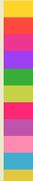


16^{ème} journée AFTLM - 2019



La PCR Digitale

 Hôpital universitaire
mère-enfant
Robert-Debré



Cédric VIGNAL
Ingénieur en biologie
Laboratoire de Génétique Moléculaire



PCR Digitale

- ▶ Principe de la PCR digitale
 - ▶ Équipements de PCR digitale
 - ▶ Etapes de validation d'une technique
 - ▶ Applications de la PCR digitale
 - ▶ Conclusion
- 

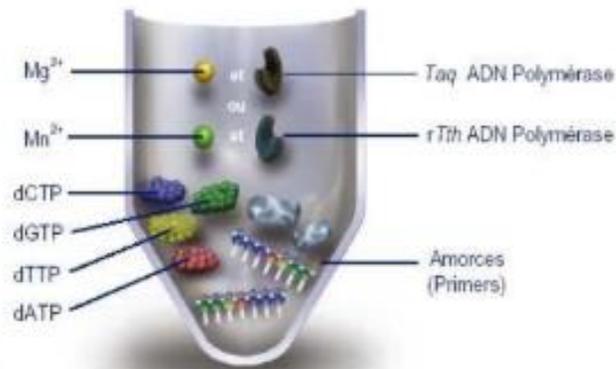
La PCR digitale

Etape 1: préparation du Mix

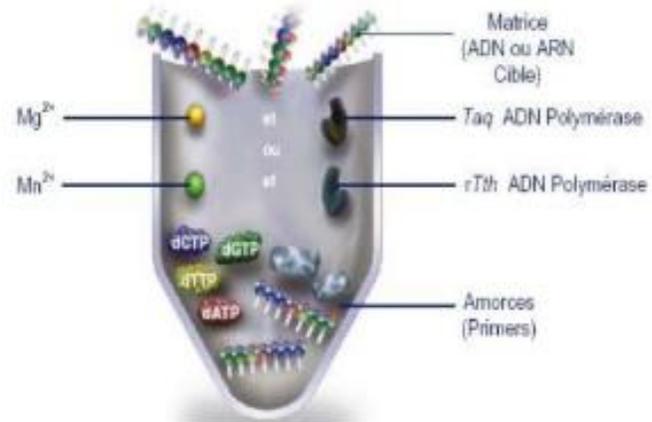
- Composants d'une PCR

Milieu réactionnel :

- dNTP
- Magnésium
- ADN polymérase
- Deux types d'amorces



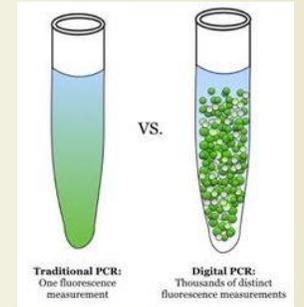
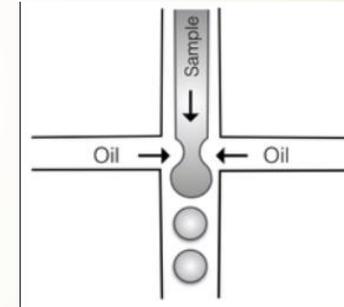
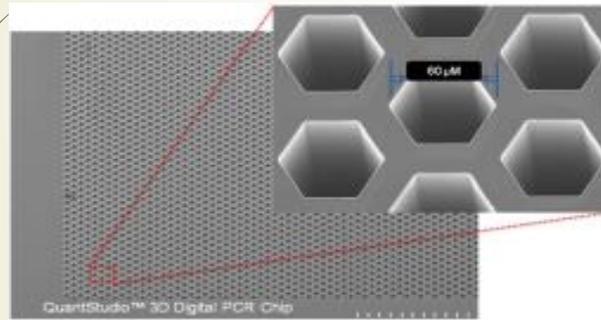
On ajoute en suite l'ADN extrait du milieu biologique à étudier au mix :



PCR digitale :

Etape 2 : compartimentation

- ▶ Augmentation de sensibilité en évitant les PCR en dilution limite d'ADN=>
 - ▶ L'idée est de compartimenter le mix
 - ▶ Micro puits ou gouttelettes lipidiques

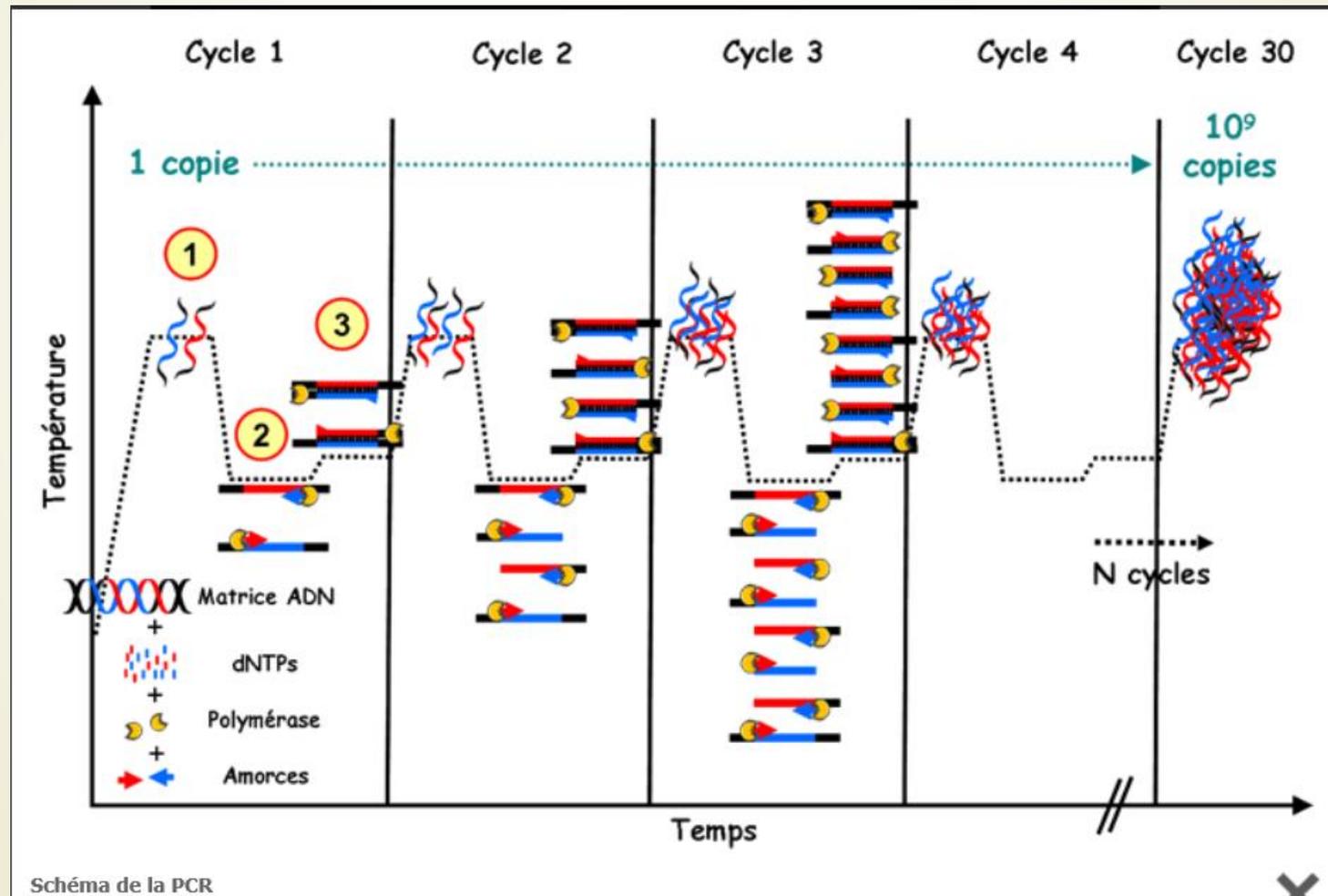


- ▶ **Chaque compartiment contient Mélange réactionnel + ADN**
 - ▶ **Nombre restreint de molécules d'intérêt par compartiment (0 à 2 ou 3)**

