboratoire. Aucune purification des amplicons n'est nécessaire et la technique permet l'utilisation d'une large gamme de concentrations d'ADN, évitant ainsi des étapes supplémentaires de mesures.

Toutefois, toujours selon les auteurs, même s'il est théoriquement possible de typer de 1 à 96 échantillons, cette technologie n'est rentable que si un grand nombre d'échantillons est analysé. Elle n'est donc pas adaptée à un laboratoire ayant une faible charge de travail. Ils ont également noté un manque d'automatisation de la méthode, notamment lors des étapes de chargement des échantillons et des différents lavages.

1.3.4.1.2 OpenArray®

Cette technique est basée sur la méthode TaqMan, décrite dans le paragraphe 1.3.2.2.2. Chaque sonde comporte un fluorophore spécifique afin de différencier chaque allèle d'un polymorphisme de groupes sanguins (<http://invitrogen.com>), comme illustré sur la figure 6. Le marqueur rapporteur VIC® est greffé à l'extrémité 5' de chaque sonde correspondant à l'allèle 1. FAM™ est quant à lui utilisé pour caractériser les sondes correspondant à l'allèle 2. Un agent stabilisant « Minor Groove Binder » (MGB) est également présent dans le mélange réactionnel et permet l'augmentation de la température d'hybridation des sondes, tout en gardant leur longueur constante. Un quencher, non fluorescent, est situé à l'extrémité 3' de chaque sonde. Comme il ne fluoresce pas, le système de PCR en temps réel peut mesurer la fluorescence du rapporteur avec précision.

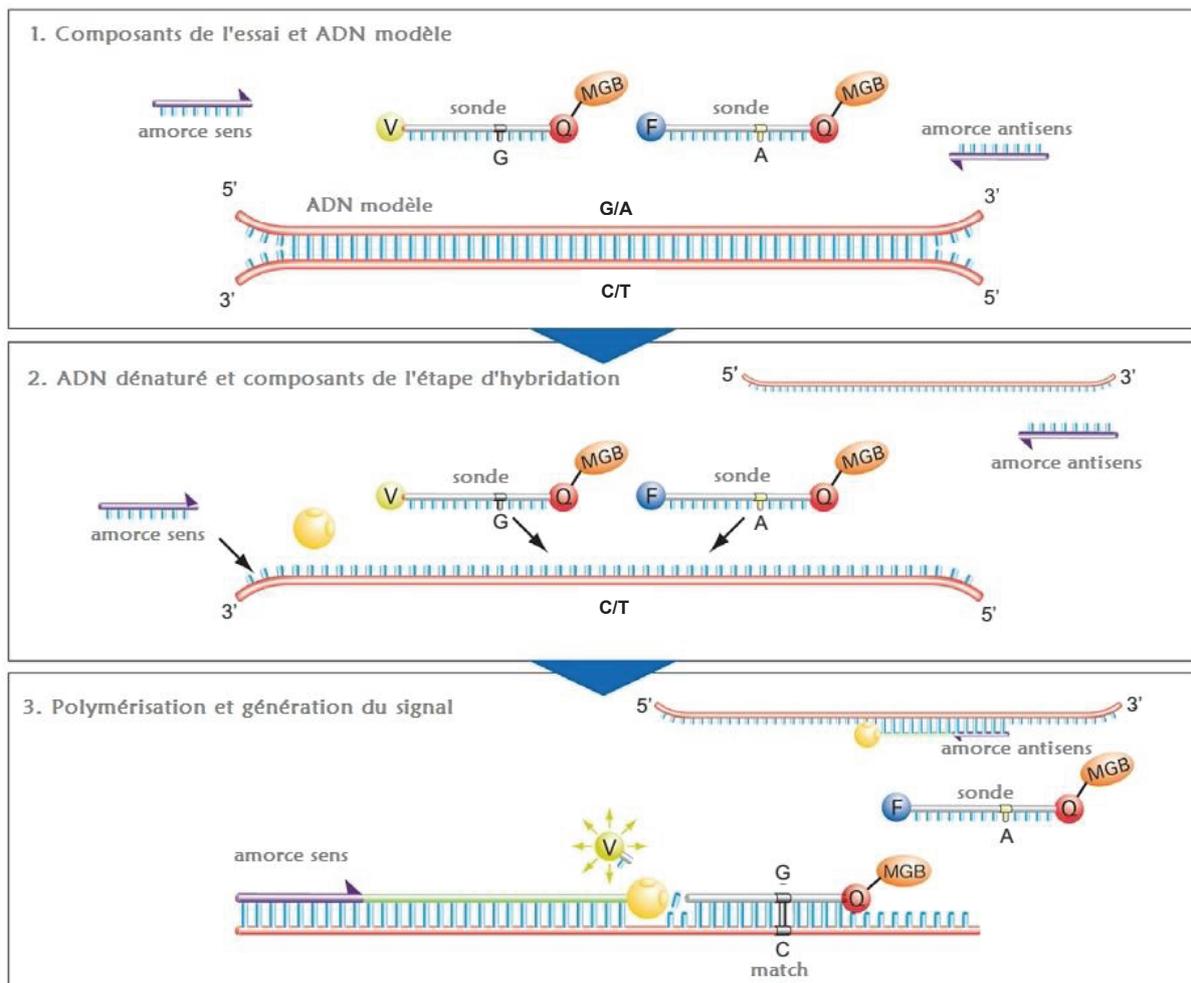


Figure 6 - Principe du système OpenArray® (www.thermofisher.com)

Hopp et al. ont utilisé cette méthode pour cribler des donneurs de sang afro-américains (Hopp *et al*, 2010). Parmi les 4270 génotypes générés par le système OpenArray®, 5 divergences ont été observées. Elles ont été résolues en réalisant une deuxième fois soit la sérologie, soit le génotypage OpenArray® ou en utilisant le résultat obtenu lors du séquençage par la méthode Sanger. Chaque échantillon a été analysé en triplicat, et une corrélation de plus de 99% a été obtenue. L'avantage principal de cette technique est le faible volume réactionnel (33 nL) et la vitesse (3 plaques pour approximativement 5h, pour un débit d'environ 9000 génotypes par série).

1.3.4.1.3 SNaPshot

SNaPshot ou mini séquençage, développé par Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com) est basé sur l'extension par un seul nucléotide. Les régions d'intérêt sont amplifiées par PCR multiplexe, les amplicons ayant tous une longueur différente. Le mélange réactionnel est purifié afin d'ôter les nucléotides non incorporés ainsi que les amorces en excès. Les amplicons sont alors mélangés à un set de « fragments d'extension ». Ce sont des fragments complémentaires à la région adjacente au SNP et qui vont s'hybrider jusqu'au nucléotide précédent ce SNP, du côté 5'. Une étape d'extension enzymatique avec un seul nucléotide est alors réalisée en présence de 4 ddNTPs marqués chacun avec un fluorophore différent. L'électrophorèse capillaire permet la détection de la fluorescence et de la longueur des fragments, menant à la détermination allélique, comme illustré sur la figure 7.

Un cycle complet permet l'analyse de jusqu'à 10 SNPs en une réaction en 24h. Le coût estimé est de 2\$ par SNP (Palacajornsuk *et al*, 2009). Un exemple de l'utilisation de cette plateforme est rapporté dans l'étude de Di Cristofaro *et al*. (Di Cristofaro *et al*, 2010). Ils ont utilisé la méthode SNaPshot pour typer 18 allèles de groupes sanguins. La PCR multiplexe amplifie 9 régions d'intérêt, avec une longueur d'amplicons allant de 96 à 986 paires de bases. Ils réalisent ensuite l'extension d'une base et analysent les données par électrophorèse capillaire grâce au logiciel GeneMapper. L'étude porte sur les groupes sanguins Kell, Duffy, MNS, Kidd, Dombrock, Cartwright et Colton, mais l'essai inclut également les allèles *FY*X*, *FY nul* et *MNS nul*.

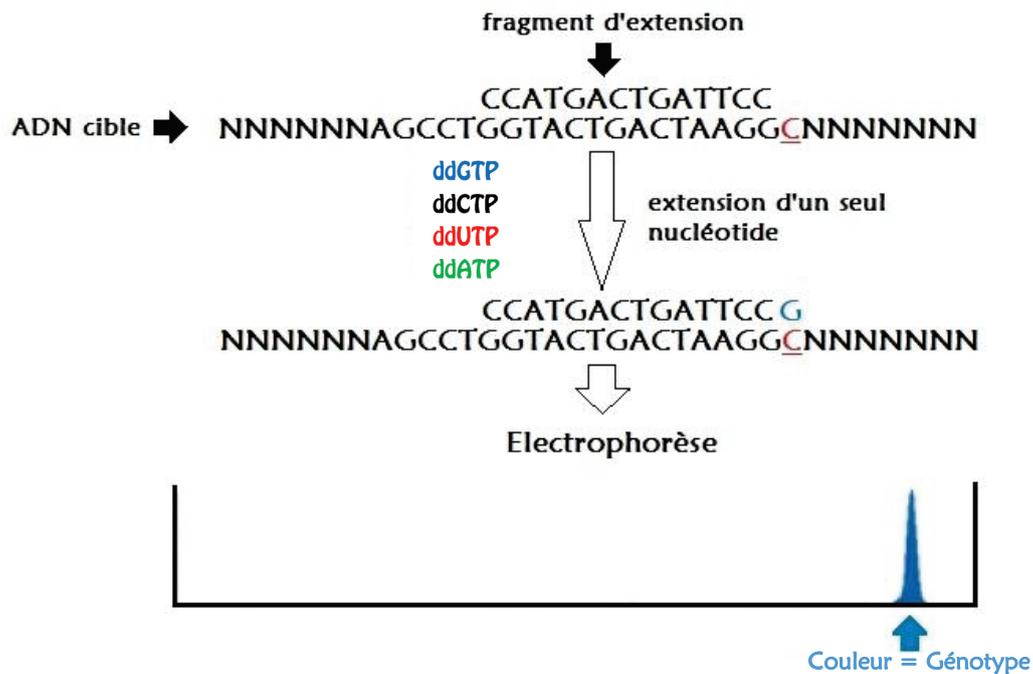


Figure 7 - Principe de la technologie SNaPshot (www.thermofisher.com)

1.3.4.1.4 Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

Cette spectrométrie de masse permet la différenciation de fragments d'ADN qui diffèrent en taille par seulement un nucléotide. Elle consiste en deux étapes :

- désorption/ionisation des fragments, induits par laser
- séparation/analyse des différentes molécules basées sur leurs propriétés physiques

Sequenom est une entreprise californienne de biotechnologies développant des outils analytiques de paillasse depuis 2008, le système MassARRAY®. C'est un équipement compact qui permet la mesure directe de la masse des acides nucléiques. Basé sur la technologie MALDI-TOF MS, il trouve ses applications pour le génotypage de groupes sanguins (<http://www.sequenom.com>).

Une étude coopérative entre la Suisse et l'Allemagne utilisant la plateforme Sequenom a été publiée en janvier 2013 (Gassner *et al*, 2013). Elle porte sur la détection moléculaire des systèmes Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS. Cette méthode a aussi été utilisée pour la caractérisation d'une collection d'antigènes de faible incidence, antigènes plaquettaires et de granulocytes, pour un total de 101 antigènes de groupes sanguins, codés par 170 allèles.

Le protocole commence par la réalisation d'une PCR multiplexe sur l'ADN génomique, suivie de l'extension d'une amorce par un seul nucléotide, et spécifique de l'allèle. Cette amorce s'hybride sur une position adjacente au SNP. Le simple brin obtenu (15 à 30 bases) est déposé sur une puce en silicium préalablement matricée. L'ensemble est alors irradié par un laser, induisant la désorption et l'ionisation des fragments amplifiés. Les molécules chargées accélèrent à travers un tube de vol en direction d'un détecteur. La séparation est faite sur la base du temps de vol. Ce temps est proportionnel à la masse des molécules individuelles. Les molécules de faible masse arrivent plus vite que les molécules dont la masse est plus importante. Un spectre de masse est obtenu à l'issue de l'analyse.

Cette technique comporte plusieurs avantages. En effet, de faibles quantités d'ADN sont requises et l'équipement est capable de déterminer directement la masse des molécules, sans aucune étape de marquage.

La plateforme Sequenom supporte jusqu'à 40 SNPs par réaction, avec une acquisition des données et une interprétation rapides. Jusqu'à 150 000 SNPs peuvent être analysés par jour. Deux formats sont disponibles : une plaque 384 puits, adaptée jusqu'à 1000 échantillons par jour, et une plaque 96 puits, optimale jusqu'à 100 échantillons par jour. En Europe, pour un système complet avec plaque 96 puits et 384 puits, le coût s'élève à 250 000 euros et 350 000 euros, respectivement. Six « modules » existent, pouvant chacun comprendre plusieurs PCR multiplexes afin de couvrir l'analyse de tous les antigènes classés dans le module. Dix PCR multiplexes différentes ont été utilisées pour couvrir tous les antigènes analysés dans cette étude. Le coût pour l'analyse des 6 modules (équivalents à 10 PCR multiplexes) s'élève à 70 euros.

Ce procédé a donné naissance à la plateforme HEMO ID (voir paragraphe 1.3.4.2.5).

1.3.4.2 Moyen à haut débit

1.3.4.2.1 BLOODChip®

La plateforme BLOODChip® est dédiée au génotypage érythrocytaire étendu et est commercialisée par Progenika (www.progenika.com), détenu par Grifols. Son développement a fait partie intégrante d'un projet collaboratif européen, le projet BloodGen (2003-2006), associant deux banques de sang (Barcelone et Prague), deux instituts de recherche académiques britanniques (Institut pour la transfusion de Bristol et l'Université de l'ouest de l'Angleterre), la fondation Sanquin (Pays-Bas), ainsi que les Universités de Ulm (Allemagne) et Lund (Suède) (Avent *et al*, 2009). Ce consortium incluait également deux industriels : Progenika Biopharma SA (Espagne) et Biotest (Allemagne), en charge de l'intégration du nouvel outil sur une plateforme d'analyse de SNP existante. Le test BLOODChip® dans sa version 2.0 permet l'analyse de 128 SNPs associés à neuf systèmes de groupes sanguins et certains antigènes plaquettaires.

Les séquences cibles sont amplifiées à partir de l'ADN génomique grâce à une PCR multiplexe par l'utilisation de sondes amplifiables (Beiboer *et al*, 2005). L'ADN extrait est mélangé avec un set d'amorces spécifiques des polymorphismes ciblés. Si la séquence cible est présente dans l'échantillon, les amorces s'hybrident sur l'ADN génomique. Une étape de lavage permet d'isoler les fragments hybridés et de les amplifier. Ces derniers sont alors marqués avec deux fluorophores, fragmentés et hybridés sur la puce BLOODChip® en conditions stringentes. La puce est composée d'une lame en verre modifiée par une matrice de sondes spécifiques immobilisées sur lesquelles les cibles viennent s'hybrider. La puce est ensuite scannée avec un microscope à fluorescence et les signaux obtenus sont analysés grâce à l'utilisation d'un logiciel dédié afin de déterminer différents scores associés aux différents allèles, permettant la détermination des génotypes. 5 heures après l'extraction d'ADN sont requises pour parvenir aux résultats.

Après des tests cliniques à petite échelle sur des donneurs présentant un phénotype rare en Espagne, Allemagne, République Tchèque et Suède, une validation sur 3000 donneurs a été réalisée et utilisée pour obtenir le marquage CE du système. Comparé à la sérologie et aux autres méthodes de typage moléculaire, les résultats obtenus mettent

en évidence une excellente performance de cette plateforme pour le génotypage érythrocytaire étendu.

1.3.4.2.2 HEA BeadChip™

Développé par BioArray Solution Ltd (détenu par Immucor), la plateforme BeadChip™ offre une solution pour le génotypage érythrocytaire étendu pour 11 systèmes de groupes sanguins ainsi qu'un panel d'antigènes plaquettaires (<http://www.immucor.com/bioarray>). Ce produit a été approuvé par la Food and Drug Administration et a obtenu le marquage CE en juillet 2010. Il a été évalué sur 4 sites hospitaliers dans le but de l'implémenter en routine (Kappler-Gratias *et al*, 2010).

C'est un test d'hybridation sur une matrice de billes (voir figure 8). Ces microbilles (3 μm de diamètre) portant des groupements acides carboxyliques sont fonctionnalisées avec des sondes oligonucléotidiques portant un bras amine d'approximativement 20 bases. Chaque bille porte environ 50 copies d'une unique sonde, dont l'extrémité 3' est spécifique à un polymorphisme cible. Les billes en suspension sont collectées (environ 4000 billes) et disposées sur un support en silicium sur lequel elles forment une monocouche. Ces matrices en silicium sont individualisées et assemblées sur lame de verre. Deux formats sont disponibles : 8 \times 1 et 8 \times 12, permettant de tester plusieurs échantillons en parallèle. Chaque bille possède un code optique qui permet son identification par imagerie spectrale et la déduction de la séquence de la sonde présente à sa surface.

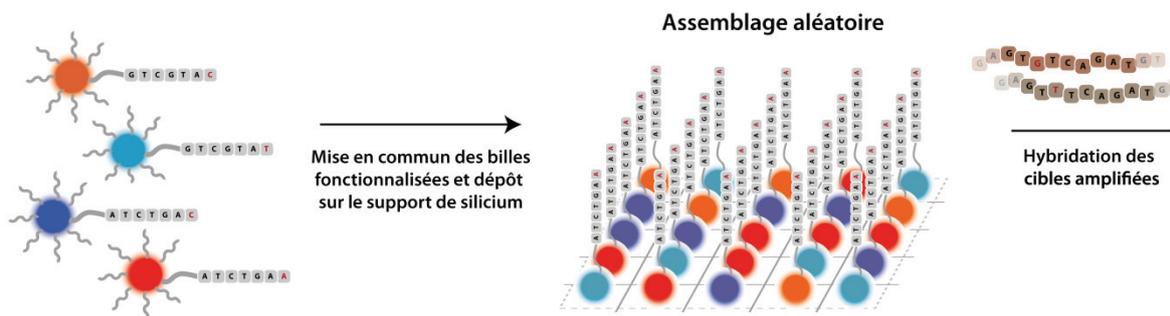
Après l'extraction d'ADN génomique, les séquences portant les polymorphismes d'intérêt sont amplifiées par PCR multiplexe. Le mélange est ensuite purifié, les produits de PCR dénaturés, hybridés sur les billes et marqués par la fluorescence par élongation spécifique de la sonde présente à la surface de la bille. Cette étape ne peut être réalisée qu'avec une correspondance parfaite entre la sonde et la cible. L'incorporation de nucléotides fluorescents marque spécifiquement chaque brin et les génotypes sont obtenus en comparant les intensités de fluorescence sur les deux allèles d'intérêt à un panel de valeurs de référence.

Les principales études de validation de l'outil HEA BeadChip™ ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de Marion Reid au laboratoire d'immunologie du New York Blood Center (Hashmi *et al*, 2005, 2007).

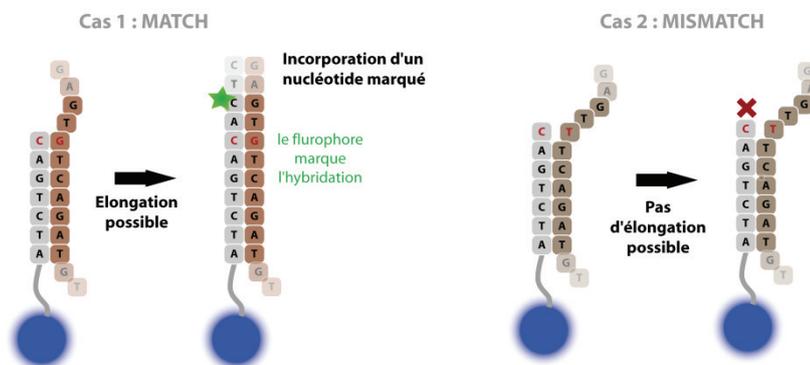
En 2007, l'équipe a présenté les résultats de l'étude menée sur 2355 patients appartenant à plusieurs groupes ethniques, portant sur la détection de 24 antigènes de groupes sanguins et un panel d'antigènes plaquettaires. Une concordance de 99,5% avec les résultats sérologiques avait alors été obtenue.

La version 1.2 du test a aussi été mise en œuvre par Kappler-Gratias *et al.* (Kappler-Gratias *et al.*, 2010) pour évaluer les méthodes moléculaires dans la caractérisation des érythrocytes utilisés comme réactifs de référence au laboratoire national français de référence.

1. ASSEMBLAGE DE LA MATRICE DE BILLES ET HYBRIDATION



2. ELONGATION ET MARQUAGE



3. LECTURE DE LA PUCE

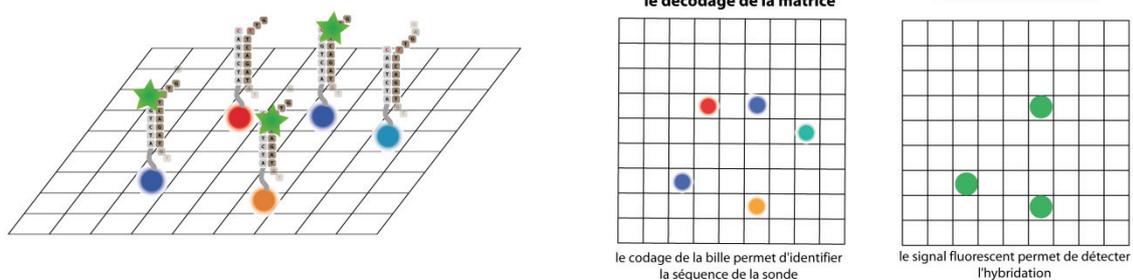


Figure 8 - Principe du test BeadChip™ (Le Goff, 2011)

Le génotypage a permis l'analyse de 34 antigènes appartenant à 11 systèmes de groupes sanguins sur un panel de 365 donneurs. La comparaison du phénotype prédit par génotypage et celui prédit par sérologie pour 25 de ces antigènes montre une corrélation de 99,95%.

Des équipes brésiliennes ont aussi rapporté l'utilisation de cet outil comme une technique de référence dans une étude évaluant l'impact du typage moléculaire étendu pour la gestion des patients multi transfusés (Guelsin *et al*, 2010) et drépanocytaires (Castilho *et al*, 2002).

En 2014, le test HEA BeadChip™ change de nom et devient le PreciseType™ HEA Molecular BeadChip Test, approuvé par la Food and Drug Administration (FDA).

1.3.4.2.3 Genome Lab SNP Stream

Commercialisée par Beckman Coulter et utilisant la technologie SNPstream® UHT développée par Orchid BioScience pour le génotypage ultra haut débit en pharmacogénomique et criblage de médicaments (Bell *et al*, 2002), cette plateforme associe une amplification par PCR multiplexe comprenant un marquage par fluorescence lors de l'étape d'élongation, suivie par une hybridation sur puce.

Les équipes canadiennes de Grégory Denomme (Toronto) et Maryse St-Louis (Québec) ont développé les outils de biologie moléculaire afin d'appliquer la technologie au génotypage érythrocytaire étendu (Denomme & Van Oene, 2005; St-Louis *et al*, 2010). La puce prend le format d'une plaque 384 puits, avec la même matrice de sondes dans chaque puits permettant ainsi de tester 384 échantillons en parallèle. Les oligonucléotides sont liés de façon covalente à un support en verre activé par le 3-mercaptopropyl-triméthoxysilane (MPTS). L'application d'un masque néoprène permet l'individualisation des 384 puits. Chaque matrice comporte 16 sondes : 4 sont des contrôles (positifs et négatifs) et les 12 autres correspondent aux SNPs d'intérêt.

Chaque test permet la détection de 2 nucléotides parmi les 4 possibles à la position du polymorphisme étudié. Pour chaque SNP, un fragment SNP-IT est utilisé. Il est construit comme suit : la séquence en 3' est complémentaire de l'une des sondes fixées au fond du puits et la séquence en 5' est complémentaire de la cible et immédiatement adjacente au SNP (figure 9).

La première étape consiste en une PCR multiplexe pour amplifier spécifiquement les séquences des polymorphismes d'intérêt à partir de l'ADN extrait. Les amplicons sont mélangés aux fragments SNP-IT avec lesquels ils interagissent spécifiquement. Ensuite, une élongation d'une base est réalisée en présence des deux nucléotides marqués, l'un par le TAMRA et l'autre par la BODIPY fluorescéine. Selon la base présente, l'élongation incorporera l'un ou l'autre des fluorophores. Le mélange réactionnel est ensuite incubé sur la puce et l'extrémité 5' du fragment s'hybride avec sa sonde complémentaire. Un lecteur de plaque permet la lecture de l'intensité de la fluorescence pour chaque sonde sur chaque spot et la déduction du génotype.



Figure 9 - Principe du test Genome Lab SNP Stream (Le Goff, 2011)

En 2005, Denomme *et al.* (Denomme & Van Oene, 2005) ont rapporté l'analyse de 372 échantillons pour 12 SNPs associés aux groupes sanguins Rh, MNS, Kell, Duffy, Kidd, Diego et un antigène plaquettaire, avec une concordance supérieure à 98% pour 11 des 12 SNPs.

En 2006, Montpetit *et al.* se sont focalisés sur l'analyse de 22 antigènes mineurs de groupes sanguins (Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS) et 3 antigènes plaquettaires (Montpetit *et al.*, 2006). Dans cette étude, les échantillons de sang ont été collectés par la méthode « FTA® cards ». De très bons résultats (concordance supérieure à 97%) ont été obtenus en dépit de concentrations très variables d'ADN issues de l'étape d'extraction.

S'en est suivie une autre étude à Hema-Quebec, portant sur le criblage de 21 000 donneurs en moins de 2 ans (St-Louis *et al.*, 2010). Une concordance de 99,6% a été obtenue et 55% des discordances ont été résolues, au bénéfice du génotypage. Cette

étude a aussi évalué l'impact de la mise en place du génotypage des groupes sanguins en routine au laboratoire (Perreault *et al*, 2009).

1.3.4.2.4 Lifecodes® RBC et Lifecodes® RBC-R

Lifecodes® (GenProbe, racheté par Immucor), intègre une PCR-RSSO (Reverse Sequence Specific Oligonucleotide) suivie d'une détection reposant sur la technologie Luminex (voir paragraphe 1.3.4.1.1). Le test RBC permet la détection de 25 SNPs associés aux groupes sanguins Kell, Kidd, Duffy, MNS, Rh et Dombrock, tandis que le test RBC-R comprend l'analyse du même nombre de SNPs, mais associés aux groupes sanguins Dombrock, Colton, Scianna, Lutheran, Diego, Landsteiner-Wiener, Cartwright, Knops et Cromer.

A la suite du rachat de GenProbe, Immucor a pris la décision de stopper la commercialisation des tests Lifecodes®, au profit du PreciseType™ HEA Molecular BeadChip Test.

1.3.4.2.5 HEMO ID

Proposé par Agena Bioscience, ce système repose sur la technologie MassARRAY® (voir paragraphe 1.3.4.1.4). Il permet d'analyser jusqu'à 167 allèles codant 101 antigènes sur 16 systèmes de groupes sanguins. 6 modules permettant l'analyse de différents groupes d'allèles définis sont disponibles.

Agena Bioscience (www.agenabio.com) a récemment acquis l'entreprise Sequenom et offre donc l'utilisation du système MassARRAY®, méthode quantitative pour la détection d'acides nucléiques via la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour du génotypage haut débit dans plusieurs domaines d'application (génotypage érythrocytaire, cancer, pharmacogénomique, épigénétique...).

Cette plateforme a été présentée au 33^{ème} congrès de l'ISBT à Séoul (31 mai au 5 juin 2014) et fait suite à une étude de la Croix Rouge Suisse publiée dans la revue *Transfusion*. Meyer *et al.* ont en effet génotypé et sérotypé plus de 4000 donneurs sur les groupes sanguins Kell, Kidd et Duffy (Meyer *et al*, 2014). Une concordance supérieure à 99% entre le sérotypage et le génotypage par le système HEMO ID a été mise en évidence. Les discordances observées sont en premier lieu le fait de profils sérologiques erronés,

et pour 3 cas, il s'agit de nouveaux allèles silencieux qui ont été découverts. L'étude conclut que le sérotypage devrait être remplacé par le génotypage pour les donneurs de sang sur les groupes sanguins Kell, Kidd et Duffy. Plus récemment, Meyer *et al.* ont utilisé ce système pour génotyper le sang de 384 donneurs sur 46 antigènes de groupes sanguins et 4 antigènes plaquettaires (Meyer *et al.*, 2015).

Concernant le débit, jusqu'à 3000 échantillons peuvent être analysés en 6 à 8h (dépend de la vitesse de changements de températures du thermocycleur). La durée des manipulations manuelles à l'intérieur du protocole avoisine les 60 minutes.

Les modules HEMO ID contiennent tous les réactifs et composants nécessaires à l'analyse et l'interprétation d'un échantillon de sang. Une quantité de 10 ng par puits peut être utilisée, purifiés par n'importe quelle méthode standard. La PCR multiplexe est ensuite réalisée puis la SAP est ajoutée afin de déphosphoryler les nucléotides restants dans le mélange.

Des amorces d'extension sont ajoutées dans chaque puits, accompagnées par la polymérase ainsi que des nucléotides de terminaison. Les amorces sont dessinées pour s'hybrider immédiatement en amont du polymorphisme d'intérêt. L'enzyme procède à l'extension de chaque amorce en incorporant une base, complémentaire du SNP.

Les produits sont ensuite dessalés, et une quantité d'environ 10 nL est transférée sur la puce SpectroCHIP® (support en silicium pré-spotté avec des matrices en cristal facilitant la spectrométrie de masse). Ce transfert est réalisé grâce au MassARRAY Nanodispenser. Les puces ainsi chargées sont insérées dans l'analyseur MassARRAY (spectromètre de masse). Les molécules sont irradiées par laser, induisant leur désorption et leur ionisation. Elles sont ainsi chargées positivement et accélèrent à l'intérieur d'un tube de vol jusqu'à un détecteur. Le temps pour arriver au détecteur est proportionnel à la masse de la molécule. A la suite du traitement des données, un spectre est produit, représentant l'intensité relative en fonction de la masse des molécules. Un rapport est alors généré.

L'inconvénient principal de cette plateforme est l'équipement coûteux requis pour l'analyse. Cependant, une fois l'investissement réalisé, cette méthode est plus rentable que d'autres plateformes de génotypage haut débit, et les coûts des tests sont comparables, voire inférieurs à la sérologie (Meyer *et al.*, 2014).

1.3.4.2.6 RBC Fluogene

Ce système est commercialisé par Inno-Train GmbH, entreprise spécialisée dans les domaines de la médecine transfusionnelle et de l'immunogénétique (www.inno-train.de). Elle produit et distribue des tests moléculaires de diagnostic in vitro pour le typage sanguin depuis 1998.

RBC Fluogene est un test marqué CE qui combine la PCR-SSP (voir paragraphe 1.3.2.1.2) et une PCR en point final avec détection par fluorescence. L'analyse est basée sur un système de sondes TaqMan modifiées (voir paragraphe 1.3.2.2.2) et détectées par le FluoVista Analyser.

Seulement 7,5 ng d'ADN sont nécessaires par réaction. Tous les réactifs sont inclus et pré-aliquotés et le test exclut toute étape de lavage.

Toutefois, aucune étude n'a été trouvée afin de commenter cette plateforme, ses avantages, ses inconvénients et la mettre en comparaison avec d'autres techniques existantes.

Cette liste et les études mentionnées qui y sont associées montrent que chaque plateforme possède ses avantages et ses inconvénients. Les principaux inconvénients rencontrés sont relatifs au temps d'obtention des résultats, à l'investissement financier à réaliser pour l'achat et l'installation de la plateforme, et au coût de revient d'un test.

C'est dans l'optique de diminuer au maximum ces inconvénients que le développement d'une nouvelle plateforme de génotypage s'est amorcé.

2 Développement d'une nouvelle plateforme de génotypage érythrocytaire haut débit : *HIFI BLOOD 96™*

Le développement d'une telle plateforme a au départ été initié par les besoins de l'Etablissement Français du Sang. Il s'est donc inscrit dans le projet « ANR-HiFi-assays » d'une durée de trois ans et d'un budget de 1,5 millions d'euros. Le développement réalisé et présenté dans la thèse de Melle Gaëlle LE GOFF a été réalisé en collaboration avec l'Etablissement Français du Sang. La suite de la mise au point qui fait l'objet de ce manuscrit a été exclusivement réalisée chez AXO Science en partenariat avec l'équipe Génie Enzymatique Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires de l'ICBMS (Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires).

La future plateforme se devait de répondre à un certain cahier des charges illustré sur la figure 10.

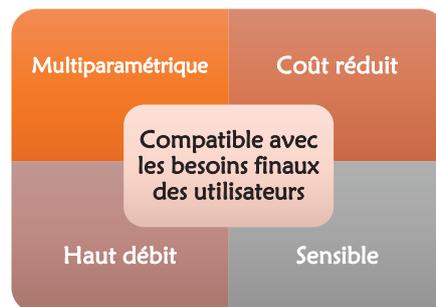


Figure 10 - Cahier des charges du système à développer

En effet, un test multiparamétrique, haut débit, à coûts réduits et faisant preuve d'une bonne sensibilité sont les critères exigés d'un test d'analyse biologique. Le système biopuce répond parfaitement à ce type de cahier des charges. C'est pourquoi ce format a guidé la mise au point de la nouvelle plateforme de génotypage érythrocytaire.

La possibilité d'automatisation du test était également un critère important à prendre en compte. C'est pourquoi le format en microplaques 96 puits a été privilégié, permettant une prise en charge aisée par les chaînes robotiques déjà présentes en laboratoire, la matrice de sondes étant immobilisée au fond des puits.

2.1 Présentation de l'outil

Toute cette partie a fait l'objet de la thèse de Melle LE GOFF, soutenue publiquement le 14 octobre 2011 (Le Goff, 2011).

Plusieurs travaux ont été menés concernant notamment le choix du support, la méthode de détection et le transfert de l'ensemble sur un système automatisé. Le principe général repose sur l'hybridation d'amplicons issus d'une PCR multiplexe dans une microplaque 96 puits. La PCR réalisée est spécifique des gènes d'intérêt et amplifie donc le fragment cible indépendamment du polymorphisme présent. La discrimination allélique est réalisée lors de l'étape d'hybridation sur la puce. Une matrice de sondes est immobilisée au fond de chaque puits, permettant au brin complémentaire de la sonde de s'hybrider. La détection est réalisée par colorimétrie.

2.1.1 Etudes préliminaires

2.1.1.1 Support

Dans un premier temps, deux types de supports ont été évalués : la lame plastique en format 12 puits, et une membrane poreuse.

Il s'est avéré que pour la lame plastique, l'immobilisation des sondes était peu homogène et peu reproductible. Les résultats étaient satisfaisants uniquement en utilisant des réactifs commerciaux optimisés pour le protocole d'hybridation.

Pour ce qui est de la membrane poreuse (Ultrabind®, Pall), la densité de sondes obtenue était élevée et l'immobilisation stable.

2.1.1.2 Détection

La détection retenue pour la mise au point du système est une détection par colorimétrie, en raison de son faible coût. Le marquage par la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline a donné les meilleurs résultats.

Le brin amplifié destiné à s'hybrider sur la sonde possède une biotine à son extrémité 5'. L'ajout de la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline puis de son substrat (BCIP/NBT) permet la formation d'un précipité de couleur violette au niveau du spot,

traduisant la présence du polymorphisme contenu dans la sonde immobilisée correspondante.

Les tests réalisés ont permis de mettre en évidence des signaux homogènes et reproductibles. Par la suite, des tests de génotypage érythrocytaire sur 3 polymorphismes ont démontré qu'il était possible avec cette méthode de différencier les génotypes avec une détection par colorimétrie.

2.1.1.3 Automatisation

Le support de type microplaque de 96 puits a été choisi pour permettre une automatisation du test sur membranes. Ces dernières étaient à l'origine insérées manuellement au fond de chaque puits, puis une plaque de filtration préfabriquée a été utilisée (Multiscreen HTS-HA, Millipore™) et a permis de mettre en évidence une immobilisation stable des sondes ainsi qu'une bonne reproductibilité.

2.1.2 Preuves de concept

L'immobilisation d'oligonucléotides a été validée comme décrit précédemment (voir paragraphe 2.1.1) et a engendré le développement d'un test d'hybridation haut débit sur membrane, à détection colorimétrique. Cette méthode a ensuite été appliquée au génotypage érythrocytaire à partir d'ADN génomique extrait de sang total. Dans le travail de Melle LE GOFF, l'étude a été menée sur 6 polymorphismes d'intérêt correspondant aux groupes sanguins Kell, Kidd, Duffy et MNS (voir tableau 7).

Tableau 7 - Polymorphismes étudiés pour la preuve de concept. Les allèles en gras sont les allèles de référence conformément à la nomenclature de l'ISBT

Système	Antigènes	Allèles	SNP
Kell	KEL1, KEL2	<i>KEL*1, KEL*2</i>	578 T>C
	KEL3, KEL4	<i>KEL*3, KEL*4</i>	841 T>C
Kidd	JK1, JK2	<i>JK*1, JK*2</i>	838 G>A
MNS	MNS1, MNS2	<i>MNS*1, MNS*2</i>	59 C>T
	MNS3, MNS4	<i>MNS*3, MNS*4</i>	143 T>C
Duffy	FY1, FY2	<i>FY*1, FY*2</i>	125 G>A

Initialement, le développement et la mise au point du dispositif ont été réalisés en collaboration avec l'Établissement Français du Sang et plus particulièrement l'EFS Rhône-Alpes. De ce fait, le matériel et les techniques disponibles au laboratoire de l'EFS ont donc été utilisés :

- banque d'échantillons de sang préalablement phénotypés par sérologie
- matériel et technique d'extraction d'ADN génomique à partir du sang total
- matériel et technique d'amplification par PCR et de contrôle par électrophorèse sur gel d'agarose
- panel de sondes spécifiques des polymorphismes d'intérêt

Ces études ont fait l'objet d'une publication : Multipurpose high-throughput filtering microarrays (HiFi) for DNA and protein assays (Le Goff *et al*, 2010c).

En supplément des études décrites précédemment, d'autres investigations ont été menées, notamment concernant la reproductibilité puits à puits (comparaison des signaux obtenus dans trois puits différents pour la même réaction de PCR), entre puits de PCR (deux réactions de PCR amplifiant le même échantillon), la concentration de streptavidine-phosphatase alcaline, la dilution de l'échantillon lors de l'hybridation, et l'influence de la longueur des sondes.

2.1.3 Validation de l'outil sur 293 donneurs

Afin de valider l'outil développé, un génotypage en aveugle de 293 donneurs avait été entrepris. Le test d'hybridation a été réalisé de façon automatisée, alors que la préparation des échantillons s'est déroulée de manière semi-automatisée (extraction d'ADN automatique mais PCR manuelle). L'ensemble du processus de la plateforme *HIFI Blood 96™* est représenté figure 11.

Ce travail et les résultats associés sont décrits dans le papier Robust, High-throughput Solution for blood group genotyping (Le Goff *et al*, 2010a). Comme évoqué précédemment, les systèmes de groupes sanguins sont pour la plupart des systèmes bialléliques, ce qui signifierait qu'un seul duo de spots de sondes correspondant au SNP analysé « s'allumerait » chez un individu homozygote, tandis que les quatre spots seraient visibles chez un individu hétérozygote.

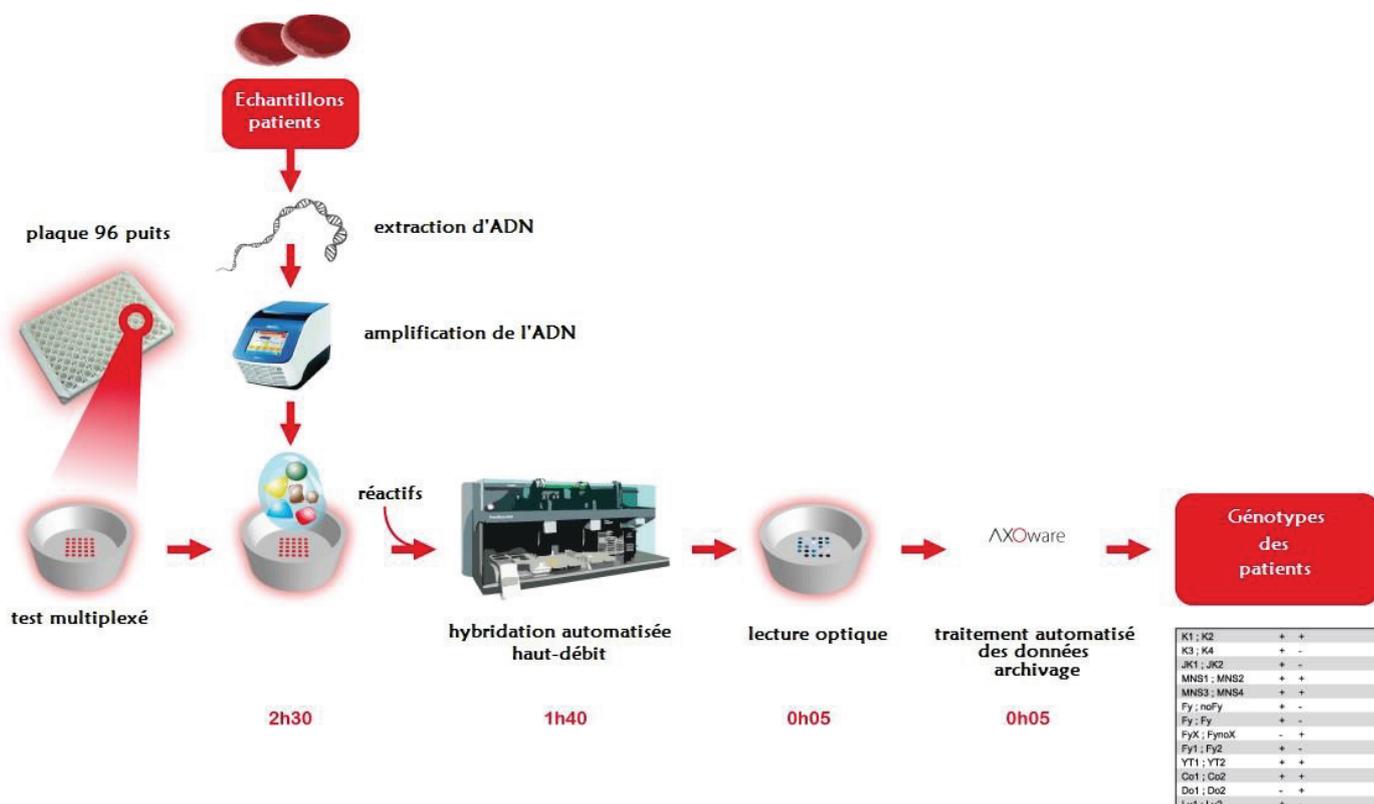


Figure 11 - Déroulement du processus de la plateforme HIFI Blood 96™

Cependant, il existe toujours une part d'hybridations non spécifiques, bien que les conditions de températures et de stringence du milieu soient optimales. Il est donc nécessaire de réaliser une analyse semi-empirique.

Elle consiste à calculer un score pour chaque SNP analysé. Ce score, qui est une valeur numérique, caractérise le génotype lorsqu'il est comparé à un ensemble de valeurs de référence.

Comme le montre la figure 12, trois valeurs de scores (-1 ; 0 et 1), correspondant respectivement à des individus homozygotes allèle B, hétérozygotes et homozygotes allèle A devraient être obtenues en théorie. En pratique, dû à la part d'hybridations non spécifiques, ce sont des intervalles de Pscore qui caractérisent les différents génotypes possibles : autour de -1, autour de 0 et autour de 1. Ces valeurs de scores sont obtenues en appliquant la formule suivante :

$$Pscore = \frac{I(B) - I(A)}{I(B) + I(A)}$$

où I(B) représente la moyenne des intensités des deux spots correspondant à l'allèle B, et I(A) la moyenne des intensités des deux spots correspondant à l'allèle A.

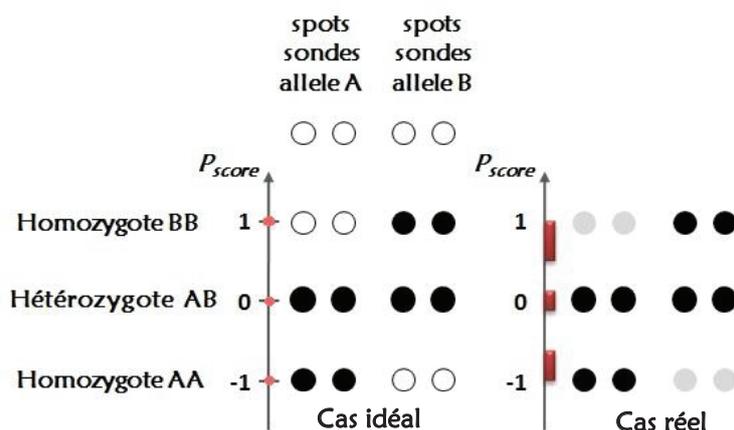


Figure 12 – Distribution théorique et réelle des Pcores

96 échantillons phénotypés par sérologie ont servi à établir les intervalles de Pscore caractérisant chaque génotype pour les groupes sanguins Kell, Kidd, Duffy et MNS. L'outil a ensuite été validé avec le génotypage en aveugle d'un panel de 293 échantillons de sang. Des concordances allant de 83,3% (MNS1/2) à 100% (Kell) ont été mises en évidence.

2.1.4 Changement de support

Concernant les membranes, des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés, ce qui représentait donc un certain frein pour passer à l'industrialisation du produit. De plus, des problèmes de propriété intellectuelle se sont posés car un brevet très similaire existait déjà, ce qui rendait quasiment impossible la commercialisation des plaques filtres dédiées au génotypage érythrocytaire étendu. Tous ces éléments ont poussé Melle LE GOFF à chercher une autre technologie sur laquelle un brevet pourrait être déposé. Le choix s'est arrêté sur l'adhésif TKL (Nouvelles Surfaces Adhésives Pour L'immobilisation De Ligands, WO 2012/095614). Les premières expériences de dépôt automatisé se sont révélées satisfaisantes. Le TKL permettait également des facilités de production (dépôt automatisé sur une surface plane et qui pouvait donc être intégré dans un test au format biopuce).

2.2 Intégration de nouveaux systèmes de groupes sanguins

Ce travail fait partie intégrante de ma thèse et fait suite à celui entrepris par Melle LE GOFF.

2.2.1 Sélection des polymorphismes

Des études de marché menées par AXO Science ont guidé le choix des nouveaux polymorphismes à intégrer à la plateforme de génotypage.

Au vu des résultats obtenus par Melle LE GOFF (Le Goff *et al*, 2010a), il s'est avéré indispensable d'ajouter au panel déjà développé les polymorphismes 265 C>T et -67 T>C, correspondant respectivement aux allèles *FY*X* et *FY*Fy*, l'utilisation de seulement deux sondes correspondant aux allèles *FY*1* et *FY*2* s'étant révélée insuffisante.

Tableau 8 - Polymorphismes pris en charge sur la plateforme HIFI Blood 96™. La couleur noire indique les polymorphismes déjà développés par Melle LE GOFF

	Système	Antigènes	Allèles	SNP
Panel 1	Kell	KEL1, KEL2	<i>KEL*1, KEL*2</i>	578 T>C
		KEL3, KEL4	<i>KEL*3, KEL*4</i>	841 T>C
	Kidd	JK1, JK2	<i>JK*1, JK*2</i>	838 G>A
	MNS	MNS1, MNS2	<i>MNS*1, MNS*2</i>	59 C>T
		MNS3, MNS4	<i>MNS*3, MNS*4</i>	143 T>C
	Duffy	FY1, FY2	<i>FY*1, FY*2</i>	125 G>A
			<i>FY*X</i>	265 C>T
		<i>FY*Fy</i>	-67 T>C	
Panel 2	Dombrock	DO1, DO2	<i>DO*1, DO*2</i>	793 A>G
		Jo(a)	<i>DO*01.-05</i>	350 C>T
		HY	<i>DO*01.-04</i>	323 G>T
	Colton	CO1, CO2	<i>CO*1, CO*2</i>	134 C>T
	Cartwright	YT1, YT2	<i>YT*1, YT*2</i>	1057 C>A
	Lutheran	LU1, LU2	<i>LU*1, LU*2</i>	230 A>G
	Diego	DI1, DI2	<i>DI*1, DI*2</i>	2561 T>C

Les amorces pour les allèles *MNS*1* et *MNS*2* ont également été ajoutées car elles n'avaient pas été dessinées et ne faisaient donc pas partie de la PCR multiplexe alors que les sondes étaient présentes sur la matrice.

Enfin, dans un objectif d'élargissement de l'offre proposée par le système *HIFI BLOOD*, des polymorphismes correspondant aux systèmes Dombrock, Colton, Cartwright, Lutheran et Diego ont été intégrés dans un nouveau panel (voir tableau 8).

2.2.2 Mise au point des nouveaux oligonucléotides

Pour des raisons de confidentialité, les séquences de tous les oligonucléotides utilisés pour la PCR et l'hybridation ne seront pas divulguées dans ce manuscrit, excepté celles pour le système de groupe sanguin Lutheran, qui serviront d'exemple afin de décrire le mode opératoire suivi pour la conception des amorces et des sondes. Une des deux amorces porte une biotine à son extrémité 5' afin de générer le brin qui sera capturé par la sonde immobilisée et de mettre en évidence cette hybridation par la formation du précipité violet au niveau de chaque spot, dû à l'interaction Biotine / Streptavidine – Phosphatase alcaline puis à la réaction Phosphatase alcaline / BCIP-NBT. Les sondes portent quant à elles une amine à leur extrémité 3' afin de pouvoir être greffées et orientées sur le support adhésif.

Plusieurs séquences du gène codant pour les antigènes du groupe sanguin Lutheran ont été récupérées sur le site du NCBI et de l'EMBL-EBI. Ces séquences ont été alignées via la fonction ClustalW du programme MEGA6. A l'aide d'oligonucléotides trouvés dans la littérature, la position du SNP a été identifiée (surligné en bleu sur la figure 13).

Toutes les séquences alignées ici portent le polymorphisme correspondant à l'allèle *LU*2* ou *Lu*b*. A partir de cette étape, des oligonucléotides ont pu être sélectionnés et testés de façon théorique grâce à plusieurs logiciels afin d'évaluer certains de leurs critères thermodynamiques.

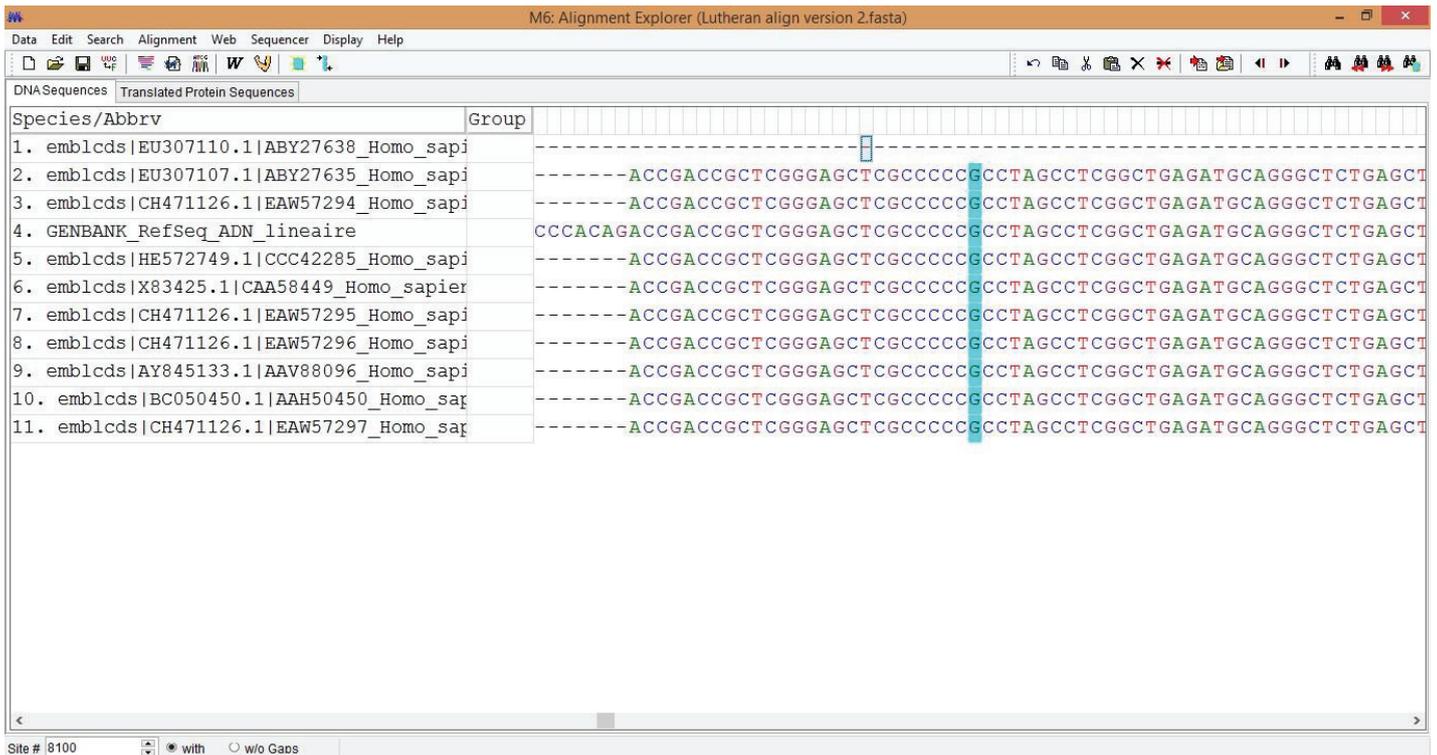


Figure 13 - Capture d'écran de l'alignement de séquences codant pour le gène LU réalisé grâce au logiciel MEGA6

2.2.2.1 Conception théorique

2.2.2.1.1 Sondes

Les sondes potentielles ont été triées en fonction de certaines propriétés :

- dans la mesure du possible, le SNP doit se situer au milieu de la sonde
- la température de fusion (ou d'hybridation) T_m : entre 54 et 60°C calculée grâce à la formule de calcul $T_m = 2AT + 4GC$
- le pourcentage en GC (classiquement entre 40 et 60%)
- la formation de structures secondaires à 55°C (température de fin d'étape d'hybridation sur la puce)

Afin de satisfaire à tous ces critères, plusieurs oligonucléotides candidats ont été testés sur les logiciels Primer3+, à l'aide de la fonction Primer_Check (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) pour évaluer le pourcentage en GC et sur Oligocalc

(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) à l'aide de la fonction Mfold pour la formation de structures secondaires.

