

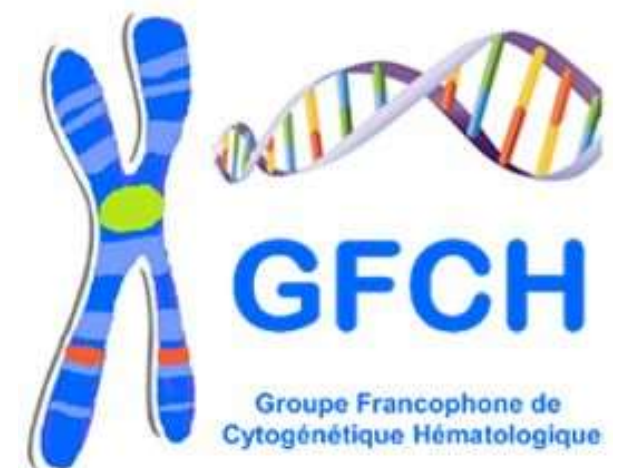
Journée du Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique

LE SÉQUENÇAGE PAR NANOPORE : PREMIERS PAS AUX HOSPICES CIVILS DE LYON

Le 05/02/2026

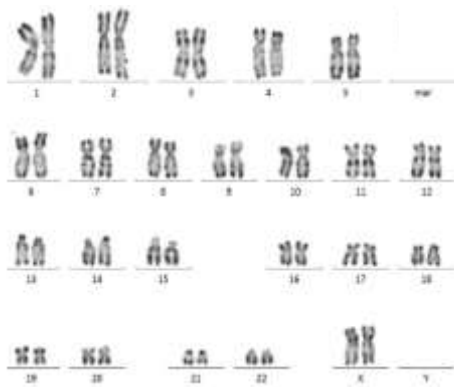
Dr Auriane SALOTTI

Assistante spécialiste en cytogénétique hématologique



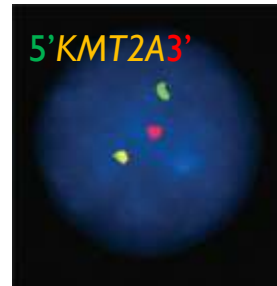
Contexte

Caryotype



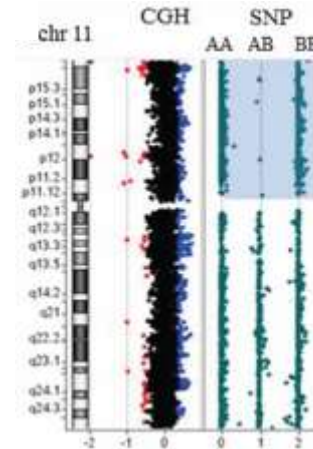
- Pangénomique
- Délai de 5 à 15 jours
- Faible résolution (5 à 10 Mpb)

FISH



- Technique ciblée
- Résolution accrue \approx 150kpb

CGH / SNP Array



- Pangénomique
- Résolution accrue \approx 50kpb
- Ne détecte pas les anomalies de structure équilibrées

Cartographie Optique du Génome



- Pangénomique
- Haute résolution \approx 500pb

Séquençage par Nanopore



Séquençage par nanopore

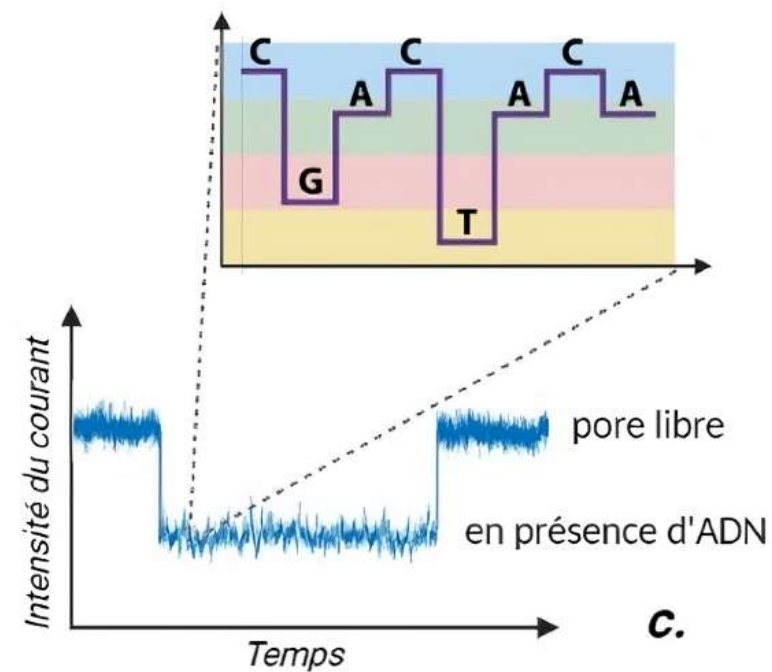
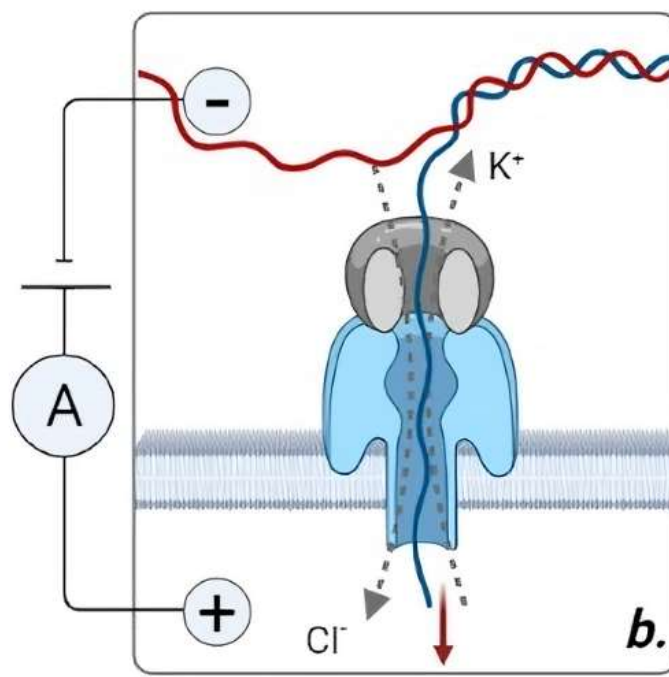
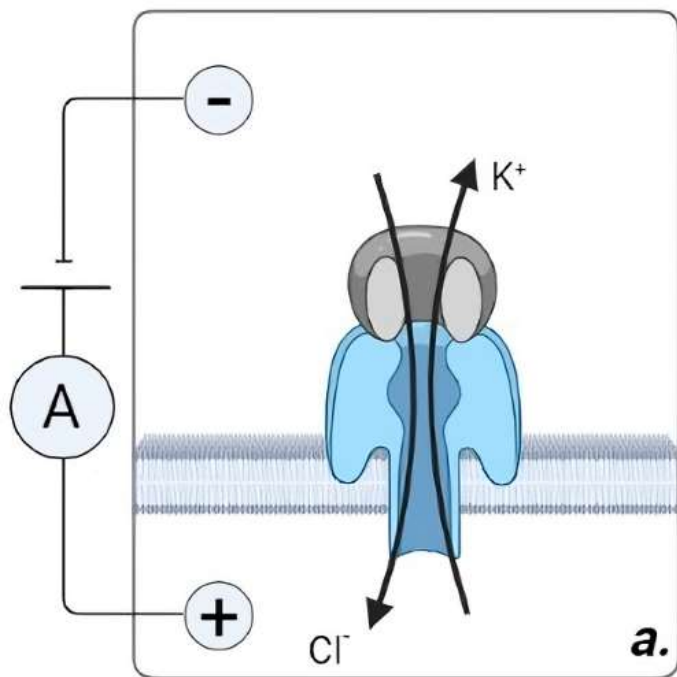


Schéma du principe du séquençage par nanopore

Avantages

- Séquençage
 - Direct
 - Temps réel
 - Long-Read

➔ Technologie pangénomique de très haute résolution

Inconvénients

- Pas de « clé en main »
- Taux d'erreur élevé : 3,2% *

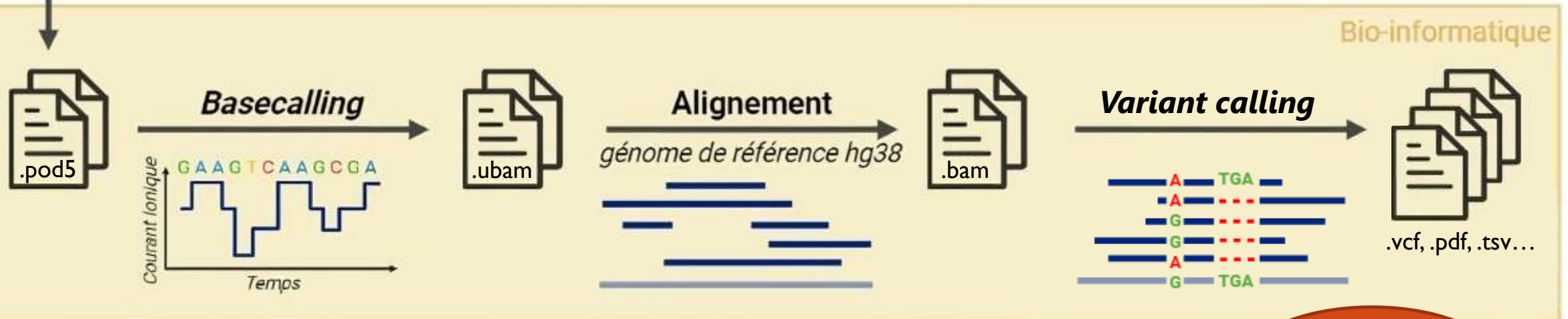


Indications restreintes pour l'instant :
Cytopénies et SMD

Aux HCL : concernerait environ 1400 (53%) caryotypes (chiffres 2025)

En pratique au laboratoire

- 1 librairie = 1 à 10 patients par flowcell



Résumé des différentes étapes suivies pour le séquençage par nanopore

Total : 3-4 jours, optimisable !

