

Normal serum protein electrophoresis and mutated HGV

HGV genes detect very slowly evolving chronic lymphocytic leukemia patients, accepté le 29 Mars 2018 dans Cancer medicine

1- Introduction

La leucémie lymphoïde chronique est une maladie très hétérogène du point de vue clinique et biologique. Le développement des techniques moléculaires à haut débit a permis de mettre en évidence de nombreuses mutations pouvant avoir un impact pronostique dans la LLC. Cependant, l'utilisation de toutes ces données n'est pas encore intégrée dans un score pronostique global. Actuellement, les techniques de NGS se développent et permettent de déterminer de nombreuses mutations géniques chez les patients atteints de LLC. En pratique, seule la mutation de *TP53* a un impact sur la prise en charge du patient, avec une adaptation du traitement en cas d'altération de ce gène.

Notre équipe s'est intéressée à l'impact de la présence d'un pic monoclonal d'isotype IgM dans la leucémie lymphoïde chronique⁴⁵⁷. Nous avons rapporté un pronostic péjoratif associé à la présence d'un pic IgM comparativement à une électrophorèse des protéines sériques normale, la présence d'une hypogammaglobulinémie ou d'un pic IgG.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact pronostique de l'électrophorèse des protéines sériques (SPE) au diagnostic en comparant le statut normal versus anormal (que ce soit la présence d'un pic monoclonal ou d'une hypogammaglobulinémie), dans l'ère du NGS, afin de déterminer si nous retrouvons un impact pronostique statistiquement indépendant des nouveaux marqueurs moléculaires. L'autre intérêt de l'électrophorèse des protéines sériques est sa facilité de réalisation et son moindre coût. De plus, cet examen est généralement réalisé au diagnostic d'une LLC, principalement pour détecter une hypogammaglobulinémie pouvant nécessiter une prise en charge spécifique. Nous avons ainsi sélectionné 112 patients pour lesquels nous disposions de matériel biologique et d'une électrophorèse des protéines sériques réalisée au diagnostic, c'est-à-dire au cours de l'année du diagnostic et avant tout traitement de la LLC. Nous avons étudié les principales anomalies moléculaires décrites, à savoir la cytogénétique (del(17p), del(11q), trisomie 12 et del(13q)), les mutations (*TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1* et *BIRC3*), ainsi que le statut mutationnel IGHV. Enfin, nous avons récupéré les données cliniques, en particulier concernant le traitement.



ORIGINAL RESEARCH

Normal serum protein electrophoresis and mutated IGHV genes detect very slowly evolving chronic lymphocytic leukemia patients

Jasmine Chauzeix^{1,2}, Marie-Pierre Laforêt¹, Mélanie Deveza¹, Liam Crowther², Elodie Marcellaud², Paco Derouault³, Anne-Sophie Lia³, François Boyer², Nicolas Barges¹, Guillaume Olombel^{2,4}, Arnaud Jaccard^{2,5}, Jean Feuillard^{1,2}, Nathalie Gachard^{1,2} & David Rizzo^{1,2}

¹Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France

²Faculté de Médecine de Limoges, UMR CNRS 7276 CRIBL, Limoges, France

³Faculté de Médecine de Limoges, EA6309, Limoges, France

⁴Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France

⁵Hématologie Clinique et Thérapie Cellulaire, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France

Keywords

Chronic lymphocytic leukemia, IGHV, prognosis, serum protein electrophoresis

Correspondence

David Rizzo, Centre de biologie et de recherche en santé, 2 avenue Martin Luther King, 87042 Limoges, France.
Tel: +33(0)5 55 05 61 80;
Fax: +33(0)5 55 05 61 85;
E-mail: david.rizzo@unilim.fr

Funding Information

This work was supported by "Ligue Nationale Contre le Cancer, équipe labellisée Ligue" and "Comité Orientation Recherche Cancer en Limousin" (CORC).

Received: 31 October 2017; Revised: 29 March 2018; Accepted: 29 March 2018

Cancer Medicine 2018; **7**(6):2621–2628

doi: 10.1002/cam4.1510

Abstract

More than 35 years after the Binet classification, there is still a need for simple prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Here, we studied the treatment-free survival (TFS) impact of normal serum protein electrophoresis (SPE) at diagnosis. One hundred twelve patients with CLL were analyzed. The main prognostic factors (Binet stage; lymphocytosis; IGHV mutation status; *TP53*, *SP3B1*, *NOTCH1*, and *BIRC3* mutations; and cytogenetic abnormalities) were studied. The frequencies of IGHV mutation status, cytogenetic abnormalities, and *TP53*, *SP3B1*, *NOTCH1*, and *BIRC3* mutations were not significantly different between normal and abnormal SPE. Normal SPE was associated with Binet stage A, nonprogressive disease for 6 months, lymphocytosis below 30 G/L, and the absence of the IGHV3-21 gene rearrangement which is associated with poor prognosis. The TFS of patients with normal SPE was significantly longer than that of patients with abnormal SPE (log-rank test: $P = 0.0015$, with 51% untreated patients at 5.6 years and a perfect plateau afterward vs. a median TFS at 2.64 years for abnormal SPE with no plateau). Multivariate analysis using two different Cox models and bootstrapping showed that normal SPE was an independent good prognostic marker for either Binet stage, lymphocytosis, or IGHV mutation status. TFS was further increased when both normal SPE and mutated IGHV were present (log-rank test: $P = 0.008$, median not reached, plateau at 5.6 years and 66% untreated patients). A comparison with other prognostic markers suggested that normal SPE could reflect slowly advancing CLL disease. Altogether, our results show that a combination of normal SPE and mutated IGHV genes defines a subgroup of patients with CLL who evolve very slowly and who might never need treatment.

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most frequent indolent B-cell cancer with blood passage of tumor cells in the elderly in western countries, is characterized by a lymphocytosis exceeding five G/L comprising small circulating monomorphic round B lymphocytes, with constant

infiltration of bone marrow and secondary lymphoid organs [1, 2]. Diagnosis requires flow cytometry immunophenotyping of cells, usually based on the Matutes–Moreau score, which combines the expression of CD5 and CD23, weak surface membrane immunoglobulin levels and weak or absent FMC7, CD22, or CD79b expression. CLL is typically characterized by a Matutes score of 4 or 5 [3,

© 2018 The Authors. *Cancer Medicine* published by John Wiley & Sons Ltd.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2621



4]. Disease progression is heterogeneous with overall survival (OS) ranging from a few years to decades.

Because some patients with CLL may have a life expectancy as long as healthy subjects of the same age without treatment while others will rapidly evolve, it has been recognized for a long time that finding reliable prognostic factors is necessary. The first and most universal clinical and biological predictive tools are the Binet and Rai staging systems that predict the clinical course [5, 6]. For example, patients with Binet Stage A CLL exhibit good treatment-free survival (TFS), with a life expectancy close to that of healthy subjects of the same age. However, it is well known that the progression of these patients is rather heterogeneous [7].

Almost twenty years after the publication of Binet and Rai stages, Damle et al. [8], and Hamblin et al. [9], showed that a greater than two percent mutation rate of the variable rearranged region of the immunoglobulin heavy chain gene (IGHV) predicts good overall survival of patients with CLL. In the early 2000s, various cytogenetic prognostic markers were identified, including isolated del(13q), which predicts very good overall survival, and del(17p), which is reliably associated with resistance to fludarabine. High-throughput sequencing of the CLL genetic landscape revealed several new gene mutations associated with a poor prognosis. For example, *NOTCH1* is associated with Richter syndrome, and the *SF3B1* mutation also seems to predict fludarabine resistance [10]. Most of these genetic markers are in fact predictive of more rapid disease progression, treatment resistance, or transformation, and very few of them identify patients who will never need to be treated. Mutated IGHV and the deletion of the long arm of chromosome 13 (del(13q)) may be the only markers that predict prolonged TFS [11–14].