La première version pour la sonde *LU*2* est la suivante (surligné en jaune sur la figure 14) : CGC-CCC-CGC-CTA-GCC (le nucléotide souligné correspond au SNP).

Son Tm est de 56°C, ce qui entre dans les critères énoncés. En revanche, son pourcentage en GC est de 86,7%, ce qui est bien plus élevé que les valeurs classiquement prises en compte. Néanmoins, le SNP se situant dans une région riche en GC et devant se trouver au milieu de la sonde, il n'est pas possible de choisir une sonde respectant le critère d'un taux de GC compris entre 40 et 60%. C'est cette sonde qui a été retenue pour réaliser les tests expérimentaux.

Sur le logiciel MEGA6 est représenté le brin sens (5' vers 3'). Il faut tenir compte du fait que c'est l'amorce sens qui sera biotinylée et générera donc le brin biotinylé à la fin de la PCR (figure 15).

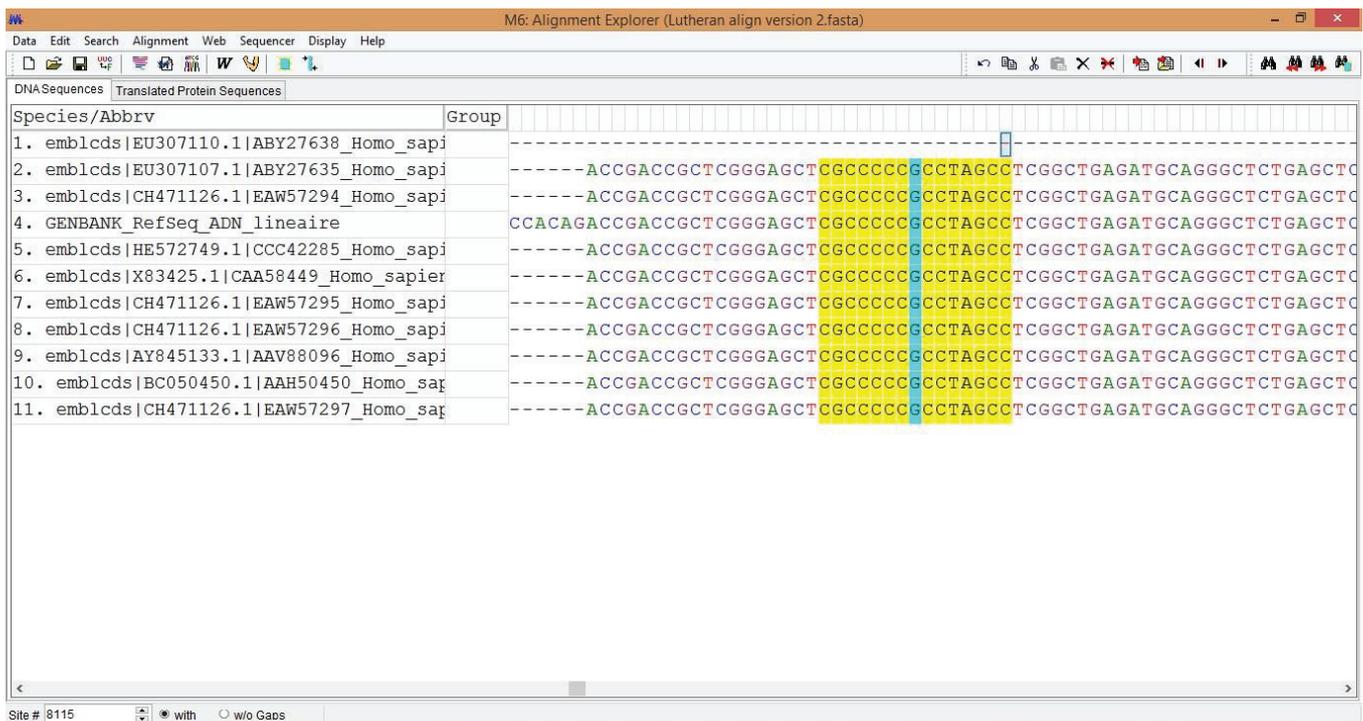


Figure 14 - Capture d'écran de l'alignement de séquences codant pour le gène *LU* réalisé grâce au logiciel MEGA6. Le SNP est surligné en bleu et la sonde sélectionnée est surlignée en jaune.

C'est ce brin qui doit être capté par la sonde immobilisée sur le support, c'est pourquoi il nous faut faire synthétiser l'oligonucléotide complémentaire et antisens par rapport à celui qui apparaît sur la figure 14.

Sonde sens	5' CGC-CCC-C <u>GC</u> -CTA-GCC 3'
Sonde complémentaire	3' GCG-GGG-G <u>CG</u> -GAT-CCG 5'
Sonde complémentaire antisens	5' GGC-TAG-G <u>CG</u> -GGG-GCG 3'

Système Lutheran

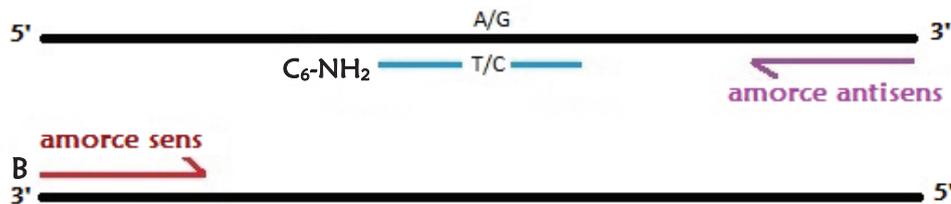


Figure 15 - Schéma de la position des oligonucléotides sélectionnés. B = biotine et C₆NH₂ = amine

Le polymorphisme entre les allèles *LU*1* et *LU*2* est de type A>G sur le brin sens. Par conséquent la sonde *LU*1* va comporter à la position du SNP le nucléotide T à la place du C : 5' GGC-TAG-GTG-GGG-GCG 3'. Concernant les propriétés de cette sonde, le taux de GC est de 80% et le T_m de 54°C.

En ce qui concerne la formation de structures secondaires, elles ont été générées à l'aide du programme OligoCalc. Avec la sonde *LU*1*, cinq structures secondaires possibles sont données à 55°C avec la simulation Mfold, représentées dans le tableau 9 et accompagnées des valeurs d'énergie libre associées (ΔG).

L'énergie libre est une constante thermodynamique indiquant la quantité d'énergie nécessaire ou libérée lors d'une réaction (Lewin, 1998). Elle est exprimée en kcal/mol et symbolisée par le paramètre ΔG . Les réactions qui nécessitent de l'énergie ont une valeur de ΔG positive alors que celles qui en libèrent ont une valeur de ΔG négative. Pour qu'un appariement de bases se forme, il est nécessaire qu'il y ait une libération globale d'énergie lors de la réaction. La stabilité de la structure est déterminée par la quantité d'énergie libérée.

Tableau 9 - Représentations des structures secondaires possibles pour la sonde LU*1 à 55°C générées par la simulation Mfold

N° structure	Schéma de la structure	Valeur d'énergie libre
1		$\Delta G = 1,67$ kcal/mol
2		$\Delta G = 2,07$ kcal/mol
3		$\Delta G = 2,41$ kcal/mol
4		$\Delta G = 2,43$ kcal/mol

5		$\Delta G = 2,43 \text{ kcal/mol}$
---	--	------------------------------------

Les valeurs de ΔG indiquées dans le tableau sont toutes positives, ce qui signifie que pour que chaque structure secondaire puisse se former, la quantité d'énergie correspondante serait nécessaire. Les probabilités pour que ces structures se forment peuvent donc être considérées comme négligeables.

Les structures secondaires possibles à 55°C pour la sonde *LU*2* sont représentées dans le tableau 10.

Tout comme pour la sonde *LU*1*, il n'est pas nécessaire de tenir compte des structures secondaires possibles fournies par la simulation Mfold, les valeurs de ΔG étant toutes positives.

Tableau 10 - Représentations des structures secondaires possibles pour la sonde *LU*2* à 55°C générées par la simulation Mfold

N° structure	Schéma de la structure	Valeur d'énergie libre
1		$\Delta G = 1,31 \text{ kcal/mol}$
2		$\Delta G = 1,36 \text{ kcal/mol}$

3		$\Delta G = 1,53 \text{ kcal/mol}$
4		$\Delta G = 1,67 \text{ kcal/mol}$
5		$\Delta G = 2,07 \text{ kcal/mol}$

2.2.2.1.2 Amorces

Les amorces potentielles ont été sélectionnées en fonction de certaines propriétés :

- la température de fusion T_m : entre 57,5 et 60°C
calculée à l'aide du logiciel Primer3+
- le pourcentage en GC (classiquement entre 40 et 60%)
- la formation de structures secondaires et de dimères d'amorces
- le fragment généré doit avoir une taille comprise entre 100 et 200 paires de bases

De même que pour les sondes, les logiciels Primer3+ et Oligocalc ont été utilisés. De plus, le site [Multiple Primer Analyzer](https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-) de ThermoFisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular->

biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html) a été exploité afin de simuler la formation d'éventuels dimères d'amorces.

Le couple d'amorces sélectionné est le suivant et leur position sont matérialisées sur la figure 16 :

GENBANK RefSeq ADN linéaire

GGACCCAGAGAGAGAGAGACTGAGGAGCGCTGGGACACCCGGAGCTGAGAGCCT
 GCCCCGCGCCACAGACCGACCGCTCGGGAGCTCGCCCCCGCTAGCCTCGGCTGA
 GATGCAGGGCTCTGAGCTCCAGGTCACAATGCACGACACCC

Figure 16 - Positions des oligonucléotides sur l'ADN codant le gène LU. Les amorces sont surlignées en jaune, la sonde en violet, et le SNP en bleu.

Amorce sens 5' GAC-CCA-GAG-AGA-GAG-AGA-C 3'

Amorce antisens 5' AGC-TCA-GAG-CCC-TGC 3' (séquence complémentaire antisens par rapport à la deuxième amorce surlignée sur la figure 16).

Les Tm et pourcentages en GC des amorces sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11 - Propriétés thermodynamiques des amorces sélectionnées pour le gène LU

Amorce	Tm (°C)	GC (%)
sens	58,8	57,9
antisens	58,7	66,7

Les Tm ont cette fois été calculés avec le logiciel Primer3+ afin de tenir compte au mieux des conditions réactionnelles de la PCR. Les valeurs utilisées concernent les concentrations de MgCl₂ (2 mM) et d'oligonucléotides (200 nM). La table sélectionnée pour les calculs des paramètres thermodynamiques est la Santa Lucia 1998.

En ce qui concerne la longueur du fragment, l'amorce sens débute au nucléotide 8015 sur l'alignement des séquences avec MEGA6, et l'amorce antisens se termine au

nucléotide 8141. Le fragment généré lors de la PCR a donc une longueur de 8141-8014= 127 paires de bases.

Concernant les dimères d'amorces, voici le résultat fourni par le logiciel de Thermofisher Scientific (figure 17):

Cross Primer Dimers:

SENS with ANTISENS

SENS

5-gaccagagagagagac->

||| |

<-cgtcccagactcga-5

Figure 17 - Dimère d'amorces possible généré par la simulation avec le logiciel de Thermofisher

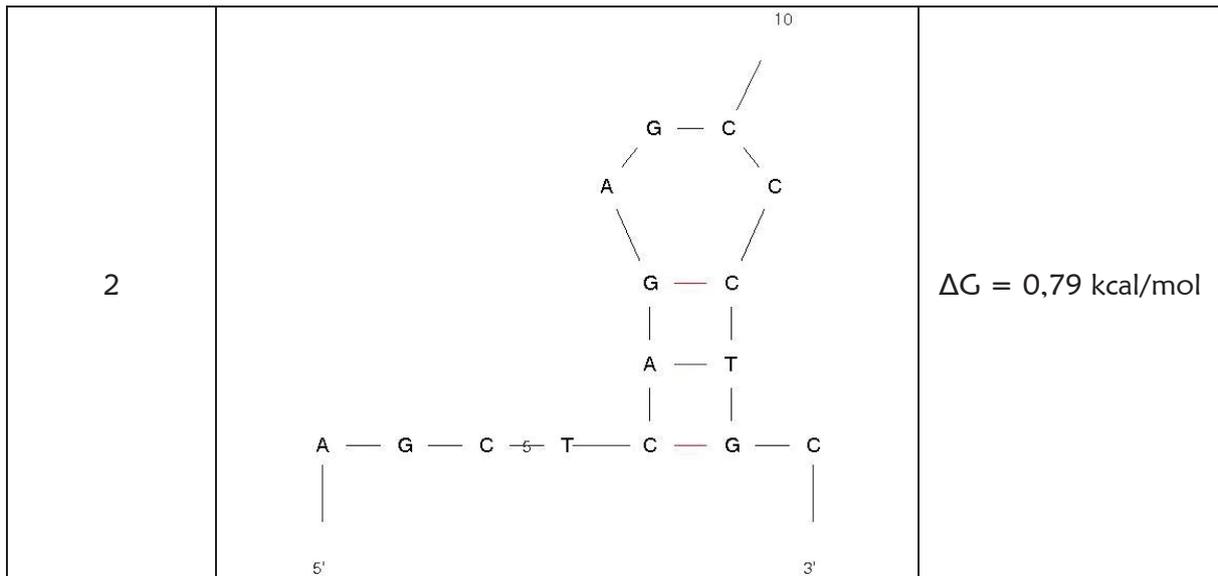
Ce dimère d'amorce impliquant seulement 4 liaisons, il peut être considéré comme négligeable à une température de 57,5°C, température lors de l'étape d'hybridation des amorces pendant la PCR.

Concernant les structures secondaires, aucune n'a été mise en évidence par le logiciel Oligocalc pour l'amorce sens.

Pour l'amorce antisens, les structures sont présentées dans le tableau 12.

Tableau 12 - Représentations des structures secondaires possibles à 57°C pour l'amorce antisens générées par la simulation Mfold

N° structure	Schéma de la structure	Valeur d'énergie libre
1		$\Delta G = 0,49$ kcal/mol



Comme pour les sondes, la probabilité que ces structures se forment lors de l'hybridation est considérée comme négligeable (valeurs de ΔG positives).

2.2.2.2 Tests préliminaires

Pour ces séries de tests, de l'ADN extrait de sang acheté auprès du LifeShare Blood Center à Shreveport (Etats-Unis), dont les génotypes sont connus, a été utilisé afin de valider ou non les oligonucléotides synthétisés.

Dans un premier temps, une PCR monoplexe (volume final 25 μL) a été réalisée et les produits d'amplification ont été déposés sur un gel d'agarose à 2% afin de vérifier la spécificité des amorces sélectionnées.

Après migration (10 minutes à 40 V puis 15 minutes à 100 V), le gel est marqué par du BET (20 minutes) et photographié par une caméra CCD (figure 18).

Le produit d'amplification se situe à la taille attendue, soit légèrement au-dessus du fragment correspondant à 0,1 kilobases soit 100 paires de bases si l'on se réfère à l'échelle du marqueur de poids moléculaire utilisé. De plus, aucun autre fragment n'est visible sur le gel, il n'y a donc pas d'amplification non spécifique lors de la PCR. Cette PCR est validée par l'absence de contamination dans le contrôle négatif. La suite des tests expérimentaux peut donc être envisagée avec ces amorces.

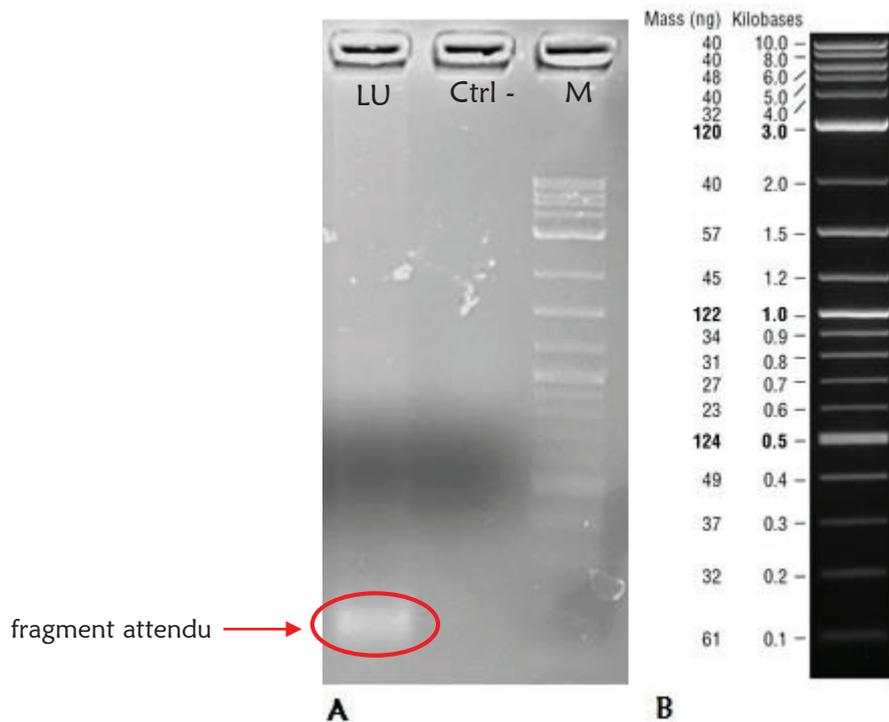


Figure 18 - Photo du gel de migration des produits de PCR monoplexe sur le gène LU. A : photo du gel ; B : échelle du marqueur de poids moléculaire utilisé

Les produits issus de la PCR monoplexe sur LU (25 μ L) ont ensuite été hybridés sur le support adhésif préalablement spotté. L'image prise à la suite du protocole d'hybridation est présentée figure 19.

Le génotype de l'ADN utilisé pour la PCR suivie de l'hybridation est homozygote pour l'allèle *LU*2*, ce qui est conforme avec le résultat obtenu.

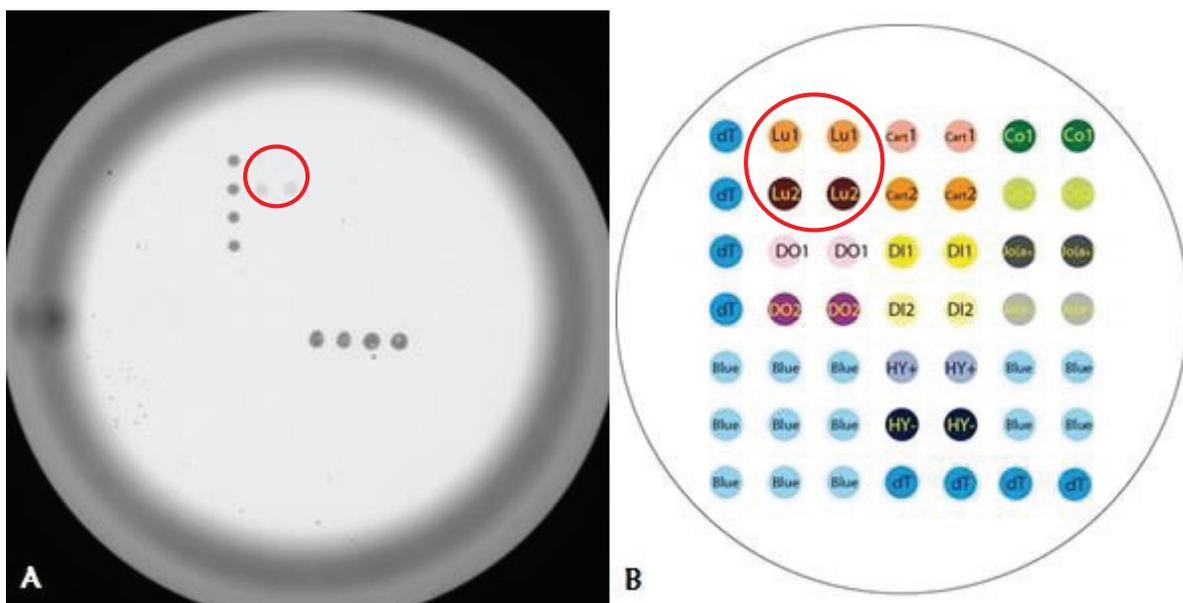


Figure 19 - Résultat de l'hybridation des produits de PCR monoplexe sur le gène LU. A : photo du puits après hybridation ; B : représentation de la matrice déposée au fond des puits

En effet, parmi les 4 spots appartenant au système de groupe sanguin Lutheran, un signal est obtenu seulement pour les 2 spots correspondant à l'allèle LU^*2 .

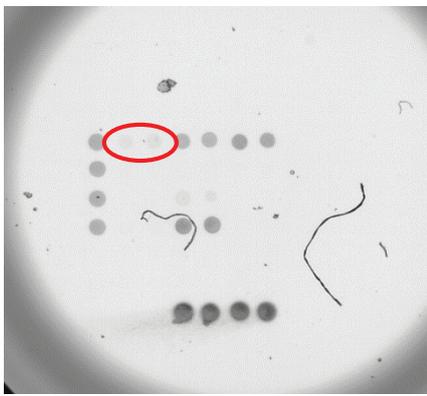
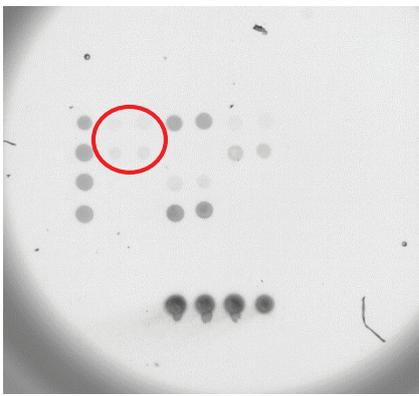
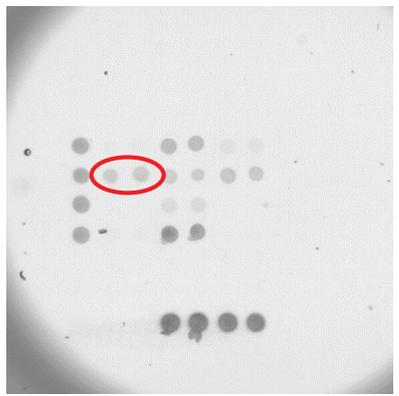
Ces étapes ont été réalisées pour chaque cible amplifiée afin de s'assurer de l'absence d'amplification non spécifique.

La PCR multiplexe a ensuite pu être réalisée. Les produits d'amplification ont par la suite été directement hybridés sur le support adhésif matricé. En effet, étant donné la faible différence de longueur des différents amplicons, il n'était pas pertinent de réaliser une migration sur un gel d'agarose, doté d'une trop faible résolution pour pouvoir différencier chaque produit de PCR.

Le tableau 13 résume les résultats obtenus après hybridation des produits de la PCR multiplexe du panel 2 dans lequel figure Lutheran.

Les spots pour lesquels un signal est détecté reflètent dans les trois cas le génotype de l'ADN utilisé pour ces tests. En effet, lorsque le génotype est homozygote sur l'allèle LU^*1 , le signal est observé seulement pour les spots correspondant à cet allèle. Dans le cas d'un hétérozygote $LU^*1/*2$, le signal est présent pour les 4 spots. Enfin, seuls les spots correspondant à l'allèle LU^*2 sont mis en évidence lorsque l'ADN présente un génotype homozygote pour l'allèle LU^*2 .

Tableau 13 - Résultats de l'hybridation des produits de PCR multiplexes sur les cibles du panel 2

$LU^*1/*1$	$LU^*1/*2$	$LU^*2/*2$
		

Toutefois, même si un signal est observable, l'intensité est faible, notamment lorsqu'on la compare à l'intensité des spots observée pour d'autres groupes de ce panel. Des tests d'optimisation ont alors été effectués.

2.2.2.3 Optimisations

A la suite des tests préliminaires, un certain nombre d'optimisations ont dû être apportées. Un des principaux problèmes rencontrés concerne la faible intensité des signaux pour certains spots ou certains systèmes de groupes sanguins, notamment dans le panel 2 pour le système de groupe sanguin Lutheran.

Une intensité faible peut refléter un faible taux d'hybridation entre la sonde immobilisée et le produit PCR. Ceci peut être expliqué par une température de fusion trop faible des sondes. Si l'on augmente leur T_m , la proportion de fragment biotinylés hybridés devrait être supérieure.

Les sondes synthétisées ont un T_m de 54°C pour LU^*1 et 56°C pour LU^*2 . Afin d'augmenter ces valeurs, les deux sondes ont été rallongées chacune d'un nucléotide (une adénine à chaque extrémité). Leurs propriétés thermodynamiques sont résumées dans le tableau 14.

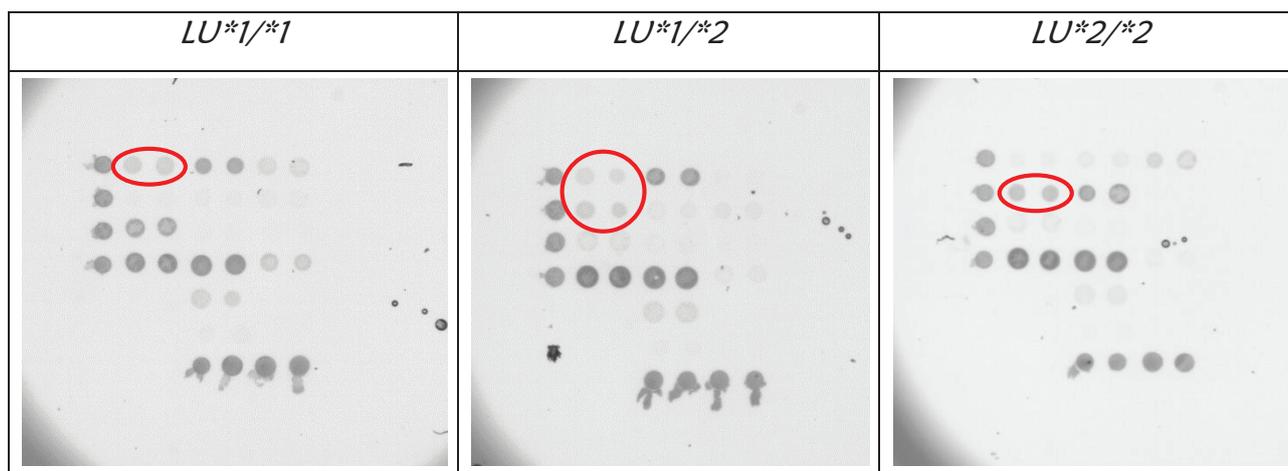
Tableau 14 - Propriétés thermodynamiques de la version 2 des sondes LU^*1 et LU^*2

Sonde	T_m (°C)	GC (%)
LU^*1	58	70,6
LU^*2	60	76,5

Concernant les structures secondaires possibles, elles peuvent, comme pour les sondes précédentes, être considérées comme négligeables.

Les produits de PCR multiplexe sur le panel 2 ont ensuite été hybridés sur le support adhésif préalablement matricé. La matrice de sondes reste la même, excepté le remplacement des premières sondes correspondant au système de groupe sanguin Lutheran par celles nouvellement synthétisées. Les résultats sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 - Résultats de l'hybridation des produits de PCR multiplexes sur les cibles du panel 2 avec les sondes LU*1 et LU*2 version 2



De la même manière que pour le test d'hybridation de produits issus de PCR multiplexes précédent, les signaux visibles correspondent à chaque fois au génotype issu de l'ADN extrait utilisé. Les signaux possèdent cependant une intensité supérieure (à vue d'œil) à celles observées lors du test précédent, confirmant l'hypothèse de températures de fusion des sondes trop faibles.

Toutes les optimisations ont consisté à allonger ou raccourcir les sondes ou les amorces. Des optimisations ont également pu être apportées aux systèmes déjà existants. Une fois optimisés, tous ces oligonucléotides ont été utilisés pour l'étude à moyenne échelle de l'outil *HIFI Blood 96™*.

2.3 Validation de l'outil : étude à moyenne échelle

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue *The Journal of Molecular Diagnostics* en janvier 2016 : Development and validation of a fully automated platform for extended blood group genotyping ((Boccoz *et al*, 2016), en annexe).

La première étape a consisté à définir des valeurs seuils (ou limites) de Pscore afin d'obtenir trois intervalles de valeurs de Pscore dans lesquels se situeraient les trois génotypes possibles. Pour cela, des échantillons de sang de génotypes connus (génotypés par les systèmes HEA BeadChip™ ou Lifecodes®RBC) ont été analysés sur la plateforme : 174 pour le panel 1 et 176 pour le panel 2. La distribution des valeurs Pscore obtenues

ainsi que les valeurs seuils choisies sont représentées figure 20 pour le panel 1 et figure 21 pour le panel 2.

L'objectif était de choisir des valeurs limites de Pscore permettant d'inclure le maximum d'échantillons dans les bons groupes de génotypes tout en minimisant les erreurs de génotypage, quitte à augmenter le pourcentage de non déterminés (ND). La méthode détaillée pour la détermination des valeurs limites de Pscore est décrite par Le Goff *et al.* (Le Goff *et al.*, 2010b).

Parmi le panel 1, des erreurs de génotypes et des non déterminés sont présents pour tous les systèmes de groupes sanguins.

Pour Kell, Kidd, $MNS^*3/*4$ et Duffy, seulement quelques échantillons (entre 1 et 9 selon les systèmes de groupes sanguins) apparaissent discordants par rapport aux valeurs seuils de Pscore choisies.

Pour $MNS^*1/*2$, les trois groupes de valeurs, correspondant aux trois groupes de génotypes possibles se chevauchent, ce qui a conduit à une augmentation du nombre de non déterminés (=6) et de discordances (=18) par rapport aux autres groupes.

Pour le couple $FY^*X/*noX$ aucun échantillon homozygote $FY^*X/*X$ n'était présent dans la cohorte (génotype extrêmement rare), aucune valeur limite n'a donc pu être déterminée.

Les valeurs de Pscore pour les couples $FY^*X/*noX$ et $FY^*Fy/*noFy$ se chevauchent. Les Pscore limites ont donc volontairement été choisis distants l'un de l'autre afin de minimiser les erreurs de génotypage (2 et 3 erreurs, respectivement).

Parmi le Panel 2, les trois génotypes possibles ne sont pas représentés pour les systèmes Diego et Dombrock (sauf le couple $DO^*1/*2$).

Pour $Jo(a+)/(a-)$, la valeur limite correspond à la valeur de Pscore maximale obtenue sur la plateforme.

Pour le couple $HY+/-$, les valeurs de Pscore pour les génotypes $HY+/+$ et $HY+/-$ ne se chevauchent pas, les valeurs de Pscore maximale et minimale ont été sélectionnées pour le couple $HY+/-$, et la valeur de Pscore maximale a été choisie pour $HY+/+$.

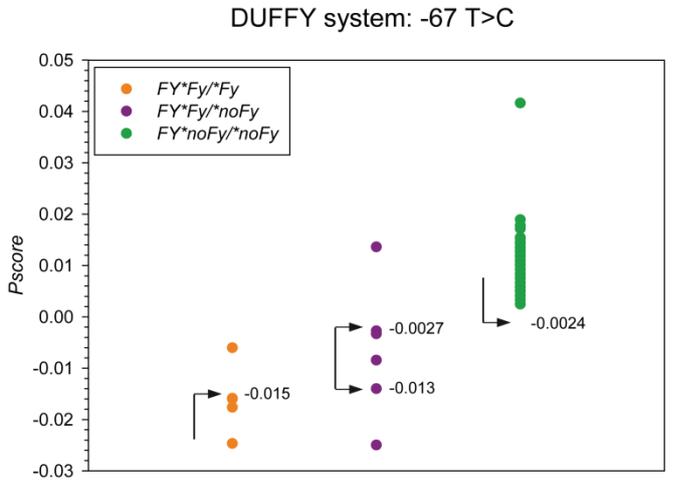
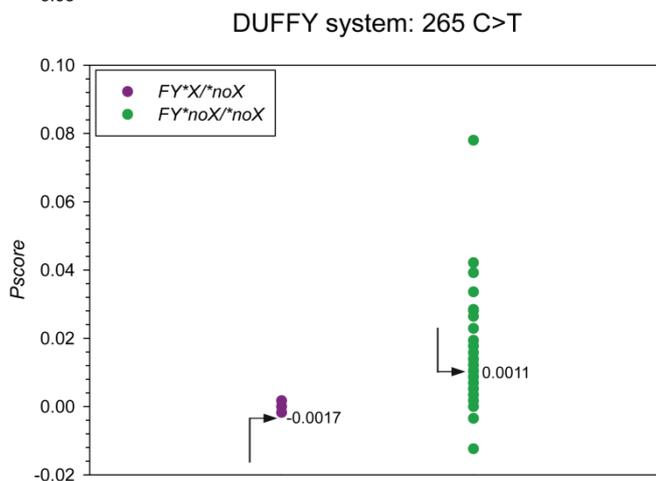
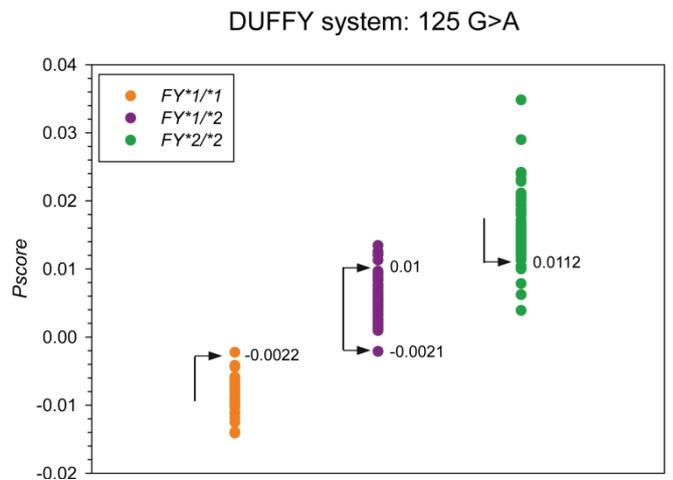
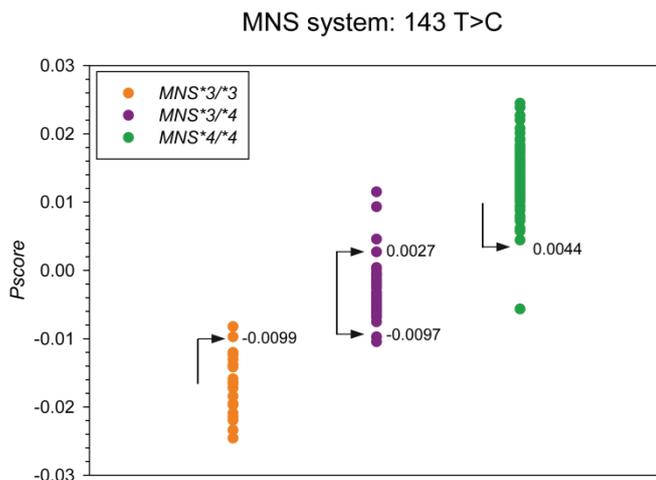
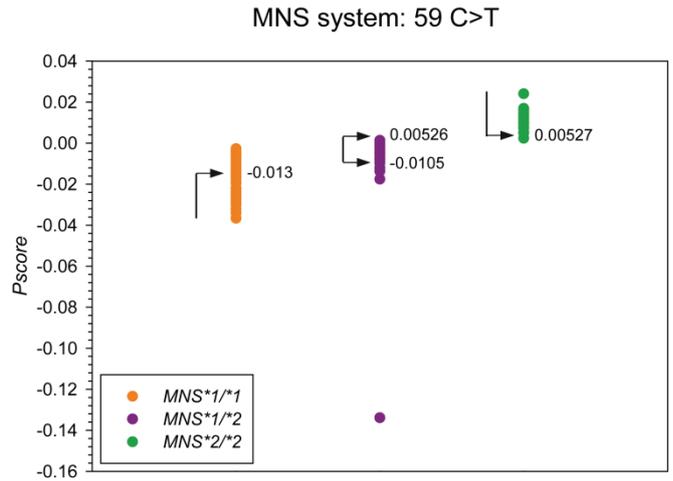
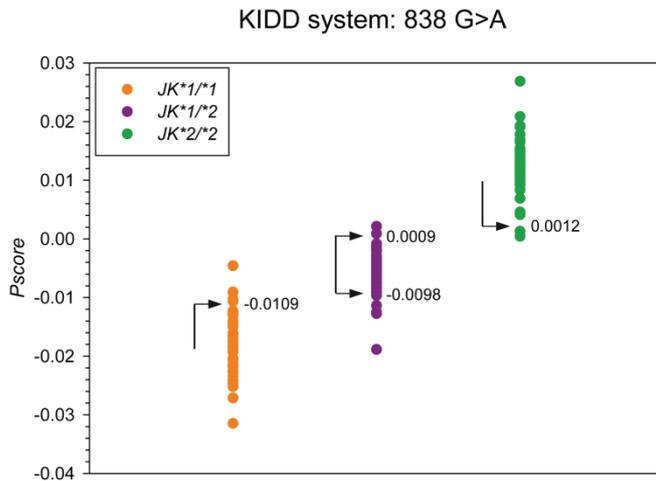
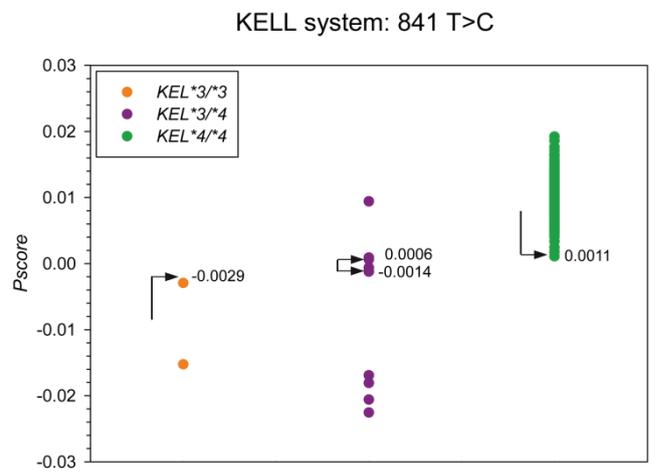
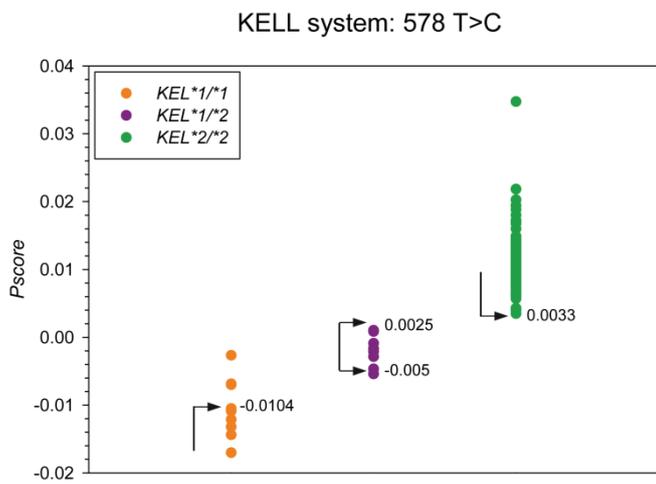
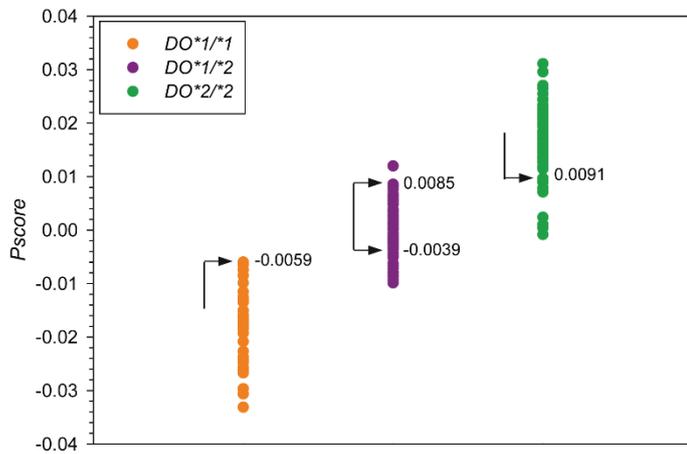
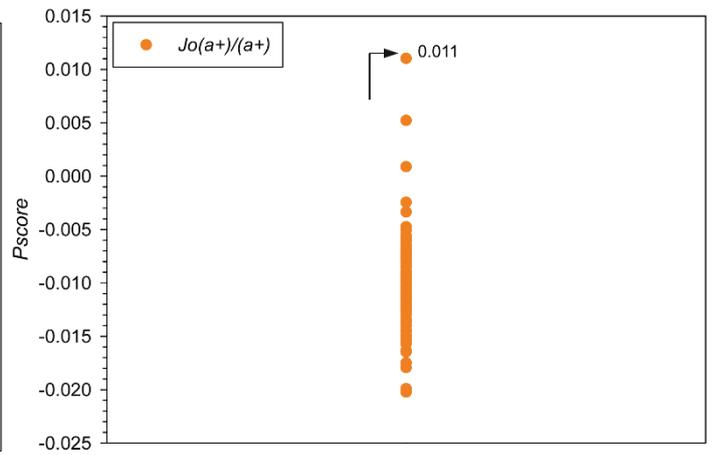


Figure 20 - Distribution des valeurs de Pscore et indication des valeurs seuils choisies pour les systèmes de groupes sanguins du panel 1

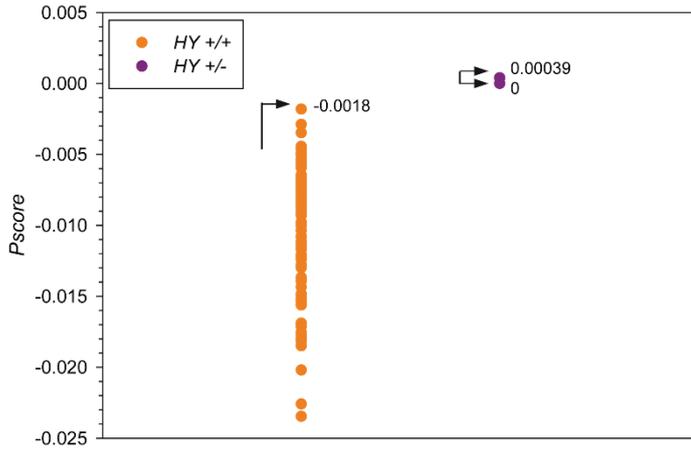
DOMBROCK system: 793 A>G



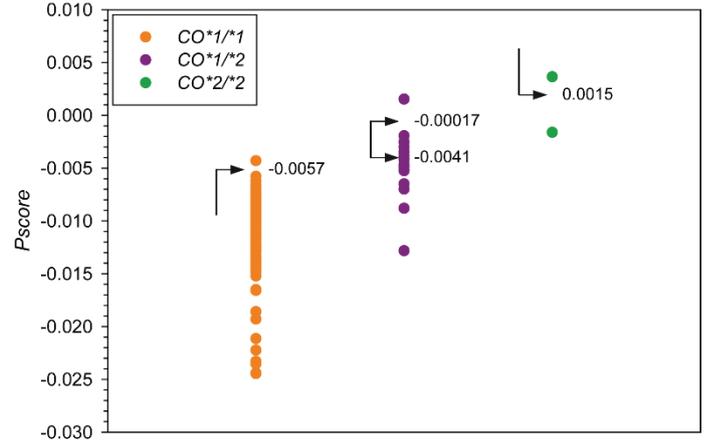
DOMBROCK system: 350 C>T



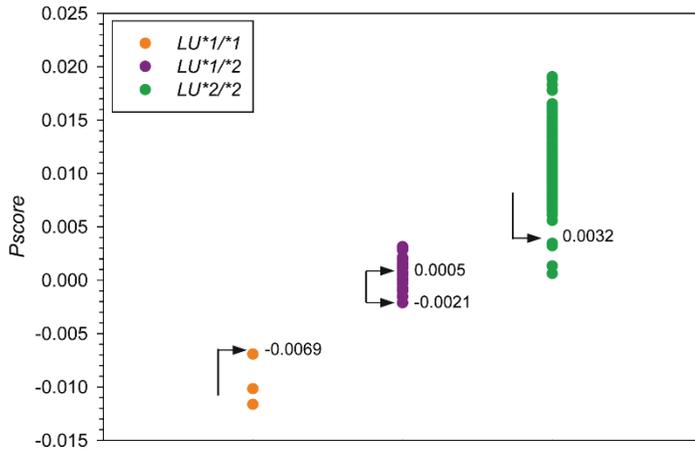
DOMBROCK system: 323 G>T



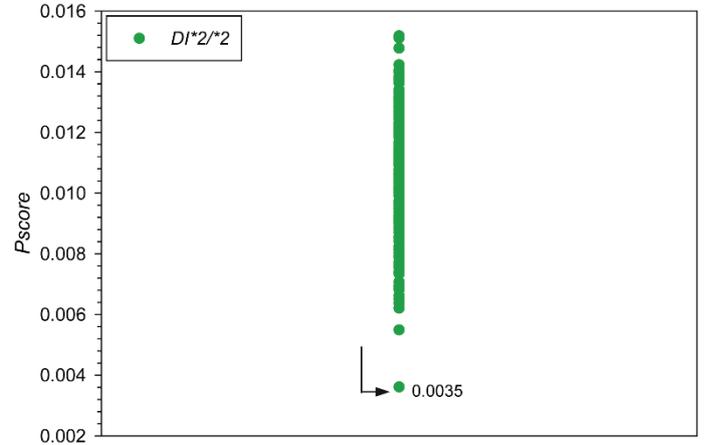
COLTON system: 134 C>T



LUTHERAN system: 230 A>G



DIEGO system: 2561 T>C



CARTWRIGHT system: 1057 C>A

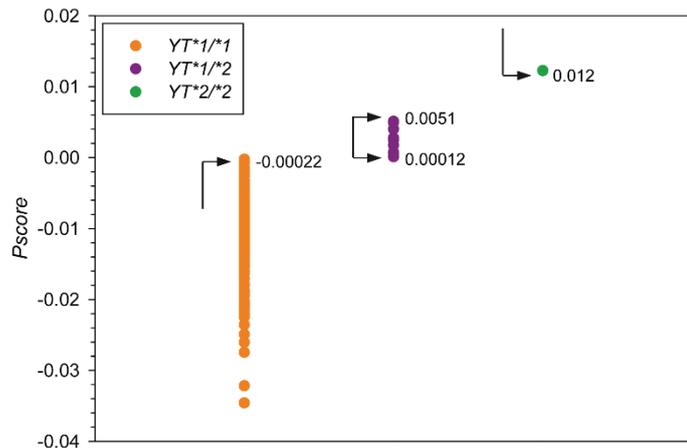


Figure 21 - Distribution des valeurs de Pscore et indication des valeurs seuils choisies pour les systèmes de groupes sanguins du panel 2

Concernant Diego, les échantillons analysés sont tous de génotype $DI^*2/*2$. La valeur limite correspond donc au Pscore minimal obtenu pour ce génotype sur la plateforme. Pour Lutheran, des chevauchements ont conduit à choisir des valeurs limites dans le but de diminuer les résultats discordants (=1) et privilégiant un nombre de ND plus élevé (=5).

Pour Colton et Dombrock ($DO^*1/*2$), les espaces de chevauchement sont étendus, par conséquent les valeurs limites choisies génèrent également un nombre de discordances plus élevé (6 et 18, respectivement) que pour les autres groupes même si le mode opératoire appliqué privilégie les résultats ND plutôt que les discordances.

Une fois les valeurs seuils déterminées, 583 échantillons pour le panel 1 et 190 échantillons pour le panel 2 (85 pour le groupe Cartwright) ont été analysés afin de valider la plateforme. Pour chaque échantillon, les génotypes ont été attribués en comparant la valeur du Pscore obtenu avec les groupes de génotypes définis grâce aux valeurs seuils de Pscore établies lors de l'étape précédente. Ces résultats de génotypage ont été comparés à ceux obtenus avec d'autres plateformes commercialisées (HEA BeadChip™ et Lifecodes®RBC) afin d'évaluer les performances de la plateforme *HIFI Blood 96™*.

La répartition des Pcores obtenus selon les systèmes de groupes sanguins est représentée figure 22 pour le panel 1 et figure 23 pour le panel 2. Les valeurs de Pscore obtenues sont classées de manière croissante et les couleurs indiquent le génotype déterminé par les autres méthodes de génotypage (HEA BeadChip™ ou Lifecodes®RBC) prises comme références. Les cadres grisés matérialisent les intervalles de confiance de Pscore, établis grâce à la sélection des valeurs seuils réalisée précédemment. Les échantillons ND se situent en dehors de ces cadres grisés puisque par définition ils ne peuvent être classés dans aucun intervalle de Pscore défini.

