

OneSeq : détection simultanée de CNV et de SNV... en attendant le séquençage génome entier



Nicolas Chatron ^{1,2}, Marc Le Lorc'h ³, Eudeline Alix ¹, Matthieu Egloff ³, Didier Goidin ⁴, Jean-Philippe Jais ⁵, Pierre-Antoine Rollat-Farnier ⁶, Claire Bardel ⁶, Serge Romana ³, G. Lesca ^{1,2}, Valérie Malan ^{3,7}, Damien Sanlaville ^{1,2}

1. Laboratoire de Cytogénétique Constitutionnelle, Hospices Civils de Lyon
2. Equipe GENDEV, CRNL, UCBL1, U1028 INSERM, UMR 5292 CNRS, Lyon
3. Service d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Hôpital Necker Enfants Malades
4. AgilentTechnologies
5. Service de Biostatistique, Hôpital Necker Enfants Malades
6. Service de Biostatistique – Bioinformatique , Hospices Civils de Lyon
7. UMR_S1163, Institut Imagine, Université Paris Descartes



Stratégie diagnostique

- Analyse Chromosomique sur Puce à ADN
 - **Gold standard** pour détection de CNVs
 - Mise en place depuis 2007
 - Première intention dans l'exploration de la déficience intellectuelle et/ou malformations congénitales
 - **Taux de CNVs pathogènes détectés: 12-15%.**
- De plus en plus d'études moléculaires monogéniques sont transférés vers des analyses de panels de gènes ou d'exome.
 - SNV+++
 - Taux diagnostic pour l'exome dans la déficience intellectuelle et/ou malformations congénitales : **25-40%** selon stratégie appliquée
 - CNV : détection possible...

2 techniques



2 plateformes



ACPA

- Digestion enzymatique
- Marquage fluorescent
- Hybridation - Scanner

NGS

- Fragmentation
- Capture
- Séquençage

- Zone unique
- Caisson anti-ozone
- Scanner
- Presque pas de dry lab

- Pré / Post PCR
- Séquenceur
- Bioinformatique
- Stockage

Le plus souvent :

- 2 équipes techniques
- 2 bases de données
- 2 consentements
- 2 informations pré-test

Parfois :

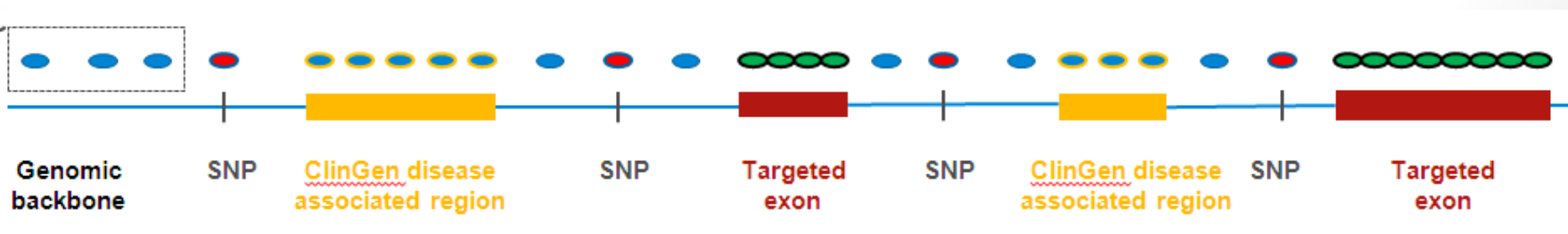
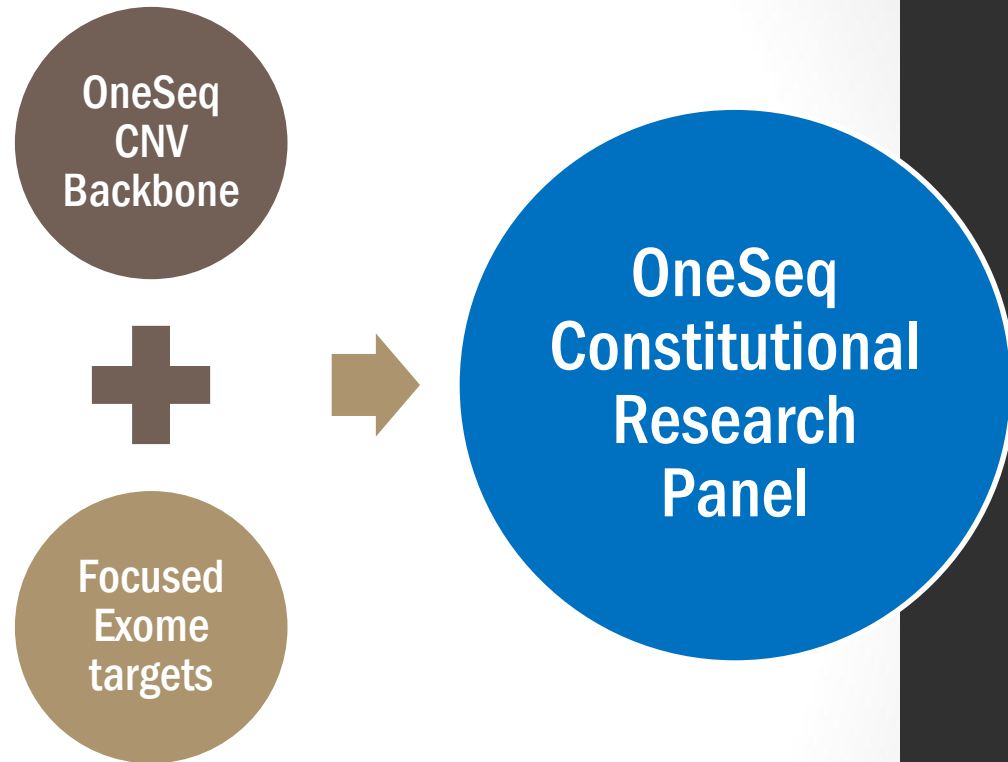
- 2 prélèvements
- 2 extractions d'ADN

MAIS

- 1 seul patient
- Coût
- Temps
- 85% des patients concernés

Solution OneSeq

- Backbone de sondes sélectionnées (%GC, ...)
- Résolution moyenne 300 kb
- Résolution 25-50 kb sur les gènes « ClinGen/ISCA »
- Target 12Mb
- Centré sur OMIM, ClinVar, HGMD



Phase 1 : Faisabilité

- CHU Lyon : NextSeq500 2x75pb *paired end*
 - 2x 8 échantillons sur une flow cell HighOutput
- Necker : HiSeq1500 2x100pb *paired end*
 - 2x 8 échantillons en Mode *Rapid Run*



