

XXXIIÈME COLLOQUE DE L'ATC  
MERCREDI 13 SEPTEMBRE 2023, LE HAVRE

# CONFIRMATION ET ÉTUDE DE CNV PAR PCR DIGITALE EN CYTOGÉNÉTIQUE

## UNE APPROCHE SIMPLE ET TRÈS PERFORMANTE

DONOVAN LIOT, KEVIN CASSINARI

LABORATOIRE DE CYTOGÉNÉTIQUE, SERVICE DE GÉNÉTIQUE, CHU DE ROUEN

INSERM U1245 – CANCER AND BRAIN GENOMICS

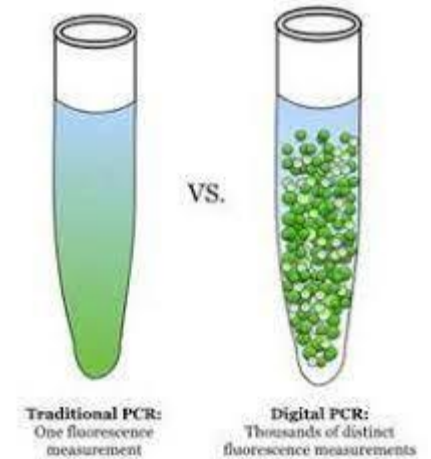
FHU G4 GÉNOMIQUE



# La PCR digitale : généralités

## PCR digitale (dPCR)

- Séparation de l'échantillon en un **grand nombre d'unités réactionnelles** (réacteurs) avant de réaliser une **PCR en point final**
- L'analyse du nombre de compartiment positif permet une **quantification**



## Différentes approches pour la compartimentation

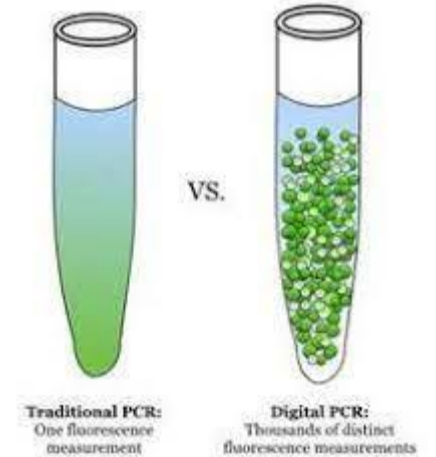
- **Chamber digital PCR (cdPCR)** : Partition des échantillons en microchambres (ex. *QuantStudio Life Technology*)
- **Digital Droplet PCR (ddPCR)** : Répartition de l'échantillon en **gouttelettes**, après émulsion)(ex. **QX200 plateforme, Biorad**; Raidrop Digital, Raindance)
- **Approches hybrides** (ex. Naica System, Stilla)



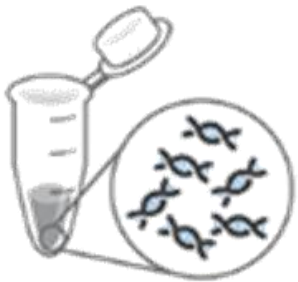
QX200 plateforme

## PCR digitale (dPCR)

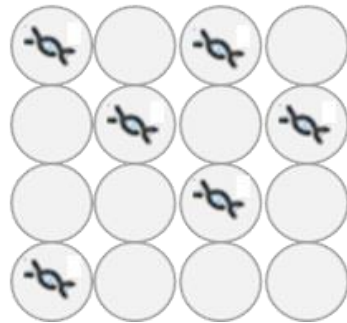
- Séparation de l'échantillon en un **grand nombre d'unités réactionnelles** (réacteurs) avant de réaliser une **PCR en point final**
- L'analyse du nombre de compartiment positif permet une **quantification**



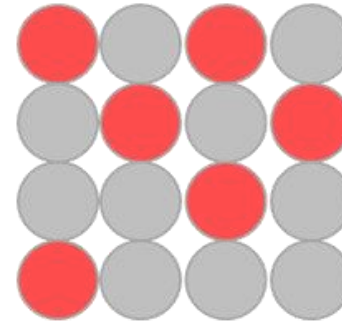
### Echantillon



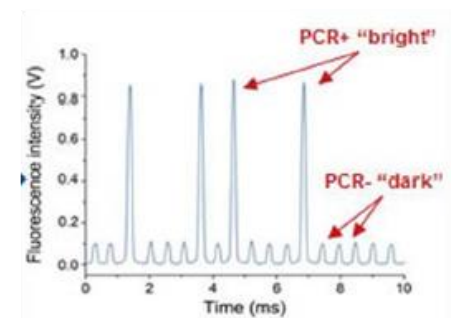
### Division



### Amplification



### Quantification

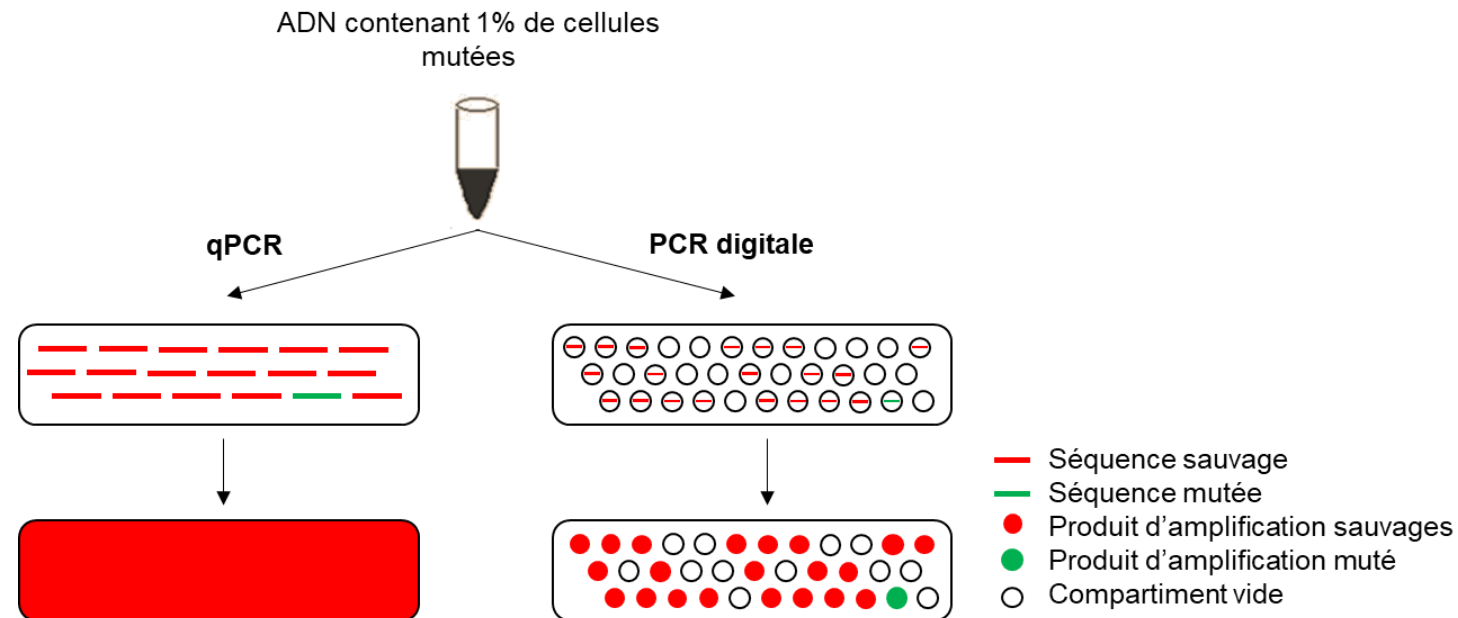


## Avantage par rapport à la qPCR

- Permet la **quantification absolue des acides nucléiques**
- Permet de s'affranchir de courbes d'étalonnage : **PCR en point final**
- **Meilleure sensibilité** : étude d'événements rares

