

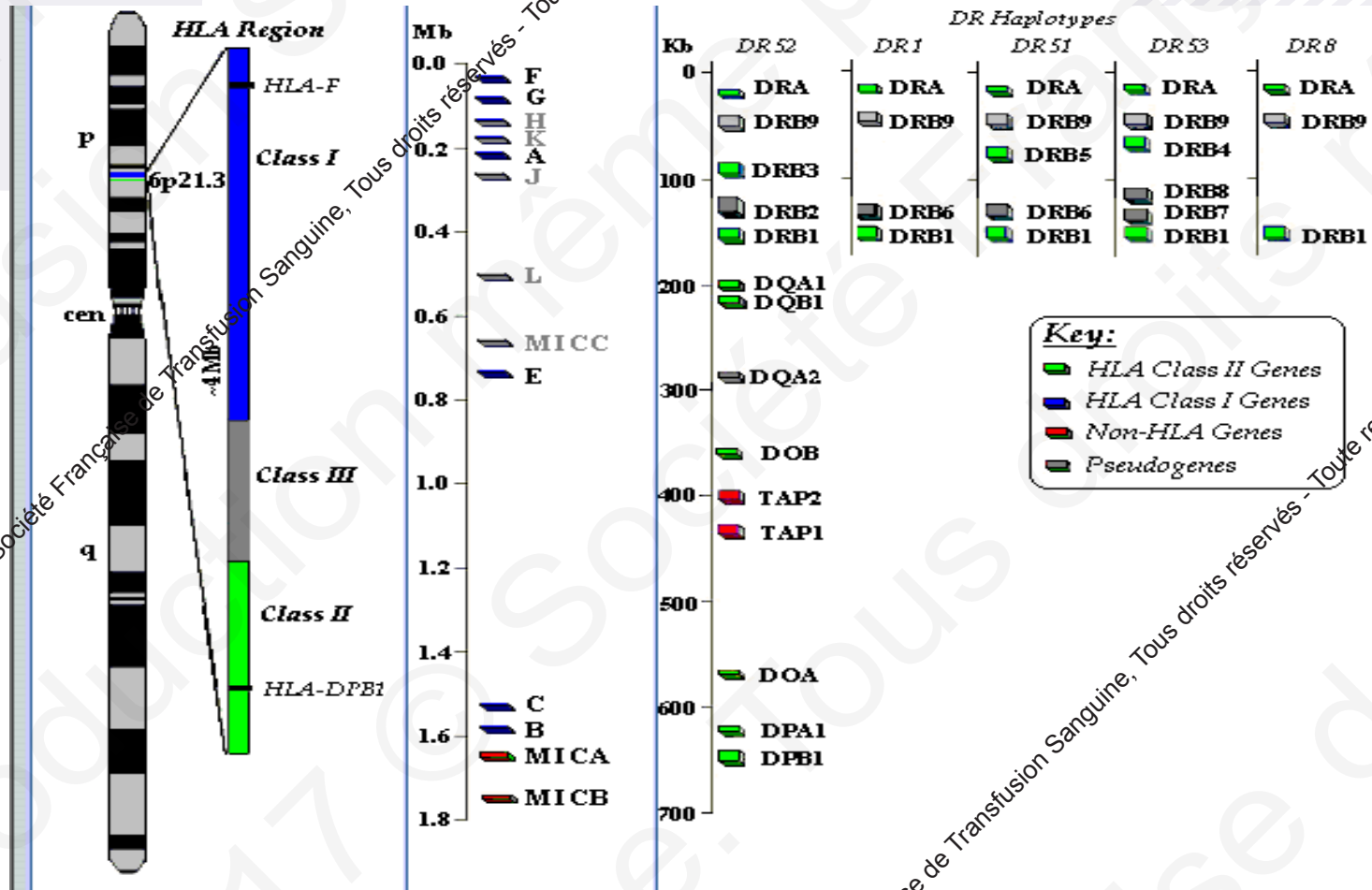
2017 © Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle.