7Gb /patient

- 30 patients + 2 témoins
 - 32 CNVs connus
 - 12 SNVs connus



Résultats : SureCall

CNV non détecté par OneSeq

	Bande chromosomique	Taille minimale
Patient 1	2q37.2q37.3 del 4q35.1q35.2 dup	7200 5700
Patient 26	2q14.1q14.3 dup 15q13.3 del	5900 1490
Patient 7	3p26.3 del 5q23.1 dup	1100 1600
Patient 22	9p24.2p13.1 gain mos	38800
	9q21.1q21.2 del	8600
Patient 24	19p13.2p12 gain mos	8350
Patient 28	12q15q21	5500
Patient 6	5q23.2 del	4400
Patient 4	11q14.1 del	4200
Patient 13	14q31.1q31.3 dup	3500
Patient 21	16p13.11 del	2660
Patient 11	Xq21.31q21.32 del	1500
Patient 25	16q23.1 dup	1222
Patient 15	16p13.11 dup	1200
Patient 12	12q21.33 dup	1000
Patient 2	4q31.22q31.23 del	994
Patient 3	17p12p11.2 del	980
Patient 5	15q24.3q25.1 del	649
Patient 10	3q26.31 del	565
Patient 19	1q21.1 del	445
Patient 8	13q21.32 dup	395
Patient 9	2p23.3 del	314
Patient 20	Xq28 dup	265
Patient 17	16q23.1 del hmz	162
Patient 27	16q23.1	103
Patient 23	20q13.33 del	10
Patient 18	Xp22.13 del mos	8
Patient 16	7q21.3 del	7

Gain en mosaïque à 15%

Sexe patient
différent du sexe
de la référence

?

300 kb : résolution théorique

Sex mismatch

• Problèmes :

- Bornage
- Segmentation
- Bruit de fond
- Sexe patient/ref

Pipeline maison

Résultats pipeline Lyon

	Bande chromosomique	Taille minimale
Patient 26	2q14.1q14.3 dup 15q13.3 del	5900 1490
	9q21.1q21.2 del	38800
Patient 22	9p24.2p13.1 gain mos	8600
Patient 24	19p13.2p12 gain mos	8350
Patient 28	12q15q21	5500
Patient 21	16p13.11 del	2660
Patient 25	16q23.1 dup	1222
Patient 19	1q21.1 del	445
Patient 20	Xq28 dup	265
Patient 17	16q23.1 del hmz	162
Patient 27	16q23.1	103
Patient 23	20q13.33 del	10
Patient 18	Xp22.13 del mos	8
Patient 16	7q21.3 del	7

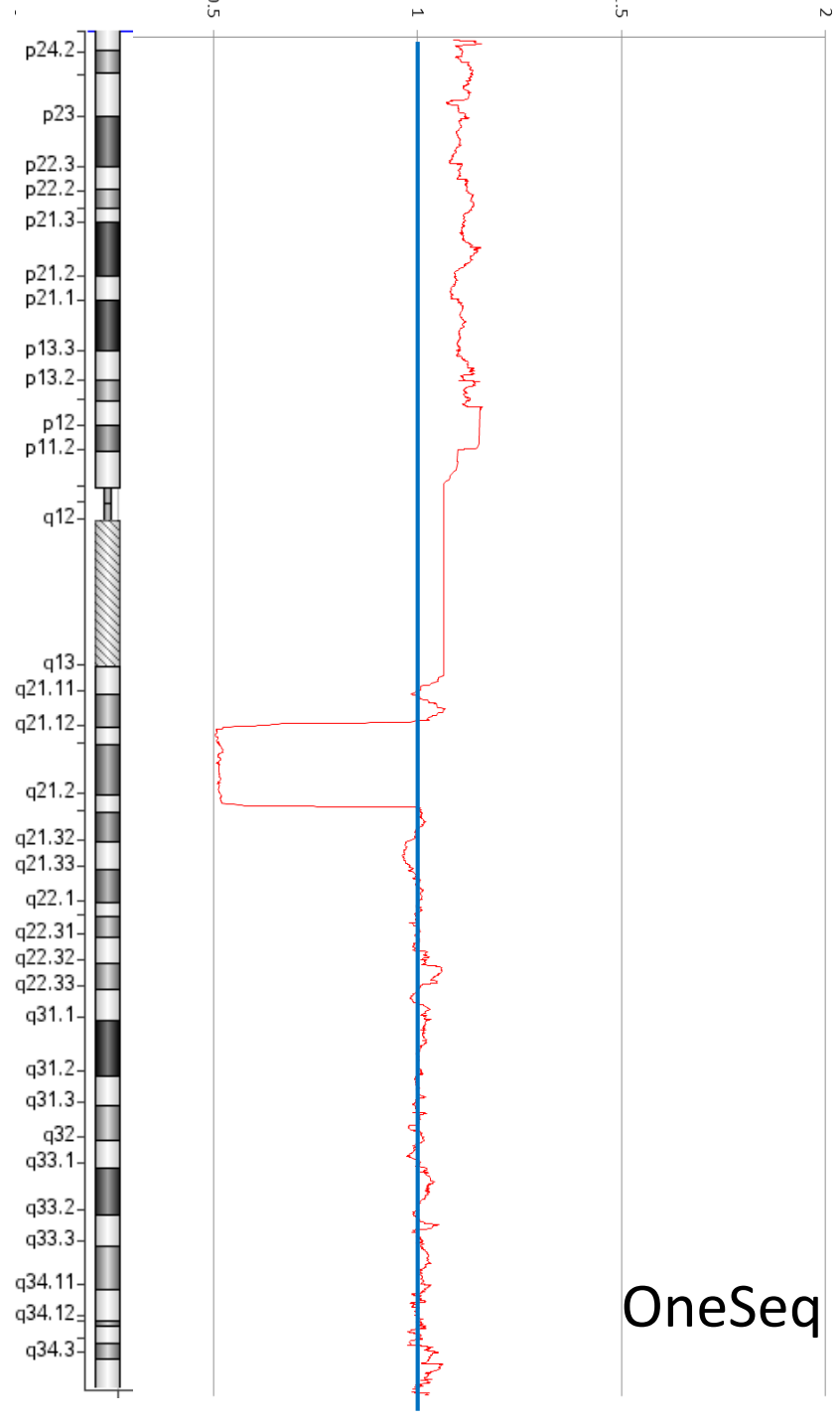
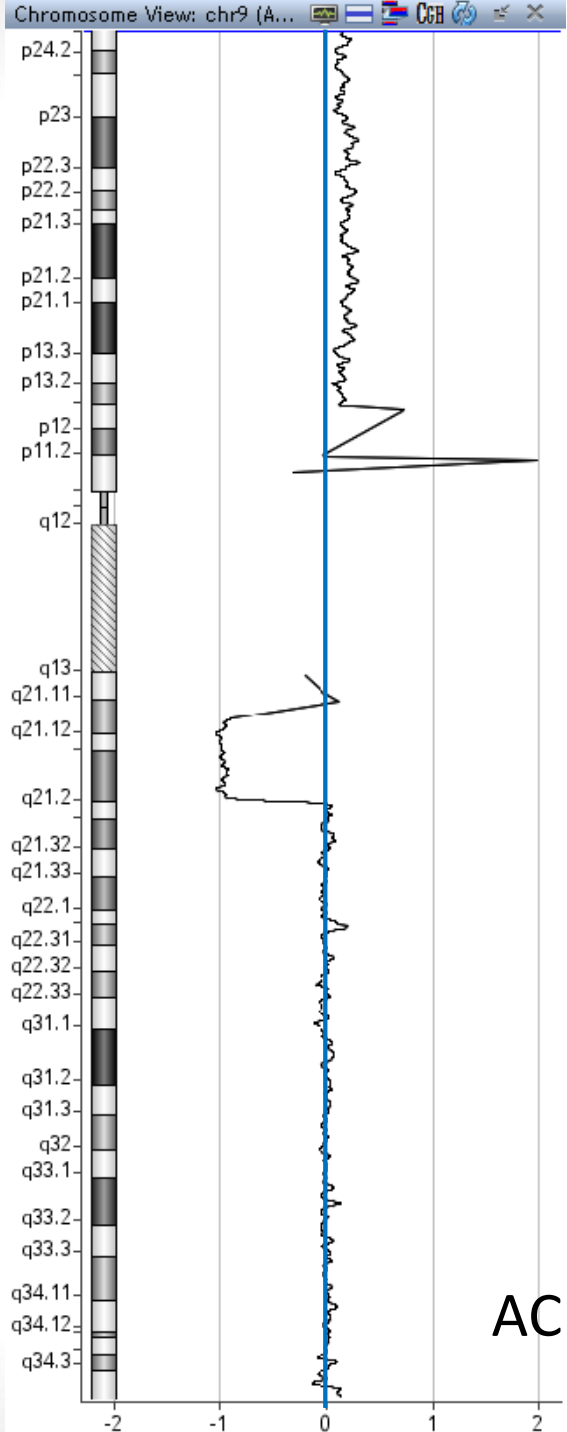
- Analyse réalisée sur 16 patients
- 2-6 CNV par patient
- 1 patient à 46 CNVs : qualité ?
- Bornes **OK**
- Pas de segmentation