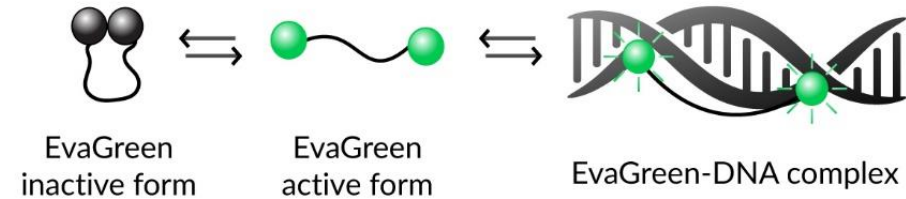
## Inconvénients

- Gamme dynamique plus petite



## Fluorescence liée à l'ADN double brin

- SYBRgreen, Evagreen, ....
- Spécificité liée à la PCR



## Sondes d'hydrolyse (Sondes Taqman)

- Spécifique d'une séquence nucléique (dans l'amplicon), émission d'une fluorescence en cas d'hydrolyse
- Permet d'utiliser deux (ou plus) fluorochromes différents
- Généralement conçue à façon (spécifique d'un amplicon)

|                            | Perfect Match  | Single Mismatch | $\Delta T_m$ |
|----------------------------|----------------|-----------------|--------------|
|                            | 3'-ACGACCAC-5' | 3'-ACGCCAC-5'   |              |
| LNA 8-mer<br>5'-TGCGGTG-3' | 71°C           | 45°C            | 26°C         |
| DNA 8-mer<br>5'-TGCGGTG-3' | 35°C           | 25°C            | 10°C         |

Figure 3: Comparison of mismatch conditions for LNA and DNA.

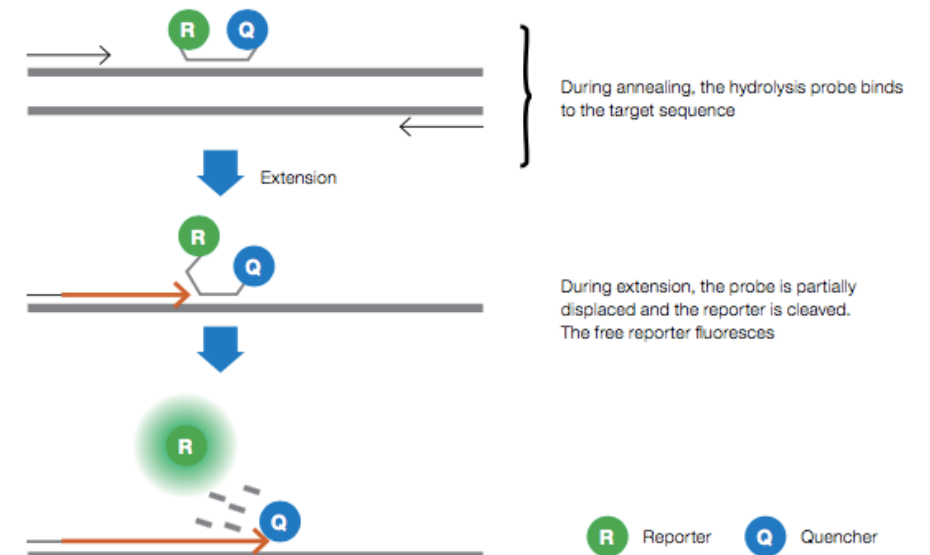


Fig. 2.1. In TaqMan assays, hydrolysis probes are hydrolyzed by Taq polymerase.

- Un couple d'amorces + une sonde d'hydrolyse (marquage FAM) dans la **région étudiée (région cible)**
- Un couple d'amorces + une sonde d'hydrolyse dans la **région de référence** (marquage VIC/HEX/TET) : généralement un **gène de ménage**

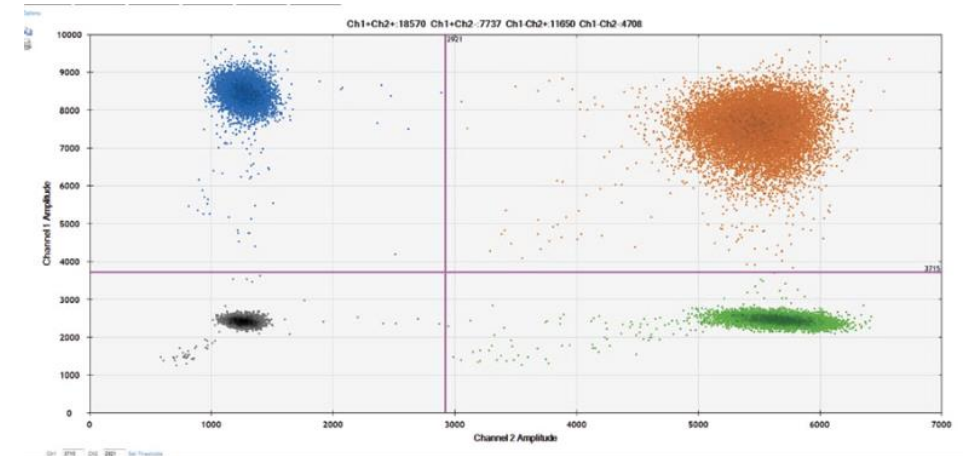
-> **Détermination du nombre de copies par uL pour la région cible et la région référence (à partir du nombre de gouttelettes positives)**

→ Détermination d'un **ratio** entre la région cible et la région référence : **quantification relative**

(Nb : une quantification absolue reste possible)

## Exemple d'applications

- **ADN : Etudes de variations de nombre de copies (CNV)**
- **ARN : Quantification relative de transcrits**



$$CNV = \frac{A}{B} N_B$$

A = concentration of target species

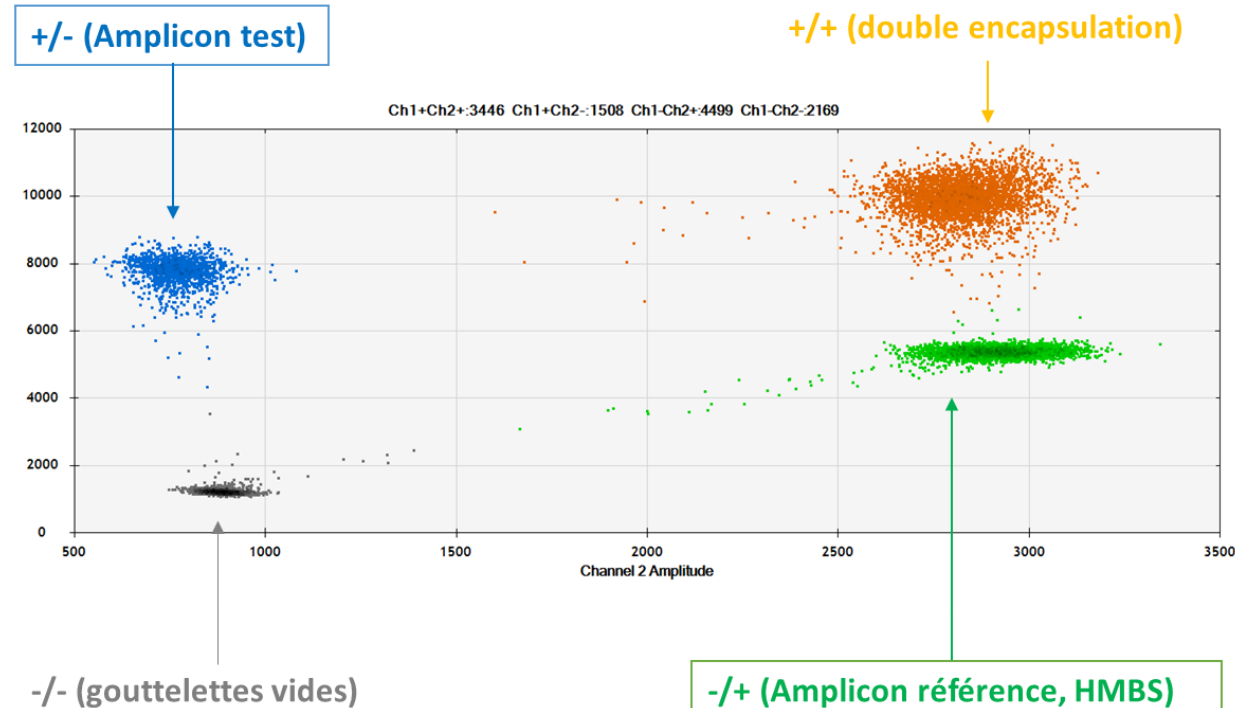
B = concentration of reference species

$N_B$  = number of copies of reference loci in the genome (usually 2)