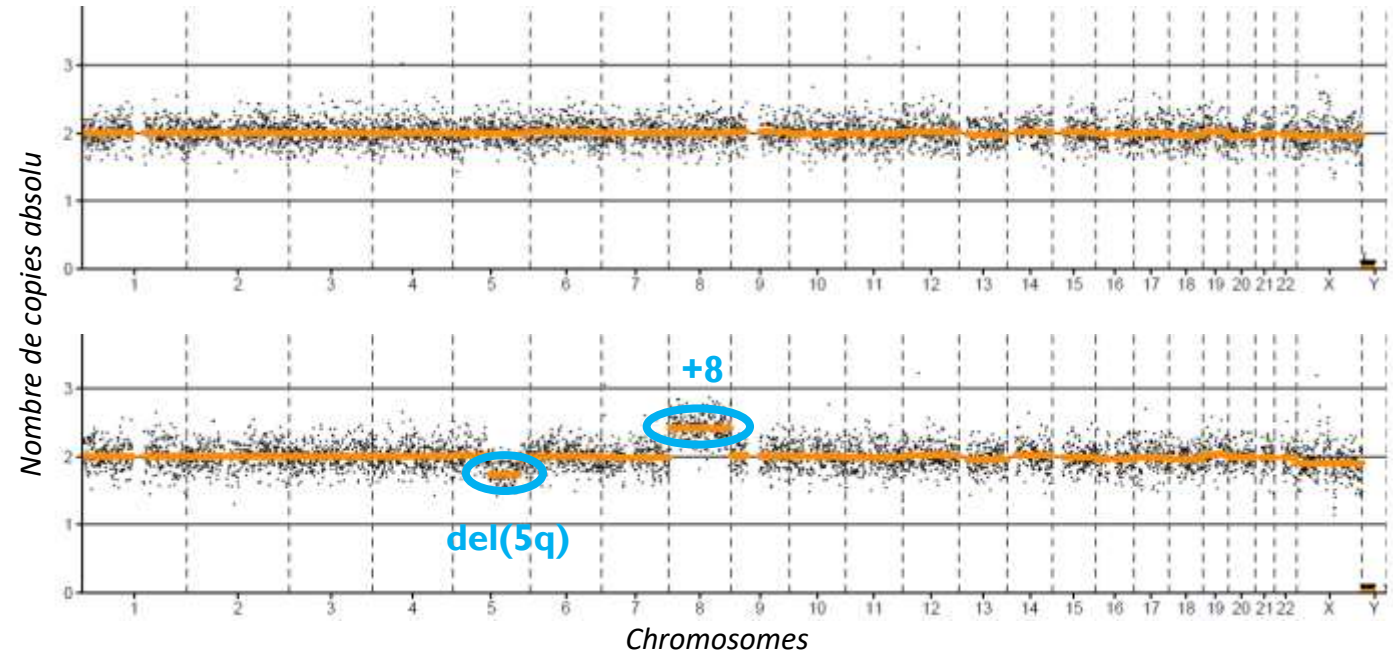
En sortie du pipeline :



Profil du nombre de copies de chaque segment de 100-500kpb du génome



Script *ACE*
CNVs



A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
AnnotSV_ID	SV_chrom	SV_start	SV_end	Cytoband	Gene_name	SV_length	SUPPORT	SV_type	AL	FILTER	COORD	COVERAGE	STRAND	AF	STDEV				
1	16	88929973	88930298	q24.3	CBFA2T3	325	11	DUP	54	PASS	IMPRECISE	30,28,19,23,2	+	0,324	1				
4	19	18442115	18442571	p13.11		456	8	DUP	48	GT	IMPRECISE	37,36,33,30,3	+	0,269	3				
5	2	99820749	99821162	q11.2	AFF3	413	2	DUP	57	GT	PRECISE	38,34,25,33,1	+	0,179					
6	16	88929513	88929874	q24.3	CBFA2T3	361	8	DUP	37	GT	PRECISE	33,30,23,25,2	+	0,188					
7	X	1453889	1454157	p22.33		268	8	DUP	32	PASS	IMPRECISE	13,11,12,12,1	+	0,375					
8	13	28065714	28065900	q12.2	FLT3	186	8	DUP	35	GT	IMPRECISE	31,29,33,31,1	+	0,171					
9	MT	5	18568			10062	5	DUP	33	PASS	PRECISE	None,0,5,No+		STDEV_LEN=STDEV					
10	X	119647658	119647970	q24	SEPTIN6	312	5	DUP	53	GT	PRECISE	17,17,12,18,1	+	0,227					
11	17	77484925	77485462	q25.3	SEPTIN9	537	4	DUP	48	GT	IMPRECISE	28,28,23,29,1	+	0,129					
12	17	77484343	77484780	q25.3	SEPTIN9	437	4	DUP	60	GT	IMPRECISE	29,30,30,26,2	+	0,129					
13	17	77485033	77485403	q25.3	SEPTIN9	370	4	DUP	52	GT	PRECISE	30,27,23,29,3	+	0,129					
14	16	88951089	88951325	q24.3	CBFA2T3LON	236	4	DUP	47	GT	IMPRECISE	35,33,28,28,2	+	0,121	3				
15	6	167976507	167976680	q27	HGC6.3	173	4	DUP	43	GT	PRECISE	23,20,21,2	+	0,174					
16	20	31060818	31060884	q11.21		306	3	DUP	40	PASS	PRECISE	11,8,9,10,12	+	0,273					
17	10	38525034	38529467	p11.1		443	3	DUP	45	GT	IMPRECISE	3,3,21,19,0	+	0,231	9				
18	11	120328597	120329162	q23.3	TLCD5	565	3	DUP	54	GT	PRECISE	14,19,14,18,1	+	0,15					
19	9	137503386	137503923	q4.3	PNPLA7	537	3	DUP	56	PASS	PRECISE	0,7,9,9,10	+	0,3	3				
20	X	1473343	1473786	p22.33	P2RYE	443	3	DUP	58	GT	PRECISE	14,14,13,15,1	+	0,188					
21	10	41898004	41910294	q11.21		1200	2	DUP	15	PASS	IMPRECISE	2,2,6,5,4	+	0,333	17				
22	20	31060358	31069914	q11.21		856	2	DUP	31	GT	IMPRECISE	4,10,7,32,11	+	0,087	1				
23	10	38525420	38529719	p11.1		429	2	DUP	42	GT	IMPRECISE	3,6,25,0,0	+	0,25	1				
24	1	125162587	125168252	q12		3665	2	DUP	38	PASS	PRECISE	2,2,2,0,0	+	0,5					
25	Y	26668805	26671683	q12		3878	2	DUP	38	GT	PRECISE	1,0,16,10,6	+	0,167					
26	16	26373802	26374715	p12.1		913	2	DUP	56	PASS	IMPRECISE	2,2,4,3,4	+	0,5	1				

Tri selon type de SV et nombre de reads avec anomalie

Visualisation de l'alignement sur IGV



Tableau répertoriant toutes les variations détectées

Script *Sniffles*
SVs

Etude de faisabilité (GridION)