PCR digitale

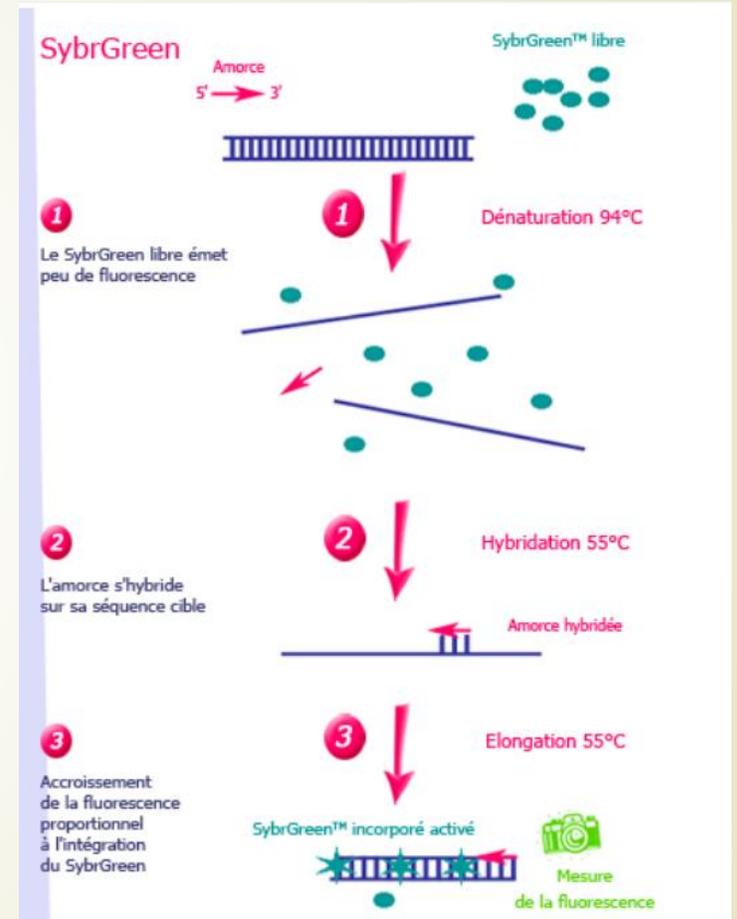
Etape 3 : Amplification

Dans chaque compartiment



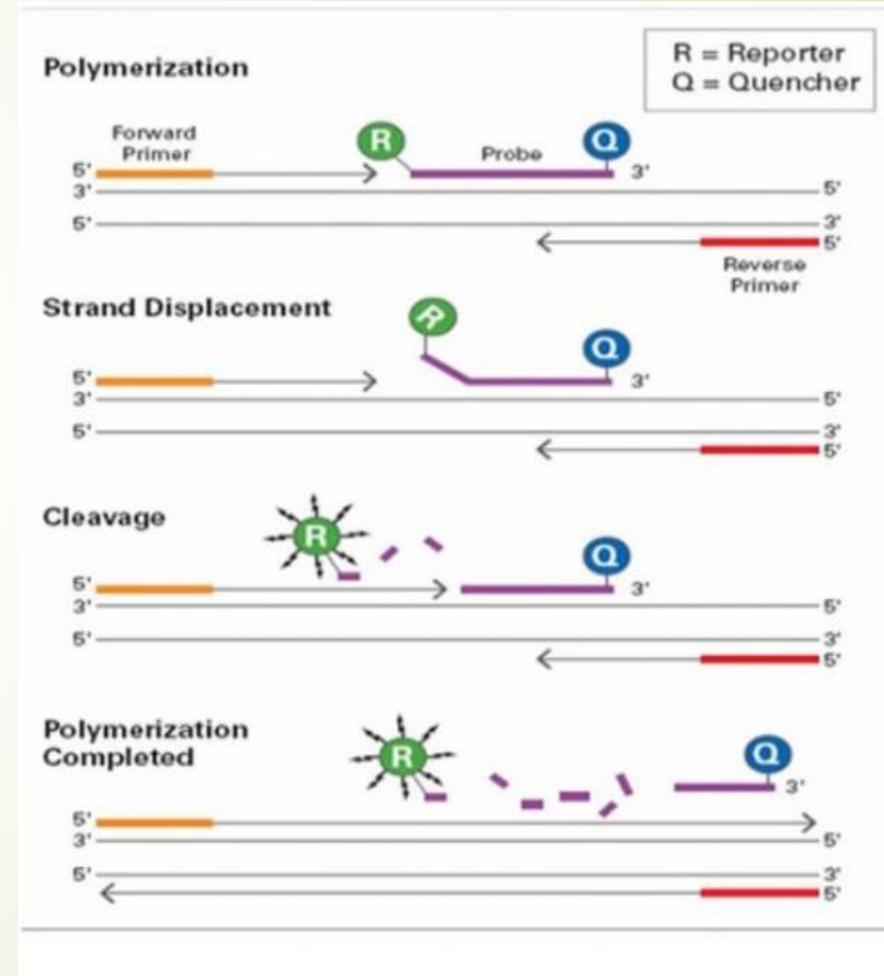
PCR digitale : moyen de détection de la séquence amplifiée

- Soit par intercalant de l'ADN double brin
- EvaGreen = SybrGreen



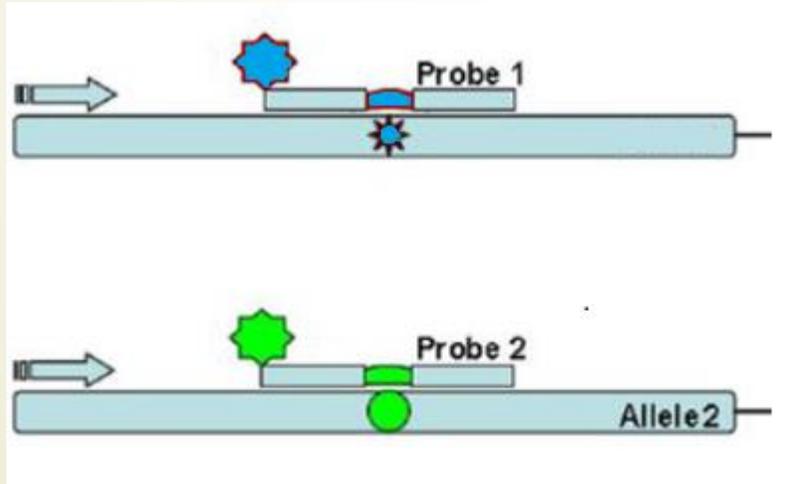
PCR digitale : moyen de détection de la séquence amplifiée

- Soit par intercalant de l'ADN double brin
- Soit par utilisation sonde d'hydrolyse



PCR digitale : moyen de détection

- ▶ Soit par intercalant de l'ADN double brin
- ▶ Soit par utilisation de sonde spécifique
 - ▶ **Multiplexage**

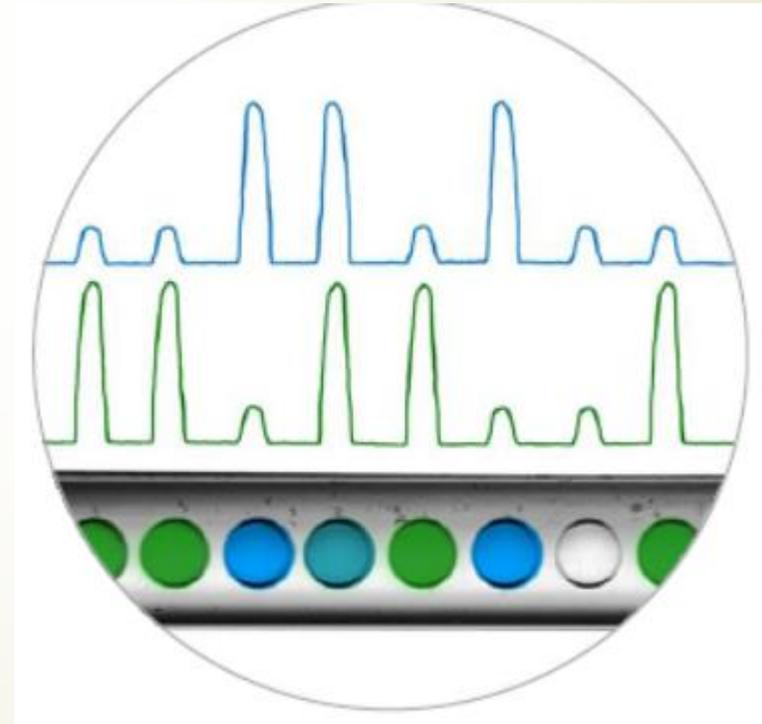
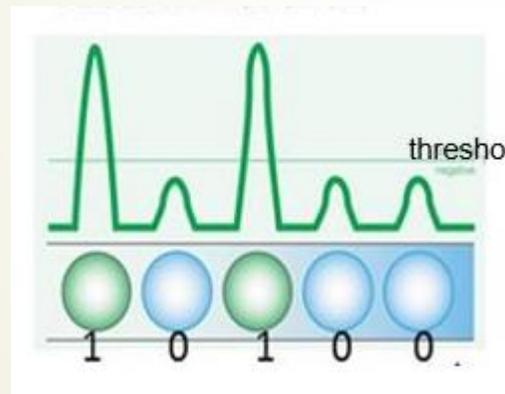