## Amplicons

- Test : région 9q34.11
- Référence 1 : région 11q23.3 (gène *HMBS*)



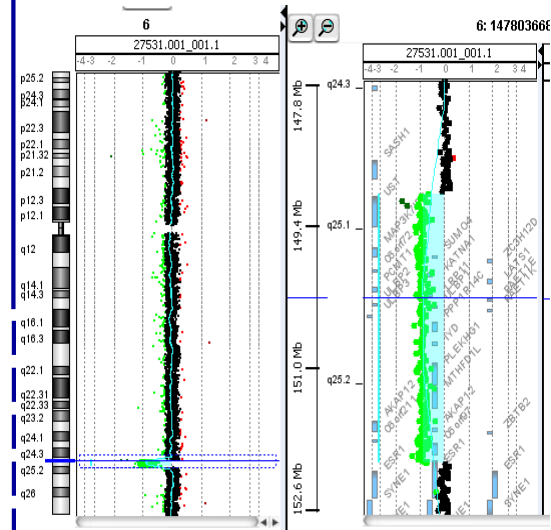
## Nombre de copies

- Cible : 654 copies/uL
- Référence : 1353 copies/uL

## Ratio (cible / référence)

- Théorique : 0,5
- Obtenu : **0,48**

## CNV rares et leur confirmation



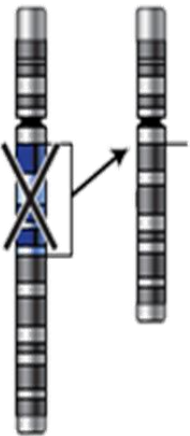
- Nombre important de **variations du Nombre de Copies (Copy Number Variation, CNV)** détectés par les **analyses pangénomique** (ACPA, WES/WGS, cartographie optique, ...)
- **CNV polymorphiques** retrouvés chez **tous les individus malades ou témoins**
- **CNV rares** causes majeur de DI/AD : **10-15% des patients avec DI/AD** (Weischenfeldt *et al.*, 2013)

-> Défi d'interprétation des CNV : établir leur implication dans un phénotype

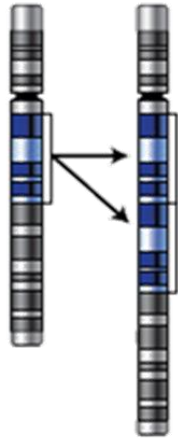
- Caractère hérité ou *de novo* d'un CNV : élément clé de son interprétation

→ Pour validation et interprétation : seconde analyses pour effectuer la confirmation des CNV ainsi que leur étude parentale.

Délétion



Duplication

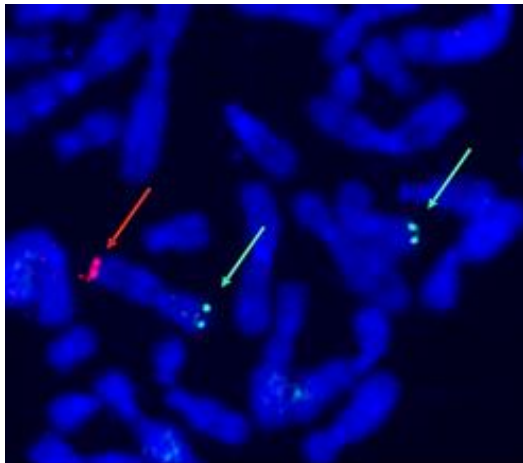


- Utilisation d'une seconde analyse pangénomique non adaptée : **coût important**, risques de **découvertes incidentelles**
- Utilisation d'une analyse ciblée :

## Cytogénétique moléculaire

### FISH

- Avantages : informations structurales, étude des mosaïques.
- Limites : **résolution**