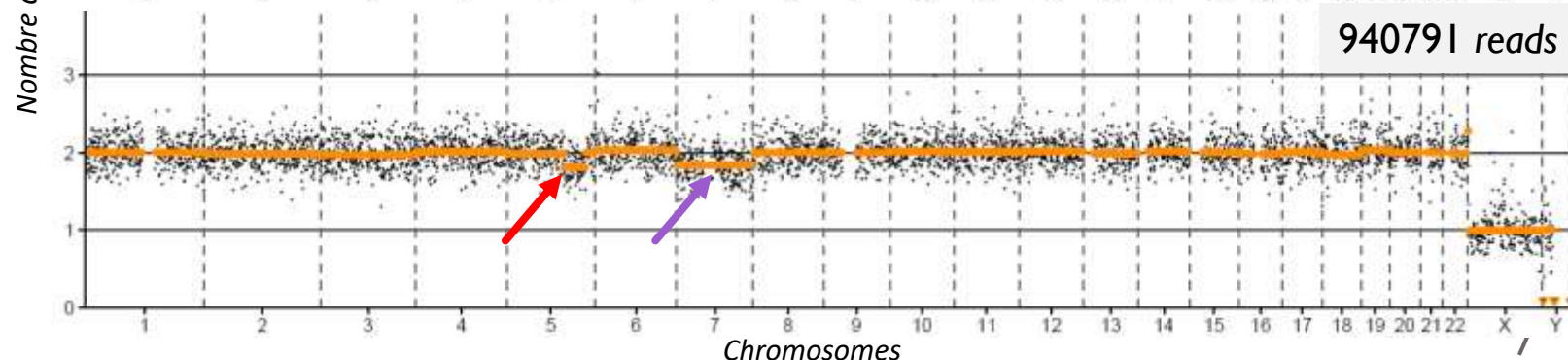
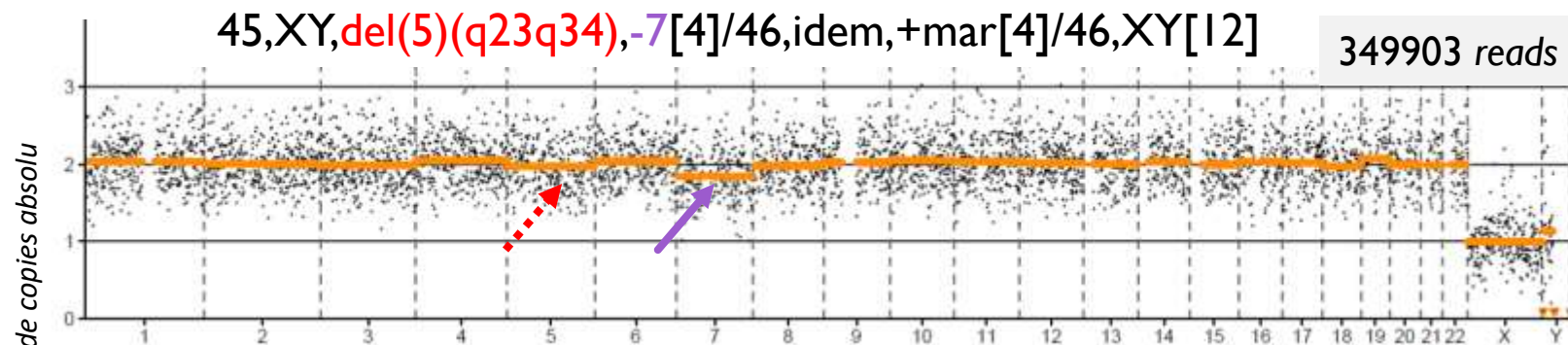
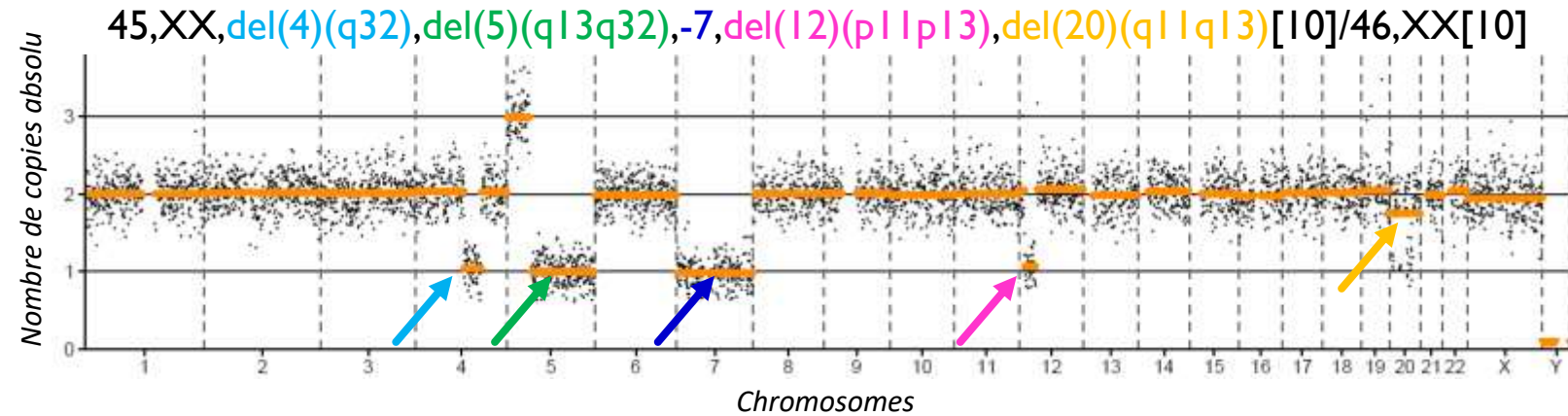
10 patients SMD + 17 patients LAM

37 CNVs connus au caryotype

- 32 retrouvés
- 5 manquantes
 - CNVs sur ≤ 2 mitoses/20

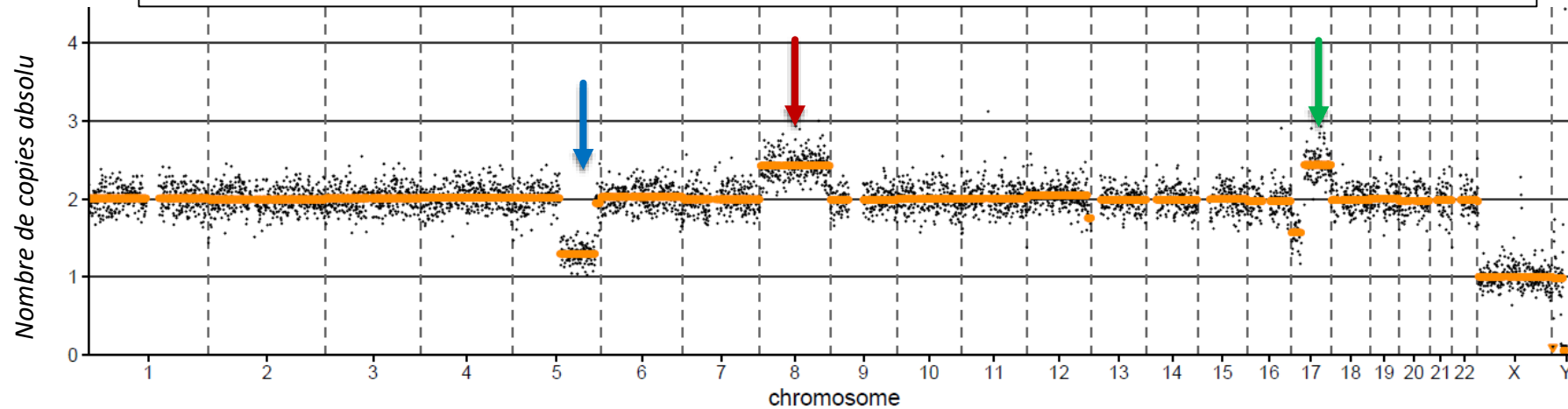
➔ Concordance de **86%**
avec le caryotype

- Biais de culture ?
- Nombre insuffisant de reads ?
- Impact de la bio-informatique ?

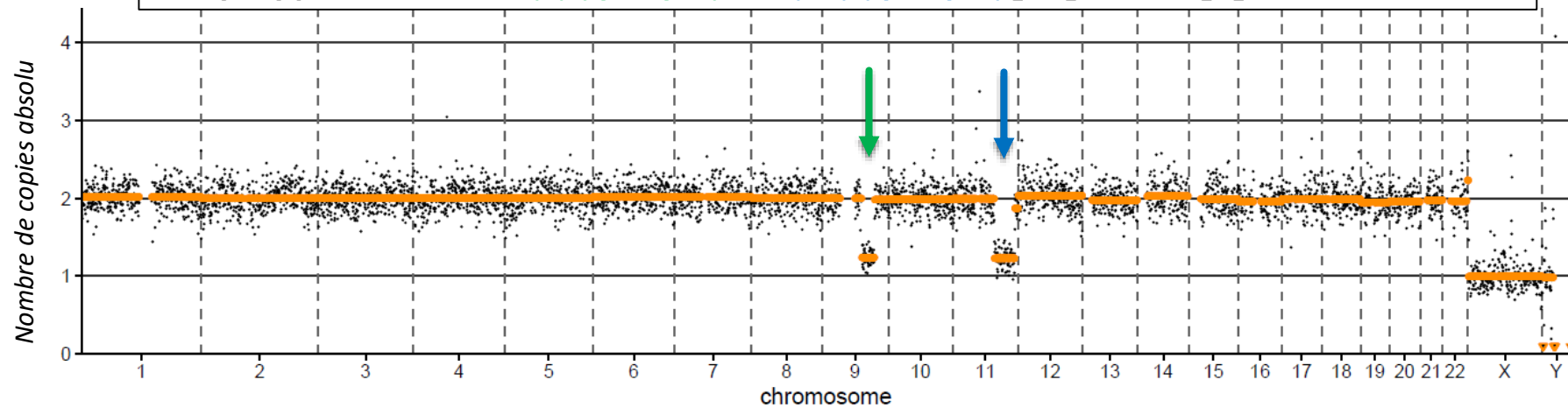


Profils « initial » et « initial + repasse »