Allèle Muté

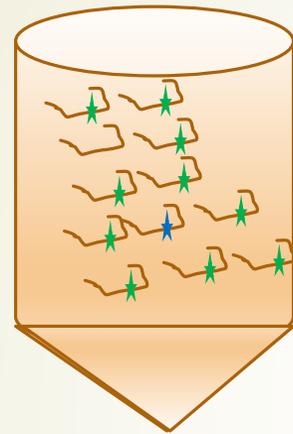
Allèle Normal

PCR Digitale : résultat

- ▶ Détection en point final au plateau de la PCR
- ▶ Compartiment positif ou non => PCR Numérique

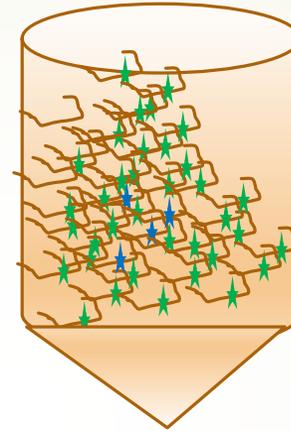


PCR quantitative par sonde d'hydrolyse



Solution d'ADN
Mix
Amorces
Sondes

Amplification
par PCR



Lecture de
fluorescence
Analyse globale

Emission de
fluorescence



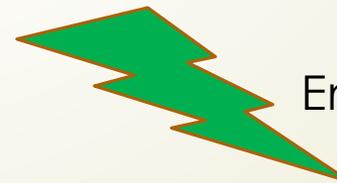
ADN muté
minoritaire



ADN Normal
Majoritaire

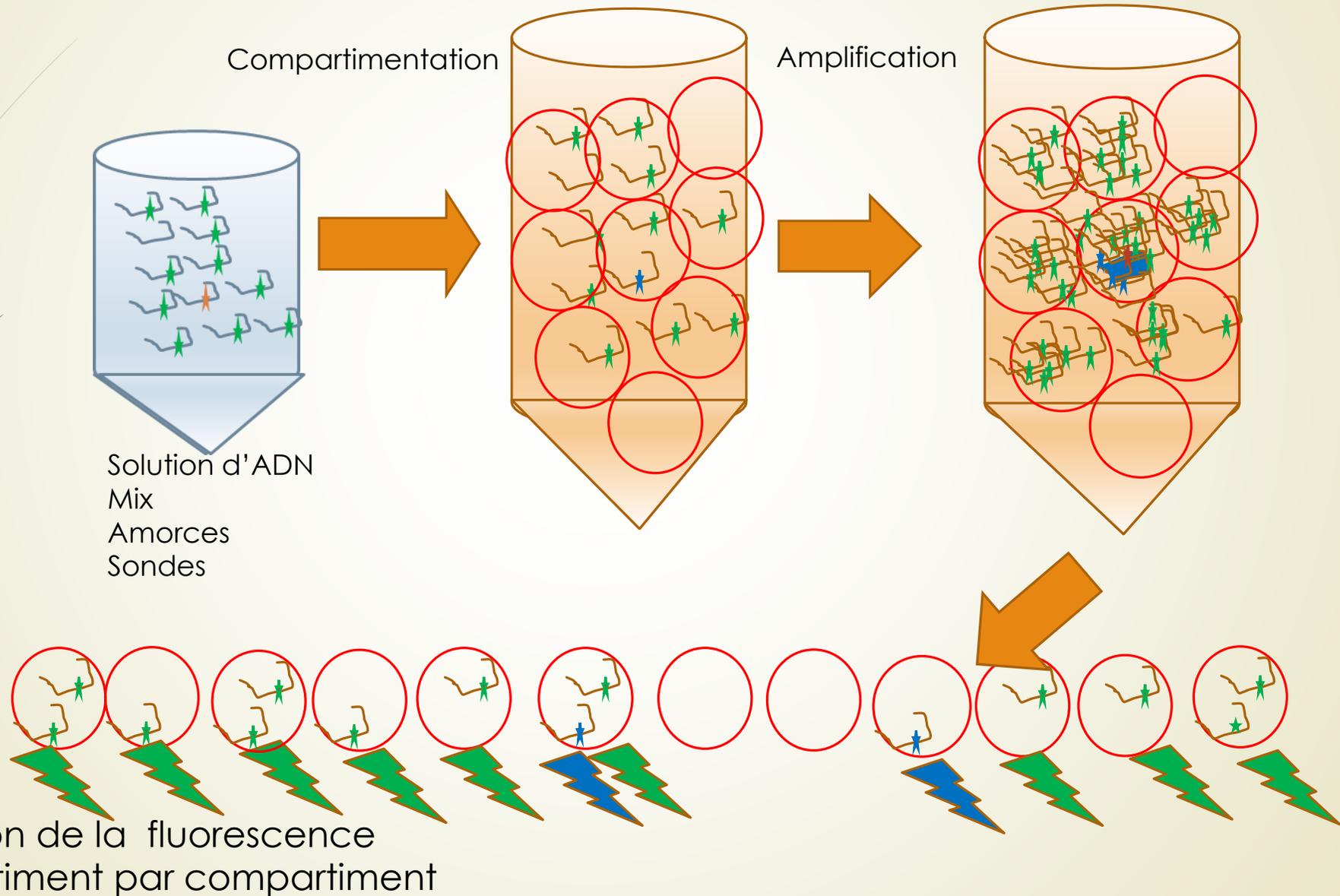


Faible émission proche du
bruit de fond



Emission détectable

Principe de la PCR digitale



PCR Digitale : contexte

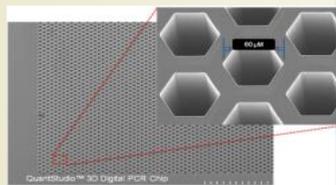
- Besoin de sensibilité de détection de mutation :
 - Séquençage Sanger > 10%-15%
 - Séquençage NGS 2-5% dépend de la profondeur de lecture
- Détection **des mutations minoritaires**



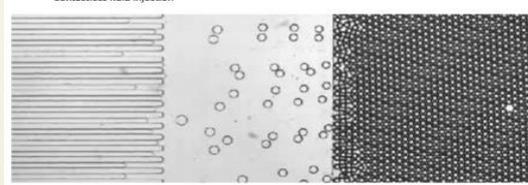
- Quantification absolue (sans gamme de standards => utilisation de la loi de Poisson)

Les équipements

Compartiments solides



Life Technologies™
QuantStudio 3D®



Stilla Technologies™
Naica System®

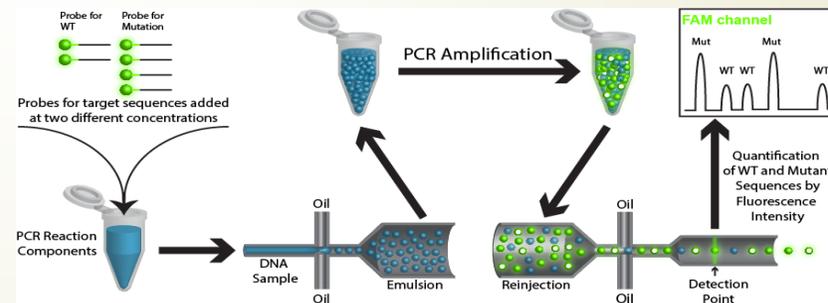
Compartiments liquides



RainDance™
Rain Drop®



Bio-Rad™
Qx200®



PCR digitale en micro-compartiments

I. Détection sensible de séquences d'acides nucléiques rares

Karla Perez-Toralla,^{1*} Deniz Pekin,^{1,2*} Jean-François Bartolo,¹ Fanny Garlan,¹ Philippe Nizard,¹ Pierre Laurent-Puig,¹ Jean-Christophe Baret,^{2,3} and Valérie Taly^{1a}

¹Université Paris Sorbonne Cité, Inserm UMR-S1147, 45, rue des Saints-Pères, 75270 Paris, France

²Droplets membranes and interfaces, Max Planck institute for dynamics and self-organization, Am Fassberg 17, D-37077 Göttingen, Allemagne

³Soft micro systems, CNRS, université de Bordeaux, CRPP, UPR 8641, 115, avenue Schweitzer, 33600 Pessac, France

^avalerie.taly@parisdescartes.fr

*Les deux auteurs ont eu une contribution égale.

