

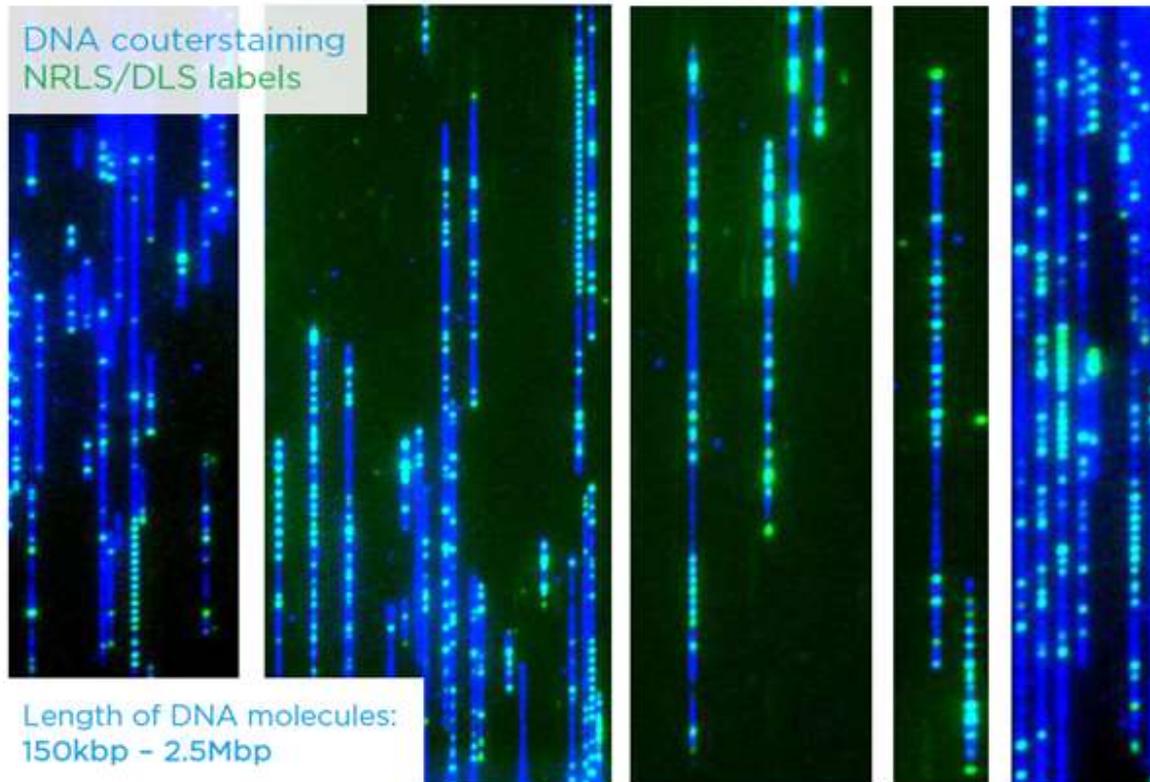
**La cartographie optique du génome,
une alternative prometteuse aux approches
cytogénétiques standards dans les
leucémies aiguës lymphoblastiques : étude
comparative en aveugle sur 10 patients.**



Valentin LESTRINGANT
Interne de biologie médicale
Laboratoire d'hématologie
Cytogénétique onco-hématologique
CHU Amiens-Picardie

Cartographie optique : Principes

Cartographie optique : principes



Cartographie optique : principes

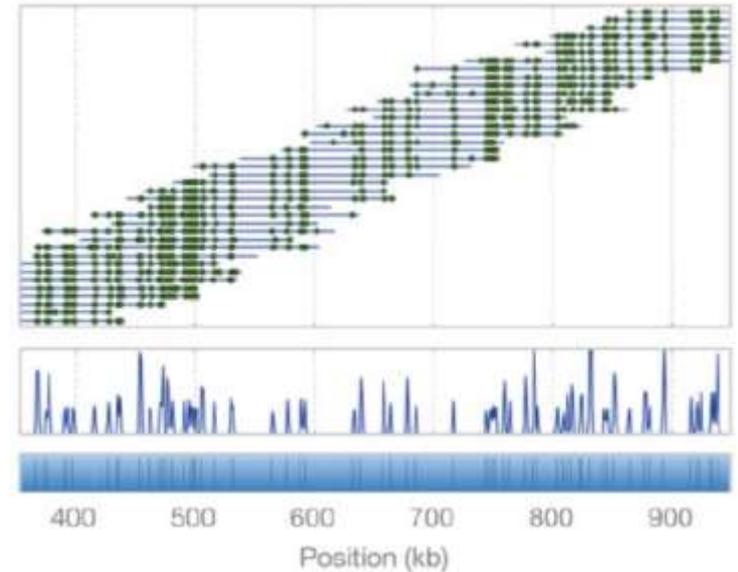
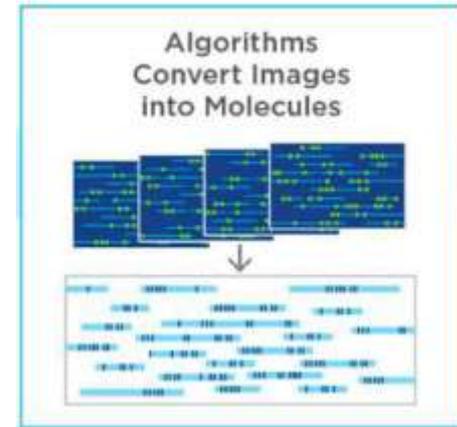
Conversion des images
en molécules

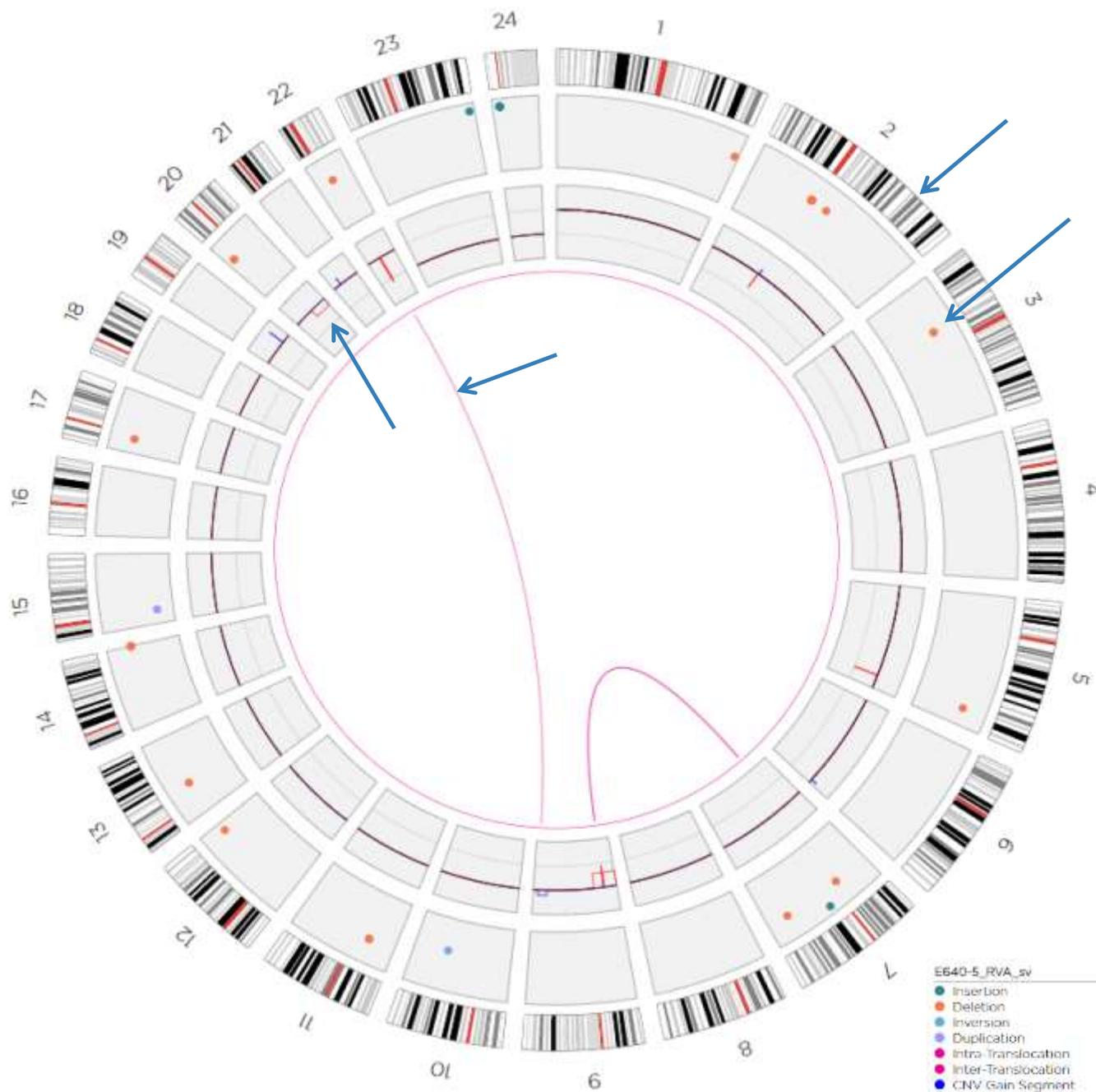


Algorithmes d'assemblage
- *De novo*
- Rare variant pipeline (RVP)