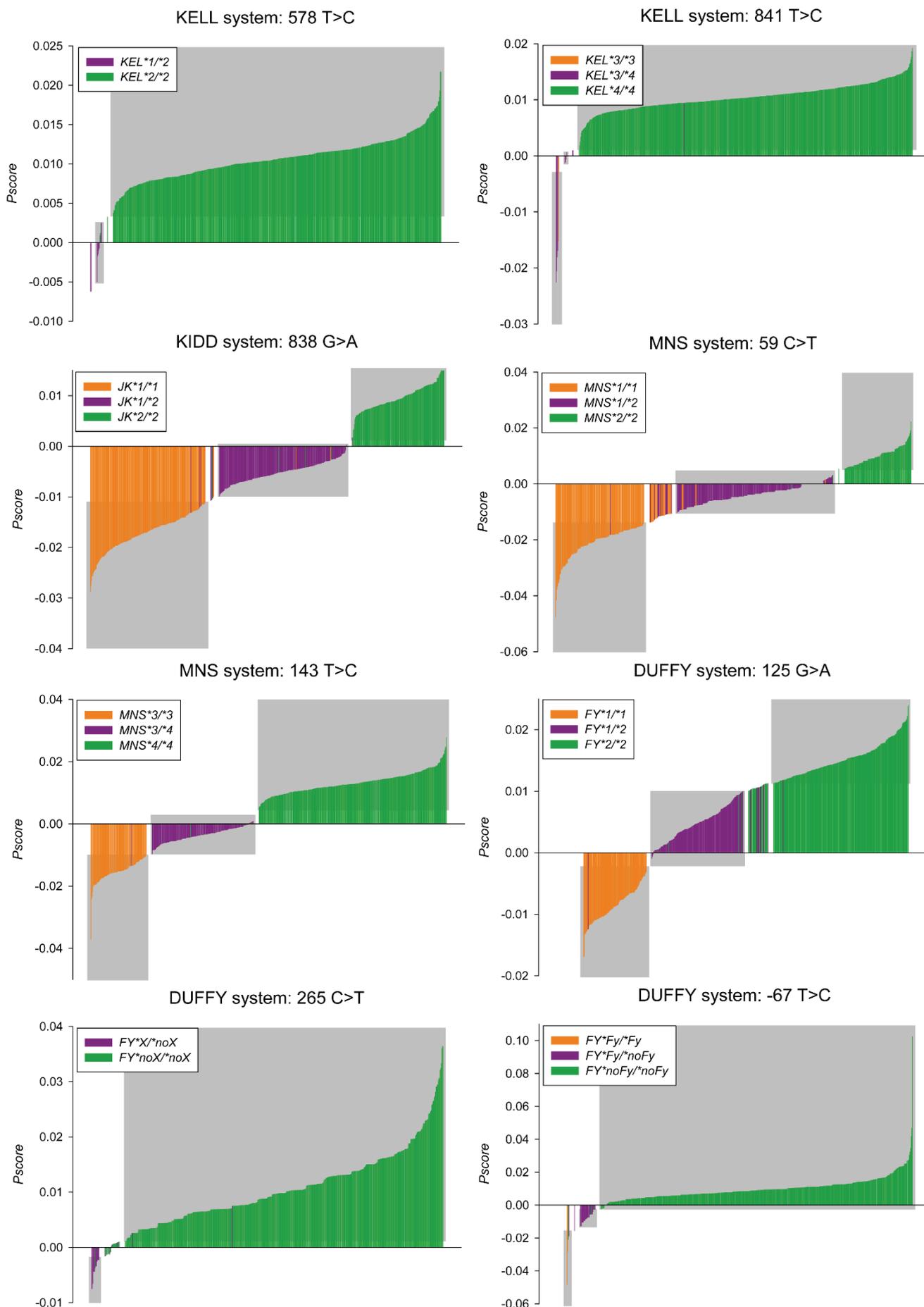


Figure 22 - Répartition des valeurs de Pscore obtenues sur 583 échantillons pour les systèmes de groupes sanguins du panel 1

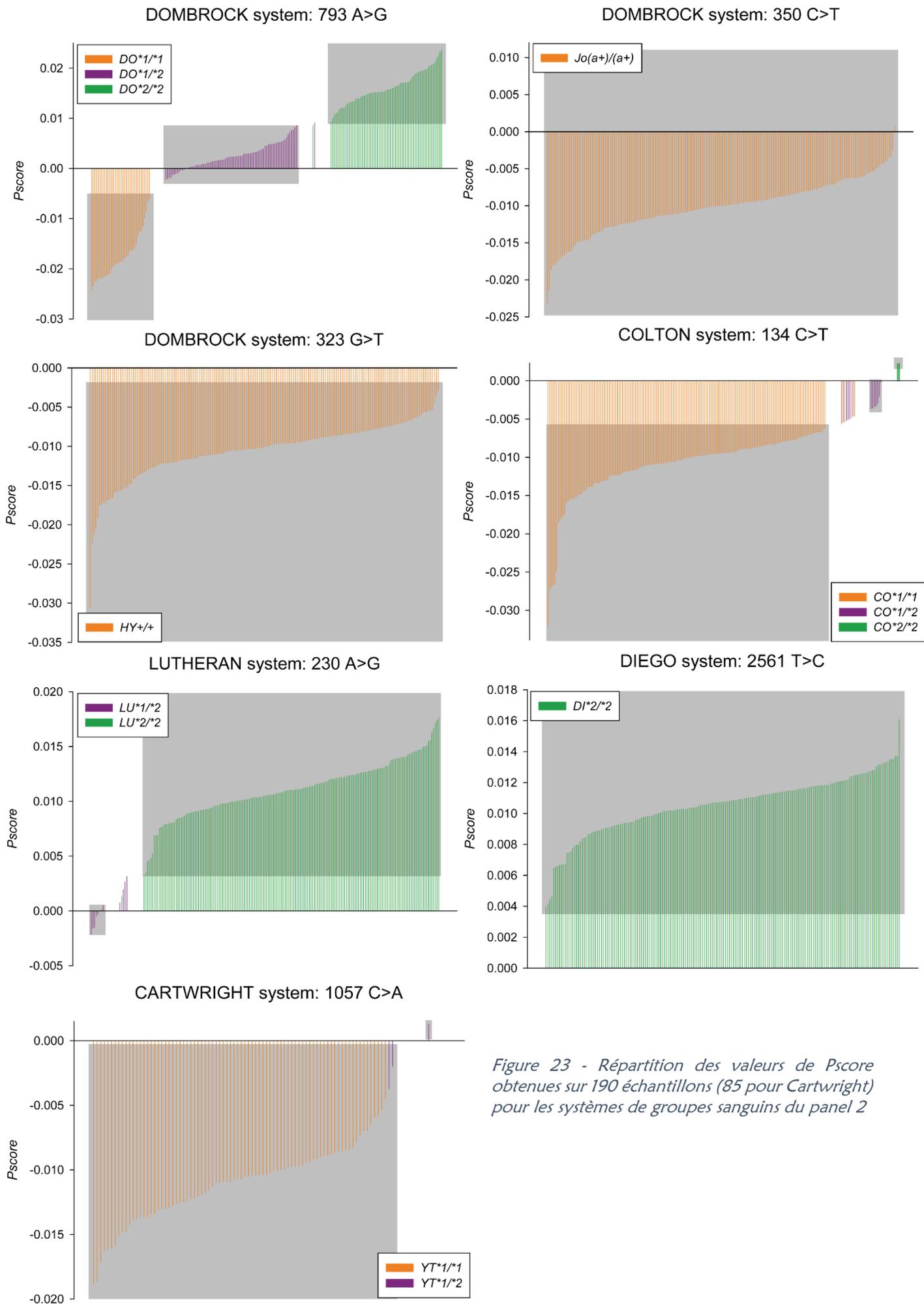


Figure 23 - Répartition des valeurs de Pscore obtenues sur 190 échantillons (85 pour Cartwright) pour les systèmes de groupes sanguins du panel 2

Les résultats discordants apparaissent quant à eux situés à l'intérieur d'une zone d'une autre couleur.

En raison d'un échantillonnage aléatoire du sang, les génotypes ayant pu être analysés sur la plateforme reflètent la distribution dans la population Caucasienne (tableaux 16 et 17), ce qui explique l'absence ou la rareté de certains génotypes tels que $KEL^*1/*1$, $KEL^*1/*2$, $KEL^*3/*3$, $KEL^*3/*4$, $FY^*X/*X$, $FY^*X/*noX$, $FY^*Fy/*Fy$ et $FY^*Fy/*noFy$ pour le panel 1 et $LU^*1/*1$, $LU^*1/*2$, $CO^*1/*2$, $CO^*2/*2$, $DI^*1/*1$, $DI^*1/*2$, $YT^*1/*2$, $YT^*2/*2$, $HY+/-$, $HY-/-$, $Jo(a+)/(a-)$ et $Jo(a-)/(a-)$ pour le panel 2.

Tableau 16 - Distribution caucasienne des génotypes du panel 1 (Badjie et al, 2011). Les données pour les génotypes liés aux allèles FY^*X et FY^*Fy ne sont pas disponibles.

Système	MNS						KIDD		
Génotype	$*1/*1$	$*1/*2$	$*2/*2$	$*3/*3$	$*3/*4$	$*4/*4$	$*1/*1$	$*1/*2$	$*2/*2$
Distribution (%)	22	31	47	11	44	45	26,3	50,3	23,4
Systèmes	KELL			DUFFY					
Génotype	$*1/*1$	$*1/*2$	$*2/*2$	$*1/*1$	$*1/*2$	$*2/*2$			
Distribution (%)	0,2	8,8	91	17	49	34			

Tableau 17 - Distribution caucasienne des génotypes du panel 2 d'après Human Blood Groups 3rd edition de Geoff Daniels (Daniels, 2013).

Système	DOMBROCK								
Génotype	$*1/*1$	$*1/*2$	$*2/*2$	$Jo(a+)/(a+)$	$Jo(a+)/(a-)$	$Jo(a-)/(a-)$	$HY+/+$	$HY+/-$	$HY-/-$
Distribution (%)	13	51	36	98	2	0	99,8	0,2	0
Système	LUTHERAN			DIEGO			COLTON		
Génotype	$*1/*1$	$*1/*2$	$*2/*2$	$*1/*1$	$*1/*2$	$*2/*2$	$*1/*1$	$*1/*2$	$*2/*2$
Distribution (%)	0	0,05	95	0,02	0,15	99,83	91,4	8,4	0,2
Système	CARTWRIGHT								
Génotype	$*1/*1$	$*1/*2$	$*2/*2$						
Distribution (%)	95,5	4	0,5						

Les pourcentages de concordance qui résultent de l'analyse de tous ces échantillons sont détaillés dans le tableau 18.

Tableau 18 - Résultats obtenus lors de l'étude de validation, en fonction des couples d'allèles. Les résultats obtenus sur la plateforme HIFI Blood 96™ ont été comparés aux données de génotypage obtenues avec d'autres plateformes commercialisées (HEA BeadChip™ et Lidecodes®RBC)

Panel 1							
Systeme	Couple d'allèles	Nombre de paramètres analysés	Nombre de ND	Nombre de discordances	ND (%)	Discordances (%)	Concordance (%)
KELL	<i>KEL*1/KEL*2</i>	1166	3	2	0.25	0.17	99.83
	<i>KEL*3/KEL*4</i>	1166	2	5	0.17	0.42	99.58
KIDD	<i>JK*1/JK*2</i>	1166	8	7	0.68	0.6	99.4
MNS	<i>MNS*1/MNS*2</i>	1166	39	10	3.34	0.85	99.15
	<i>MNS*3/MNS*4</i>	1164	0	4	0	0.34	99.66
DUFFY	<i>FY*1/FY*2</i>	1166	36	6	3.08	0.51	99.49
	<i>FY*X/FY*noX</i>	1166	25	3	2.14	0.25	99.75
	<i>FY*Fy/FY*noFy</i>	1166	1	4	0.085	0.34	99.66
Panel 2							
LUTHERAN	<i>LU*1/LU*2</i>	380	5	0	1.31	0	100
COLTON	<i>CO*1/CO*2</i>	380	9	0	2.36	0	100
DOMBROCK	<i>DO*1/DO*2</i>	378	2	0	0.52	0	100
	<i>HY+/HY-</i>	378	0	0	0	0	100
	<i>Jo(a+)/Jo(a-)</i>	380	0	0	0	0	100
DIEGO	<i>DI*1/DI*2</i>	380	0	0	0	0	100
CARTWRIGHT	<i>YT*1/*YT*2</i>	170	0	2	0	1.17	98.83

Ces pourcentages sont calculés en fonction du nombre de paramètres analysés et non du nombre d'échantillons. En effet, lors d'une analyse, le système *HIFI Blood 96™* génère un résultat (présence ou absence) pour chacun des allèles. C'est pourquoi le nombre de paramètres analysés est doublé par rapport au nombre d'échantillons. Pour les couples *MNS*3/*4*, *DO*1/*2*, *YT*1/*2* et *HY+/-*, le nombre de paramètres analysés est plus faible que pour les autres couples d'allèles, en raison d'un manque d'informations de génotypage pour certains échantillons sur les autres plateformes utilisées comme référence, ce qui n'a pas permis un comparatif avec la plateforme développée ici.

A cela, il faut ajouter que les antigènes correspondant à ces systèmes de groupes sanguins sont rarement testés en génotypage par les banques de sang, résultant en un faible nombre de dons de sang typés sur ces antigènes rares. C'est pourquoi il est parfois compliqué d'obtenir une cohorte présentant une bonne diversité et incluant un nombre équivalent de tous les génotypes possibles.

Lors de cette étude de validation à moyenne échelle, 583 échantillons ont été analysés sur le panel 1 et tous les couples d'allèles montrent un pourcentage de concordance supérieur à 99% en comparaison avec les autres plateformes de génotypage (tableau 18). Cependant, on note un taux de ND supérieur à 2% pour les couples *MNS*1/*2*, *FY*1/*2* et *FY*X/*noX*. Pour ce dernier couple, ce taux supérieur à 2% est probablement dû à la faible intensité des signaux obtenus sur les spots correspondants, ce qui a engendré une surestimation des valeurs seuils, générant un fort pourcentage de ND. Concernant *MNS*1/*2* et *FY*1/*2*, cela résulte du chevauchement des valeurs de Pscore correspondant aux trois génotypes lors de la définition des valeurs seuils.

Parmi le panel 2 (190 échantillons analysés), tous les couples d'allèles présentent une concordance de 100%. Ceci est en partie dû au manque ou à l'absence de plusieurs génotypes dans la cohorte, ne permettant pas d'avoir des résultats exhaustifs.

Seul *CO*1/*2* possède un taux de ND supérieur à 2% expliqué également par le chevauchement des valeurs de Pscore lors de l'étape de définition des seuils.

3 Développement et application de la technologie HIFI à la détection de pathogènes responsables de HAP (Pneumonies Acquises à l'Hôpital) et VAP (Pneumonies Acquises sous Ventilation)

3.1 Buts / Enjeux

Les syndromes respiratoires associés à des infections représentent une menace pour la santé humaine à travers le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les infections respiratoires des voies inférieures sont la 2^{ème} cause de décès à l'échelle mondiale en 2012 (Source Rapport statistiques sanitaires mondiales 2014 de l'OMS). Une baisse de 30% est toutefois observée entre 2000 et 2012, mais ces pathologies restent responsables de 3,1 millions de décès en 2012, toujours à l'échelle mondiale.

Un grand nombre d'agents infectieux peuvent être impliqués dans l'acquisition de ces infections respiratoires, notamment des bactéries et des virus. Une pneumonie peut par exemple être induite par une quinzaine d'agents infectieux différents, chacun ayant ses propres facteurs de résistance et de virulence.

Ces pathologies peuvent se transmettre pour aboutir à des infections communautaires, ou bien s'acquérir en milieu hospitalier : on parle alors d'infection nosocomiale. Elles sont causées par des microorganismes possédant de multiples résistances envers les agents anti-infectieux. Ces résistances sont acquises à la suite de contacts trop nombreux et récurrents entre les microorganismes et ces antibiotiques. La tentative du clinicien de caractériser l'agent infectieux responsable de la pathologie du patient s'avère compliquée, en raison du nombre d'essais disponibles (identification ET détection des facteurs de virulence et de résistance), de leur temps d'exécution et de leur coût. La plupart des agents pathogènes sont actuellement identifiés individuellement par culture sur boîte de Petri ou par des méthodes basées sur la PCR.

Il est donc primordial que les cliniciens disposent d'un outil de choix permettant un diagnostic rapide de la pathologie infectieuse, des microorganismes qui en sont responsables, ainsi que des éventuels facteurs de résistance et de virulence associés, afin de répondre rapidement et efficacement aux besoins du patient, et de lui proposer le traitement le mieux adapté.

Aujourd'hui, 3 technologies faisant partie intégrante du diagnostic moléculaire sont en constante évolution : des systèmes modernes d'extraction d'acides nucléiques, des PCR

multiplexées ainsi que des plateformes d'analyse multiplexées. Ces trois technologies ont été ingénieusement combinées afin de créer le produit *HIFI Blood 96™*, précédemment évoqué. Mais cette combinaison s'avère également applicable pour la détection et l'identification d'agents pathogènes responsables d'infections respiratoires en modulant les cibles de la PCR multiplexe et les sondes immobilisées sur le support adhésif. Le test ReSynPlex (Respiratory Syndrome Linked Pathogens Multiplex Detection and Characterization) a ainsi été développé afin de répondre le plus précisément possible aux besoins des cliniciens.

3.2 Méthodes existantes

3.2.1 Méthodes conventionnelles

L'isolation des virus par culture cellulaire sur du milieu de culture adapté a longtemps été considérée comme la méthode standard pour la détection des virus respiratoires, du fait de sa grande sensibilité sur la plupart des pathogènes respiratoires (à la condition qu'ils soient cultivables) lorsque le test est réalisé sur un échantillon « frais ». Cependant, l'inconvénient majeur de ce type d'analyse est relatif au temps d'obtention du résultat, qui dépend du temps de culture de l'agent pathogène et peut s'étendre sur plusieurs jours, ce qui est trop long pour être cliniquement pertinent.

Progressivement à partir des années 1990, d'autres méthodes de diagnostic ont fait leur apparition, basées notamment sur la détection des antigènes ou anticorps spécifiques. Ils ont la capacité de fournir des résultats rapides, en moins de 30 minutes.

Plusieurs tests de diagnostic rapides sont actuellement disponibles sur le marché pour la détection des virus Influenza A et B, RSV (Virus Respiratoire Syncytial), ou les adénovirus.

Dans son rapport du contrôle du marché des tests rapides de diagnostic de la grippe d'avril 2013, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé recense 20 tests dédiés aux virus de la grippe, en format bandelettes ou cassettes. Tous fournissent un résultat en 15 minutes maximum, possèdent une sensibilité comprise entre 61 et 100%, et une spécificité allant de 85 à 100% en comparaison avec d'autres méthodes (RT-PCR et/ou culture cellulaire et/ou autre méthode

immuno chromatographique). Ils peuvent donc, pour certains, manquer de sensibilité et de spécificité. C'est dans cette optique que les techniques d'amplification d'ADN ont fait leur apparition. Elles ont offert plusieurs avantages non négligeables par rapport aux techniques conventionnelles. Outre des sensibilités et spécificités meilleures, elles se basent sur des protocoles standardisés, résultant donc en un certain potentiel d'automatisation.

3.2.2 Méthodes moléculaires

3.2.2.1 GeneXpert

Commercialisé par Cepheid, le système GeneXpert intègre la préparation de l'échantillon, l'amplification et la détection de la séquence cible dans des échantillons simples ou complexes en utilisant la PCR en temps réel couplée à des sondes de type Molecular Beacons. Il repose sur l'utilisation d'une cartouche à insérer dans le module de l'appareil afin de pouvoir procéder à l'analyse de l'échantillon. Cette cartouche est composée de plusieurs compartiments :

- 11 chambres de traitement dédiées au passage et l'analyse de l'échantillon et contenant les différents réactifs nécessaires.
- La soupape. Elle pivote et permet aux fluides de se déplacer entre les différentes chambres. A travers la soupape, la cible est isolée, les inhibiteurs PCR neutralisés, et une lyse par sonication est réalisée. Après son traitement, l'échantillon est mélangé aux réactifs PCR et transféré dans le tube réactionnel.
- Le tube réactionnel qui permet à la réaction de PCR et à la détection optique de se dérouler.

L'analyse des résultats se fait par l'intermédiaire d'un logiciel spécifique.

Le système GeneXpert est disponible en configuration 1, 2, 4, 16, 48 et 80 modules, permettant donc d'analyser simultanément jusqu'à 80 échantillons. Le système de modules est universel. C'est la cartouche qui est spécifique des cibles recherchées grâce aux réactifs qu'elle contient. Des cartouches sont disponibles pour cibler notamment *Staphylococcus aureus* et sa résistance à la méthicilline, pour la détection des Streptocoques du groupe B, du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et de sa résistance à la rifampicine, de la bactérie *Clostridium difficile*, pour cibler les gènes *vanA* et *vanB*

conférant la résistance à la vancomycine. Le système GeneXpert permet aussi la détection des virus grippaux de type A et la détection des méningites à entérovirus. Des cartouches permettant des tests relatifs à des pathologies sexuellement transmissibles, à l'oncologie et à la génétique sont également disponibles.

Plusieurs études ont été menées afin d'évaluer les performances et les avantages de ce système. En 2012, Laudat *et al.* ont testé quatre techniques de biologie moléculaire, dont GeneXpert de Cepheid et la technique conventionnelle de culture sur boîte de Petri pour la détection de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) dans le but de définir une stratégie économique-pratique pour leur laboratoire (Laudat *et al.*, 2012). Quatre critères ont guidé leur étude :

- La technique, c'est-à-dire le temps nécessaire afin de réaliser l'analyse d'un ou d'une série de 10 échantillons, ainsi que la simplicité du test (compétences ou non requises en biologie moléculaire)
- La réponse, c'est-à-dire le temps nécessaire pour l'obtention du résultat (temps entre le prélèvement et la réponse aux cliniciens et la facilité de lecture et d'interprétation des résultats)
- Le coût du test, comparé à ceux de deux géloses, pris comme références (gélose au sang et milieu chromogène rendu sélectif par adjonction de céfoxitine)
- La valeur prédictive négative (probabilité que le patient soit non porteur)

Aucune technique testée n'a montré un résultat probant sur les quatre critères à la fois. Cependant, concernant la plateforme GeneXpert, les auteurs avancent comme avantages notamment la non nécessité d'une formation spécifique, la facilité de lecture et d'interprétation des résultats ainsi qu'une valeur prédictive négative de 100%. En revanche, ils estiment un coût 40 fois supérieur à celui de la technique de référence.

De leur côté, Bunsow *et al.* confirment également l'utilité et la rapidité du test GeneXpert pour la détection de *Mycobacterium tuberculosis* et sa résistance à la rifampicine, mais notent cependant le fait que le résultat concernant la résistance à la rifampicine doit être confirmé par un test phénotypique de sensibilité à l'antibiotique (Bunsow *et al.*, 2014).

L'utilité de ce test a également été citée pour la détection de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez des patients présentant une pneumonie acquise sous ventilation (Cercenado *et al.*, 2012).

3.2.2.2 ResPlex

Ce test, distribué par Qiagen, détecte 19 pathogènes différents associés aux infections respiratoires parmi lesquels le métapneumovirus et le bocavirus. Pour certains pathogènes, le test est capable de différencier les sous-types comme pour les virus de la grippe A et B, le virus respiratoire syncytial, les virus parainfluenza, les picornavirus, coronavirus et adenovirus. Il est basé sur une PCR multiplexe enrichie en cibles (target-enriched multiplex PCR : Tem-PCR™), c'est-à-dire qu'une étape d'enrichissement de la cible est réalisée en utilisant une toute petite quantité d'amorces spécifiques, afin de réduire les formations de dimères d'amorces ainsi que les amplifications non spécifiques, ce qui augmente donc la spécificité du test. Cette technique d'enrichissement avait déjà été décrite auparavant (Li *et al*, 2007; Han *et al*, 2006; Brunstein & Thomas, 2006), mais a été modifiée par Qiagen afin d'inclure des contrôles supplémentaires.

Une fois les cibles des virus respiratoires amplifiées par RT-PCR, elles sont hybridées en phase solide à des sondes greffées sur des billes. Ces billes sont étiquetées par des molécules fluorescentes et passent ensuite à travers un système basé sur la technologie Luminex, c'est-à-dire un cytomètre en flux. Cet instrument est capable d'identifier la bille ainsi que l'amplicon hybridé en analysant la fluorescence correspondante. Un résultat en Unité d'Intensité Moyenne de Fluorescence (MFI : Mean Fluorescence Intensity) est généré par le logiciel associé et les valeurs obtenues sont utilisées afin de savoir si le test est positif (présence du virus dans l'échantillon analysé) ou négatif (absence du virus). Plusieurs contrôles sont utilisés dans ce test dont un contrôle externe positif, basé sur l'amplification du gène *IDS* (iduronate-2-sulfatase) humain, situé sur le chromosome X, afin de s'assurer que le prélèvement de l'échantillon était approprié pour délivrer des cellules humaines dans l'échantillon du patient (Schrijver, 2011).

Le test ResPlex II est actuellement disponible en RUO et a été testé par plusieurs groupes de chercheurs, notamment par Pillet *et al.*, qui ont évalué les performances de 6 systèmes multiplexés pour le diagnostic d'infections respiratoires. Le kit ResPlex II montre une des sensibilités les plus faibles (56,25%) comparé aux autres méthodes moléculaires, malgré une spécificité de 99,08% et une précision de 0,93 (Pillet *et al*, 2013).

Le test ResPlex III a aussi été testé par Eggers *et al.* pour détecter et sous-typier les virus grippaux saisonniers de 2006-2007 (Eggers *et al*, 2012) et ils en ont conclu que ce test pourrait apporter une réponse rapide à une éventuelle menace de pandémie de même

qu'il est capable de fournir un sous-type des souches du virus Influenza rencontrées lors des épidémies saisonnières. Selon les auteurs il présente donc des bénéfices potentiels pour la gestion des virus grippaux circulants.

3.2.2.3 FilmArray®

Commercialisé par BioFire Diagnostics, ce système permet l'identification de 20 pathogènes respiratoires en une heure environ (17 virus et 3 bactéries). Tous les réactifs nécessaires à l'analyse sont contenus dans la « FilmArray® Pouch » (figure 24), ou poche de stockage des réactifs, sous forme lyophilisés. Cette poche est tout d'abord introduite dans le bloc de chargement. La solution d'hydratation est ajoutée. L'échantillon est dilué dans le tampon puis introduit à son tour dans la poche. Cette dernière est retirée du bloc de chargement puis chargée dans l'appareil d'analyse.

L'échantillon passe dans la chambre de lyse, où une lyse physique de l'échantillon (cellules et virus) est réalisée. Les acides nucléiques ainsi libérés sont liés à des billes magnétiques et le tout est transféré dans la chambre de purification. Un tampon de lavage retire les débris cellulaires et viraux, puis le tampon d'élution rompt le lien entre les acides nucléiques et les billes magnétiques. Ces derniers sont alors transférés vers la chambre de PCR afin de subir une rétro-transcription. Une PCR nichée (Nested-PCR) est ensuite réalisée. Elle consiste en une première amplification multiplexe, puis les produits sont dilués afin de limiter le nombre d'amorces restantes. La mixture est ensuite complétée avec un mix réactionnel de PCR « frais » et aliquotés dans chaque puits de la puce, préalablement pré-chargés avec un nouveau couple d'amorces, afin de pouvoir réaliser la seconde étape de la PCR nichée.

Ces amorces sont dessinées pour s'hybrider à des régions contenues à l'intérieur des fragments issus de la première étape multiplexe de la PCR. Cette seconde étape est quant à elle monoplexe puisqu'un seul couple d'amorces spécifiques est contenu dans chaque puits. Ce type de PCR a pour but d'éliminer les amplifications non spécifiques que l'on peut rencontrer lors de PCR multiplexes classiques. Un agent intercalent fluorescent se lie ensuite aux doubles brins formés.

Les organismes sont identifiés sur la base des puits positifs, les résultats sont intégrés par le logiciel et un rapport d'analyse est ensuite généré.

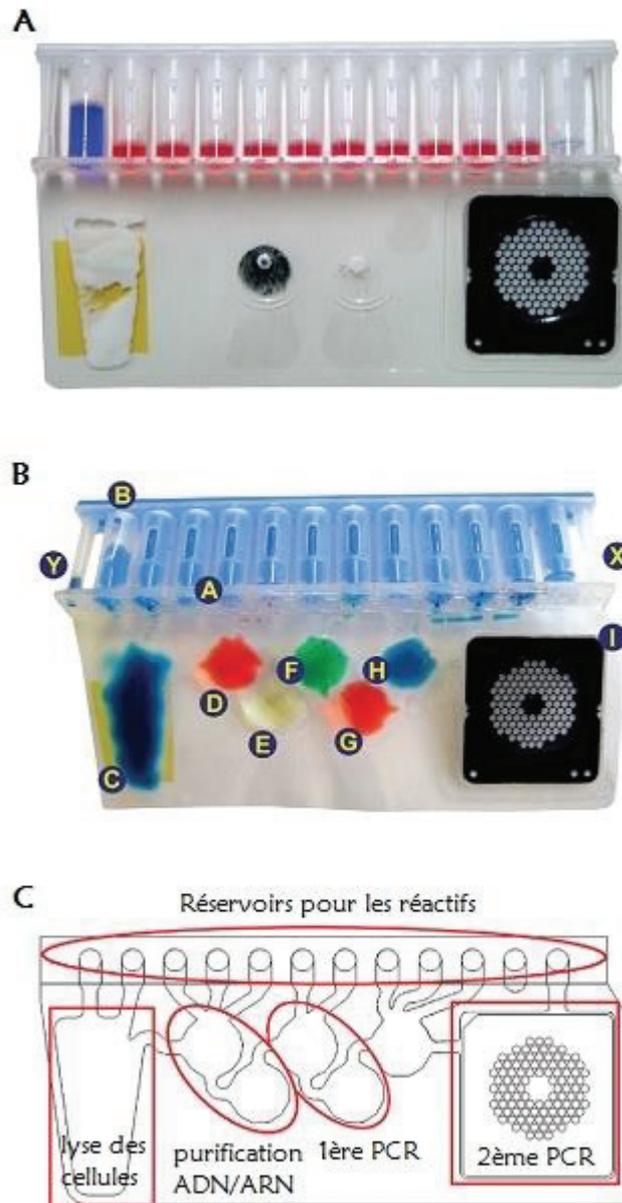


Figure 24 - La "FilmArray® Pouch" (Poritz et al, 2011). **A** : La "FilmArray® Pouch" remplie avec l'échantillon (coloré en bleu pour l'illustration) à gauche de la poche, et la solution d'hydratation (colorée en rouge) du côté droit de la poche. **B** : La poche remplie avec différents colorants afin de matérialiser tous les compartiments (A-réservoir d'injection ; B-piston ; C-chambre de lyse ; D à H-chambres réactionnelles ; I-puits de la puce ; Y-port d'injection ; X-port d'hydratation). **C** : Schéma d'une poche montrant les traces des chambres, canaux et puits (en noir) et les domaines réactionnels (en rouge).

Plusieurs groupes de chercheurs ont évalué les performances du système FilmArray®. Popowitch *et al.* ont estimé une sensibilité de 84,5% et une spécificité de 100% (Popowitch *et al.*, 2013). Quant à Piralla *et al.*, ils ont mené leur étude sur des échantillons prélevés en unité de soins néonataux (écouvillons nasaux, lavages broncho-alvéolaires, aspirations nasopharyngées et aspirations trachéales). Sur 152 échantillons,

une concordance de 94,4% a été obtenue en comparaison avec les essais de PCR en temps réel développés dans leur laboratoire. Dans 5,6% des cas, FilmArray® a détecté un virus additionnel. De plus, pour 87,5% des échantillons, les résultats de FilmArray® sont concordants avec ceux d'une autre plateforme d'analyse moléculaire, Seegene Seeplex RV15®, alors que 12,5% sont discordants. Ils avancent comme avantages principaux une détection rapide des virus (1h), le nombre de pathogènes détectables en un seul test ainsi qu'un temps de manipulations manuelles réduit (Piralla *et al*, 2014).

3.2.2.4 Check-Direct

La société Check-Points, fondée en 2002 et basée aux Pays-Bas, développe des tests de diagnostics moléculaires, notamment pour la détection des carbapénémases, ESBLs (Extended Spectrum Beta-Lactamases : bêta-lactamase à spectre étendu), et AmpCs dans le but d'améliorer le contrôle et la prévention des résistances aux antibiotiques portées par certaines bactéries Gram négatives : Check-direct CPE et Check-direct ESBL.

Ces tests reposent sur le principe de la PCR multiplexe en temps réel, à l'aide de sondes molecular beacons, hautement spécifiques, en utilisant jusqu'à 5 fluorophores différents. Ces sondes adoptent une structure particulière en « tige-boucle ». Dans la boucle se situe la partie de la sonde complémentaire à l'ADN ou l'ARN cible, et la tige est formée par l'assemblage des deux extrémités 5' et 3' de la sonde, sur une longueur d'environ 5 à 7 nucléotides. Un fluorophore est greffé covalamment à l'extrémité 5' ainsi qu'un quencher à l'extrémité 3'. Dans sa structure repliée en tige-boucle, la proximité du fluorophore et du quencher empêche une quelconque émission de fluorescence. Lorsque l'ADN ou l'ARN cible est présent, la sonde change de conformation pour que la partie boucle aille s'hybrider sur sa séquence complémentaire. La structure en duplex ainsi formée est plus stable que la tige initialement présente sur la sonde, du fait qu'un nombre plus important de nucléotides est impliqué dans le duplex cible/sonde. Ceci provoque l'éloignement du quencher et du fluorophore et permet à ce dernier d'émettre la fluorescence qui est alors mesurée en temps réel par le système de détection. Une émission de fluorescence traduit donc la présence de la cible recherchée dans l'échantillon.

En 2013, Nijhuis *et al.* ont évalué le test Check-direct CPE, développé pour détecter les gènes de résistance aux carbapénémases les plus fréquemment rencontrés chez les

entérobactéries (KPC, OXA-48, tous les variants de VIM sauf VIM-7 et NDM) à partir d'écouvillons rectaux. Les tests ont montré 100% de sensibilité et de spécificité. De plus, la limite de détection de la PCR en temps réel est comparable à celle obtenue sur le milieu de culture ChromID CARBA agar et les résultats ont été obtenus en 3h.

3.2.2.5 *RespiFinder*®

Commercialisé par Pathofinder, ce test de diagnostic moléculaire en temps réel identifie jusqu'à 22 pathogènes responsables d'infections respiratoires (18 virus et 4 bactéries). Les résultats sont obtenus en 4 heures (à partir d'ADN extrait). Il repose sur le principe de l'analyse des courbes de fusion. Afin d'appliquer cette méthode à un test multiplexe, Pathofinder a développé la technologie SmartFinder® (figure 25) qui permet, en une seule réaction, d'analyser jusqu'à 12 cibles par la méthode des courbes de fusion.

Après une pré-amplification spécifique du gène, 2 sondes uniques s'hybrident spécifiquement à l'ADN pré amplifié de chaque pathogène présent dans l'échantillon. Ces sondes sont jointes grâce à une étape de ligation puis amplifiées en utilisant un couple d'amorces universelles dont l'une est marquée par la sonde fluorescente FAM™. La détection des sondes amplifiées est faite par analyse des courbes de fusion, sur des systèmes de PCR en temps réel. 12 sondes de détection marquées soit par Cy5 soit par ROX™ et possédant des températures de fusion spécifiques permettent la détection des sondes amplifiées et donc du pathogène correspondant.

Le contrôle interne est détecté par une sonde spécifique dans un canal additionnel afin de valider un résultat négatif sur l'échantillon clinique.

Pillet *et al.* ont évalué la sensibilité de ce test (*RespiFinder*® SMART 22 FAST v2.0) à 79,17% et sa spécificité à 98,41% (Pillet *et al.*, 2013). Cependant ils notent une durée de test de 7h, ce qui semble un peu long pour un test d'identification de pathogènes respiratoires, là où les cliniciens ont souvent besoin de réponses rapides afin de mettre en place le traitement le plus adapté aux patients dans les meilleurs délais.

Quant à Reijans *et al.*, ils considèrent que le test *RespiFinder*® (une des versions antérieures au test *RespiFinder*® SMART 22 FAST v2.0, identifiant 15 virus), constitue un outil haut-débit pour la détection simultanée des virus respiratoires montrant d'excellentes performances (Reijans *et al.*, 2008).

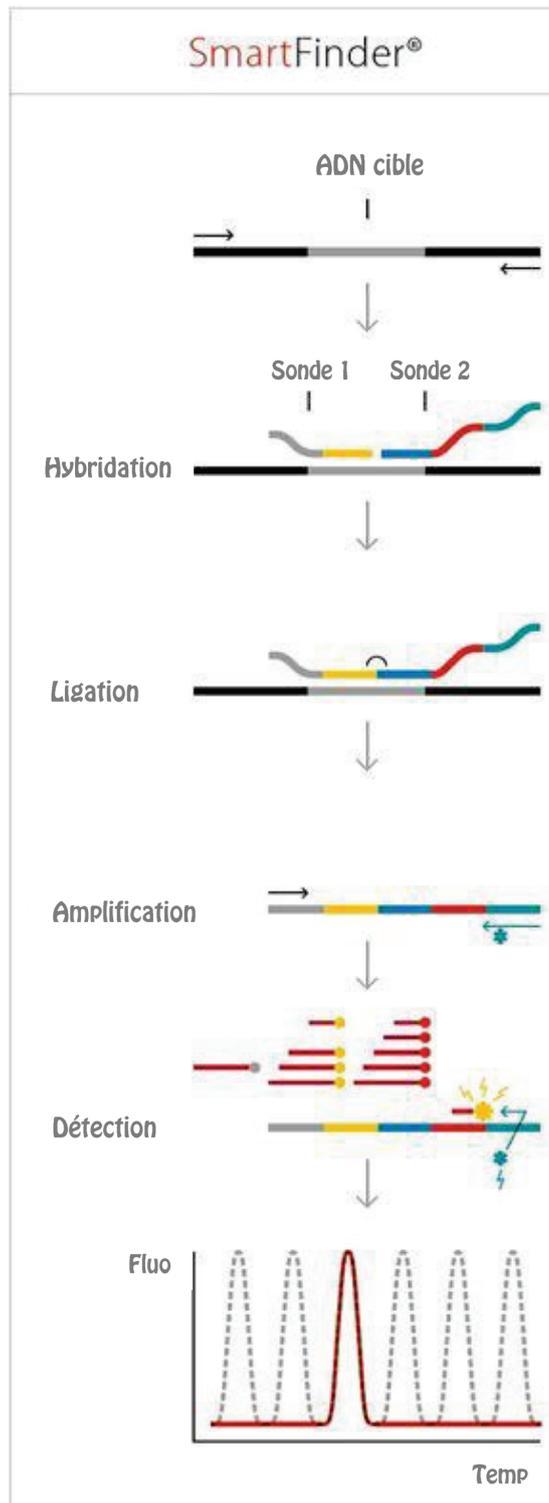


Figure 25- Principe de la technologie SmartFinder® (www.pathofinder.com)

- | | |
|--|---|
| <p>— Amorce sens universelle</p> <p>— Séquence spécifique 2 de la cible</p> <p>— Amorce antisens universelle</p> | <p>— Séquence spécifique 1 de la cible</p> <p>— Séquence d'identification de la sonde</p> |
|--|---|

3.2.2.6 eSensor®

Produit par GenMarkDx™, cette méthode détecte 14 virus respiratoires et utilise une cartouche eSensor® qui combine la microfluidique et la détection électrochimique. Les résultats sont obtenus en 30 minutes à partir du matériel génomique déjà amplifié. Aucune purification post-PCR ni aucun lavage ne sont nécessaires. La traçabilité est assurée grâce à un lecteur de code-barres inclus dans l'instrument XT-8, dans lequel la cartouche est insérée après avoir été préalablement chargée avec le matériel génomique amplifié du patient.

Concernant le protocole de réalisation, une fois l'ADN extrait et les cibles amplifiées, le mélange réactionnel est traité avec une exonucléase afin d'obtenir un ADN simple brin. Cet ADN cible est mis en présence d'une solution contenant une sonde signal. Si la cible est présente, la sonde signal s'hybride sur l'ADN. Le mélange est ensuite pompé à travers la chambre microfluidique de la cartouche eSensor® et le complexe ADN/sonde signal est complété avec une sonde de capture liée à une électrode en or. Le voltage est balayé sur chaque électrode et l'ADN cible est analysé par détection électrochimique.

Concernant eSensor® RVP (Respiratory Viral Panel), Popowitch *et al.* ont estimé une sensibilité de 98,3% et une spécificité de 99,2% (Popowitch *et al.*, 2013).

Une autre étude a été réalisée par Pierce *et al.* sur 250 échantillons congelés (écouvillons et aspirations nasopharyngés, aspirations trachéales et lavages bronchoalvéolaires) prélevés en pédiatrie et préalablement caractérisés par PCR en temps réel développée dans leur laboratoire. Leurs tests sur la plateforme eSensor® ont mis en évidence une concordance de 99,2% entre les deux méthodes. eSensor® RVP est une plateforme robuste et relativement facile à utiliser. Cependant, les auteurs notent un délai d'exécution un peu long (plus de 6h pour l'analyse de 6 échantillons sur 20 virus respiratoires, comprenant un temps de manipulations manuelles d'une heure contre 3h10 pour leur PCR en temps réel pour l'analyse de 6 échantillons sur 10 virus respiratoires avec 45 minutes de manipulations manuelles). Mais la principale différence se fait au niveau du coût. En effet, leur PCR « maison » possède un coût total avoisinant 334\$ (tous réactifs et fournitures compris, soit 55\$ par échantillon pour 10 virus respiratoires) alors que le test eSensor® atteint 90\$ par test (même nombre d'échantillons, deux fois plus de virus analysés), sachant que plusieurs réactifs et fournitures ont dû être apportés par le laboratoire, les auteurs estiment le coût de la

méthode eSensor® à environ 837\$ pour 6 échantillons, soit 139,50\$ par échantillon (Pierce & Hodinka, 2012).

3.2.2.7 Allplex™, Anyplex™ et Seeplex®

Tous trois développés et commercialisés par Seegene, ils sont axés sur la détection et l'identification de pathogènes responsables d'infections respiratoires à partir d'écouvillons nasopharyngés, d'aspirations nasopharyngées, de lavages broncho-alvéolaires et pour certains d'expectorations.

Le test Allplex™ permet la détection et l'identification de 26 pathogènes (16 virus, 7 bactéries et 3 sous-types du virus de la grippe A), répartis en 4 panels. La réverse-transcription et la PCR multiplexe en temps réel sont réalisées en une seule étape, et les résultats sont obtenus en 4h30 environ. Le multiplexage est réalisable grâce à la technologie MuDT™ (Multiple Detection Temperatures, développée par Seegene) qui permet l'obtention des valeurs de cycle seuil (C_t) de plusieurs pathogènes dans un même canal de détection sur un thermocycleur adapté aux PCR en temps réel.

Le test Anyplex™ est décliné en plusieurs versions selon les pathogènes ciblés. Les plus complets sont les tests Anyplex™RV16 et Anyplex™RB5 qui permettent la détection de 16 virus respiratoires et de 5 bactéries respiratoires, respectivement. La PCR multiplexe en temps réel utilise les technologies DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide) et TOCE™, toutes deux propriétés de Seegene. La technologie DPO™ consiste en une construction spécifique des amorces (une partie 5' = stabilisateur et une partie 3' = déterminant, jointes par un lien de polydeoxyinosine A) qui permet d'inhiber les hybridations non spécifiques. Quant à la technologie TOCE™, elle permet la détection et l'identification de plusieurs cibles et/ou variations génétiques de façon simultanée. La technologie TOCE™ fait appel à la technologie DPO™.

Enfin le test Seeplex® est lui aussi décliné en plusieurs versions selon les pathogènes ciblés. Seeplex® RV15 permet la détection de 15 virus respiratoires, en utilisant la technologie DPO™, disponible également en version « OneStep » où la synthèse de l'ADN complémentaire et la PCR multiplexe sont réalisées en une seule étape. Le test Pneumobacter ACE Detection détecte quant à lui 6 bactéries responsables de pneumonies, toujours avec la technologie DPO™. Pillet *et al.* ont utilisé de façon

combinée les tests Seeplex®RV15 OneStep Detection et Pneumobacter ACE Detection et ont obtenu une sensibilité de 54,17% et une spécificité de 98,16% (Pillet *et al*, 2013). Cho *et al*. ont comparé les tests Anyplex™RV16 et Seeplex®RV15 avec les méthodes de culture, et ce sur 730 échantillons d'aspirations nasopharyngées. Pour 9 des 11 virus testés, RV16 a montré une sensibilité supérieure à RV15. Pour 1 virus RV15 a montré une sensibilité supérieure à RV16 et ces valeurs sont égales pour le dernier virus. Concernant les spécificités, elles ont été évaluées à 99,9% pour les deux tests, et 100% pour les méthodes de culture (Cho *et al*, 2013).

3.2.2.8 xTAG® RVP

Propriété de Luminex®, xTAG® est un test moléculaire couvrant 20 virus (dont 3 sous-types de 3 virus) associés aux maladies respiratoires ou grippales. Le test est divisible en deux étapes. Premièrement une RT-PCR multiplexe génère des amplicons spécifiques, puis une étape d'extension spécifique d'amorces multiplexe (TPSE : Target Specific Primer Extension) est réalisée.

Le principe de ce test est décrit dans le travail de Merante et al. en 2007 (Merante *et al*, 2007). Les acides nucléiques viraux sont extraits d'échantillons nasopharyngés puis la RT-PCR (16 cibles) est réalisée. Les produits ainsi générés sont traités par la SAP afin d'inactiver les nucléotides non incorporés puis traités par l'exonucléase I pour dégrader les amorces en excès.

La deuxième partie du protocole consiste à effectuer l'extension spécifique des amorces ou TSPE. Dans cette étape, chaque cible est spécifiquement hybridée au TSP (Target Specific Primer, ou amorce spécifique de la cible) possédant une étiquette ADN unique. Une ADN polymérase procède ensuite à l'extension de l'amorce en incorporant des nucléotides dCTP couplés à la biotine. Après la réaction de TSPE, les produits sont ajoutés directement dans des micropuits contenant des billes couplées à l'anti-étiquette. Ces billes, chacune ayant une séquence anti-étiquette unique spécifique à une seule cible, sont distinguables entre elles spectralement. Les produits d'extension biotinylés hybridés à la surface des billes sont détectés à l'aide d'une molécule rapportrice fluorescente, typiquement la streptavidine couplée à la phycoérythrine. Chaque amorce étiquetée s'hybride seulement sur son anti-étiquette correspondante, et chaque bille détecte donc un virus spécifique à travers l'association bille/anti-étiquette/amorce étiquetée. Les billes

sont ensuite analysées par l'instrument Luminex® 100IS ou 200IS, qui contient deux lasers. L'un identifie la signature fluorescente de la bille, et le second identifie la présence ou l'absence du produit d'extension de l'amorce à travers la présence ou non de la phycoérythrine.

Les données générées par l'instrument sont analysées grâce au logiciel Tag-It™ afin de fournir un rapport résumant quels virus sont présents dans l'échantillon. Un rapport détaillé contenant les données brutes est également accessible.

Cet aperçu des tests et/ou plateformes existants pour diagnostiquer les virus ou bactéries responsables d'infections respiratoires n'est pas exhaustive. D'autres tests sont disponibles sur le marché, ciblant un nombre plus ou moins important de pathogènes et qui ont fait l'objet de publications ces dernières années. Les études menées par plusieurs groupes de chercheurs ont montré que les plateformes existantes ne respectent pas tous les critères nécessaires au clinicien, qui est confronté à un choix entre le nombre de pathogènes ciblés, la rapidité du test, et son coût. Le développement de la plateforme ReSynPlex s'inscrit dans le but de réunir les besoins du clinicien : la détection d'un grand nombre de pathogènes en quelques heures, avec un coût maîtrisé.

3.3 Développement du test haut débit

Ces recherches s'inscrivent dans le cadre du projet ANR-ReSynPlex. Il implique, outre le groupe Biocapteurs et Biopuces de l'équipe GEMBAS de l'ICBMS et AXO Science, trois autres partenaires, situés à Grenoble :

- l'équipe Immunologie Analytique des Pathologies Chroniques de l'Institut Albert Bonniot (IAB), U823
- l'équipe Génomique et Evolution des Microorganismes du Laboratoire d'Adaptation et Pathogénie des Microorganismes (LAPM), UMR5163
- le groupe Biologie Intégrative des Virus Persistants de l'Unité des Interaction Virus – Cellules hôtes (UVHCI), UMI3265

Le projet se décompose en trois tâches principales, réparties entre les cinq partenaires du projet.

La tâche 1, réalisée par le LAPM, l'UVHCI et l'IAB regroupe tout ce qui est relatif à la préparation des échantillons et la réalisation des PCR multiplexes. Ils ont également sélectionné les cibles pertinentes à inclure sur la plateforme ReSynPlex.

La tâche 2, gérée par AXO Science et l'ICBMS, concerne l'immobilisation des sondes oligonucléotidiques, la mise en place du protocole du test à partir des acides nucléiques amplifiés, ainsi que toute la partie automatisée.

Pour finir la tâche 3, réservée à l'UVHCI et au LAPM, consiste à transmettre les échantillons d'acides nucléiques amplifiés à AXO Science et à établir la cohorte d'échantillons nécessaires à la validation du test.

3.3.1 Sélection des cibles

La sélection des cibles a été réalisée par le LAPM, l'UVHCI et l'IAB. Les pathogènes majoritairement responsables des infections respiratoires acquises à l'hôpital ont été inclus dans le panel établi, ce qui représente 11 gènes permettant l'identification de 9 bactéries et virus. Cinq gènes de résistance aux antibiotiques (carbapénémases, conférant la résistance aux β -lactamases) ont également été sélectionnés pour être analysés sur la plateforme ReSynPlex.

Le tableau 19 détaille les organismes / résistances ciblés ainsi que les gènes d'intérêt.

Tableau 19 - Cibles du test ReSynPlex, les gènes associés et noms utilisés sur la matrice de dépôt

Bactérie / Virus / Résistance	Gène	Nom utilisé sur la matrice de dépôt
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i>	<i>nuc</i>
	<i>sa442</i>	<i>sa442</i>
	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>lytA</i>	<i>lytA</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>fucK</i>	<i>fucK</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>algD</i>	<i>algD</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>mip</i>	<i>mip</i>
Influenza A (virus de la grippe A)	matrix protein	InfIA
Influenza B (virus de la grippe B)	neuraminidase	InfIB

RSV A (Virus Respiratoire Syncytial A)	nucleoprotein	RSVA
RSV B (Virus Respiratoire Syncytial B)	nucleoprotein	RSVB
Carbapénémase	IMP	IMP
Carbapénémase	VIM	VIM
Carbapénémase	OXA-48	OXA-48
Carbapénémase	NDM	NDM
Carbapénémase	KPC	KPC

3.3.2 Conception des amorces et amplification des cibles

La conception des amorces permettant d'amplifier chaque cible définie dans le tableau 19 a été réalisée par le LAPM. Ces amorces peuvent provenir directement de publications ou bien avoir été modifiées afin d'obtenir une homogénéité des températures d'hybridation. Pour des raisons de confidentialité, les séquences des amorces ne seront pas divulguées dans ce manuscrit.

Les extractions d'acides nucléiques (ADN pour les bactéries et ARN pour les virus) ont également été réalisées par le LAPM au moyen de kits d'extraction QIAGEN : le kit QIAGEN QIAmp mini kit pour les ADN, et le kit QIAGEN one-step RT-PCR kit pour les ARN. Ce kit permet d'effectuer la rétro-transcription des ARN ainsi que la PCR en une seule étape.

Une fois les PCR terminées, les produits d'amplification sont envoyés à AXO Science pour procéder à l'analyse sur la plateforme robotique.

3.3.3 Conception des sondes

Pour des raisons de confidentialité, une seule séquence de sonde dessinée pour le test ReSynPlex et qui servira d'exemple sera divulguée dans ce manuscrit.

Les séquences des acides nucléiques correspondant aux cibles ont été récupérées sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> qui gère la banque américaine d'acides nucléiques GenBank) par le LAPM. Sur ces séquences (figure 26) ont été indiqués la position des

amorces (en jaune), la localisation des polymorphismes de séquence (en rouge) au vu des alignements de séquence que le LAPM avait réalisés au préalable, ainsi qu'une sonde potentielle (en vert).

lytA :

Streptococcus pneumoniae TIGR4 chromosome, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_003028.3

[GenBank Graphics](#)

```
>gi|194172857:c1841361-1840405 Streptococcus pneumoniae TIGR4 chromosome,
complete genome
ATCGAAATTAATGTGAGTAAATTAAGAACAGATTTGCCTCAAGTCGGCGTGCAACCATATAGGCAAGTAC
ACGCACACTCAACTGGGAATCCGCATTCAACCGTACAGAATGAAGCGGATTATCACTGGCGGAAAGACCC
AGAATTAGGTTTTTCTCGCACATTGTTGGGAACGGTTGCATCATGCAGGTAGGACCTGTTGATAATGGT
GCCTGGGACGTTGGGGCGGTTGGAATGCTGAGACCTATGCAGCGGTTGAACTGATTGAAAGCCATTCAA
CCAAAGAAGAGTTTCATGACGGACTACCGCCTTTATATCGAACTCTTACGCAATCTAGCAGATGAAGCAGG
TTTCCCGAAACCGCTTGATACAGGGAGTTAGCTGGATTAACGCAAGGATTTGCACGAATAACCAA
CCAAACAACCACTCAGACCACGTTGACCCTTATCCATATCTTGCTAAATGGGGCATTAGCCGTGAGCAGT
TTAAGCATGATATTGAGAACGGCTTGACGATTGAAACAGGCTGGCAGAAGAATGACACTGGCTACTGGTA
CGTACATTCAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTTGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGAC
AGTTTCAGGCTATATGCTTGCAGACCCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGACAAC
CAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTACTATTTCAACGAAGAAGGTGCCAT
GAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCATGGTATCA
AATGCCTTATCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACACTGGCAGACA
AGCCAGAATTCACAGTAGAGCCAGATGGCTTGATTACAGTAAAAATA
```

Figure 26 - Partie de la séquence d'ADN codant le gène *lytA* chez *Streptococcus pneumoniae*

Le fichier ainsi généré m'a été envoyé par le LAPM afin de procéder à la sélection de la sonde de détection. Les sondes potentielles ont été triées en fonction de certaines propriétés :

- la température de fusion T_m : entre 64 et 66°C
calculée grâce à la formule de calcul $T_m = 2AT + 4GC$
- le pourcentage en GC (classiquement entre 40 et 60%)
- la formation de structures secondaires

Afin de satisfaire à tous ces critères, plusieurs oligonucléotides candidats ont été testés sur les logiciels Primer3+, à l'aide de la fonction Primer_Check

(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) pour évaluer le pourcentage en GC et sur Oligocalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) à l'aide de la fonction Mfold pour la formation de structures secondaires.