## Techniques de biologie moléculaire

### qPCR

-> Méthode la plus utilisée actuellement

- Limites : mises au point, reproductibilité

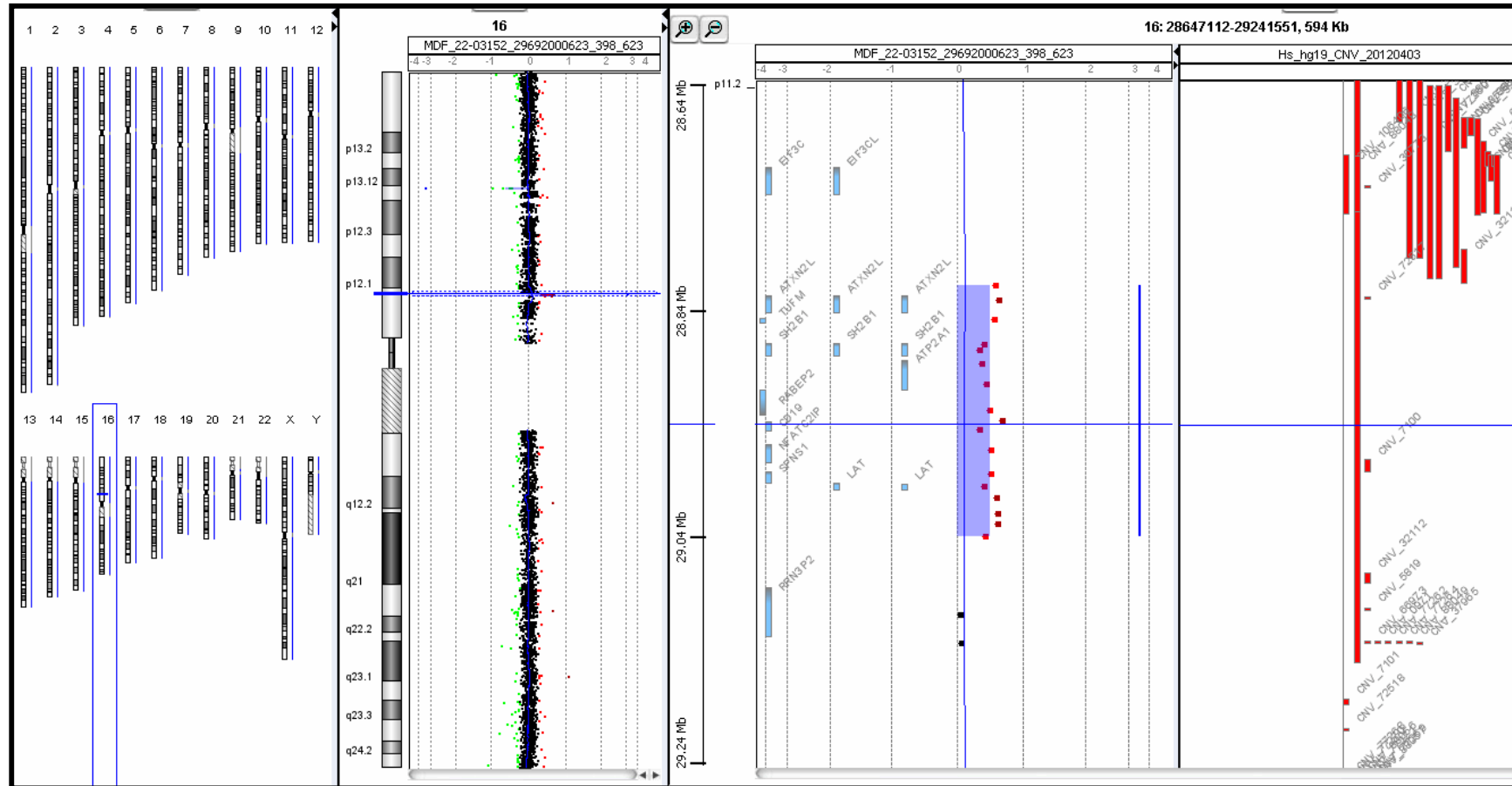
### QMPSF ou MLPA

- Limites : coûts importants

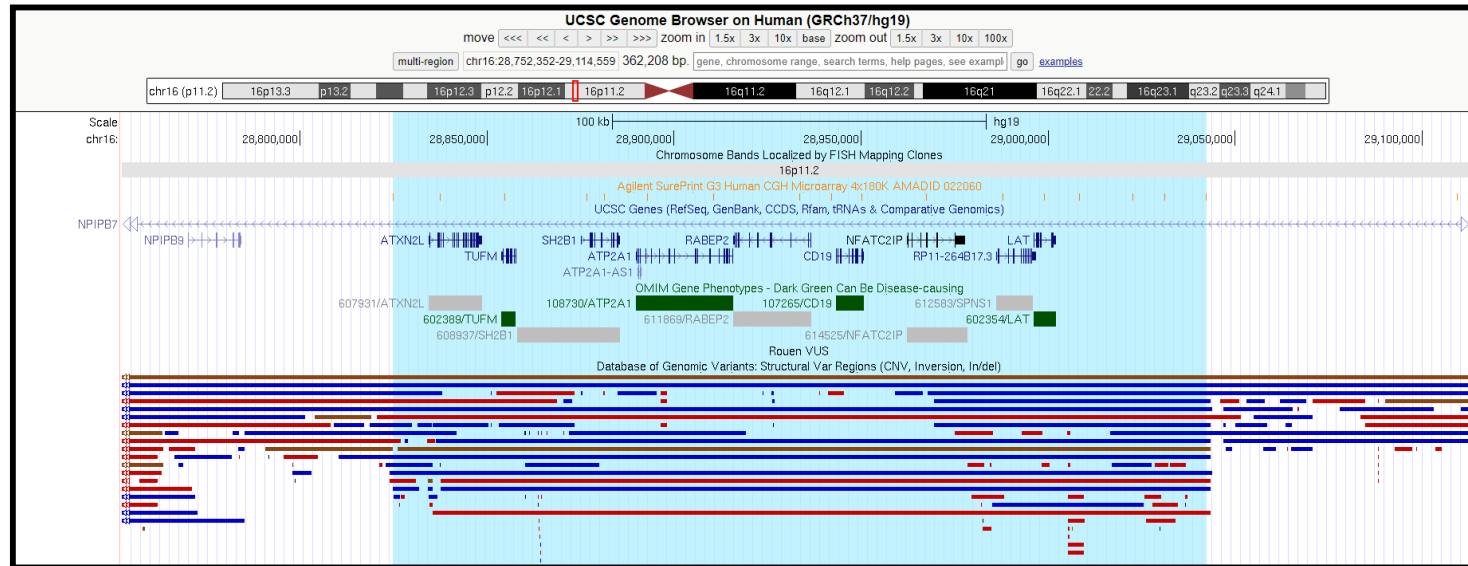
## Utilisation de la ddPCR au laboratoire de cytogénétique de Rouen pour la confirmation des CNV rares

➡ CNV détecté en CGH-array (Agilent SurePrint G3 Human 4x180K)

➤ Ex: duplication 16p11.2 hétérozygote de 217kb (chr16:28,824,794-29,042,118:hg19)



## 1 - Visualisation du CNV sur UCSC genome browser (<https://genome.ucsc.edu/>)



## 2 – Export de la séquence nucléotidique du remaniement

**Sequence Formatting Options:**

- ☐ All upper case.
- ☐ All lower case.
- ☒ Mask repeats: ☐ to lower case ☒ to N
- ☐ Reverse complement (get '-' strand sequence)



Exportation de la séquence (format FASTA) après masquage des régions répétées (N) : facilite le design

## Utilisation d'un script Python pour mettre en forme la séquence du CNV afin qu'elle soit interprétable par le logiciel de design d'amorces

## Séquence du CNV issue UCSC

[illegible]

## Séquence après mise en forme

phg19\_dna range=chr16:28824794-29042118 5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=N  
GGATTTTGGATACCTACAGAAAGGGAACATAGTTACCAATTATGGGCTCATGACCAATTACAGAACTGAGGATCTTGGAAAGCTGTGCATATTTC  
>2  
CCTTTGTGCATAATATATTCATGCTCTTATTTGTACATGCTAGCCATCTTTTTTTTTTATTTGGTCCATAGGCATTTTATTTGTAATATGTGTTA  
>3  
TGTCAATGTTCTTGAGAGCATCAGCCGGGACAGTCATATGCCCATTTTGGTGGCAGGGGAAGATGGAGAAAGAGCTTCTTTTTTCTCTCCTC  
>4  
CACTAGCAAGGGCAAGGCAAGCTATGGAGAAAGAAGTTTCATGGGCTAAAACCTCAGAATTTGAGTGTGGAGCAGGATGGGTAGATGGAAGGGGT  
>5  
GAAACTAGCACATCTGAAGGCAGGAGCGAGGCGAGGCGAAGGACTATTACCCAAAAAGTAAGGCAGTGTTGTAGCTAGGTGTGCATGTGTTTGGTG  
>6  
CCTTTAATTTATGCTTAGGACAAGCTGAGTTTTCTTAGTTTGTGCATATCCATTTCCTGCCATGAAACCCTCTCCCCCTGCCCTCTATCAGT  
>7  
TCTCTGTCCCTTATCTGGGTCTCCCAAACCTGGATTAAGATTAGGTGTCACTCCCATTTGCTCTTGATGCTCTGTGCTTCACCTACTAGATCTCC  
>8  
GCTGCCCTTATTGCAGGGTCGGGTGGAGGATTTGAACTCGGAACCTTTGGCCTTCAGTCTTTGTTATTACAGTTTAAAGATTCACTCTGGGCATGC  
>9  
GGGAGCTCCCAACCGCGCTCTCCCTCTCCGCTCCCCGGCGACGCGCACGCGCGCAGCCCGGCTCGCGCCCTCTCGCTTCTCTCAGCCGCGAG  
>10  
TGCCCCGATCCCCCTCGCTTCCGCGCTCTCCAGCGGGGCCCCAGCCCCGGCCCCCTCTCTCCCTCCCTTCTCTTAATTCCTTCGGACGCTGCC  
GCATTGCGCGCCCCGGGAACACCTAGGCGAGGACTAGTTCGTGGAGGGGCTCGTGGTGCGCAGTGATGAGTAGTGAGGCGCCCTGCTCAGTTTT  
>11  
TCTTACTGATTAACAATTTTGTAGTCTAAATCAGCATCATCAGGTGGTATATACTTCTAGGATTTAAACATTAATTTATAGTGGTCTAAGAGGGCT  
TGCTGTGACCCGGAAGCATCTGAGCCAGCAGGTGGCCCTCTGCGGAGGACATTGTGGACACCATGGTGTTTAAAGCAAGTGATGTATGCTTGT  
>12  
TGCTTTAATGCCTTTTTTTCTGAGCGAAGTGGTGGAATTTTCTCTTAAAAATATGCTTGATGTCTAATATATAATGCGATGAATCTCTGCT  
>13  
GACCGGTGCACACGCAACAAAAACAAAACATCACTTACTCTTACTATCTATAATTAACCACTCTCAGCATTTGCATCAGGTATTTTTCAACA  
>14  
TTGCAGTTATTAATACAATTATTAGTTGATTACTTTTGCCAGCCACGTTCCAATTTTTTCCACTCTGTTTGTGCTGTTATTTTGAGACGAGC  
>15  
AATTTGTTGCATCTTGGAGTTTTTAACCTGATGGAAGGGAAGTGACTGTGCTGTCTTTCTGCTGGGTTTTAAACCACTTCTCTCCCTCCCCA  
>16  
AGCTGTAGATCTAAAAAATAAATTTCAAAATTTATGTGCTATTCTTTTTATAAAAGTGAAATATAACTACATTATTTGTGCTTTTAAAAACTA  
CATGGGTGTGTGCTGCTTGGCAGACATCTTTGTTTAGATTGAATCAGTTGCTAAG  
>17  
TGGTGTGATAGTGTGTAACCTTTTCTGCTGTTTGTAGTAAGGCCCTTGTAAGTCACTGCTGTTGACAGCAGTAAGCATCTTACAGCTCCCCCTTTT  
CCAAAGGAAGAAGGAGAAGAGGTTGTGCTGTTGACTTGCAGGCCATGGGGCTCCCGTCTCTCCAAGACAGCAAGCATCCGTATCGGATAAGGAGGA  
>18  
CTAGGCATGGCCAGGAGTAGAGGGGAAAAACAAAAATAAATTTGCTCTCCCTTGTTTTTGCGAATAAATCCACAGTACCCCAACTTCTCCGGGG  
TGTCGCAAAACCATCTCTCTCTGTGCCCCGACGGCGGTTTGGCCCCATGCTTCAGAGCAACCCAGCATGCTGACGTCGGGACGCAATCCCCAGG  
GTGCCCCAGAGTGGGGTGCTGCACCTCAGCTTCCACACCCTCACCTACCCCTACATCGGACACCCCCAAGGTGAGCAGCTGGCCAGGCGCCTC  
ACTTCAGACTTGGGCCCCCTGTTCTTTCTTTCCATTAACTTGAGTGACCTGTGTGAGAGACAGACAGATGCCCCACAGGATGGCTGGACAAGGAG  
>19  
CTAACTTAACCTGCCTGGAGTTTCTCCTTGGAGACTAGATGGGGTGACAGCTGTCACTGTTTGTGGCATTGATAGGTGCTGCATTGTGACCTG  
>20  
ATGGTGCCACGTTTTTGAAATCTAGGATGATGGGGAGCCAGATCGGATCTGTGCCATGCAATTTGAAGGTGGGTTCCAGACTTCATGTGAAGTTG  
>21  
GGACATTTATGTGTGAGCCATTTGATGCTAAAAATGGGCGGGTTGGAGTCCCAAGAGCACTCAGCAGGTAGATGTGGGGTGGTGCAGGAGGTGCA  
T