Caryotype : 46,XY,del(5)(q13q34)[6]/47,idem,+8,i(17)(q10)[7]/46,XY[7]



Caryotype : 46,XY,del(9)(q12q32),del(11)(q21q24)[14]/46,XY[6]





Etude rétrospective (PromethION)

11 runs (70 patients)

Initiation de la VDM

- Etude de contamination intra-librairie ✓
- Etude de contamination inter-librairie (flowcells réutilisables) ✓
- Répétabilité ✓
- Reproductibilité ✓
- Comparabilité tube hépariné / tube EDTA ✓



	GridION	PromethION 24
Configuration		
Number of flow cells per device	5	24
Maximum number of channels per flow cell	512	2,675
Run time	72 Hours	72 Hours
Device TMO [†]	250 Gb	~7 Tb
Maximum number of flow cells per year [*]	520	2,596

TMO : Theoretical Maximum Output
 D'après <https://nanoporetech.com/products/specification>

Etude rétrospective (PromethION) : détection des anomalies pour les SMD

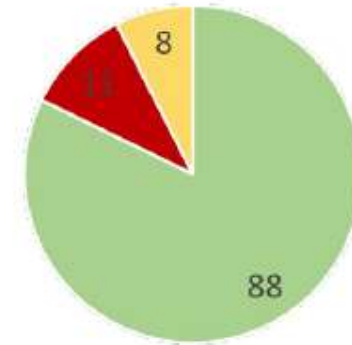
99 CNVs connus au caryotype

- 88 retrouvés
- 11 manquants
 - 5 patients avec <5Gb séquencées
 - 9 CNVs avec <6 mitoses/20
 - 1 del(3q) + del(3p) = anomalie équilibrée
- 8 anomalies supplémentaires

Impact pronostic (70 patients)

- Seul 1 changement de risque cytogénétique : défavorable → très défavorable

Répartition des anomalies



■ Trouvées ■ Manquantes ■ Supplémentaires

Thèse M.Bonnot, interne HCL

➔ **Concordance de 86%**
avec le caryotype

➔ **Résultats encourageants**

Etude prospective en cours (PromethION) : 25 runs de 10 patients

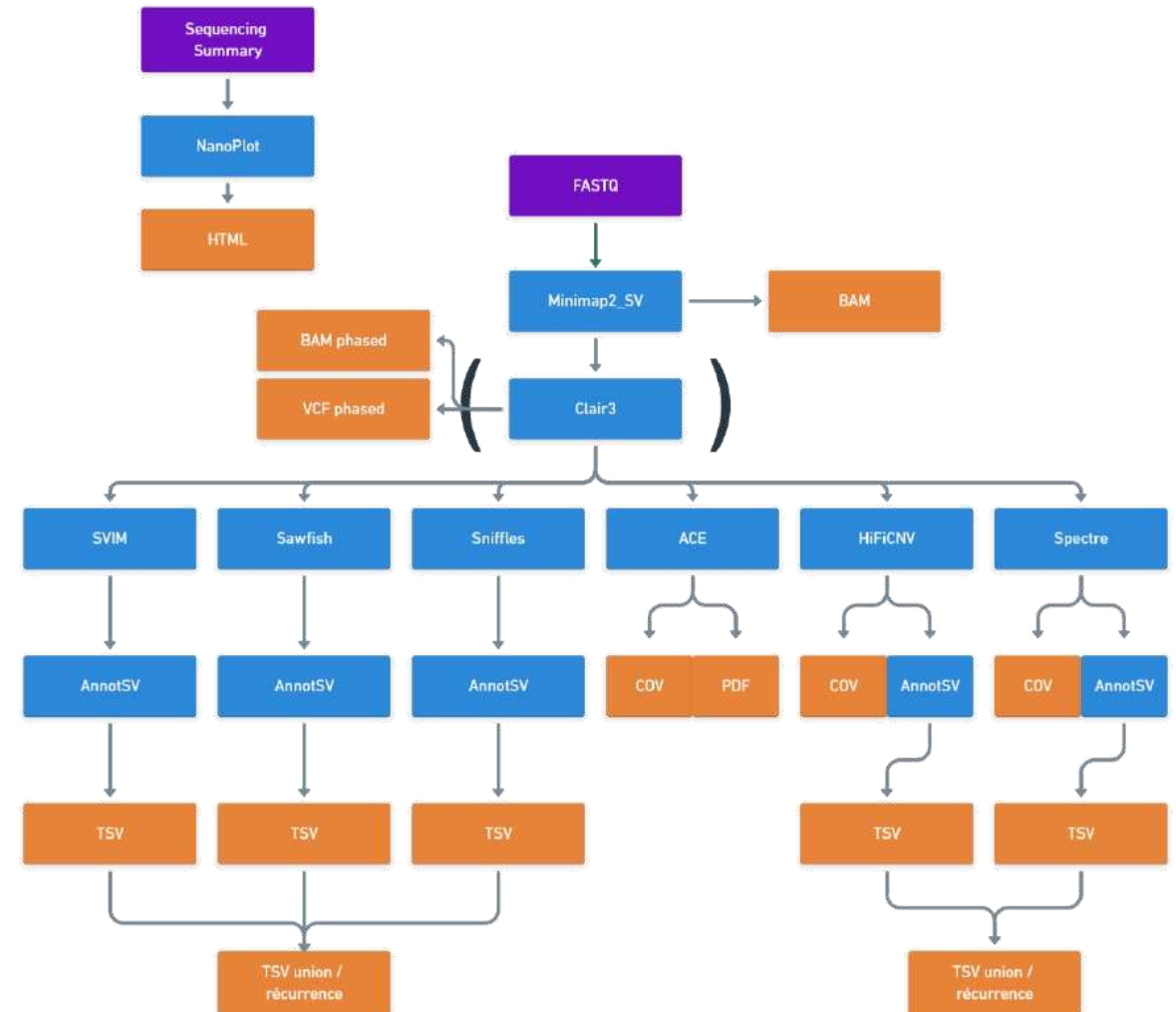
Travail en cours

- Interprétation
 - Seuils de significativité pour les anomalies sous-clonales (chromosomes X et Y ++)
 - Anomalies non visibles au caryotype
- Visualisation dynamique (rapport html interactif)
- Optimisation du pipeline et workflow bioinformatique

Potentiel d'amélioration

- Technologique
 - Automatisation future ?
 - Evolution continue des flowcells, du basecalling et des pipelines bioinformatiques

- Analytique : technologie pangénomique « **tout-en-un** »
 - CNV
 - SV
 - SNV
 - Méthylation
 - Haplotypes



Pipeline bioinformatique HCL_SV_ONT. Q.Testard

Etude de faisabilité pour les LAM (GridION)

1 CNVs

2 Translocations

3 Duplications

4 Insertions

5 Délétions cryptiques

6 Mutations ponctuelles et indels

Mode « adaptive sampling » préférentiel

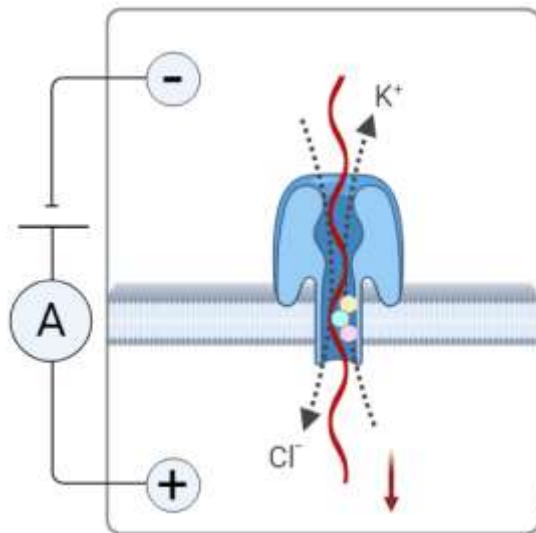
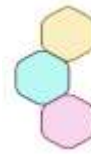
Non visibles en cytogénétique ! (techniques classiques biomol +/- NGS)