Voici la sonde potentielle proposée par le LAPM d'après leur étude bibliographique : GCCGAAAACGCTTGATACAGGGAG et le résultat obtenu sur Primer3+ (figure 27).

Primer3Plus pick primers from a DNA sequence		Primer3Manager	Help
		About	Source Code
< Back			
<input checked="" type="checkbox"/> Oligo:	Primer		
Sequence:	GCCGAAAACGCTTGATACAGGGAG		
Length:	24 bp		
Tm:	58.4 °C		
GC:	54.2 %		
ANY:	4.0		
SELF:	0.0		
3' Stability:	4.3 ΔG		
Send to Primer3Manager		Reset Form	

Figure 27 - Paramètres thermodynamiques de la sonde potentielle (extraite de la littérature) *lytA* obtenus grâce au logiciel Primer3+

Le pourcentage en GC, d'une valeur de 54,2 répond aux critères. En revanche, le Tm est égal à 74°C (2x11 + 4x13), trop élevé pour notre étape d'hybridation avec une rampe de température allant de 88°C à 55°C (rampe qui devait être initialement utilisée et qui avait été définie lors de la sélection des sondes). Le risque étant que des cibles s'hybrident de façon non spécifique à cette sonde. Afin de diminuer la température de fusion, la sonde candidate a donc été raccourcie.

Le modèle retenu est le suivant : CCGAAAACGCTTGATACAGGGA. Le pourcentage en GC calculé par Primer3+ est de 50%, et le Tm est de 66°C. Le test Mfold met en évidence 9 structures secondaires possibles à 55°C (tableau 20).

Tableau 20 - Représentations des structures secondaires possibles à 55°C pour la sonde *lytA* sélectionnée, obtenues avec la simulation Mfold

N° structure	Schéma de la structure	Valeur d'énergie libre
1	<p>5' C-C-G-A-T-G-A-T-A-C-A-G-G-G-A 3' 10</p>	$\Delta G = 1,52$ kcal/mol
2	<p>5' C-C-G-A-A-T-G-A-T-A-C-A-G-G-G-A 3' 10</p>	$\Delta G = 1,77$ kcal/mol
3	<p>5' C-C-G-A-A-A-T-G-A-T-A-C-A-G-G-G-A 3' 10</p>	$\Delta G = 1,77$ kcal/mol
4	<p>5' C-C-G-A-A-A-T-G-A-T-A-C-A-G-G-G-A 3' 10</p>	$\Delta G = 1,97$ kcal/mol
5	<p>5' 10 20 3'</p>	$\Delta G = 2,07$ kcal/mol
6	<p>5' C-C-G-C-T-T-G-A-T-A-C-A-G-G-G-A 3' 10</p>	$\Delta G = 2,09$ kcal/mol

7		$\Delta G = 2,38 \text{ kcal/mol}$
8		$\Delta G = 2,46 \text{ kcal/mol}$
9		$\Delta G = 2,52 \text{ kcal/mol}$

Néanmoins, au vu des valeurs d'énergie libre positives de ces structures secondaires théoriques, la probabilité pour que ces conformations aient lieu peut être considérée comme négligeable. Cette sonde a donc été choisie, synthétisée et déposée sur le support adhésif conformément à la matrice préétablie pour être testée expérimentalement. Toutes les sondes du test ReSynPlex ont été sélectionnées conformément à ce mode opératoire.

3.3.4 Preuve de concept

Afin de valider la preuve de concept concernant l'application de la technologie *HIFI* à la détection et l'identification de pathogènes responsables d'infections respiratoires, plusieurs études ont été menées dans le but de valider les critères suivants :

- l'utilisation du support adhésif TKL
- la détection par colorimétrie

- l'automatisation de l'essai
- le multiplexage

Tableau 21 - Gènes ciblés pour le test de PCR monoplexes et provenance des organismes (bactéries ou virus) dont l'ADN ou l'ARN a été extrait

Gène / cible	Organisme	Provenance
nuc	<i>Staphylococcus aureus MSSA</i>	souche de référence 476
	<i>Staphylococcus aureus MRSA</i>	souche de référence 252
sa442	<i>Staphylococcus aureus MSSA</i>	souche de référence 476
	<i>Staphylococcus aureus MRSA</i>	souche de référence 252
mecA	<i>Staphylococcus aureus MRSA</i>	souche de référence 252
lytA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	souche de référence ATCC49619
fucK	<i>Haemophilus influenzae</i>	souche de référence ATCC49766
algD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	souche de référence ATCC27853
mip	<i>Legionella pneumophila</i>	Souche Paris
matrix protein	Influenza A	Plusieurs extraits de patients
neuraminidase	Influenza B	Plusieurs extraits de patients
nucleoprotein	RSV A	Plusieurs extraits de patients
nucleoprotein	RSV B	Plusieurs extraits de patients

La première expérience réalisée a eu pour but de tester des produits issus de PCR monoplexes sur 11 gènes cibles comme le montre le tableau 21.

La matrice de dépôt des sondes établie est représentée sur la figure 28 et les résultats correspondants dans le tableau 22.

dT	InflB	InflB	lytA	lytA	T- Bleu
dT	nuc	nuc	fucK	fucK	T- Bleu
dT	Sa442	Sa442	algD	algD	T- Bleu
dT	mecA	mecA	RSVB	RSVB	T- Bleu
T- Bleu	InflA	InflA	RSVA	RSVA	T- Bleu
T- Bleu	mip	mip	dT	dT	T- Bleu

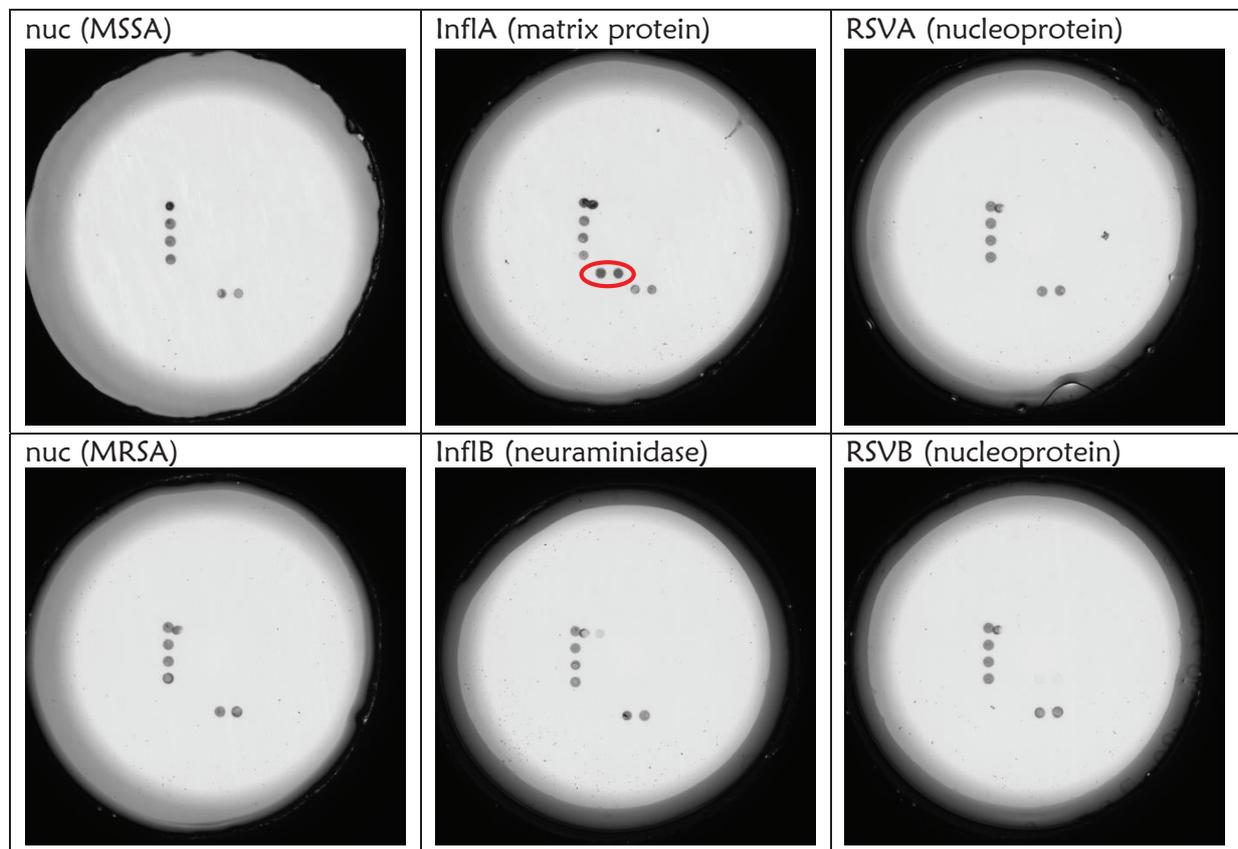
Figure 28 - Matrice des sondes déposées utilisée pour le test d'hybridation des PCR monoplexes. dT : contrôle positif d'hybridation (sonde dT couplée à la biotine) ; T-Bleu : contrôle négatif d'hybridation (pas de sonde dans la solution déposée)

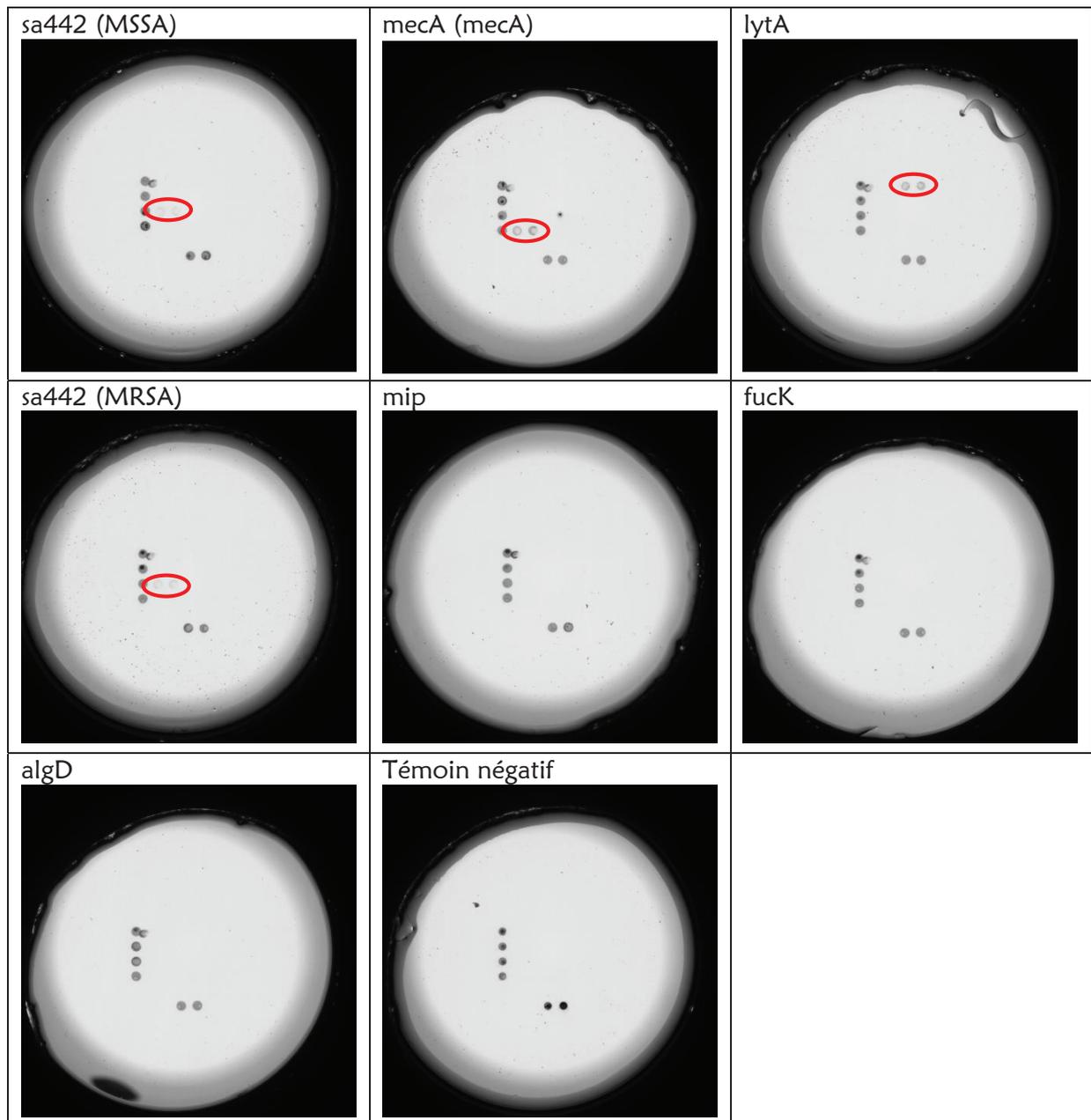
Quatre cibles sont détectées : InflA, *sa442* (MSSA et MRSA), *mecA* et *lytA*. Sept ne le sont pas à la suite de ce test (tableau 23).

Les images observées montrent que, même si toutes les cibles ne sont pas détectées, il est possible de mettre en évidence des produits issus de PCR monoplexes sur des souches bactériennes ou des virus isolés de patients grâce au test d'hybridation sur l'adhésif TKL couplé à une détection par colorimétrie.

Le test ayant été réalisé sur la plateforme dotée d'un automate de pipetage, l'automatisation de l'essai est également validée.

Tableau 22 - Résultats obtenus après hybridation des produits de PCR monoplexes - Rampe de température 88 à 55°C





La rampe de température utilisée pour l'étape d'hybridation des cibles afin de réaliser ce premier test démarrait à 88°C pour descendre jusqu'à 55°C.

Une hypothèse avancée qui pourrait expliquer l'absence de détection de certaines cibles est une température d'hybridation encore trop élevée.

Tableau 23 - Récapitulatif des cibles détectées

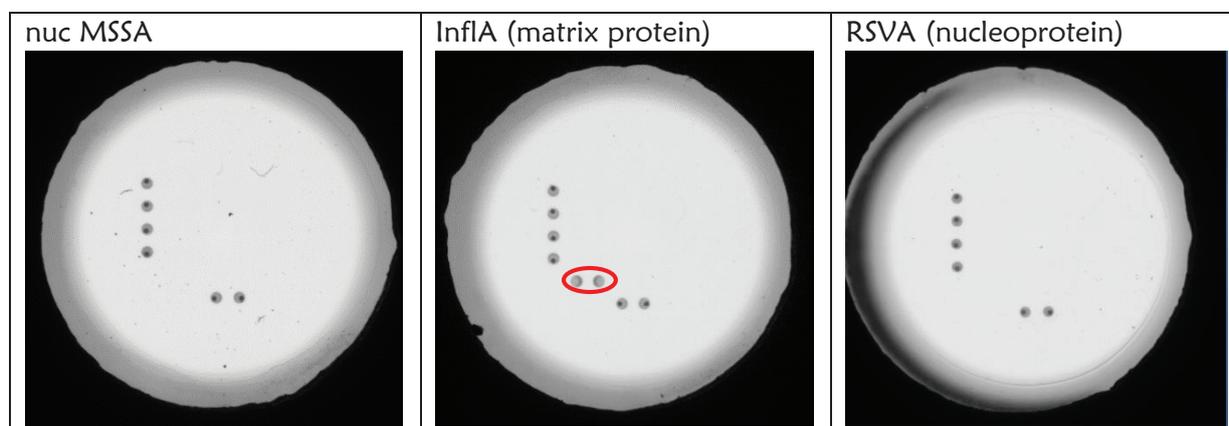
Bactérie / Virus / Résistance	Gène	Nom utilisé sur la matrice de dépôt	Test 1*
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i>	<i>nuc</i>	NON
	<i>sa442</i>	<i>sa442</i>	OUI
	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	OUI
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>lytA</i>	<i>lytA</i>	OUI
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>fucK</i>	<i>fucK</i>	NON
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>algD</i>	<i>algD</i>	NON
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>mip</i>	<i>mip</i>	NON
Influenza A	matrix protein	InflA	OUI
Influenza B	neuraminidase	InflB	NON
RSV A	nucleoprotein	RSVA	NON
RSV B	nucleoprotein	RSVB	NON

* produits de PCR monoplexes, rampe de température de 88 à 55°C

C'est pourquoi un deuxième test a été effectué sur les mêmes cibles (excepté l'Influenza B) en abaissant la rampe de température jusqu'à 30°C, ce qui implique également une durée supérieure de l'étape d'hybridation des cibles. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 24 et récapitulés dans le tableau 25.

Ces résultats montrent qu'en abaissant la rampe de température jusqu'à 30°C, de nouvelles cibles sont détectées (RSVB) et pour d'autres cibles, le signal spécifique est augmenté, c'est-à-dire que l'intensité du signal colorimétrique obtenue est plus forte (*mecA* et *lytA*).

Tableau 24 - Résultats obtenus après hybridation des produits de PCR monoplexes - Rampe de température 88 à 30°C



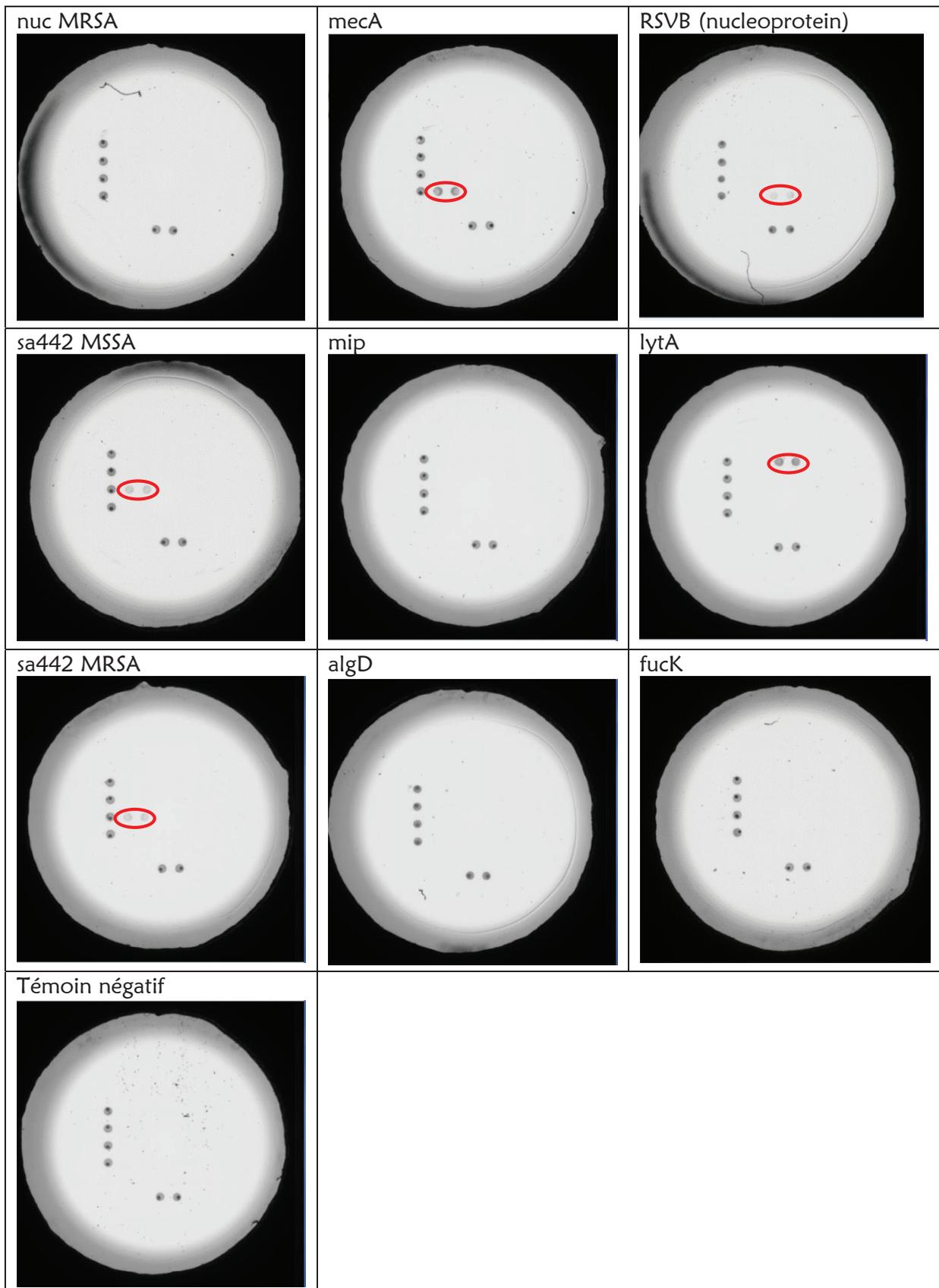


Tableau 25 - Récapitulatif des cibles détectées

Bactérie / Virus / Résistance	Gène	Nom utilisé sur la matrice de dépôt	Test 1*	Test 2**
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i>	<i>nuc</i>	NON	NON
	<i>sa442</i>	<i>sa442</i>	OUI	OUI
	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	OUI	OUI
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>lytA</i>	<i>lytA</i>	OUI	OUI
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>fucK</i>	<i>fucK</i>	NON	NON
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>algD</i>	<i>algD</i>	NON	NON
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>mip</i>	<i>mip</i>	NON	NON
Influenza A	matrix protein	InfA	OUI	OUI
Influenza B	neuraminidase	InfB	NON	∅
RSV A	nucleoprotein	RSVA	NON	NON
RSV B	nucleoprotein	RSVB	NON	OUI

* produits de PCR monoplexes, rampe de température de 88 à 55°C

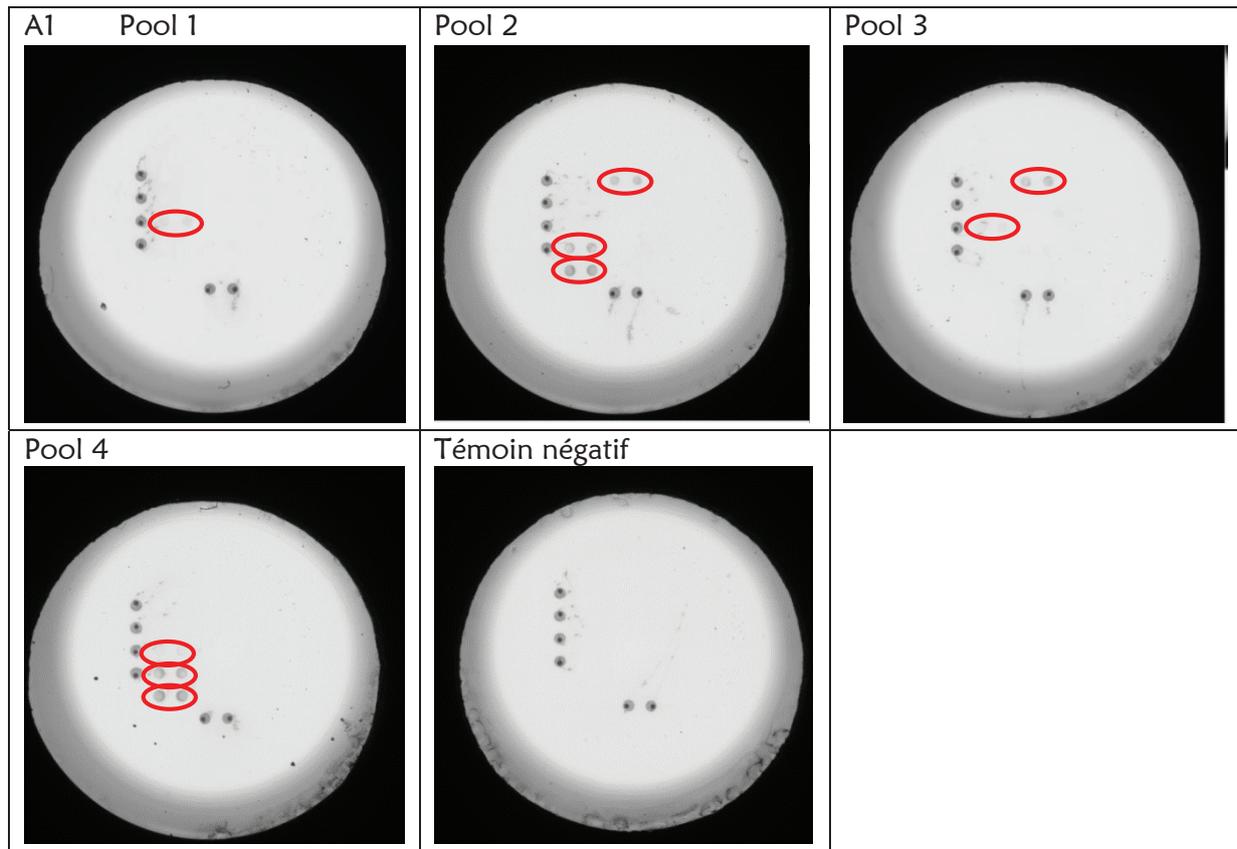
** produits de PCR monoplexes, rampe de température de 88 à 30°C

Pour les cibles encore non détectées (*nuc* MSSA et MRSA, *fucK*, *mip*, *algD*, RSVA) une expérience a été réalisée en abaissant la rampe de température jusqu'à 10°C, mais aucune amélioration n'a été mise en évidence et cette rampe de température n'a pas été réutilisée pour les tests ultérieurs. C'est donc la rampe de température de 88°C à 30°C qui a été retenue pour tous les essais ultérieurs.

Afin de valider le critère du multiplexage, des « pools » d'échantillons ont été créés en mélangeant directement plusieurs produits issus de PCR monoplexes pour lesquels un signal avait pu être observé lors d'une des deux précédentes expériences afin de les hybrider dans le même puits. Le tableau 26 rassemble les résultats observés.

Le pool 1 est constitué des cibles *sa442* MSSA et MRSA et RSVB, le pool 2 des cibles *mecA*, *lytA* et InfA, le pool 3 de *sa442* MRSA, RSVB et *lytA*. Pour finir le pool 4 est composé de *sa442* MSSA, *mecA* et InfA.

Tableau 26 - Résultats obtenus après hybridation de pools de produits de PCR monoplexes - Rampe de température 88 à 30°C



Sur le pool 1, *sa442* est détecté. En revanche, aucune détection de *RSVB*. Pour le pool 2, tout comme pour le pool 4, toutes les cibles sont détectées : *mecA*, *lytA* et *InflA* pour le pool 2, et *sa442* *MSSA*, *mecA* et *InflA* pour le pool 4. . Pour le pool 3, *RSVB* n'est toujours pas détecté.

Cet essai a permis de valider le critère du multiplexage, puisque pour deux des trois pools toutes les cibles sont détectées.

Tous les critères nécessaires ont pu être validés. Néanmoins, plusieurs optimisations restent à mettre en œuvre afin de pouvoir détecter toutes les cibles sélectionnées.

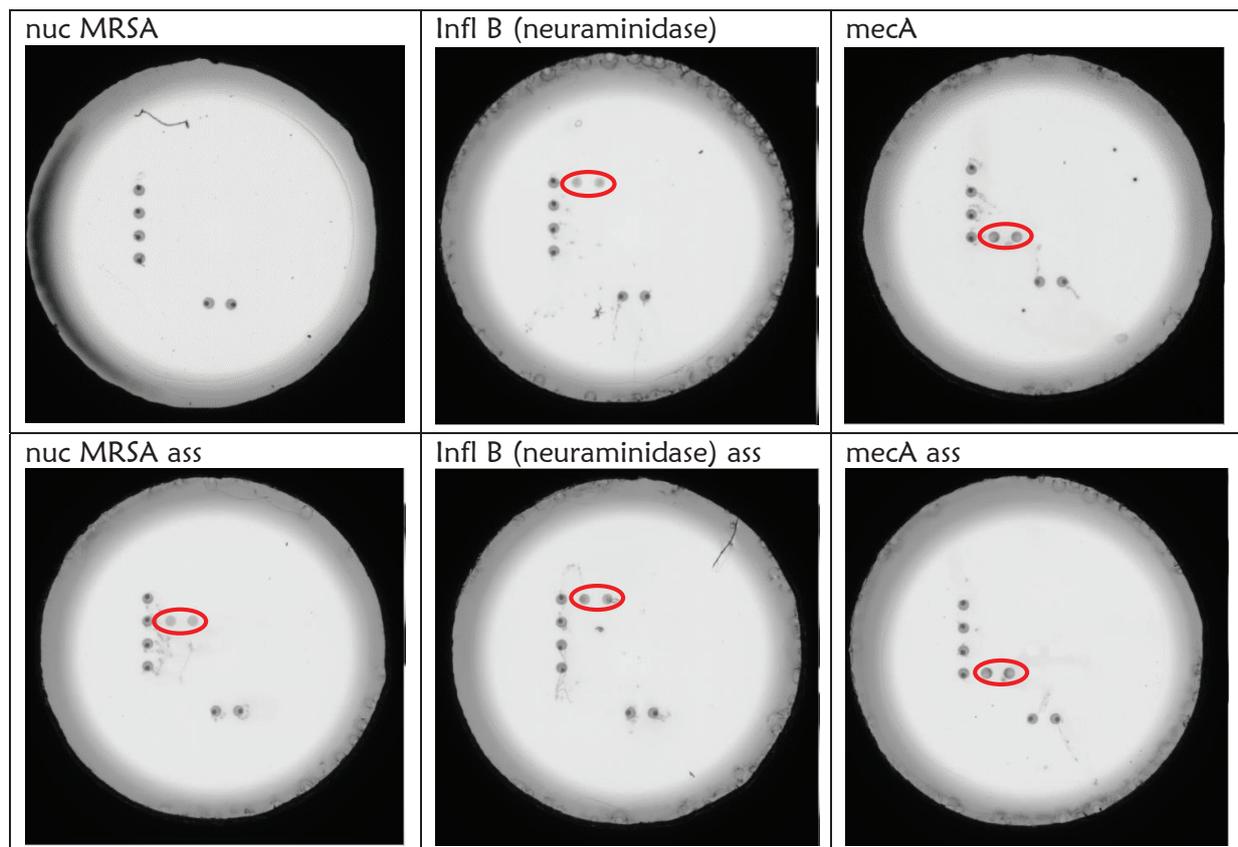
3.3.5 Optimisations du test

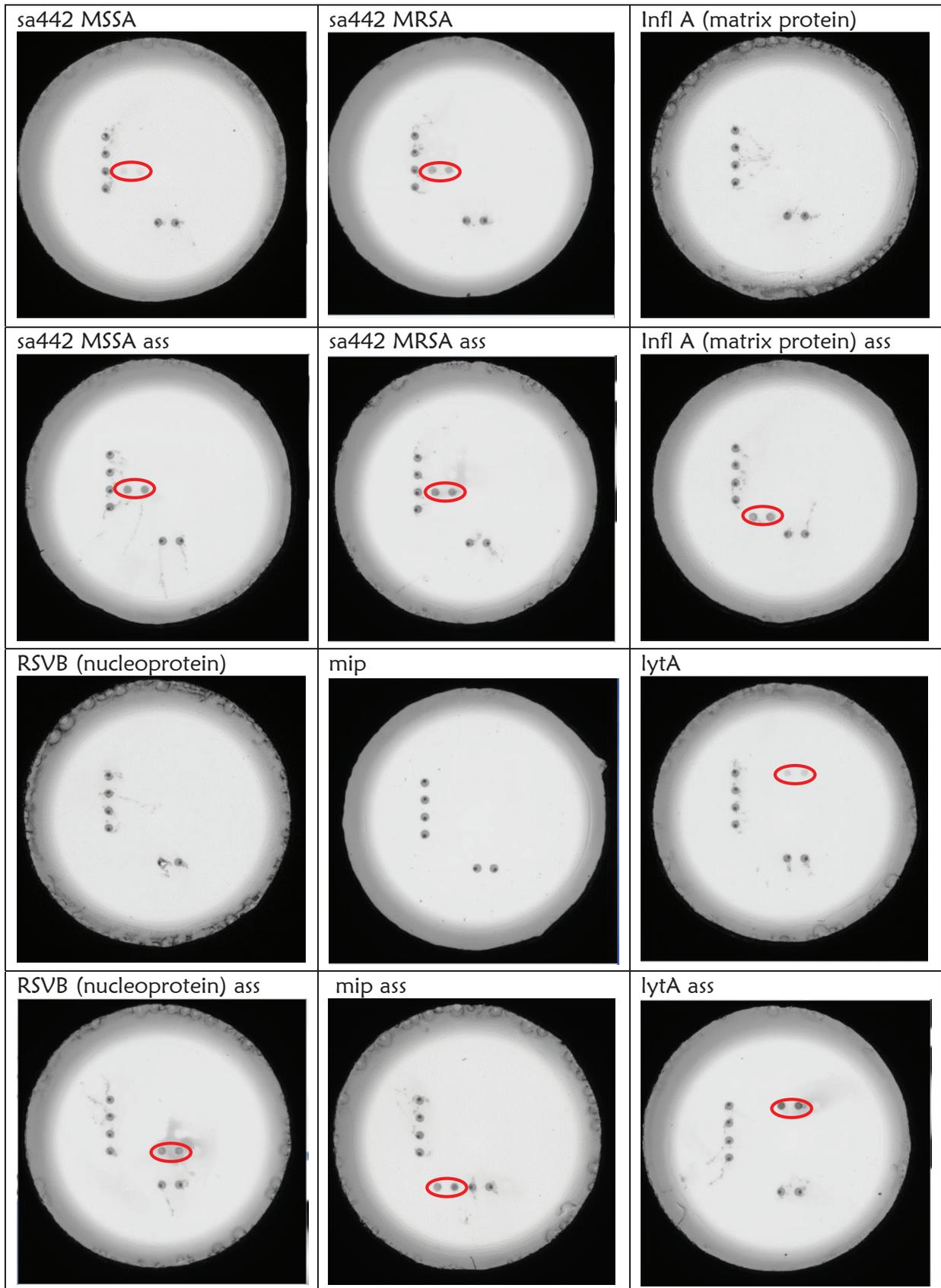
Un des points critiques du test est l'absence de détection de plusieurs cibles : *nuc*, *fuck*, *algD*, *mip*, neuraminidase (Influenza A) et nucleoprotein (*RSVA*). Une hypothèse avancée est la compétition lors de l'étape d'hybridation entre le brin complémentaire du brin biotinylé et la sonde immobilisée sur le support. En effet, le brin biotinylé

pourrait se ré-hybridiser préférentiellement avec son brin complémentaire plutôt qu'avec la sonde immobilisée sur le support adhésif. Afin de minimiser les effets de cette éventuelle compétition, des PCR asymétriques ont été réalisées à partir de PCR primaires par le LAPM à Grenoble afin de favoriser l'amplification du brin biotinylé et d'induire sa présence en excès dans le mélange réactionnel. Les résultats sont présentés dans le tableau 27.

Les images du test montrent qu'avec des hybridations de produits issus de PCR asymétriques, il est possible de détecter des cibles qui ne l'étaient pas auparavant (tableau 28) : *nuc*, *algD*, *mip*, *InflB* et *RSVA*. Leur utilisation permet également d'augmenter le signal spécifique de l'hybridation pour plusieurs cibles, notamment *sa442* et *lytA*. Seul le gène *fuck* n'est toujours pas détecté.

Tableau 27 - Résultats après hybridations de produits de PCR monoplexes symétriques et asymétriques - Rampe de température de 88 à 30°C





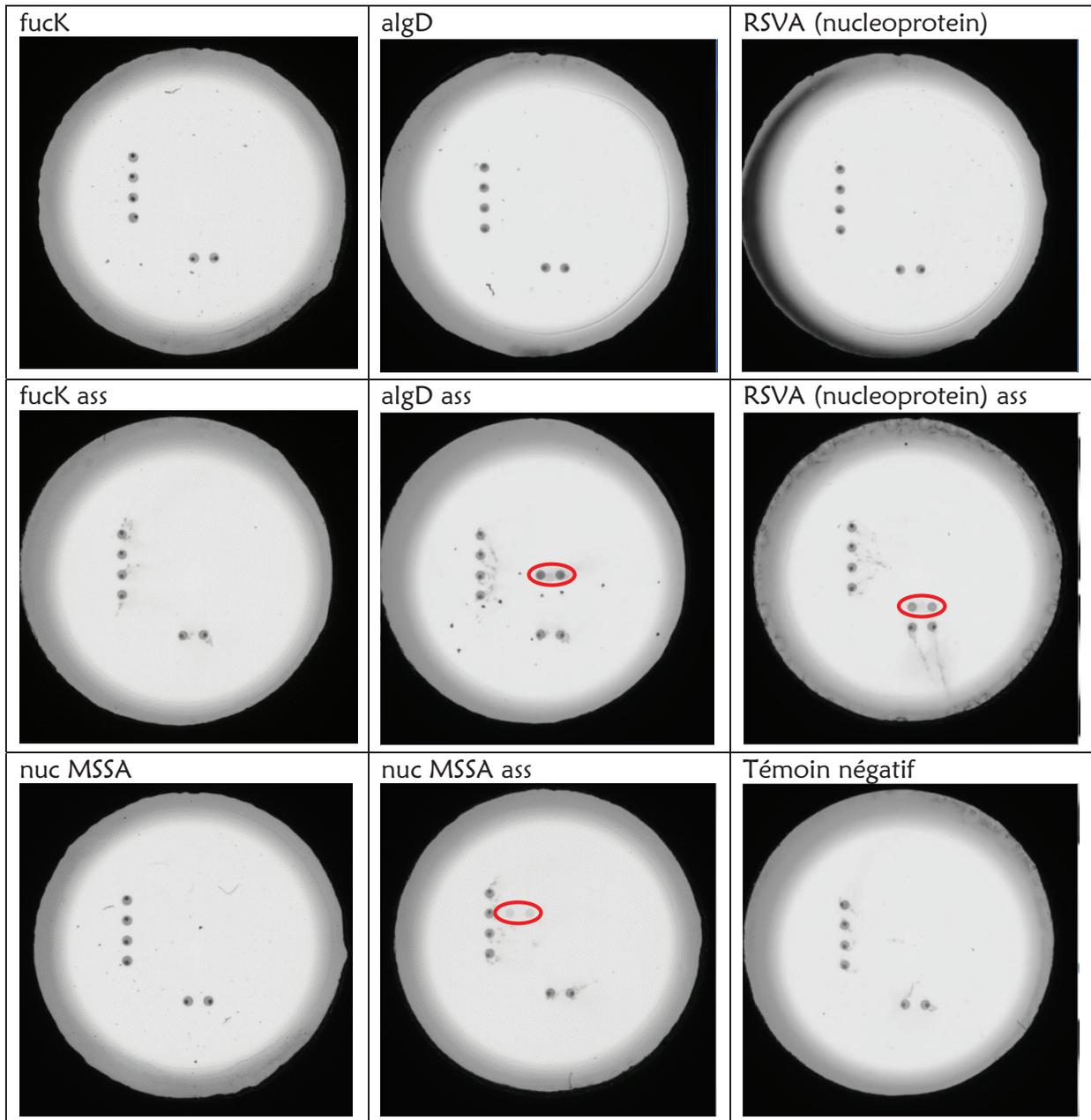


Tableau 28 - Récapitulatif des cibles détectées

Bactérie / Virus / Résistance	Gène	Nom utilisé sur la matrice de dépôt	Test 1*	Test 2**	Test 3***
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i>	<i>nuc</i>	NON	NON	OUI
	<i>sa442</i>	<i>sa442</i>	OUI	OUI	OUI
	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	OUI	OUI	OUI
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>lytA</i>	<i>lytA</i>	OUI	OUI	OUI
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>fucK</i>	<i>fucK</i>	NON	NON	NON
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>algD</i>	<i>algD</i>	NON	NON	OUI
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>mip</i>	<i>mip</i>	NON	NON	OUI
Influenza A	matrix protein	InflA	OUI	OUI	OUI
Influenza B	neuraminidase	InflB	NON	∅	OUI
RSV A	nucleoprotein	RSVA	NON	NON	OUI
RSV B	nucleoprotein	RSVB	NON	OUI	OUI

* produits de PCR monoplexes, rampe de température de 88 à 55°C

** produits de PCR monoplexes, rampe de température de 88 à 30°C

*** produits de PCR monoplexes assymétriques, rampe de température de 88 à 30°C

Afin de compléter le panel de cibles déjà présent sur le test, les cibles correspondant aux gènes de résistance aux β -lactamases (carbapénémases) énumérées dans le tableau 19 ont été ajoutées. Des PCR symétriques et assymétriques ont été réalisées et analysées, à partir de plusieurs échantillons extraits de patients. La matrice de dépôt des sondes est désormais celle représentée figure 29.

dT	VIM	VIM	mipv2	mipv2	nuc	nuc
dT	IMP	IMP	fucKv2	fucKv2	sa442	sa442
dT	KPC	KPC	mip	mip	algD	algD
dT	NDM	NDM	fucK	fucK	RSVA	RSVA
T- Bleu	OXA-48	OXA-48	InflB	InflB	RSVB	RSVB
T-Bleu	mecA	mecA	InflA	InflA	T-Bleu	T-Bleu
T- Bleu	lytA	lytA	dT	dT	dT	dT

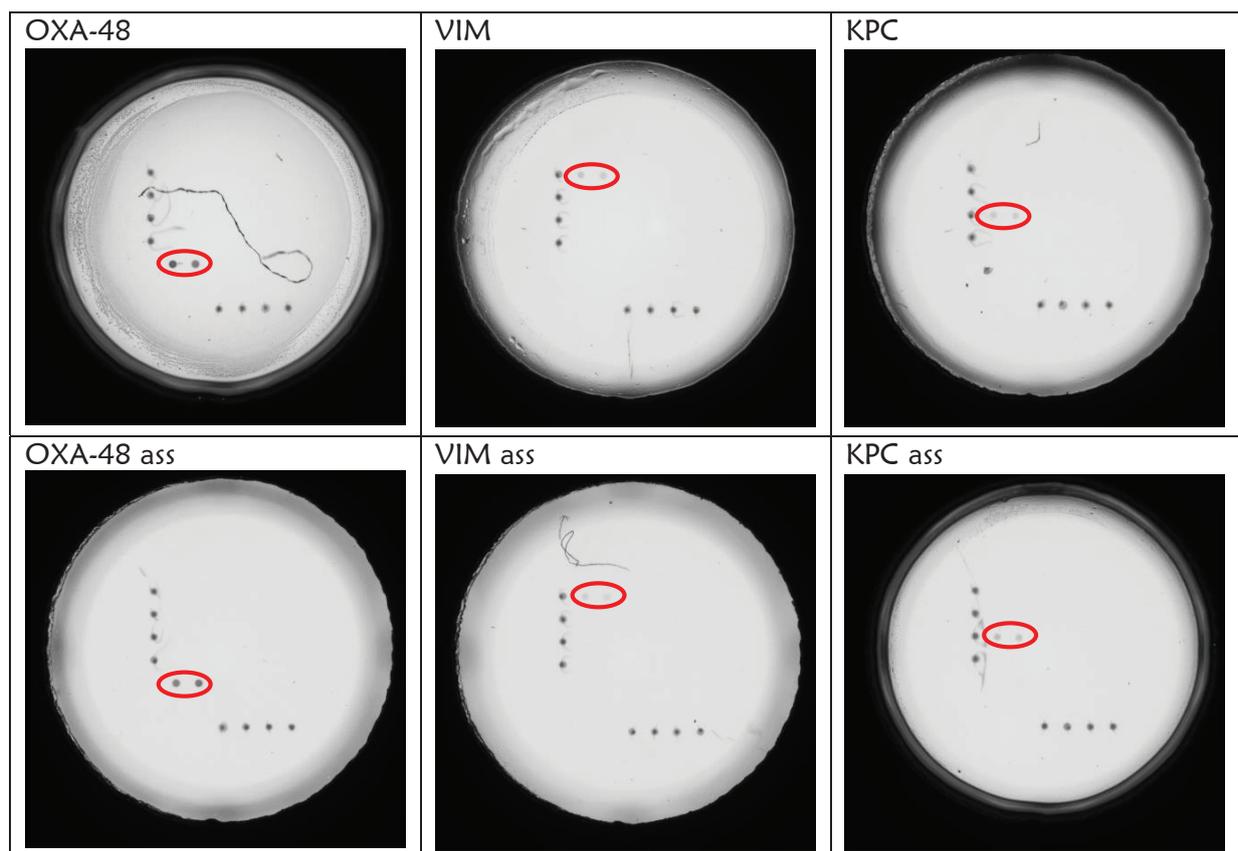
Figure 29 - Plan de la matrice des sondes déposées sur le support, après l'ajout des sondes de détection des carbapénémases, d'une 2^{ème} version des sondes ciblant les gènes *mip* et *fucK*. dT : contrôle positif d'hybridation (sonde dT couplée à la biotine) ; T-Bleu : contrôle négatif d'hybridation (pas de sonde dans la solution déposée)

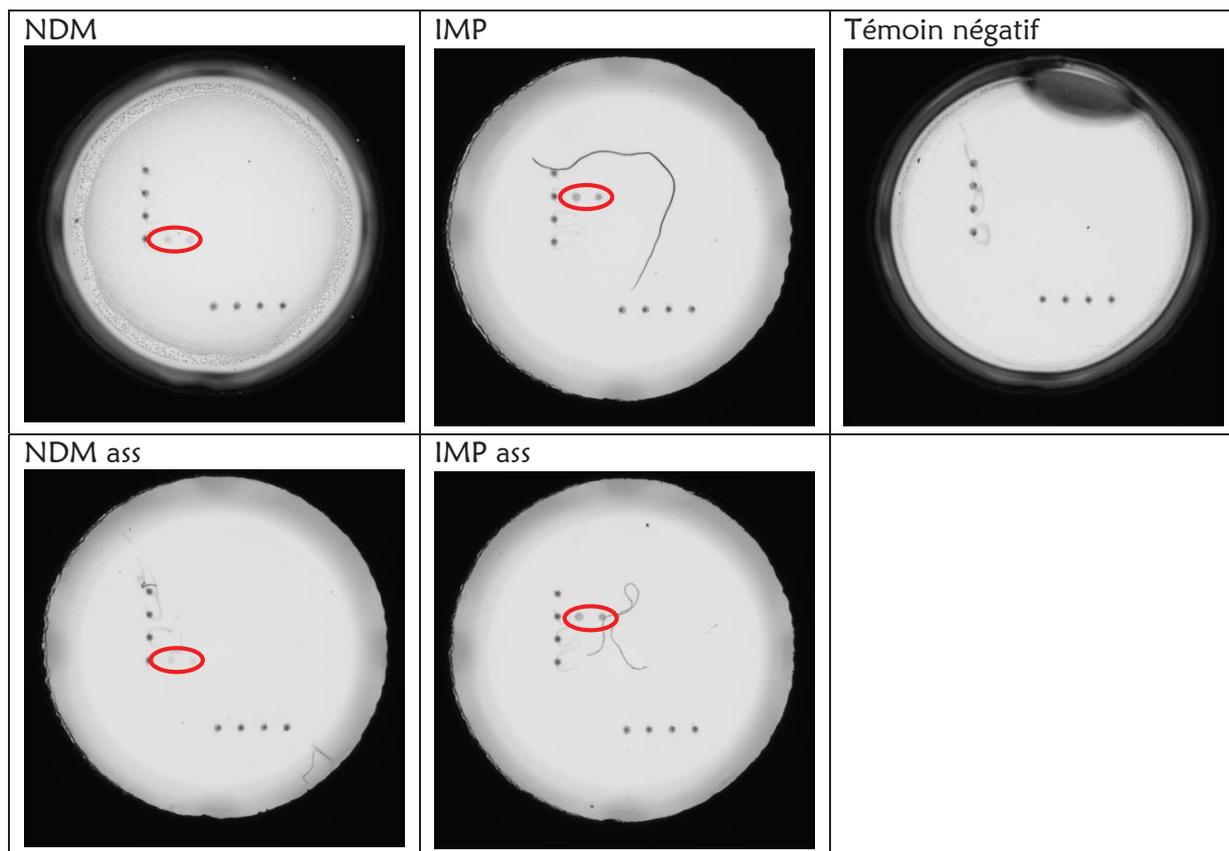
Les images des résultats obtenus pour les carbapénémases sont représentées dans le tableau 29.

Face à l'absence de détection du gène *fucK* malgré les essais de rampe de température et de PCR assymétriques, une deuxième sonde a été synthétisée (*fucKv2*), ciblant une autre partie de l'amplicon.

De la même manière, à la suite de l'expérience avec la rampe de température descendant jusqu'à 10°C lors de l'étape d'hybridation, l'absence de détection de *mip* m'a conduit à dessiner une nouvelle sonde. Bien que la détection ait fonctionné avec les produits issus de PCR assymétriques, la sonde a tout de même été ajoutée à la matrice de dépôt afin d'observer si un signal d'intensité supérieure pouvait être obtenu pour les tests ultérieurs.

Tableau 29 - Résultats obtenus après hybridations de produits de PCR symétriques et assymétriques ciblant les carbapénémases - Rampe de température de 88 à 30°C





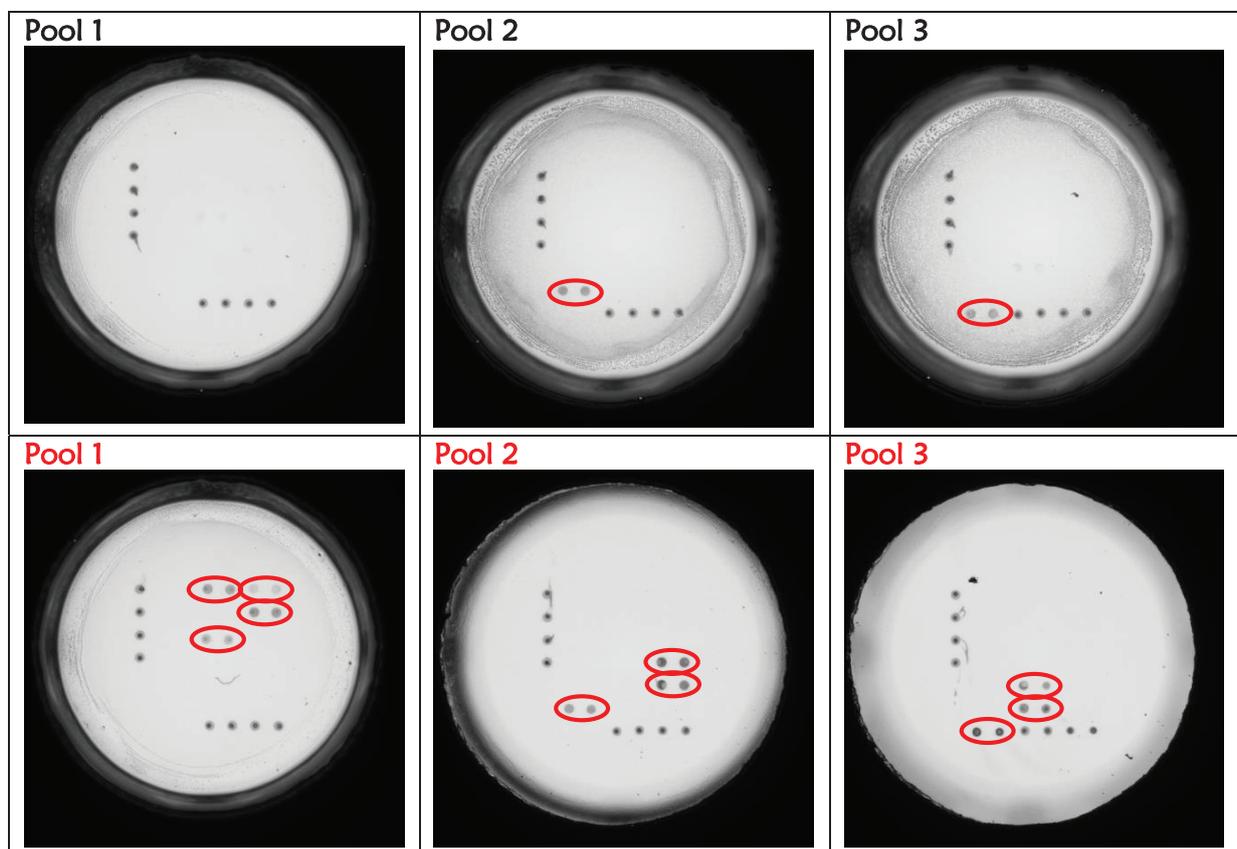
Toutes ces nouvelles cibles ont pu être détectées par PCR classique ainsi que par PCR assymétrique. Contrairement aux cibles qui ont pu être observées précédemment, le fait d'analyser des amplicons issus de PCR assymétriques n'augmente pas le signal obtenu. Par la suite, 13 pools de produits issus de PCR assymétriques (tableau 30) ont été réalisés et comparés aux mêmes pools de produits issus de PCR symétriques. Les résultats sont présentés dans le tableau 31.