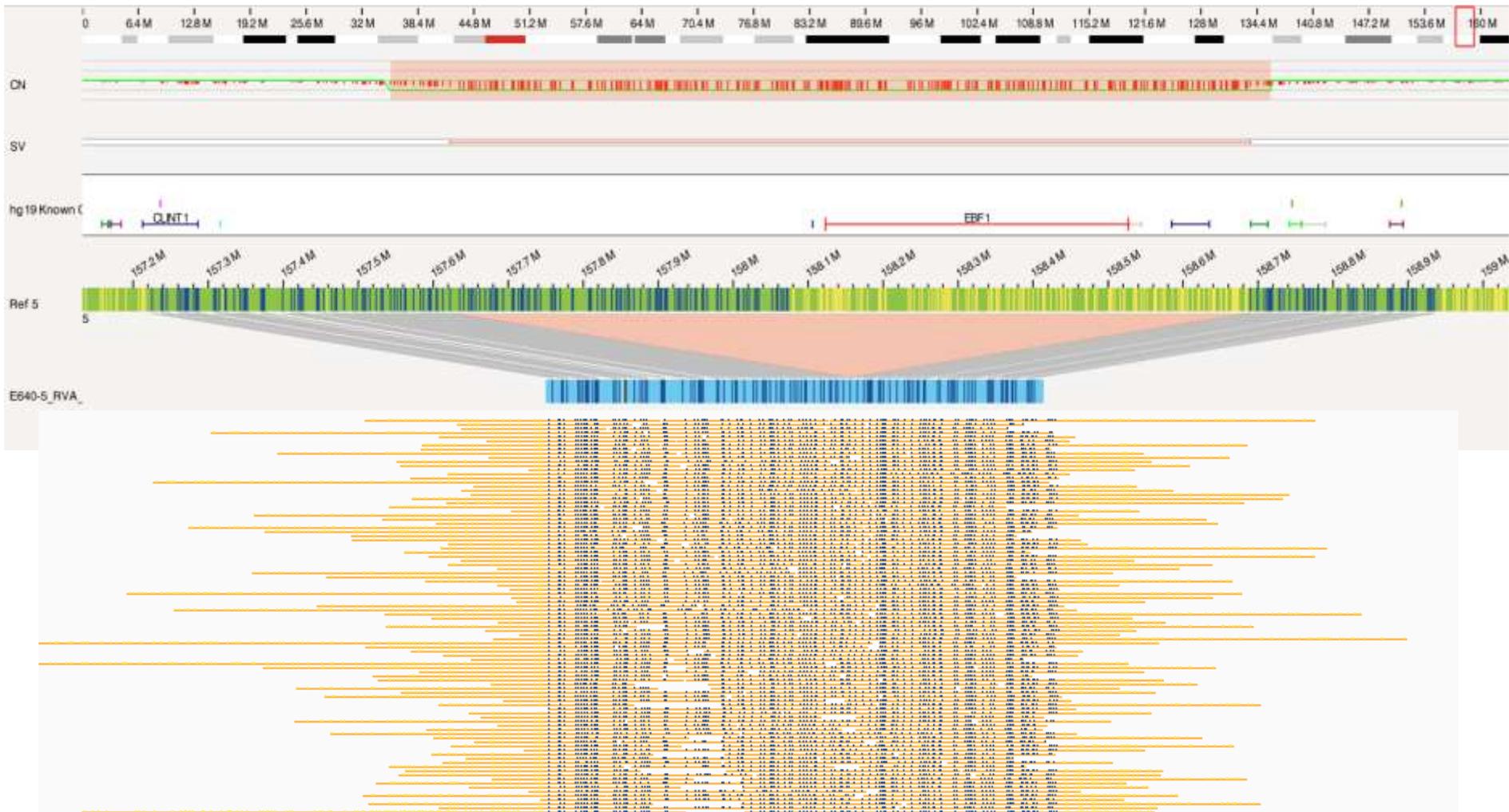


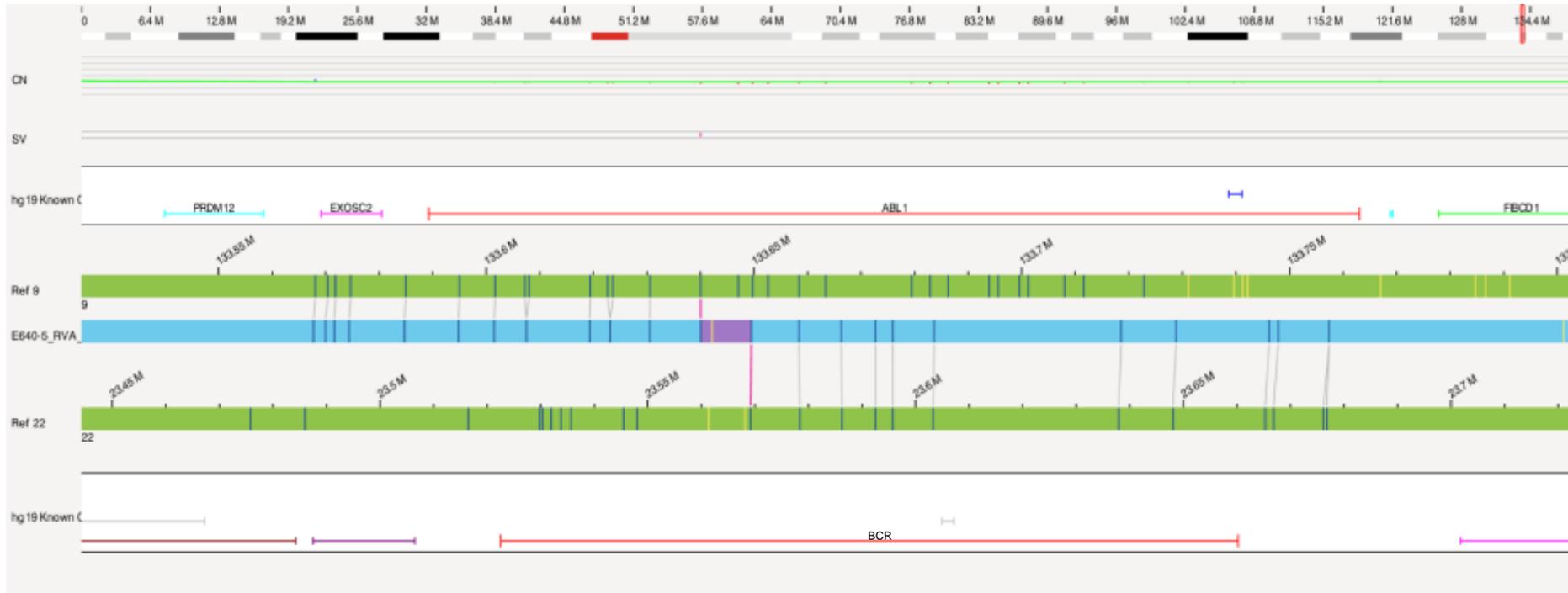
Algorithmes d'analyse
- Variants de structure (SV)
- Variants du nombre de copies (CNV)