BONUS

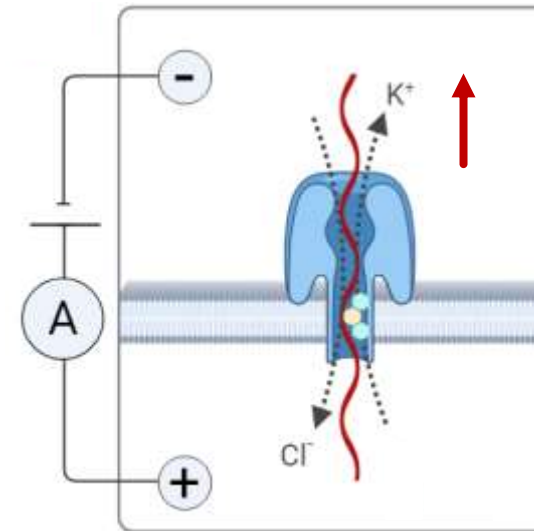


Le mode « adaptive sampling »

- Enrichissement des zones d'intérêt pour améliorer la détection des anomalies dans ces zones
- Motif nucléotidique déterminé en amont à reconnaître



Le séquençage se poursuit



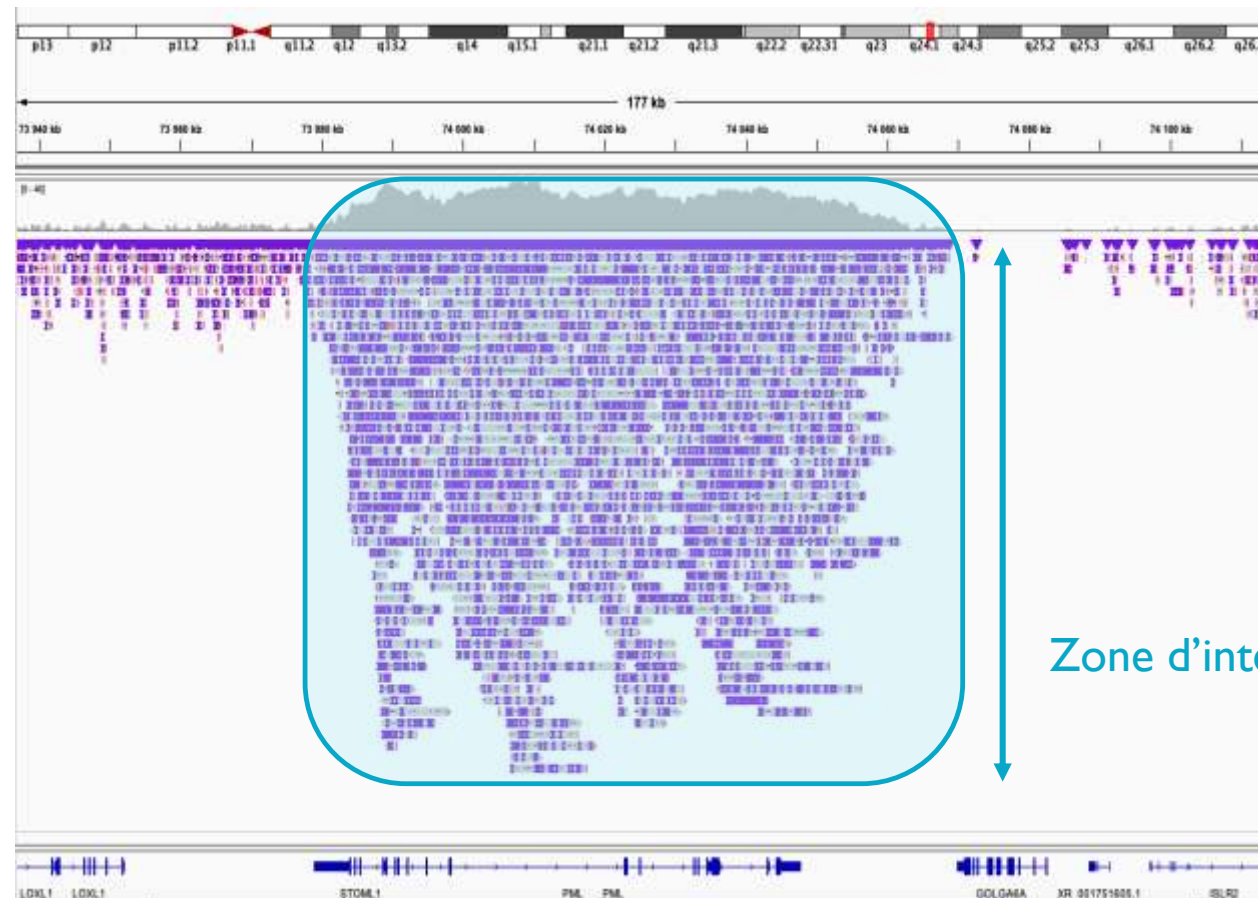
Le séquençage s'arrête :
rejet du brin d'ADN au profit d'un autre

Schéma du principe du séquençage par nanopore en mode « adaptive sampling »

Le mode « adaptive sampling »

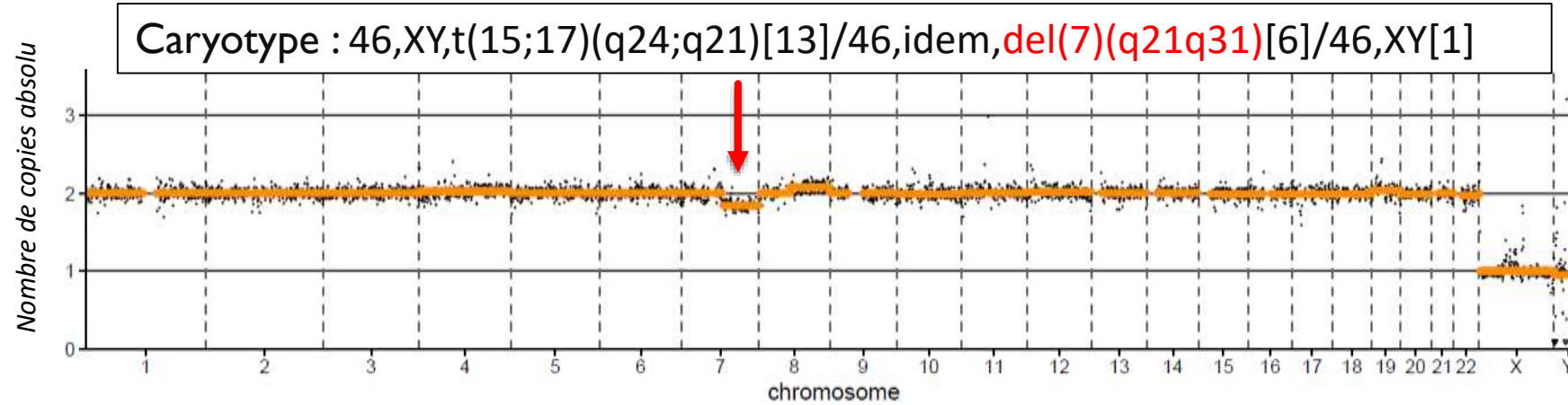


- Enrichissement des zones d'intérêt pour améliorer la détection des anomalies dans ces zones