<https://primers.neoformit.com/>

Utilisation des paramètres par défaut : amplicon de petite taille, TM cible 60°

Enter FASTA DNA sequence(s)  
(multiple sequences accepted)

e.g.

```
>part of X00351 Human mRNA for beta-actin
CACGGCATCGTCACTGGGACGACATGGAGAAATCTGGCACACACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTGGTCCCGA
GGAGACCCCGTCTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCCAAGGCCAACCGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGA
CCTTCAACACCCAGCCATGTACGTTGCTATCCAGGCTGTCTATCCCTGTACGCTCTG6CCGTACCACTG6CATG6
ATGGACTCCG6TGACGGGTCACCCACACTGTGCCATCTACGAGGGGTATGCCCTCCCC
```

```
>hg19_dna range=chr16:28824794-29042118 5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=N
GGATTTTGGATACTTACAGAAGGGAACATAGTTACCAATTATGGGCTCATGACCAATTACAGAACTGAGGATCTTGAAGCTTGTCATATTCC
>2
CCTTTTGCATAATATATTCATGTCCTTTATTGTACATGCTAGCCATCTTTTTTTTTTTTATTGGTCCATAGGCATTTTATTGTAATATGTTACATCTAGAA
AAAGAGTCCCAGGATTTTCTTCTGTGTGTTTTCGCTTGTCTTCTCATGGTCCATGATGCCAGTGAGGTGGTCAGTACAATGAAACCAAACGGGGATGGAAG
CAGATCATTCTGCTATTTTCTAGATCTTGCACATCAAACTGGGGCTGATCCACGTTTAGCCTGCCTGTGAGGTTTACAGTAATTTTCCAGCTGTGTGATCATC
AGTGATTTCAAATTCGCAATGTAACCATGCTTCATCATCACAGTTAGAAACTGGACGATGACTTTGGAGAAATGGCCTAATAAGTACCTGGCATTTTGCCTCTCTTT
TGGCATTGTTGATG
>3
TGTCAATGTTCTTGAGAGCATCAGCCGGGACAGTCATATGCGCCATTTTGGTGGCAGGGGAAGATGGAGGAAAGAGCTTTCTTTTTTCTCTCCTCGTTCTATTTT
TTATACAAGTTATTGGAGGTTAGCTCTACAATTCGGCCTTTAGGTAGCAGAACATTCAAGACTATGACTTAATTTGAGGAGTAATTAAGTACGCACTGGTGCA
ATGATCATTATGACAGTGAGTCTCATTTTGGAGAACAGTGAGAACTTCTTGTATGAAAGATAACTATCTCTTTTTTATGTTTTTTA
```

Optional parameters (defaults recommended)  
Primer3 input parameters

Primer length (nt)  
Optimum  Min  Max

Amplicon length (nt)  
Min  Max

Melting temperate (°C)  
Optimum  Min  Max

Annealing properties  
GC min %  GC clamp  Self-dimer (any)  Self-dimer (3')

Submit

- ➔ Choix d'un ou plusieurs design parmi ceux proposés
- ➔ Sondes UPL 1 à 90 disponibles au laboratoire
- ➔ Seules les amorces sont à commander (amorces classiques)

**Nb : Pas de UPL 15 car utilisé pour le gène de référence.**

Assay #2

UPL probe #3

| Primer | Length | Position  | Tm   | GC%  | Sequence             |
|--------|--------|-----------|------|------|----------------------|
| Left   | 20     | 362 - 382 | 60.0 | 55.0 | TTCCGAGCAGGGGAAATGTC |
| Right  | 20     | 415 - 434 | 60.0 | 55.0 | TCCAGTACCCTCTCATGGCA |

**Amplicon (72 nt)**

TTCCGAGCAGGGGAAATGTCATCTAGCTGCCCTCTGCTGGGTGCAGCCTATGCCATGAGAGGGTACTGGA

Primer/probe alignment:

TTCCGAGCAGGGGAAATGTC

CTGCTGGG

TCCAGTACCCTCTCATGGCA

AGGCCAACCCCTTCCGAGCAGGGGAAATGCCATCTAGCTGCCCTCTGCTGGGTGCAGCCTATGCCATGAGAGGGTACTGGAAGCAGAGGGG

352

444

Assay #3

UPL probe #50

| Primer | Length | Position  | Tm   | GC%  | Sequence             |
|--------|--------|-----------|------|------|----------------------|
| Left   | 20     | 65 - 85   | 60.0 | 55.0 | AGATGGGTTTGGCACCTGAG |
| Right  | 20     | 126 - 145 | 60.1 | 60.0 | AGCCTCTGGGAGATAGTGG  |

**Amplicon (80 nt)**

AGATGGGTTTGGCACCTGAGCTGAAGCCATGCTGGCTCCAGAGCGATAGAACATTCTTCCCACTATCTCCAGGAGGCT

Primer/probe alignment:

AGATGGGTTTGGCACCTGAG

GCTCCAGA

AGCCTCTGGGAGATAGTGG

CGAGGAAACAAGATGGGTTTGGCACCTGAGCTGAAGCCATGCTGGCTCCAGAGCGATAGAACATTCTTCCCACTATCTCCAGGAGGCTGAATAACGGC

55

155

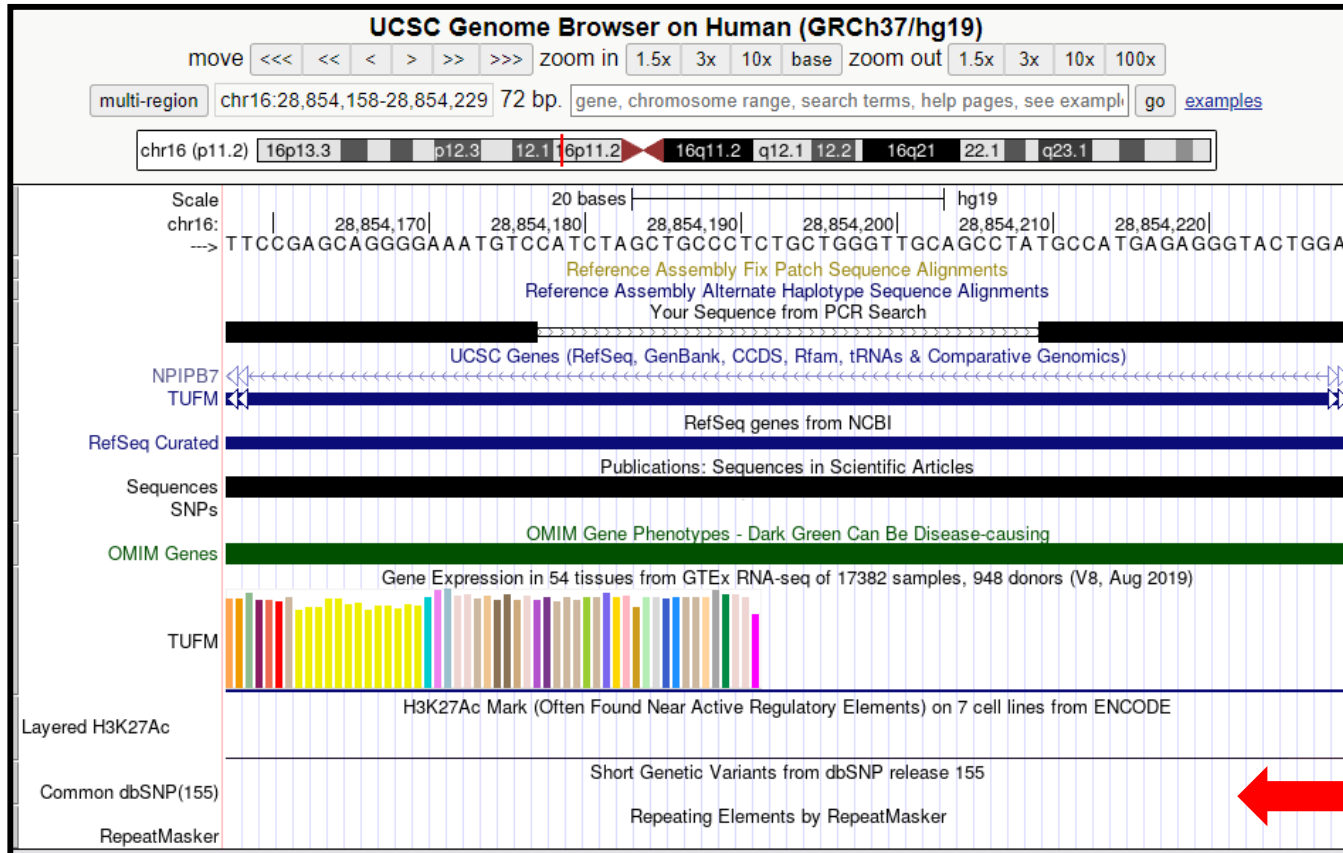
## ➔ Vérification de la spécificité de l'amorce via l'outil In-Silico PCR de l'UCSC