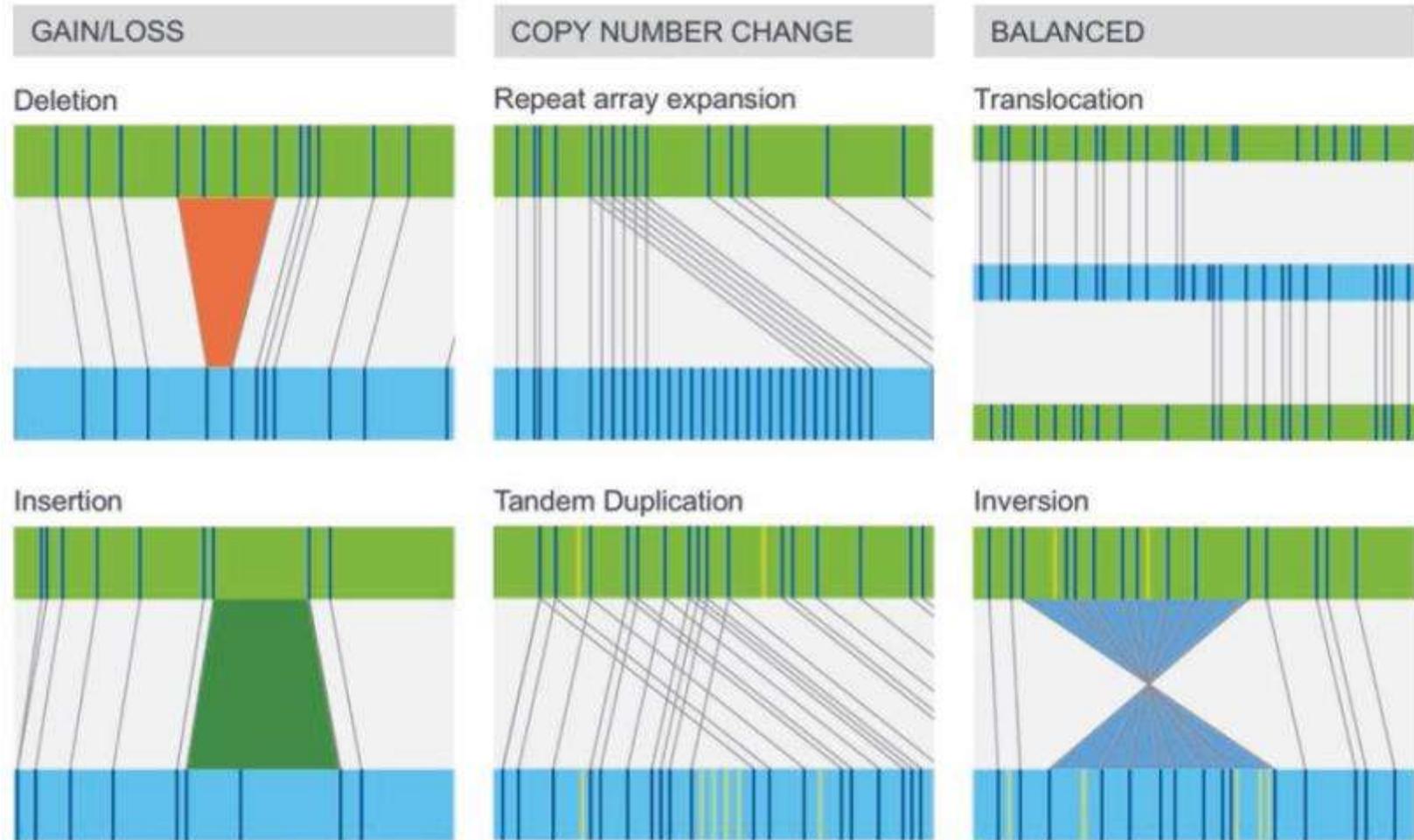


E640-5_RVA_sv	Count
Insertion	12
Deletion	37
Inversion	1
Duplication	1
Intra-Translocation	0
Inter-Translocation	3
CNV Gain Segment	5
CNV Loss Segment	8





Cartographie optique : principes



Etude comparative

Objectifs

- **Evaluer** à la fois les performances :
 - analytiques de la technologie
 - des outils informatiques de traitement et de filtration des données

10 LAL préalablement typées génétiquement (Caryotype/FISH/SNP-A/RT-MLPA)

- **Sélectionnées** pour créer un **panel représentatif** des anomalies majeures d'impact pronostique, et de leur diversité structurelle.

Données de cartographie optique interprétées **indépendamment** par des opérateurs **aveugles**, avant comparaison.

Secondairement :

- Taux de chevauchement des gains et pertes décelées par OM et par SNP.
- Possibilité de déceler des CN-LOH en OM bien que l'outil ne soit pas conçu initialement pour cela ? (Neveling et al)

Matériel et méthodes

▷ 10 cas amiénois LAL B ou T

▷ Techniques de référence

Caryotype / FISH Amiens/Rouen

SNP-A / RT-MLPA Lille

▷ Cartographie optique

Culots DMSO Moelle osseuse → technique OM Plateforme INRA
Gentyane Clermont-Ferrand

Rare Variant Pipeline

Opérateurs aveugles :

- Valentin Lestringant - interne cytogénétique hémato CHU Amiens

- Joyce Lee - ingénieure Bionano USA

M&M Anomalies « d'intérêt »

➤ Techniques de référence

- Critères de sélection :

- SNP-A >20kb :
 - implique gène d'une liste prédéfinie de gènes d'intérêt
 - ou si >1Mb
 - CN-LOH exclus
- Caryo/FISH/RT-MLPA : tout

➤ Cartographie optique

- Extraction anomalies selon critères suivants :

- CNV tool >275kb
- SV tool :
 - Ins/Del/Dup >20kb
 - Confidence Scores : Ins 0, Del 0, Inv 0.01, Dup -1, Trans all, CN 0.99
 - 0% in variant database

- Critères de sélection :

- implique gène d'une liste prédéfinie de gènes d'intérêt
- ou >1Mb
- translocations : toutes

Caractéristiques patients

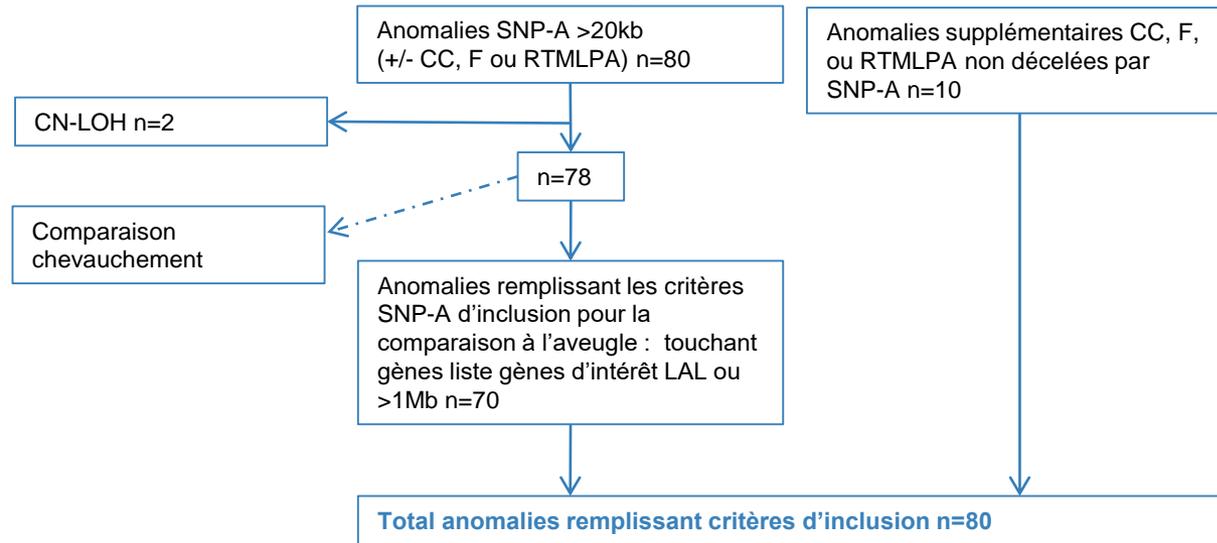
Age au diagnostic	Sexe	Date du prélèvement	Classification EGIL
6	M	03/09/2019	T-III
8	F	13/02/2019	T-III
4	M	24/08/2018	B-II
5	M	17/10/2017	B-II
35	M	31/08/2017	T-I
37	M	24/07/2017	T-III
5	M	17/02/2017	B-II
6	M	27/07/2016	B-III
32	M	11/05/2016	B-II
2	M	07/07/2019	B-II

6 LAL-B
4 LAL-T

7 enfants
3 adultes

Résultats

Techniques de référence



Résultats

Qualité des données :

- Average N50 (≥ 150 kbp) = 286 kbp
- **Average coverage of 339x**
- Negative Label Variance (NLV) $>20\%$ pour 2 patients

Cartographie optique

Extraction anomalies selon critères suivants :

-CNV tool >275 kb

-SV tool :

Ins/Del/Dup >20 kb

Confidence Scores : Ins 0, Del 0, Inv 0.01, Dup -1,
Trans all, CN 0.99

0% in variant database

n=948

Puis analyse aveugle par deux opérateurs indépendants

Nettoyage manuel bruit de fond général/signaux
faux positifs/ fusion des doublons

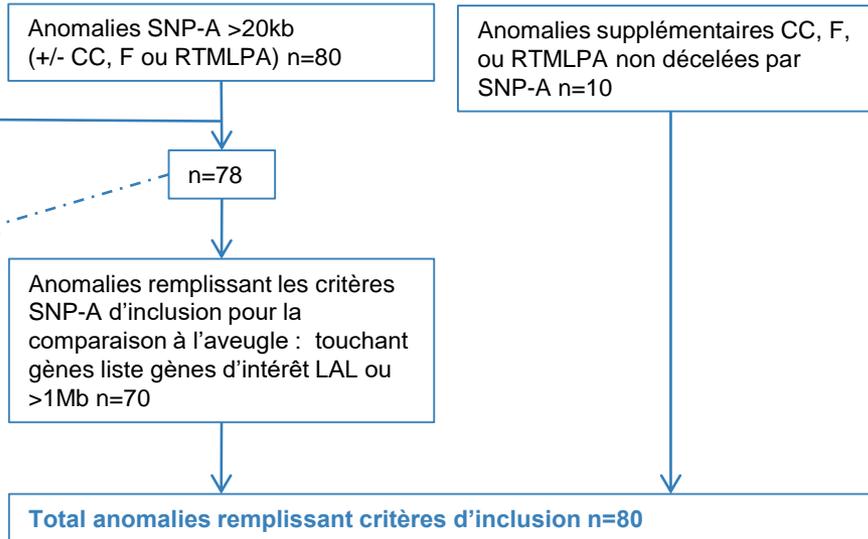
**Anomalies remplissant critères d'inclusion (touchant
gènes de la liste gènes d'intérêt LAL, ou >1 MB pour
insertions délétions et duplications)**