Les équipements : comparatif

fournisseur	Life Technologies™ QuantStudio 3D®	Stilla Technologies™ Naica System®	Raindance™ RainDrop®	Bio Rad™ QX200®
Nombre de compartiments exploitables / échantillon	20 000	30 000	10 000 000	20 000
Nombre d'échantillons maximum par série	24	12	8	96
Nombre de canaux de détection	2	3	2	2

Workflow Qx200 (Bio-Rad)

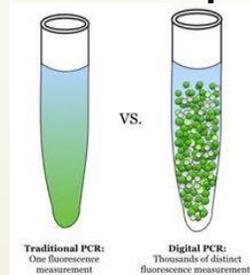


Mix + ADN

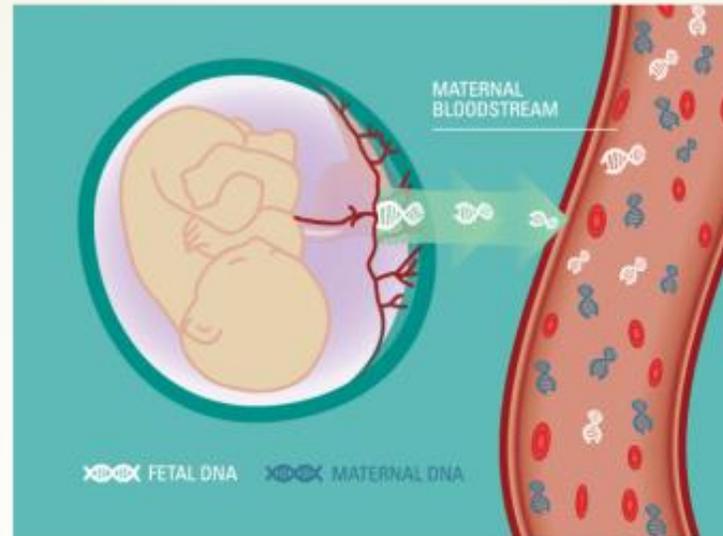
Compartimentation
génération de
gouttelettes

Amplification

Détection



Diagnostic Prénatal Non Invasif



- Présence d'ADN foetal libre circulant dans le sang maternel
 - Représente l'ensemble du génome foetal
 - Représente environ **0,5% à 12% de l'ADN circulant total**
 - **ADN de petite taille <150 pb**
 - **Pas physiquement séparable** de l'ADN circulant maternel
- Recherche de mutation chez le foetus par simple prise de sang chez la femme enceinte.
 - =>**Intérêt** : limiter les risques de complications

DPNI

- Tube de sang maternel



Extraction ADN circulant

- Maternel (90-95%)
- Foetal (5-10%)

Extraction ADN cellulaire Maternel

- Tube de sang paternel



Extraction ADN Paternel

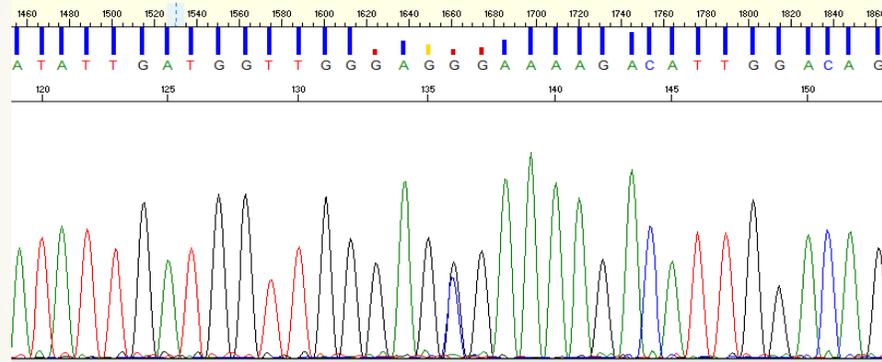


Quantification ADN foetal

- ▶ Analyse de 13 plasmas de femmes enceintes de 12-27 SA
- ▶ Concentration moyenne ADN foetal circulant :
 - ▶ $7,8 \pm 5,9$ pg/ μ L
 - ▶ ou $2,3 \pm 1,8$ copies d'ADN / μ L
 - ▶ ou $9,4 \pm 7,9$ % ADN circulant total

Exemple système de détection de mutation impliquée dans une Rasopathie

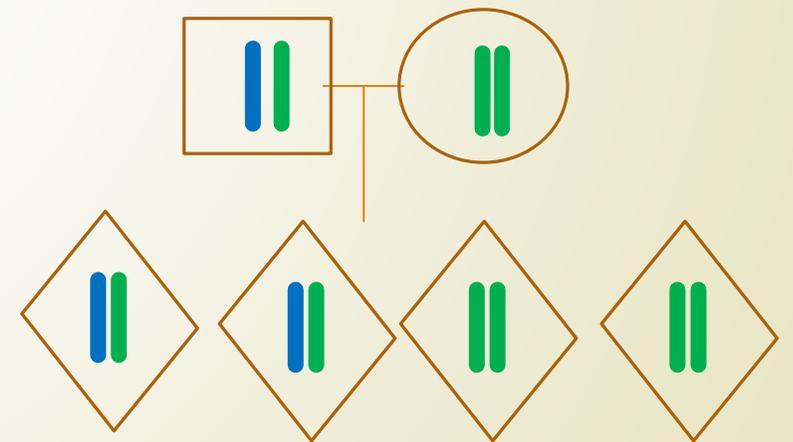
- ▶ Patient né en 1975
- ▶ Séquençage en 2011
 - ▶ Mutation :SOS 1 : c.1300G>C retrouvée cause de la maladie



- ▶ Rasopathie : Maladie Monogénique dominante (ex :syndrome de Noonan)
 - ▶ Clinique +/- marquée
 - ▶ Dysmorphie
 - ▶ Retard mental +/-
 - ▶ Anomalie cardiaque +/-
 - ▶ Assez fréquente

Rasopathie et Diagnostic Prénatal Non Invasif

- ▶ En 2019 : grossesse en cours
- ▶ Porteur de la mutation : le papa
- ▶ Maman homozygote « normal »
- ▶ **Quel est le statut du fœtus?**

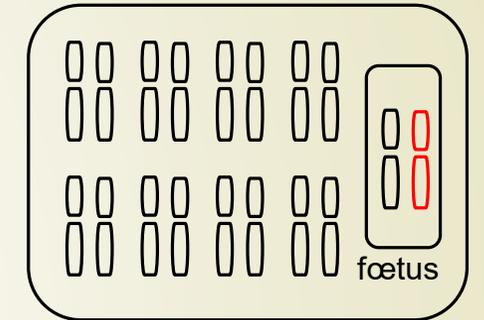
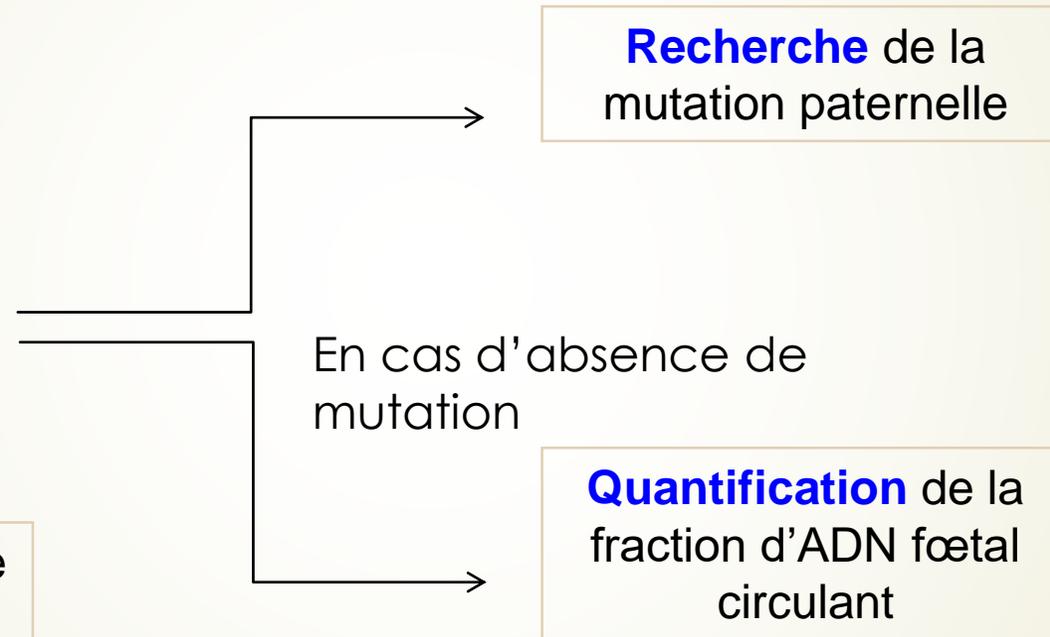