300 kb : résolution théorique

Faux négatif (idem pour SureCall)

Non vu en ACPA, MLPA, visible si analyse orientée (*KCNQ2*)

Puce ACPA chromosome X

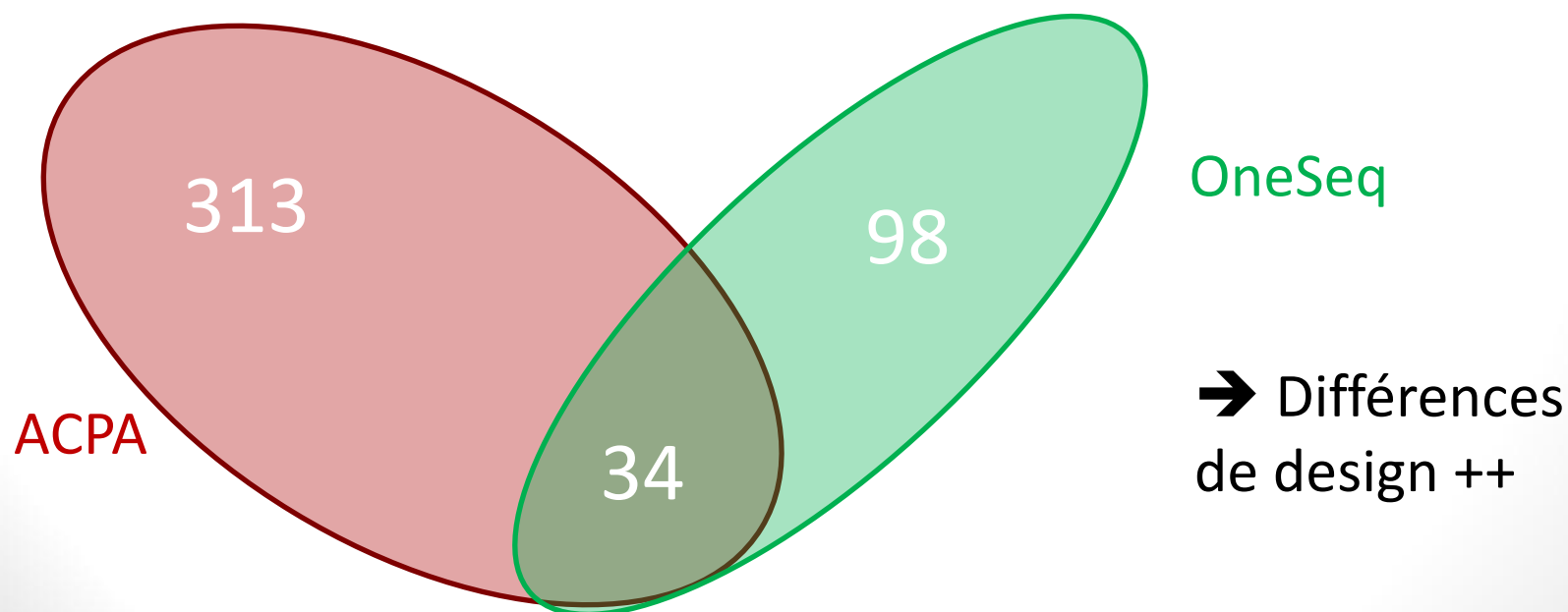


Phase 2 : Situation réelle



- Etude prospective
- 38 patients avec demande d'ACPA
- Analyse en **aveugle**

CNV : !!! 2 échecs d'analyse CNVs sur OneSeq !!!



CNV rendus

	ACPA		OneSeq	
	CNV	Taille (kb)	CNV	Taille (kb)
Patient 4	arr[hg19] 3q11.2q12.1(95,538,276-98,328,314)x3	2790	chr3:95557904-98319829x3	2761
Patient 8	arr[hg19] 14q32.31q32.33(102,209,178-107,278,770)x1	5070	chr14:102175000-107263302x1	5088
Patient 9	arr[hg19] 7q33(136,527,855-136,859,050)x4	332	chr7:136522073-136812630x4	291
Patient 14	arr[hg19] 17p13.3(1,279,511-2,157,982)x1	878	chr17:1274629-2140000x1	865
Patient 17	arr[hg19] 16p13.3(1,713,427-1,948,956)x1	236	chr16:1765049-1943592x1	178
Patient 22	arr[hg19] 16p11.2(29,652,999-30,197,341)x3	544	chr16:29656737-30199946x3	543
Patient 23	arr[hg19] 22q11.21(18,894,835-21,454,721)x1	2560	chr22:18893860-21458558x1	2565

OK

OK

OK

OK

?

OK

OK

- Pas de CNV pathogène ou VOUS additionnel identifié avec OneSeq.