L'APPROCHE NGS, UNE RÉVOLUTION MÉTHODOLOGIQUE DANS LA DÉTERMINATION HAUTE RÉOLUTION DU GÉNOTYPAGE HLA

© Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

CARTOGRAPHIE DES GENES HLA



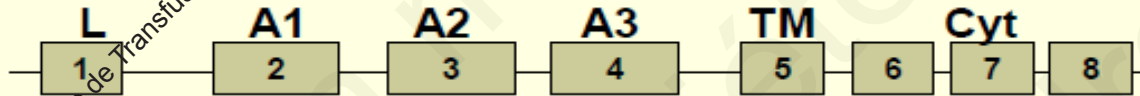
© Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

© Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

ORGANISATION DES GENES HLA

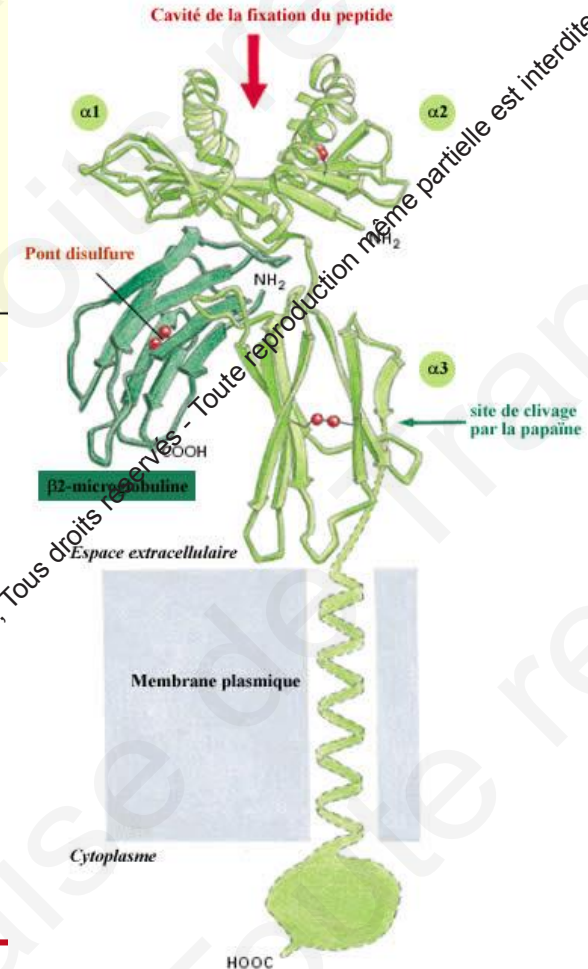
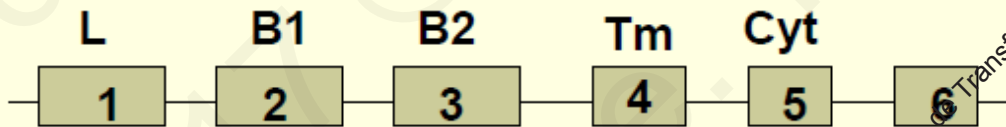
Class I Alpha Chain Locus

DNA (exons/introns)



DR Beta Chain Locus

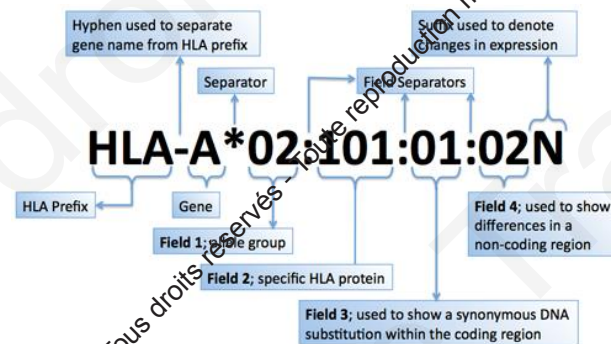
DNA (exons/introns)



UN POLYMORPHISME EXTRÊMEMENT ÉTENDU

- Le nombre d'allèles HLA est devenu tellement important, (Janvier 2017 plus de 15 000 allèles) que les anciennes règles de nomenclature étaient insuffisantes.