To assess the cytogenetic and mutational status of CLL, each case requires high levels of technical and medical expertise, and the process is time consuming and costly [15]. To circumvent these difficulties, various other biological parameters, such as serum soluble CD23, CD38, and ZAP70 expressions, have been reported as prognostic markers [16]. However, as exemplified for antibodies detecting ZAP70, published reagents and/or methods for the detection and quantification of these markers are rather diverse [17]. To date, these markers are rarely used in the routine staging and follow-up of patients with CLL.

Universal biological analyses prescribed for the initial staging of patients with CLL include serum protein electrophoresis (SPE). SPE detects either hypogammaglobulinemia, which is supposed to predict infection risk [18] and is likely to be related to tumor burden [19], or immunoglobulin peaks. The prevalence rates of hypogammaglobulinemia and monoclonal paraprotein are 25% [20] and 11% [21], respectively. The clinical significance of

abnormal serum protein electrophoresis has been previously studied, showing a worse prognosis in the presence of serum paraprotein [19, 22]. The impact of hypogammaglobulinemia is controversial regarding either infection risk, TFS, or OS [20, 23, 24]. As most publications only report on the significance of hypogammaglobulinemia or the monoclonal component alone, the prognostic value of a normal gamma globulin serum profile (normal SPE) per se has not been reported.

Here, we studied the correlation of normal SPE with TFS and its relationship with other variables (Binet Stage, biological parameters, and genetic characteristics). We found that normal SPE is an independent good prognostic variable and that the combination of normal SPE and mutated IGHV genes predicts patients with excellent TFS who are likely to have very slowly progressing CLL and who will never need treatment after diagnosis.

Materials and Methods

Patients

We analyzed 112 samples from patients with typical CLL, diagnosed between 2004 and 2016, and 93% were diagnosed between 2004 and 2012. By flow cytometry, their Matutes score was 4 or 5 in all cases. Inclusion criteria were based on the availability of biologic samples and concomitant serum protein electrophoresis with immunofixation electrophoresis when a peak was detected. Normal concentrations of gamma globulin ranged from 6 g/L to 11 g/L. The threshold for peak detection was 1 g/L of monoclonal immunoglobulin. Patients were classified according to the Binet Stage, nonprogressive/progressive disease (known stable disease for 6 months or not), the Rossi score, and their IGHV mutation status.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands) according to the manufacturer's instructions.

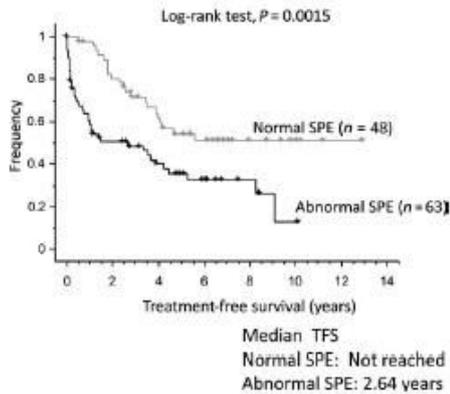
Sequencing of *SF3B1*, *NOTCH1*, *TP53*, and *BIRC3*

Patients were first screened for mutations in *SF3B1* exons 14, 15, 16, and 18 (NM_012433), *NOTCH1* exon 34 (NM_017617), and *BIRC3* exons 6 to 9 (NM_001165) by Sanger sequencing (BigDye Terminator cycle kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) and ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer) after amplification of 50 ng genomic DNA. Sequences were analyzed with the Mutation Surveyor



Table 1. Patient characteristics at diagnosis (mean \pm standard deviation is given for age, lymphocytosis, hemoglobin, and platelet counts).

	Total (n = 112)	Normal SPE (n = 49)	Abnormal SPE (n = 63)	P
Sex	Men: 63.5% (n = 66) Women: 36.5% (n = 38)	Men: 63.3% (n = 31) Women: 36.7% (n = 18)	Men: 58.7% (n = 37) Women: 41.3% (n = 26)	NS
Age (years)	66.6 \pm 10.5	65.7 \pm 10.5	67.3 \pm 10.5	NS
Binet				χ^2 test: P = 0.001
Stage A	81.3% (n = 91)	95.9% (n = 47)	69.8% (n = 44)	
Stage B	15.2% (n = 17)	2.0% (n = 1)	25.4% (n = 16)	
Stage C	3.6% (n = 4)	2.0% (n = 1)	4.8% (n = 3)	
Nonprogressive disease for 6 months after diagnosis	79.5% (n = 89)	98.0% (n = 48)	65.1% (n = 41)	χ^2 test: P < 0.0001
IGHV gene mutation (M-CLL)	59.5% (n = 66)	61.2% (n = 30)	58.1% (n = 36)	NS
Lymphocytosis (G/L)	32.8 \pm 63.6	18.2 \pm 13.3	44.1 \pm 82.5	NS
Lymphocytosis >30 G/L*	25.9% (n = 29)	14.3% (n = 7)	34.9% (n = 22)	t test: P = 0.017
Hemoglobin (g/dL)	13.7 \pm 1.8	14.1 \pm 1.5	13.5 \pm 2.0	NS
Platelets (G/L)	212.2 \pm 87.7	228.1 \pm 89.1	199.7 \pm 184.5	NS
Cytogenetic				
del(17p)	0.9% (n = 1)	2.1% (n = 1)	0.0% (n = 0)	NS
del(11q)	11.7% (n = 13)	8.3% (n = 4)	14.3% (n = 9)	
Trisomy 12	15.5% (n = 17)	10.4% (n = 5)	19.4% (n = 12)	
Isolated del(13q)	28.8% (n = 32)	32.7% (n = 16)	25.8% (n = 16)	
Mutations				
NOTCH1	8.9% (n = 10)	12.2% (n = 6)	6.3% (n = 4)	NS
SF3B1	11.6% (n = 13)	6.1% (n = 3)	15.9% (n = 10)	
TP53	7.1% (n = 8)	4.1% (n = 2)	9.5% (n = 6)	
BIRC3	2.7% (n = 3)	2.0% (n = 1)	3.2% (n = 2)	

**Figure 1.** Kaplan-Meier curves for treatment-free survival according to SPE status.

DNA Analysis Software V4.0 (SoftGenetics, State College, PA). Patients not screened by Sanger sequencing were assayed by high-throughput sequencing (HTS) (Proton, Ion Torrent), using a panel that targeted the same regions. The *TP53* gene was analyzed by HTS in all cases. The panels were designed on the AmpliSeq designer platform (www.ampliseq.com). Libraries were constructed using the

Ion AmpliSeq Library kit 2.0 (Thermo Fischer Scientific) according to the manufacturer's instructions. Variants were filtered to retain exonic mutations and to obtain a prediction score of pathogenesis by SIFT and/or CADD positive or unknown on both scores. Known mutations were identified by querying the COSMIC, 1000 genomes, and dbSNP databases.

Immunoglobulin gene sequence analysis

Amplification of V, D, and J rearranged genes was performed using the Biomed-2 strategy with FR1 and FR2 primers as previously described. Sequence analysis of VDJ segments was performed as previously described [25].

Cytogenetics

Conventional cytogenetic and fluorescence in situ hybridization were performed according to conventional procedures. Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragment (QMPSF) was performed as described elsewhere [26].

Flow cytometry

Multiparametric flow cytometry analysis was performed on heparinized blood samples as described elsewhere [27].