SNVs

- Analyse filtrée sur panel DI-450 [≈ 25% de diag. attendu]
- 0-3 SNVs à explorer par patient

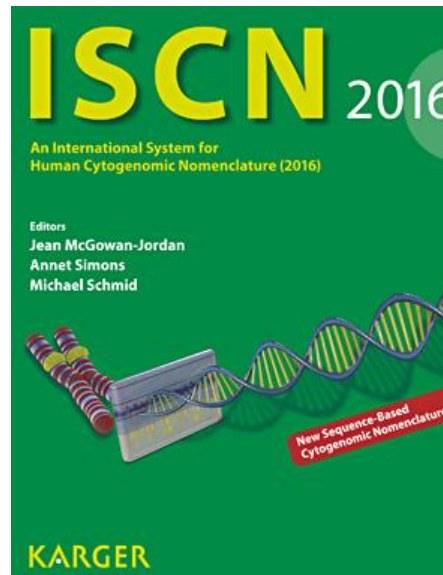
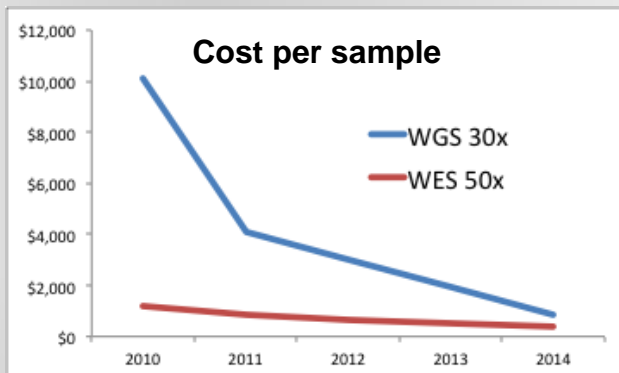
Patient	SNV
Patient 5	NM_001332.3(CTNND2):c.916C>T
Patient 11	NM_001080517.2(SETD5):c.3853C>G
Patient 12	NM_001123385.1(BCOR):c.4766G>A
	NM_080632.2(UPF3B):c.1121G>A
Patient 13	NM_015267.3(CUX2):c.3763_3764delGA
	NM_000797.3(DRD4):c.463C>T
Patient 20	NM_005359.5(SMAD4):c.*5005dupT
Patient 22	NM_001008537.2(KIAA2022):c.569G>A
Patient 25	NM_001243226.2(TCF4):c.1589G>T
	NM_003482.3(KMT2D):c.11570A>T
	NM_033517.1(SHANK3):c.3722_3734delGGGCCAGCCCCC
Patient 27	NM_030665.3(RAI1):c.109G>A
Patient 30	NM_015267.3(CUX2):c.2955_2956insGG

Patient porteur d'une microdélétion 16p11.2 BP1-BP2 récurrente

Vérifications Sanger et analyses parentales en cours

La mort de l'ACPA ?

	Caryotype	ACPA	Exome sequencing	OneSeq
SNV			++	++
Indel			+	+
CNV	+ (>5Mb)	++	+	++
LOH		+/- (SNP vs CGH)	+	+
SV	+			



Remerciements



Laboratoire de Cytogénétique

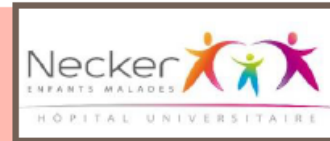
- Dr C. Schluth-Bolard
- Dr M. Till
- Dr G. Lesca
- A. Labalme
- E. Alix
- **Pr D. Sanlaville**

Service de Bioinformatique

- Pr P. Roy
- Dr C. Bardel
- **Dr P.-A. Rollat Farnier**

Service de Génétique Médicale

- Pr P. Edery
- Dr A. Putoux
- Dr M.-P. Cordier
- Dr M. Rossi
- Dr S. Dupuis Girod
- Dr C. Abel
- Dr E. Ollagnon