Face à cette complexité les méthodes classiques (y compris SBT) ne sont plus suffisantes car trop lourdes à mettre en œuvre pour une étude complète du polymorphisme. Le NGS en utilisant la puissance des nanotechnologies permet une approche exhaustive: production de millions de séquences en une réaction unique



PERFORMANCES DU NGS APPLIQUÉ AU HLA

Méthode applicable à une utilisation de haut débit, permettant d'analyser dans un process unique, l'ensemble des gènes HLA d'un grand nombre d'individus, avec un très haut niveau de résolution.

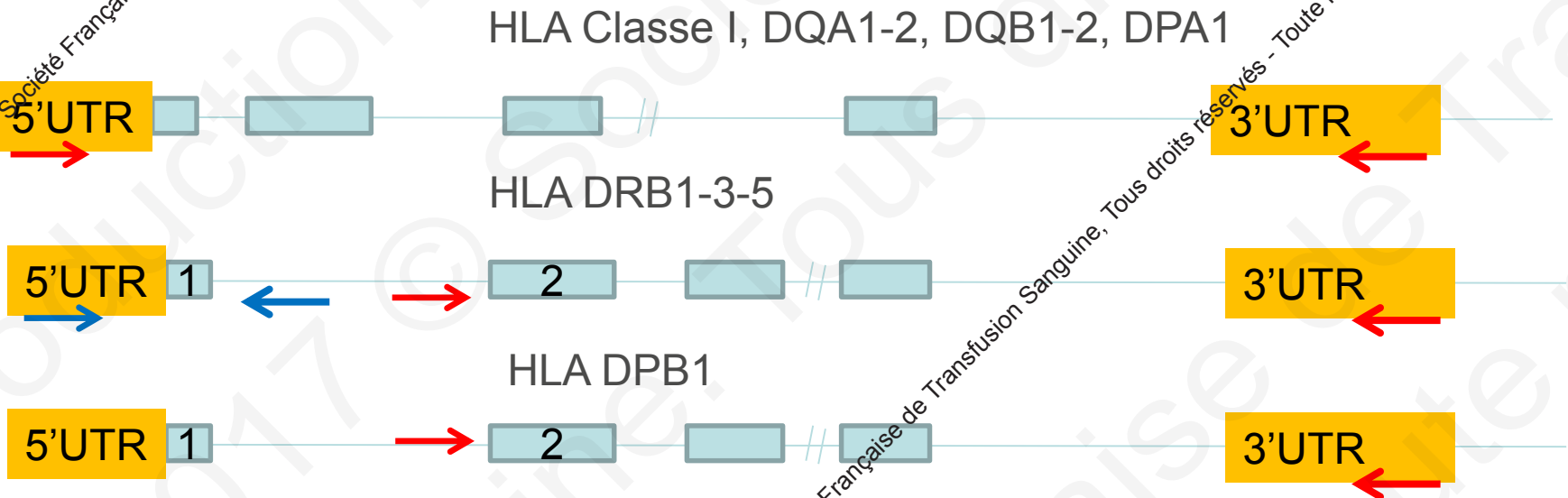
Cette performance est liée à la particularité de la méthode à pouvoir séquencer en parallèle des millions de fragments d'ADN et de pouvoir étudier chacun des gènes HLA sur toute sa longueur.

↪ DIFFERENTES ETAPES DU PROCESS

- 1- Amplification par PCR des gènes d'intérêt
- 2- Constitution de la librairie
- 3- Réaction de séquençage
- 4- Analyse

OBJECTIF DE L'EFS

- ➔ Développer des réactifs et un logiciel adapté pour une analyse exhaustive de l'ensemble des gènes HLA par la technique NGS. Les amorces sélectionnées permettent l'amplification de l'intégralité de chacun des gènes, dans des conditions expérimentales de PCR identiques en garantissant que tous les allèles de chacun des locus soient amplifiés



LE PRINCIPE DE LA LIBRAIRIE

➤ DEFINITION

Etape qui consiste à transformer les produits de PCR pour permettre une réaction de séquençage en une seule étape pour tous les gènes étudiés et pour tous les échantillons de la série et ceci sur un support unique.