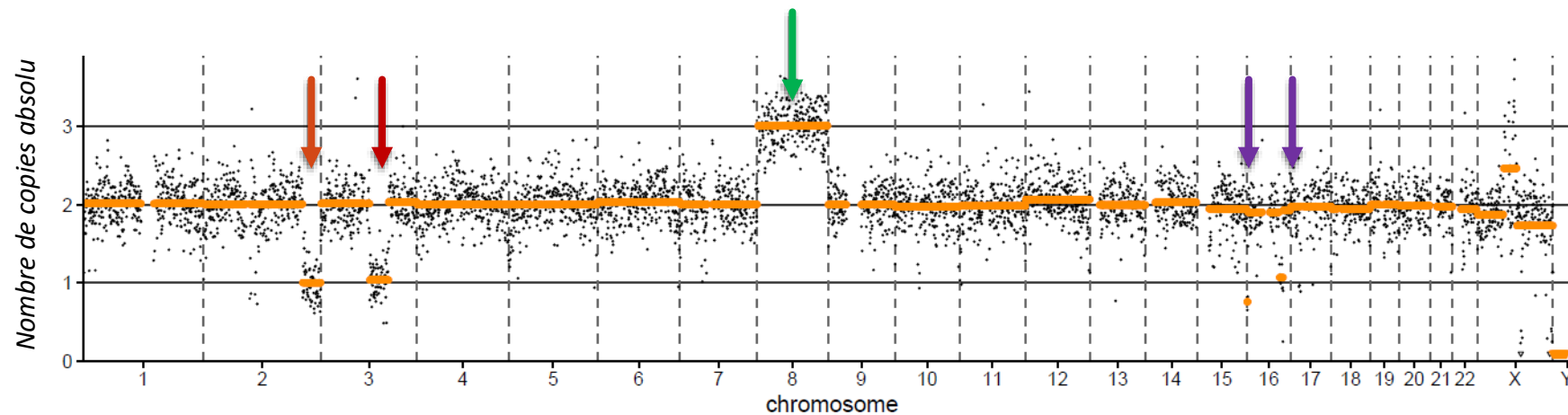


Autrement : $< 5 X$

Zone d'intérêt : $40 X$



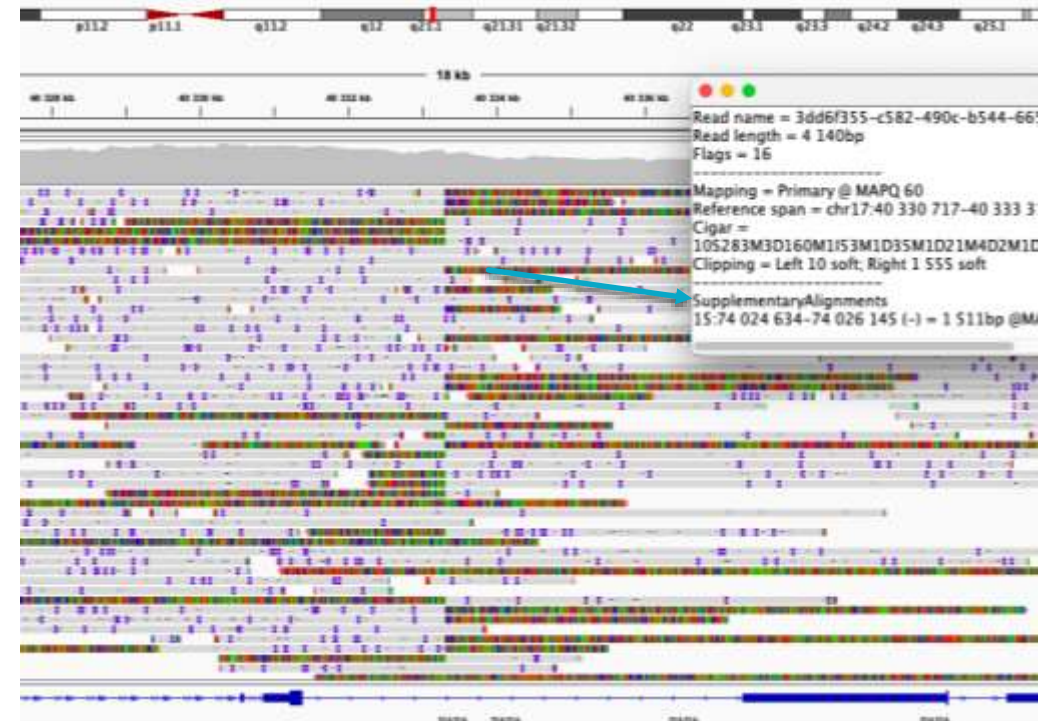
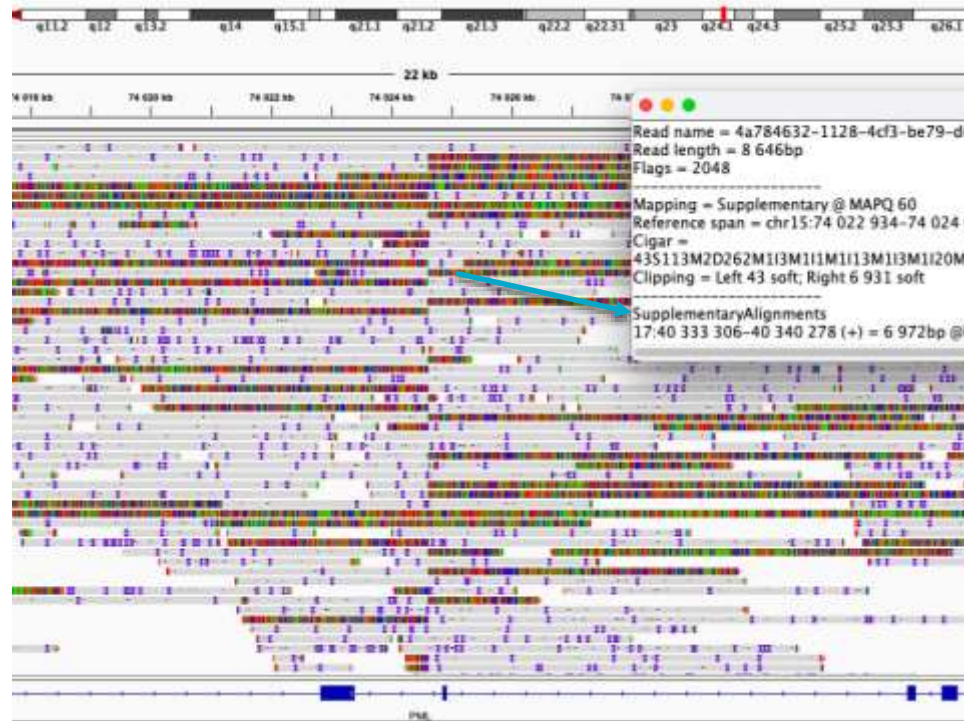
Caryotype : 47,XX, del(2)(q33),del(3)(q13q23),+8, der(16)inv(16)(p13q22) del(16)(p13)del(16)(q22q23)[14]/46,XX[6]



Translocations

t(15;17)(q24;q21) PML::RARA

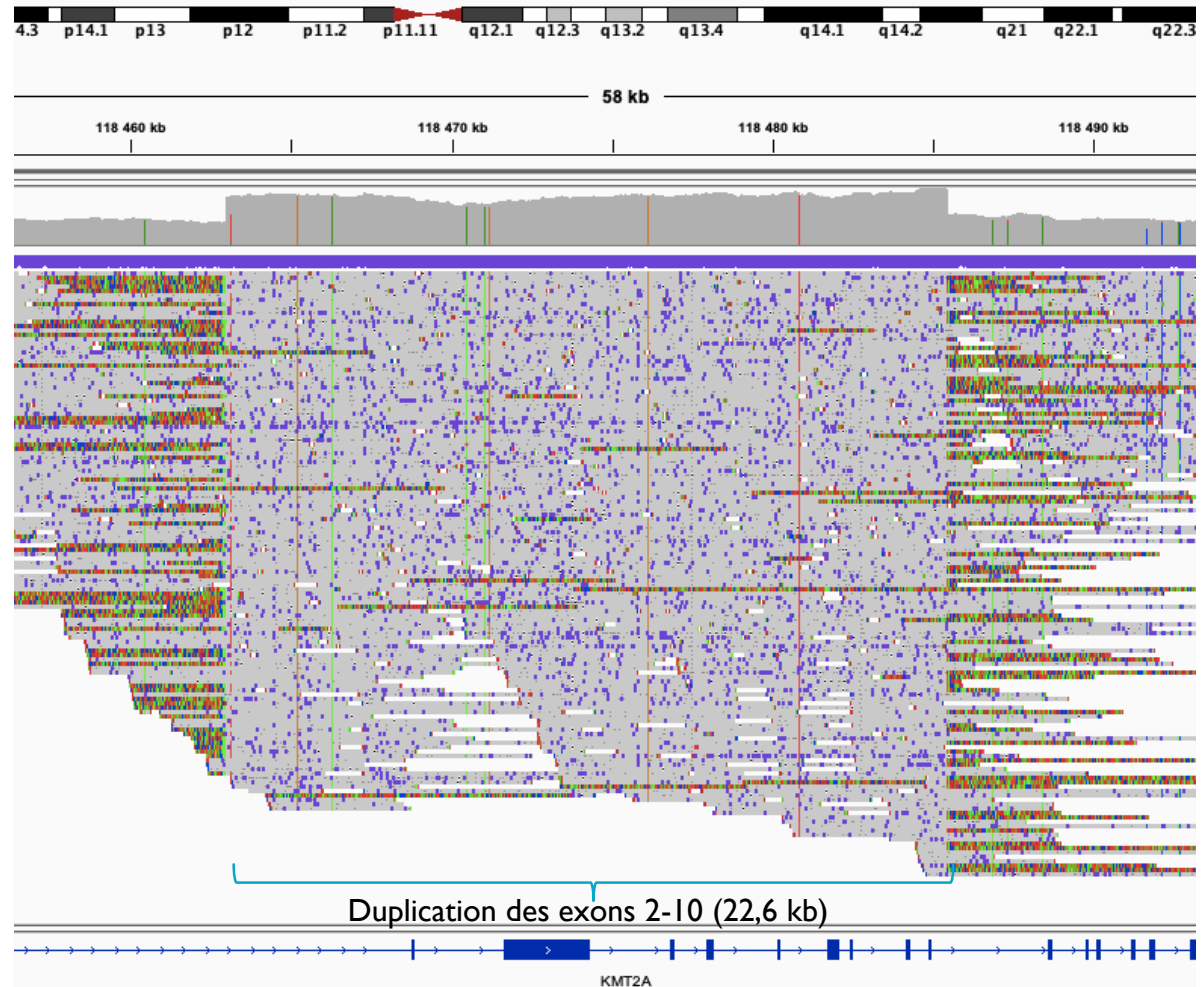
Mais aussi t(9;22), t(8;21), t(11;19)...