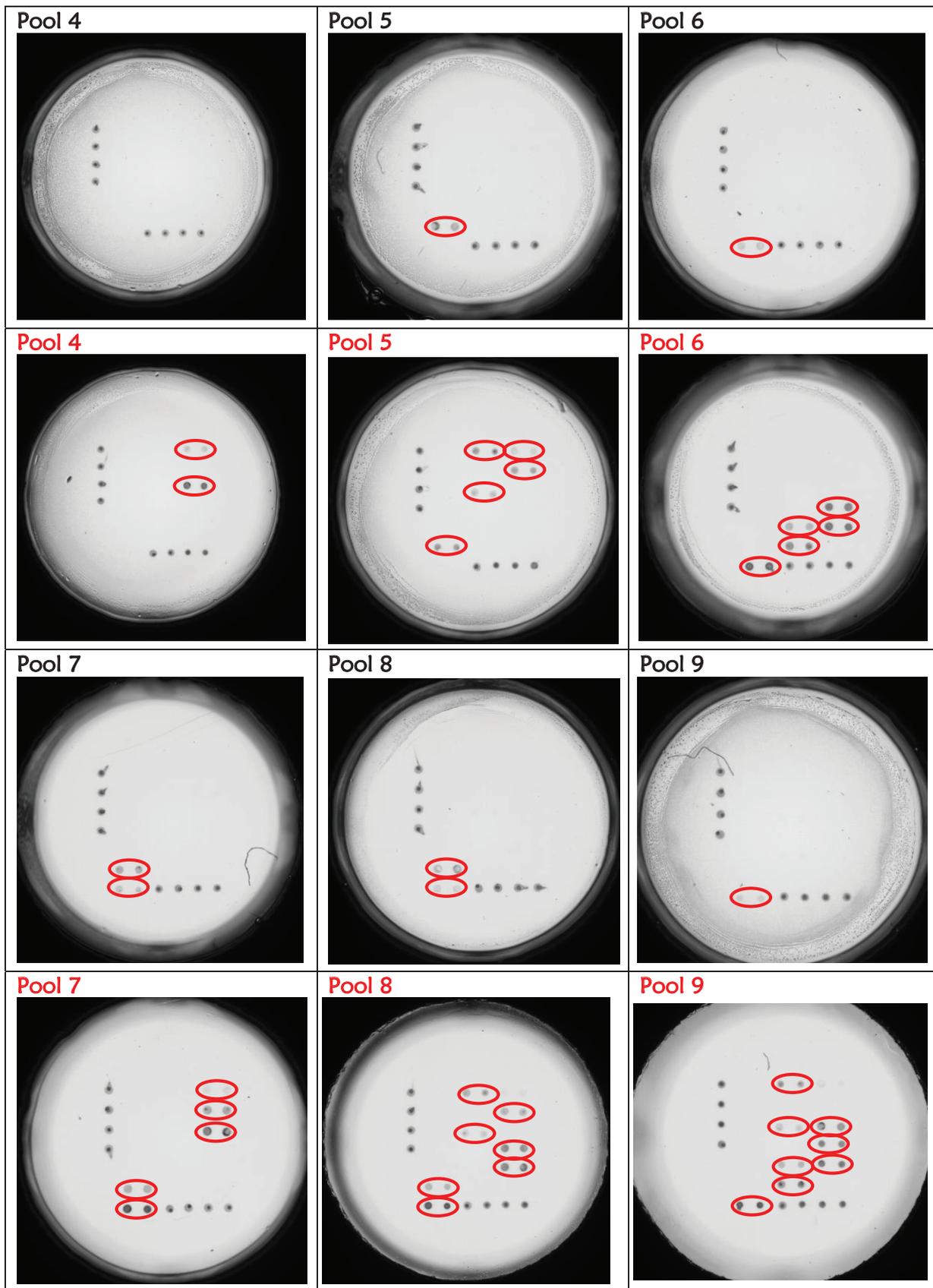
Tableau 30 - Composition des pools de produits de PCR assymétriques réalisés

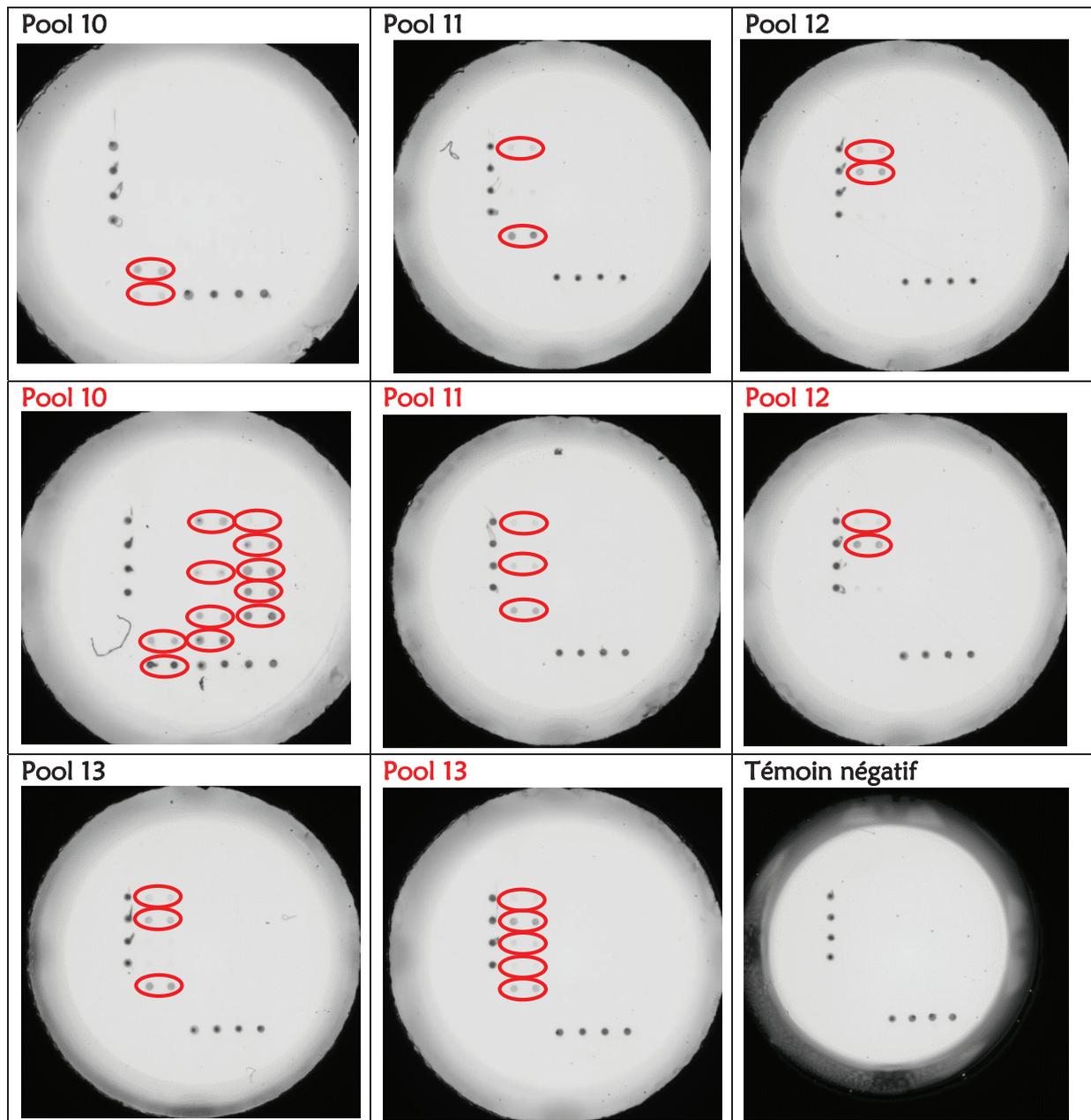
Numéro du pool	Cibles	Volume de chaque produit PCR
1	<i>nuc</i> + <i>sa442</i> + <i>mip</i> = 3 cibles	8 μ L
2	RSVB + RSVA + <i>mecA</i> = 3 cibles	8 μ L
3	Infl A + Infl B + <i>lytA</i> = 3 cibles	8 μ L
4	<i>algD</i> + <i>fucK</i> + <i>nuc</i> = 3 cibles	8 μ L

5	<i>nuc</i> + <i>sa442</i> + <i>fucK</i> + <i>mip</i> + <i>mecA</i> = 5 cibles	5 μ L
6	RSVB + RSVA + Infl A + Infl B + <i>lytA</i> = 5 cibles	5 μ L
7	<i>algD</i> + <i>lytA</i> + <i>nuc</i> + <i>sa442</i> + <i>mecA</i> = 5 cibles	5 μ L
8	<i>nuc</i> + <i>fucK</i> + <i>sa442</i> + <i>mip</i> + <i>mecA</i> + RSVB + RSVA + <i>lytA</i> = 8 cibles	3 μ L
9	<i>algD</i> + <i>lytA</i> + Infl B + Infl A + RSVB + RSVA + <i>mip</i> + <i>nuc</i> = 8 cibles	3 μ L
10	<i>nuc</i> + <i>fucK</i> + <i>sa442</i> + <i>mip</i> + RSVB + RSVA + <i>mecA</i> + Infl A + Infl B + <i>lytA</i> + <i>algD</i> = 11 cibles	2,2 μ L
11	KPC + OXA48 + VIM = 3 cibles	8 μ L
12	VIM + NDM + IMP = 3 cibles	8 μ L
13	KCP + OXA48 + VIM + NDM + IMP = 5 cibles	5 μ L

Tableau 31 - Résultats obtenus après hybridation de pools de produits de PCR asymétriques (en rouge) / PCR symétriques (en noir) - Rampe de température de 88 à 30°C



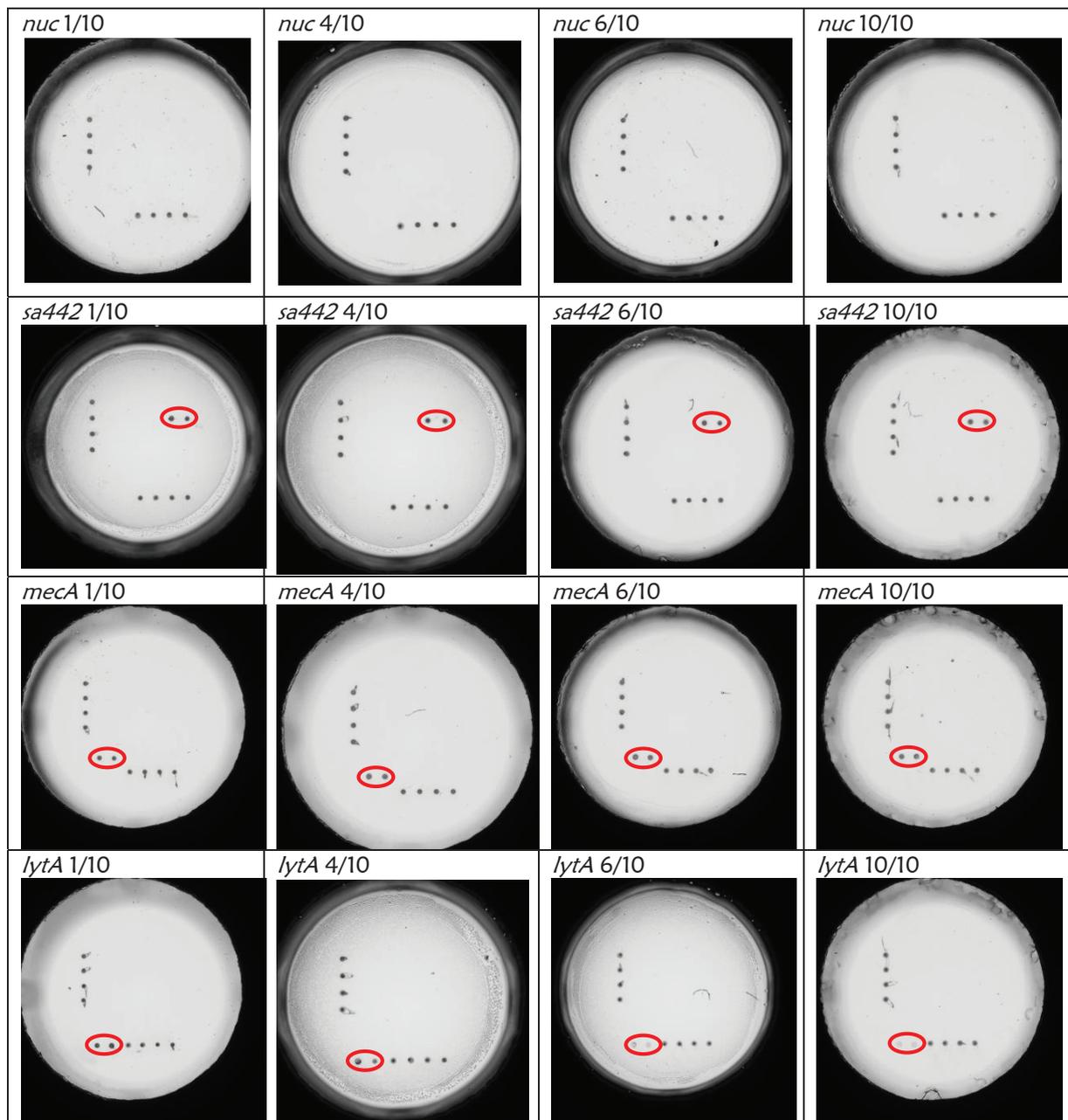


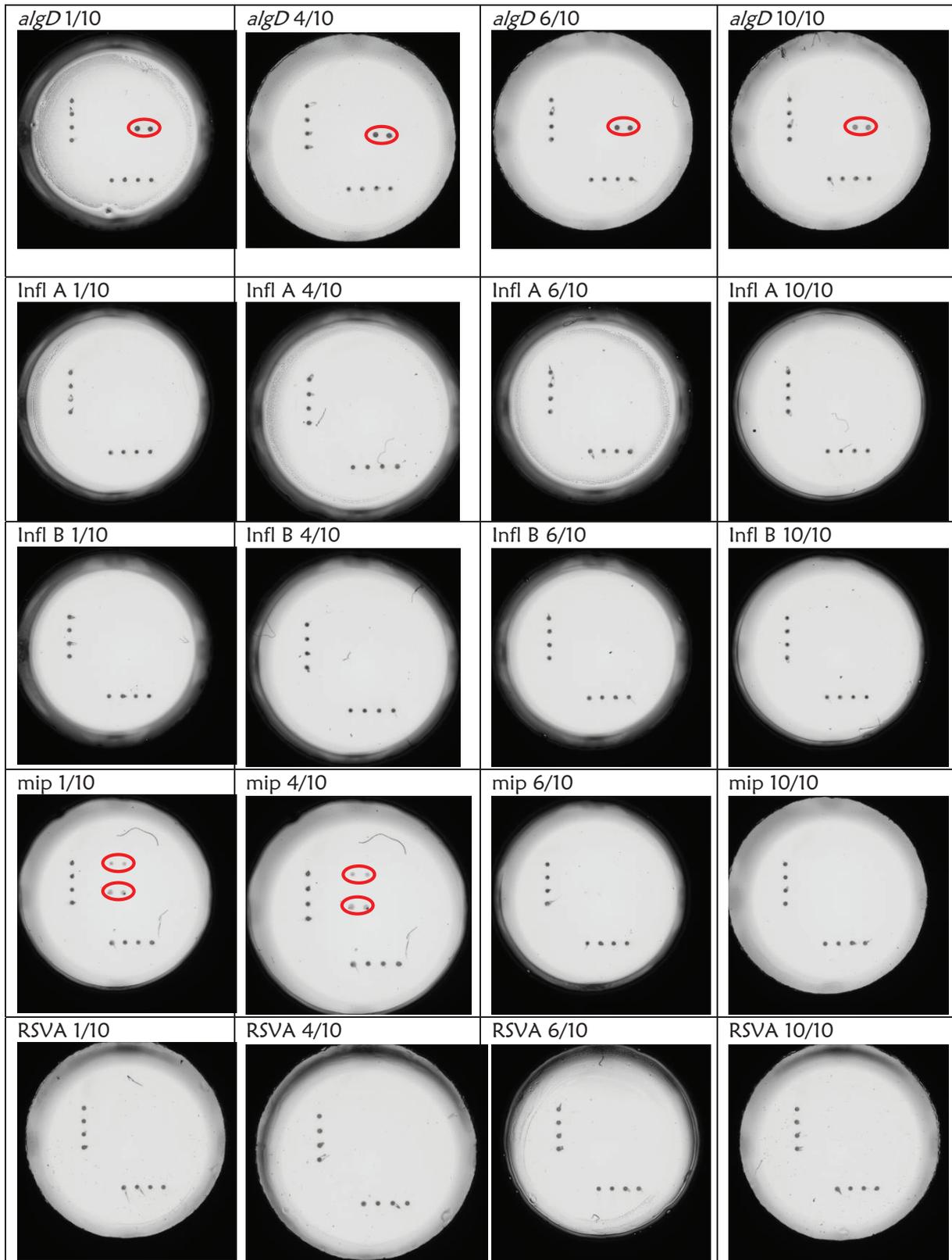


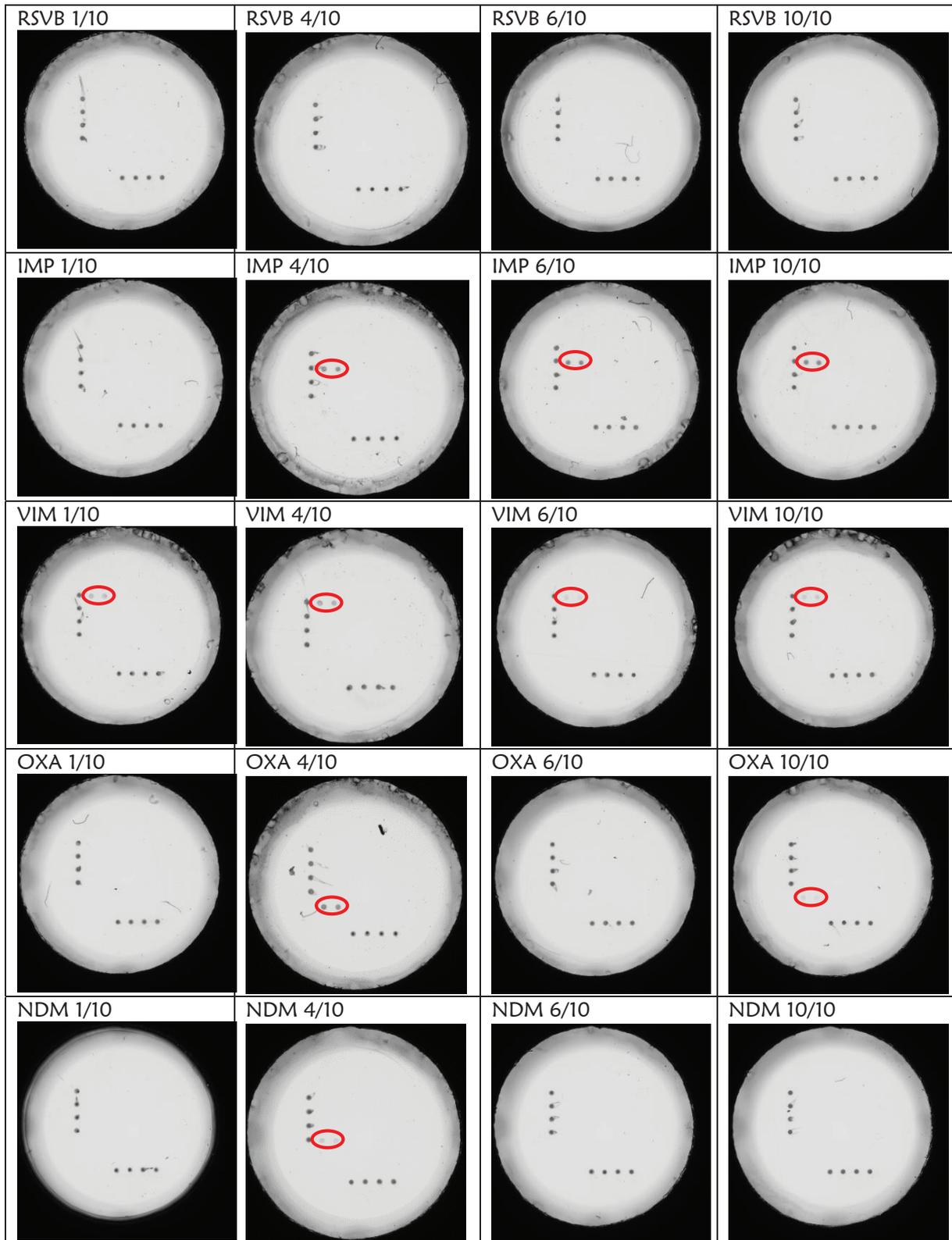
Seuls les pools de produits issus de PCR asymétriques permettent la détection de toutes les cibles, excepté *fucK*. L'intérêt d'analyser des produits issus de PCR asymétriques est encore une fois démontré pour la majorité des cibles, bien que la détection des carbapénémases soit la même avec des produits de PCR asymétriques ou non (les signaux pour NDM et KPC sont les plus faibles). On observe toutefois pour *nuc* un signal plus faible que pour les autres cibles. En ce qui concerne la cible *mip*, pour laquelle deux sondes sont présentes sur la matrice de dépôt, un signal est détecté pour chaque version de la sonde. L'intensité est cependant un peu plus forte pour la version n°1 de la sonde. Les deux versions sont néanmoins conservées pour la prochaine expérience qui consiste

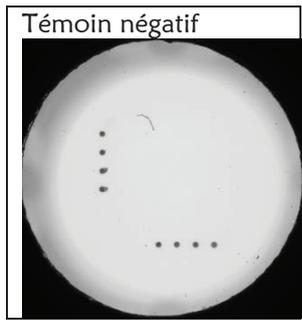
en l'analyse de produits issus de PCR asymétriques directes avec différents rapports (1/10, 4/10 et 6/10) entre l'amorce biotinylée et l'amorce non biotinylée afin de tenter d'améliorer encore la détection. Le rapport 10/10 correspond à une PCR symétrique. Le tableau 32 illustre les résultats obtenus.

Tableau 32 - Résultats obtenus après hybridation de produits de PCR monoplexes asymétriques avec différents rapports d'amorces (1/10, 4/10 et 6/10) et symétriques (10/10)









Contrairement au test précédent, ici aucune cible virale n'est détectée (Infl A, Infl B, RSVA, RSVB), ni sur des produits issus de PCR symétriques, ni issus de PCR asymétriques et ce quel que soit le rapport entre les amorces. Il s'est avéré qu'un problème dans les réactifs est survenu lors de l'étape de rétro-transcription suivie de la PCR (RT-PCR) réalisée au LAPM, ce qui explique l'absence de détection de ces cibles en raison d'un défaut de fonctionnement de la RT-PCR.

Un autre résultat surprenant concerne la cible OXA48 pour laquelle un signal est détecté avec les rapports 4/10 et 10/10, mais pas avec le rapport 6/10. Un mauvais dépôt de l'échantillon d'ADN lors de la préparation de la PCR est avancé.

Concernant *fucK*, c'est le brin non biotinylé qui était en fait ciblé par la sonde, d'où l'absence de signal. Une nouvelle sonde a été dessinée afin d'être incorporée à la matrice pour les tests ultérieurs.

Pour *lytA*, l'intensité du signal détecté s'affaiblit lorsque le rapport entre les amorces augmente, ce qui traduit une nouvelle fois une sensibilité supérieure du test avec l'utilisation de produits issus de PCR asymétriques. Au regard des résultats obtenus selon les différents rapports, le 4/10 semble un bon compromis pour la détection de toutes les cibles.

De nouveaux tests doivent être menés, notamment pour analyser des produits de PCR multiplexes et confirmer les résultats obtenus avec les pools de produits de PCR en vue de passer à des analyses d'échantillons provenant exclusivement de patients.

Toutes ces expériences ont contribué à démontrer la faisabilité d'un test de détection des pathogènes respiratoires et de certaines résistances aux antibiotiques. La technologie *HIFI* brevetée par AXO Science témoigne ici de son adaptabilité et de sa flexibilité en permettant, grâce à une même plateforme, l'analyse d'échantillons biologiques appliquée à différents domaines diagnostics.

4 Matériel et méthodes

4.1 Matériel

4.1.1 Instruments

Agitateur de plaque Teleshake 95 _____ Inheco
Appareil de dépôt non-contact sciFLEXARRAYER S3 _____ Scienion
Automate de pipetage EVO 100 _____ Tecan
Bloc chauffant et réfrigérant CPAC Ultraflat HT 2-TEC _____ Inheco
Laveur de microplaques HydroSpeed _____ Tecan
Lecteur de plaques CLAIR (Colorimetric Array Imaging Reader) _____ Sensovation
Thermocycleur Prime Elite _____ Techne
Thermocycleur TProfessional _____ Biometra

4.1.2 Logiciels

AXOware™ _____ AXO Science
EVOWARE _____ Tecan

4.1.3 Réactifs

4.1.3.1 Support

Adhésif TKL _____ AXO Science

4.1.3.2 Solvants et réactifs chimiques

BCIP/NBT solution prête à l'emploi _____ Sigma-Aldrich
Eau Molecular Biology Grade _____ 5Prime
Ethanol 96-100% _____ Sigma-Aldrich
LowCross Buffer _____ Candor Bioscience

4.1.3.3 Kits

Kit d'extraction d'ADN NucleoSpin® 96 Blood kit _____Macherey-Nagel

Kit d'extraction d'ADN QIAmp mini kit _____Qiagen

Kit PCR GoTaq® G2 Colorless Master Mix kit _____Promega

Kit de PCR Premix Ex Taq hot start version _____Takara

Kit de rétro-transcription et PCR des ARNs QIAGEN one-step RT-PCR kit _____Qiagen

4.1.3.4 Tampons et solutions

PBS Tablets pH 7,4 _____AppliChem

Tampon de spotting 2X _____AXO Science

4.1.3.5 Oligonucléotides et enzymes

Tous les oligonucléotides sont de grade R&D, purifiés par RP-HPLC.

Amorces pour le génotypage érythrocytaire _____Eurogentec

Amorces pour les PCR _____Eurogentec

Séquence d'oligonucléotides (5' → 3') biotine-(dT)₁₆-C₆-NH₂ _____Eurogentec

Sondes pour la détection de pathogènes _____Eurogentec

Sondes pour le génotypage érythrocytaire _____Eurogentec

Streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (S2890) _____Sigma-Aldrich

4.2 Méthodes

Les méthodes et protocoles utilisés pour le génotypage d'échantillons de sang sur la plateforme *HIFI Blood 96™* font partie d'un article paru en 2015 dans le livre *Molecular Typing of Blood Cell Antigens* (Boccoz *et al*, 2015b).

4.2.1 Préparation des échantillons

4.2.1.1 HIFI Blood 96™

Les échantillons de sang traités à l'EDTA (avec et sans plasma), provenant de différentes banques de sang Européennes sont conservés à -20°C et décongelés juste avant leur utilisation.

4.2.1.2 ReSynPlex

Concernant les bactéries, les souches de références *Staphylococcus aureus* MSSA 476 et *Staphylococcus aureus* MRSA 252 sont achetées chez Biomérieux, la souche de *Staphylococcus aureus* MRSA CIP 65.25 obtenue auprès du Centre de Ressources Biologiques de L'institut Pasteur, la souche de *Legionella Pneumophila* provient du Centre National de Référence (CNR) des Legionella de Lyon et enfin les souches de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ont été commandées auprès de l'American Type Culture Collection. Des stocks sont réalisés et conservés à -80°C, puis les bactéries sont remises en culture afin de réaliser les extractions d'ADN.

Concernant les cibles virales et les gènes de résistance aux β -lactamases, les acides nucléiques proviennent de prélèvements de Lavages Broncho Alvéolaires (LBA) de patients. Les prélèvements identifiés positifs en culture au laboratoire du Centre Hospitalo-Universitaire de Grenoble pour les germes ou résistances ciblés ont été sélectionnés par le LAPM pour être testés sur la plateforme ReSynPlex.

4.2.2 Extraction et amplification des acides nucléiques

4.2.2.1 HIFI Blood 96™

4.2.2.1.1 Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée à l'aide du NucleoSpin® Blood kit de Macherey-Nagel (France), conformément au manuel d'utilisation. Le protocole est automatisé sur un

automate de pipetage EVO100 (Tecan) et permet l'extraction simultanée de l'ADN de 96 échantillons en approximativement 1h30. Tous les réactifs sont inclus dans le kit sauf l'éthanol 96-100%.

400 mL d'éthanol 96-100% sont ajoutés au tampon de lavage B5.

La protéinase K lyophilisée est mise en solution en lui ajoutant 3,35 mL de tampon protéinase PB. Cette solution reconstituée est stable à -20°C pendant 6 mois. Ces deux étapes sont réalisées manuellement juste avant de lancer le protocole sur le robot. L'automate exécute ensuite le protocole comme suit : 200 μ L de sang et 25 μ L de protéinase K sont ajoutés dans les puits du bloc de lyse. 200 μ L de solution BQ1 sont ajoutés dans chaque puits et le mélange est ensuite homogénéisé puis incubé à 22°C sous agitation pendant 10 minutes, afin de permettre la lyse des cellules.

200 μ L d'éthanol 96-100% sont ajoutés dans chaque puits du bloc de lyse, mélangés 5 fois par pipetages, et transférés dans la NucleoSpin® Binding plate. 150 μ L de tampon B5 sont ajoutés dans chaque puits et le vide est appliqué afin de permettre la filtration des échantillons à travers la NucleoSpin® Binding plate (pression de -0,2 bar pendant 5 minutes) et la fixation de l'ADN aux membranes de silice.

600 μ L de tampon BW sont ajoutés dans chaque puits. Le vide est appliqué de la même manière qu'à l'étape précédente à une pression de -0,2 bar pendant 3 minutes.

900 μ L de tampon B5 sont ensuite ajoutés dans chaque puits avant d'appliquer le vide (-0,2 bar pendant 1 minute). Les tampons BW et B5 sont des tampons de lavage permettant de se débarrasser des débris cellulaires.

Appliquer le vide maximal (au moins -0,6 bar de pression) pendant 10 minutes afin de sécher complètement la membrane et d'éliminer toute trace d'éthanol.

80 μ L de tampon d'éluat BE préalablement chauffé à 70°C sont ajoutés dans chaque puits. Le système est incubé à température ambiante pendant 5 minutes puis le vide est appliqué afin de recueillir les éluats dans les puits de la microplaque 96 puits (-0,6 bar pendant 1 minute).

La plaque d'éluats (environ 65 μ L par puits) est scellée avec un film adhésif, et conservée à 4°C pour une utilisation directe en PCR multiplexe ou à -20°C pour une conservation plus longue.

4.2.2.1.2 PCR multiplexe

Les amorces (Eurogentec) sont mises en solution avec de l'eau Molecular Biology Grade de manière à obtenir une concentration de $800\mu\text{M}$ pour les amorces du panel 1 et $600\mu\text{M}$ pour les amorces du panel 2. Elles sont stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation. Pour le mix d'amorces du panel 1, $6,25\mu\text{L}$ de chaque amorce sont mélangés et pour le mix d'amorces du panel 2, $6\mu\text{L}$ de chaque amorce sont mélangés dans des eppendorf $1,5\text{mL}$. Les tubes sont agités au vortex.

Les mix de PCR sont préparés manuellement à l'aide du GoTaq® G2 Colorless Master Mix kit (Promega) en respectant les volumes suivants :

Réactifs	Panel 1	Panel 2
2X Go Taq® Colorless master mix	$1400\mu\text{L}$	$1400\mu\text{L}$
Mix d'amorces panel 1	90	
Mix d'amorces panel 2		$60\mu\text{L}$
Eau nucléase-free	$1310\mu\text{L}$	$1340\mu\text{L}$
Total	$2800\mu\text{L}$	$2800\mu\text{L}$

Le mélange est homogénéisé et distribué dans 4 tubes eppendorf 2mL à raison de $700\mu\text{L}$ par tube.

Ces 4 tubes, la plaque contenant les ADN extraits ainsi qu'une plaque PCR 96 puits sont disposés dans le robot afin que ce dernier procède à la préparation du mélange réactionnel pour la PCR. $25\mu\text{L}$ du mix PCR est disposé dans chaque puits de la plaque PCR, puis $2\mu\text{L}$ d'ADN sont introduits au fond des puits. La plaque est scellée avec un film adhésif (Alumaseal) puis transférée manuellement dans le thermocycleur pour procéder à la PCR selon le cycle suivant :

Durée	Température	Nombre de cycles
15 minutes	95°C	1
30 secondes	94°C	35
30 secondes	$57,5^{\circ}\text{C}$	
30 secondes	72°C	
10 minutes	72°C	1
∞	4°C	

La plaque est conservée à 4°C jusqu'à son utilisation pour le test d'hybridation.

4.2.2.2 ReSynPlex

Pour les bactéries, l'extraction d'ADN est réalisée avec le QIAmp mini kit de Qiagen, conformément au manuel d'instructions. La PCR est ensuite réalisée à l'aide du kit Premix Ex Taq hot start version (Takara) comme suit : 25 μ L de mix PCR + 5 μ L d'amorces à une concentration de 10 μ M + 5 μ L d'ADN à une concentration de 40ng/mL. Le tout est complété avec de l'eau stérilisée jusqu'à l'obtention d'un volume réactionnel de 50 μ L. Le cycle PCR utilisé est le suivant :

Durée	Température	Nombre de cycles
2 minutes	94°C	1
30 secondes	94°C	35
30 secondes	60°C	
1 minute	72°C	
5 minutes	72°C	1

Les extractions d'ARN sont réalisées par les techniciens de virologie du CHU de Grenoble sur les automates MAGnaPure (Roche) ou EasyOne (Qiagen). Les extraits sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation. La RT-PCR est réalisée à l'aide du one-step RT-PCR kit de Qiagen comme suit : 10 μ L de tampon + 2 μ L de dNTPs à une concentration de 10mM + 2 μ L d'enzymes (contenant la transcriptase inverse pour la rétro-transcription et la polymérase pour la PCR) + 7,5 μ L d'amorces à une concentration de 4 μ M + 5 μ L d'échantillon. Le tout est complété avec de l'eau RNase-free jusqu'à l'obtention d'un volume réactionnel de 50 μ L. Le cycle utilisé pour la RT-PCR est le suivant :

Durée	Température	Nombre de cycles
30 secondes	50°C	1
10 minutes	95°C	1
1 minute	94°C	45
1 minute	60°C	
1 minute	72°C	
10 minutes	72°C	1

Une fois les PCR réalisées, les mélanges réactionnels sont envoyés à AXO Science pour procéder à l'analyse automatisée sur la plateforme.

4.2.3 Test d'hybridation haut débit automatisé

4.2.3.1 Matricage sur le support

4.2.3.1.1 HIFI Blood 96™

Les sondes (Eurogentec) utilisées sont suspendues dans de l'eau Molecular Biology Grade de manière à obtenir une concentration finale de 150µM. 20µL de chaque sonde sont déposés dans les puits d'une plaque 384 puits et mélangés à 20µL de tampon de dépôt 2X (AXO Science) selon les plans de plaque définis pour le panel 1 (figure 30) et pour le panel 2 (figure 31) :

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
24	Ctrl-									dT	FynoFy	FyFy	K4	K3	K2	K1
23											JK2	JK1	MNS4	MNS3	MNS2	MNS1
22										Ctrl-	FynoX	FyX			Fy2	Fy1
21																
20																

Figure 30 - Plan de plaque pour la disposition des sondes du panel 1

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
24	Ctrl-										HY+	dT	DO-2	DO-1	LU-2	LU-1
23											HY-		Di-2	DI-1	Cart-2	Cart-1
22											Ctrl-	Ctrl-	Jo(a-)	Jo(a+)	Co-2	Co-1
21																
20																

Figure 31 - Plan de plaque pour la disposition des sondes du panel 2

Pour les contrôles négatifs (Ctrl-), 20µL de tampon de spotting et 20µL d'eau Molecular Biology Grade sont déposés dans les puits correspondants. La plaque est scellée avec un film adhésif puis stockée à -20°C jusqu'à son utilisation. Un automate de dépôt non contact (sciFLEXARRAYER S3, Scienion) assure le matricage sur le support TKL selon le plan prédéfini.

Deux plots par SNP sont déposés, avec un volume de 350 pL par plot, espacés de 300µm. La plaque matricée est ensuite stockée à 4°C jusqu'à son utilisation. Les matrices obtenues après dépôt sont représentées figures 32.

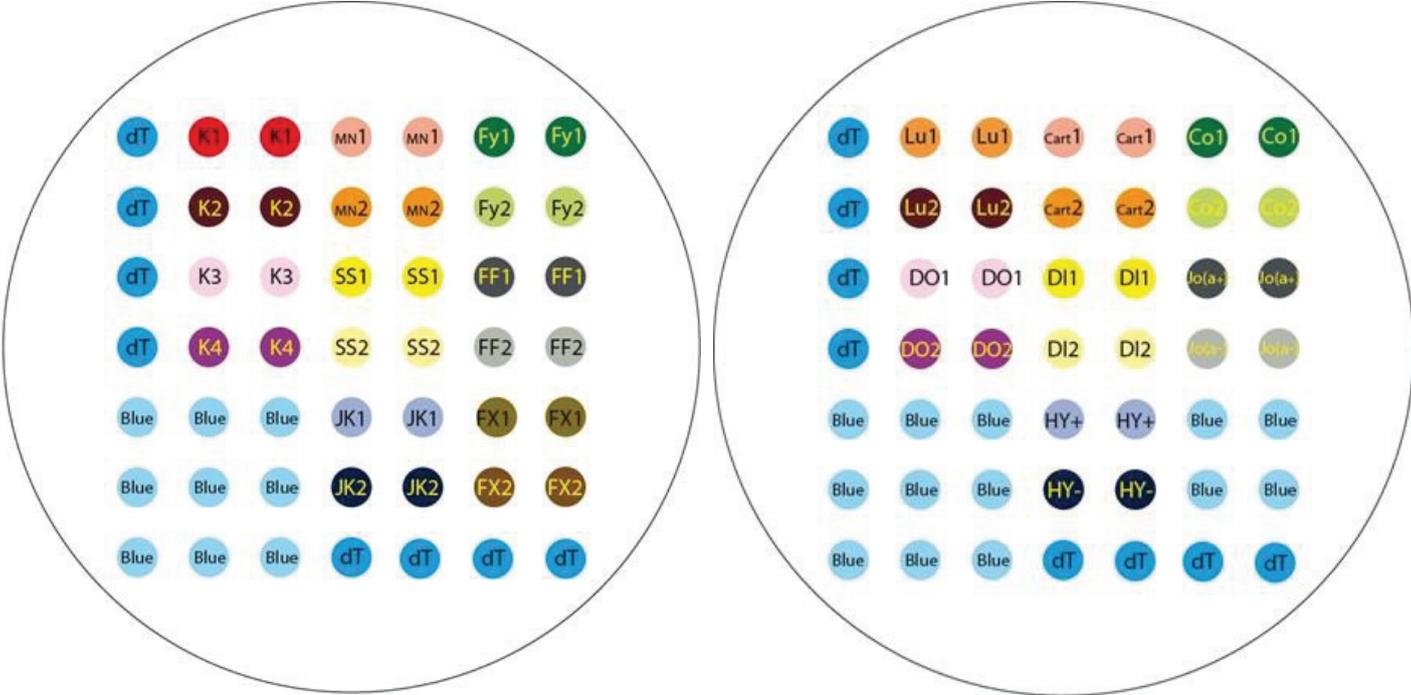


Figure 32 - Matrices déposées en fond de puits. A : Panel 1 ; B : Panel 2

4.2.3.1.2 ReSynPlex

Le protocole est le même que celui décrit précédemment pour *HIFI Blood 96™*, excepté pour la reprise des sondes (Eurogentec) qui sont suspendues de manière à obtenir une concentration finale de 100µM. Le plan de la plaque sondes est le suivant (figure 33):

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
24	Ctrl-											RSVA	InflA	mip	OXA48	VIM
23												RSVB	Nuc	fucK	mecA	IMP
22													Sa442	InfB	lytA	KPC
21											Ctrl-	dT	algD			NDM
20																

Figure 33 - Plan de plaque pour la disposition des sondes ReSynPlex

4.2.3.2 Hybridation sur la puce

4.2.3.2.1 HIFI Blood 96™

Le protocole d'hybridation (ou script) est le même pour les deux panels. L'automate exécute donc deux fois le même script mais en décalé dans le temps (le script pour le panel 2 débute à la 10^{ème} minute du script pour le panel 1) afin de permettre l'analyse des deux panels en un seul test, ou « run ». Le protocole décrit ici les étapes successives nécessaires à l'analyse d'un panel.

Les plaques PCR ainsi que les plaques matricées sont placées dans l'automate de pipetage. La plaque matricée est transférée dans le lecteur de plaque afin d'acquérir une image du fond de chaque puits avant l'hybridation avec les cibles. Une fois l'acquisition terminée, 200µL de LowCross buffer sont ajoutés dans chaque puits de la plaque puis elle est incubée à 37°C pendant 10 minutes. Elle est ensuite transférée dans le laveur, et trois lavages avec 300µL de PBS par puits sont réalisés.

50µL de LowCross Buffer sont ajoutés dans chaque puits de la plaque PCR et le tout est ensuite transféré dans les puits de la plaque matricée. La plaque est incubée pendant 60 secondes à 88°C, puis la rampe de température est lancée, jusqu'à atteindre 55°C. Les puits sont lavés deux fois avec 300µL de PBS. 100µL de solution de SAV-AP sont ajoutés dans chaque puits de la plaque qui est ensuite incubée à 37°C pendant 30 minutes. Deux lavages avec 300µL de PBS par puits sont réalisés. 100µL de solution BCIP/NBT sont ajoutés dans chaque puits de la plaque puis elle est incubée à 37°C pendant 30 minutes. La plaque est lavée deux fois avec 300µL par puits d'eau ultrapure, puis laissée à sécher pendant 10 minutes à 55°C. La plaque est ensuite transférée dans le lecteur de plaque pour permettre l'acquisition des images après hybridation.

Les images obtenues pour chacun des puits sont analysés grâce au logiciel AXOware™. Les intensités de chaque plot sont quantifiées en utilisant une échelle de niveaux de gris 0-255 et les allèles parmi chaque système bi-allélique sont comparés. Comme décrit dans le paragraphe 2.1.3, le logiciel applique la formule permettant de calculer le P_{score} associé à chaque système bi-allélique. Le score ainsi obtenu est classé en fonction des valeurs limites enregistrées dans le logiciel et un rapport est généré, indiquant les génotypes de chaque échantillon de sang.

4.2.3.2.2 ReSynPlex

Le protocole est identique à celui décrit précédemment mise à part le fait que les 25 μ L de chaque réaction de PCR sont déposés dans une plaque 96 puits (plaque échantillons) de façon manuelle juste avant de lancer le script sur l'automate.

Trois rampes de température différentes ont été testées :

- de 88°C à 55°C
- de 88°C à 30°C
- de 88°C à 10°C

5 Conclusions et perspectives

Au début de ces travaux, le test de génotypage érythrocytaire développé couvrait l'analyse de 6 polymorphismes associés aux groupes sanguins Kell, Kidd, Duffy et MNS. Deux ont été rajoutés (*FY*X* et *FYnull*) afin de compléter et terminer ce premier panel, puis un deuxième panel couvrant 7 polymorphismes de groupes sanguins a été créé. L'analyse de ces deux panels peut être effectuée en parallèle lors d'un seul test. A raison d'un échantillon de sang de donneur par puits d'une plaque 96 puits, ce sont 96 individus dont le sang peut être génotypé sur 15 polymorphismes en approximativement 4h30. Ce test est donc devenu une vraie plateforme de génotypage haut-débit, aisément adaptable en plaques 384 puits, qui permettrait donc de génotyper le sang de 384 donneurs en un seul test.

Cette plateforme a fait l'objet d'une installation à la Croix Rouge de Belgique.

Néanmoins, les optimisations ne sont pas terminées. En effet, il conviendrait de se procurer une cohorte d'échantillons de sang afin de couvrir tous les génotypes qui sont analysables avec la plateforme *HIFI Blood 96™*, et qui manquaient lors de la validation à moyenne échelle. Ces génotypes absents ont conduit à parfois surestimer les valeurs seuils et donc à augmenter le pourcentage d'échantillons ND à la sortie de l'analyse. Le génotypage d'échantillons supplémentaires permettrait d'obtenir des valeurs limites de Pscore encore plus précises dans le but d'augmenter les performances du système.

Un nouveau panel est également en voie de développement, ciblant les antigènes plaquettaires humains (HPA).

Concernant l'adaptation de la plateforme à la détection de pathogènes respiratoires, les tests réalisés sont prometteurs. Une spécificité allélique n'est pas nécessaire dans le premier panel établi, ce qui a permis une plus grande flexibilité quant aux conditions de réactions et de températures testées. L'objectif à court terme est de tester l'hybridation de produits de PCR multiplexe asymétrique sur les 16 cibles énumérées dans ce manuscrit. L'étude consistera ensuite à analyser des échantillons provenant exclusivement de Lavages Broncho Alvéolaires et Broncho Aspirations de patients afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité de la PCR. Ces 16 cibles constitueraient un premier panel en vue d'une étude de validation à moyenne échelle.