➤ PRINCIPE

A chaque extrémité des fragments sont collées:

des séquences uniques complémentaires de l'amorce de séquençage utilisée afin de permettre le séquençage en parallèle de tous les segments d'ADN dans la même réaction

des séquences permettant la fixation sur le support.

Les fragments d'ADN issus de tous les individus étant poolés dans une même réaction, une phase d'indexation qui consiste à coller à chaque fragment une séquence unique pour chaque individu (l'index) est réalisée pour attribuer au final à chaque séquence, l'individu dont il est issu.

CONSTRUCTION DE LA LIBRAIRIE

➤ ETAPE 1 : Fragmentation des produits de PCR

- ◆ Consiste en une fragmentation aléatoire des produits de PCR obtenus,



➤ ETAPE 2 : Réparation des extrémités et addition de Linker

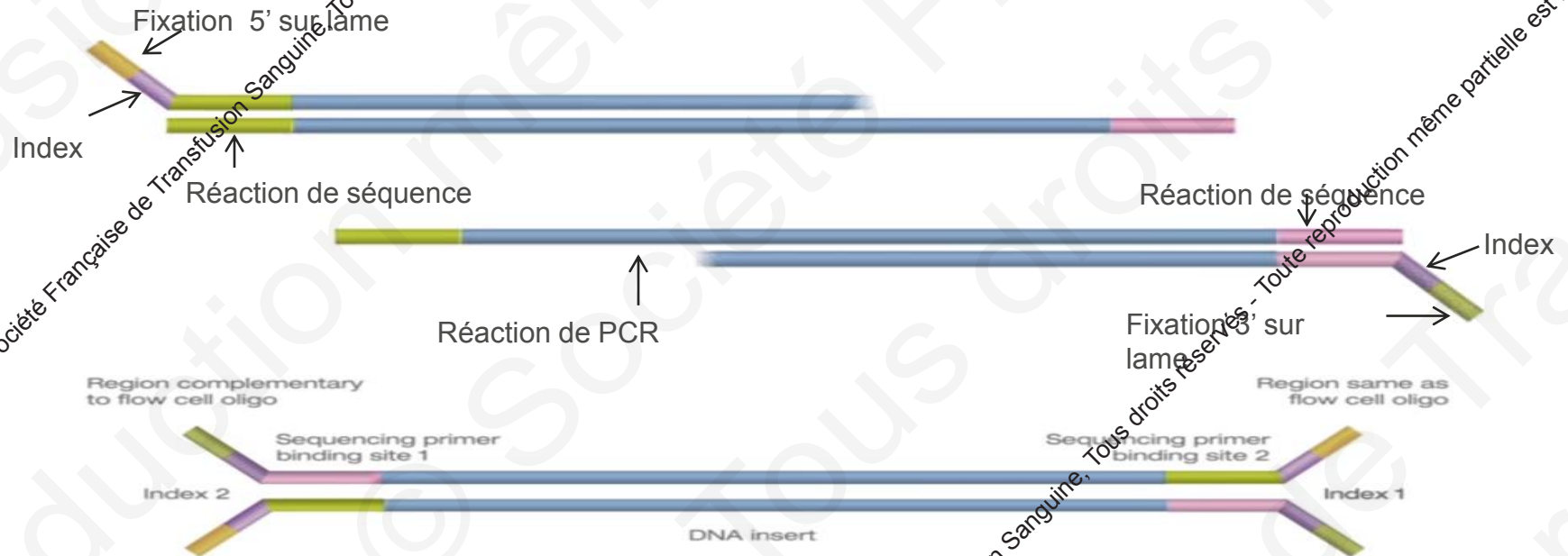
- ◆ Réparation qui consiste à obtenir des bouts francs pour chaque fragment (action enzymatique de T4 polymérase)
- ◆ Adenylation de chacun des bouts francs (action enzymatique) pour optimiser l'étape ultérieure de ligation.
- ◆ Ligation de séquences adaptatrices qui permettront la réaction de séquençage.