**UCSC In-Silico PCR**

>chr16:28844344+28844416 73bp GGGTCAGACTGGACTGTGTG GATCCAGGCTGTTCTCAGGG  
GGGTCAGACTGGACTGTGTGgtttctctctccagcttcagcccagtag  
ctcCCCTGAGAACAGCCTGGATC

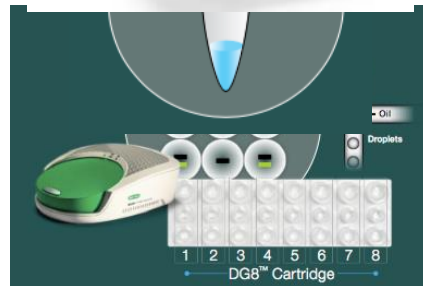
**Primer Melting Temperatures**

Forward: 59.1 C gggtcagactggactgtgtg  
Reverse: 62.1 C gatccaggctgttctcaggg  
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).



➡ **Commande des amorces : fournisseur d'oligonucléotides habituel, pas de purification spécifique, déjà reconstituées**

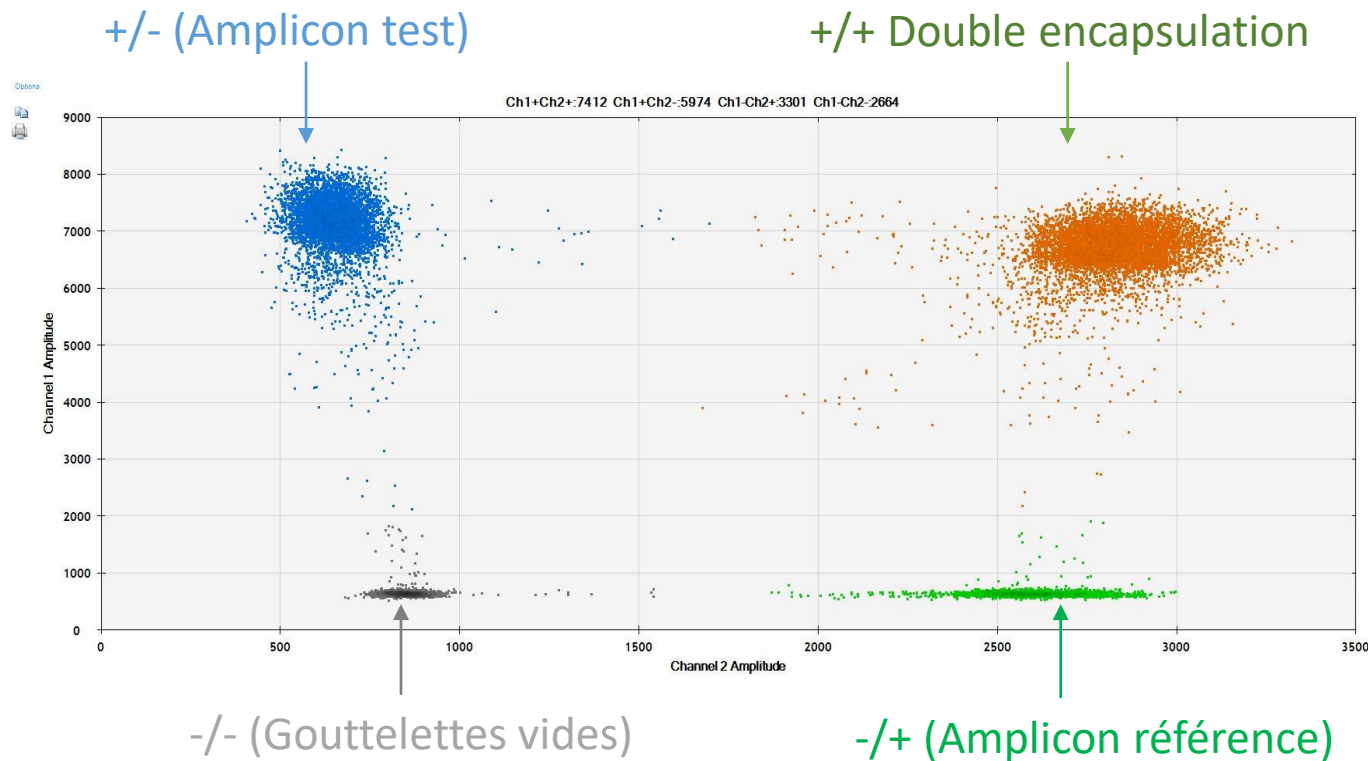
- **Coût < 10€ par couple d'amorces**
- **Livraison en 48-72h**



- ➔ Temps technique pour une manipulation standard (4-5 confirmations + étude parentale) : 2h
- ➔ Fragmentation de l'ADN (10 min à 98 °C)
- ➔ Préparation des mix de PCR
- ➔ Temps total de la manip ½ Journée
- ➔ Réalisation de l'émulsion sur plateforme Biorad QX200
- ➔ Réalisation de la PCR
- ➔ Lecture des gouttelettes sur plateforme Biorad QX200

## Amplicons

- Test : région 16p11.2
- Référence 1 : région 11q23.3 (gène *HMBS*)