DPNI – Rasopathie

ADN foetal (gène *SOS1* : c.1300G>C)

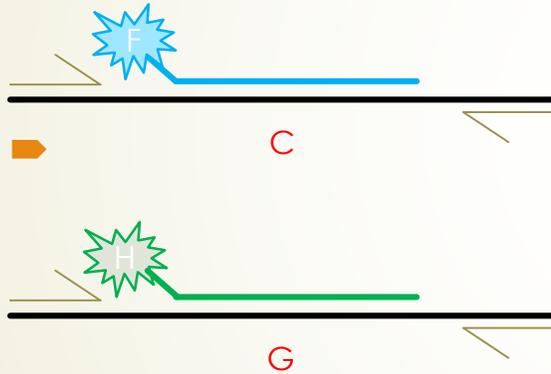


ADN plasmatique libre
circulant



Rasopathie : gène *SOS1* : c.1300G>C construction du système d'analyse

► Schéma sondes



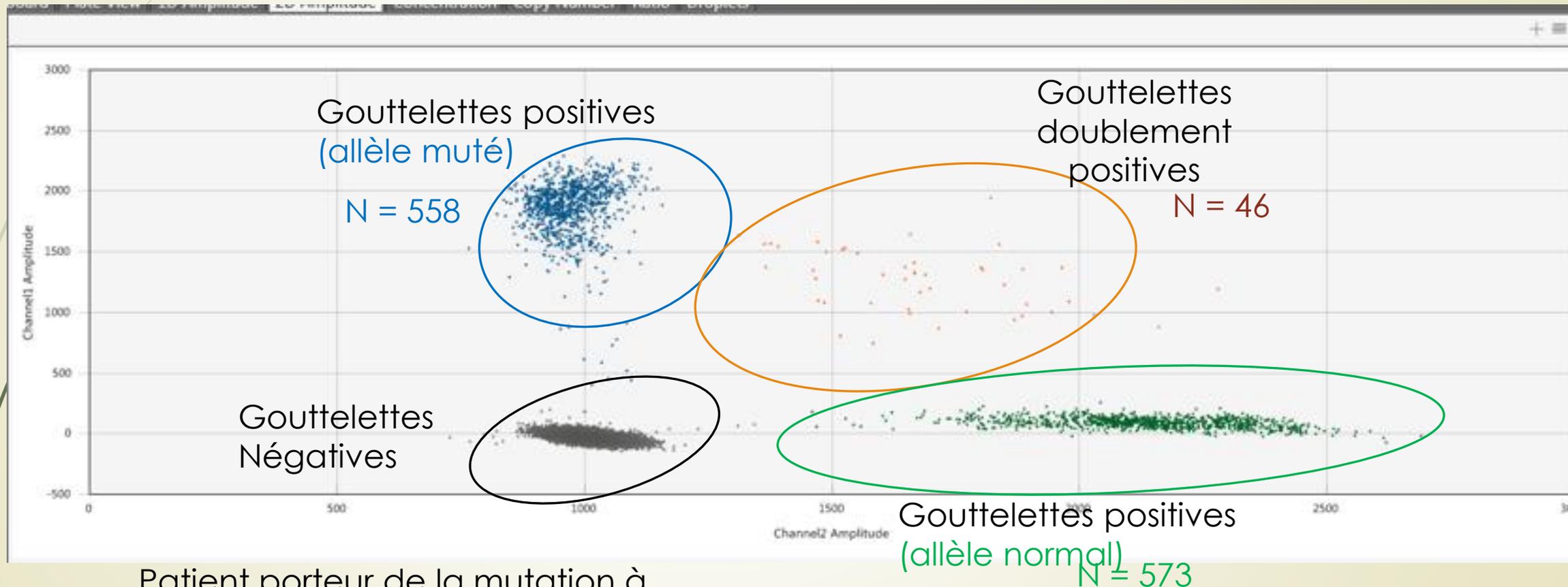
Sonde spécifique de l'allèle
muté marquée en FAM

Sonde spécifique de l'allèle
Normal marquée en Hex

Interprétation

Exemple système de détection de mutation impliquée dans une Rasopathie SOS 1 : c.1300G>C

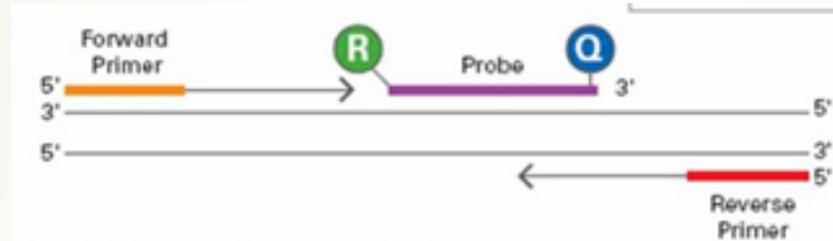
Technique valide si > 8000 gouttelettes détectées



Patient porteur de la mutation à l'état hétérozygote

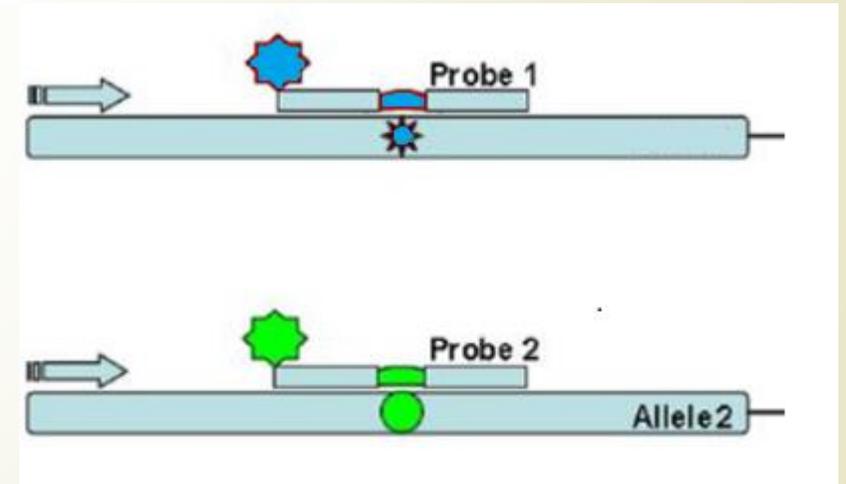
Mise au point du système PCR(1)

➤ Système PCR =



➤ Validation initiale : Détermination de la spécificité

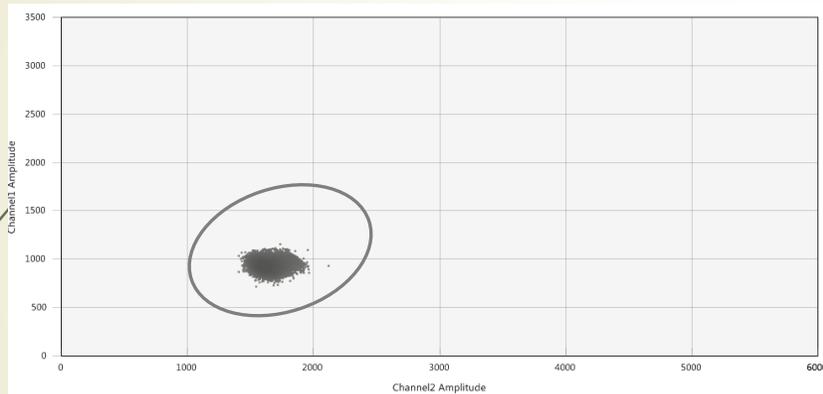
- Blanc – H₂O
- Témoin négatif - porteur de deux allèles normaux
- Témoin positif - porteur de la mutation