Statistics

The chi-square test was used to evaluate the difference between categorical covariates for the SPE subgroups. A lymphocytosis threshold of 30 G/L was used as determined previously [28]. The effects of demographics (age and sex), Binet stage, lymphocytosis, genetics (IGHV mutation status, *SF3B1*, and *NOTCH1* mutations), cytogenetics (trisomy 12, del(11q), del(13q), and del(17p)), and serum parameter (SPE subgroups) covariates on treatment-free survival (TFS) were examined using the Cox proportional hazard model [29]. Briefly, each covariate was first tested in univariate analysis. All significant covariates with a *P*-value below 0.20 after univariate analysis were included simultaneously in the multivariate model. The significance of variables in the final model was tested by a backward stepwise process using the likelihood ratio to evaluate the effect of omitting variables. The stability of the final model was validated by performing 1000 bootstrap samples.

Results

To study the significance of normal serum protein electrophoresis in CLL, a series of 112 patients was selected. Their clinical and biological characteristics are shown in Table 1. Among them, 49 (44%) had a normal SPE in the year of diagnosis, and 63 (56%) had an abnormal SPE (hypogammaglobulinemia: 24%; gamma globulin peak: 32%). These two groups of patients with CLL were comparable in terms of age and sex, as well as hemoglobin concentrations and platelet counts.

Regarding the Binet stages of the patients, 39 of 41 patients (96%) with normal SPE were Binet stage A, while 19 of the 63 (30%) patients with abnormal SPE were Binet stage B or C (Table 1, *P* = 0.001, chi-square test). Nonprogressive CLL (known stable disease for 6 months) was found in 98% of patients with normal SPE (48/49), while 65% (41/63) of the patients with abnormal SPE had stable disease (*P* = 2×10^{-5} , chi-square test). The number of patients with lymphocytosis above 30 G/L at diagnosis was significantly lower in patients with normal SPE (14.3% in normal SPE vs. 34.9% in abnormal SPE, Student's *t* test: *P* = 0.017) (Table 1).

With a threshold of a 2% mutation rate, the number of patients with mutated (M-CLL) or unmutated (UM-CLL) IGHV genes was comparable between normal and abnormal SPE (Table 1). Analysis of the IGHV gene repertoire was performed for IGHV gene rearrangements with a frequency over 5% among all patients with CLL of this series. Patients with a normal SPE exhibited significantly increased usage of IGHV1-2. In contrast, the rearrangement of the IGHV3-21 segment, associated with a poor

Table 2. Cox univariate analysis of TFS.

	HR	LCI	UCI	P-value
Binet stage				
Binet stage A (n = 91)	1.00			
Binet stage B (n = 17)	21.44	10.1	45.6	<0.0001
Binet stage C (n = 4)	42.97	11.2	164.6	<0.0001
Lymphocytosis				
<30 G/L (n = 83)	1.00			
≥30 G/L (n = 29)	4.12	2.44	6.96	<0.0001
IGHV mutation status				
M-CLL (n = 66)	1.00			
UM-CLL (n = 45)	2.48	1.49	4.13	0.0005
Hemoglobin				
>10 g/dL (n = 108)	1.00			
<10 g/dL (n = 3)	14.37	3.14	65.91	0.0006
SPE group				
Normal SPE (n = 49)	1.00			
Abnormal SPE (n = 63)	2.41	1.42	4.10	0.001
Rossi's score				
Very Low or Low (n = 69)	1.00			
Intermediate or high (n = 41)	2.08	1.25	3.45	0.005
SF3B1 status				
SF3B1 wild type (n = 99)	1.00			
SF3B1 mutation (n = 13)	2.28	1.18	4.42	0.014
Cytogenetics				
Normal FISH or QMPSF (n = 47)	1.00			
Isolated del(13)(q14) (n = 32)	0.45	0.24	0.83	0.010
Del(11q) (n = 13)	2.15	1.05	4.40	0.036
Trisomy 12 (n = 17)	1.62	0.86	3.07	0.14
Del(17p) (n = 1) ¹	2.73	0.37	19.96	0.32
Platelet count				
>100 G/L (n = 105)	1.00			
<100 G/L (n = 6)	2.36	0.85	6.56	0.099

HR, hazard ratio; LCI, lower confidence interval; UCI, upper confidence interval; *P*-value, probability that the hazard ratio = 1 (null hypothesis).

¹Excluded criteria because of low numbers.

prognosis, was overrepresented in patients with abnormal SPE and was completely absent in patients with normal SPE (Fig. S1).

The *BIRC3* and *NOTCH1* mutation rates were low and comparable between patients with normal and abnormal SPE (Table 1). Although not significant, the *SF3B1* mutation rate was lower in patients with normal SPE (6% vs. 16% for abnormal SPE, log-rank test: *P* = 0.11). There were no differences for del(11q), trisomy 12, or isolated del(13q) (Table 1). The number of patients with del(17p) was too low to draw any conclusion.

We then studied TFS according to SPE. Patients with normal SPE had a significantly increased TFS, with a median that was not statistically reached. The plateau

Table 3. 5 statistically significant variables after Cox multivariate analysis of TFS (the two models were designed to include all nonoverlapping variables with a P-value <0.20 after univariate analysis).

	1st Model					2nd Model						
	Multivariate analysis		Internal bootstrapping validation (mean)			Multivariate analysis		Internal bootstrapping validation (mean)				
	HR	LCI	UCI	P-value	HR	LCI	UCI	% Bootstrap selection	HR	LCI	UCI	% Bootstrap selection
Binet stage	1.00				1.00				1.00			
Binet stage A (n = 91)	1.00				1.00			84.5	1.00			
Binet stage B (n = 17)	5.39	26.35	<0.0001		11.92	5.39	26.36		3.40	1.98	5.85	97
Binet stage C (n = 4)	72.34	313.49	<0.0001		72.34	16.69	313.28		2.25	1.30	3.88	78
Lymphocytosis	1.00				1.00				1.00			
<30 G/L (n = 83)	2.53	1.43	0.002		2.53	1.43	4.50	83.8	2.47	1.47	4.17	85.5
>30 G/L (n = 19)	1.00				1.00				1.00			
SPE group	1.00				1.00				1.00			
Normal SPE (n = 49)	1.00				1.00			70	1.00			
Abnormal SPE (n = 63)	2.52	1.43	0.001		2.52	1.43	4.43		2.47	1.47	4.17	
IGHV mutation status	1.00				1.00				1.00			
M-CLL (n = 66)	1.99	1.15	0.01		1.99	1.15	3.45	67.5	1.00			
UM-CLL (n = 45)	1.00				1.00				1.00			
Hemoglobin	1.00				1.00				1.00			
< 10 g/dL (n = 108)	17.10	3.33	87.72	0.0007	17.10	3.33	87.72		17.10	3.34	87.68	53
> 10 g/dL (n = 3)	1.00				1.00				1.00			

HR, hazard ratio; LCI, lower confidence interval; UCI, upper confidence interval; P-value, probability that hazard ratio = 1 (null hypothesis).

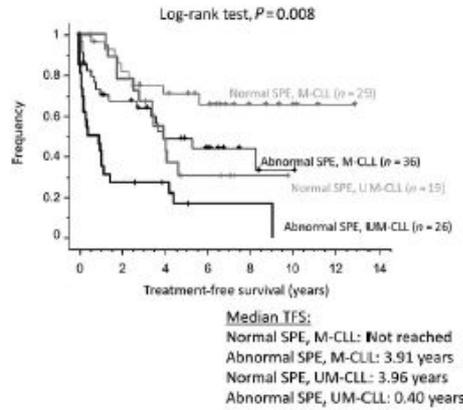


Figure 2. Kaplan-Meier curves for treatment-free survival according to SPE and IGHV mutation status.

began at 5.6 years and was at 51% of cumulated TFS. Patients with abnormal SPE had a median TFS of 2.64 years with no plateau and had a comparable TFS to patients with either hypogammaglobulinemia or an immunoglobulin peak (Figs. 1 and S2). In comparison, the median TFS of patients with mutated IGHV was 8.2 years, and the plateau began at 8.4 years, with 48% of patients being treatment-free (Fig. S3).