Opérateur 1 n=89

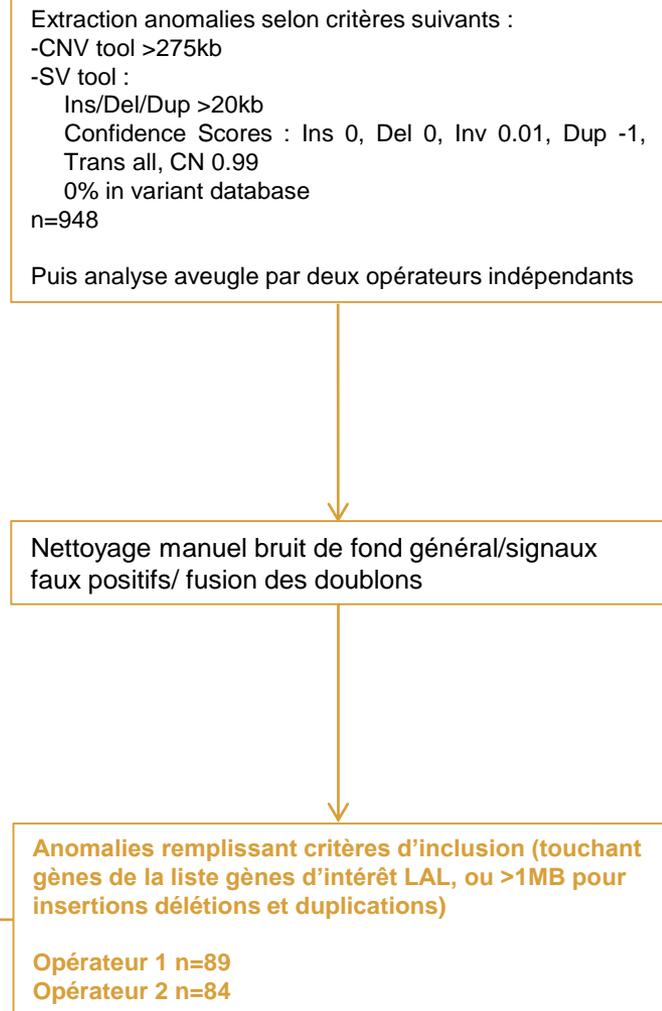
Opérateur 2 n=84

Résultats

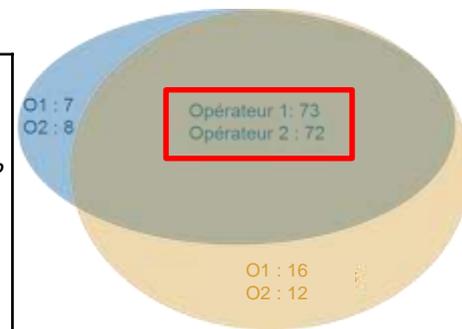
Techniques de référence



Cartographie optique



Résultats

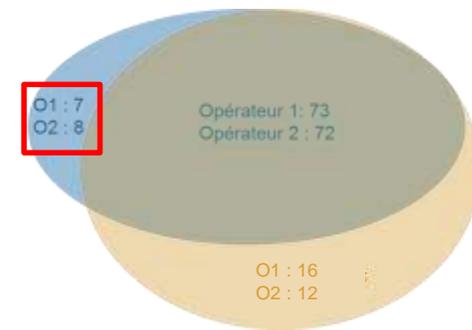


1	<p>Deletion 9p21.3 involving <i>CDKN2A, CDKN2B, MLLT3, MTAP</i> Translocation t(10;14) <i>TLX1-TRD</i> Deletion 13q14.2 involving <i>RB1</i> Deletion 17p13.3-p13.1 involving <i>TP53</i> tri 20 : Gain 20p13-p11.21 involving <i>SLX4IP</i> tri 20 : Gain 20q11.21-q13.33</p>
2	<p>Deletion 1p33 leading to <i>STIL-TAL</i> fusion Deletion 4q31.3 involving <i>FBXW7</i> Deletion 9p21.3 involving <i>CDKN2A, CDKN2B, MTAP</i> Deletion 10q23.31 involving <i>PTEN</i> Deletion 21q22.2 involving <i>ERG</i></p>
3	<p>Deletion 1q42.2-q42.3 without genes of interest Deletion 1q44 without genes of interest Whole chromosome gain 3 Whole chromosome gain 6 Whole chromosome gain 10 Whole chromosome gain 14 Whole chromosome gain 17 Whole chromosome gain 18 Whole chromosome gain 21 Whole chromosome gain X</p>
4	<p>Deletion 5q33.3 involving <i>EBF1</i> Translocation t(7;9) Deletion 7p12.2 involving <i>IKZF1</i> Deletion 9p24.3-p13.1 involving <i>PAX5, CDKN2A, CDKN2B, MLLT3, MTAP, JAK2</i></p>
5	<p>Gain 9q32-q34.3 involving <i>ABL1, NUP214, NOTCH1</i> Translocation t(9;22) <i>BCR-ABL1, e1a2</i> transcript Deletion 11p12 involving <i>RAG2, RAG1</i> Deletion 13q14.11 involving <i>SERP2</i> Deletion 20p12.2 involving <i>SLX4IP</i> Deletion 20q11.22-q13.33 without genes of interest</p>
	<p>Gain 6q23.3 involving <i>MYB, AHI1</i> Translocation t(10;11) (<i>PICALM-MLLT10</i>) Whole chromosome gain 13 Deletion 16p13.3 involving <i>CREBBP</i> Deletion 16p13.3-p13.13 without genes of interest Gain 17q25.2-q25.3 involving <i>SEPT9</i></p>

6	<p>Deletion 2q34-q35 involving <i>IKZF2</i> Deletion 5q13.1-q13.2 without genes of interest Gain 6q23.3 involving <i>MYB, AHI1</i> Deletion 9p21.3 involving <i>CDKN2A, CDKN2B, MTAP</i> Deletion 9q34.11-q34.13 leading to <i>SET-NUP214</i> fusion Deletion 10q24.31-q24.32 involving <i>TLX1</i> Deletion 10q25.1 involving <i>ADD3</i> Deletion 11p13 involving <i>WT1</i> Deletion 11q22.1-q22.2 without genes of interest Deletion 16p13.3 involving <i>CREBBP</i> Deletion 16q11.2-q22.1 without genes of interest Gain 19p13.2-p11 involving <i>EPOR, LYL1</i></p>
7	<p>Whole chromosome gain 5 Deletion 6q13-q22.33 involving <i>CASP8AP2</i> Deletion 7p12.2 involving <i>IKZF1</i> Translocation t(7;21) <i>SERPINE1-DONSON</i> Whole chromosome gain 10 Translocation t(11;19) <i>KMT2A-MLLT1</i> Gain 20q11.21-q13.33 without genes of interest Gain 21q11.2-q22.3 involving <i>ERG, RUNX1</i></p>
8	<p>Deletion 13q14.2 (0,24Mb) involving <i>RB1</i> Deletion 13q14.2 (0,09Mb) involving <i>RB1</i> Deletion 13q14.2-q14.3 involving <i>DLEU1, DLEU2</i> Deletion 21q11.2-q21.1 without genes of interest iAMP21 : Gain 21q21.1-q22.3 involving <i>RUNX1</i> Deletion 21q22.3 without genes of interest Whole chromosome gain X</p>
9	<p>Deletion 3q26.32 involving <i>TBL1XR1</i> Deletion 7p22.3-p11.2 involving <i>IKZF1, CARD11</i> Deletion 9p24.3-p21.3 involving <i>MLLT3, JAK2</i> Deletion 9p21.3 involving <i>CDKN2A, CDKN2B, MTAP</i> Deletion 9p21.3-p13.1 involving <i>PAX5, CDKN2B</i> Translocation t(9;22) <i>BCR-ABL1, e14a2</i> transcript</p>
10	<p>Deletion 7p12.2 involving <i>IKZF1</i> der(16)t(13;7;9;16)(13qter→13q12.3::7p22.3→7p12.2::9p13.2 →9p13.2::16p12.2→16qter),der(7)t(7;16)(p12.2;p12.2),der(7)t(7;21)(q36.3;p11.2) Deletion Xp21.1 involving <i>DMD</i></p>