Liste des Publications associées à ces travaux de thèse

Boccoz SA, Blum LJ & Marquette CA (2013) DNA biosensor/biochip for multiplex blood group genotyping. *Methods* **64**: 241-249

Boccoz SA, Le Goff GC & Marquette CA (2015a) Multiplex assays for blood groups genotyping. In *Ligand-binding assays : hot topics in bioanalysis*. Sous-presse

Boccoz SA, Le Goff G, Blum LJ & Marquette CA (2015b) Microarrays in blood group genotyping. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1310**: 105–113

Boccoz SA, Le Goff GC, Mandon CA, Corgier BP, Blum LJ & Marquette CA (2016) Development and Validation of a Fully Automated Platform for Extended Blood Group Genotyping. *J. Mol. Diagn. JMD* **18**: 144–152

Références

- Ansart-Pirenne H, Martin-Blanc S, Le Pennec PY, Rouger P, Cartron JP & Tournamille C (2007) FY*X real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis associated with a complete one-step real-time FY genotyping. *Vox Sang.* **92**: 142–147
- Anstee DJ (2009) Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood* **114**: 248–56
- Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Karimi A & Mueller MM (2009) Comparison of PCR methods for detecting fetal RhD in maternal plasma. *J Clin Lab Anal* **23**: 24–8
- Avent ND, Martinez A, Flegel WA, Olsson ML, Scott ML, Nogués N, Pířacka M, Daniels GL, Muñiz-Diaz E, Madgett TE, Storry JR, Beiboer S, Maaskant-van Wijk PM, von Zabern I, Jiménez E, Tejedor D, López M, Camacho E, Cheroutre G, Hacker A, et al (2009) The Bloodgen Project of the European Union, 2003–2009. *Transfus. Med. Hemotherapy* **36**: 162–167
- Badjie KSW, Tauscher CD, van Buskirk CM, Wong C, Jenkins SM, Smith CY & Stubbs JR (2011) Red blood cell phenotype matching for various ethnic groups. *Immuno-hematol. Am. Red Cross* **27**: 12–19
- Beiboer SHW, Wieringa-Jelsma T, Maaskant-Van Wijk PA, Van Der Schoot CE, Van Zwieten R, Roos D, Den Dunnen JT & De Haas M (2005) Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *Transfusion (Paris)* **45**: 667–679
- Bell PA, Chaturvedi S, Gelfand CA, Huang CY, Kochersperger M, Kopla R, Modica F, Pohl M, Varde S, Zhao R, Zhao X, Boyce-Jacino MT & Yassen A (2002) SNPstream UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery. *BioTechniques Suppl*: 70–72, 74, 76–77
- Boccoz SA, Blum LJ & Marquette CA (2013) DNA biosensor/biochip for multiplex blood group genotyping. *Methods*
- Boccoz SA, Le Goff G, Blum LJ & Marquette CA (2015a) Microarrays in blood group genotyping. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1310**: 105–113
- Boccoz SA, Le Goff GC, Mandon CA, Corgier BP, Blum LJ & Marquette CA (2016) Development and Validation of a Fully Automated Platform for Extended Blood Group Genotyping. *J. Mol. Diagn. JMD* **18**: 144–152
- Boccoz SA, Le Goff GC & Marquette CA (2015b) Multiplex assays for blood groups genotyping. In *Ligand-binding assays: hot topics in bioanalysis*
- Brunstein J & Thomas E (2006) Direct screening of clinical specimens for multiple respiratory pathogens using the Genaco Respiratory Panels 1 and 2. *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B* **15**: 169–173
- Bunsow E, Ruiz-Serrano MJ, López Roa P, Kestler M, Viedma DG & Bouza E (2014) Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the detection of Mycobacterium tuberculosis and resistance to rifampin in clinical specimens. *J. Infect.* **68**: 338–343

- Castilho L, Rios M, Bianco C, Pellegrino J Jr, Alberto FL, Saad ST & Costa FF (2002) DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion (Paris)* **42**: 232–8
- Cercenado E, Marín M, Burillo A, Martín-Rabadán P, Rivera M & Bouza E (2012) Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in lower respiratory tract secretions from patients with suspected ventilator-associated pneumonia: evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA SSTI assay. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 4095–4097
- Cho CH, Chulten B, Lee CK, Nam MH, Yoon SY, Lim CS, Cho Y & Kim YK (2013) Evaluation of a novel real-time RT-PCR using TOCE technology compared with culture and Seeplex RV15 for simultaneous detection of respiratory viruses. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **57**: 338–342
- Colinas RJ, Bellisario R & Pass KA (2000) Multiplexed genotyping of beta-globin variants from PCR-amplified newborn blood spot DNA by hybridization with allele-specific oligodeoxynucleotides coupled to an array of fluorescent microspheres. *Clin Chem* **46**: 996–8
- Daniels G (2013) Human blood groups 3rd edition. In *Human Blood Groups* pp i–ix. Wiley-Blackwell Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118493595.fmatter/summary> [Accessed October 6, 2015]
- Daniels G & Reid ME (2010) Blood groups: the past 50 years. *Transfusion (Paris)* **50**: 281–289
- Denomme GA & Van Oene M (2005) High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion (Paris)* **45**: 660–666
- Di Cristofaro J, Silvy M, Chiaroni J & Bailly P (2010) Single PCR Multiplex SNaPshot Reaction for Detection of Eleven Blood Group Nucleotide Polymorphisms: Optimization, Validation, and One Year of Routine Clinical Use. *J. Mol. Diagn. JMD* **12**: 453–460
- Drago F, Karpasitou K & Poli F (2009) Microarray Beads for Identifying Blood Group Single Nucleotide Polymorphisms. *Transfus. Med. Hemotherapy* **36**: 157–160
- Eggers M, Roth B, Schweiger B, Schmid M, Gregersen J-P & Enders M (2012) Comparison of the novel ResPlex III assay and existing techniques for the detection and subtyping of influenza virus during the influenza season 2006-2007. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **31**: 1257–1265
- Gassner C, Meyer S, Frey BM & Vollmert C (2013) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight Mass Spectrometry-Based Blood Group Genotyping—The Alternative Approach. *Transfus. Med. Rev.* **27**: 2–9
- Guelsin GAS, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, Melo FC, Hashimoto MN, Higa TT, Hirle LS & Visentainer JEL (2010) Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the south of Brazil. *J. Clin. Lab. Anal.* **24**: 311–316
- Han J, Swan DC, Smith SJ, Lum SH, Sefers SE, Unger ER & Tang Y-W (2006) Simultaneous amplification and identification of 25 human papillomavirus types with Templex technology. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 4157–4162

- Hashmi G, Shariff T, Seul M, Vissavajhala P, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, Lomas-Francis C, Chaudhuri A & Reid ME (2005) A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion (Paris)* **45**: 680–688
- Hashmi G, Shariff T, Zhang Y, Cristobal J, Chau C, Seul M, Vissavajhala P, Baldwin C, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, Lomas-Francis C & Reid ME (2007) Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion (Paris)* **47**: 736–747
- Hopp K, Weber K, Bellissimo D, Johnson ST & Pietz B (2010) High-throughput red blood cell antigen genotyping using a nanofluidic real-time polymerase chain reaction platform. *Transfusion (Paris)* **50**: 40–6
- Jungbauer C, Hobel CM, Schwartz DWM & Mayr WR (2012) High-throughput multiplex PCR genotyping for 35 red blood cell antigens in blood donors. *Vox Sang.* **102**: 234–242
- Kappler-Gratias S, Peyrard T, Rouger P, Le Pennec PY & Pham BN (2010) Blood group genotyping by high-throughput DNA analysis: Application to the French panel of RBC reagents. *Transfus. Clin. Biol.* **17**: 165–167
- Kengkate M, Butthep P, Kupatawintu P, Kanunthong S, Chantratita W & Nathalang O (2012) Genotyping of HPA-1 to -7 and -15 in the Thai population using multiplex PCR. *Transfus. Med.* **22**: 272–276
- Laudat P, Demondion E, Jouannet C, Charron J, Chillou C, Salaun V & Mankikian B (2012) [Detection of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA) by molecular biology (Cepheid GeneXpert IL, GeneOhm BD, Roche LightCycler, Hyplex Evigene I2A) versus screening by culture: Economic and practical strategy for the laboratory]. *Pathol. Biol. (Paris)* **60**: 208–213
- Lefrère J-J & Schved J-F (2010) *Transfusion en hématologie* John Libbey Eurotext
- Le Goff G (2011) Immobilisation de biomolécules pour l'analyse multiparamétrique sur biopuces: application au génotypage érythrocytaire haut-débit. Available at: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00686770/document> [Accessed September 9, 2015]
- Le Goff GC, Brès J-C, Rigal D, Blum L & Marquette CA (2010a) Robust, High-Throughput Solution for Blood Group Genotyping. *Anal. Chem.* **82**: 6185–6192
- Le Goff GC, Brès J-C, Rigal D, Blum L & Marquette CA (2010b) Robust, High-Throughput Solution for Blood Group Genotyping. *Anal. Chem.* **82**: 6185–6192
- Le Goff GC, Desmet C, Brès J-C, Rigal D, Blum L & Marquette CA (2010c) Multipurpose high-throughput filtering microarrays (HiFi) for DNA and protein assays. *Biosens. Bioelectron.* **26**: 1142–1151
- Lewin B (1998) *Gènes VI De Boeck Supérieur*
- Li H, McCormac MA, Estes RW, Sefers SE, Dare RK, Chappell JD, Erdman DD, Wright PF & Tang Y-W (2007) Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 2105–2109
- Merante F, Yaghoubian S & Janeczko R (2007) Principles of the xTAG respiratory viral panel assay (RVP Assay). *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **40 Suppl 1**: S31–35

- Meyer S, Trost N, Frey BM & Gassner C (2015) Parallel donor genotyping for 46 selected blood group and 4 human platelet antigens using high-throughput MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1310**: 51–70
- Meyer S, Vollmert C, Trost N, Brönnimann C, Gottschalk J, Buser A, Frey BM & Gassner C (2014) High-throughput Kell, Kidd, and Duffy matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry-based blood group genotyping of 4000 donors shows close to full concordance with serotyping and detects new alleles. *Transfusion (Paris)* **54**: 3198–3207
- Montpetit A, Phillips MS, Mongrain I, Lemieux R & St-Louis M (2006) High-throughput molecular profiling of blood donors for minor red blood cell and platelet antigens. *Transfusion (Paris)* **46**: 841–848
- Novaretti MC, Ruiz AS, Dorlhiac-Llacer PE & Chamone DA (2010) Application of real-time PCR and melting curve analysis in rapid Diego blood group genotyping. *Immunohematology* **26**: 66–70
- Palacajornsuk P, Halter C, Isakova V, Tarnawski M, Farmer J, Reid ME & Chaudhuri A (2009) Detection of blood group genes using multiplex SNaPshot method. *Transfusion (Paris)* **49**: 740–749
- Perreault J, Lavoie J, Painchaud P, Côté M, Constanzo-Yanez J, Côté R, Delage G, Gendron F, Dubuc S, Caron B, Lemieux R & St-Louis M (2009) Set-up and routine use of a database of 10 555 genotyped blood donors to facilitate the screening of compatible blood components for alloimmunized patients. *Vox Sang.* **97**: 61–68
- Pierce VM & Hodinka RL (2012) Comparison of the GenMark Diagnostics eSensor respiratory viral panel to real-time PCR for detection of respiratory viruses in children. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 3458–3465
- Pillet S, Lardeux M, Dina J, Grattard F, Verhoeven P, Le Goff J, Vabret A & Pozzetto B (2013) Comparative evaluation of six commercialized multiplex PCR kits for the diagnosis of respiratory infections. *PLoS One* **8**: e72174
- Piralla A, Lunghi G, Percivalle E, Viganò C, Nasta T, Pagni L, Mosca F, Stronati M, Torresani E & Baldanti F (2014) FilmArray® respiratory panel performance in respiratory samples from neonatal care units. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **79**: 183–186
- Popowitch EB, O'Neill SS & Miller MB (2013) Comparison of the Biofire FilmArray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP fast multiplex assays for detection of respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 1528–1533
- Poritz MA, Blaschke AJ, Byington CL, Meyers L, Nilsson K, Jones DE, Thatcher SA, Robbins T, Lingenfelter B, Amiott E, Herbener A, Daly J, Dobrowolski SF, Teng DH-F & Ririe KM (2011) FilmArray, an Automated Nested Multiplex PCR System for Multi-Pathogen Detection: Development and Application to Respiratory Tract Infection. *PLoS ONE* **6**: e26047
- Reid ME (2009) Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematol. Am Soc Hematol Educ Program*: 171–7

- Reijans M, Dingemans G, Klaassen CH, Meis JF, Keijndener J, Mulders B, Eadie K, van Leeuwen W, van Belkum A, Horrevorts AM & Simons G (2008) RespiFinder: a new multiparameter test to differentially identify fifteen respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 1232–1240
- Schrijver I (2011) *Diagnostic Molecular Pathology in Practice: A Case-Based Approach* Springer Science & Business Media
- Sousa TN, Sanchez BAM, Cerávolo IP, Carvalho LH & Brito CFA (2007) Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the *Plasmodium vivax* invasion receptor. *Vox Sang.* **92**: 373–380
- St-Louis M, Perreault J, Lavoie J, Emond J, St-Laurent J, Long A & Richard M (2010) Génomotypage de 21 000 donneurs de sang au Québec et analyse du RHD. *Transfus. Clin. Biol.* **17**: 242–248
- Tournamille C (2013) Les technologies de biologie moléculaire en immunohématologie. *Transfus. Clin. Biol.* **20**: 72–79
- Wagner FF, Bittner R, Petershofen EK, Doescher A & Müller TH (2008) Cost-efficient sequence-specific priming-polymerase chain reaction screening for blood donors with rare phenotypes. *Transfusion (Paris)* **48**: 1169–1173

Annexes



DNA biosensor/biochip for multiplex blood group genotyping



S.A. Boccoz^{a,b}, L.J. Blum^a, C.A. Marquette^{a,*}

^a Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, Université Lyon 1 – CNRS 5246 ICBMS, Bâtiment CPE 43, bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

^b AXO Science SAS, 66 Bd Niels Bohr, CEI 1, 69100 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 27 September 2013

Keywords:

Blood group
DNA biochip
Microarray
Multiplex
Polymerase chain reaction

ABSTRACT

At present, 33 blood groups representing over 300 antigens are listed by the International Society of Blood Transfusion (ISBT). Most of them result from a single nucleotide polymorphism (SNP) in the corresponding DNA sequence, i.e. approx. 200 SNPs. In immunohematology laboratories, blood group determination is classically carried out by serological tests, but these have some limitations, mostly in terms of multiplexing and throughput. Yet, there is a growing need of extended blood group typing to prevent alloimmunization in transfused patients and transfusion accidents. The knowledge of the molecular bases of blood groups allows the use of molecular biology methods within immunohematology laboratories. Numerous assays focused on blood group genotyping were developed and described during the last 10 years. Some of them were real biochips or biosensors while others were more characterized by the particular molecular biology techniques they used, but all were intending to produce multiplex analysis. PCR techniques are most of the time used followed by an analytical step involving a DNA biosensor, biochip or analysis system (capillary electrophoresis, mass spectrometry). According to the method used, the test can then be classified as low-, medium- or high-throughput. There are several companies which developed platforms dedicated to blood group genotyping able to analyze simultaneously various SNPs or variants associated with blood group systems.

This review summarizes the characteristics of each molecular biology method and medium-/high-throughput platforms dedicated to the blood group genotyping.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Today, 33 blood group systems representing over 300 antigens are listed by the ISBT. Most of them have been cloned and sequenced [1,2] which means that the molecular bases of these blood group systems are known and mostly result from single nucleotide polymorphism (SNP).

Red Blood Cells (RBC) carrying a particular antigen can elicit an immune response if they are introduced in the blood circulation of someone who lacks this antigen. It is the antibody produced during the immune response which is problematic and is involved in donor/patient transfusion incompatibility, materno-fetal incompatibility and autoimmune hemolytic anemia. This immune response can be immediate or delayed and, in some cases, lead to death. That is the reason why antigen-negative blood is required for a safe transfusion. The method of reference for testing blood group antigens has been for decades the hemagglutination technique. However, this gold standard method has certain limitations (immunological reagent availability and specificity) when it comes

to the determination of minor or rare blood group antigens in order to fulfill perfect matching between patient and donor [3].

The classical method for blood group typing is hemagglutination. This technique is simple and well established for all major blood groups, with specificity, sensitivity and security appropriate for clinical diagnostic environment. However, when it comes to extended blood group typing, this technique has some limitations [3] (see Table 1).

Reagents are specialized and must be obtained from immunized patients or donors (polyclonal and monoclonal antibodies) or from immunized mice (monoclonal antibodies). Reagents' cost is increasing, and many antibodies are not available, or are weakly reactive which is not suitable for the growing need of blood products typed for a large number of antigens. This limit led to a relatively low number of donors typed for larger number of antigens, which limits the establishment of an antigen-negative inventory. In addition, antigens may often be too weakly expressed on the surface of the RBCs to be detected by serology and discrepancies in serologic activity can occur between different manufacturer's reagents [4]. Finally, even if all the necessary antibodies required to determine all the blood group systems were available, there would remain the following problems:

* Corresponding author.

E-mail address: christophe.marquette@univ-lyon1.fr (C.A. Marquette).

Table 1
Limitations of serology.

<i>Technical limitations</i>	
Manual data entry	
Reagents specialized and obtained from immunized patients or mice	
The cost of commercially licensed reagent increases	
Many antibodies are not commercialized or weakly reactive	
Not adapted to a high-throughput or high-content typing	
<i>Clinical limitations</i>	
Difficulties to phenotype a recently transfused patient or a multi-transfused patient, or when RBCs are coated with IgG	
Difficulties for the D-typing of the Rh blood group	
When a silencing gene is involved	
Indirect indication of the risk and severity of anemia or HDFN (Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn)	

- It is difficult to type recently transfused patients [5], multi-transfused patients like those with sickle cell disease [6], or those who RBCs are coated with IgG [4].
- D-typing is difficult due to the high number of antigens produced by the *RHD* gene [7].
- Cases where the phenotype does not exactly represent the genotype, due to silencing alleles, for example for the Duffy blood group [8].
- Hemagglutination only gives an indirect indication of the risk and severity of anemia or HDFN [9].

The knowledge of the molecular bases of most of the blood group systems allows the use of new tools like DNA based assays. One type of existing DNA-based assays uses DNA biosensors or microarrays (solid phase or suspended beads arrays). They are potentially high-throughput tools allowing testing a large number of donors on a large number of antigens [3]. Moreover, they help overriding the limitations of serology, replacing the immunochemical reagents by synthetic and reproducible probes. These methods usually associate a multiplex PCR step followed by detection with

specific probes corresponding to the analyzed polymorphisms. Indeed, two thirds of all blood group antigens are defined by single nucleotide polymorphisms (approximately 200 SNPs) [10]. In this situation, a solution based on multiplex PCR which can analyze several parameters at the same time is required. The Fig. 1 gives an overview of the different techniques used to predict a blood type.

The purpose of this review is to summarize the different existing molecular biology methods which allow extended blood group genotyping. After seeing how DNA-based assays can be helpful, we will describe the principles of PCR-based assays applied to blood grouping and then summarize the different existing DNA biosensor/microarray-based platforms.

2. Classical PCR-based assays

This technique has revolutionized the field of molecular genetics, allowing the reproduction of a specific DNA sequence in an exponential way. After the isolation of DNA, the PCR reaction consists in three steps as represented on the Fig. 2.

- (1) Denaturation: To dissociate the double stranded DNA and to obtain two simple strands. This step is usually performed at 95 °C during 30 s.
- (2) Annealing: During this step, specific primers hybridize on their complementary sequences. The classic range of temperature is 55 °C–65 °C, depending on the melting temperatures of the primers.
- (3) Extension: Between 68 °C and 72 °C, the DNA polymerase synthesizes strands complementary to oligonucleotides present in the reaction mix. The duration of this step depends on the length of the amplified fragment. The typical velocity of the DNA polymerase is 1 kb/minute.

These three steps are repeated approximately 30 times, which result in a number of DNA copies which increases in an exponential

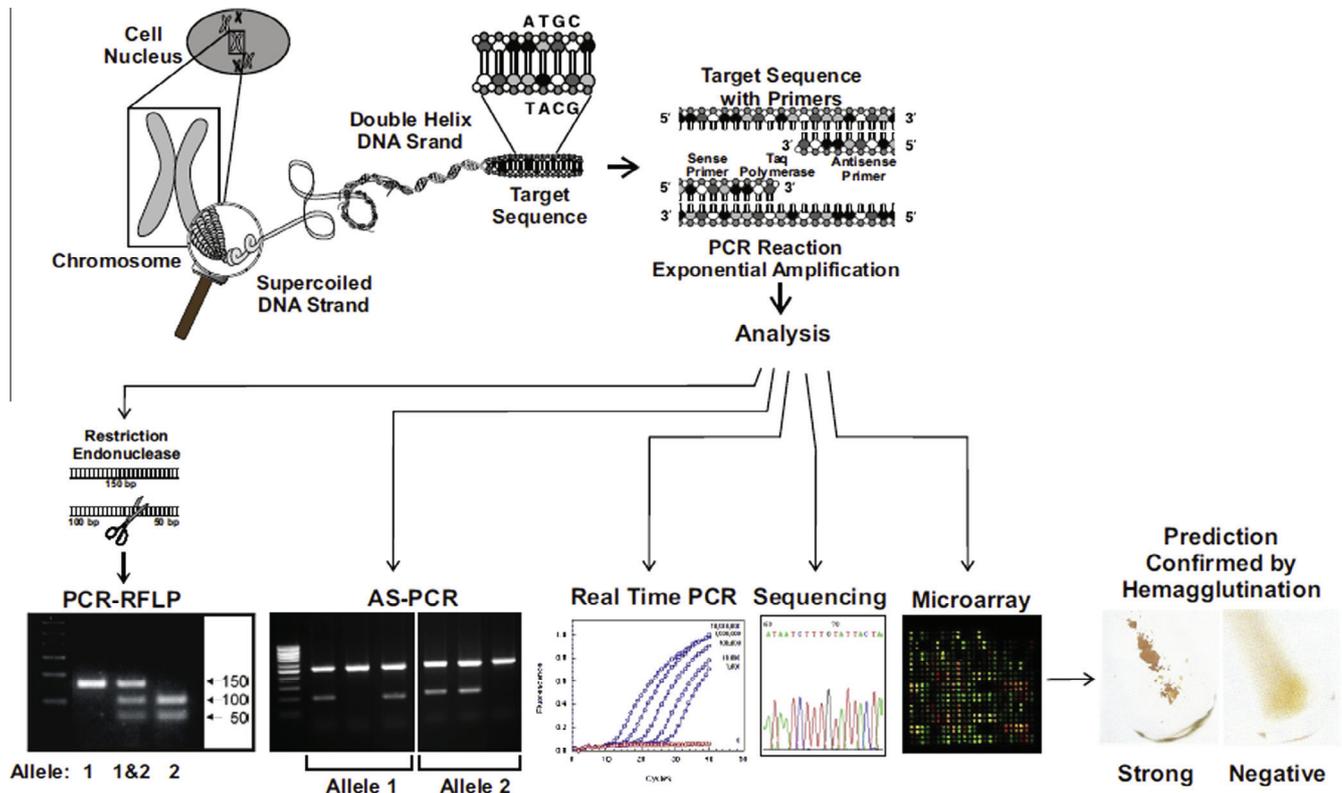


Fig. 1. Possibilities to go from cell nucleus to DNA and then assay, useful to predict a blood type [11].

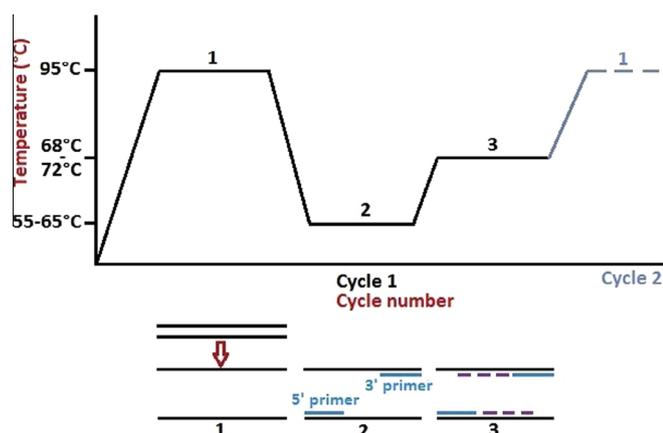


Fig. 2. Principle and major steps of the Polymerase Chain Reaction (PCR).

way. Before the beginning of the first cycle, one step of initial denaturation is usually performed to enable long fragments to dissociate, especially when genomic DNA is isolated. This step also allows the activation of the widely used hot-start DNA polymerase, which helps preventing non-specific amplifications. In a similar way, a final extension step of 5 min is performed to finish all the loading extensions.

After the amplification, the synthesized fragments have to be analyzed and here different methods can be used, from the low-throughput agarose electrophoresis, to the medium-throughput capillary electrophoresis and finally the high-throughput microarrays systems. It is interesting to note that going from low- to high-throughput is linked to the use of biosensor or biochip like systems.

For the sake of comparison, we are describing hereafter the full range of analysis systems (from non-biosensors electrophoresis to biochip microarrays).

2.1. Low-throughput

2.1.1. PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

This technique is relevant only if a SNP creates or removes a restriction site. Indeed, PCR is used to amplify region of interest including the SNP, followed by a step of digestion with a restriction enzyme. These enzymes are highly specific and cleave the DNA at a specific site, characterized by a unique sequence of nucleotides. Results are usually visualized using gel electrophoresis and fragments of different sizes are obtained, reflecting the presence or absence of the restriction site and thus the SNP of interest. Results are classically compared to known controls (homozygous samples for each allele, and a heterozygous sample) as internal calibrators.

Some studies have already been conducted using this technique, mostly for ABO genotyping [12–16], but also for other systems such as Lewis [17] and Knops [18].

This technique cannot be multiplexed in its current status but shall be in the future modified to fit a multiplex purpose.

2.1.2. Allele-specific-PCR (AS-PCR) or sequence-specific priming-PCR (SSP-PCR)

This method requires at least two reaction tubes per DNA sample. Each reaction tube contains one gene specific primer which is common to both alleles and one specific primer for one of the two possible alleles. If the complementary sequence of the allele specific primer is not present, annealing does not occur and there is no amplification. Results of the two reaction tubes are visualized by agarose gel electrophoresis. As the lack of PCR product reflects a missing allele, it is important to include an internal control to ensure that the PCR amplification step was successful.

Some articles have been published with this technique concerning the following blood group antigens: Duffy [19–21], RhD/CE [22,23], and ABO [24].

Some kits have been also developed and are commercialized: BAGene SSP Kits [25], by BAG Health Care (<http://www.bag-health-care.com>). These kits are CE-IVD marked and allow the determination of ABO blood groups, RH types, Kell Kidd and Duffy systems, MNS system, HPA and HNA specificities. They are composed of pre-aliquoted and dried reaction mixtures for SSP-PCR, optimized for a final volume of 10 μ L. 10X PCR buffer and an internal control are supplied. However, Taq polymerase (not hot-start) and all the equipment for the detection of the PCR products by agarose gel electrophoresis must be added. This technique is compatible with multiplexing conditions as far as the determination of the two alleles is separated in two different vessels (see next paragraph).

2.2. Medium-throughput

2.2.1. Multiplex PCR

This technique allows the analysis of several SNPs or regions of interest in the same reaction, unlike AS or SSP-PCR, using multiple primer pairs. Number of reactions, time and quantity of reagents used are then drastically reduced.

The main problem in multiplex PCR is the degree of multiplexing. Indeed, increasing the number of primers promotes the emergence of non-specific hybridizations. Optimization of multiplex PCR can then be fastidious mostly because annealing temperatures of all primers must be similar.

In general, multiplex PCR products are visualized by agarose gel or capillary electrophoresis, and discriminated according to their sizes. In 2012, Jungbauer et al. published an article in which they developed a multiplex PCR to genotype 35 red blood cell antigens [26]. It consists of six different reactions, each with 5 to 7 primer pairs. At least one allele-specific primer is used in each primer pair. PCR products are analyzed by agarose gel electrophoresis and differentiated by their sizes. Sixteen people per 96-well plate can then be genotyped for 35 antigens. For all samples and markers tested, a 100% concordance was found between determined genotypes and phenotypes (from 1 to 469 samples were tested for each antigen). The group also compared the cost of classical serological typing (35 to 39€ per donor for 20 minor RBC antigens) with their own genotyping approach (15€ per donor for 35 RBC antigens). Thus, for 1 minor RBC antigen, serological typing would cost between 1.75 and 1.90€ (automated vs. manual), and genotyping around 0.43€.

This is one of many studies showing the relevance of genotyping compared to serology, from the standpoint of the cost, the throughput, and the fact that there are only approximately 20 minors RBC antigens for which serological reagents are available on a regular basis [26]. Kengkate et al. used this same technique to genotype HPA-1 to -7 and -15 in Thai population [27] and Wagner also used it to screen blood donors with rare phenotypes [28].

2.2.2. Real-time PCR

Real time PCR is an autonomous detection system based on PCR reaction. It can then almost be considered as biosensors on its own. The working principle is the same than classic PCR, except that the extension is detected and measured in real time. There are three common methods:

- The use of SYBR[®] Green. It is a non-specific intercalating dye which integrates to the forming double stranded DNA during extension and emits fluorescence. Multiplexing is here not possible but Novaretti et al. used real-time PCR with SYBR[®] Green to genotype blood donors for Diego blood group [29], as Sousa et al. for the genotyping of Duffy blood group [30].

- TaqMan probes. These probes have a fluorophore bound to one extremity and a quencher to the other one. In their initial configuration, the quencher captures the fluorescence of the fluorophore, turning off the signal. In the presence of DNA template, the TaqMan probe hybridizes and during the extension, the TaqMan probe is hydrolyzed by the 5'-3' exonuclease activity of the polymerase. This results in the "break" of the proximity between fluorophore and quencher, turning on the fluorescence emitted by the fluorophore. Fluorescence detected is directly proportional to the amount of fluorophore and DNA template present in the reaction. Multiplexing is possible but limited due to the number of fluorescent dyes commercially available, and also due to the number of colors recognized by the instrument. In 2009, Atamaniuk et al. published an article in which they compared 3 molecular biology methods to predict fetal RhD in maternal plasma and concluded that TaqMan was one of the most accurate system [31].
- FRET detection. In this system, two probes are used: one with a transmitter fluorophore bound at the 3' end, and the other with an acceptor fluorophore bound at the 5' end. These two probes are chosen to hybridize to their target sequences in a configuration where the two fluorophores are separated only by one to five base pairs. When the two probes are separated, the transmitter fluorophore only emits background fluorescence whereas when they are hybridized and closer than 10 nucleotides away, the proximity of the two fluorophores allows the energy transfer from transmitter to acceptor. Fluorescence is measured during the annealing, and is proportional to the quantity of DNA synthesized. As probes stay intact, it is also possible to realize melting curves at the end of the reaction. Ansart-Pirenne et al. [32] used this technique for the genotyping of FY*X allele on 199 DNA samples.

Other probes exist for the measure of fluorescence during real-time PCR such as Molecular Beacons, and Scorpions, but their design is fastidious and their cost is high.

2.3. Non PCR-based assays

2.3.1. Sanger DNA sequencing

For this method, a complementary primer of region of interest is used. Extension is realized by Klenow fragment (DNA polymerase without 5'-3' exonuclease activity). Dideoxynucleotides are added. They do not possess 3'OH group, and do not allow the addition of nucleotides and the extension is then stopped. Each dideoxynucleotide is labeled by a specific fluorophore which emits at a specific wavelength. The detection system measures the fluorescence emitted and a specific profile is obtained, allowing the determination of the desired sequence.

2.3.2. Pyrosequencing

In this technique, deoxynucleotides are not introduced in the reaction vessel all together, but one after the other. If the added nucleotide corresponds to the one expected by the DNA polymerase, it is incorporated in the strand being synthesized and a pyrophosphate is released. This pyrophosphate is transformed into ATP, by an ATP sulfurylase, and used by a luciferase bioluminescent enzyme to produce light. A CCD (Charge-Coupled Device) imaging sensor captures the emitted signal and reproduces it as a peak on a pyrogram. Peak height is function of signal intensity, itself function of the number of nucleotides incorporated at the same time. The sequence can be deduced from peak heights. In the case of single nucleotide polymorphism analysis, different nucleotides are incorporated at a same position and peak height helps identifying the presence of SNPs.

3. Integrated systems

3.1. Medium-throughput

3.1.1. Fluidic microarray system – xMAP

xMAP technology (<http://www.luminexcorp.com>) is based on the use of matrices in suspension. Polystyrene microspheres act as an immobilization support for oligonucleotide probes. Each bead (5.6 µm diameter) has its own optical encoding which allows its identification during result analysis. Two fluorophores are incorporated in different proportion in each bead, conferring them a unique spectral signature. Up to 500 different optical codes can then be created. Beads carrying the same code form a set, and each set carries a specific probe.

Oligonucleotide probes are synthesized with an amino C-12 modification at 5' end and are covalently immobilized on the polystyrene microspheres through a carbodiimide activation method [33]. Once the beads coupled with probes, they are stable for at least 6 months.

The principle of the assay is summarized on Fig. 3. A multiplex PCR which generates biotinylated amplicons is performed in order to amplify regions of interest. Directly after the amplification, the mixture is transferred into a 96-well plate and denatured at 99 °C. Labeled PCR products are then hybridized with microspheres during 45 min. The plate is washed three times and incubated with R-phycoerythrin conjugated-streptavidin. The analysis is based on the flow cytometry principle. When a microsphere passes through the detection chamber, a laser excites red and infrared fluorochromes, allowing the bead classification among the different sets. Another laser excites orange fluorescence associated with the target binding.

Drago et al. used this technique for the identification of blood group SNPs [34]. They typed more than 2000 patients, whom 493 with multiplex assays, and they observed no discrepancies between Luminex results and serological results, except when there was a null/weak phenotype. According to the authors, there are some advantages with this method compared to other high-throughput techniques: fast reaction kinetics, rapid data acquisition, and excellent sensitivity. Due to its flexibility, probe sets can be reformulated, depending on the needs of the laboratory. No amplicon purification is required after PCR, and this is a technique which allows the use of a large range of DNA concentrations, avoiding fastidious steps of measures.

However, always according to the authors, even if it is possible to type from 1 to 96 samples, xMAP technology is cost-effective when a large number of samples is typed, then it may not be the method of choice for laboratories with low workload. There is also a lack of automation in the protocol, especially for sample loading and washing steps.

3.1.2. TaqMan open array – open array

This technique is based on TaqMan method, described earlier. Each probe contains a specific fluorescent dye to differentiate each allele (<http://invitrogen.com>) of one blood group SNP. The reporter dye VIC® is used at 5' end of each probe corresponding to allele 1. FAM™ is used at 5' of each probe corresponding to allele 2. One Minor Groove Binding stabilizing agent is also present in the reaction mix, which allows the increase of melting temperature of probes while keeping their length constant. A non fluorescent quencher is included at 3' end of each probe. As it does not fluoresce, the real-time PCR system can measure the fluorescence of the reporter accurately. This technique allows the increasing of throughput using classical plates.

Hopp et al. used this platform to screen African American blood donors [35]. Out of the 4270 genotypes generated by the OpenAr-

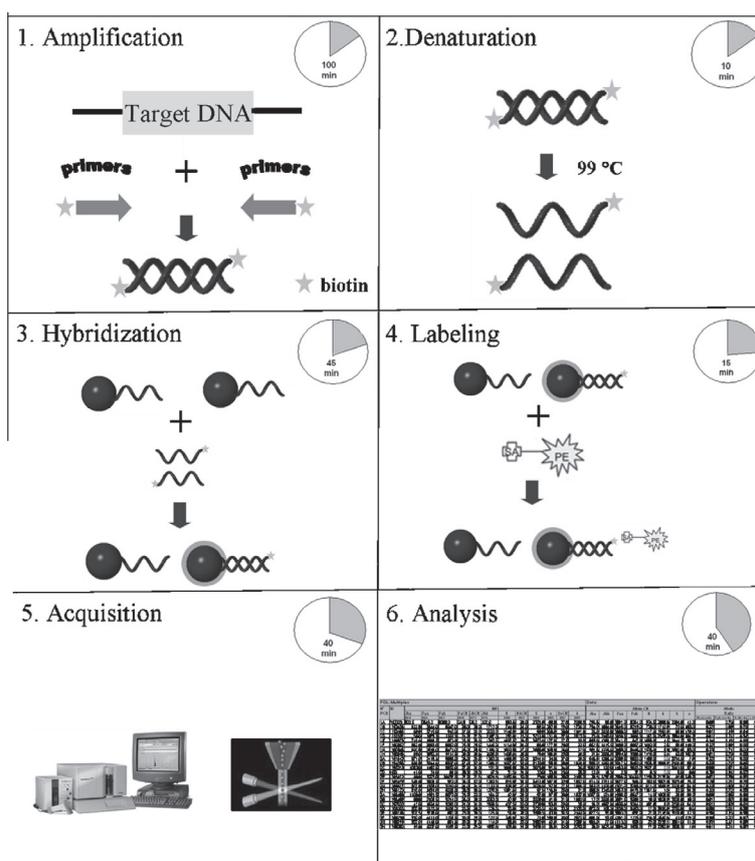


Fig. 3. Principle of xMAP assay [34].

ray[®] system, there were 5 discrepancies. Three have been resolved by either a new serological typing, a new OpenArray[®] genotyping, or using result obtained by Sanger sequencing. Each sample has been analyzed in triplicate, with over 99% correlation.

The great advantage of this method is the low reaction volume (33 nL) and speed (3 plates per approximately 5 h for a throughput of 9000 genotypes per run).

3.1.3. Mini sequencing or SNaPshot

This technique, developed by Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com) is based on an extension by only one nucleotide. Regions of interest are amplified by multiplex PCR so that each amplicon has a different length. Reaction mix is purified to remove non-incorporated nucleotides and primers. Amplicons are then mixed with a set of extension fragments. These fragments are complementary to the adjacent region of the SNP and will hybridize to the nucleotide preceding the SNP, at the 5' side. A step of enzymatic extension of 1 nucleotide length is performed in the presence of four dideoxynucleotides labeled with four different fluorophores. Capillary electrophoresis allows the detection of fluorescence and length of the fragments, leading to the allelic determination.

One complete cycle allows to analyze up to 10 SNPs in a single reaction vessel per 24 h, and the estimated cost is 2\$ per SNP [36]. One example of using this platform is reported in the publication of Di Cristofaro et al. [37]. They used SNaPshot reaction to type 18 blood group alleles. Their multiplex PCR amplified 9 regions of interest, with a length from 96 to 986 bp. Then, with the SNaPshot kit, they realized the one base extension and analyzed data by capillary electrophoresis with GeneMapper software. They analyzed only seven blood group systems: Kell, Duffy, MNS, Kidd, Dombrock,

Cartwright and Colton but the assay also included the *FY**X allele, silencing *FY* and silencing *MNS*.

3.1.4. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) - sequenom

This technique allows the differentiation of DNA fragments which differ from one nucleotide in length. It consists of two steps: (i) desorption/ionization of fragment induced by laser and (ii) separation/analysis of the different molecules, based on their physical properties.

Sequenom is a Californian company of biotechnology developing since 2008 bench analytical tools: MassARRAY systems. It is a compact equipment which allows the direct measurement of nucleic acid mass. This system is based on multi MALDI-TOF MS technology and finds applications for blood group genotyping (<http://www.sequenom.com>).

A cooperative study between Switzerland and Germany using the Sequenom platform has been published in January 2013 [38]. The aim of this study was the molecular detection of the following blood group systems: Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNSs. This method has also been used for the characterization of a collection of low incidence antigens, platelet and granulocyte antigens for a total of 101 blood group antigens, encoded by 170 alleles.

The protocol starts by a multiplex PCR on genomic DNA, followed by an allele-specific single base extension of a primer. This primer anneals in a position directly adjacent to the SNP. The simple strands obtained (15–30 bases) are deposited on a silicon chip beforehand spotted with a matrix crystal containing patches. The entire mixture is then irradiated by a laser, inducing the desorption and ionization of the amplified fragments. Charged molecules accelerate through a flight tube towards a detector. Separation is

made by Time Of Flight (TOF). This time is proportional to the mass of the individual molecules. Low-mass molecules arrive faster than high-mass molecules. As a result, a mass spectrum is obtained.

This technique has some advantages: low quantities of DNA are required and the equipment is able to determine directly the mass of the molecules, without any labeling or dyeing step. The Sequenom platform supports multiplexing until 40 SNPs per reaction, with a rapid data acquisition and interpretation. Up to 150000 SNPs can be analyzed per day. Two formats are available: 384-well plate, suitable for up to 1000 samples per day, and 96-well plate, optimal up to 100 samples a day. Concerning the costs, list prices for Europe for full 96-well system and full 384-well system are 250000€ and 350000€ respectively, whereas each multiplex PCR costs 10€. There are 10 different multiplex PCR to cover all the antigens included in this study, and cost for the package of multiplexed PCR is 70€.

3.2. Medium- to high-throughput

3.2.1. BLOODChip®

The BLOODChip® system is dedicated to extended blood group genotyping and is commercialized by Progenika (www.progenika.com). It has been developed as a part of the European collaborative project BloodGen (2003–2006) which associated two blood banks (Barcelona and Prague) with two British academic research institutes (University of the West of England, Bristol Institute for Transfusion), the Sanquin (Netherlands), the universities of Ulm (Germany) and Lund (Sweden). The consortium also included two industrial partners: Progenika Biopharma SA (Spain), and Biotech (Germany) in charge of the integration on an existing SNP analysis platform. In version 2.0, which is CE marked, BLOODChip® allows the analysis of 128 SNPs associated with nine blood group systems and some platelet antigens.

Target sequences are amplified from genomic DNA through a multiplex PCR by hybridization of amplifiable probes, developed by Beiboer et al. [39]. Extracted DNA is mixed with a set of primers specific of the targeted polymorphisms. If the target sequence is present in the sample, the primers hybridize on genomic DNA. A washing step allows to isolate hybridized fragments and to amplify them. PCR products are then marked with two fluorophores, fragmented, and hybridized on the BLOODChip® array under stringent conditions. The chip is composed of a glass slide modified by an immobilized matrix of specific probes on which targets hybridize. Once hybridized, the chip is scanned with a fluorescence microscope and obtained signals are analyzed through a dedicated single software program to determine the different scores associated with the different alleles which allow the determination of the genotypes. Five hours after DNA extraction are required to achieve the results.

After clinical tests at a small scale on panels of rare donors in Spain, Germany, Czech Republic and Sweden, a validation on 3000 donors was performed and used to obtain the CE marking of the system. When compared to serology and other molecular typing methods, the results obtained by the authors highlighted an excellent performance of BLOODChip® v2.0 for an extended blood group genotyping.

3.2.2. HEA BeadChip™

Developed by BioArray Solutions Ltd. (held by Immucor Inc.), HEA BeadChip™ offers an extended genotyping solution for 11 blood groups and a panel of platelet antigens (<http://www.immucor.com/bioarray>). This product was approved by the *Food and Drug Agency* and obtained CE marking in July 2010. It has been evaluated on four hospital sites for the implementation of extended genotyping in routine [40,41].

It is a hybridization test on a matrix of beads (Fig. 4). Microbeads (3 µm of diameter) with carboxylic acid groups are function-

alized with probe oligonucleotides modified with an amino arm (approximately 20 bases). Each bead carries about 50 copies of a unique probe, which 3' end is specific to a target polymorphism. The different beads in suspension are collected (approximately 4000 beads) and coated on a silicon support where they form a monolayer. These silicon matrices are individualized and assembled on a glass slide. Two formats are available: 8 × 1 and 8 × 12, allowing testing several samples in parallel. Each bead has an optical encoding which allows its identification by spectral imagery and to deduce the sequence of the probe presents on its surface. From this stand point the technique is similar to the Lumindex technology based ones.

After genomic DNA extraction, sequences with target polymorphisms are amplified using a multiplex PCR. The mixture of PCR products is then purified, denatured, hybridized on beads and fluorescently labeled using two strands specific enzymatic elongation. This step can be realized only with a perfect match between target and probe. The incorporation of a labeled nucleotide specifically labels the two strands. Genotypes are obtained through the comparison of fluorescence intensities between the two alleles of interest and a panel of reference values.

Main published validation studies of HEA BeadChip™ have been performed in collaboration with Marion Reid's team at the Immunohematology laboratory (New York Blood Center) [42,43]. In 2007, the team presented results of a study led on 2355 patients belonging to multiple ethnic groups, for the analysis of 24 blood group antigens and a panel of platelet antigens, with 99.5% of concordance compared to serological results.

HEA BeadChip™ test (version 1.2) has been also implemented by Kappler-Gratias et al. [40,41] for the evaluation of molecular methods in the characterization of erythrocytes used as reagent on the Laboratory and French National Reference Panel. The genotyping test has allowed analyzing 34 antigens involved in 11 blood group systems for a panel of 365 donors. Comparison of the predicted phenotype by genotyping results and serological phenotype for 25 of these antigens showed a concordance of 99.95%.

Brazilian teams have also reported the use of HEA BeadChip™ as a reference technique in a study evaluating the impact of extended molecular typing for the monitoring of multi-transfused patient panel [44] and for the monitoring of sickle cell patients [6].

3.2.3. Genome lab SNP stream

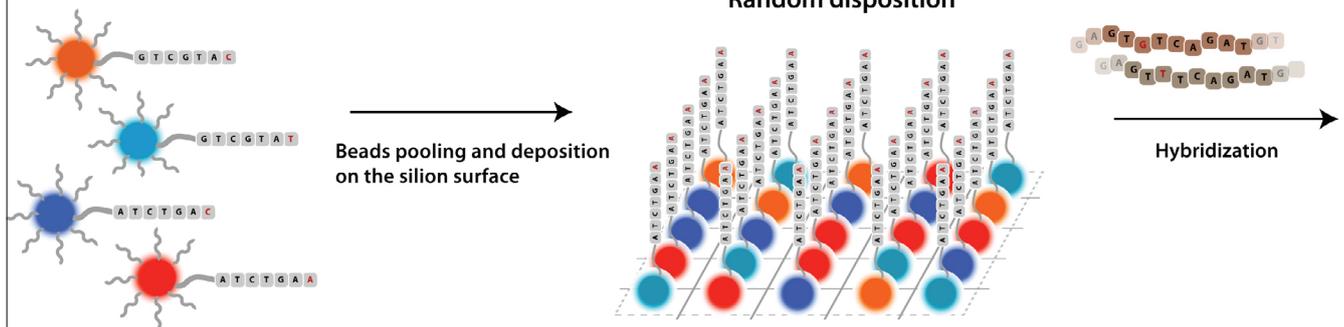
Genome Lab SNP Stream platform, commercialized by Beckman Coulter, use the SNPstream® UHT, developed by Orchid BioScience for ultra high-throughput genotyping in pharmacogenomics and in the drug screening [45]. It associates amplification by multiplex PCR with a fluorescent labeling step obtained by elongation, followed by hybridization on a chip. Canadian teams of Gregory Denomme (Toronto) and Maryse St-Louis (Quebec) developed the molecular biology tools required for the transfer of this technology to extended blood group genotyping [46,47].

The format of the chip is a conventional 384-well plate, with the same matrix of probes in each well, allowing then to test 384 samples in parallel. Oligonucleotides are covalently bound to a glass support activated by 3-mercaptopropyl-trimethoxysilan (MPTS). Then, the application of a neoprene mask allows individualizing 384 wells. Each matrix includes 16 probes: four are controls (positive and negative) and the other 12 correspond to the studied SNPs.

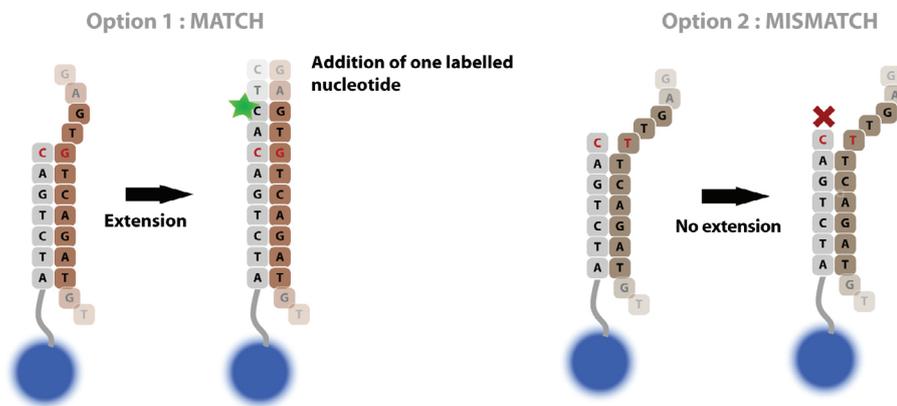
Each test allows the detection of two nucleotides among the four possible at the SNP position. For each studied SNP, a fragment SNP-IT is used and constructed as follows: 3'-end sequence of the fragment is complementary to one of the probes fixed in the bottom of the well and 5'-end sequence of the fragment is complementary to the target and immediately adjacent to the SNP.

The first step consists of a multiplex PCR to amplify specific sequences of targeted polymorphisms on the extracted DNA (Fig. 5).

1. Beads pooling and hybridization



2. Extension and labelling



3. Chip reading

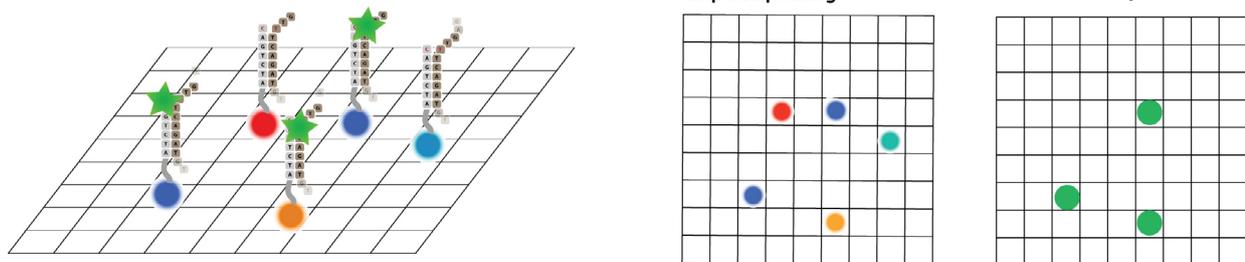


Fig. 4. Principle of HEA BeadChip™ assay.

Amplicons are mixed with SNP-IT fragments with which they specifically interact. Then a one-base enzymatic elongation is performed in presence of the two labeled nucleotides, one by BODIPY-fluorescein and the other by TAMRA. According to the base present on the target at the SNP site, the elongation will incorporate one or the other fluorophores. The reaction mixture is incubated on the chip and the 5'-end of the fragment hybridizes with its complementary probe. A plate reader enables to read the fluorescence intensity for each probe on each spot and to deduce the genotype.

In 2005, Denomme et al. [46] reported the analysis of 372 samples for 12 SNPs associated with RH, MNS, KEL, FY, JK, DI blood group systems and one platelet antigen, with a concordance above 98% for 11 of the 12 parameters.

Maryse St-Louis's team of Hema-Quebec was also interested in the development of this technology. In 2006, a study of Montpetit

et al. focuses on the analysis of 22 minor blood group antigens (RHCE, KEL, FY, JK, MNS) and three platelet antigens [48]. In this study, blood samples were collected by FTA® cards. Very good results (concordance above 97%) were obtained despite varying DNA amounts in the extraction step.

Ensued at Hema-Quebec, a donor screening project involved 21 000 donors in less than 2 years [47]. A concordance of 99.6% was obtained and 55% of the discordances were resolved at the benefit of genotyping. This study also allowed evaluating the impact of implementation of blood group genotyping in routine laboratory [49].

3.2.4. HIFI Blood 96™

HIFI Blood 96™ is an emerging blood genotyping technique developed on the AXO Science HIFI assay platform which takes

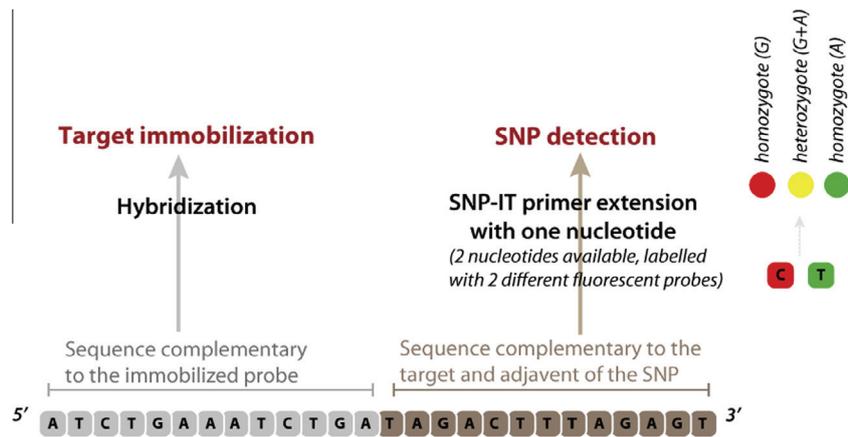


Fig. 5. Principle of Genome Lab SNP Stream assay.

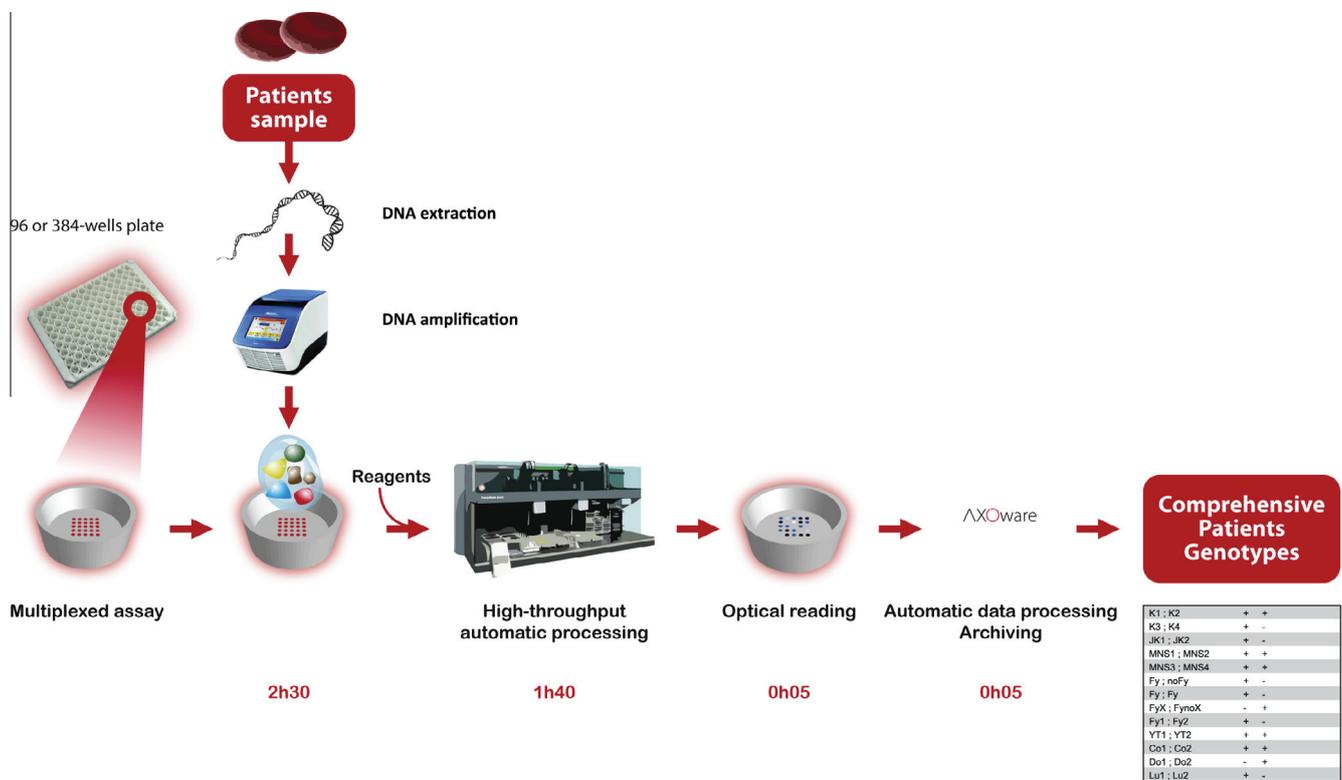


Fig. 6. Principle of the HIFI Blood 96™.

advantage of the HIFI technology for the assembly of microarrays with standard 96-, 384- and 1536-well plate (<http://www.axoscience.com>). It associates fully automated steps from extraction to multiplex PCR, hybridization and reading. This is the first system on the market with real high-throughput capabilities.

The format of the test is based on classical 96- or 384-well plates with each well bottom modified with an array of probe oligonucleotides (Fig. 6). Each array is composed of 16 probes and three controls and allows the identification of eight genotypes concomitantly.

The whole blood samples are first processed through an automated DNA extraction and then amplified using biotinylated gene specific primers. Without any pre-treatment or purification step, the PCR products are hybridized on the HIFI platform and labeled to produce stained positive spots which are directly detected and quantified using optical imaging. Images of each well are then *in silico* processed to produce scores useful for the sorting of the sample according to their genotypes.

Two multiplex PCR were developed, allowing the identification of 22 blood group antigens ($KEL^{*}01/02$, $KEL^{*}03/04$; $JK^{*}01/02$; $FY^{*}01/02$; $MNS^{*}01/02$, $MNS^{*}03/04$; $YT^{*}01/02$; $CO^{*}01/02$; $DO^{*}01/02$; $LU^{*}01/02$; $JO(a+)(a-)$; $HY+/-$), and also two variants which belong to the Duffy system ($FY^{*}Fy$ and $FY^{*}X$). The molecular biology developments and validation of the platform were partially performed in collaboration with the *Etablissement Français du Sang* [50] and very good correlations (between 97% and 100%) with other genotyping and phenotyping assays were found. The *HIFI Blood 96™*, which is taking 4 h30 to generate 96 genotypes from whole blood, is currently under CE marking process.

4. Conclusion

As highlighted in this review, the integration of molecular biology techniques with microarray or biochip systems was the main

Table 2
Benefits and implementations of DNA-based assays for blood group typing.

<i>Typing for a patient</i>	
To identify a fetus at risk for HDFN	
When serologic reagents are not available, or weakly reactive	
When antigen is weakly expressed	
In recently transfused patients	
In multi-transfused patients	
To distinguish alloantibodies from autoantibodies	
To determine zygosity, especially for <i>RHD</i>	
To identify Rh variants	
When RBCs are coated with Immunoglobulin	
To detect silencing genes or genes responsible of a weakly expressed antigen	
<i>Typing for a donor</i>	
When serologic reagents are not available, or weakly reactive	
When antigen is weakly expressed	
To screen for antigen-negative donors	
To detect silencing genes or genes responsible of a weakly expressed antigen	
<i>Other applications</i>	
High-throughput and high-content	
Can be fully automated (depending on the platform used), sometimes from DNA extraction until results acquisition	
To resolve reagent discrepancies	
Data entry in a donor/patient database	

milestone leading to the achievement of really multiplex and high-throughput analytical tools based on DNA biosensing. Applied to the highly complex blood group genotyping field in clinical laboratory, these systems prove their capabilities and performances. Indeed, the knowledge of molecular bases of most of the 33 blood group systems [2] allows the implementation of molecular testing in classical molecular biology conditions. Furthermore, the use of multiplex PCR together with microarray or biochip systems, allowing the multiplex identification of PCR products, permitted the transfer of these laboratory techniques to clinical laboratory facilities.

It is assumed that high-throughput blood group genotyping using such biochip platforms will replace serological techniques in a near future. This change will only be accompanied by the emerging of a platform being cost-effective and easy to implement in clinical environment [51].

Finally, these new tools can override most of the technical and clinical limitations of serology (see Table 2) and one of the most important advances will here be the increasing of antigen-negative blood inventories, then overstepping a new milestone in safety and transfusion practices [9].