In addition to SPE status, the other significant variables after univariate analysis were hemoglobin levels, lymphocytosis, IGHV mutation status, *SF3B1* mutation, isolated del(13q), and del(11q). Criteria that integrated various variables, such as Binet stage or Rossi's score, were also highly significant (Table 2). Compared to normal SPE, the hazard ratio for treatment was 2.41 for abnormal SPE, a value that was compared to that of IGHV mutation status and of Rossi's score. For multivariate analysis, two Cox models were designed. The first model included the Binet stage, Rossi's score, IGHV mutation status, lymphocytosis, and SPE status, and the second model separated all biological criteria. Bootstrapping showed the stability of both models. Normal SPE was an independent variable in both. Other independent variables included the Binet stage, Rossi's score, and lymphocytosis for the first model, and IGHV mutation status and lymphocytosis for the second one (Table 3).

We looked at the relationship between SPE and either the IGHV mutation status or Rossi's score. Patients with normal SPE and mutated IGHV had an excellent prognosis (median TFS not reached after 13 years of follow-up, with a plateau at 5.6 years and 66% of accumulated TFS), while patients with normal SPE and unmutated IGHV genes or abnormal SPE and mutated IGHV genes

had comparable and shorter TFS (median TFS at 3.96 years and 3.91 years, respectively, Fig. 2). The group with abnormal SPE and unmutated IGHV genes had a very short TFS (median TFS = 0.40 years). If restricted to the 84 patients with both stage A and stable CLL, the TFS curves of patients with normal and abnormal SPE were parallel for the first 2.6 years. However, a plateau was reached at 5.6 years only for patients with normal SPE and mutated IGHV genes (Fig. S4A). Indeed, among patients with mutated IGHV genes, the TFS curves of those with normal or abnormal SPE were clearly separated if the starting time point was translated from 0 to 2.6 years (Fig. S4B).

Normal SPE had no correlation with the TFS of patients with isolated del(13q) (very low-risk Rossi's score, Fig. S5A) but was correlated with the significantly improved TFS of all other patients of Rossi's model (Fig. S5B and C). Moreover, even though their numbers were low, patients with normal SPE, mutated IGHV genes, and isolated del(13q) together had much longer TFS than the others (log-rank test: $P = 0.0295$, Fig. S6).

Altogether, our results suggest that the combination of normal SPE with mutated IGHV genes identifies patients with a very slowly evolving CLL, and even though isolated del(13q) was not selected after multivariate analysis, its presence is likely to be an additional favorable parameter.

Discussion

In this study, we showed that normal SPE is an independent good prognostic marker *per se* that predicts longer TFS in CLL, but most importantly, the combination of normal SPE and mutated IGHV genes defines a subgroup of patients with excellent TFS.

CLL has a highly variable natural course with overall survival ranging from a few years to several decades. As very well described by Binet and Rai [5, 6], the difficulty for the physician is to correctly predict disease evolution as it has a strong impact on patient medical care. It is remarkable that their scoring systems, based on a few simple clinical and biological parameters defined more than 30 years ago, are still valid and have not been supplanted by any of the "new" markers published after these princeps papers. Facing this plethora of markers, the current tendency is to search for simplicity [30–32]. In that context, the Binet and Rai scoring systems are still the keystones of CLL staging at diagnosis. Additionally, only IGHV mutation status and del(17p)/TP53 mutations are currently recommended to predict CLL progression and resistance to therapeutics [30, 31, 33].

Despite this apparent simplicity, within each group and mainly within good prognosis groups (Binet stage A or

Rai stage 0–I), patient progression is rather heterogeneous. Most of the other markers proposed in CLL staging are associated with poor prognosis when present. In other words, the absence of the marker is not inevitably associated with the absence of disease progression. IGHV mutation status and chromosome 13 abnormalities are thus particular as it is the presence of somatic mutations in the variable regions of the immunoglobulin heavy chain genes or the presence of isolated del(13q) that predicts favorable evolution [13]. Our results show that combining SPE results and IGHV mutation status improves the power of predicting a favorable disease course as the presence of normal SPE plus mutated IGHV genes is associated with very long TFS. Of note, even if the number of patients in this series was too low to form a firm conclusion, the presence of these two criteria combined with the presence of isolated del(13q) tended to define an even better prognosis group.

Hamblin et al. [9], and Opezzo et al. [34], have proposed that CLL with mutated IGHV genes could be a different disease with a more indolent course. Normal SPE appeared to be an independent parameter to predict longer TFS and was associated with Binet stage A. For mutated IGHV genes, the presence of normal SPE could also reflect a more indolent natural history. Supporting this hypothesis is the fact that various poor prognostic markers, such as the short-term evolution of the disease, lymphocytosis over 30 G/L, or the IGHV3-21 gene rearrangement, were almost always absent in patients with normal SPE. Based on their excellent TFS, patients with CLL harboring both normal SPE and mutated IGHV status might never require any specific treatment.

Acknowledgments

This work was supported by "Ligue Nationale Contre le Cancer, équipe labellisée Ligue" and "Comité Orientation Recherche Cancer en Limousin" (CORC). We thank Dr Jean-Baptiste Woillard (Pharmacology Department of Limoges University Hospital, France) for having supervised the statistical analysis, and Dr Jeanne Cook-Moreau (UMR CNRS 7276, France) for careful English editing.

Conflict of Interest

None declared.

References

1. Swerdlow, S. H., and International Agency for Research on Cancer. 2008. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer, Lyon.