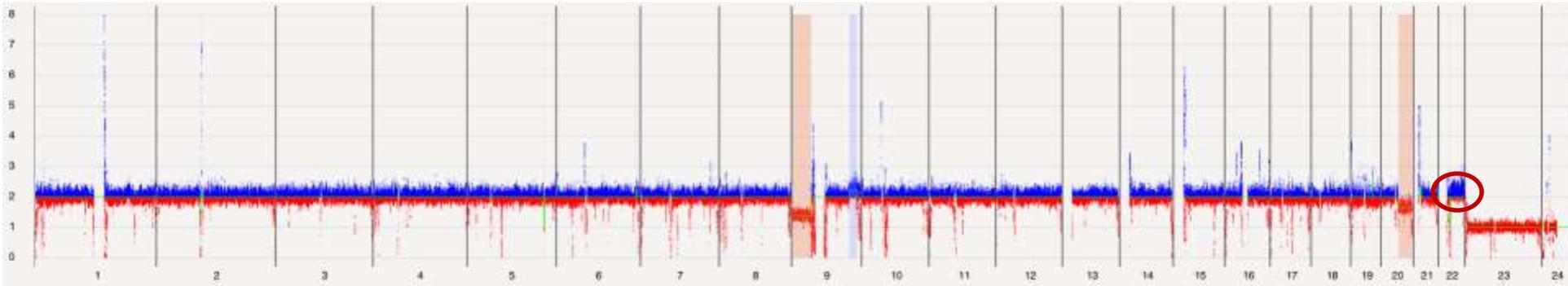
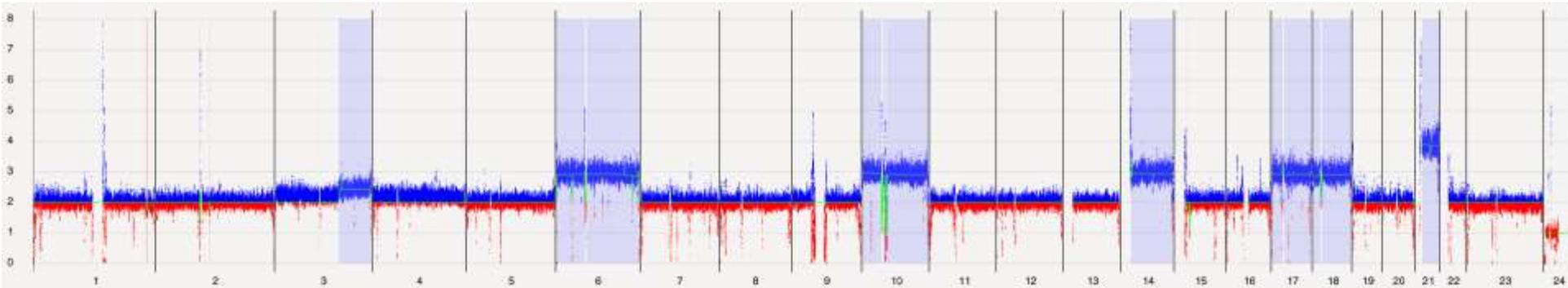
Résultats

3	Gain du chromosome 3 (nombre de copies = 2.22) Gain du chromosome 4 (nombre de copies = 2.22)
4	Délétion de la région 22q11.22-q11.23 (1,17Mb) incluant <i>VPREB1</i> Gain de la région 22q11.23-q13.33 (27,38Mb) incluant <i>IL2RB</i>
5	Sous clone dupliqué 80~95<4n>
8	Gain de la région Xp22.33 (0,94Mb) incluant <i>SHOX</i> Fusion P2RY8-CRLF2 Délétion de la région Xp22.33 (0,53Mb) incluant <i>CRLF2</i> , <i>CSF2RA</i> , <i>IL3RA</i> , <i>P2RY8</i>
10	Trisomie 21 sous-clonale



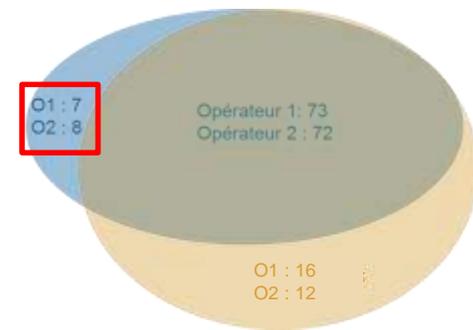
Résultats

- | | |
|---|---|
| 3 | Gain du chromosome 3 (nombre de copies = 2.22) |
| 4 | Gain de la région 22q11.23-q13.33 (27,38Mb) incluant <i>IL2RB</i> |



Résultats

10 Trisomie 21 sous-clonale



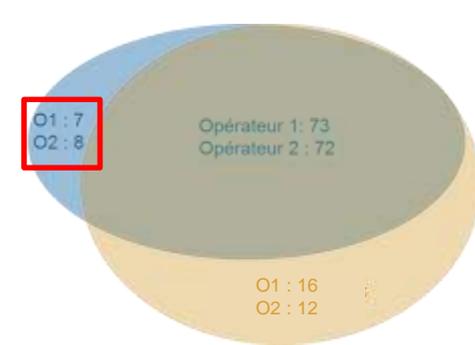
7/22 métaphases au caryotype conventionnel

Vérification & quantification en FISH → 7% noyaux interphasiques seulement :

- Avantage prolifératif in vitro du clone +21
- Sous la limite de détection de la cartographie

Résultats

5 Sous clone dupliqué 80~95<4n>



Au caryotype, 6/19 métaphases proches de la tétraploïdie, nombre de chromosomes variable, faible résolution à la limite du classable.

Vrai tétraploïde ?

Résultats

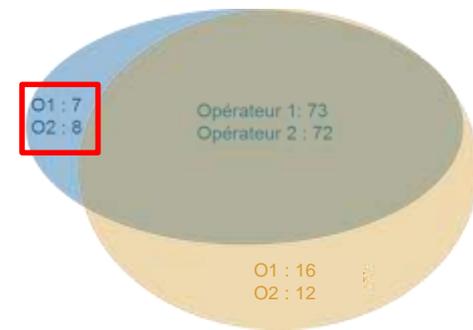


8 Gain de la région Xp22.33 (0,94Mb) incluant *SHOX*
Fusion P2RY8-CRLF2 Délétion de la région Xp22.33 (0,53Mb) incluant *CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA*, *P2RY8*

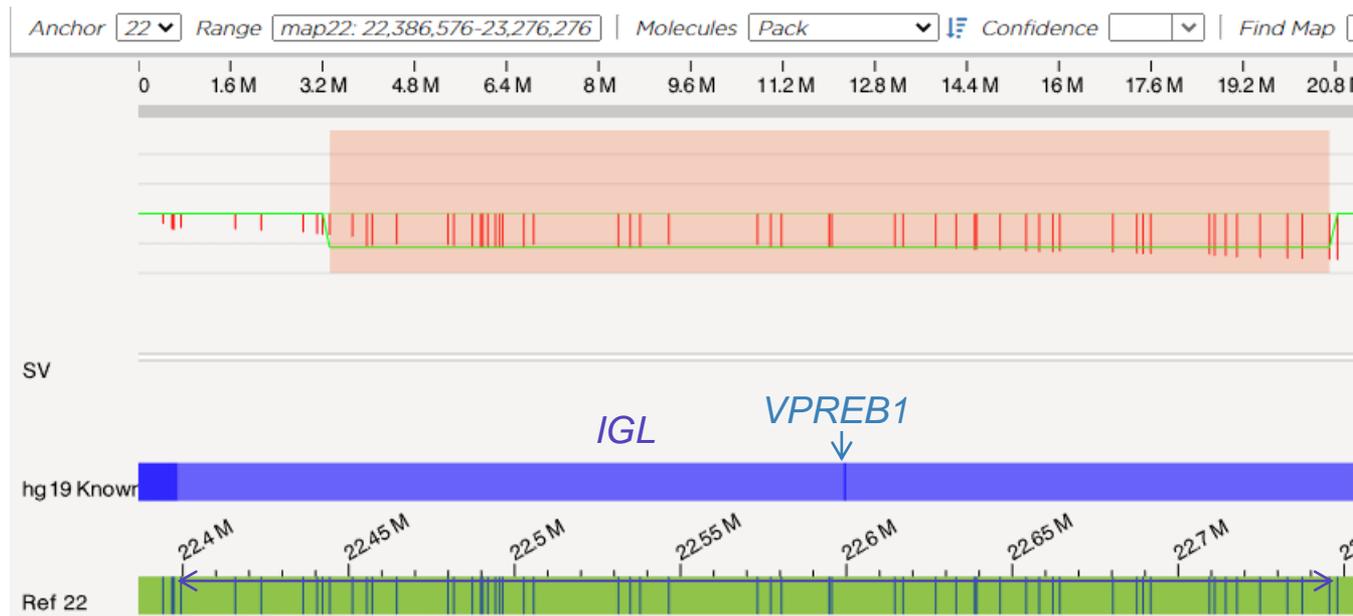


Région pseudo-autosomique (PAR) « non couverte »