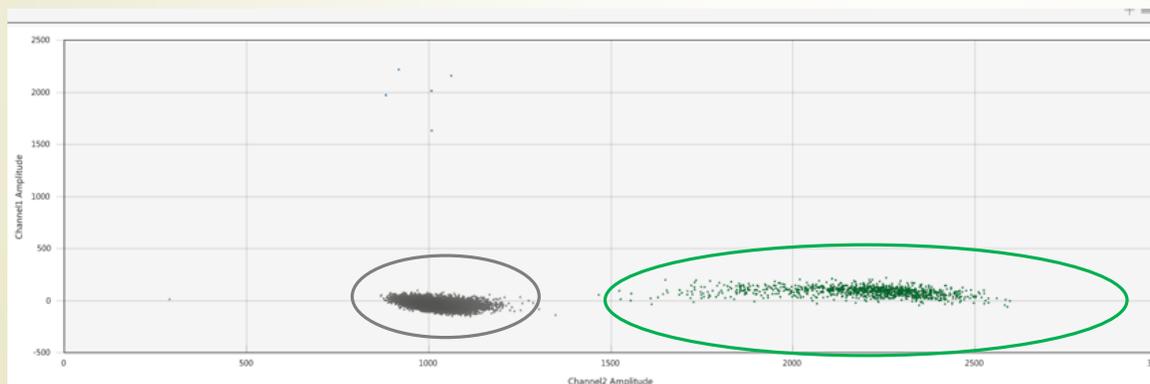
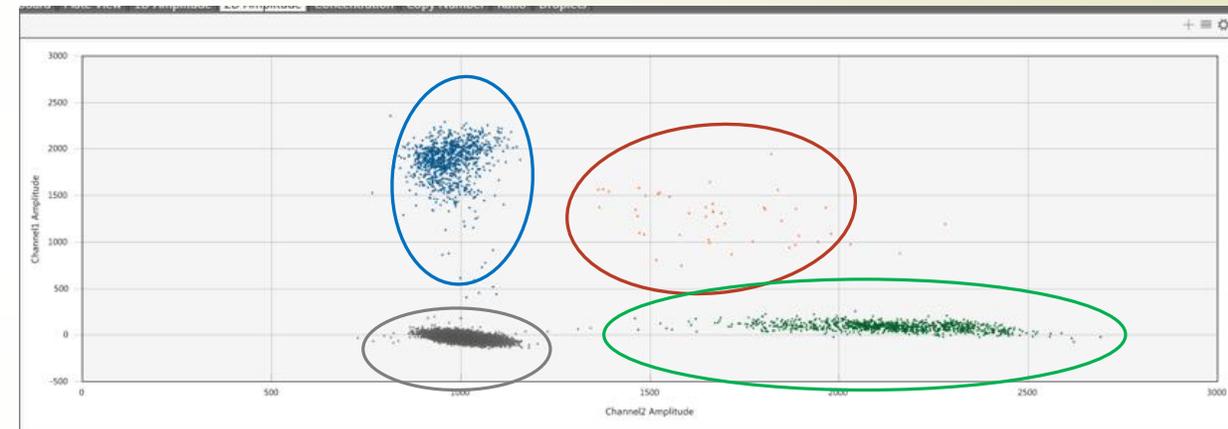
Validation de la spécificité

Exemple du système validé

Blanc (H₂O)
→ uniquement gouttelettes négatives



Témoin Positif : ADN muté hétérozygote
→ gouttelettes négatives,
Normales, mutées et doublement marquées

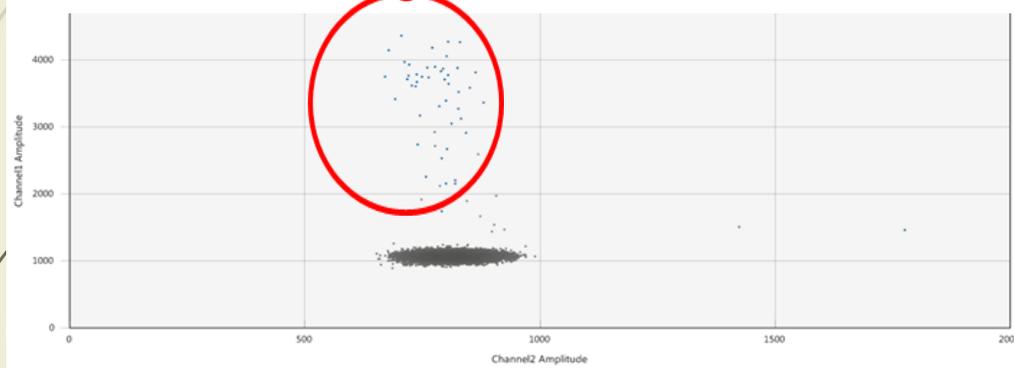


Témoin négatif
→ uniquement gouttelettes
négatives et Normales)

Exemple système non validé

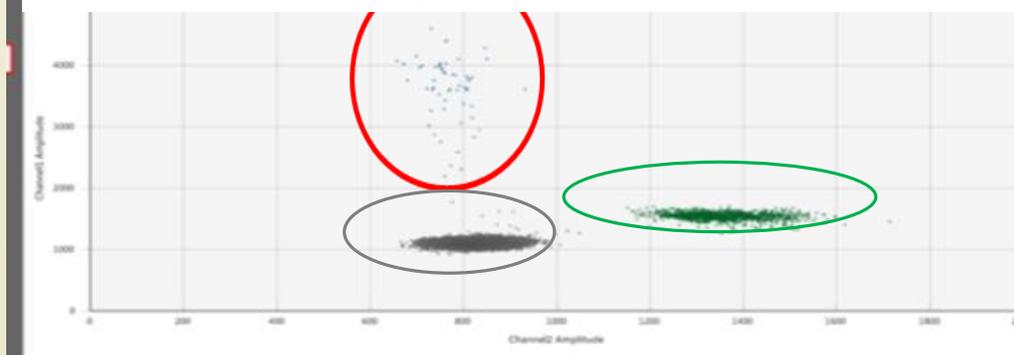
Blanc (H₂O)