2. Tamaru, J.-I. 2017. 2016 revision of the WHO classification of lymphoid neoplasms. *Rinsho Ketsueki* 58:2188–2193.
3. Matutes, E., K. Owusu-Ankomah, R. Morilla, J. Garcia Marco, A. Houlihan, T. H. Que, et al. 1994. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 8:1640–1645.
4. Moreau, E. J., E. Matutes, R. P. A'hern, A. M. Morilla, R. M. Morilla, K. A. Owusu-Ankomah, et al. 1997. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am. J. Clin. Pathol.* 108:378–382.
5. Binet, J. L., A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Pignat, J. Goasguen, et al. 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48:198–206.
6. Rai, K. R., A. Sawitsky, E. P. Cronkite, A. D. Chanana, R. N. Levy, and B. S. Pasternack. 1975. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46:219–234.
7. Letestu, R., V. Lévy, V. Eclache, F. Baran-Marszak, D. Vaur, D. Naguib, et al. 2010. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood* 116:4588–4590.
8. Damle, R. N., T. Wasil, F. Fais, F. Ghiotto, A. Valetto, S. L. Allen, et al. 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1840–1847.
9. Hamblin, T. J., Z. Davis, A. Gardiner, D. G. Oscier, and F. K. Stevenson. 1999. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1848–1854.
10. Rossi, D., A. Bruscajgin, V. Spina, S. Rasi, H. Khiabani, M. Messina, et al. 2011. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 118:6904–6908.
11. Rigolin, G. M., I. del Giudice, L. Formigaro, E. Saccenti, S. Martinelli, M. Cavallari, et al. 2015. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic correlations. *Genes Chromosom. Cancer* 54:818–826.
12. Rossi, D., S. Rasi, V. Spina, A. Bruscajgin, S. Monti, C. Ciardullo, et al. 2013. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121:1403–1412.
13. Gladstone, D. E., L. Swinnen, Y. Kasamon, A. Blackford, C. D. Gocke, C. A. Griffin, et al. 2011. Importance of immunoglobulin heavy chain variable region mutational status in del(13q) chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 52:1873–1881.
14. Sandoval-Sus, J. D., J. C. Chavez, S. Dalia, S. M. H. Naqvi, C. Talati, L. Nodzon, et al. 2018. Association between immunoglobulin heavy-chain variable region mutational status and isolated favorable baseline genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 59:59–68.
15. Hallek, M. 2017. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am. J. Hematol.* 92:946–965.
16. Rosenquist, R., D. Cortese, S. Bhoi, L. Mansouri, and R. Gunnarsson. 2013. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leuk. Lymphoma* 54:2351–2364.
17. Gachard, N., A. Salviat, C. Boutet, C. Arnoulet, F. Durrieu, B. Lenormand, et al. 2008. Multicenter study of ZAP-70 expression in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia using an optimized flow cytometry method. *Haematologica* 93:215–223.
18. Forconi, F., and P. Moss. 2015. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood* 126:573–581.
19. Rizzo, D., J. Chauzeix, F. Trimoreau, J. B. Woillard, F. Genevieve, A. Bouvier, et al. 2015. IgM peak independently predicts treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia and correlates with accumulation of adverse oncogenetic events. *Leukemia* 29:337–345.
20. Parikh, S. A., J. F. Leis, K. G. Chaffee, T. G. Call, C. A. Hanson, W. Ding, et al. 2015. Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia: natural history, clinical correlates, and outcomes. *Cancer* 121:2883–2891.
21. Martin, W., R. Abraham, T. Shanafelt, R. J. Clark, N. Bone, S. M. Geyer, et al. 2007. Serum-free light chain—a new biomarker for patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Transl. Res.* 149:231–235.
22. Xu, W., Y. H. Wang, L. Fan, C. Fang, D. X. Zhu, D. M. Wang, et al. 2011. Prognostic significance of serum immunoglobulin paraprotein in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.* 35:1060–1065.
23. Andersen, M. A., F. J. Vojdeman, M. K. Andersen, P. D. N. Brown, C. H. Geisler, O. Weis Bjerrum, et al. 2016. Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia is a predictor of early death. *Leuk. Lymphoma* 57:1592–1599.
24. Matutes, E., and A. Polliack. 2016. A matter of life or early death in CLL: do serum immunoglobulin levels really count? *Leuk. Lymphoma* 57:1501–1502.
25. Gachard, N., M. Parrens, I. Soubeyran, B. Petit, A. Marfak, D. Rizzo, et al. 2013. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia* 27:183–189.



26. Bastard, C., G. Raux, C. Fruchart, F. Parmentier, D. Vaur, D. Penther, et al. 2007. Comparison of a quantitative PCR method with FISH for the assessment of the four aneuploidies commonly evaluated in CLL patients. *Leukemia* 21:1460–1463.
27. Rizzo, D., A. Lotay, N. Gachard, I. Marfak, J. L. Faucher, F. Trimoreau, et al. 2013. Very low levels of surface CD45 reflect CLL cell fragility, are inversely correlated with trisomy 12 and are associated with increased treatment-free survival. *Am. J. Hematol.* 88:747–753.
28. Del Giudice, I., F. R. Mauro, M. S. De Propris, S. Santangelo, M. Marinelli, N. Peragine, et al. 2011. White blood cell count at diagnosis and immunoglobulin variable region gene mutations are independent predictors of treatment-free survival in young patients with stage A chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 96:626–630.
29. Coordonné par Andrew Kramar et Simone Mathoulin-Pélissier. Méthodes biostatistiques appliquées à la recherche clinique en cancérologie. Available at http://www.jle.com/fr/ouvrages/e-docs/methodes_biostatistiques_appliquees_a_la_recherche_clinique_en_cancerologie_290431/ouvrage.phtml (accessed 17 October 2017).
30. Rosenquist, R., A. Rosenwald, M. Q. Du, G. Gaidano, P. Groenen, A. Wotherspoon, et al. 2016. Clinical impact of recurrently mutated genes on lymphoma diagnostics: state-of-the-art and beyond. *Haematologica* 101:1002–1009.
31. International CLL-IPI working group. 2016. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 17:779–790.
32. Gocke, C. D., and D. E. Gladstone. 2018. The absolute percent deviation of IGHV mutation rather than a 98% cut-off predicts survival of chronic lymphocytic leukaemia patients treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab. *Br. J. Haematol.* 180:7–8.
33. Delgado, J., M. Doubek, T. Baumann, J. Kotaskova, S. Molica, P. Mozas, et al. 2017. Chronic lymphocytic leukemia: a prognostic model comprising only two biomarkers (IGHV mutational status and FISH cytogenetics) separates patients with different outcome and simplifies the CLL-IPI. *Am. J. Hematol.* 92:375–380.
34. Oppezio, P., C. Magnac, S. Bianchi, F. Vuillier, A. Tiscornia, G. Dumas, et al. 2002. Do CLL B cells correspond to naive or memory B-lymphocytes? Evidence for an active Ig switch unrelated to phenotype expression and Ig mutational pattern in B-CLL cells. *Leukemia* 16:2438–2446.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

Figure S1. IGHV repertoire-Only IGHV gene rearrangements with a frequency over five percent of the whole series are shown (Chi² test: $P = 0.021$ for IGHV1-2 and $P = 0.0095$ for IGHV3-21).

Figure S2. Kaplan Meyer curves for treatment-free survival for normal SPE, hypogammaglobulinemia and monoclonal peak.

Figure S3. Kaplan Meyer curves for treatment-free survival according to IGHV mutation status.

Figure S4. Kaplan Meyer curves for treatment-free survival (A) restricted to patients with non-progressive CLL for 6 months and Binet stage A, according to SPE and IGHV mutation status. (B) Restricted to patients with non-progressive CLL for 6 months, Binet stage A and mutated IGHV status, according to SPE, starting at 2.6 years).

Figure S5. Kaplan Meyer curves for treatment-free survival according to SPE status and Rossi's score (A: very good Rossi's score. B: good Rossi's score. C: Intermediate Rossi's score).

Figure S6. Kaplan Meyer curves for treatment-free survival for CLL patients with mutated IGHV genes, normal SPE and isolated del(13q) versus other patients of this whole series.



3- Discussion

Nous avons étudié 112 patients atteints de LLC dont 49 avec une SPE normale et 63 avec une SPE anormale. Le groupe avec SPE normale regroupait majoritairement des patients en stade Binet A (96 %), tandis qu'un stade Binet plus avancé était plus fréquent en cas de SPE anormale (30 %). Nous avons regardé les patients considérés comme stables, c'est-à-dire n'ayant pas nécessité de traitement dans les 6 mois après le diagnostic : la proportion de patients stables était significativement plus importante en cas de SPE normale (98 % versus 65 %).

Nos résultats montrent que la présence d'une électrophorèse des protéines sériques normale au diagnostic permet de distinguer les patients ayant une TFS significativement supérieure (TFS médiane non atteinte à 13 ans et présence d'un plateau à partir de 5,6 ans et 51 % de TFS cumulative versus une TFS médiane de 2,64 ans en cas de SPE anormale). L'utilisation conjointe du statut mutationnel IGHV permet la détection de patients atteints de LLC ayant une TFS particulièrement longue (médiane de survie non atteinte à 13 ans, avec un plateau à partir de 5,6 ans et 66 % de TFS cumulative, versus des TFS médianes de 3,96 et 3,91 ans respectivement pour les groupes avec SPE normale et statut IGHV non muté d'une part, et SPE anormale et statut IGHV muté d'autre part). Dans le groupe SPE normale et statut IGHV muté, certains marqueurs de mauvais pronostic sont significativement sous-représentés. C'est le cas du réarrangement IGHV3-21 (absent) et de la lymphocytose au diagnostic avec un seuil à 30 G/L.