Résultats

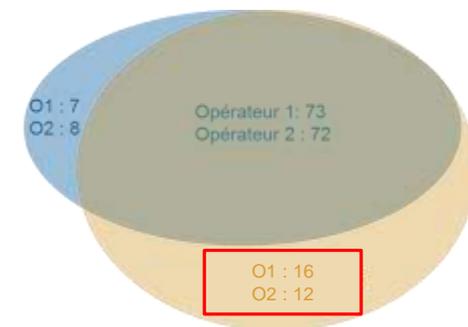


4 Délétion de la région 22q11.22-q11.23 (1,17Mb) incluant *VPREB1*



Résultats

Pt	Abn	Taille (Kbp)
1	Translocation t(11;14) LMO2-TCRA	NA
	Deletion 13q12.11 near <i>ZMYM2</i>	79,292
2	Deletion 4q25 involving <i>LEF1</i>	25,712
	Translocation/Inversion t(7;8) TCRB-MYC	NA
3	Gain 16q24.3 involving <i>CBFA2T3</i>	186,705
5	Insertion 10q24.31 near <i>TLX1</i>	53,614
	der(16)t(16;17)(16pter→16p13.3::17q25.3→17q25.3),der(?)t(17;9;12;19)(17qter→17q25.3::9q34.11→9q34.11::12q24.31→12q24.31::19p13.2→19pter)	NA
7	dic(7;10)t(7;21;20;10)(7pter→7q22.1::21q22.11→21q22.3::20q11.21→20q11.22::10q26.13→10pter)	NA
	Translocation t(20;21)	NA
8	der(4)t(4;5)(p14;q22.1) <i>RELL1-TSLP</i>	NA
9	Translocation t(14;20) IGH-CEBPB	NA
10	Deletion 3p21.31 involving <i>SETD2</i>	198,852



3 translocations bien décrites dans les LAL :

- *LMO2-TCRA*
- *TCRB-MYC*
- *IGH-CEBPB*

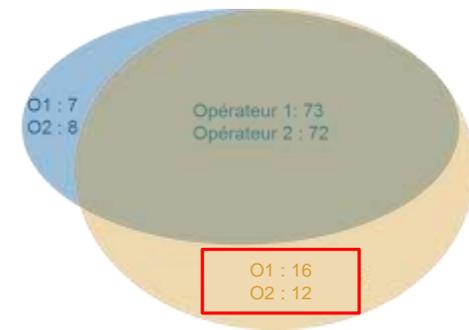
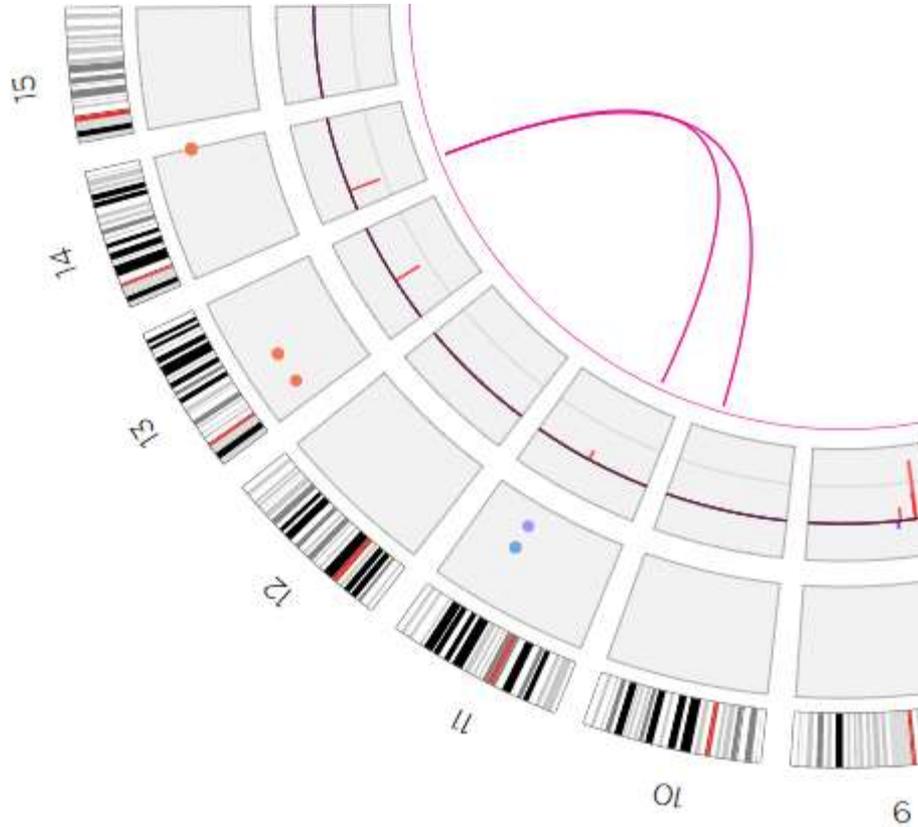
Points de cassure variables
Surexpression partenaire (pas de transcrit)

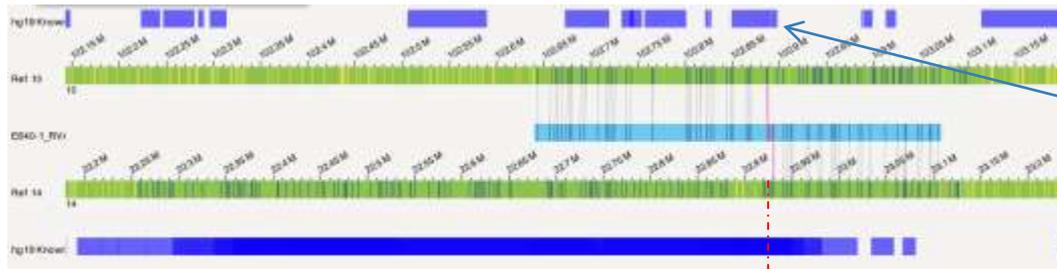
FISH non systématique sur ces cibles

Contrôlés FISH

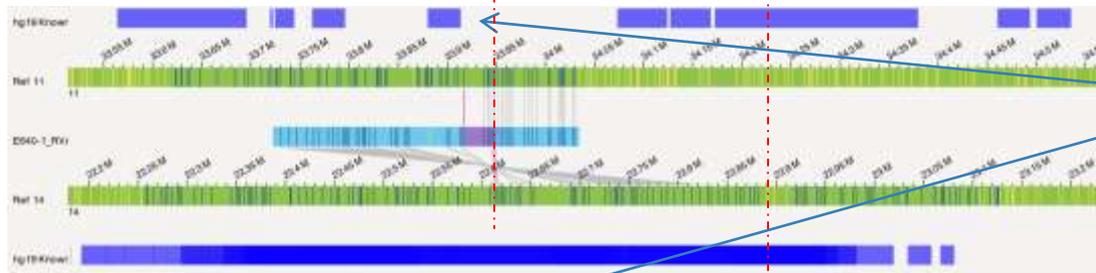
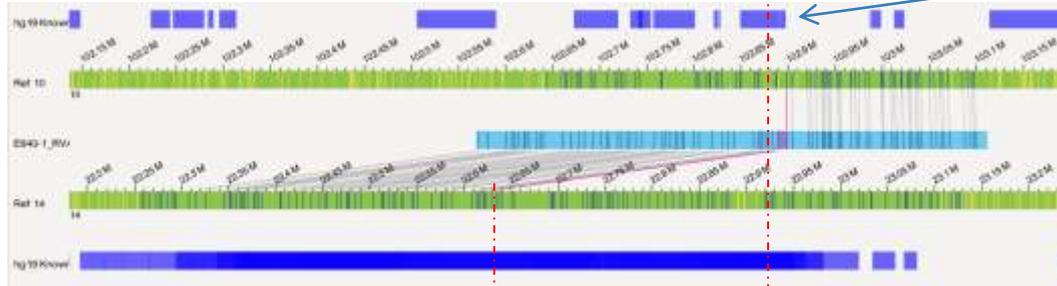
Résultats