→ Présence de gouttelettes Mutées



témoin négatif : Patient Normal

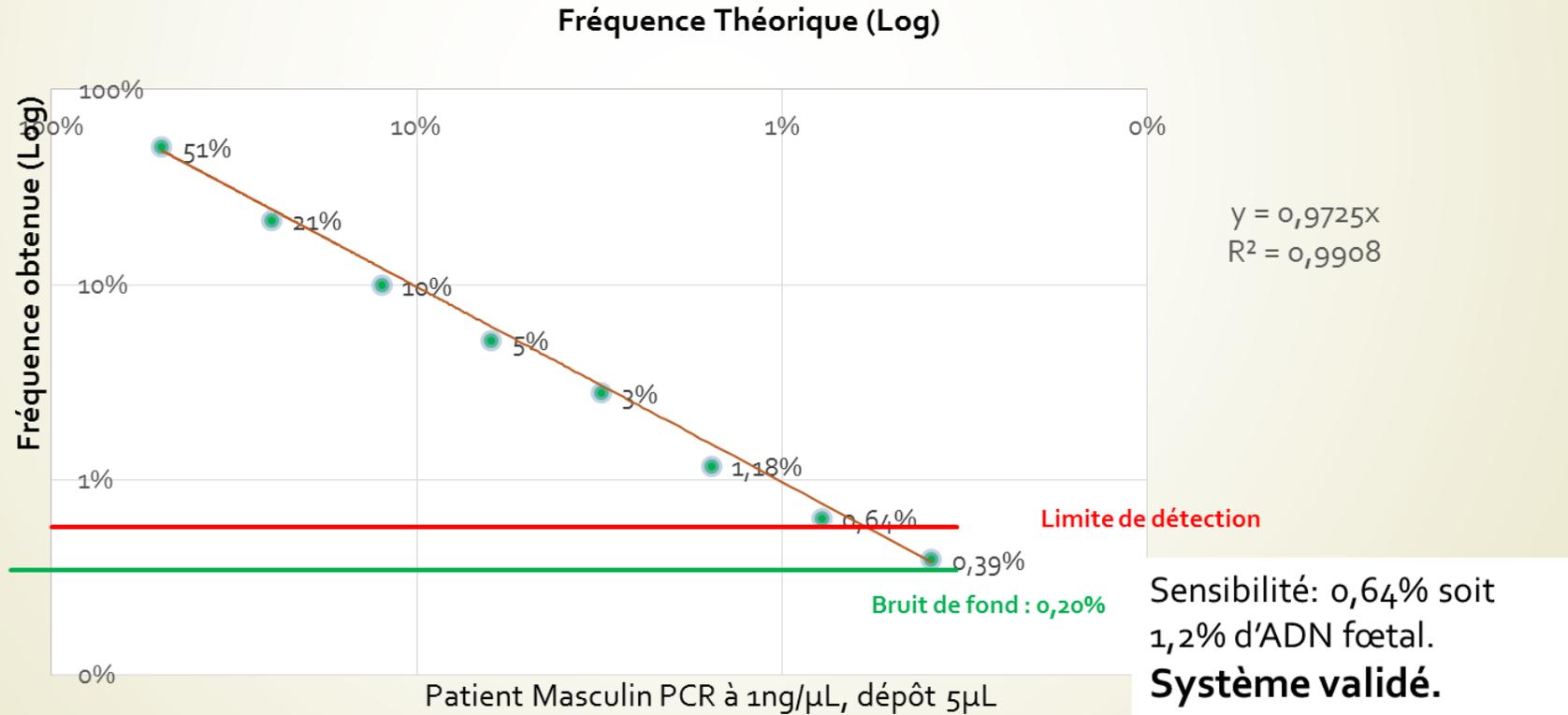
→ Présence de gouttelettes Mutées



Manque de spécificité

Mise au point du système (2)

- Détermination de la limite de linéarité
Dilutions successives d'ADN muté dans un ADN normal
- Détermination du bruit de fond et limite de détection
Analyse 10 témoins normaux : détermination du taux de faux positifs.



PCR digitale – limites

Echec de mise au point: lié à l'environnement génique des systèmes

répétition d'un nucléotide qui empêche design correct

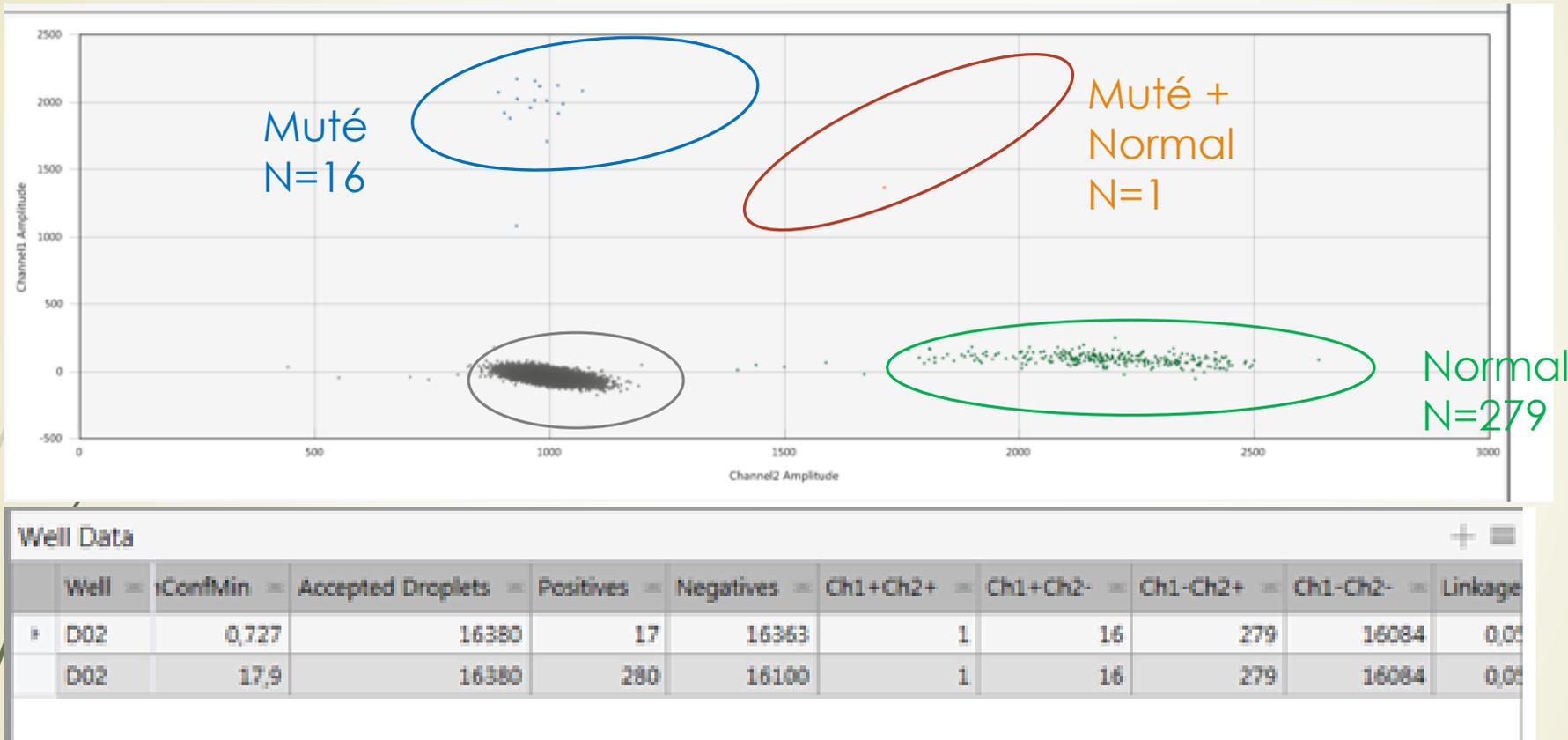
```
-TAAATTTGTT -CAGCCATTGT -GGAGAGCGGT -TTGGTGATT -CTCAAAGAAC -TTAGAACTAC¶  
-CTTTTGACCC -AGCAATCCCA -TACTGGGTA -TATACCCAAA -CGAAACTAAA -TCATTCTGCC¶  
-AAAAAAGGC -ATCACTCAT -ATGTTTCATTG -CAGCACTATT -ACAATAGCAA -AGACATGGAA¶  
-TCAACCTAGA -TGCCCATCAA -CAGTGGACTG -GATAAAGAAA -ATATGTTACA -TATACACCTT¶  
-GGAATGCTAC -GCAGCTATAG -AAAAGAACAA -GATCATGTCC -TTGGAGCCA -CATGGATGCA¶
```

polymorphisme fréquent trop proche

```
-TACCCATGCT -GAGTCTGAGG -TGCCTATAGG -ACATCTATAT -AAATAAGCCC -AGTACATTGT¶  
-TTGATATATG -GGTTGGCAG -TCAGGTTGGA -GGTCAGAGGT -TAGAAATCAG -AGTTGGGAAT¶  
-TGGGATTATA -CAGGCTGTAT -A/TTAAGATTT -AGATATAACT -GTGAATCCAA -GAGTGTGATG¶  
-AATACAAAGT -TAAATGAAGG -ACCTTTAATG -AACACCAACA -TTTAATGTGA -AATCTCAAGG¶  
-AAGTATGAAG -TAAGACATAG -TCCCCAAAT -CCCCGATGAT -TTTAGAACTC -AGTATCGATT¶  
¶
```