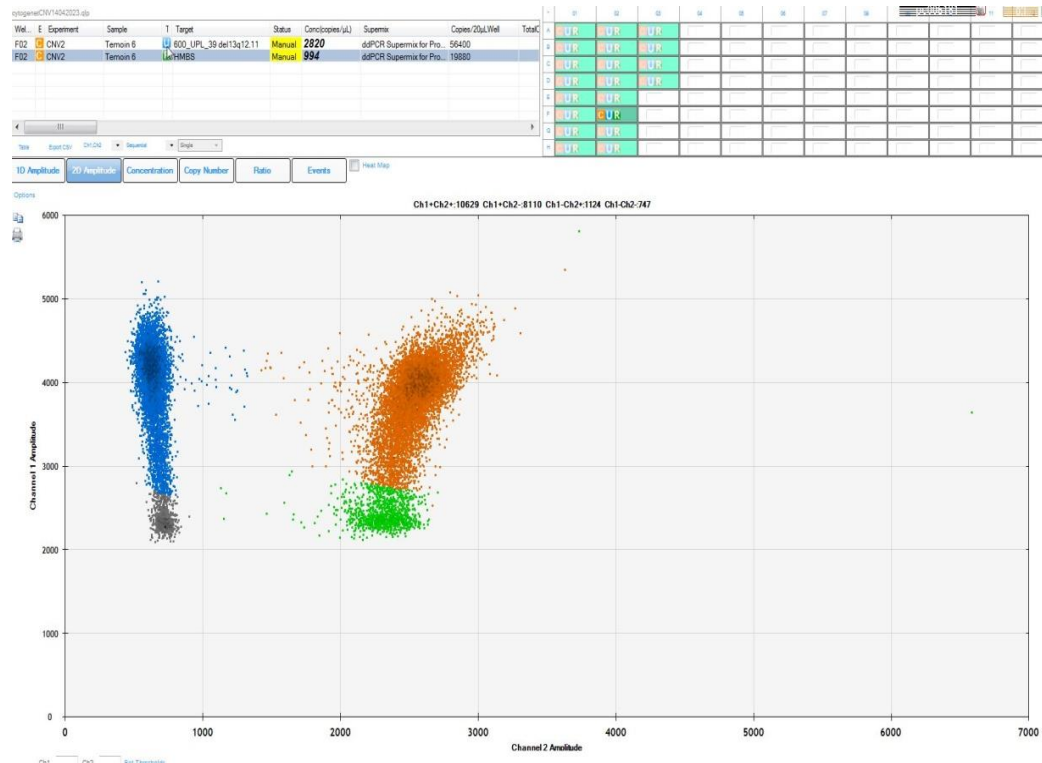
## Nombre de copies

- Cible : 1385 copies/uL
- Référence : 949 copies/uL

## Ratio (cible / référence)

- Théorique : 3
- Obtenu : **2,92**

## ➔ Vérification de la bonne séparation des populations de gouttelettes



- Diminution de la quantité d'ADN utilisé (50ng en temps normal)
- Nouveau design d'amorces

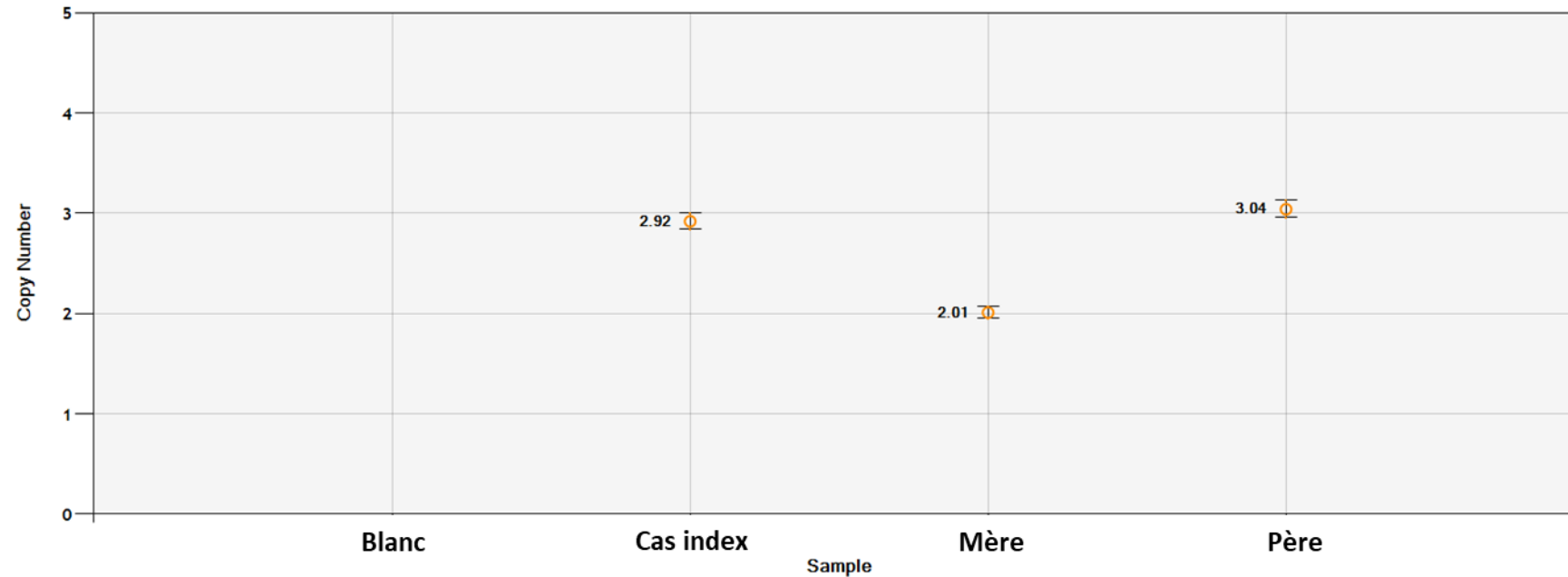
## ➔ Vérification du nombre de gouttelettes analysées

| Well | E | Experiment | Sample   | T | Target          | Status | Conc(opies/μL) | Copi... | AcceptedDroplets | CNV  |
|------|---|------------|----------|---|-----------------|--------|----------------|---------|------------------|------|
| B01  | C | CNV2       | 22-03152 | U | 056_UPL_36 d... | OK     | 1385           | 27700   | 19351            | 2.92 |
| B01  | C | CNV2       | 22-03152 | R | HMBS            | OK     | 949            | 18980   | 19351            |      |
| D01  | C | CNV2       | 23-07841 | U | 056_UPL_36 d... | OK     | 1136           | 22720   | 18158            | 3.04 |
| D01  | C | CNV2       | 23-07841 | R | HMBS            | OK     | 746            | 14920   | 18158            |      |
| C01  | C | CNV2       | 23-07843 | U | 056_UPL_36 d... | OK     | 875            | 17500   | 18993            | 2.01 |
| C01  | C | CNV2       | 23-07843 | R | HMBS            | OK     | 871            | 17420   | 18993            |      |

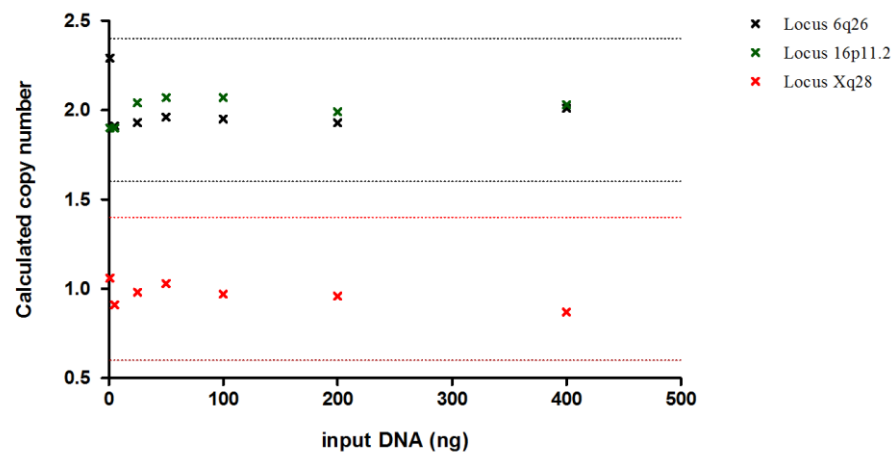
➔  $n_{\text{Accepted Droplets}} > 8000$  requis



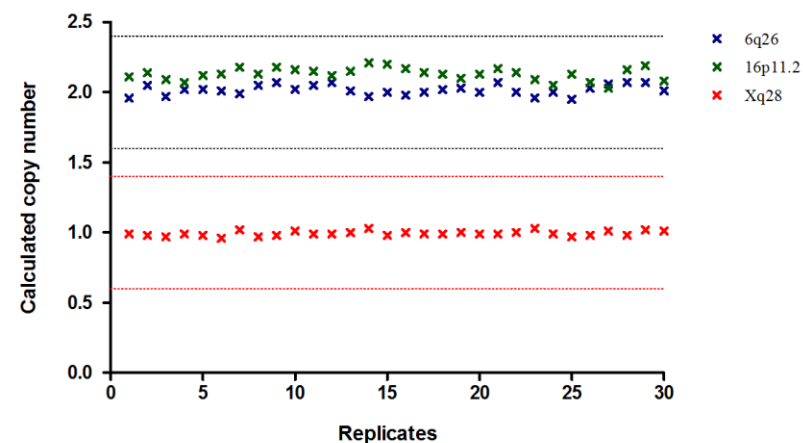
➡ Vérification de l'échantillon blanc pour chaque technique (contamination inter-échantillons)