AnnotSV_ID	SV_c_hrc	SV_start	SV_end	CytoBand	Gene_name	SUPPORT	SV_type	ALT	QUAL	FILTER	COORD	COVERAGE	STRAND	AF
15_74024	15	74024624	74024624	q24.1	PML	23	TRA	[17:40333316[N	59	PASS	PRECISE	28,19,35,35,34	+-	0,767
17_40333	17	40333316	40333316	q21.2	RARA	22	TRA	N[15:74024624[59	PASS	PRECISE	27,16,25,23,24	+-	1
Y_112899	Y	11289963	11289963	q11.21		4	TRA	N[KI270710.1:34	31	PASS	PRECISE	0,1,5,5,4	-	1
21_10415	21	10415460	10415460	p11.2	BAGE;BAGE2	3	TRA	<TRA>	55	PASS	IMPRECISE	0,1,2,3,3	-	1
7_152401	7	152401605	152401605	q36.1	KMT2C	3	TRA	N]21:10415460]	55	PASS	IMPRECISE	0,1,2,3,3	-	1
21_79273	21	7927317	7927317	p11.2		3	TRA	N]KI270438.1:94	40	PASS	IMPRECISE	4,3,4,5,5	-	0,75

Duplications

KMT2A partial tandem duplication (MLL-PTD)

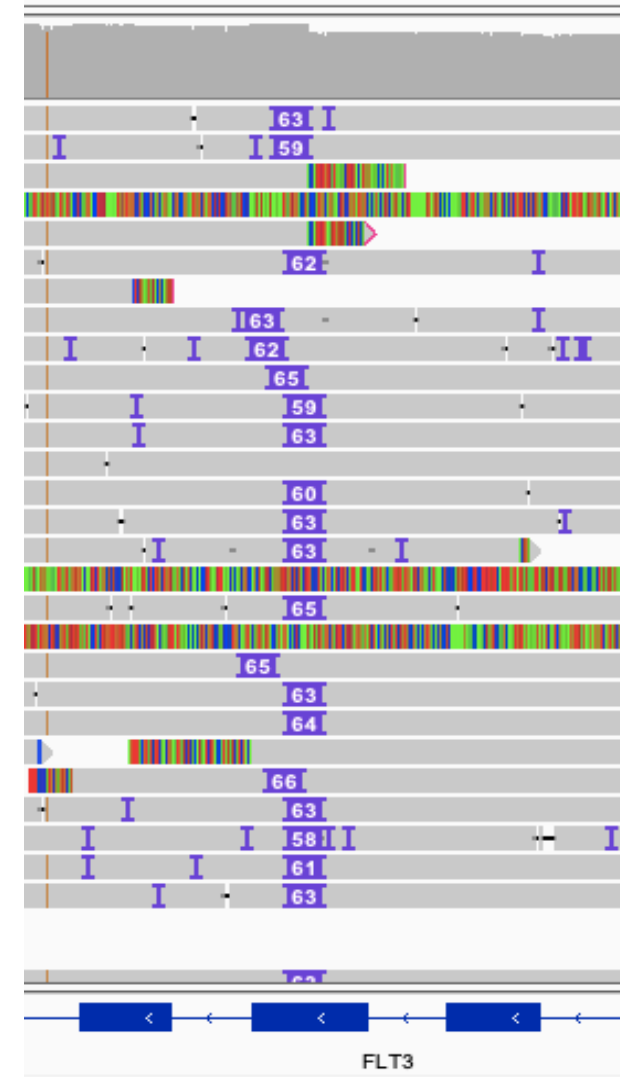


AnnotSV_ID	SV_chrom	SV_start	SV_end	CytoBand	Gene_name	SV_length	SUPPORT	SV_type	QUAL	FILTER	COORD	COVERAGE	STRAND	AF
11_11846	11	118462976	118485453	q23.3	KMT2A	22477	56	DUP	58	PASS	PRECISE	48,48,97,66,€+-		0,566
19_16277	19	1627741	1628952	p13.3	TCF3	1211	21	DUP	44	PASS	IMPRECISE	56,54,76,40,€+-		0,333
17_77484	17	77484645	77485182	q25.3	SEPTIN9	537	19	DUP	52	PASS	IMPRECISE	52,48,55,41,€+-		0,328
3_108575	3	108575524	108575892	q13.13	CIP2A	368	17	DUP	54	PASS	IMPRECISE	53,42,44,56,€+-		0,274

Insertions

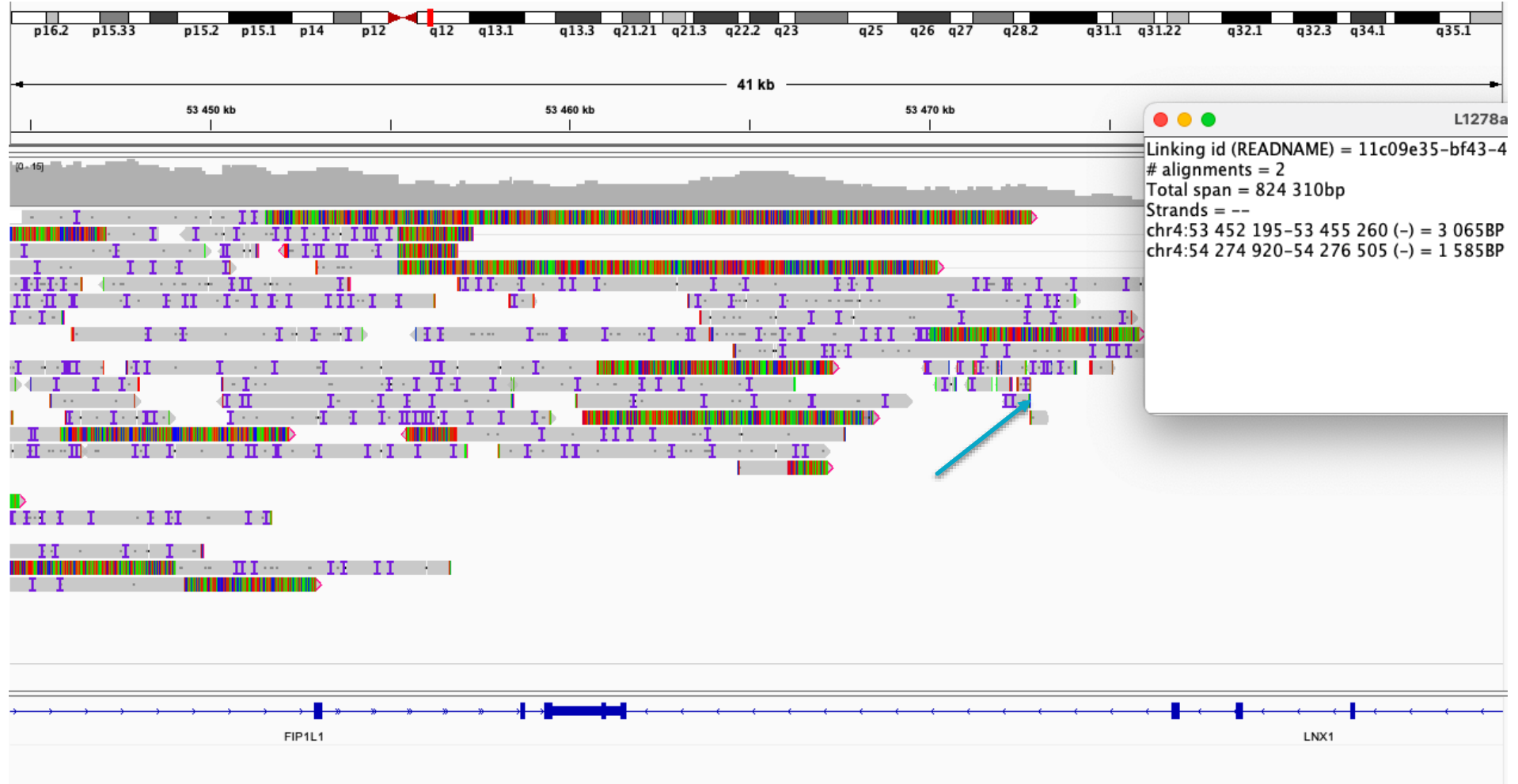
FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD)