Service d'Histologie Embryologie Cytogénétique

- Pr S. Romana
- M. Egloff
- M. Le Lorc'h
- **Dr V. Malan**

Service de Bioinformatique

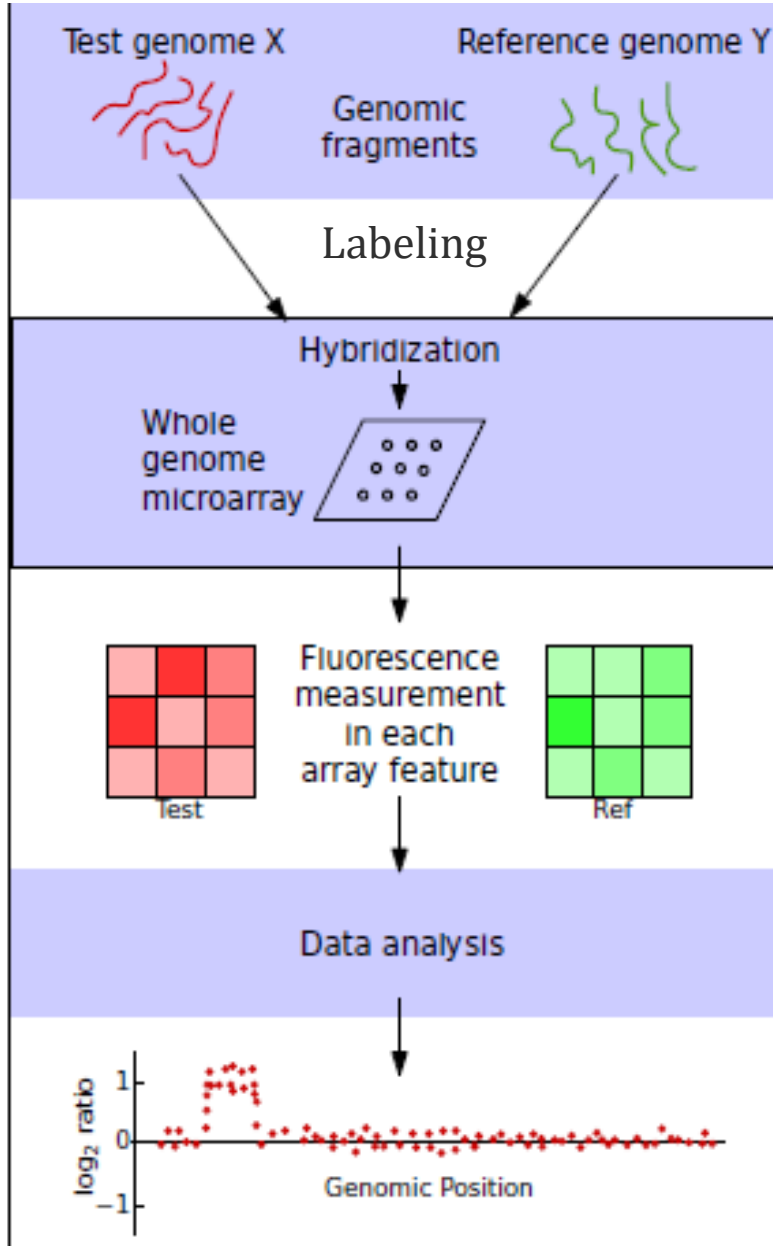
- P. Nitschke
- **Dr J.-P. Jaïs**

Service de Génétique Médicale

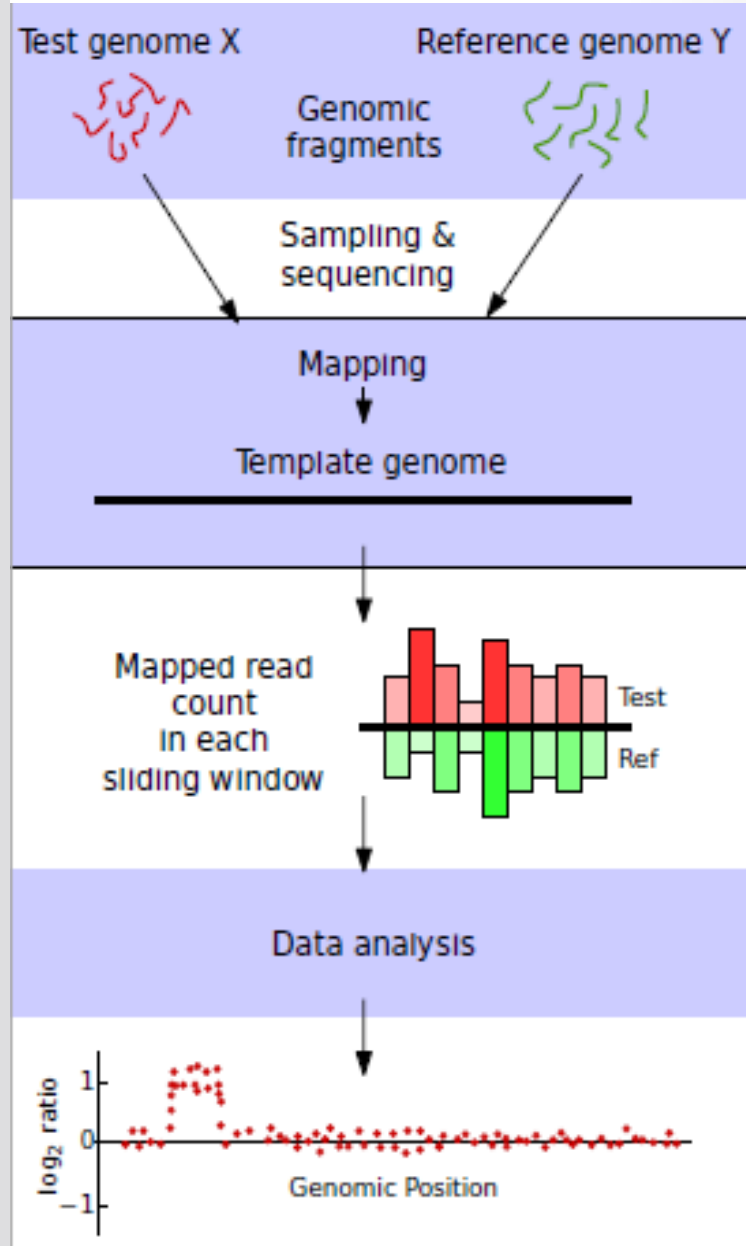
- Pr A. Munnich
- Pr S. Lyonnet
- Pr V. Cormier-Daire
- Pr J. Amiel
- Dr M. Rio
- Dr M. Nizon
- Dr G. Baujat
- Dr C. Michot