CONSTRUCTION DE LA LIBRAIRIE

➔ ETAPE 3 : Indexation des fragments

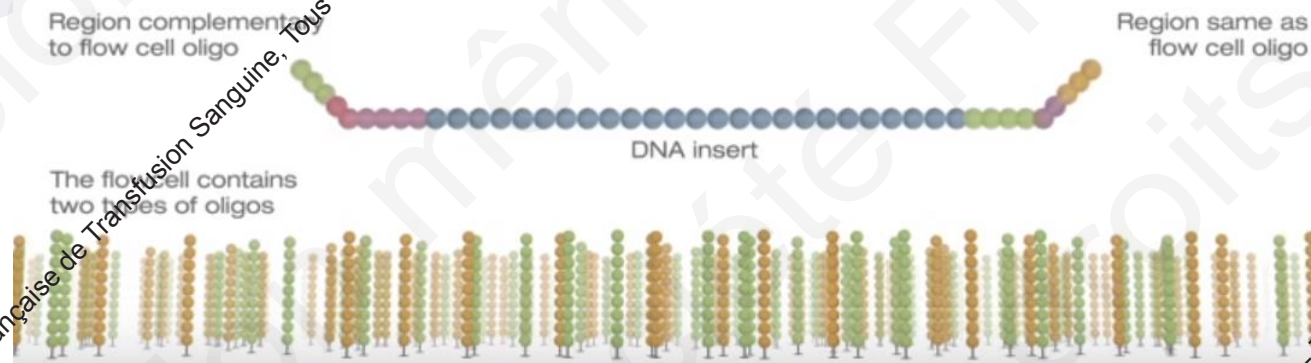
- Addition d'une séquence variable pour chaque individu (index) et d'une séquence constante pour tous les fragments permettant la fixation sur le support.



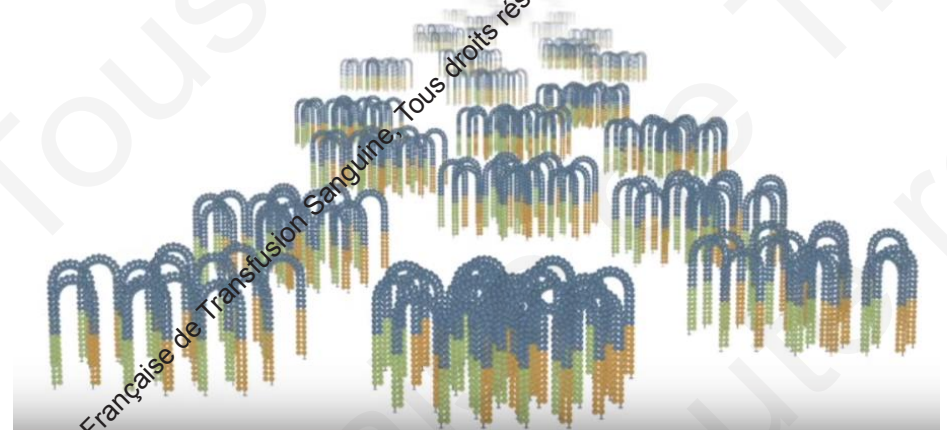
- Tous les fragments obtenus sont alors poolés pour une réaction de séquençage unique en parallèle. Grâce à l'index, chaque séquence sera attribuée à l'individu dont elle est issue.

LA REACTION DE SEQUENÇAGE (1)

- ◆ Des millions d'adaptateurs sont fixés sur le support de séquençage.
- ◆ Chaque fragment simple brin va se fixer sur son adaptateur.