Translocation t(11;14) *LMO2-TCRA*
Coexistence *TCRA-TLX1* et *TCRA-LMO2*

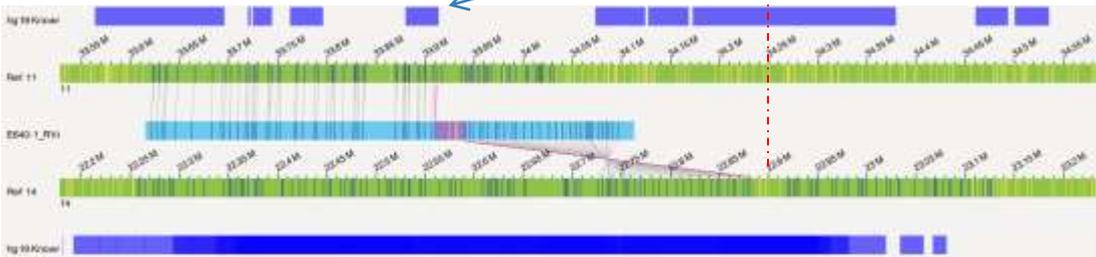


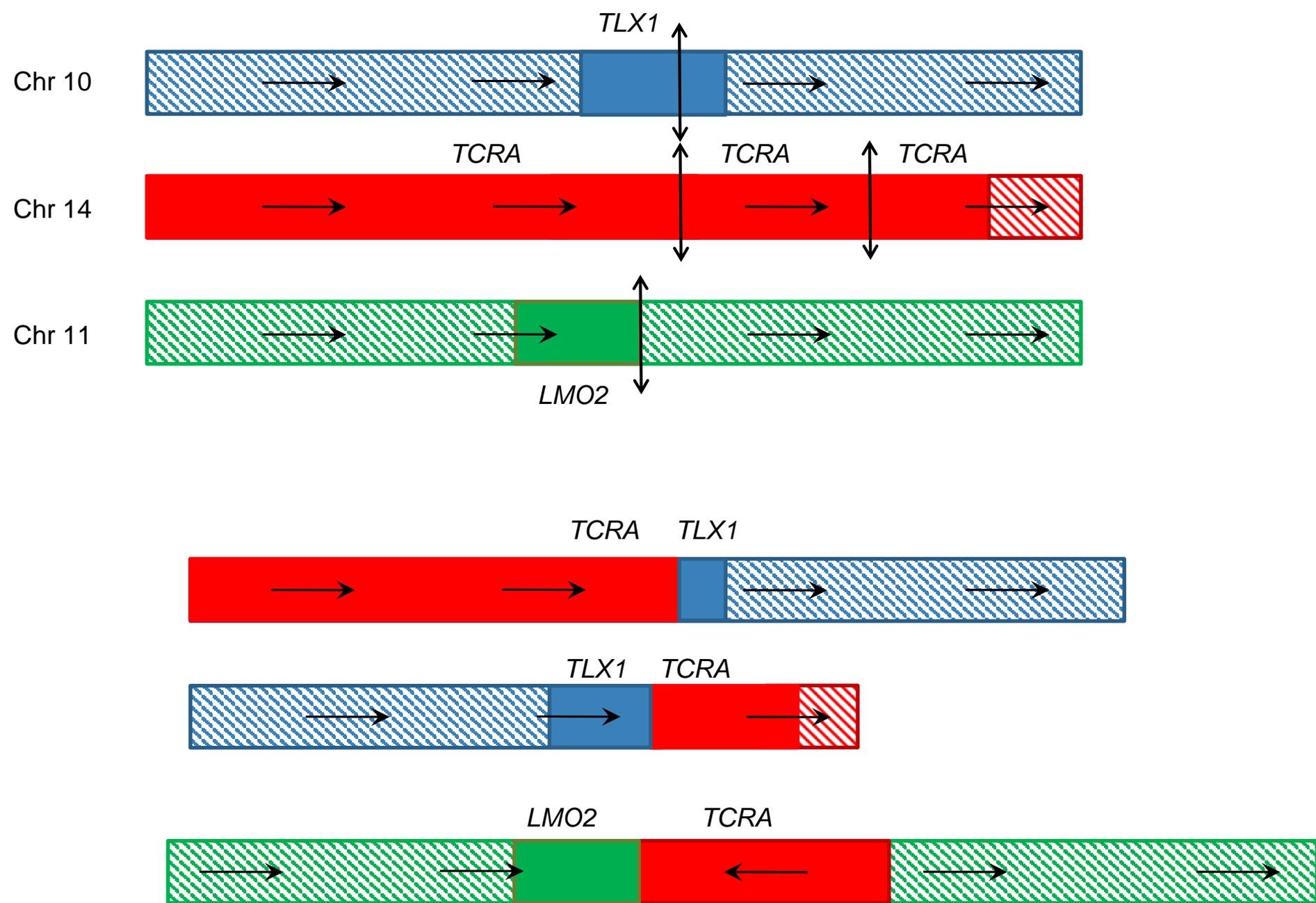


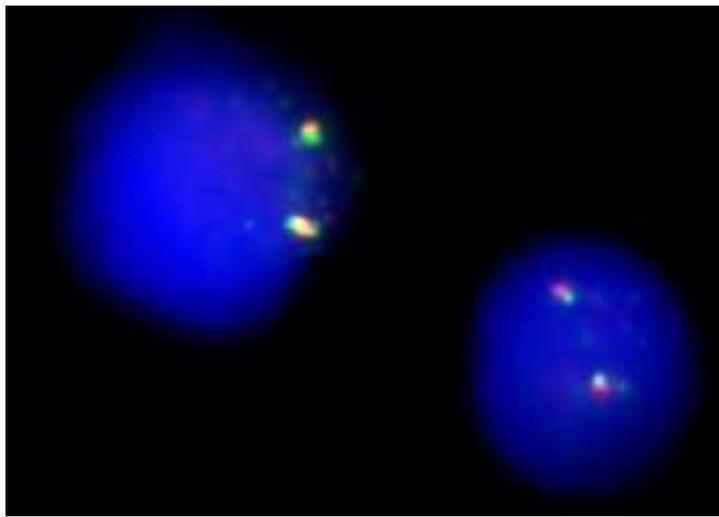
TLX1



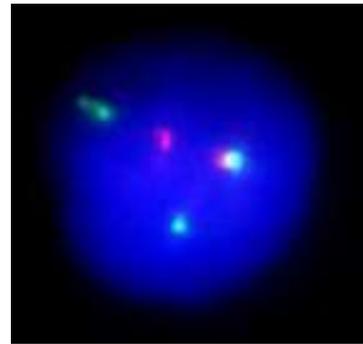
LMO2



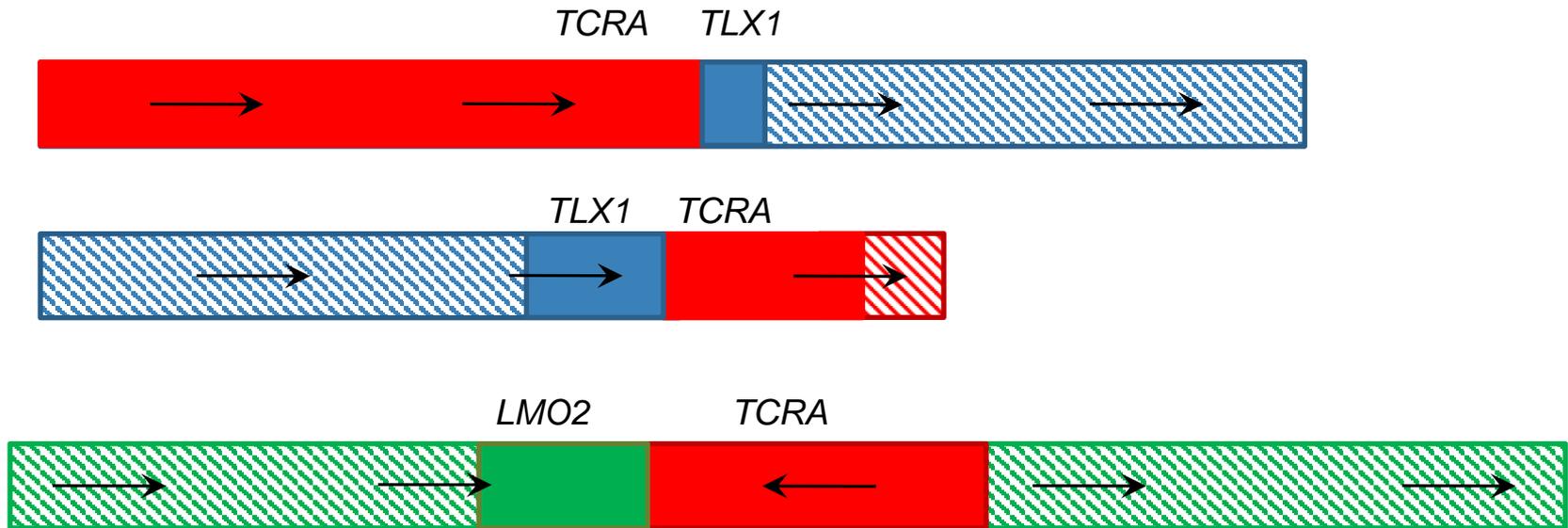
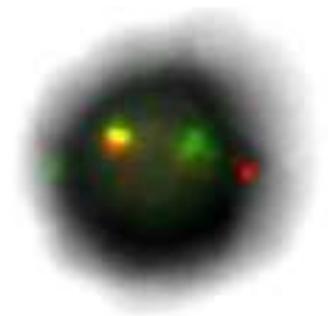




FISH *LMO2*

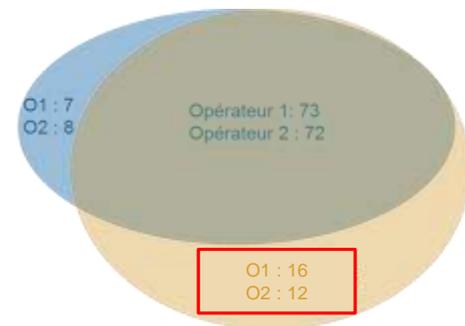


FISH *TRA/D*



Résultats

Pt	Abn	Taille (Kbp)
1	Translocation t(11;14) <i>LMO2-TCRA</i>	NA
	Deletion 11q13.3-q13.4 without genes of interest	1 762,807
	Deletion 13q12.11 near <i>ZMYM2</i>	79,292
2	Deletion 4q25 involving <i>LEF1</i>	25,712
	Translocation t(7;8) <i>TCRB-MYC</i>	NA
3	Deletion 2q12.3-q13 without genes of interest	1 282,087
	Gain 16q24.3 involving <i>CBFA2T3</i>	186,705
4	Gain 6q27 without genes of interest	1 280,768
5	Insertion 10q24.31 near <i>TLX1</i>	53,614
	der(16)t(16 ;17)(16pter→16p13.3 ::17q25.3→17q25.3),der(?)t(17 ;9 ;12 ;19)(17qter→17q25.3 ::9q34.11→9q34.11 ::12q24.31→12q24.31 ::19p13.2→19pter)	NA
7	Deletion 2p25.3 without genes of interest	2 038,497
	dic(7;10)t(7;21;20;10)(7pter→7q22.1 ::21q22.11→21q22.3 ::20q11.21→20q11.22 ::10q26.13→10pter)	NA
	Translocation t(20;21) involving <i>DNMT3B</i>	NA
8	der(4)t(4;5)(p14;q22.1) <i>RELL1-TSLP</i>	NA
9	Translocation t(14;20) <i>IGH-CEBPB</i>	NA
10	Deletion 3p21.31 involving <i>SETD2</i>	198,852