Le reste c' est pour les
questions

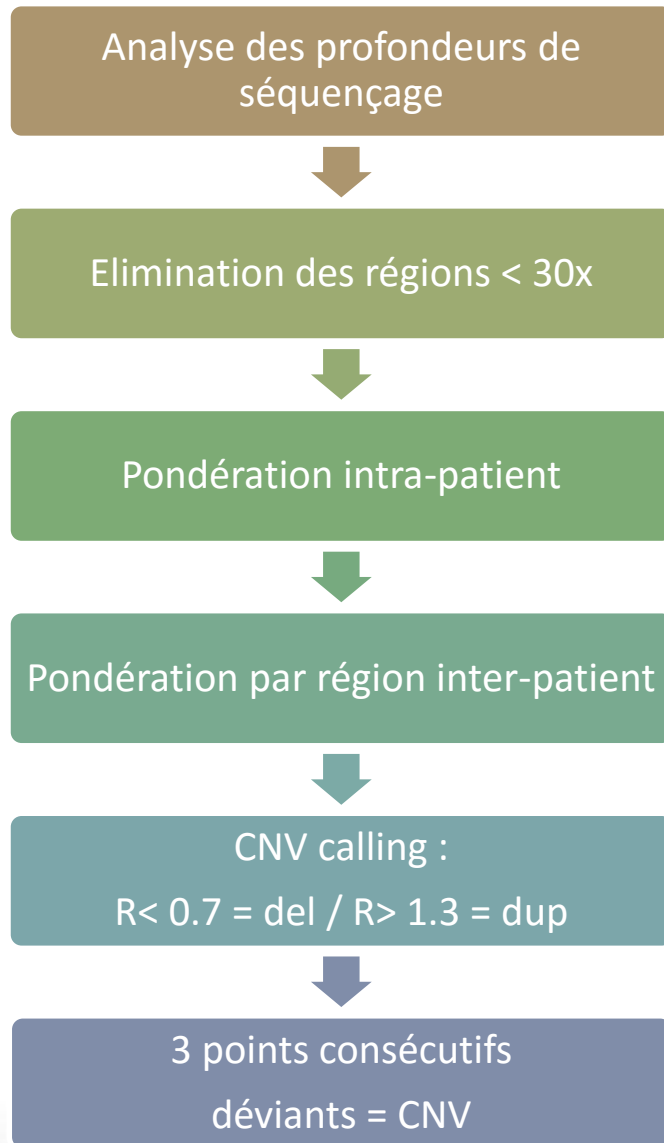
CGH array



OneSeq

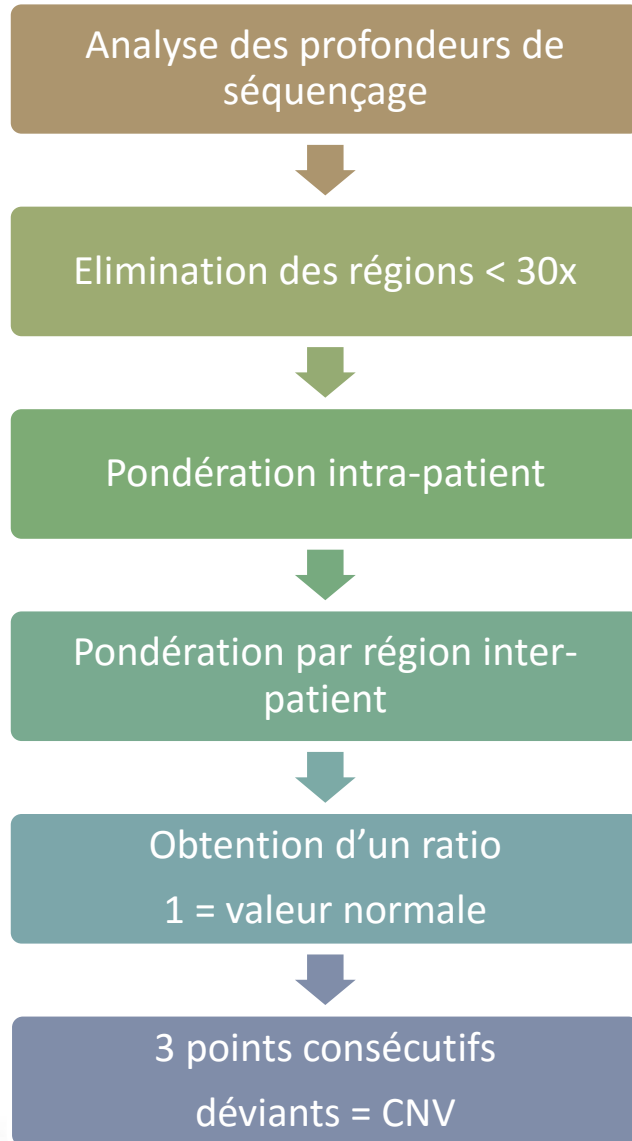


In-house pipeline CNV Lyon



Si >15 % des régions d'un patient sont détectées CNV
→ Patient éliminé de la référence

In-house pipeline



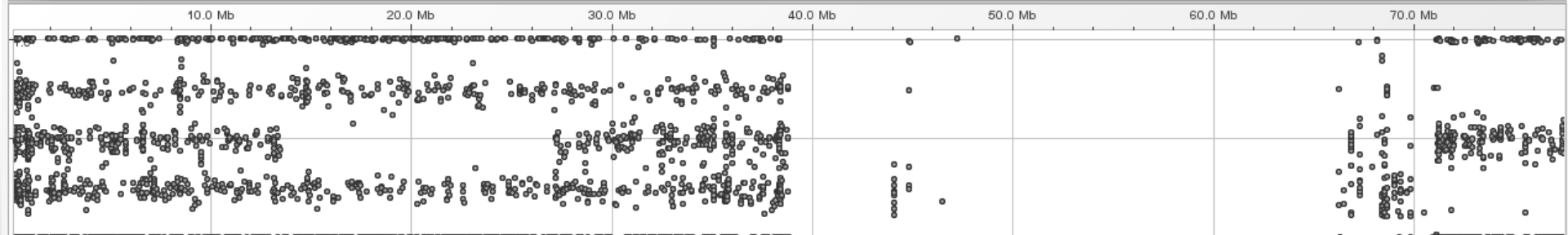
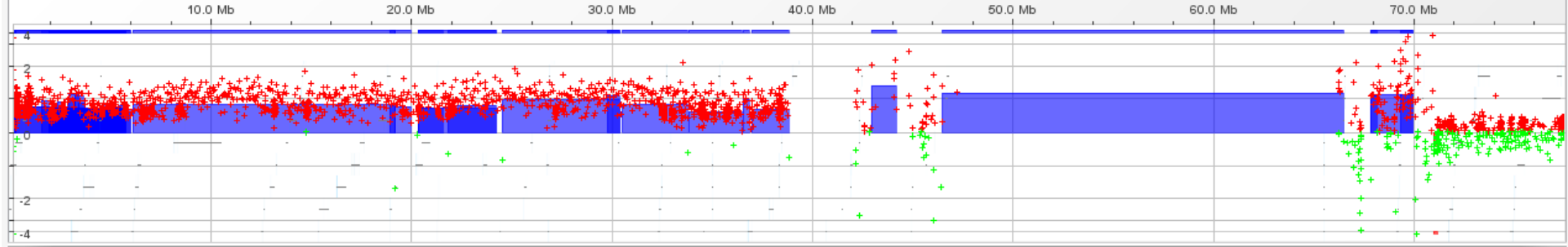
Pour une région si >15 % des patients sont détectés CNV
→ Région éliminée de la référence

- Focused exome
 - Capture : 206€
 - Quantité de séquençage nécessaire : 1,5-3Gb
 - Target 12Mb

- OneSeq
 - Capture : 412€
 - Quantité de séquençage nécessaire : 7Gb
 - Target : 28Mb

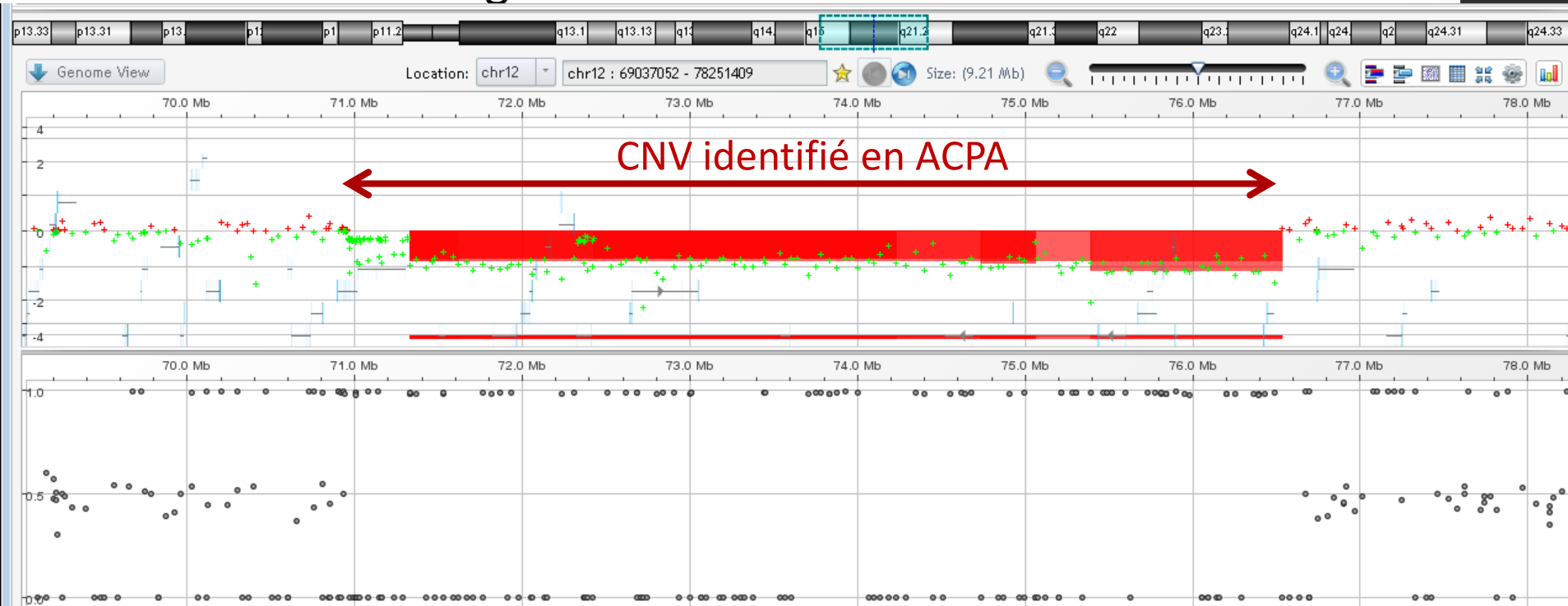


Genome View Location: chr9 chr9 : 110755 - 77488203 Size: (77.3 Mb)