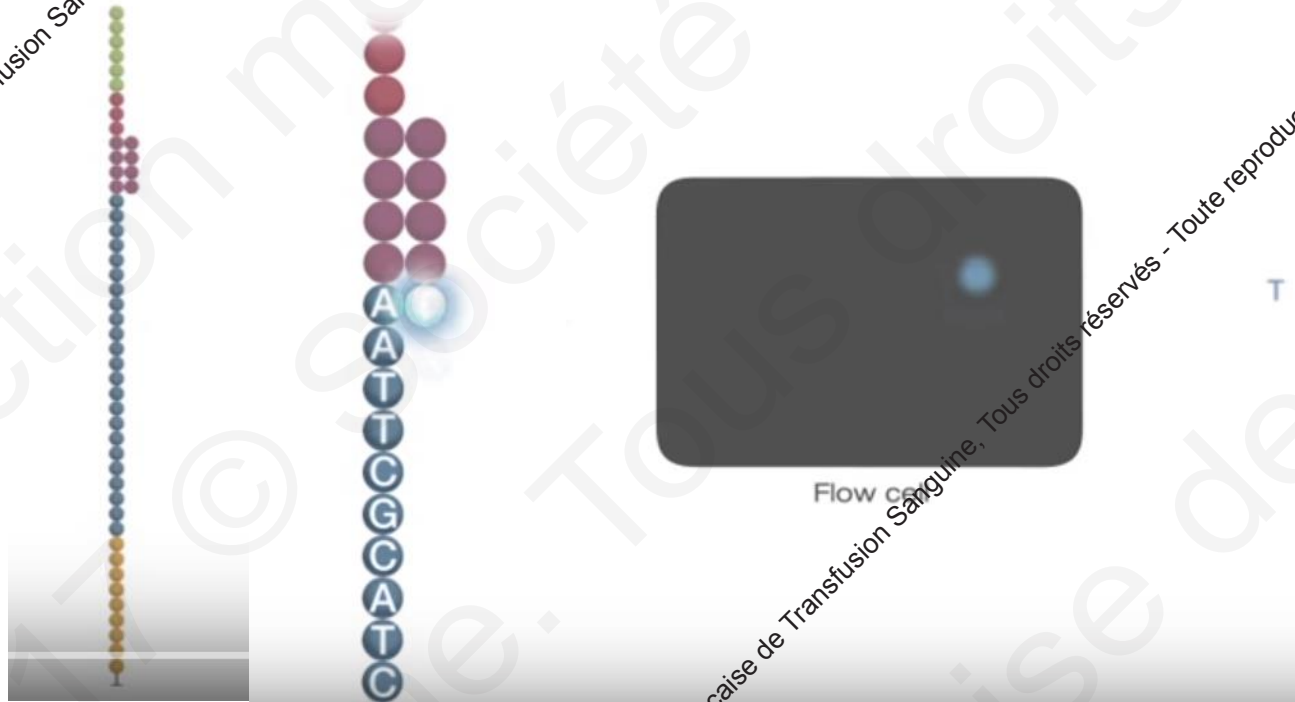


- ◆ Une réaction de PCR sur lame va s'opérer pour obtenir des clusters de chaque fragment (environ 1000 copies nécessaires pour l'intégration d'un signal fiable).



REACTION DE SEQUENÇAGE (2)