3 translocations bien décrites dans les LAL :

- *LMO2-TCRA*
- *TCRB-MYC*
- *IGH-CEBPB*

2 autres translocations à contrôler

2 remaniements très complexes

6 délétions, 2 gains et 1 insertion dont

- Retour datas brutes SNP-A
- 4 >1Mb : non confirmées

Résultats

Pt	Abn	Taille (Kbp)
1	Translocation t(11;14) <i>LMO2-TCRA</i>	NA
	Deletion 11q13.3-q13.4 without genes of interest	1 762,807
	Deletion 13q12.11 near <i>ZMYM2</i>	79,292
2	Deletion 4q25 involving <i>LEF1</i>	25,712
	Translocation t(7;8) <i>TCRB-MYC</i>	NA
3	Deletion 2q12.3-q13 without genes of interest	1 282,087
	Gain 16q24.3 involving <i>CBFA2T3</i>	186,705
4	Gain 6q27 without genes of interest	1 280,768
5	Insertion Duplication 10q24.31 near <i>TLX1</i>	53,614
	der(16)t(16 ;17)(16pter→16p13.3 ::17q25.3→17q25.3),der(?)t(17 ;9 ;12 ;19)(17qter→17q25.3 ::9q34.11→9q34.11 ::12q24.31→12q24.31 ::19p13.2→19pter)	NA
7	Deletion 2p25.3 without genes of interest	2 038,497
	dic(7;10)t(7;21;20;10)(7pter→7q22.1 ::21q22.11→21q22.3 ::20q11.21→20q11.22 ::10q26.13→10pter)	NA
	Translocation t(20;21) involving <i>DNMT3B</i>	NA
8	der(4)t(4;5)(p14;q22.1) <i>RELL1-TSLP</i>	NA
9	Translocation t(14;20) <i>IGH-CEBPB</i>	NA
10	Deletion 3p21.31 involving <i>SETD2</i>	198,852



3 translocations bien décrites dans les LAL :

- *LMO2-TCRA*
- *TCRB-MYC*
- *IGH-CEBPB*

2 autres translocations à contrôler

2 remaniements très complexes

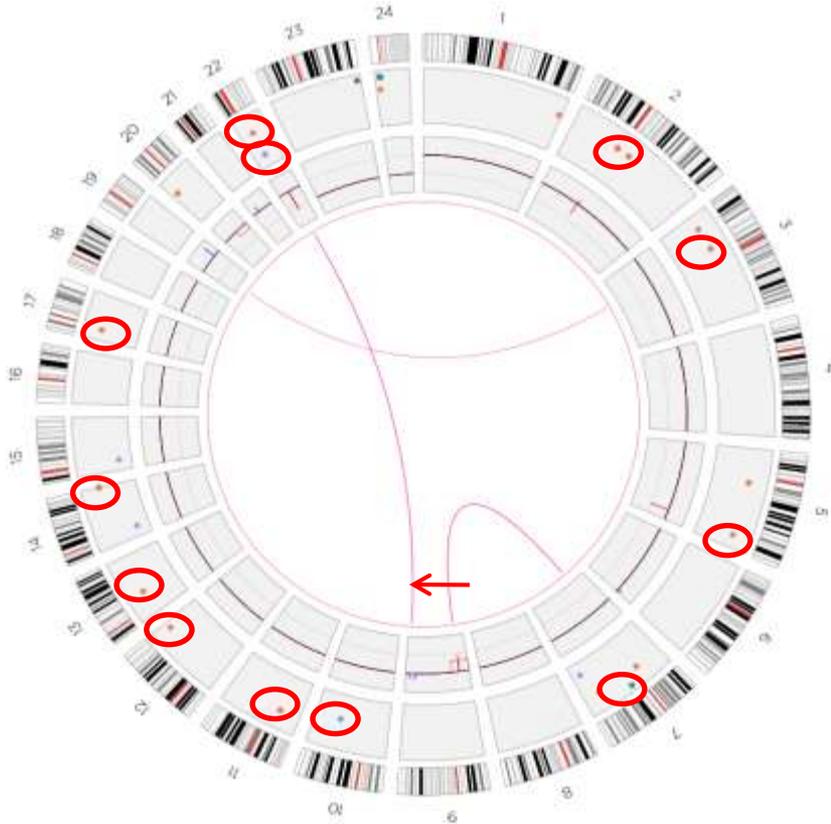
6 délétions, 2 gains et 1 insertion dont

- Retour datas brutes SNP-A
- 4 >1Mb : non confirmées

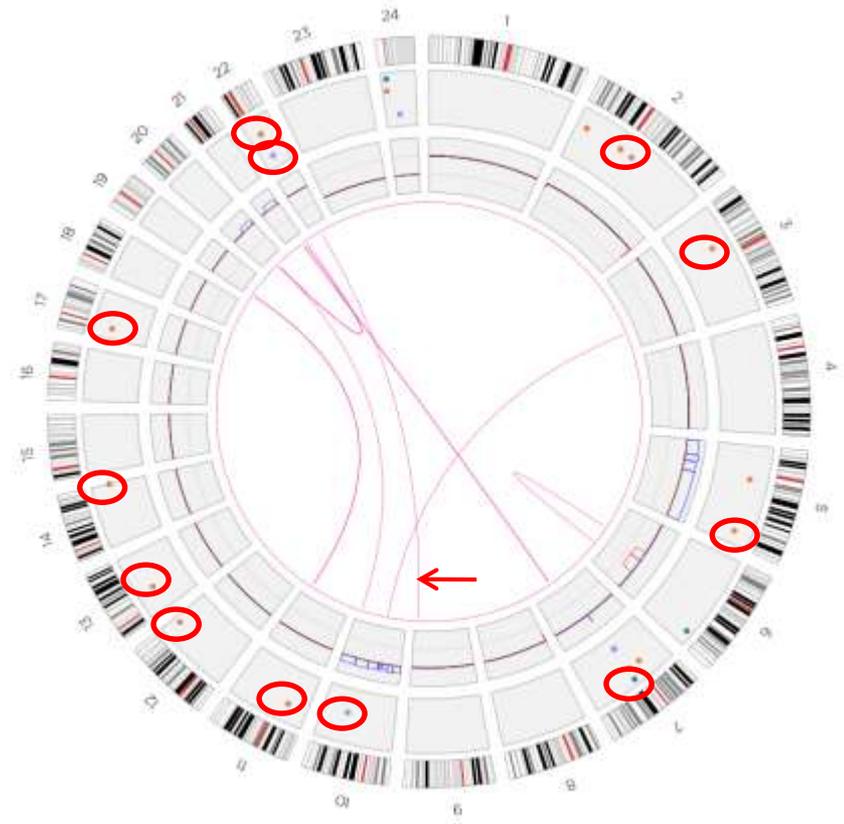
Contamination

- ▷ Patient 6 par patient 3
- ▷ 17 anomalies communes, avec single molecule counts très faibles pour le contaminé
- ▷ Envisager barcoding ?

Sample 3



Sample 6



Conclusion

- ▷ Maturité de la technologie
- ▷ Résolution, sensibilité analytique
- ▷ Angles morts PAR, centromères, télomères, gains/pertes de chromosomes entiers en faible fraction
- ▷ Contamination
- ▷ Applicabilité
 - diagnostic nécessité essais sur cohortes larges
 - recherche nouveaux variants/cibles

Remerciements

▷ CHU Amiens

- Dr Yann Ferret
- Dr Guillaume Jedraszak
- Pr Loïc Garçon
- Pr Jean Pierre Marolleau
- Mélanie Duval
- Anne-Lise Meens
- Francis Yonkeu-Fonze
- Service d'hématologie clinique

▷ CHU Lille

- Dr Nicolas Duployez
- Pr Claude Preudhomme
- Dr Nathalie Grardel
- Laboratoire d'hématologie

▷ Centre Henri-Becquerel Rouen

- Dr Dominique Penther
- Laboratoire de cytogénétique OH

▷ CHU Toulouse

- Dr Isabelle Luquet

▷ Bionano

- Joyce Lee
- Yannick Delpu
- Lucia Muraro