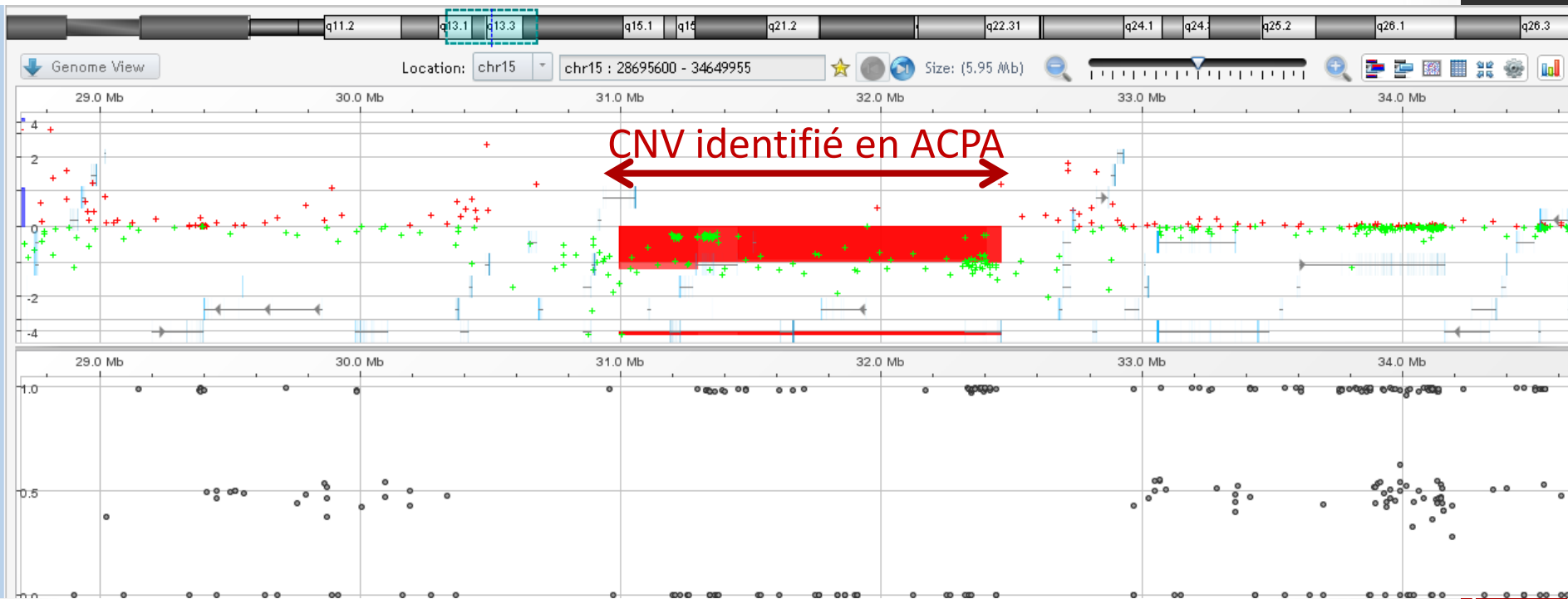
Résultats : CNV

- Détection **OK**
- Bornes **NON**
- Problème de segmentation



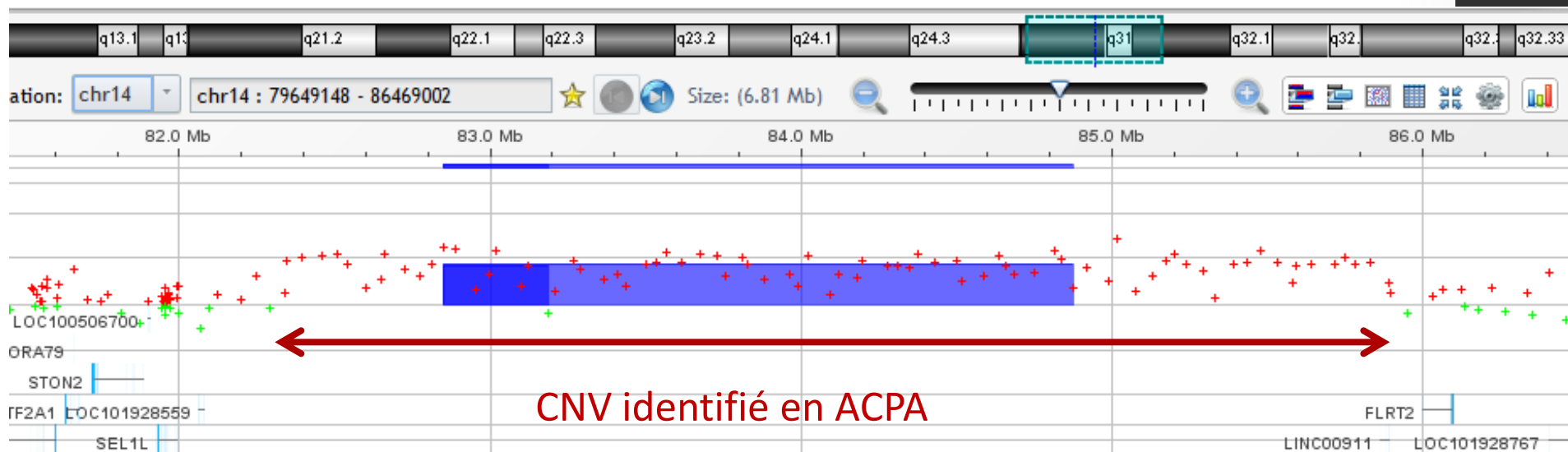
Résultats : CNV

- Détection **OK**
- Bornes **OK**



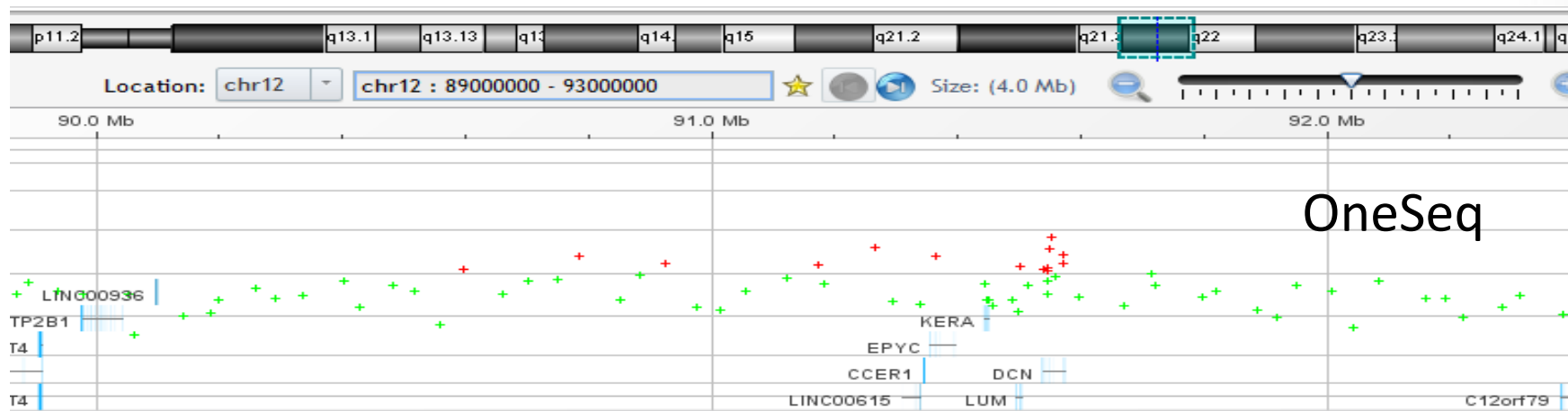
Résultats : CNV

- Détection **OK**
- Bornes **NON**