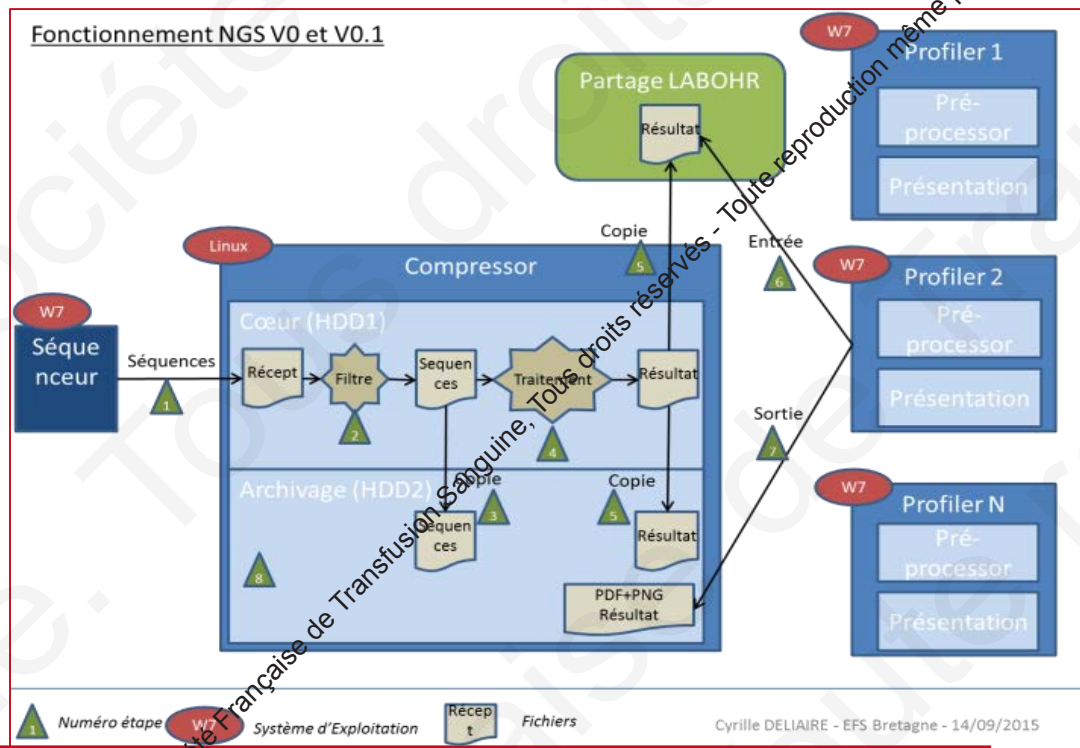
- ◆ A ce stade pourra s'opérer la réaction de séquençage par intégration des nucléotides marqués par des fluorochromes



ANALYSE DES SEQUENCES

- ◆ Chaque cluster produit une ligne de séquences comprenant ses propre index
- ◆ Le système Illumina regroupe dans un même fichier les séquences de même index , créant autant de fichiers que d'index représentés dans la série (nombre d'échantillons).
- ◆ Ces séquences vont être ensuite analysées par un logiciel adapté qui va assembler les séquences produites, les aligner et les comparer à la base de référence IMG_T pour attribuer un génotypage à chaque construction.

- ◆ Un logiciel adapté à l'analyse des gènes HLA a été développé par l'EFS pour cette étape



INTERFACE UTILISATEUR

Profilier Version 0.0.01 (Rev 2.0.160) - Environnement: PRODVAL160 sur workstation-104980 - 9024-amorces.png.gz (Version IMGT/HLA Release: 3.23.0)

Fichier Options Connexion

9024-amorces.png.gz C:\Users\10001573\Documents\Mes Documents\MEHD\ Evénements

Zoom Afficher 2 références Corr. ins. sur 0 Séq. R.B. Différences Debug Section

Locus

A B C DRB1 DRB2 DRB3 DRB4

DRB5 DMA DMB DOA DOB DPA1 DGA1 DRA

E F G HFE H J K L

MICA MICB P TAP1 TAP2 V Y 2DL

1 3

Construction G? F C

HLA-A*02:06:01:01

HLA-A*11:01:01:01

HLA-A*02:06:01:03

HLA-A*02:06:13

D0 - Exon 1 - 28

D1 - Exon 1 - 48

D2 - Exon 2 - 78

D3 - Exon 2 - 144

D4 - Exon 2 - 240

D5 - Exon 2 - 256

D6 - Exon 2 - 257

Corrections:

HLA-A*02:06:01:01
6607 séquence(s)

Phase: Résultat(s)

HLA-A*02:06:01:01

Nb Séq. LIB	AIB	PrM PrM E23	TM Read	Map%	PCE	BCR	SUQM
5607	52	308	108	99	100	100	0
16,49		357	330		100	100	
			494				

Consensus

HLA-A*11:01:01:01
6136 séquence(s)

Phase: Résultat(s)

HLA-A*11:01:01:01

Nb Séq. LIB	AIB	PrM PrM E23	TM Read	Map%	PCE	BCR	SUQM
5136	47	320	108	99	100	100	0
16,49		448	324		100	100	
			491				

2

MM-Exon Lié?