References

- [1] L. Logdberg, M.E. Reid, R.E. Lamont, T. Zelinski, *Transfus. Med. Rev.* 19 (2005) 45–57.
- [2] L. Logdberg, M.E. Reid, T. Zelinski, *Transfus. Med. Rev.* 25 (2011) 36–46.
- [3] M.E. Reid, *Program* (2009) 171–177.
- [4] C.M. Westhoff, *Curr. Opin. Hematol.* 13 (2006) 471–475.
- [5] M.E. Reid, M. Rios, V.I. Powell, D. Charles-Pierre, V. Malavade, *Transfusion* 40 (2000) 48–53.
- [6] L. Castilho, M. Rios, C. Bianco, J. Pellegrino Jr., F.L. Alberto, S.T. Saad, F.F. Costa, *Transfusion* 42 (2002) 232–238.
- [7] C.M. Westhoff, *Immunohematology* 21 (2005) 155–163.
- [8] L. Castilho, *Transfusion* 47 (2007). 285–315.
- [9] M.E. Reid, *Transfusion* 47 (2007). 105–165.
- [10] J.R. Storry, M.L. Olsson, *Br. J. Haematol.* 126 (2004) 759–771.
- [11] M.E. Reid, *Immunohematology* 24 (2008) 166–169.
- [12] Y. Fukumori, S. Ohnoki, H. Shibata, H. Yamaguchi, H. Nishimukai, *Int. J. Legal Med.* 107 (1995) 179–182.
- [13] W. Haak, J. Burger, K.W. Alt, *Anthropol. Anz.* 62 (2004) 397–410.
- [14] N.A. Mifsud, A.P. Haddad, J.A. Condon, R.L. Sparrow, *Immunohematology* 12 (1996) 143–148.
- [15] H. Nishimukai, Y. Fukumori, T. Okura, I. Yuasa, T. Shinomiya, S. Ohnoki, H. Shibata, U. Vogt, *Int. J. Legal Med.* 109 (1996) 90–93.
- [16] Z. Tun, K. Honda, M. Nakatome, M.N. Islam, H. Bai, Y. Ogura, H. Kuroki, M. Yamazaki, M. Terada, C. Wakasugi, *J. Forensic Sci.* 41 (1996) 1027–1030.
- [17] S. Ameno, K. Ameno, H. Kinoshita, N. Tanaka, I. Ijiri, *Int. J. Legal Med.* 110 (1997) 232–234.
- [18] J.M. Moulds, B.J. Thomas, O. Doumbo, D.A. Diallo, K.E. Lyke, C.V. Plowe, J.A. Rowe, D.J. Birmingham, *Transfusion* 44 (2004) 164–169.
- [19] F. Bauduer, M. Touinssi, A. Degioanni, S. Leroux, O. Dutour, L. Ducout, P. De Micco, J. Chiaroni, *Am. J. Hum. Biol.* 16 (2004) 78–81.
- [20] C. Gassner, R.L. Kraus, T. Dovic, S. Kilga-Nogler, I. Utz, T.H. Mueller, F. Schunter, D. Schoenitzer, *Immunohematology* 16 (2000) 61–67.
- [21] M.L. Olsson, C. Hansson, N.D. Avent, I.E. Akesson, C.A. Green, G.L. Daniels, *Transfusion* 38 (1998) 168–173.
- [22] B. Faas, S. Simsek, P. Bleeker, M. Overbeeke, H. Cuijpers, A. von dem Borne, C. van der Schoot, *Blood* 85 (1995) 829–832.
- [23] C. Gassner, A. Schmarda, S. Kilga-Nogler, B. Jenny-Feldkircher, E. Rainer, T.H. Muller, F.F. Wagner, W.A. Flegel, D. Schonitzer, *Transfusion* 37 (1997) 1020–1026.
- [24] B. Hosseini-Maaf, A. Hellberg, M.A. Chester, M.L. Olsson, *Transfusion* 47 (2007) 2110–2125.
- [25] M. Prager, *Transfusion* 47 (2007). 54S–59S.
- [26] C. Jungbauer, C.M. Hobel, D.W.M. Schwartz, W.R. Mayr, *Vox Sanguinis* 102 (2012) 234–242.
- [27] M. Kengkate, P. Butthep, P. Kupatawintu, S. Kanunthong, W. Chantratita, O. Nathalang, *Transfus. Med.* 22 (2012) 272–276.
- [28] F.F. Wagner, R. Bittner, E.K. Petershofen, A. Doescher, T.H. Müller, *Transfusion* 48 (2008) 1169–1173.
- [29] M.C. Novaretti, A.S. Ruiz, P.E. Dorlhiac-Llacer, D.A. Chamone, *Immunohematology* 26 (2010) 66–70.
- [30] T.N. Sousa, B.A.M. Sanchez, I.P. Cerávoló, L.H. Carvalho, C.F.A. Brito, *Vox Sanguinis* 92 (2007) 373–380.
- [31] J. Atamaniuk, K.M. Stuhlmeier, A. Karimi, M.M. Mueller, *J. Clin. Lab. Anal.* 23 (2009) 24–28.
- [32] H. Ansart-Pirenne, S. Martin-Blanc, P.Y. Le Pennec, P. Rouger, J.P. Cartron, C. Tournamille, *Vox Sanguinis* 92 (2007) 142–147.
- [33] R.J. Colinas, R. Bellisario, K.A. Pass, *Clin. Chem.* 46 (2000) 996–998.
- [34] F. Drago, K. Karpasitou, F. Poli, *Transfus. Med. Hemother.* 36 (2009) 157–160.
- [35] K. Hopp, K. Weber, D. Bellissimo, S.T. Johnson, B. Pietz, *Transfusion* 50 (2010) 40–46.
- [36] P. Palacajornsuk, C. Halter, V. Isakova, M. Tarnawski, J. Farmar, M.E. Reid, A. Chaudhuri, *Transfusion* 49 (2009) 740–749.
- [37] J. Di Cristofaro, M. Silvy, J. Chiaroni, P. Bailly, *J. Mol. Diagn.* 12 (2010) 453–460.
- [38] C. Gassner, S. Meyer, B.M. Frey, C. Vollmert, *Transfus. Med. Rev.* 27 (2013) 2–9.
- [39] S.H.W. Beiboer, T. Wieringa Jelsma, P.A. Maaskant Van Wijk, C.E. Van Der Schoot, R. Van Zwieten, D. Roos, J.T. Den Dunnen, M. De Haas, *Transfusion* 45 (2005) 667–679.
- [40] S. Kappler-Gratias, T. Peyrard, M. Beolet, P. Rouger, P.Y. Le Pennec, B.N. Pham, *Vox Sanguinis* 99 (2010) 374.
- [41] S. Kappler-Gratias, T. Peyrard, P. Rouger, P.Y. Le Pennec, B.N. Pham, *Transfus. Clin. Biol.* 17 (2010) 165–167.
- [42] G. Hashmi, T. Shariff, M. Seul, P. Vissavajhala, K. Hue-Roye, D. Charles-Pierre, C. Lomas-Francis, A. Chaudhuri, M.E. Reid, *Transfusion* 45 (2005) 680–688.
- [43] G. Hashmi, T. Shariff, Y. Zhang, J. Cristobal, C. Chau, M. Seul, P. Vissavajhala, C. Baldwin, K. Hue-Roye, D. Charles-Pierre, C. Lomas-Francis, M.E. Reid, *Transfusion* 47 (2007) 736–747.
- [44] G.A.S. Guelsin, A.M. Sell, L. Castilho, V.L. Masaki, F.C. Melo, M.N. Hashimoto, T.T. Higa, L.S. Hirle, J.E.L. Visentainer, *J. Clin. Lab. Anal.* 24 (2010) 311–316.
- [45] P.A. Bell, S. Chaturvedi, C.A. Gelfand, C.Y. Huang, M. Kochersperger, R. Kopla, F. Modica, M. Pohl, S. Varde, R.B. Zhao, X.J. Zhao, M.T. Boyce-Jacino, *BioTechniques* (2002) 70.
- [46] G.A. Denomme, M. Van Oene, *Transfusion* 45 (2005) 660–666.
- [47] M. St-Louis, J. Perreault, J. Lavoie, J. Émond, J. St-Laurent, A. Long, M. Richard, *Transfus. Clin. Biol.* 17 (2010) 242–248.
- [48] A. Montpetit, M.S. Phillips, I. Mongrain, R. Lemieux, M. St-Louis, *Transfusion* 46 (2006) 841–848.
- [49] J. Perreault, J. Lavoie, P. Painchaud, M. Cote, J. Constanzo-Yanez, R. Cote, G. Delage, F. Gendron, S. Dubuc, B. Caron, R. Lemieux, M. St-Louis, *Vox Sanguinis* 97 (2009) 61–68.
- [50] S.A. Boccoz, P. Bailly, J.C. Bres, D. Rigal, L.J. Blum, C.A. Marquette, *Vox Sanguinis* 105 (2013).
- [51] B. Veldhuisen, C.E. Van Der Schoot, M. De Haas, *Vox Sanguinis* 97 (2009) 198–206.

About the Authors



Stephanie Boccoz

Stephanie Boccoz is a PhD Researcher at the Molecular and Biomolecular Chemistry and Biochemistry Institute (ICBMS, UMR5246, CNRS-Université Lyon1). Her work within the Biochip group aims at designing multiplexed PCR for diagnostic. She also contributes to develop the PCR for AXO Science, a company specialized in Red Blood Cell genotyping.



Gaelle Le Goff

After graduating from the Ecole Normale Supérieure (Lyon, France), Gaelle Le Goff received her PhD in Chemistry in 2011 from the Université Claude Bernard (Lyon, France) where she developed a microarray tool for blood group genotyping. Her areas of interest focus on biosensors for healthcare, diagnostics and drug development. She is currently a postdoctoral fellow at Novartis Institute for Biomedical Research and Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, USA).



Christophe Marquette

Christophe Marquette is Permanent Research Director at the Molecular and Biomolecular Chemistry and Biochemistry Institute (ICBMS, UMR5246, CNRS-Université Lyon1) and is in charge of the development of optical biochips and micro-arrays based on electrochemical luminescent reactions. He is also the R&D scientific director of AXO Science.

Chapter 10

Multiplex assays for blood group genotyping

Stephanie Boccoz,
Gaelle Le Goff &
Christophe Marquette

Limitations of serology	4
Polymerase chain reaction	5
High-throughput platforms dedicated to blood group genotyping	7
Benefits of the implementation of DNA-based methods for blood group genotyping	13

doi:10.4155/fseb2013.13.73

At present, 33 blood groups representing over 300 antigens are listed by the International Society of Blood Transfusion (ISBT). Most of them result from a single-nucleotide polymorphism (SNP) in the corresponding DNA sequence, in other words, approximately 200 SNPs. In immunohematology laboratories, blood group determination is classically carried out by serological ligand-binding assays, but these have some limitations, mostly in terms of multiplexing and throughput. To prevent transfusion accidents, the need for extended blood group typing is growing. The knowledge of the molecular bases of blood groups allows the use of molecular biology methods and numerous assays focused on blood group genotyping were developed and described during the last 10 years. Most of the time, PCR is associated with a ligand-binding step (DNA Biosensor, biochip or other microarray systems). There are several companies that developed platforms dedicated to blood group genotyping able to analyze simultaneously various SNPs or variants associated with blood group systems.

Limitations of serology

Today, 33 blood group systems representing over 300 antigens are listed by the ISBT. Most of them have been cloned and sequenced [1,2] which means that the molecular bases of these blood group systems are known and mostly result from SNP.

Red Blood cells (RBC) carrying a particular antigen can elicit an immune response if they are introduced in someone's blood circulation who lacks this antigen. It is the antibody produced during the immune response which is problematic and is involved in donor/patient transfusion incompatibility, materno-fetal incompatibility and autoimmune hemolytic anemia. This immune response can be immediate or delayed and, in some cases, lead to death. That is the reason why antigen-negative blood is required for a safe transfusion. The method of reference for testing blood group antigens has been for decades the hemagglutination technique. However, this gold standard method has certain limitations (see **Table 10.1**), when it comes to the determination of minor or rare blood group antigens in order to fulfill perfect matching between patient and donor [3].

The knowledge of the molecular bases of most of the blood group systems allows the use of new tools such as DNA-based assays. One type of existing DNA-based assays uses DNA biosensors or microarrays (solid-phase or suspended beads arrays). They are potentially high-throughput tools allowing testing a large number of donors on a large number of antigens [3]. Moreover, they help overriding the limitations of serology, replacing the immunochemical reagents by synthetic and reproducible probes. These methods usually associate a multiplex PCR step followed by a ligand-binding

Multiplex assays for blood group genotyping

Table 10.1. Limitations of serology.

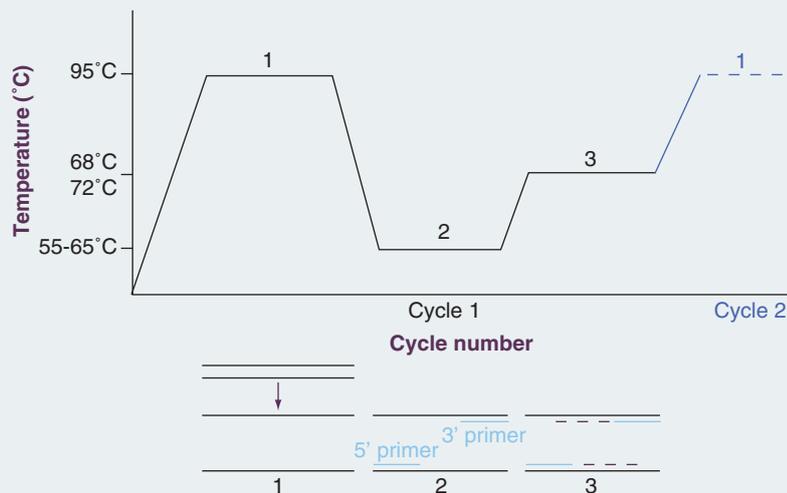
Technical limitations.

Manual data entry if not automation.
 Reagents specialized and obtained from immunized patients or mice.
 The cost of commercially licensed reagent increases.
 Many antibodies are not commercialized or weakly reactive.
 Not adapted to a high-throughput or high-content typing.

Clinical limitations.

Difficulties to phenotype a recently transfused patient or a multitransfused patient, or when RBCs are coated with IgG.
 Difficulties for the D-typing of the Rh blood group.
 When a silencing gene is involved.
 Indirect indication of the risk and severity of anemia or Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn (HDFN).

Figure 10.1 Principle and major steps of the polymerase chain reaction.



assay using with specific probes corresponding to the analyzed polymorphisms.

Polymerase chain reaction

Principle

This technique has revolutionized the field of molecular genetics, allowing the reproduction of a specific DNA sequence in an exponential way. After the isolation of DNA, the PCR reaction consists in three steps as represented on the **Figure 10.1**.

Boccoz & Marquette

- Denaturation: To dissociate the dsDNA and to obtain two simple strands. This step is usually performed at 95°C during 30 s.
- Annealing: During this step, specific primers hybridize on their complementary sequences. The classic range of temperature is 55–65°C, depending on the melting temperatures of the primers.
- Extension: Between 68 and 72°C, the DNA polymerase synthesizes strands complementary to oligonucleotides present in the reaction mix. The duration of this step depends on the length of the amplified fragment. The typical velocity of the DNA polymerase is 1 kb/min.

These three steps are repeated approximately 30-times, which result in a number of DNA copies, which increases in an exponential way. Before the beginning of the first cycle, one step of initial denaturation is usually performed to enable long fragments to dissociate, especially when genomic DNA is isolated. This step also allows the activation of the widely used hot-start DNA polymerase, which helps preventing nonspecific amplifications. In a similar way, a final extension step of 5 min is performed to finish all the loading extensions.

After the amplification, the synthesized fragments have to be analyzed and here different methods can be used, from the low-throughput agarose electrophoresis, to the medium-throughput capillary electrophoresis and finally the high-throughput microarrays systems. It is interesting to note that going from low- to high-throughput is linked to the use of biosensor- or biochip-like systems.

Multiplex PCR

This technique allows the analysis of several SNPs or regions of interest in the same reaction, unlike Allele-Specific- or Single-Specific-Primer-PCR, using multiple primer pairs. Number of reactions, time and quantity of reagents used are then drastically reduced.

The main problem in multiplex PCR is the degree of multiplexing. Indeed, increasing the number of primers promotes the emergence of nonspecific hybridizations. Optimization of multiplex PCR can then be fastidious mostly because annealing temperatures of all primers must be similar.

In general, multiplex PCR products are visualized by agarose gel or capillary electrophoresis, and discriminated according to their sizes. In 2012, Jungbauer *et al.* published an article in which they developed a multiplex PCR to genotype 35 RBC antigens [4]. It consists of six different reactions, each with five to seven primer pairs. At least one allele-specific primer is used in each primer pair. PCR products are analyzed by agarose gel electrophoresis and differentiated by their sizes. Sixteen people per 96-well plate can then be

Multiplex assays for blood group genotyping

genotyped for 35 antigens. For all samples and markers tested, a 100% concordance was found between determined genotypes and phenotypes (from 1 to 469 samples were tested for each antigen). The group also compared the cost of classical serological typing (35 to 39 per donor for 20 minor RBC antigens) with their own genotyping approach (15 per donor for 35 RBC antigens). Thus, for 1 minor RBC antigen, serological typing would cost between 1.75 and 1.90 (automated vs manual), and genotyping around 0.43.

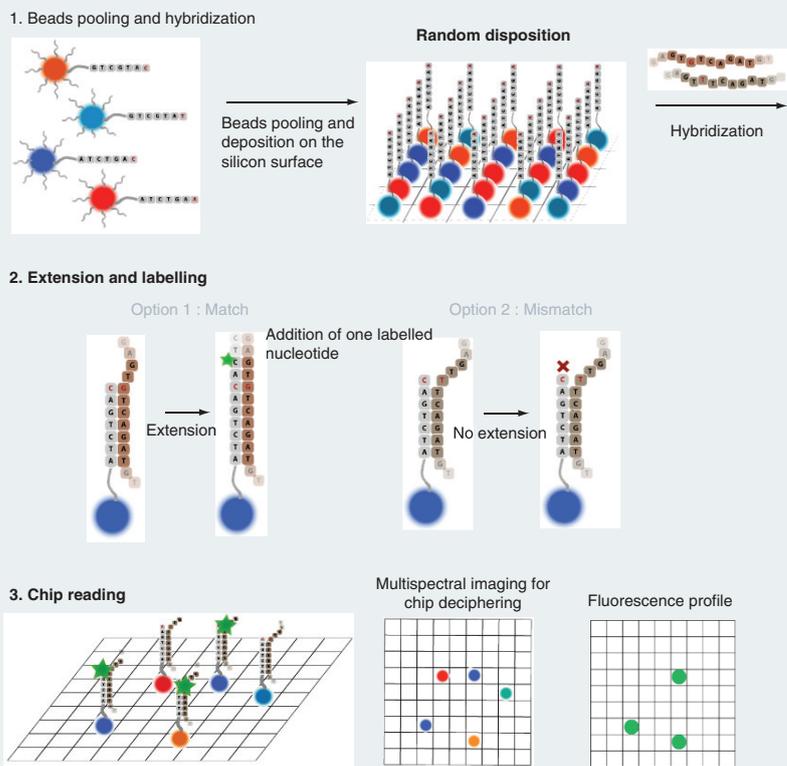
This is one of many studies showing the relevance of genotyping compared with serology, from the standpoint of the cost, the throughput, and the fact that there are only approximately 20 minors RBC antigens for which serological reagents are available on a regular basis [4]. Kengkate *et al.* used this same technique to genotype HPA-1 to -7 and -15 in Thai population [5] and Wagner also used it to screen blood donors with rare phenotypes [6].

High-throughput platforms dedicated to blood group genotyping BLOODChip®

The BLOODChip® system is dedicated to extended blood group genotyping and is commercialized by Progenika [7]. It has been developed as a part of the European collaborative project BloodGen (2003–2006) which associated two blood banks (Barcelona and Prague) with two British academic research institutes (University of the West of England, Bristol Institute for Transfusion), the Sanquin (Netherlands), the universities of Ulm (Germany) and Lund (Sweden). The consortium also included two industrial partners: Progenika Biopharma SA (Spain), and Biotest (Germany) in charge of the integration on an existing SNP analysis platform. In version 2.0, which is CE marked, BLOODChip® allows the analysis of 128 SNPs associated with nine blood group systems and some platelet antigens.

Target sequences are amplified from genomic DNA through a multiplex PCR by hybridization of amplifiable probes, developed by Beiboer *et al.* [8]. Extracted DNA is mixed with a set of primers specific of the targeted polymorphisms. If the target sequence is present in the sample, the primers hybridize on genomic DNA. A washing step allows to isolate hybridized fragments and to amplify them. PCR products are then marked with two fluorophores, fragmented and hybridized on the BLOODChip® array under stringent conditions. The chip is composed of a glass slide modified by an immobilized matrix of specific probes on which targets hybridize. Once hybridized, the chip is scanned with a fluorescence microscope and obtained signals are analyzed through a dedicated single software program to determine the different scores associated with the different alleles which allow the determination of the genotypes. Five hours after DNA extraction are required to achieve the results.

Figure 10.2 Principle of HEA BeadChip™ assay.



After clinical tests at a small scale on panels of rare donors in Spain, Germany, Czech Republic and Sweden, a validation on 3000 donors was performed and used to obtain the CE marking of the system. When compared with serology and other molecular typing methods, the results obtained by the authors highlighted an excellent performance of BLOODChip® v2.0 for an extended blood group genotyping.

HEA BeadChip™

Developed by BioArray Solutions Ltd. (held by Immucor Inc.), HEA BeadChip™ offers an extended genotyping solution for 11 blood groups and a panel of platelet antigens [9]. This product was approved by the US FDA and obtained CE marking in July 2010. It has been evaluated on four hospital sites for the implementation of extended genotyping in routine [10,11].

It is a hybridization test on a matrix of beads (Figure 10.2). Micro-beads (3µm of diameter) with carboxylic acid groups are functionalized with probe

Multiplex assays for blood group genotyping

oligonucleotides modified with an amino arm (20 bases). Each bead carries about 50 copies of a unique probe, which 3' end is specific to a target polymorphism. The different beads in suspension are collected (4000 beads) and coated on a silicon support where they form a monolayer. These silicon matrices are individualized and assembled on a glass slide. Two formats are available: 8×1 and 8×12 , allowing testing several samples in parallel. Each bead has an optical encoding which allows its identification by spectral imagery and to deduce the sequence of the probe presents on its surface. From this stand point the technique is similar to the Luminex technology based ones.

After genomic DNA extraction, sequences with target polymorphisms are amplified using a multiplex PCR. The mixture of PCR products is then purified, denatured, hybridized on beads and fluorescently labeled using two strands specific enzymatic elongation. This step can be realized only with a perfect match between target and probe. The incorporation of a labeled nucleotide specifically labels the two strands. Genotypes are obtained through the comparison of fluorescence intensities between the two alleles of interest and a panel of reference values.

Main published validation studies of HEA BeadChip™ have been performed in collaboration with Marion Reid's team at the Immunohematology laboratory (New York Blood Center) [12,13]. In 2007, the team presented results of a study led on 2355 patients belonging to multiple ethnic groups, for the analysis of 24 blood group antigens and a panel of platelet antigens, with 99.5% of concordance compared with serological results.

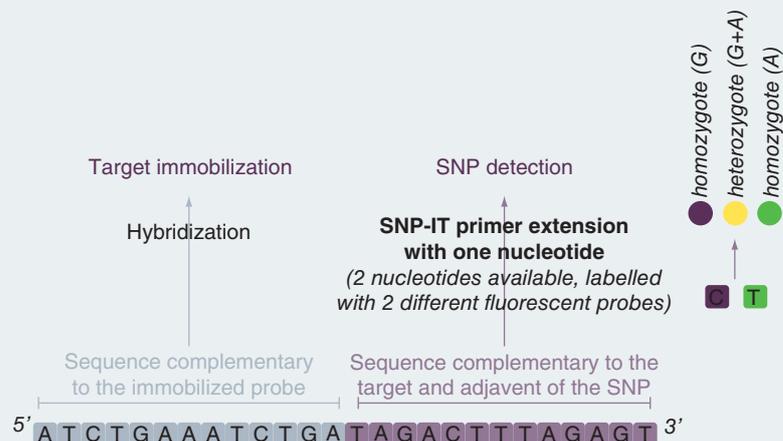
HEA BeadChip™ test (version 1.2) has been also implemented by Kappler-Gratias *et al.* [10,11] for the evaluation of molecular methods in the characterization of erythrocytes used as reagent on the Laboratory and French National Reference Panel. The genotyping test has allowed analyzing 34 antigens involved in 11 blood group systems for a panel of 365 donors. Comparison of the predicted phenotype by genotyping results and serological phenotype for 25 of these antigens showed a concordance of 99.95%.

Brazilian teams have also reported the use of HEA BeadChip™ as a reference technique in a study evaluating the impact of extended molecular typing for the monitoring of multitransfused patient panel [14] and for the monitoring of sickle cell patients [15].

Genome Lab SNP Stream

Genome Lab SNP Stream platform, commercialized by Beckman Coulter, use the SNPstream® UHT, developed by Orchid BioScience for ultra high-throughput genotyping in pharmacogenomics and in the drug screening [16]. It associates amplification by multiplex PCR with a fluorescent labeling step

Figure 10.3 Principle of Genome Lab SNP Stream assay.



obtained by elongation, followed by hybridization on a chip. Canadian teams of Gregory Denomme (Toronto) and Maryse St-Louis (Quebec) developed the molecular biology tools required for the transfer of this technology to extended blood group genotyping [17,18].

The format of the chip is a conventional 384-well plate, with the same matrix of probes in each well, allowing then to test 384 samples in parallel. Oligonucleotides are covalently bound to a glass support activated by 3-mercaptopropyl-trimethoxysilan (MPTS). Then, the application of a neoprene mask allows individualizing 384 wells. Each matrix includes 16 probes: four are controls (positive and negative) and the other 12 correspond to the studied SNPs.

Each test allows the detection of two nucleotides among the four possible at the SNP position. For each studied SNP, a fragment SNP-IT is used and constructed as follows: 3'-end sequence of the fragment is complementary to one of the probes fixed in the bottom of the well and 5'-end sequence of the fragment is complementary to the target and immediately adjacent to the SNP.

The first step consists of a multiplex PCR to amplify specific sequences of targeted polymorphisms on the extracted DNA (Figure 10.3). Amplicons are mixed with SNP-IT fragments with which they specifically interact. Then a one-base enzymatic elongation is performed in presence of the two labeled nucleotides, one by BODIPY-fluorescein and the other by TAMRA (Carboxyethylmethylrodhamine). According to the base present on the target at the SNP site, the elongation will incorporate one or the other fluorophores. The reaction mixture is incubated on the chip and the 5'-end of the fragment

Multiplex assays for blood group genotyping

hybridizes with its complementary probe. A plate reader enables to read the fluorescence intensity for each probe on each spot and to deduce the genotype.

In 2005, Denomme *et al.* [17] reported the analysis of 372 samples for 12 SNPs associated with RH, MNS, KEL, FY, JK, DI blood group systems and one platelet antigen, with a concordance above 98% for 11 of the 12 parameters.

Maryse St-Louis's team of Hema-Quebec was also interested in the development of this technology. In 2006, a study of Montpetit *et al.* focuses on the analysis of 22 minor blood group antigens (RHCE, KEL, FY, JK, MNS) and three platelet antigens [19]. In this study, blood samples were collected by FTA© cards. Very good results (concordance above 97%) were obtained despite varying DNA amounts in the extraction step.

Ensued at Hema-Quebec, a donor screening project involved 21,000 donors in less than 2 years [18]. A concordance of 99.6% was obtained and 55% of the discordances were resolved at the benefit of genotyping. This study also allowed evaluating the impact of implementation of blood group genotyping in routine laboratory [20].

HIFI Blood 96™

HIFI Blood 96™ is an emerging blood genotyping technique developed on the AXO Science HIFI assay platform [21], which takes advantage of the HIFI technology for the assembly of microarrays with standard 96-, 384- and 1536-well plate. It associates fully automated steps from extraction to multiplex PCR, hybridization and reading. This is the first system on the market with real high-throughput capabilities.

The format of the test is based on classical 96- or 384-well plates with each well bottom modified with an array of probe oligonucleotides (Figure 10.4). Each array is composed of 16 probes and three controls and allows the identification of eight genotypes concomitantly.

The whole blood samples are first processed through an automated DNA extraction and then amplified using biotinylated gene specific primers. Without any pretreatment or purification step, the PCR products are hybridized on the HIFI platform and labeled to produce stained positive spots which are directly detected and quantified using optical imaging. Images of each well are then *in silico* processed to produce scores useful for the sorting of the sample according to their genotypes.

Two multiplex PCR were developed, allowing the identification of 22 blood group antigens (*KEL*01/*02*, *KEL*03/*04*; *JK*01/*02*; *FY*01/*02*; *MNS*01/*02*, *MNS*03/*04*; *YT*01/*02*; *CO*01/*02*; *DO*01/*02*; *LU*01/*02*; *JO(a+)/(a-)*; *HY + /-*), and also two variants which belong to the Duffy

Figure 10.4 Principle of the HIFI Blood 96™.

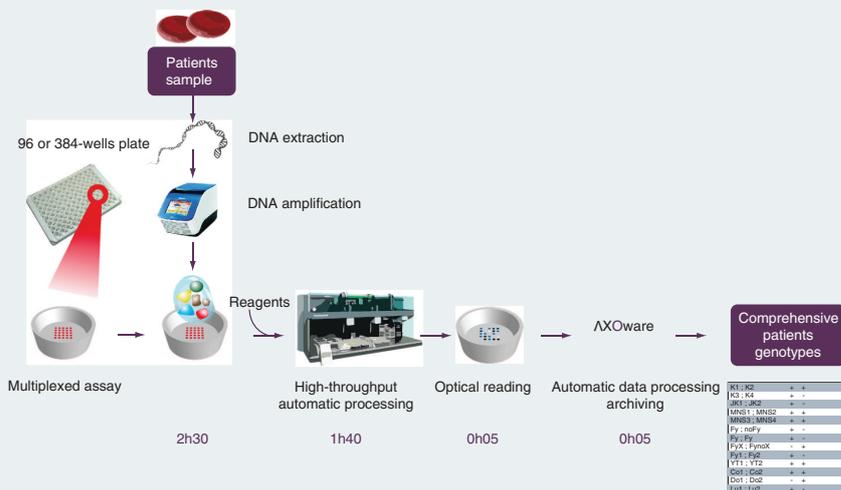


Table 10.2. Benefits and implementations of DNA-based assays for blood group typing.

Typing for a patient.

- To identify a fetus at risk for HDFN.
- When serologic reagents are not available, or weakly reactive.
- When antigen is weakly expressed.
- In recently transfused patients.
- In multitransfused patients.
- To distinguish alloantibodies from autoantibodies.
- To determine zygosity, especially for *RHD*.
- To identify Rh variants.
- When RBCs are coated with Immunoglobulin.
- To detect silencing genes or genes responsible of a weakly expressed antigen

Typing for a donor.

- When serologic reagents are not available, or weakly reactive.
- When antigen is weakly expressed.
- To screen for antigen-negative donors.
- To detect silencing genes or genes responsible of a weakly expressed antigen

Other applications.

- High-throughput and high-content.
- Can be fully automated (depending on the platform used), sometimes from DNA extraction until results acquisition.
- To resolve reagent discrepancies.
- Data entry in a donor/patient database

Multiplex assays for blood group genotyping

system (*FY*Fy and FY*X*). The molecular biology developments and validation of the platform were partially performed in collaboration with the Etablissement Français du Sang [22] and very good correlations (between 97 and 100%) with other genotyping and phenotyping assays were found. The *HIFI Blood 96TM*, which takes 4 h 30 to generate 96 genotypes from whole blood, is currently under CE marking process

Benefits of the implementation of DNA-based methods for blood group genotyping

As highlighted in this chapter, the integration of molecular biology techniques with microarray or biochip systems was the main milestone leading to the achievement of really multiplex and high-throughput analytical tools based on DNA biosensing. Applied to the highly complex blood group genotyping field in clinical laboratory, these systems prove their capabilities and performances. Indeed, the knowledge of molecular bases of most of the 33 blood group systems [2] allows the implementation of molecular testing in classical molecular biology conditions. Furthermore, the use of multiplex PCR together with microarray or biochip systems, allowing the multiplex identification of PCR products, permitted the transfer of these laboratory techniques to clinical laboratory facilities.

It is assumed that high-throughput blood group genotyping using such biochip platforms will complete serological tests and maybe replace them in a near future. This change will only be accompanied by the emerging of a platform being cost-effective and easy to implement in clinical environment [23].

Finally, these new tools can override most of the technical and clinical limitations of serology (see **Table 10.2**) and one of the most important advances will be here the increasing of antigen-negative blood inventories, then overstepping a new milestone in safety and transfusion practices [24].

However, there are blood group systems where serology is more relevant than genotyping. This is the case for ABO blood group and *RHD* gene. Indeed, too many SNPs have to be analyzed to cover all the corresponding phenotypes and serology has proven to be sufficiently accurate and fast to avoid genetic analysis.

Financial & competing interests disclosure

The authors are employed by AXO Science, a company specialized in Red Blood Cell genotyping. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Boccoz & Marquette

Multiplex assays for blood group genotyping

Summary

- The method of reference for testing blood group antigens has been for decades the hemagglutination ligand-binding assay. However, this gold standard method has certain limitations when it comes to the determination of minor or rare blood group antigens in order to fulfill perfect matching between patient and donor.
- Red Blood Cells carrying a particular antigen can elicit an immune response if they are introduced in the blood circulation of someone who lacks this antigen. It is the antibody produced during the immune response which is problematic and is involved in donor/patient transfusion incompatibility, materno–fetal incompatibility and autoimmune hemolytic anemia. This immune response can be immediate or delayed and, in some cases, lead to death.
- The knowledge of molecular bases of most of the 33 blood group systems allows the implementation of molecular testing in classical molecular biology conditions.
- It is assumed that high-throughput blood group genotyping using biochip platforms will complete serological tests and maybe replace them in a near future. This change will only be accompanied by the emerging of a platform being cost-effective and easy to implement in clinical environment.
- These new tools can override most of the technical and clinical limitations of serology and one of the most important advances will be the increasing of antigen-negative blood inventories, then overstepping a new milestone in safety and transfusion practices.

Key terms

Blood group system:	a classification of blood based on the presence or absence of inherited antigenic substances on the surface of Red Blood Cells.
Multiplex:	characterize a test that can identify several parameters in a single experiment.
DNA Microarray:	a collection of microscopic DNA spots attached to a solid surface. Used to measure the expression levels of large number of genes simultaneously or to genotype multiple regions of a genome.
Polymerase Chain Reaction:	a molecular biology amplification technique used to replicate few DNA copies. Amplification factor is usually one to one million.

References

1. Logdberg L, Reid ME, Lamont RE, Zelinski T. Human blood group genes 2004: chromosomal locations and cloning strategies. *Transfus. Med. Rev.* 19(1), 45–57 (2005).
2. Logdberg L, Reid ME, Zelinski T. Human Blood Group Genes 2010: chromosomal locations and cloning strategies revisited. *Transfus. Med. Rev.* 25(1), 36–46 (2011).
3. Reid ME. Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Prog.* 171–177 (2009).
4. Jungbauer C, Hobel CM, Schwartz DWM, Mayr WR. High-throughput multiplex PCR genotyping for 35 red blood cell antigens in blood donors. *Vox Sang.* 23(3), 234–242 (2012).

Boccoz & Marquette

5. Kengkate M, Butthep P, Kupatawintu P, Kanunthong S, Chantratita W, Nathalang O. Genotyping of HPA-1 to -7 and -15 in the Thai population using multiplex PCR. *Transfus. Med.* 22(4), 272–276 (2012).
6. Wagner FF, Bittner R, Petershofen EK, Doescher A, Müller TH. Cost-efficient sequence-specific priming–polymerase chain reaction screening for blood donors with rare phenotypes. *Transfusion* 48(6), 1169–1173 (2008).
7. www.progenika.com
8. Beiboer SHW, Wieringa-Jelsma T, Maaskant-Van Wijk PA *et al.* Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *Transfusion* 45(5), 667–679 (2005).
9. www.immucor.com/bioarray
10. Kappler-Gratias S, Peyrard T, Beolet M, Rouger P, Le Pennec PY, Pham BN. Blood group genotyping by high-throughput DNA-analysis applied to 356 Reagent Red blood cell samples. *Vox. Sang.* 99, 374–374 (2010).
11. Kappler-Gratias S, Peyrard T, Rouger P, LE Pennec PY, Pham BN. Blood group genotyping by high-throughput DNA analysis: application to the French panel of RBC reagents. *Transfus. Clin. Biol.* 17(3), 165–167 (2010).
12. Hashmi G, Shariff T, Seul M *et al.* A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion* 45(5), 680–688 (2005).
13. Hashmi G, Shariff T, Zhang Y *et al.* Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion* 47(4), 736–747 (2007).
14. Guelsin GAS, Sell AM, Castilho L *et al.* Benefits of Blood Group Genotyping in Multi-Transfused Patients from the South of Brazil. *J. Clin. Lab. Anal.* 24(5), 311–316 (2010).
15. Castilho L, Rios M, Bianco C *et al.* DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion* 42(2), 232–238 (2002).
16. Bell PA, Chaturvedi S, Gelfand CA *et al.* SNPstream (R) UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery. *Biotechniques* 70, 76–77 (2002).
17. Denomme GA, Van Oene M. High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion* 45(5), 660–666 (2005).
18. St-Louis M, Perreault J, Lavoie J *et al.* Génotypage de 21 000 donneurs de sang au Québec et analyse du RHD. *Transfus. Clin. Biol.* 17(4), 242–248 (2010).
19. Montpetit A, Phillips MS, Mongrain I, Lemieux R, St-Louis M. High-throughput molecular profiling of blood donors for minor red blood cell and platelet antigens. *Transfusion* 46(5), 841–848 (2006).
20. Perreault J, Lavoie J, Painchaud P *et al.* Set-up and routine use of a database of 10 555 genotyped blood donors to facilitate the screening of compatible blood components for alloimmunized patients. *Vox. Sang.* 97(1), 61–68 (2009).
21. www.axoscience.com
22. Boccoz SA, Bailly P, Bres JC, Rigal D, Blum LJ, Marquette CA. Validation of a fully automated platform for extended blood group genotyping. *Vox. Sang.* 105(60), (2013).
23. Veldhuisen B, Van Der Schoot CE, De Haas M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox. Sang.* 97(3), 198–206 (2009).
24. Reid ME. Overview of molecular methods in immunohematology. *Transfusion* 47, 105–165 (2007).



Development and Validation of a Fully Automated Platform for Extended Blood Group Genotyping



Stephanie A. Boccoz,^{*} Gaëlle C. Le Goff,[†] Céline A. Mandon,[†] Benjamin P. Corgier,[†] Loïc J. Blum,^{*} and Christophe A. Marquette^{*}

From the Institute of Chemistry and Molecular and Supramolecular Biochemistry Team Enzyme Engineering,^{*} Biomimetic Membranes and Supramolecular Assemblies, CNRS 5246 ICBMS, Université Lyon 1, Villeurbanne; and the AXO Science SAS,[†] Villeurbanne, France

Accepted for publication
September 9, 2015.

Address correspondence to
Christophe A. Marquette, R.D.,
Université Lyon 1 - CNRS
5246 ICBMS Bâtiment CPE 43,
bd du 11 novembre 1918,
69622 Villeurbanne, Cedex,
France E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr.

Thirty-five blood group systems, containing >300 antigens, are listed by the International Society of Blood Transfusion. Most of these antigens result from a single nucleotide polymorphism. Blood group typing is conventionally performed by serology. However, this technique has some limitations and cannot respond to the growing demand of blood products typed for a large number of antigens. The knowledge of the molecular basis of these red blood cell systems allowed the implementation of molecular biology methods in immunohematology laboratories. Here, we describe a blood group genotyping assay based on the use of TKL immobilization support and microarray-based *HIFI* technology that takes approximately 4 hours and 30 minutes from whole-blood samples to results analysis. Targets amplified by multiplex PCR were hybridized on the chip, and a revelation step allowed the simultaneous identification of up to 24 blood group antigens, leading to the determination of extended genotypes. Two panels of multiplex PCR were developed: Panel 1 (KEL1/2, KEL3/4; JK1/2; FY1/2; MNS1/2, MNS3/4, *FY*Fy* et *FY*X*) and Panel 2 (YT1/2; C01/2; D01/2, HY+, Jo(a+); LU1/2; DI1/2). We present the results of the evaluation of our platform on a panel of 583 and 190 blood donor samples for Panel 1 and 2, respectively. Good correlations (99% to 100%) with reference were obtained. (*J Mol Diagn* 2016, 18: 144–152; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.09.002>)

Today, 35 blood group systems are listed by the International Society of Blood Transfusion, which represent >300 antigens and 1568 alleles listed in the National Center for Biotechnology Information Blood Group Gene Mutation Database.¹ Most of them were cloned and sequenced,^{2,3} unraveling the molecular bases of these blood group systems. Most results from single nucleotide polymorphism (SNP). Red blood cells (RBCs) carrying a particular antigen may elicit an immune response if introduced in the blood circulation of a patient who lacks this antigen. It is the antibody produced during the immune response which is problematic and leads to donor/patient transfusion incompatibility, maternal-fetal incompatibility, and autoimmune hemolytic anemia. This immune response can be immediate or delayed and, in some cases, lethal. For these reasons, antigen-negative blood is required for a safe transfusion. For decades, the method of reference for testing blood group antigens was the hemagglutination technique. This is a simple and well-established technique available for

all major blood groups, with specificity, sensitivity, and security appropriate for clinical diagnostic environment. However, this gold standard method has certain limitations (immunologic reagent availability and specificity) when it comes to the determination of minor or rare blood group antigens critical to fulfill a perfect matching between patient and donor.⁴ Reagents are specialized and must be obtained from immunized patients or donors (polyclonal and monoclonal antibodies) or from immunized mice (monoclonal antibodies). Cost of immunologic reagents keeps increasing, and many antibodies are not available or weakly reactive, which is not suitable for the growing need of blood products typed for a large number of antigens. Consequently, only a relatively low number of donors are typed for larger number

Supported by departmental funding.

Disclosures: L.J.B. and C.A.M. own stock in AXO Science. Probe and primers reagents were supplied free of charge by AXO Science.

of antigens, which hinders the establishment of an antigen-negative inventory. In addition, antigen expression on the surface of the RBCs is often too weak to be detected by serology, and discrepancies in serologic activity can occur between different manufacturer's reagents.⁵ Finally, even if all of the necessary antibodies required to determine all of the blood group systems were available, the following problems would remain: i) it is difficult to type recently transfused patients,⁶ multitransfused patients such as those with sickle cell disease,⁷ or those whose RBCs are coated with IgG⁵; ii) D-typing is difficult because of the high number of antigens produced by the RHD gene⁸; iii) in some cases the phenotype does not exactly represent the genotype, because of silencing alleles, (eg, for the Duffy blood group⁹); and iv) hemagglutination only gives an indirect indication of the risk and severity of anemia or hemolytic disease of the fetus and newborn.¹⁰

The identification of the molecular bases of most of the blood group systems paved the way for DNA-based assays as typing tools. Techniques such as allele-specific PCR or sequence-specific primer PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism cannot be used routinely in laboratories because of their low throughput. However, in the past few years, several blood group genotyping platforms for SNP identification were developed⁴ and have helped to override the limitations of serology, replacing the immunochemical reagents by synthetic and reproducible probes. These methods usually associate a multiplex PCR step, followed by detection with specific probes that correspond to the analyzed polymorphisms. Indeed, two-thirds of all blood group antigens are defined by SNPs (approximately 200 SNPs).¹¹ In this situation, a technologic solution on the basis of multiplex PCR which can analyze several variables at the same time is required. A few high-throughput platforms are available, namely HEA BeadChip (BioArray Solutions Ltd., Warren, NJ),^{12,13} BLOODchip (Progenika, Medford, MA)¹⁴ and Genome Lab SNP Stream (Beckman Coulter, Brea, CA),^{15,16} but process in steps of these platforms can be sometimes fastidious, and test duration can be long (5 hours after extraction for BLOODchip platform).

To overcome these disadvantages, we developed a new platform, with high-throughput capabilities, and which take only 3.25 hours after extraction (or 4.5 hours from whole blood to extended blood group report), because of the use of a fully robotized process flow. It is an emerging blood genotyping technique that takes advantage of the *HIFI* technology for the assembly of microarrays with standard 96-, 384- and 1536-well plate.^{17,18} It associates fully automated steps from extraction to multiplex PCR, hybridization, and reading. The format of the test is based on classical 96- or 384-well plates with each well bottom modified with an array of probe oligonucleotides. Each array is composed of a probe set (16 probes associated with Panel 1 and 14 probes associated with Panel 2) and two controls.

The whole-blood samples (Figure 1) are first processed through automated DNA extraction and then amplified with

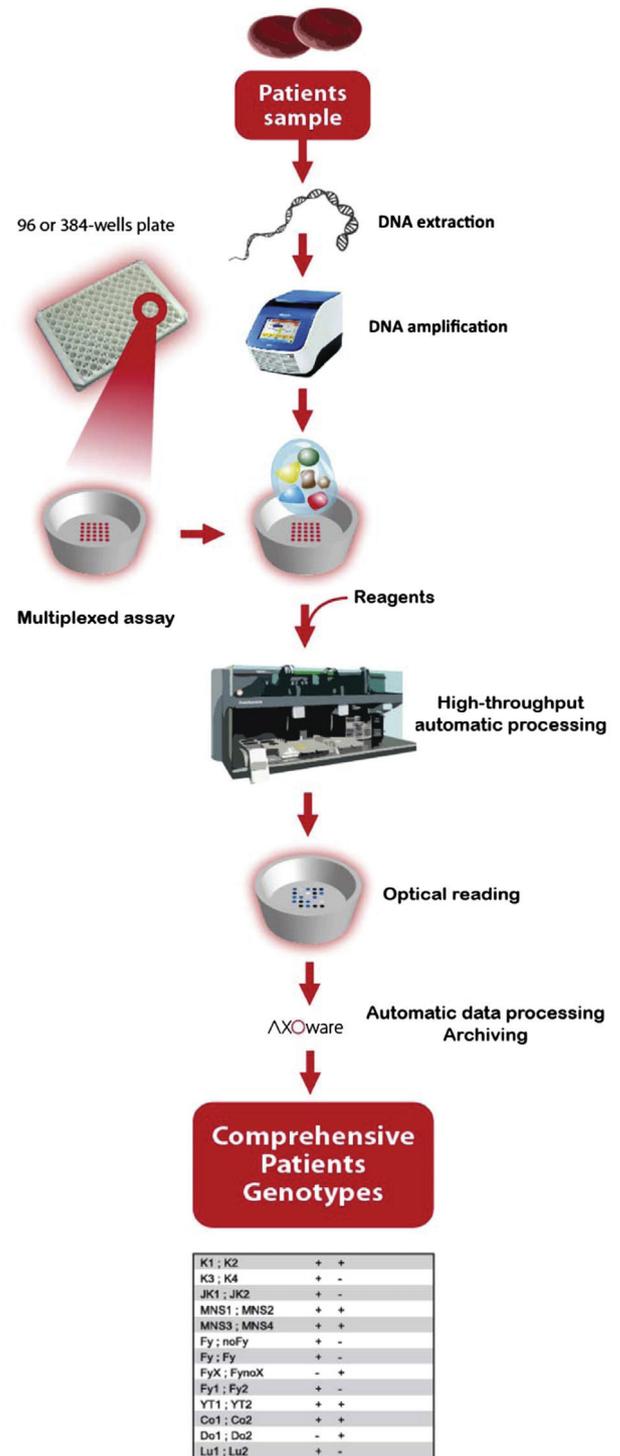


Figure 1 Principle of HIFI technology. Patient sample composed of whole blood is lysed and used for DNA extraction before multiplex amplification. Amplified DNA sequences corresponding to blood group are then hybridized on the Microwell microarray, then labeled for signal generation with the use of colorimetric imaging. Genotypes are listed in the table.

the use of biotinylated gene-specific primers. Without any pretreatment or purification step, the PCR products are then hybridized on the array and labeled to produce stained positive spots that are directly detected and quantified with

the use of optical imaging. Images of each well are then processed *in silico* to generate scores useful for the sorting of the sample according to their genotypes.

Two multiplex PCRs were developed, allowing the identification of 24 blood group antigens (Panel 1: KEL1/2, KEL3/4; JK1/2; FY1/2; MNS1/2, MNS3/4; Panel 2: YT1/2; CO1/2; DO1/2; Jo(a+); HY+; LU1/2; DII/2), and also two variants that belong to the Duffy system (Panel 1: *FY*Fy* and *FY*X*). We present here an extensive evaluation of our platform for high-throughput multiplexed blood group genotyping on a panel of 583 blood donor samples for Panel 1 and 190 blood donor samples for Panel 2, benchmarking against other commercially available genotyping assays. Good correlations (between 99% and 100%) with other genotyping techniques were found.

Materials and Methods

Probes and Primers

Synthetic oligonucleotides probes and primers [20- to 30-mers; primer mix set: HIFI Blood 96 PrimerMix_P1 HIFI Blood 96 PrimerMix_P2 Probe sets: HIFI Blood 96 Probes_P1 HIFI Blood 96 Probes_P2 (Eurogentec, Liège, Belgium)] were used. The SNP is located in the middle of the probe, and the size of PCR products is between 100 and 200 bp.

Sample Selection

Blood samples from voluntary blood donations were provided by various European blood banks with patient consent. To define P_{score} thresholds (prevalidation study), 174 whole-blood samples (EDTA anticoagulant) were used for Panel 1 (83 with plasma and 91 without plasma) and 176 for Panel 2 (91 with plasma and 85 without plasma). Samples with plasma were previously genotyped with HEA BeadChip (BioArray Solutions Ltd., Warren, NJ). IDCore+ (Grifols, Los Angeles, CA) was used for samples without plasma. For the validation of the described platform, 583 whole-blood samples (EDTA anticoagulant, without plasma) were used for Panel 1. Among these samples, 456 were previously genotyped by LifecodeRBC (Immucor, Peachtree Corners, GA) and 127 on HEA BeadChip platform. For Panel 2, 190 whole-blood samples (EDTA anticoagulant, without plasma) were used. LifecodeRBC was used to genotype 95 samples and HEA BeadChip platform was used for the other 95. For Cartwright blood group, validation was performed on only 85 samples (previously genotypes with LifecodeRBC) because genotyping data were unavailable for the other samples.

Plate Preparation

For the plate preparation, adhesive surface were purchased from AXO Science (Lyon, France) and was assembled with a bottomless 96-well plate (Greiner Bio One, Frickenhausen,

Germany). 5' Amino-modified oligonucleotides (16 for Panel 1 and 14 for Panel 2, 16-mer to 23-mer), specific for the targeted alleles (two probes per SNP, two replicates per probe) and two control probes (for hybridization and negative control) were prepared in spotting buffer (AXO Science) to reach a final concentration of 70 $\mu\text{mol/L}$. These solutions were spotted as 350-pL drops in each well bottom with the use of a piezoelectric spotter (sciFLEXARRAYER S3; Scienion, Berlin, Germany) in a 7×7 matrix format, with a spot-to-spot distance of 300 μm .

HIFI Assay

Genomic DNA was extracted from 200 μL of whole-blood sample with the use of NucleoSpin96 (Macherey Nagel, Hoerd, France). Protocol steps and reaction volumes were used according to the manufacturer's instructions. However, protocol was adapted to fully automated extraction with the use of an EVO 100 platform (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Eight sequences for Panel 1 and six sequences for Panel 2 that hosted the targeted polymorphisms were amplified with the use of Go TaqG2 Hot Start Colorless Master Mix Kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's instructions, in a final volume of 27 μL . One primer in each primer pair was labeled with biotin at its 5' end. Final concentration of each primer in the reaction mix was 1.5 $\mu\text{mol/L}$. PCR was performed in a twin.tec 96-well plate (Eppendorf, Montesson, France) with the use of Techne Prime Elite (Bibby Scientific, Staffordshire, United Kingdom).

Assays were performed on an EVO 100 (Tecan), equipped with a heater and an imager. The automated assays took place as follows (approximately 4.5 hours for a 96-well plate).

Each well was imaged before the test with the use of a CLAIR imaging instrument (Colorimetric Array Imaging Reader; Sensovation, Radolfzell, Germany). After imaging, each matrix was saturated for 10 minutes at 37°C with 200 μL of Low-Cross Buffer (Candor Bioscience, Wangen, Germany). Wells were washed three times with phosphate-buffered saline (pH 7.4; VWR, Fontenay-sous-Bois, France). PCR products were diluted twofold in the saturation buffer. The mixture was transferred to the assay plate, incubated for 5 minutes at 88°C, and then gradually cooled down to 55°C. At 55°C, wells were washed twice with phosphate-buffered saline. Then they were loaded with 2 $\mu\text{g/mL}$ alkaline phosphatase-labeled streptavidin solution (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and incubated at 37°C during 30 minutes. Two washes with phosphate-buffered saline were performed. 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT; 100 mL; Sigma-Aldrich) substrate solution was added in each well for signal generation. The original color of BCIP/NBT solution was yellow. The interaction between alkaline phosphatase-labeled and BCIP/NBT generated a purple precipitate on positive spots. Wells were washed twice with milliQ water. Plate was allowed to dry on the heater during 10 minutes at

55°C, and the second imaging was performed with the CLAIR for signal acquisition.