Analyse sur plasma

SOS1 c.1300G>C
Fraction Foetal = 10%



Proportion de muté / Normal = 6% > limite de quantification

**Valeur Interprétable pour le système
Foetus porteur de la mutation**

=> Concordant avec le résultat Diagnostic Prénatal Invasif

Maladies monogéniques récessives ex : Drépanocytose

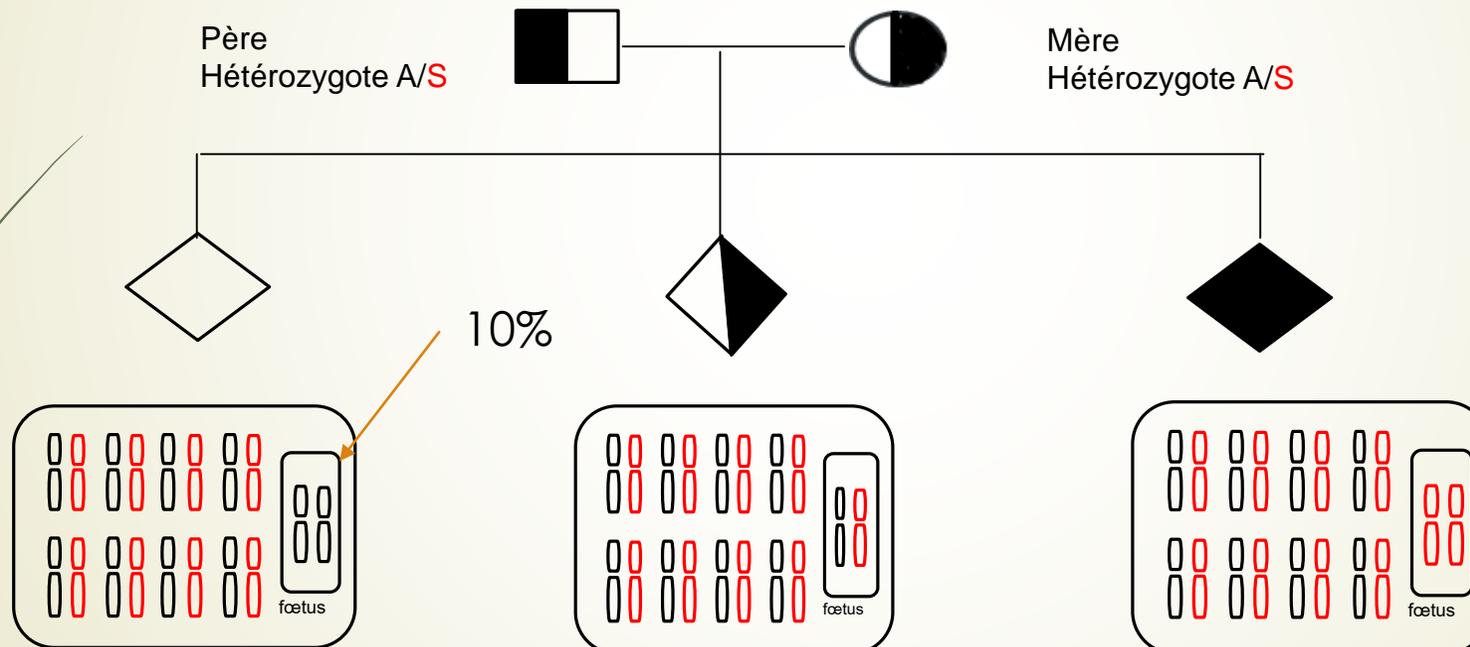
Les parents ont **la même mutation**

Allèle Normal : A

Allèle Muté : S

Père
Hétérozygote A/S

Mère
Hétérozygote A/S



Homozygote normal

Fœtus non atteint

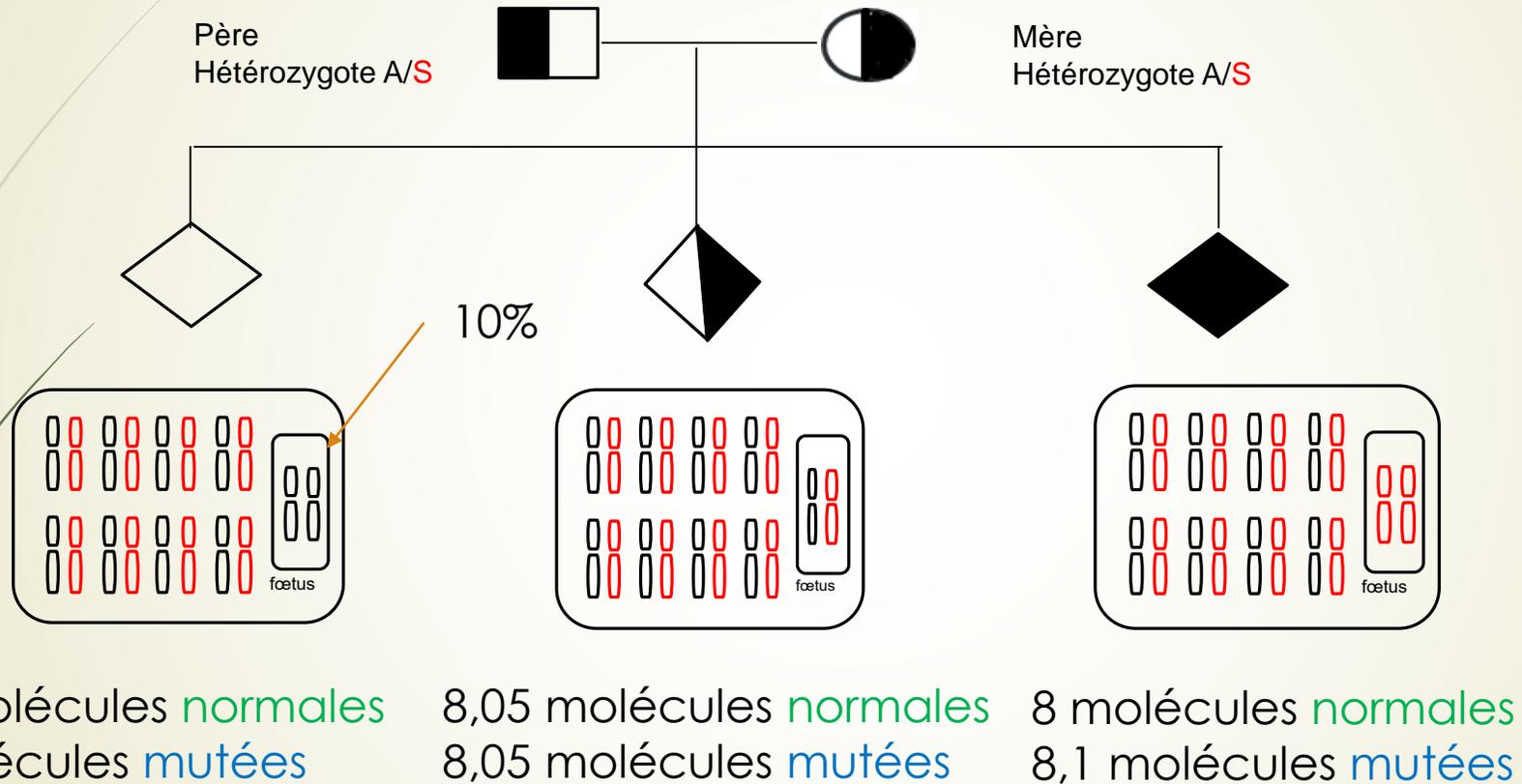
Hétérozygote

Fœtus non atteint

Homozygote muté

Fœtus atteint

Maladies monogéniques récessives ex : Drépanocytose



Détermination différence significative en quantité entre allèle muté et allèle Normal
=> Analyses statistiques plus poussées +++

Applications PCR digitale au laboratoire

- ▶ **DPNI de maladie monogénique : recherche de mutation ponctuelle**
 - ▶ Maladie dominante (exemple rasopathie)
 - ▶ Maladie récessive (exemple drépanocytose)
- ▶ **Quantification du nombre de copies d'un gène**
 - ▶ Application au diagnostic de l'amyotrophie spinale proximale (SMA)
- ▶ **Etude de la maladie résiduelle dans les leucémies** (mutation ponctuelle, transcrits de fusion)
- ▶ **Applications en développement**
 - ▶ RT-PCR quantitative : confirmation de RNA Seq
 - ▶ Chimérisme



Conclusion

- ▶ C'est une technique facile à appréhender et facile à interpréter
 - ▶ Rapide (résultats de 96 échantillons possible en une journée)
 - ▶ Sensible
 - ▶ Quantification absolue (plus besoin de gamme ce qui permet d'économiser de l'échantillon)
 - ▶ Adaptable à de faibles quantités de matériel (DPNI)
-
- ▶ Les limites sont souvent liées aux difficultés de conception des systèmes PCR.
 - ▶ Technique qui reste chère

Merci de votre attention

APHP.Nord
Hôpital Robert Debré
Laboratoire de Génétique Moléculaire

Pr Cavé
Dr Couque
Dr Fauret
Dr Arfeuille

Dr Drunat
Dr Caye
Dr Vial
Dr Chune

Techniciennes : Manon Meraux, Natacha Duchemin, Pauline Wazana, Justine Rousselot, Cecile Maalouf, Mariam Keita, Elisabeth Trawinski, Ghislaine Brunie, Magalie Da Fonseca, Sabrina Pereira, Christine Giroux, Nelly Deltour, Kwan-Hu Sabrina, Khemiri Ahlene, Axelle Zoumba

Hôpital universitaire
mère-enfant
Robert-Debré



ASSISTANCE
PUBLIQUE  HÔPITAUX
DE PARIS

Channel2 Amplitude