L'utilisation de la SPE est intéressante car il s'agit d'un examen généralement réalisé au diagnostic de la LLC, de faible coût et facilement réalisable. Malgré l'apparition de nombreux marqueurs de mauvais pronostic et y compris dans l'ère du séquençage haut débit, une électrophorèse des protéines sériques normale (c'est-à-dire immunoglobulines polyclonales sans hypogammaglobulinémie) au diagnostic demeure un marqueur indépendant de bon pronostic, permettant d'identifier des patients avec une LLC évoluant lentement et qui ne nécessiteront probablement jamais de traitement spécifique.



C- Article 2 : « Updates to « COV’COP » to easily detect CNVs in inherited and cancer diseases », manuscrit soumis dans Bioinformatics le 11/06/2018 et refusé le 18/06/2018, en attente de resoumission dans un autre journal

1- Introduction

Le logiciel Cov’Cop a été mis au point par les Drs Paco Derouault et Anne-Sophie Lia (EA6308) afin de mettre en évidence les CNV dans des pathologies héréditaires⁶⁰⁶. Ce logiciel répond à un besoin pour l’interprétation des CNV à partir de données issues de NGS avec librairies préparées à partir de panels d’amplicons. En effet, de nombreux outils existent pour la détection de CNV par NGS mais sont pour la plupart développés pour des librairies préparées par capture et séquencées par technologie Illumina. Les contraintes et stratégies de normalisation sont différentes de celles nécessaires pour notre stratégie NGS (amplicons et technologie Ion Torrent).

Nous avons voulu adapter l’utilisation de Cov’Cop à la détection des CNV dans des pathologies somatiques, en particulier dans la LLC pour laquelle nous devons répondre sur la présence ou non des principales anomalies (del(17p), del(11q), trisomie 12, del(13q)). Nous avons donc collaboré avec l’équipe EA6308 pour mettre au point un panel de NGS pouvant permettre la détection des CNV avec le logiciel Cov’Cop dans le cadre de pathologies lymphoïdes, ainsi qu’un second panel réduit pour la recherche ciblée de mutation et de délétion de *TP53* et d’*ATM*.

Nous avons contribué à l’amélioration du logiciel Cov’Cop avec l’intégration d’une interface graphique et d’aides visuelles à la détection automatique des CNV. Nous avons participé à son adaptation prenant en compte les spécificités relatives aux anomalies somatiques. En effet, les anomalies rencontrées peuvent être sous-clonales avec un pourcentage réduit de cellules porteuses. De plus, certains CNV tels que la del(13q) sont fréquents et peuvent induire un biais dans le calcul des ratios normalisés pour des puces comprenant un nombre limité de patients (7 à 8 échantillons par puce pour le panel lymphoïde étendu). Cette difficulté a nécessité l’application d’une double normalisation (élimination automatique des régions avec CNV dans le processus de calcul des ratios normalisés) et l’utilisation optionnelle d’un échantillon de référence validé pour ne présenter aucune anomalie de nombre (ADN témoin). Enfin, nous avons tenté de déterminer un seuil de sensibilité. Dans ce travail, certains gènes et régions chromosomiques ont été anonymisés pour protéger des données non encore publiées.



*Data and text mining***Updates to “COV’COP” to easily detect CNVs in inherited and cancer diseases**

Paco Derouault¹, Jasmine Chauzeix^{2,3}, David Rizzo^{2,3}, Corinne Magdelaine^{1,4}, Sylvie Bourthomieu^{1,5}, Karine Durand^{6,7}, H el ene Dzugan^{1,4}, Franck Sturtz^{1,4}, St ephane M erillou⁸, Anne-Sophie Lia^{1,4*}

1 Univ. Limoges, MMNP, EA 6309, F-87000 Limoges, France; 2 CHU Limoges, Service H ematologie Biologique, F-87000 Limoges, France; 3 Univ. Limoges, UMR CNRS 7276 CRIBL, F-87000, Limoges, France; 4 CHU Limoges, Service Biochimie et G en etique Mol culaire, F-87000 Limoges, France; 5 CHU Limoges, Service de Cytog en etique, F-87000 Limoges, France; 6 CHU Limoges, Service Anatomopathologie, F-87000 Limoges, France; 7 Univ. Limoges, EA CAPTur, F-87000 Limoges, France; 8 Univ. Limoges, UMR-7252X-LIM, F-87000, France

*To whom correspondence should be addressed.

Associate Editor: XXXXXXXX

Received on XXXXX; revised on XXXXX; accepted on XXXXX

Abstract

Cov’Cop 2 is a new major version of the Cov’Cop software for CNVs detection among amplicons sequencing data. New original features are provided in order to maximize CNVs detection. All the first steps of correction and normalization are identical in Cov’Cop 1 and 2. However, in this new version, three major new implementations are present. Firstly, we added a new CNV calling algorithm, based on the z-score, that automatically defines the deletion and duplication thresholds. Secondly, we optimized Cov’Cop so that it can detect deletion or duplication events from cancer data with a low ratio of cancer cells among healthy cells, especially by using control samples. Finally, we improved the user-friendly graphics interface by developing a new interactive visualization, strongly maximizing results interpretation.

Availability: <https://git.unilim.fr/merilp02/CovCop2/>

Contact: anne-sophie.lia@unilim.fr

Supplementary information: Supplementary data are available at *Bioinformatics* online.

1 Introduction

In order to help molecular geneticists to quickly identify CNVs responsible for inherited diseases among Amplicons Sequencing data generated by NGS, we designed a user-friendly tool “Cov’Cop” (Derouault *et al.* 2017). Using the raw-read-count (RRC) value of each amplicon (provided as a coverage file for each run by the sequencer), it simultaneously analyzes all the patients using a two-stage algorithm containing correction and normalization levels to give a score for each amplicon. Theoretical score of 1 is the normal case while low (<0.5) or high (>1.5) values respectively reveal deletions or duplications.

Here, we propose a new major update to Cov’Cop with a new CNV calling algorithm, based on the z-score, that automatically defines the deletion and duplication thresholds. Also, we optimized Cov’Cop so that

it can detect deletion or duplication events from cancer data with a low ratio of cancer cells among healthy cells, especially by using control samples (data sets described in supplementary data 1). Finally, we improved the user-friendly graphics interface by developing a new interactive visualization, greatly maximizing results interpretation.

2 New features**2.1 CNV detection algorithm****2.1.1 Z-score-based CNV detection : “Z-detection”**

Cov’Cop 1 considered an amplicon deleted or duplicated according to thresholds defined by the user. A new CNV detection algorithm, based



Derouault et al.

on the z-score, has been implemented in Cov'Cop 2. For each amplicon, the z-score is calculated from all the values of a patient. The z-score following a standard normal distribution, we fixed for both deletion and duplication events a threshold corresponding to a significance level of 0.01 with one-tailed test. Thus, a negative z-score with a p-value < 0.01 indicates a deleted amplicon, while a positive z-score with a p-value < 0.01 states a duplicated amplicon. This algorithm automatically determines the best deletion and duplication thresholds based on the variability of a patient's data. We estimated the sensitivity of this new algorithm to be around 91% and the specificity around 96% (see supplementary data 2).

2.1.2 Two-stages ratio to optimize CNVs detection

The last normalization step of Cov'Cop 1 consisted in a ratio of standardized patient values that gives a theoretical value equal to 1 for a gene present in two copies, 0.5 for a deletion event and 1.5 for a duplication. In Cov'Cop 2, we optimized this detection by adding a new step: once the first ratio is calculated and first CNV detection is performed, a second ratio is calculated excluding the amplicons located inside the firstly detected CNVs, and the final CNV detection is realized. This approach is used to improve standardization in regions where a same CNV event is present in many patients (see supplementary data 3).