Signal Acquisition and Genotype Interpretation

These steps were automatically performed with dedicated software, AXOware version 1.6 (AXO Science). The intensity of each spot was quantified with the use of 0 to 255 grayscale intensities. The resulting net specific intensity for a given allele A was calculated as the mean intensity for all spot replicates of that allele. Ideally, a qualitative test would be sufficient to obtain the genotype of a patient according to the coloration appearing on positive spots. However, because of the SNP character of the mutation, mismatch hybridization occurred. For this reason, a semiquantitative analysis was performed, comparing the grayscale intensity levels of both spots for a given SNP.

Genotype assignment for each SNP (associated with two alleles A_1 and A_2) was evaluated with the calculation of a P_{score} . This P_{score} is a discriminating parameter as explained in the following equation:

$$P_{score} = \frac{I(A_2) - I(A_1)}{I(A_2) + I(A_1)} \quad (1)$$

where $I(A_1)$ and $I(A_2)$ are the median spot intensity for a given allele corrected with local background subtraction.¹⁹

According to the patient's genotype, P_{score} values range in three different clusters. The cutoff limit values for these clusters were determined by the analysis of blood samples of known genotypes (174 for Panel 1 and 176 for Panel 2). Method for determination of P_{score} cutoff limit values was described by Le Goff et al.¹⁹

Quality Control

Different controls were performed to ensure the validity of the assay. After the plate preparation and before the assay, intensities of background and spots were compared. When the result was found below a fixed cutoff value, meaning that intensity difference between background and spots was too weak, the plate was declared noncompliant. At the end of the assay, five quality controls were performed, and several cutoff values were used to evaluate i) positive spot controls, ii) negative spot controls; iii) homogeneity between two spot replicates, iv) homogeneity within a spot, and v) minimal mean intensity for all of the spots belonging to the same blood group system.

Results

Determination of P_{score} Cutoff Limit Values for the Validation Assay

A qualitative test should be sufficient to obtain a signal corresponding to the presence or the absence of targeted alleles in the patient's genome. Because our test is based on

the variation of only one nucleotide between the two alleles, mismatches occurred. Therefore, it was necessary to perform a semiquantitative analysis by comparing the grayscale intensity levels of both spots for a given SNP to assign an assay score, P_{score} (see *Materials and Methods*). A first series of samples of known genotypes (174 samples for Panel 1 and 176 for Panel 2) was analyzed to determine P_{score} cutoff limit values which were used in the validation study. This batch of samples allowed obtaining P_{score} cutoff limit values for all of the existing genotypes according to SNPs analyzed on the *HIFI* platform (*Supplemental Figures S1 and S2*). Overall, the idea was to choose P_{score} cutoff limit values according to the results obtained in the prevalidation study, which differ from each blood group system, allowing inclusion of most of the samples in the right clusters, and minimizing wrong genotyping results, even increasing percentage of not determined (ND) samples.

Among Panel 1, wrong or ND samples appeared in all blood group systems. However, few samples only were found discrepant for KEL (1/2, 3/4), Kidd, MNS (3/4), and Duffy (1/2 and $FY^*Fy/*noFy$) blood group systems. For MNS (1/2), clusters obtained for the three different genotypes overlapped; we therefore considered a higher number of ND and discrepant samples than for the other groups. For $FY^*X/*noX$ couple, no sample genotyped FY^*X*X was present in the prevalidation cohort, because this sort of genotype is extremely rare and no cutoff limit value could be determined. Because P_{score} values for $FY^*X/*noX$ samples were situated in the same area than those for $FY^*noX/*noX$ samples, the cutoff limit values were chosen distant from each other to minimize risks of wrong genotyping.

Among Panel 2, Diego and Dombrock (Jo(a+)/(a-) and HY+/-) blood group systems did not have all of the three possible genotypes represented. For Jo(a+)/(a-), the cutoff

Table 1 SNPs Analyzed on *HIFI* Platform

System	Antigens	Alleles	SNP
Panel 1			
Kell	KEL1, KEL2	KEL*1, KEL*2	578 T>C
	KEL3, KEL4	KEL*3, KEL*4	841 T>C
Kidd	JK1, JK2	JK*1, JK*2	838 G>A
	Duffy	FY1, FY2	FY*1, FY*2
			$FY^*02W.01 (FY^*X)$
		$FY^*02N.01 (FY^*Fy)$	-67 T>C
MNS	MNS1 (M), MNS2 (N)	MNS*1, MNS*2	59 C>T
	MNS3 (S), MNS4 (s)	MNS*3, MNS*4	143 T>C
Panel 2			
Dombrock	D01, D02	DO*1, DO*2	793 A>G
	Jo(a)	$DO^*01.-05$	350 C>T
	HY	$DO^*02.-04$	323 G>T
Colton	CO1, CO2	CO*1, CO*2	134 C>T
Cartwright	YT1, YT2	YT*1, YT*2	1057 C>A
Lutheran	LU1, LU2	LU*1, LU*2	230 A>G
Diego	DI1, DI2	DI*1, DI*2	2561 T>C

Bold alleles are reference alleles for the International Society of Blood Transfusion, with the corresponding nucleotide.

Table 2 Detailed Genotype Distribution among the Validation Cohort for Panel 1 and Panel 2

System	Genotype	Samples, <i>n</i>	System	Genotype	Samples, <i>n</i>
Panel 1					
Kell	<i>KEL*1/*1</i>	0	MNS	<i>MNS*1/*1</i>	192
	<i>KEL*1/*2</i>	12		<i>MNS*1/*2</i>	274
	<i>KEL*2/*2</i>	571		<i>MNS*2/*2</i>	117
	<i>KEL*3/*3</i>	1		<i>MNS*3/*3</i>	97
Duffy	<i>KEL*3/*4</i>	17	Kidd	<i>MNS*3/*4</i>	169
	<i>KEL*4/*4</i>	565		<i>MNS*4/*4</i>	316
	<i>FY*1/*1</i>	113		<i>JK*1/*1</i>	201
	<i>FY*1/*2</i>	178		<i>JK*1/*2</i>	218
	<i>FY*2/*2</i>	292		<i>JK*2/*2</i>	164
	<i>FY*X/*X</i>	0			
	<i>FY*X/*noX</i>	27			
	<i>FY*noX/*noX</i>	556			
	<i>FY*Fy/*Fy</i>	1			
	<i>FY*Fy/*noFy</i>	29			
	<i>FY*noFy/*noFy</i>	553			
Panel 2					
Lutheran	<i>LU*1/*1</i>	0	Dombrock	<i>DO*1/*1</i>	38
	<i>LU*1/*2</i>	12		<i>DO*1/*2</i>	82
	<i>LU*2/*2</i>	178		<i>DO*2/*2</i>	69
Colton	<i>CO*1/*1</i>	176	Diego	<i>HY+/-</i>	189
	<i>CO*1/*2</i>	12		<i>HY+/-</i>	0
	<i>CO*2/*2</i>	2		<i>HY-/-</i>	0
Diego	<i>DI*1/*1</i>	0	Cartwright	<i>Jo(a+)/Jo(a+)</i>	190
	<i>DI*1/*2</i>	0		<i>Jo(a+)/Jo(a-)</i>	0
	<i>DI*2/*2</i>	190		<i>Jo(a-)/Jo(a-)</i>	0
Cartwright	<i>YT*1/*1</i>	82			
	<i>YT*1/*2</i>	3			
	<i>YT*2/*2</i>	0			

Samples were previously genotyped with either HEA BeadChip (BioArray Solution Ltd.), IDCore+ (Grifols), or LifecodeRBC (Immucor).

limit value corresponded to the maximal P_{score} obtained on the platform. For *HY+/-*, no overlap was observed between *HY+/-* and *HY+/-* genotypes, which allowed to assign cutoff limit values corresponding to the maximal

P_{score} for *HY+/-*, and to maximal and minimal P_{score} for *HY+/-*. About the Diego blood group system, only the genotype *DI*2/*2* was represented. So the cutoff limit value corresponded to the minimal P_{score} obtained for this group.

Table 3 Detailed Results of the Validation Study for the Two Panels

System	Couple of alleles	Analyzed variables, <i>n</i>	ND, <i>n</i>	Discrepancies, <i>n</i>	ND, %	Discrepancy, %	Concordance, %
Panel 1							
Kell	<i>KEL*1/KEL*2</i>	1166	3	2	0.25	0.17	99.83
	<i>KEL*3/KEL*4</i>	1166	2	5	0.17	0.42	99.58
Kidd	<i>JK*1/JK*2</i>	1166	8	7	0.68	0.6	99.4
	<i>MNS*1/MNS*2</i>	1166	39	10	3.34	0.85	99.15
MNS	<i>MNS*3/MNS*4</i>	1164	0	4	0	0.34	99.66
	<i>FY*1/FY*2</i>	1166	36	6	3.08	0.51	99.49
	<i>FY*X/FY*noX</i>	1166	25	3	2.14	0.25	99.75
Duffy	<i>FY*Fy/FY*noFy</i>	1166	1	4	0.085	0.34	99.66
Panel 2							
Lutheran	<i>LU*1/LU*2</i>	380	5	0	1.31	0	100
Colton	<i>CO*1/CO*2</i>	380	9	0	2.36	0	100
Dombrock	<i>DO*1/DO*2</i>	378	2	0	0.52	0	100
	<i>HY+/-</i>	378	0	0	0	0	100
	<i>Jo(a+)/Jo(a-)</i>	380	0	0	0	0	100
Diego	<i>DI*1/DI*2</i>	380	0	0	0	0	100
Cartwright	<i>YT*1/YT*2</i>	170	0	2	0	1.17	98.83

ND, not determined.

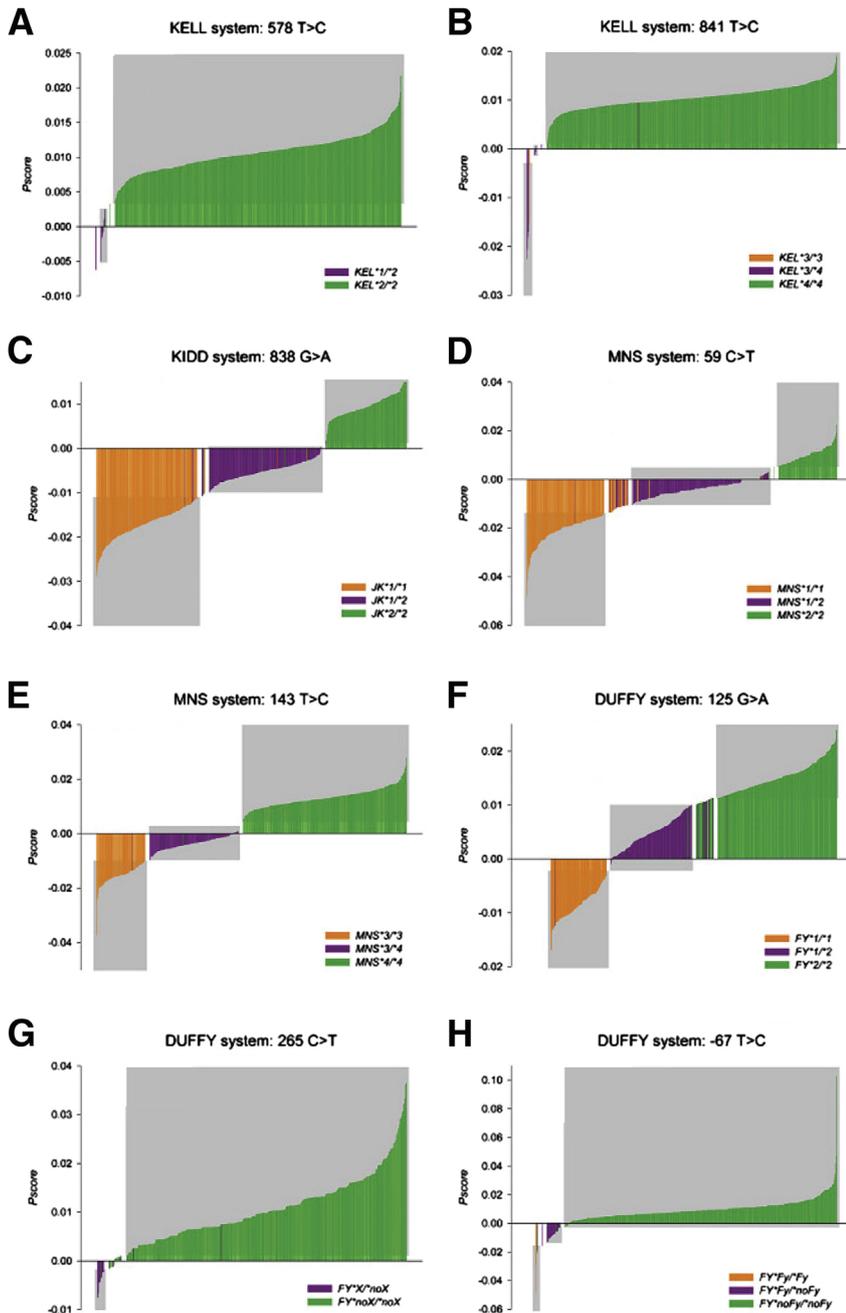


Figure 2 P_{score} distribution with the use of 174 samples (in ascending order) obtained for the validation study for Panel 1. Each color is assigned to a genotype determined by an independent reference technique, whereas gray zone P_{score} areas correspond to each genotype (see calculation in *Materials and Methods*). Not determined samples are situated between two gray zones, outside of P_{score} confidence intervals. Discrepant samples appear in the wrong color area. **A:** Kell system 578 T>C. **B:** Kell system 841T>C. **C:** Kidd system 838G>A. **D:** MNS system 59C>T. **E:** MNS system 143T>C. **F:** Duffy system 125G>A. **G:** Duffy system 265C>T. **H:** Duffy system -67T>C.

For all of the other groups, overlaps directed us to define cutoff limit values that minimized discrepant results and promoted ND results, as much as possible. For Lutheran, Colton, and Dombrock (DO1/2), overlaps were larger, so the chosen cutoff limit values generated a greater number of discrepant samples.

Targeted SNPs and Cohorts Used for the Validation

The *HIFI* platform allows the identification of 15 SNPs linked to the expression of 24 blood group antigens. According to the International Society of Blood Transfusion

nomenclature, details of SNPs characterized by our platform are presented in [Table 1](#).

Cohorts used for the validation of our platform are detailed in [Table 2](#). Some genotypes are poorly or not represented because of their scarcity.

Validation Study

To evaluate the efficiency and the reliability of our automated platform to implement blood banks in a near future, a validation study was performed. A total of 583 (for Panel 1) and 190 (for Panel 2, 85 for Cartwright blood group) blood

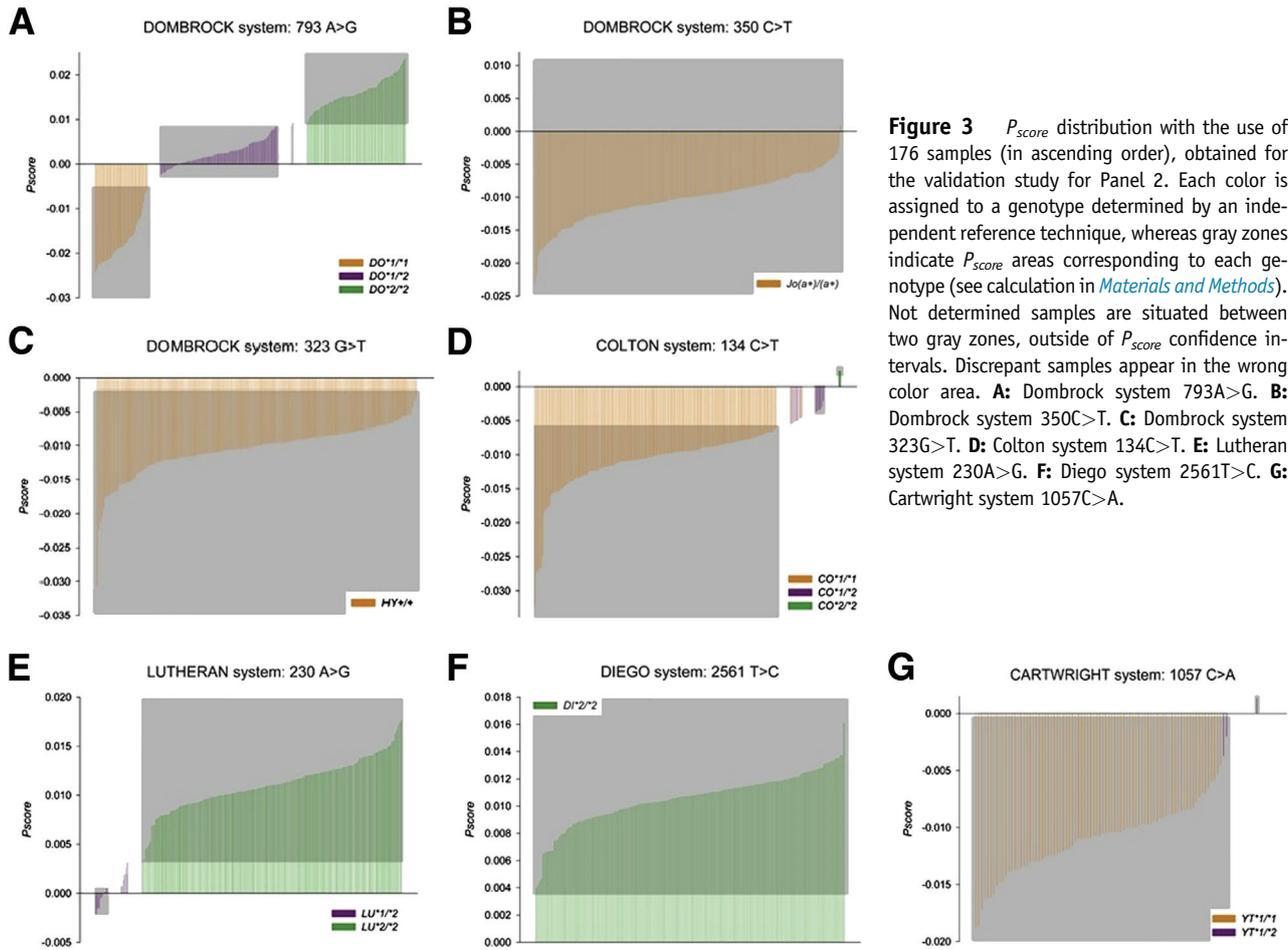


Figure 3 P_{score} distribution with the use of 176 samples (in ascending order), obtained for the validation study for Panel 2. Each color is assigned to a genotype determined by an independent reference technique, whereas gray zones indicate P_{score} areas corresponding to each genotype (see calculation in *Materials and Methods*). Not determined samples are situated between two gray zones, outside of P_{score} confidence intervals. Discrepant samples appear in the wrong color area. **A:** Dombrock system 793A>G. **B:** Dombrock system 350C>T. **C:** Dombrock system 323G>T. **D:** Colton system 134C>T. **E:** Lutheran system 230A>G. **F:** Diego system 2561T>C. **G:** Cartwright system 1057C>A.

samples were randomly provided by various European blood banks. For each sample, genotypes were assigned by comparing the obtained P_{score} with the set of P_{score} cutoff limit values for each SNP. The obtained genotypes were compared with results from other genotyping platforms already commercialized [HEA BeadChip from Bioarray Ltd Solution, IDCore+ from Grifols, or LifecodeRBC from Immucor (held by BioArray Solutions Ltd)], taken as references, to evaluate the performance of the *HIFI* platform. Results for the two panels are detailed in Table 3, and P_{score} values obtained are presented in Figure 2 for Panel 1 and Figure 3 for Panel 2.

Percentages in Table 3 are calculated according to the number of analyzed variables, which is different from the number of samples. Indeed, for a given couple of alleles, the *HIFI* platform gave a result (presence or absence) for each allele, considered as a single variable. Therefore, the number of analyzed variables was doubled compared with the number of samples. For *MNS*3/MNS*4*, *DO*1/DO*2*, *YT*1/YT*2*, and *HY+ /HY-* couples, number of analyzed variables was lower because of the lack of information (for one sample or more) about the genotype with the use of the other genotyping platforms, which did not allow us to compare results obtained on the *HIFI* platform. A result was

reported as ND when the P_{score} ranged outside clusters or was invalidated because of the noncompliance with quality controls. Figures 2 and 3 reflect results presented in Table 3. Good correlation rates were obtained a between 99% and 100% for Panel 1 and 100% for Panel 2. However, because blood samples were randomly provided by various European blood banks, genotypes available in our validation study reflect the genotype distribution in the Caucasian population, explaining the low occurrence of some particular genotypes: *KEL*1*1*, *KEL*1*2*, *KEL*3*3*, *KEL*3*4*, *FY*X*X*, *FY*X/*noX*, *FY*Fy/*Fy* and *FY*Fy/*noFy* for Panel 1; *LU*1*1*, *LU*1*2*, *CO*1*2*, *CO*2*2*, *DI*1*1*, *DI*1*2*, *YT*1*2*, *YT*2*2*, *HY+/-*, *HY-/-*, *Jo(a+)/(a-)*, and *Jo(a-)/(a-)* for Panel 2. To this problem, we can add (especially for the Panel 2) that antigens corresponding to these blood group systems are rarely tested by genotyping in blood banks, leading to a low number of blood donations typed for these rare antigens. It is therefore difficult to obtain a diverse cohort, including an equivalent number of all of the possible genotypes, whether for prevalidation or validation studies. For Panel 2 in particular, this validation study must be continued to include the following genotypes that are lacking in our cohort: *LU*1*1*, *DI*1*1*, *DI*1*2*, *YT*2*2*, *HY+ /HY-*, *HY- /HY-*, *Jo(a+)/(a-)*, and *Jo(a-)/(a-)*.

Among Panel 1, all of the couple of alleles tested showed a percentage of concordance >99% in comparison with the other genotyping platforms, which was a more than a satisfactory result. However, we noticed a ND rate >2% for *MNS*1/*2*, *FY*1/*2*, and *FY*X/*noX*. This is possibly because of low signal intensity on the corresponding spots, which did not allow generation of workable P_{score} values in the prevalidation study (Supplemental Figures S1 and S2). In consequence we overestimated these cutoff values, leading to a greater percentage of ND.

Among Panel 2, all of the couple of alleles tested showed 100% concordance between our assay and other genotyping techniques. As mentioned previously in the *Results*, this is partly because of the lack or the absence of some genotypes in the cohort, not allowing us to have exhaustive results. Only *CO*1/*2* showed a ND rate >2% explained with the same reasons than those for *MNS*1/*2* and *FY*1/*2*. For all discordant samples, only a sequencing reaction will allow us to know which genotyping method gives the right result.

It is important to notice that, in complement to all of the genotypes included in the two panels, some null phenotypes can be highlighted on the *HIFI* platform, as those concerning *GYPB* (*MNS*3/*4* or Ss), linked to the antigen U (*MNS:5*): phenotypes S-s-U- and S-s-Uvar. These phenotypes associate two SNPs in addition to *MNS*3/*4* which are *GPB-Int5* (also reported as *GYPB.P2*) and *GPB-230* (also reported as *GYPB.NY*). Blood samples with the phenotype S-s-U- are *MNS: -3,-4* which give a low signal on the SNP *MNS*3/*4*, but also on SNPs *GYPB.P2* and *GYPB.NY*. Samples with the phenotype S-s-Uvar are *MNS: -3,-4* and homozygous for either *GYPB.P2* or *GYPB.NY*. Although SNPs *GYPB.P2* and *GYPB.NY* are not included on the *HIFI* platform, it is possible to give an indirect indication on the potential presence of an S-s-U phenotype, because of the low signal on both *MNS*3* and *MNS*4* spots. Nevertheless, no indication can be given for the potential presence of the phenotype S-s-Uvar because the two additional SNPs *GYPB.P2* and *GYPB.NY* are here essentials.

Discussion

As previously mentioned in the *Introduction*, serology has some limitations when it comes to the determination of minor or rare blood group antigens. The herein presented genotyping platform could overcome these disadvantages. Indeed, the fully robotized process flow minimizes operator's influence on test results and allows obtaining comprehensive fast and reliable results for up to 24 blood group antigens, including rare antigens. Furthermore, the dedicated software manages the process from beginning to end, enabling a complete security, traceability with the use of barcodes from blood samples to result report, and total archiving (process, e-data, and revealed plates which can be re-imaged if necessary). Finally, the array of

probes can be adapted to customer's needs (a third panel can be easily obtained by selecting its interesting targets).

Results presented here show a good correlation (between 99% and 100%) with other commercialized genotyping platforms. This new platform offers substantial time saving, each panel allowing the characterization of 96 samples simultaneously for 24 antigens. In addition, the assay is easily adaptable to a 384- or 1536-well plate format.

Nevertheless, these studies must be continued to include samples of specific genotypes that are lacking (from different ethnic groups and geologic localizations), but data obtained are promising.

Supplemental Data

Supplemental material for this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.09.002>.

References

- McBean RS, Hyland CA, Flower RL: Approaches to determination of a full profile of blood group genotypes: single nucleotide variant mapping and massively parallel sequencing. *Comput Struct Biotechnol J* 2014, 11:147–151
- Logdberg L, Reid ME, Lamont RE, Zelinski T: Human blood group genes 2004: chromosomal locations and cloning strategies. *Transfus Med Rev* 2005, 19:45–57
- Logdberg L, Reid ME, Zelinski T: Human blood group genes 2010: chromosomal locations and cloning strategies revisited. *Transfus Med Rev* 2011, 25:36–46
- Reid ME: Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:171–177
- Westhoff CM: Molecular testing for transfusion medicine. *Curr Opin Hematol* 2006, 13:471–475
- Reid ME, Rios M, Powell VI, Charles-Pierre D, Malavade V: DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 2000, 40:48–53
- Castilho L, Rios M, Bianco C, Pellegrino J Jr, Alberto FL, Saad ST, Costa FF: DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion* 2002, 42:232–238
- Westhoff CM: Review: the Rh blood group D antigen... dominant, diverse, and difficult. *Immunohematology* 2005, 21:155–163
- Castilho L: The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. *Transfusion* 2007, 47:28S–31S
- Reid ME: Overview of molecular methods in immunohematology. *Transfusion* 2007, 47:10S–16S
- Storry JR, Olsson ML: Genetic basis of blood group diversity. *Br J Haematol* 2004, 126:759–771
- Hashmi G, Shariff T, Zhang Y, Cristobal J, Chau C, Seul M, Vissavajhala P, Baldwin C, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, Lomas-Francis C, Reid ME: Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion* 2007, 47:736–747
- Kappler-Gratias S, Peyrard T, Beolet M, Amiranoff D, Menanteau C, Dubeaux I, Rouger P, Cartron J-P, Le Penec P-Y, Pham B-N: Blood group genotyping by high-throughput DNA analysis applied to 356 reagent red blood cell samples. *Transfusion* 2011, 51:36–42
- Avent ND, Martinez A, Flegel WA, Olsson ML, Scott ML, Nogués N, Pišacka M, Daniels GL, Muñoz-Díaz E, Madgett TE, Storry JR,

- Beiboer S, Maaskant-van Wijk PM, von Zabern I, Jiménez E, Tejedor D, López M, Camacho E, Cheroutre G, Hacker A, Jinoch P, Svobodova I, van der Schoot E, de Haas M: The Bloodgen Project of the European Union, 2003–2009. *Transfus Med Hemother* 2009, 36: 162–167
15. Denomme GA, Van Oene M: High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion* 2005, 45:660–666
16. St-Louis M, Perreault J, Lavoie J, Emond J, St-Laurent J, Long A, Richard M: [Genotyping of 21,000 blood donors in Quebec and RHD analysis] French. *Transfus Clin Biol* 2010, 17: 242–248
17. Boccoz SA, Blum LJ, Marquette CA: DNA biosensor/biochip for multiplex blood group genotyping. *Methods* 2013, 64:241–249
18. Corgier BP, Mandon CA, Le Goff GC, Blum LJ, Marquette CA: Adhesive microarrays for multipurpose diagnostic tools. *Lab Chip* 2011, 11:3006–3010
19. Le Goff GC, Brès J-C, Rigal D, Blum L, Marquette CA: Robust, high-throughput solution for blood group genotyping. *Anal Chem* 2010, 82: 6185–6192

Chapter 9

Microarrays in Blood Group Genotyping

Stephanie A. Boccoz, Gaëlle Le Goff, Loïc J. Blum,
and Christophe A. Marquette

Abstract

Thirty-five blood group systems, containing more than 300 antigens, are listed by the International Society of Blood Transfusion (ISBT). Most of these antigens result from a single-nucleotide polymorphism (SNP). Blood group typing is conventionally carried out by serology. However, this technique has certain limitations and cannot respond to the growing demand for blood products typed for a large number of antigens. Here we describe a blood group genotyping assay, from genomic DNA extraction from whole-blood samples to results. After DNA extraction, the on-chip test is based on the hybridization of targets beforehand amplified by multiplex polymerase chain reaction, followed by a revelation step allowing the simultaneous identification of up to 24 blood group antigens and leading to the determination of extended genotypes.

Key words Blood group, DNA biochip, Microarray, Multiplex, Polymerase chain reaction

1 Introduction

Today, 35 blood group systems representing over 300 antigens are listed by the ISBT. Most of them have been cloned and sequenced [1, 2] unraveling the molecular bases of these blood group systems. The majority result from single-nucleotide polymorphism (SNP). Red blood cells (RBC) carrying a particular antigen may elicit an immune response if introduced in the blood circulation of a patient who lacks this antigen. It is the antibody produced during the immune response which is problematic and leads to donor/patient transfusion incompatibility, maternal-fetal incompatibility, and autoimmune hemolytic anemia. This immune response can be immediate or delayed and in some cases lethal. For this reason, antigen-negative blood is required for a safe transfusion. For decades the method of reference for testing blood group antigens has been the hemagglutination technique. However, this gold standard method has certain limitations (immunological reagent availability and specificity) when it comes to the determination of

minor or rare blood group antigens, critical to fulfill a perfect matching between patient and donor [3]. Reagents are specialized and must be obtained from immunized patients or donors (polyclonal and monoclonal antibodies) or from immunized mice (monoclonal antibodies). Cost of immunological reagents keeps increasing and many antibodies are not available or weakly reactive, which is not suitable for the growing need of blood products typed for a large number of antigens. These limitations led to a relatively low number of donors typed for larger number of antigens, which limits the establishment of an antigen-negative inventory. In addition, antigen expression on the surface of the RBCs is often too weak to be detected by serology and discrepancies in serologic activity can occur between different manufacturers' reagents [4]. The identification of the molecular bases of most of the blood group systems paved the way for DNA-based assays as typing tools. One type of existing DNA-based assays uses DNA biosensors or microarrays (planar arrays or suspended bead arrays). Microarray-based genotyping tools allow testing of a large number of donors on a large number of antigens at potentially high throughput [3]. Moreover, they help overriding the limitations of serology, replacing the immunochemical reagents by synthetic and controlled probes. Here we describe a new blood group genotyping assay, from genomic DNA extraction of whole-blood samples to results analysis (Fig. 1). DNA is extracted from whole-blood samples and targets are amplified using biotinylated gene-specific primers. Then polymerase chain reaction (PCR) products are directly hybridized on the spotted microarray and labeled to produce stained positive spots which are detected and quantified using optical imaging. Images of each well are then processed *in silico* to produce scores useful for the sorting of the sample according to their genotypes. Examples of two multiplex PCR are presented, allowing the identification of 22 blood group antigens (KEL1/2, 3/4; JK1/2; FY1/2; MNS1/2, 3/4; in panel 1; YT1/2; CO1/2; DO1/2; LU1/2, HY+/-, JOa+/a- in panel 2), as well as two variants part of the Duffy system (*FY*Fy* and *FY*X*, in panel 1).

The purpose of this chapter is to give a protocol for implementation of blood group genotyping, with TKL (AXO Science, France) immobilization support and a colorimetric labeling. The user should adapt probe and primer panels according to his needs. The protocol described here is fully automatable with two liquid-handling systems (one for DNA extraction/PCR and the other one for hybridization). In this configuration, images taken with the Colorimetric Array Imaging Reader can be analyzed automatically on the principle that spot intensity can be directly connected to the genotype [5, 6] (Fig. 2; www.axoscience.com).

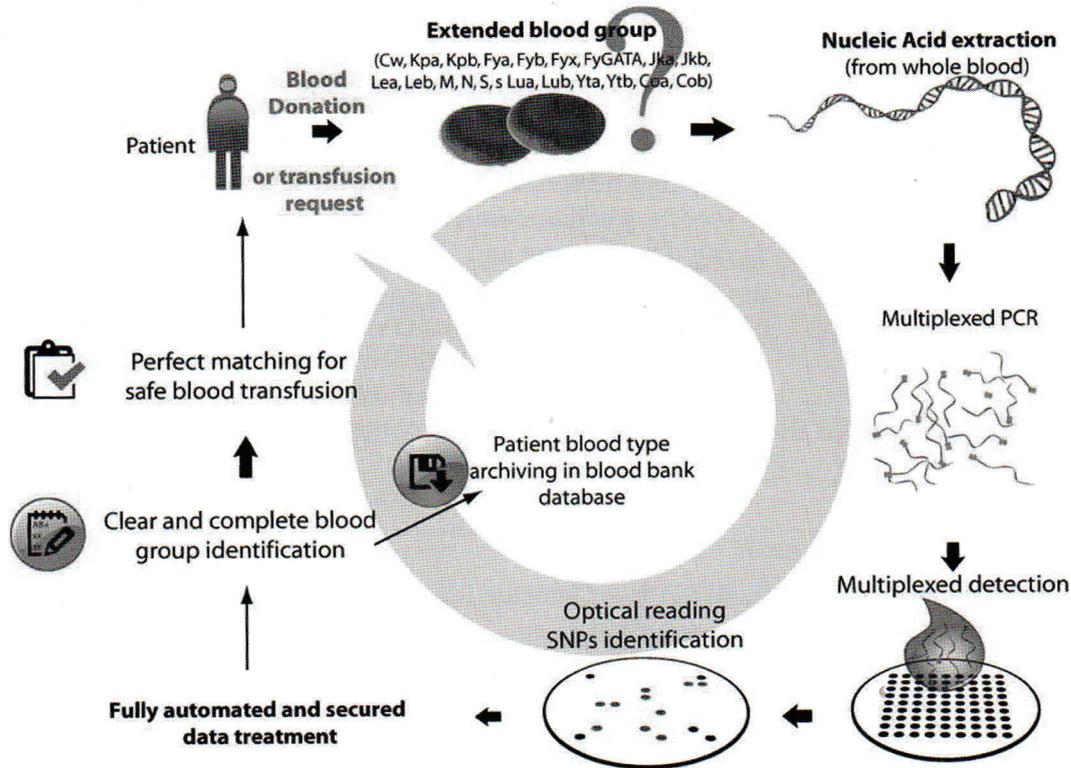


Fig. 1 RBC genotyping and transfusion safety

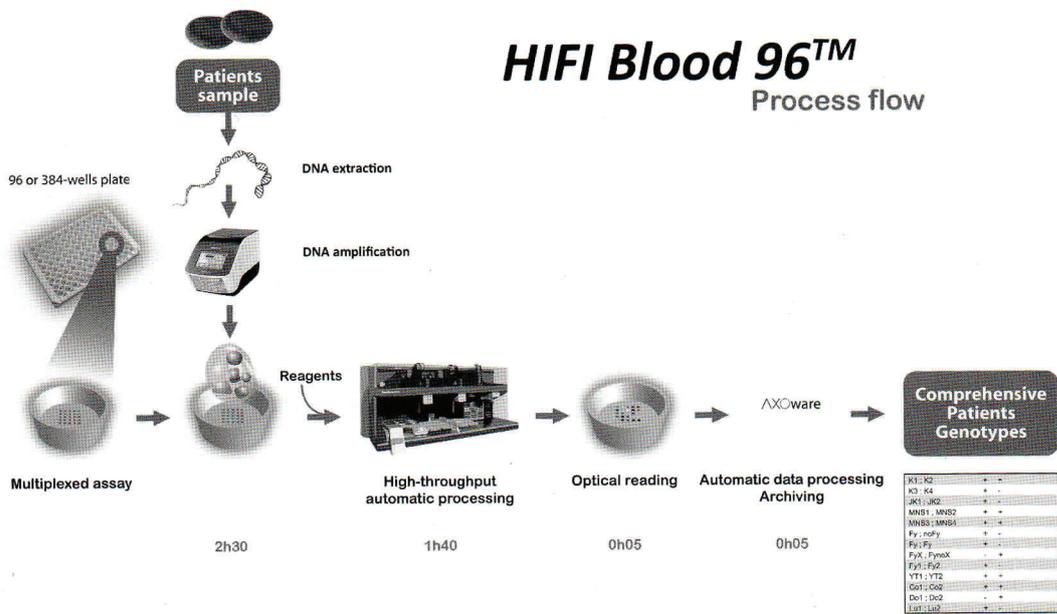


Fig. 2 Principle of HIFI Blood 96™

2 Materials

Use ultrapure or molecular biology-grade water (5Prime, Germany) to prepare all solutions.

2.1 Microarray Spotting

1. Spotting buffer 2×: 0.2 M NaAc, 0.2 M KCl, pH 5.5. Weight 0.6804 g sodium acetate and 0.37275 g potassium chloride. Add 25 mL water and dissolve with stirring. Store at 4 °C.
2. Oligo dT probe (positive control for spotting and hybridization composed of 16 dTs) and oligonucleotide probes (Eurogentec, Belgium). All probes carry a C6-amino modification at their 3'-end to bind to the TKL immobilization support. Add the appropriate volume of water in each probe tube to reach a final concentration of 150 μM and store at -20 °C. For confidentiality reasons, oligonucleotide sequences will not be disclosed here.

2.2 DNA Extraction

1. EDTA blood samples (with or without plasma). Store at -20 °C.
2. NucleoSpin® 96 Blood kit (Macherey-Nagel, France) (*see Note 1*).
3. Prepare the proteinase K solution by dissolving the lyophilized proteinase K in 3.35 mL Proteinase Buffer PB. Proteinase K solution is stable at -20 °C for at least 6 months.
4. Ethanol (>96 % grade).

2.3 Polymerase Chain Reaction

1. Oligonucleotide primers (Eurogentec): One primer in each primer pair is biotinylated. Add the appropriate volume of water in each primer tube to have a final concentration of 800 μM for primers of panel 1 and 600 μM for primers of panel 2. Store at -20 °C. For confidentiality reasons, oligonucleotide sequences will not be disclosed here.
2. GoTaq® G2 Colorless Master Mix kit (Promega, France).

2.4 Hybridization and Result Acquisition

1. Phosphate buffer saline (PBS) tablets pH 7.4 (AppliChem, France). Add one tablet for 1 L of ultrapure water and dissolve with stirring. Store at 4 °C.
2. LowCross-Buffer® (Candor Bioscience, France).
3. Streptavidin - Alkaline Phosphatase from *Streptomyces avidinii* (SAV-AP; Sigma Aldrich, France). Add 250 μL ultrapure water to 250 μg powder in order to have a final concentration of 1 mg/mL. Vortex and store at -20 °C.
4. BCIP®/NBT-Blue Liquid Substrate System for Membranes (Sigma Aldrich). Store at 4 °C (*see Note 2*).

2.5 Laboratory Equipment and Supplies

1. sciFLEXARRAYER S3 spotter (Sciencion, Germany).
2. 384-Well microplate (Genetix, UK).
3. Microtiter sealing tape.

4. TKL immobilization support (AXO Science).
5. Bottomless 96-well plate (Dutscher, France).
6. 96-Well PCR plate (VWR, France).
7. Teleshake 95 (Inheco, Germany).
8. Falcon tubes, 15 mL.
9. Eppendorf tubes, 1.5 mL.
10. Twin.tec 96-well PCR Plate, skirted (Eppendorf).
11. Alumaseal II™ (Dutscher).
12. Thermocycler.
13. Vortex.
14. CPAC Ultraflat HT 2-TEC (heating and cooling unit; Inheco).
15. Colorimetric Array Imaging Reader (CLAIR; Sensovation, Germany).
16. HydroSpeed microplate washer (Tecan, Germany).
17. Optional: TECAN EVO 100 (liquid-handling system; Tecan).
18. Data analysis software (AXO Science).

3 Methods

Carry out all procedures at room temperature unless otherwise specified.

3.1 Microarray Spotting

1. Prepare the probe plate by dispensing 20 µL spotting buffer and 20 µL probe in each well of a 384-well microplate, according to the map plates 1 and 2 (Figs. 3 and 4). For negative control wells (T-), replace 20 µL probe with 20 µL ultrapure water. Mix by pipetting up and down in each well. Seal the plate with microtiter sealing tape and store at -20 °C until used.
2. Use a non-contact arrayer, preferably a sciFLEXARRAYER S3 spotter, to dispense arrays of probes at the bottom of a microtiter plate (350 pL per drop, 2 drops per SNP).
3. Store the printed microtiter at 4 °C.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
24	T-									dT	FynoFy	FyFy	K4	K3	K2	K1
23											JK2	JK1	MNS4	MNS3	MNS2	MNS1
22										T-	FynoX	FyX			Fy2	Fy1
21																
20																
...																
2																
1																

Fig. 3 Map plate for panel 1

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
24	T-										HY+	dT	DO-2	DO-1	LU-2	LU-1
23											HY-		DI-2	DI-1	Cart-2	Cart-1
22											T-	T-	Jo(a-)	Jo(a+)	Co-2	Co-1
21																
20																
...																
2																
1																

Fig. 4 Map plate for panel 2

3.2 DNA Extraction

The protocol used here is the NucleoSpin® 96 Blood—vacuum processing. All reagents except ethanol are provided in the kit.

1. Thaw EDTA blood samples at room temperature for at least 15 min.
2. Prepare the wash buffer B5 by adding 400 mL 96–100 % ethanol (>96 % grade) in the bottle.
3. Dispense 200 µL blood and 25 µL proteinase K solution to each well of the lysis block. Add 200 µL BQ1 solution and mix three times by pipetting up and down. Incubate at 22 °C with shaking during 10 min.
4. Prepare the NucleoVac 96 Vacuum Manifold for binding/washing steps: insert spacers “MTP/MULTI-96 PLATE” in the manifold base. Place the MN Wash Plate in the manifold. Place the manifold lid on top of the manifold base. Place the NucleoSpin® Binding Plate on top of the manifold lid.
5. Add 200 µL 96–100 % ethanol in each well of the lysis block. Mix five times by pipetting up and down and transfer samples to the NucleoSpin® Blood Binding Plate (*see Note 3*).
6. Overlay samples with 150 µL B5 buffer in each well of the binding plate. Apply vacuum until all lysates have passed through the wells of the NucleoSpin® Blood Binding Plate (–0.2 bar for 5 min). Release the vacuum.
7. Preheat elution buffer BE to 70 °C (*see Note 4*).
8. Add 600 µL BW buffer to each well. Apply vacuum (–0.2 bar for 3 min) until all buffer has passed through the wells of the NucleoSpin® Blood Binding Plate. Release the vacuum.
9. Add 900 µL B5 buffer to each well. Apply vacuum (–0.2 bar for 1 min) until all buffer has passed through the wells of the NucleoSpin® Blood Binding Plate. Release the vacuum. Repeat a second time.
10. Raise the NucleoSpin® Blood Binding Plate, remove MN wash plate, and put it on a clean paper towel. Replace NucleoSpin®

Blood Binding Plate. Apply maximum vacuum (at least -0.6 bar) for 10 min to dry the membrane completely (*see Note 5*). Release the vacuum.

11. Prepare the NucleoVac 96 Vacuum Manifold for elution step: insert spacers "MICROTUBE RACK" in the manifold base. Place the rack of tube strips in the manifold. Place the manifold lid on top of the manifold base. Place the NucleoSpin® Binding Plate on top of the manifold lid.
12. Add 80 μL (*see Note 6*) BE buffer preheated at 70°C , directly to the bottom of each well. Incubate for 5 min at room temperature. Apply vacuum for elution (-0.6 bar for 1 min). Release vacuum.
13. Close tube strips with cap strips for storage at 4°C if used directly in multiplex PCR, or at -20°C for a long-term storage.

3.3 Multiplex PCR

1. Equilibrate all the reagents to room temperature.
2. Prepare the primer mix for panel 1: in a 1.5 mL tube mix 6.25 μL of each primer. Mix by vortexing.
3. Prepare the primer mix for panel 2: in a 1.5 mL tube mix 6 μL of each primer. Mix by vortexing.
4. Prepare the PCR mix in a 15 mL tube: for panel 1 mix 1,400 μL 2 \times GoTaq® Colorless master mix, 90 μL panel 1 primer mix, and 1,310 μL nuclease-free water; for panel 2 mix 1,400 μL 2 \times GoTaq® Colorless master mix, 60 μL panel 2 primer mix, and 1,340 μL nuclease-free water. Mix by vortexing.
5. Dispense 25 μL PCR mix in each well of the 96-well PCR plate. Add 2 μL DNA template in each well.
6. Cover the plate with Alumaseal adhesive film.
7. Place the plate in a thermocycler and run the cycling program given in Table 1.
8. After cycling store the PCR plate at -20°C .

Table 1
Cycling program for multiplex PCR

Step	Temperature ($^\circ\text{C}$)	Time (min)	Number of cycles
Initial heat activation	95.0	15	1
Denaturation	94.0	0.5	35
Annealing	57.5	0.5	
Extension	72.0	0.5	
Final extension	72.0	10	1
	4.0	Hold	

3.4 Hybridization and Result Acquisition

1. Remove LowCross-Buffer® from the fridge 15 min before starting the protocol. Equilibrate the PCR plate and SAV-AP to room temperature.
2. Prepare PBS by dissolving 1 PBS tablet in 1 L water with stirring.
3. Prepare SAV-AP solution: dissolve 30 μL streptavidin-alkaline phosphatase (1 mg/mL) in 15 mL LowCross-Buffer®.
4. Remove protective films from the spotted plate (above and below the plate), and place it inside the CLAIR reader. Start initial imaging sequence. Once finished, remove the plate from the CLAIR.
5. Add 200 μL LowCross-Buffer® per well. Incubate at 37 °C for 10 min.
6. Wash three times with 300 μL PBS per well.
7. For each sample, dilute 27 μL PCR products with 50 μL LowCross-Buffer® and transfer onto the spotted plate. Incubate at 88 °C for 60 s, and then decrease the temperature to 55 °C.
8. Wash two times with 300 μL PBS per well.
9. Add 100 μL SAV-AP per well and incubate at 37 °C for 30 min.
10. Wash two times with 300 μL PBS per well.
11. Add 100 μL BCIP®/NBT solution per well and incubate at 37 °C for 30 min.
12. Wash two times with 300 μL ultrapure water.
13. Place the plate on the CPAC and allow the plate to dry for 10 min at 55 °C.
14. Place the plate into the CLAIR. Start final reading sequence. Once finished, remove the plate from the CLAIR (Fig. 5).

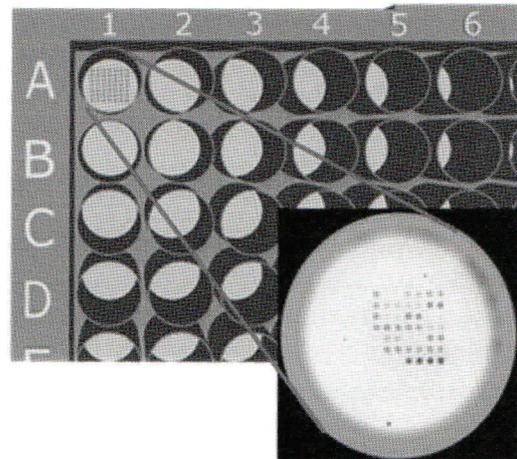


Fig. 5 Example of a result obtained at the end of the test

3.5 Results Analysis

1. Image obtained for each of the 96 wells should be analyzed using an image analysis software (for example AXOWare™) and the intensity of each spot should be quantified using 0–255 grayscale intensities.
2. Then, allele-specific spots (within one blood group system) should be compared. The easiest way to compare and sort the different genotype is to calculate a score for each biallelic system:

$$P_{\text{score}} = [I(A_2) - I(A_1)] / [I(A_2) + I(A_1)]$$

where $I(A_1)$ and $I(A_2)$ refer to the median spot intensity for a given allele, and to sort the different samples according to their P_{score} .

3. Depending on the patient's genotype, P_{score} values range in three different clusters (ideally around -1, 0, and 1).

3.6 Notes

1. Wear gloves and goggles in protection from chaotropic salts contained in BQ1 and BW buffers. All kit reagents must be stored at room temperature (18–25 °C) except proteinase K (store at 4 °C) and are stable for at least 1 year. Salts contained in buffers can precipitate. In this case, incubate for several minutes at 30–40 °C and mix until precipitate is dissolved.
2. BCIP is light sensitive. Remove from the fridge just before using.
3. Avoid moistening the edges of the wells when dispensing samples to prevent any cross-contamination.
4. Preheating BE buffer increases final yield from 10 to 15 %.
5. Ethanol contained in B5 buffer inhibits enzymatic reactions. It is very important to dry completely the columns before DNA elution.
6. A volume of 80 µL of BE allows to obtain approximately 65 µL DNA eluate.

References

1. Logdberg L, Reid ME, Lamont RE et al (2005) Human blood group genes 2004: chromosomal locations and cloning strategies. *Transfus Med Rev* 19:45–57
2. Logdberg L, Reid ME, Zelinski T (2011) Human blood group Genes 2010: chromosomal locations and cloning strategies revisited. *Transfus Med Rev* 25:36–46
3. Reid ME (2009) Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 171–177
4. Westhoff CM (2006) Molecular testing for transfusion medicine. *Curr Opin Hematol* 13: 471–475
5. Le Goff GC, Brès JC, Rigal D et al (2010) Robust, high-throughput solution for blood group genotyping. *Anal Chem* 82: 6185–6192
6. Boccoz SA, Bailly P, Brès JC et al (2013) Oral abstracts. *Vox Sang* 105:1–64

Résumé

Les travaux présentés dans cette thèse font suite à celle de Melle LE GOFF. Ils se concentrent sur la technologie *HIFI* brevetée et développée pendant ses travaux.

Une première partie du travail présenté dans ce manuscrit concerne le test *HIFI Blood 96™* et plus particulièrement les améliorations et les évolutions apportées au test afin d'en faire un véritable outil de génotypage, multiparamétrique et haut-débit pouvant être installé dans les banques de sang dans le but de constituer des inventaires de sang génotypé de façon étendue, participant ainsi à améliorer la sécurité transfusionnelle. Il permet de caractériser 96 échantillons sur 15 polymorphismes (divisés en deux panels) associés aux groupes sanguins en approximativement 4h30. Cette plateforme a fait l'objet d'une étude de validation à moyenne échelle sur 583 donneurs pour le panel 1 et 190 donneurs pour le panel 2.

La deuxième partie des travaux décrit l'adaptation de la technologie *HIFI* appliquée au diagnostic des pathologies respiratoires, avec le développement d'une autre plateforme, ReSynPlex, en partenariat avec 3 équipes de recherche de Grenoble.

Development of multiplex PCR for diagnosis: analytical microarrays

Abstract

The work reported in this thesis follows the one undertaken by Ms LE GOFF. It is focused on *HIFI* technology, which is patented and developed during her thesis.

The first part of this work concerns the *HIFI Blood 96™* test, and particularly the improvements and developments adduced to the test to make it a real diagnostic tool, multiparametric and high-throughput which can be implemented in blood banks in order to constitute negative antigen inventories, thus contributing to improve blood safety. It allows to characterize 96 samples on 15 polymorphisms (divided in two panels) associated to blood group systems in approximately 4.5 hours. A mesoscale validation study has been conducted on 583 samples for panel 1 and 190 samples for panel 2.

The second part of this work describes the adaptation of *HIFI* technology applied to diagnosis of respiratory tract infections, with the development of another platform, ReSynPlex, in partnership with 3 research teams in Grenoble.

Mots-clés

biopuce ; diagnostic ; génotypage érythrocytaire ; haut-débit ; infections respiratoires ; microarrays ; PCR multiplexe ; polymorphisme d'un nucléotide ; puce à ADN

Keywords

biochip ; blood group genotyping ; diagnosis ; DNA biochip ; high-throughput ; microarray ; multiplex PCR ; respiratory tract infections ; single nucleotide polymorphism