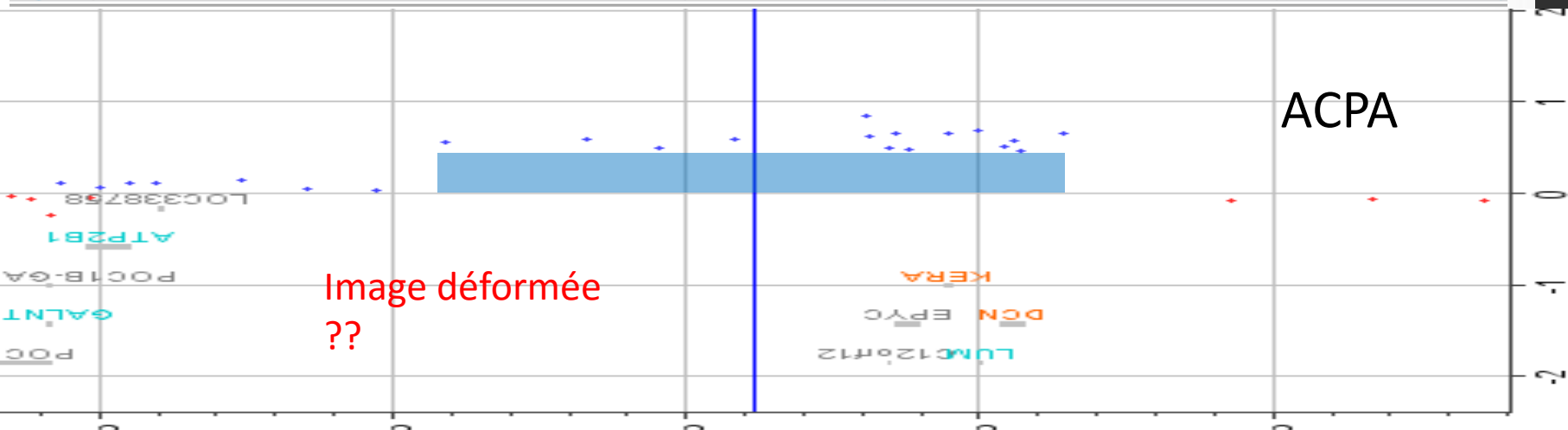


Résultats : CNV

- Détection : **NON**



OneSeq

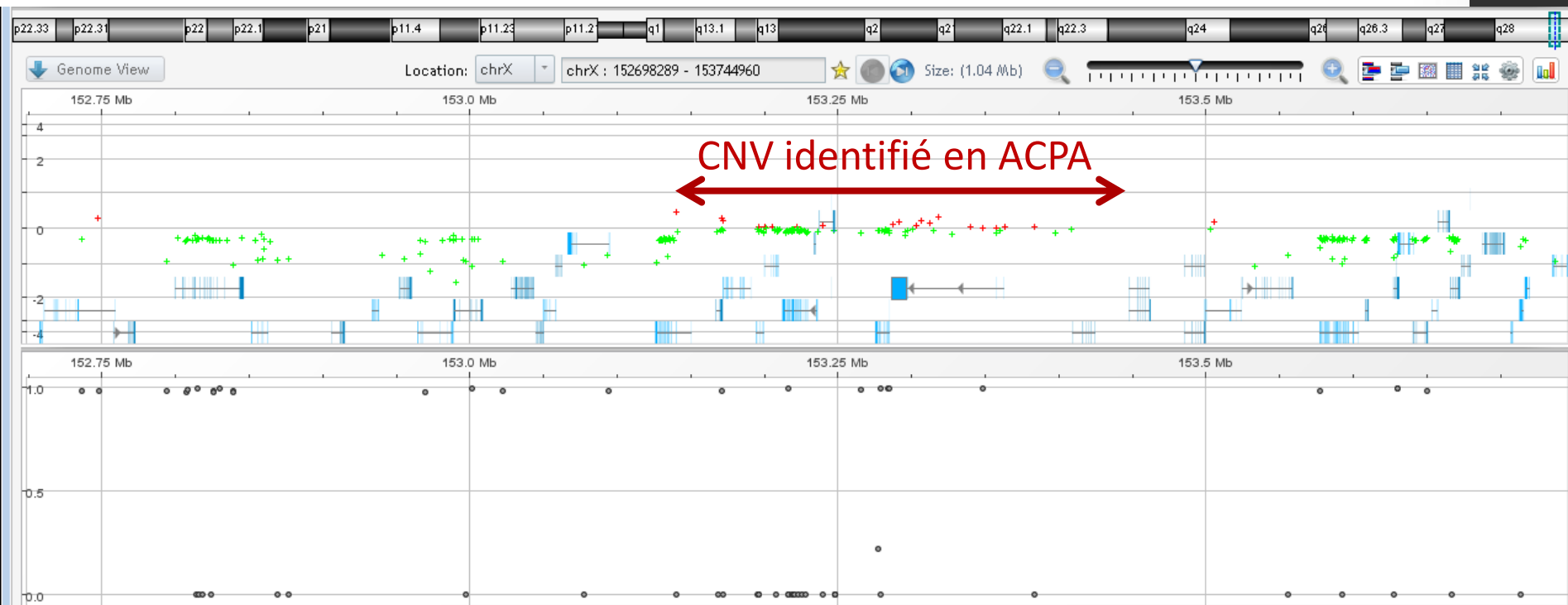


ACPA

Image déformée
??

Résultats : CNV

- Détection : **NON**
- Dup Xq28 (350kb) chez un garçon passé contre témoin XX



Comparaison pangénomique

Gain: 20, Loss: 35, LOH: 10