MM-Intron Lié?

Insertion Ac...

Sélection...

MM-Exon Lié?

MM-Intron Lié?

Insertion Ac...

ILLUSTRATION DES PERFORMANCES DE L'OUTIL

Protocole expérimental

- ➔ 43 échantillons complexes, sélectionnés parmi les ADN étudiés dans les étapes préalables de validation de la méthode ont été analysés en aveugles par 4 laboratoires de l'EFS indépendants de l'équipe conceptrice (Bordeaux , Grenoble, Lyon et Marseille).
- ➔ Dans le panel étudié, présence d'allèles rares et de nouveaux allèles non encore décrits dans la nomenclature internationale.
- ➔ Protocole technique: réactifs NGS HLA développés par l'EFS (NG-Mix), réactif de librairie GenDX, réactif de séquençage Illumina.
- ➔ Méthode d'analyse: Utilisation du logiciel développé par l'EFS (NG-View), et comparaison des résultats avec les résultat de référence obtenus par les technique SBT, SSO et SSP.
- ➔ Locus étudiés: HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB5, DQB1, DPB1

RÉSULTATS (1)

Etude de concordance

➔ Nombre total d'allèles identifiés = 561

- 516 allèles A, B, C, DRB1, DQB1 et DPB1

- 45 allèles DRB3 et DRB5 (chaînes associés au locus DRB1)

➔ Concordance avec les résultats de référence à 4 digits:

- concordance entre les résultats des 4 laboratoires et les résultat de référence dans 559 cas sur 561 allèles testé

- Pour deux allèles un laboratoire sur 4 ne retrouve pas l'allèle de référence (1 cas de non amplification et un cas d'erreur d'interprétation)

➔ Concordance observée 99,6%

RÉSULTATS (2)

Performances du système au delà de 4 digits

➔ Parmi les 550 allèles:

● 202 allèles décrits à un niveau de 6 digits:

- dans 100% des cas, ce niveau de résolution est atteint dans tous les laboratoires sans ambiguïté

● 278 allèles sont décrits à un niveau de 8 digits:

- dans 229 cas (82,4%) ce niveau de résolution est atteint par les 4 laboratoires.
- Dans 49 cas, les ambiguïtés , uniquement au 8eme digit sont rendues de façon identique par les 4 laboratoires, ces ambiguïtés correspondent soit à des positions polymorphes en dehors des régions étudiées, soit à des polymorphismes situés au niveau des amorces.

ALLÈLES RARES ET NOUVEAUX ALLÈLES

↪ Allèles non communs inclus dans le panel (n=6):

HLA-B*44:167

HLA-B*08:106

HLA-B*15:31

HLA-C*07:300

HLA-C*15:13

HLA-C*06:82

Dans 100% des cas retrouvés par les 4 laboratoires

↪ Nouveaux allèles:

25 nouveaux allèles détectés par les 4 laboratoires avec les mêmes mutations jusque là non décrites

- 3 mutations Exoniques générant des polymorphismes traduits par des AA différents
- 22 mutations Introniques

POTENTIALITÉS OFFERTES PAR L'APPROCHE NGS

- Approche haut débit possible avec un cout unitaire réduit
 - ◆ Particulièrement intéressant pour les registres DVMO
- Meilleur niveau de résolution des typages
 - ◆ Evaluation à réaliser pour la relevance clinique
- Possibilité avec l'outil proposé d'explorer dans la même réaction les gènes HLA non classiques polymorphes (HLA-E, F et G) et d'évaluer leur intérêt clinique.
- Intérêt cognitif par la description de polymorphismes non connus
 - ◆ soit des gènes classique (nouveaux allèles)
 - ◆ Soit des gènes non encore explorés (DQA2, DQB2)
- Optimisation de la caractérisation des haplotypes étendus
 - ◆ Intérêt dans la greffe de CSH