2.1.3 Merging CNVs

To reduce the impact of false negative amplicons on CNV detection, we added a "merge" option in Cov'Cop 2. If two CNV areas, located on the same chromosome, are disjointed by only one amplicon with a z-score duplicated or deleted at a significance level of 0.05, Cov'Cop 2 will then merge the two CNV areas to point out easily this global CNV (see supplementary data 4).

2.1.4 Reference amplicons selection or exclusion

For the normalization step, Cov'Cop 1 and 2 select a set of amplicons, which are the most stable ones among the patients of a run. These amplicons are used to normalize the values of the other amplicons. In Cov'Cop 2, the user can indicate specific amplicons to use for this normalization step (See supplementary data 5). Inversely, Cov'Cop 2 gives also the opportunity to exclude manually some amplicon data for the last ratio step of normalizations (See supplementary data 5).

2.2 CNV calling from cancer data

2.2.1 Control samples

In Cov'Cop 1, one patient was compared to all the other ones for CNVs calling and users did not have the possibility to choose any control samples as reference. Cov'Cop 2 allows it, if the user wishes to. In such a case, in the last ratio normalization step, for each amplicon, the median of controls samples is calculated. Then for each patient, the amplicon values are divided by the median calculated for the controls. Practically, Cov'Cop 2 can be run with only one control sample but more control samples will improve the result.

2.2.2 Cancer cell proportion

A cancer tissue sample may contain both healthy cells and cancer cells at the same time. This proportion may impact on the detection of CNVs. Simulated and real data demonstrate that Cov'Cop 2 is able to detect

cancer CNVs in samples containing as low as 19% of cancer cells (see supplementary data 7).

2.3 2D interactive visualization

Upgrade in visual presentation of the results is a strong new feature of Cov'Cop 2. We added an interactive 2D visualization for each patient (Figure 1). The amplicons are represented by dots on the top of their chromosomal positions on the x-axis, and the y-axis corresponds to their normalized values. Users can interactively zoom in on specific regions and navigate between data. Several information described below have also been added on the graph.

2.3.1 Local regression curve

To optimize visual CNVs detection, we introduced the possibility to display regression curves on the presented chart. We chose to implement the Loess local regression algorithm (Cleveland, 1979) to visualize easily a sudden change (See supplementary data 6.1).

2.3.2 CUSUM charts

For some data such as cancer or mosaic ones, a sample may contain at the same time "normal" and deleted/duplicated cells. The deletion/duplication detection efficiency depends then on the proportion of deleted/duplicated cells compared to normal cells and the normalized values can be close to 1. CNVs will be then very difficult to detect. Consequently to be able to observe a slight increase or decrease in values, we added the visual method named CUMulative SUMmary control chart (CUSUM) (Page, 1954). (see supplementary data 6.2).

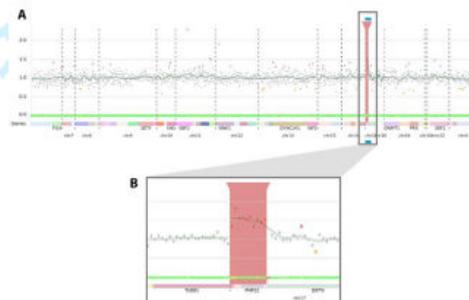


Figure 1: Visualization of Cov'Cop 2. A – General view. Each dot corresponds to an amplicon. The grey color indicates a "normal" value while a red or orange dot states a duplicated and deleted amplicon respectively. The red rectangle corresponds to the duplication of a region. B – Zoom on the duplicated region (PMP22).

3 Conclusion

Cov'Cop 2 offers a wide range of new features to interpret data from amplicon sequencing to detect CNVs. This tool works on data generated from Ion Designer (Life Technologies, CA, USA) but also from the Illumina DesignStudio (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). The user-friendly interface associated with our new 2D visualization facilitates data exploration and manipulation allowing to process complex analyses such as those from cancer data. Cov'Cop 2 also offers to export the results in VCF format (Danecek et al, 2011) or graphical output for



Article short title

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

publications. It can also now be used in command line mode to be integrated in various pipelines (see supplementary data 8).

Acknowledgements

This work has been supported by a grant from CHU de Limoges APREL 2013 and 2015, sponsored by ARS Limousin.

Conflict of Interest: none to declared.

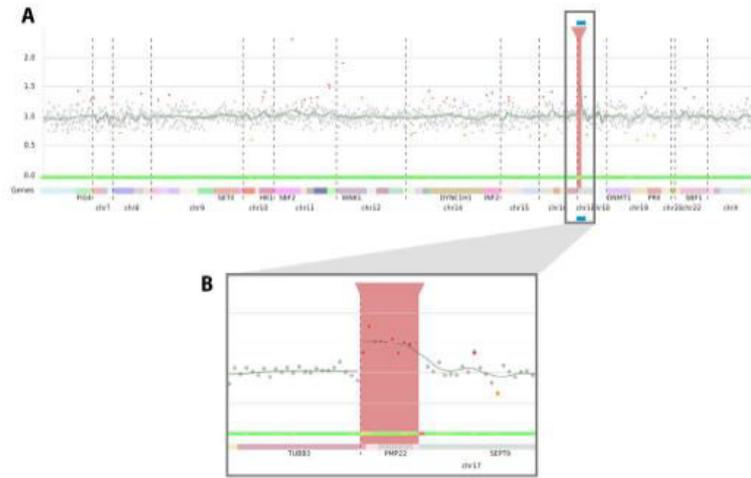
References

- Cleveland, W.S. (1979) Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. *Journal of the American Statistical Association*, 74(368), 829-36.
- Danecek, P. et al. (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-58.
- Derouault, P. et al. (2017) "COV-COP" Allows to Detect CNVs Responsible for Inherited Diseases among Amplicons Sequencing Data. *Bioinformatics*, 33(10), 1586-88.
- Page, E.S. (1954) Continuous Inspection Schemes. *Biometrika*, 41(1/2), 100-115.

For Peer Review



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



440x288mm (300 x 300 DPI)

Review



3- Discussion

Dans ce travail, nous avons activement contribué à l'amélioration du logiciel Cov'Cop pour la détection des CNV en génétique somatique des tumeurs. Par rapport aux maladies héréditaires, et à l'exception des cas de mosaïque, la génétique somatique des tumeurs est directement impactée par le degré d'infiltration de l'échantillon biologique par les cellules cancéreuses. De plus, au sein même d'une tumeur, certaines anomalies moléculaires, dont les CNV, peuvent être sous-clonales. Ainsi, la question de la sensibilité de la méthode est capitale même si la pureté de l'échantillon tumoral est élevée.

Les seuils arbitraires du ratio normalisé appliqués pour la détection automatique d'une anomalie (c'est-à-dire ratio $< 0,8$ ou $> 1,2$) étaient déjà modifiables dans la première version publiée du logiciel. Dans cette version 2, des options basées sur des tests statistiques (et donc sans *a priori*) ont été intégrées pour faciliter et standardiser la détection de ces anomalies et leur interprétation.

Une première amélioration a consisté en l'intégration d'une visualisation graphique des résultats. En effet, dans la première version publiée, le logiciel générait à partir des couvertures obtenues, un ratio normalisé par amplicon. Selon le seuil de détection appliqué, les amplicons sortant des bornes ($< 0,8$ ou $> 1,2$) étaient mis en évidence par surlignage en orange pour une délétion ou rouge pour une amplification (Figure 73 A). Il fallait donc faire défiler les résultats de tous les amplicons (ce qui, dans le cas de notre premier panel, correspond à une table de plus de 1200 lignes et autant de colonnes que d'échantillons) afin de visualiser les anomalies. Dans cette nouvelle version, un graphique est construit automatiquement pour chaque échantillon, représentant en ordonnée le ratio normalisé, et en abscisse les amplicons rangés par chromosome, séparés par des traits pointillés verticaux (Figure 73 B). Les gènes sont mis en évidence par un système de couleur. Il est également possible de sélectionner sur le graphique une zone d'intérêt (gène ou amplicon), permettant de voir directement le ratio normalisé en rapport. Le rendu de résultat consiste alors en un examen visuel rapide de la sortie graphique.