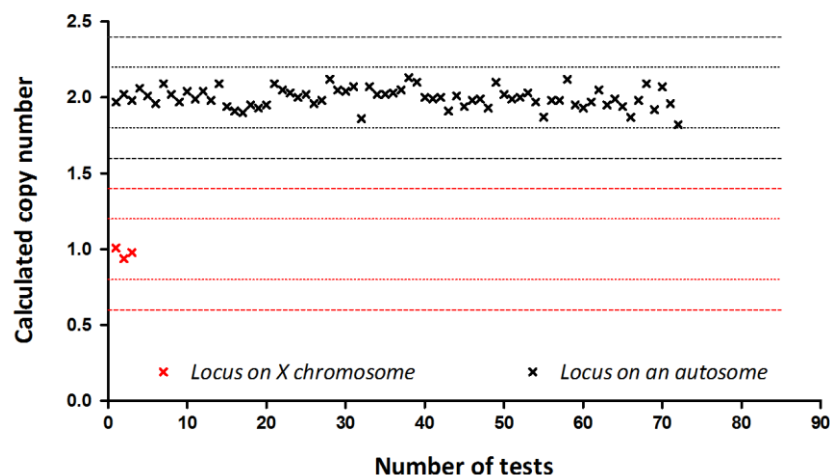
➡ Ici duplication d'origine paternelle -> Précise l'interprétation du CNV et le conseil génétique



**Amplitude de mesure**



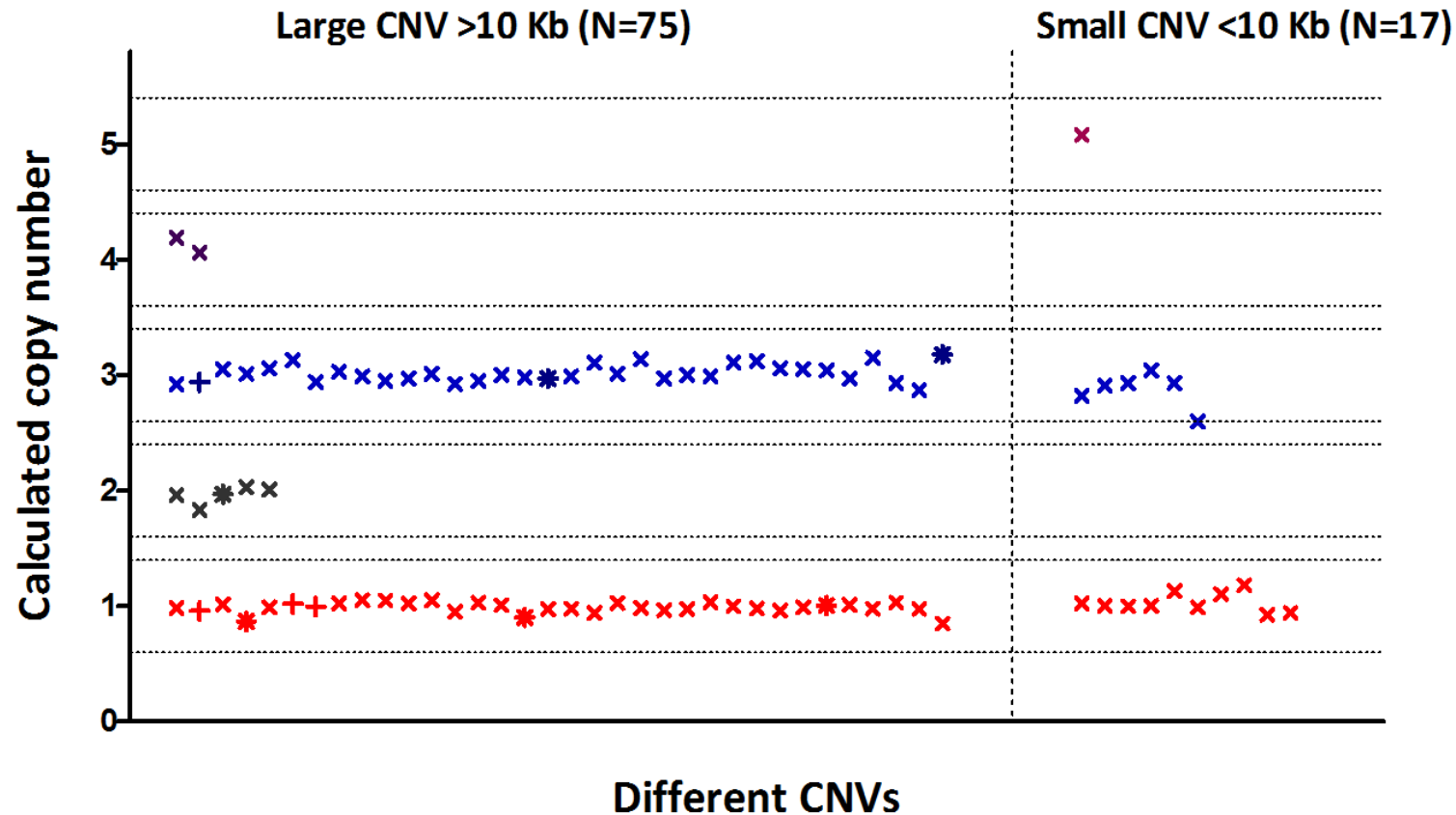
**Répétabilité**



**Etude des ADN témoins**

| Nombre de copies | Type d'événement  | Intervalles de référence |
|------------------|---|--------------------------|
| 0                | Délétion homozygote                                       | 0                        |
| 1                | Délétion hétérozygote<br>Normal (chrX, individu masculin) | 0,79 - 1,21              |
| 2                | Normal<br>Duplication (chrX, individu masculin)           | 1,79 - 2,21              |
| 3                | Duplication hétérozygote                                  | 2,79 - 3,21              |
| 4                | Tripllication   | 3,79 - 4,21              |
| 5                | Quadripllication  | 4,79 - 5,21              |

**Intervalles de référence**



Confirmation de 92/93 CNV : 1 CNV de trop petite taille (167 bp)

87% des ddPCR quantitatives dès le premier design

- ➡ **Technique fiable et reproductible**
- ➡ **Rapide à mettre en œuvre (4 jours entre la commande des amorces et le rendu des résultats)**
- ➡ **Formation aisée à la technique pour de nouveaux technicien(ne)s**
- ➡ **Adapté à tous les CNV détectés par ACPA et aux CNV détectés par NGS de taille supérieure à 1 Kb**

**Clinical Chemistry** 65:9  
1153-1160 (2019)

Molecular Diagnostics and Genetics

---

## A Simple, Universal, and Cost-Efficient Digital PCR Method for the Targeted Analysis of Copy Number Variations

Kévin Cassinari,<sup>1</sup> Olivier Quenez,<sup>2</sup> Géraldine Joly-Hélas,<sup>1†</sup> Ludivine Beaussire,<sup>1†</sup> Nathalie Le Meur,<sup>1</sup> Mathieu Castelain,<sup>1</sup> Alice Goldenberg,<sup>1</sup> Anne-Marie Guerrot,<sup>1</sup> Anne-Claire Brehin,<sup>1</sup> Jean-François Deleuze,<sup>3</sup> Anne Boland,<sup>3</sup> Anne Rovelet-Lecrux,<sup>2</sup> Dominique Campion,<sup>2,4</sup> Pascale Saugier-Veber,<sup>1</sup> Nicolas Gruchy,<sup>5</sup> Thierry Frebourg,<sup>1</sup> Gaël Nicolas,<sup>2‡</sup> Nasrin Sarafan-Vasseur,<sup>1‡</sup> and Pascal Chambon<sup>1\*</sup>

---

<https://academic.oup.com/clinchem/article/65/9/1153/5608511?login=true>

## Rouen, laboratoire de cytogénétique, service de génétique (Pr Claude Houdayer)

- Géraldine Joly-Hélas
- Pascal Chambon
- Stéphane Le Mignot
- Coralie Tiercin
- Marion Finet
- Elise Caullet
- Mathieu Castelain



✉ [kevin.cassinari@chu-rouen.fr](mailto:kevin.cassinari@chu-rouen.fr)

✉ [donovan.liot@chu-rouen.fr](mailto:donovan.liot@chu-rouen.fr)