AnnotSV_ID	SV_chrom	SV_start	SV_end	CytoBand	Gene_name	SV_length	SUPPORT	SV_type	ALT	COVERAGE	STRAN D	AF
5_143012544	5	143012544	143012544	q31.3	ARHGAP26	52	37	INS	TATGTATATA	34,36,36,35,35	+-	1
11_11925354	11	119253540	119253540	q23.3	CBL	224	34	INS	TCTGAGCCC	32,7,7,6,31	+-	1
13_20063841	13	20063841	20063841	q12.11	ZMYM2	46	33	INS	AATATACAT	30,33,29,28,28	+-	1
7_102260354	7	102260354	102260354	q22.1	CUX1	501	31	INS	ACTGGGATT	26,20,20,20,32	+-	1
16_88909546	16	88909546	88909546	q24.3	CBFA2T3	89	31	INS	ACGGAAGAT	29,30,29,30,31	+-	1
10_79165961	10	79165961	79165961	q22.3	ZMIZ1	42	31	INS	GTGTGCGCG	29,32,32,32,33	+-	0,969
3_71539237	3	71539237	71539237	p13	FOXP1	331	30	INS	GAGTAGCTG	36,30,30,30,28	+-	1
16_88961893	16	88961893	88961893	q24.3	CBFA2T3	73	30	INS	GCATCATAA	33,34,34,33,34	+-	0,882
17_77380271	17	77380271	77380271	q25.3	SEPTIN9	68	30	INS	GCATGCCCG	30,27,25,26,23	+-	1
3_71396918	3	71396918	71396918	p13	FOXP1	218	29	INS	ATATATATA	27,27,29,29,31	+-	1
9_130777917	9	130777917	130777917	q34.12	ABL1	75	28	INS	CAGATCACT	34,35,35,35,33	+-	0,8
11_74066273	11	74066273	74066273	q13.4	C2CD3	49	28	INS	AACATCACA	24,27,27,27,24	+-	1
17_16095672	17	16095672	16095672	p12	NCOR1	95	27	INS	TCAGCCCCC	29,27,27,27,28	+-	1
11_96089969	11	96089969	96089969	q21	MAML2	848	26	INS	CATTATACCT	32,14,14,14,32	+-	1
16_88931667	16	88931667	88931667	q24.3	CBFA2T3	41	26	INS	ATGAGCCAG	25,24,24,24,23	+-	1
3_128676378	3	128676378	128676378	q21.3		314	25	INS	TTTTTTTTTT	23,16,16,16,26	+-	1
1_186327070	1	186327070	186327070	q31.1	TPR	70	25	INS	TAAATATAT	24,26,24,24,26	+-	1
3_128587120	3	128587120	128587120	q21.3		451	23	INS	AAAGGAAA	25,22,22,22,24	+-	1
13_28034146	13	28034146	28034146	q12.2	FLT3	63	23	INS	AAACTCTAA	27,23,25,25,21	+-	0,92
7_139101481	7	139101481	139101481	q34	ZC3HAV1	364	22	INS	TTTGCCCGG	22,22,23,23,26	+-	0,957
3_71327319	3	71327319	71327319	p13	FOXP1	243	21	INS	CAGCCTTCT	24,17,17,17,23	+-	1



Délétions cryptiques

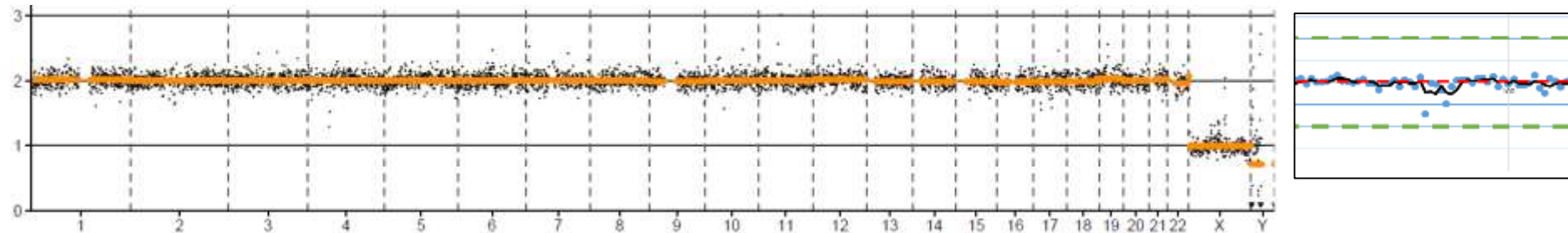
Délétion interstitielle de 800kb en 4q12 → FIP1L1::PDGFRA



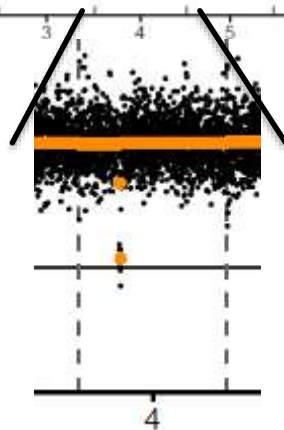
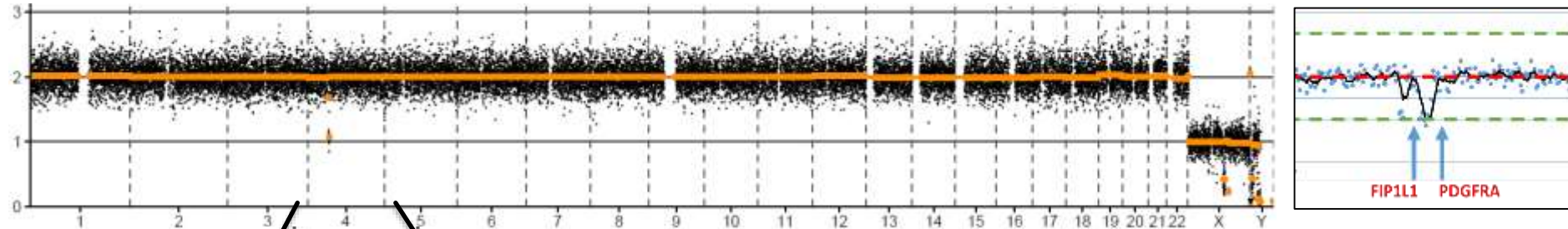
Délétion non vue sur la sortie Sniffles car peu de reads et faible profondeur

5 Délétions cryptiques

Délétion interstitielle 4q12 → *FIP1L1::PDGFRA*

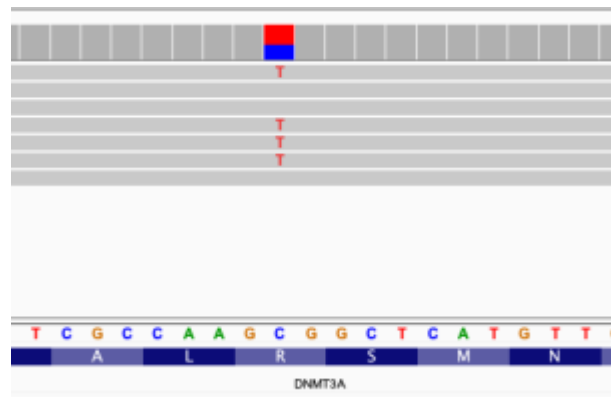
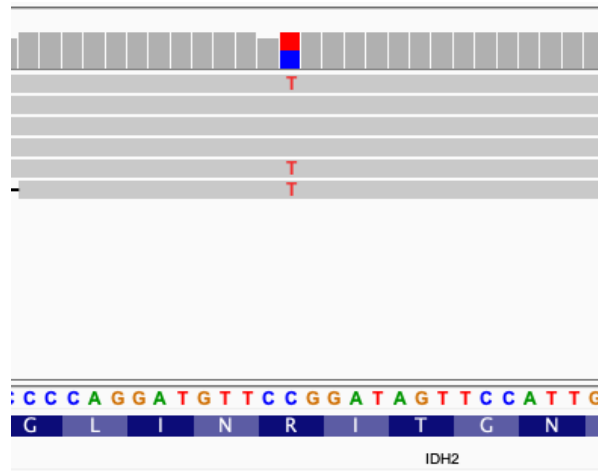


Résolution 100 kb



Mais vu sur le profil du nombre de copies lorsqu'on augmente la résolution !

Mutations ponctuelles et indels <30nt



Conclusion : Preuve de faisabilité pour la détection des CNVs

Avantages



- Résolution adaptée aux anomalies d'intérêt
- Concordance 86–89 % avec le caryotype et ≈ 100 % pour le risque cytogénétique
- CNVs supplémentaires
- Délai concurrentiel : 3-4 jours
- Flexibilité et débit
- Potentiel d'amélioration important : « tout-en-un »

Inconvénients



- Actuellement : CNV uniquement
- Sensibilité limitée pour petits clones (<6 mitoses/20)
- Nécessité d'amélioration ou d'harmonisation (validation technique, bioinformatique, interprétation biologique...)
- Pas information sur l'architecture clonale

Questions soulevées



- Rendu des anomalies non visibles au caryotype
- Définition de la complexité
- Quid des hyperdiploïdies ?
- Gestion des data (stockage, archivage des données brutes, capacités matérielles et humaines d'analyse...)

MERCI DE VOTRE ATTENTION

Remerciements

UF Cytogénétique Hématologique

Dr Isabelle TIGAUD

Dr Béatrice GRANGE

Sophie GAZZO

Aurélie CHARANSOL

Marine BLANCHET



UF Biologie Moléculaire Hématologique

Dr Sarah HUET

Pr Pierre SUJOBERT

Dr Ilyes BENHALIMA

Kaddour CHABANE

Cellule de Bioinformatique

Quentin TESTARD