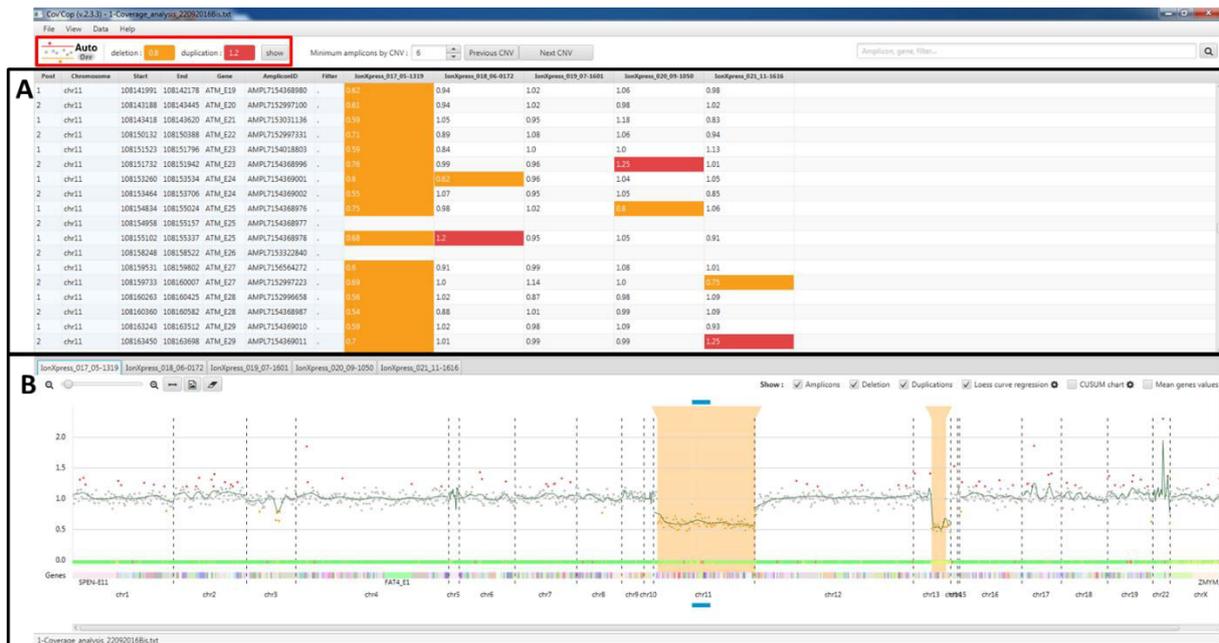


Figure 73 : Capture d'écran du logiciel CovCop2 montrant un exemple d'analyse d'une puce comportant 5 patients

Le rectangle rouge encadre les seuils arbitraires de détection choisis par l'utilisateur (ici $< 0,8$ ou $> 1,2$).

A- Tableau indiquant par amplicon (lignes) et par patient (colonne) les ratios normalisés obtenus par l'analyse du logiciel. Les ratios sortant des bornes sont mis en évidence par surlignage en orange pour une délétion ou rouge pour une amplification

B- Représentation graphique produite par le logiciel CovCop représentant en abscisse les différents amplicons rangés par chromosomes, séparés par des traits pointillés verticaux, et en abscisse les ratios normalisés. Chaque point représente le ratio normalisé d'un amplicon. Le code couleur des points est le même que celui de la table numérique présentée en A.

La visualisation graphique intègre également un score correspondant à la stabilité de chaque amplicon entre les différents échantillons. Ce score représente le pourcentage d'échantillons détectés comme anormaux dans la même analyse. Ceci permet la visualisation de régions mal amplifiées pouvant entraîner de faux positifs. Ce score est représenté sous le graphique par un système de couleurs (vert pour un bon score, et rouge pour un mauvais score) (Figure 74).



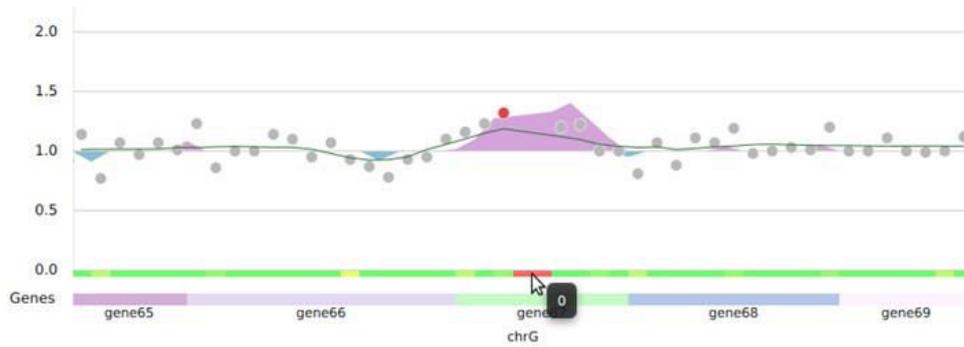


Figure 74 : Visualisation graphique du logiciel Cov'Cop2. Exemple de détection d'amplicons mal amplifiés.

Un système de couleur en bas du graphique permet de visualiser la stabilité des amplicons entre les différents patients de l'analyse (vert pour une bonne stabilité et rouge pour une mauvaise stabilité). Ici, deux amplicons sont éliminés du graphique en raison d'un score à 0, et indiqués en rouge sous le graphique.

Afin de faciliter la visualisation de certains CNV n'affectant qu'une faible proportion de cellules, une courbe de régression Loess a également été intégrée (Figure 75).

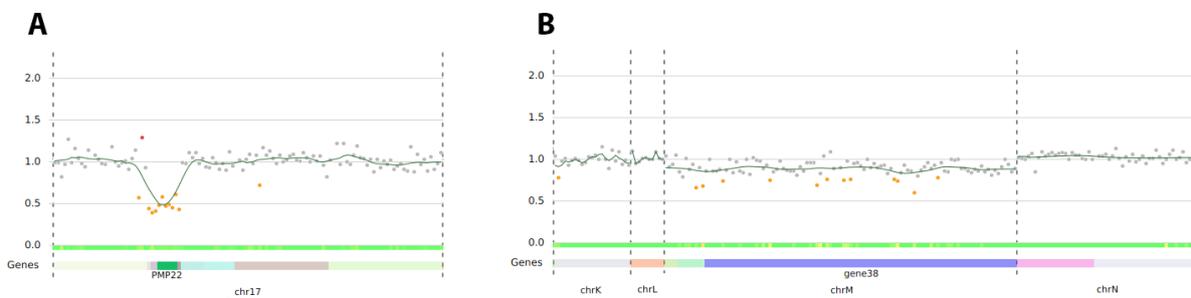


Figure 75 : Exemple de visualisation graphique fournie par le logiciel Cov'Cop2 avec intégration d'une courbe Loess en vert.

A- Exemple de visualisation de la déletion du gène *PMP22* : un pic inverse apparaît sur la courbe.
 B- Exemple de déletion d'un chromosome entier dans une faible proportion de cellules (échantillon issu d'une LLC). La courbe Loess est sous la valeur de 1 pour toute la région concernée et facilite la visualisation de cette déletion.



De plus, il est possible d'appliquer l'option « CUSUM (pour Cumulative Summary control) charts » pour faciliter la visualisation de CNV sous-clonaux. Il s'agit d'un algorithme qui calcule pour chaque chromosome la somme cumulative des déviations par rapport à la moyenne pour chaque patient. Les anomalies alors détectées sont surlignées en bleu pour une délétion et en violet pour une duplication (Figure 76).

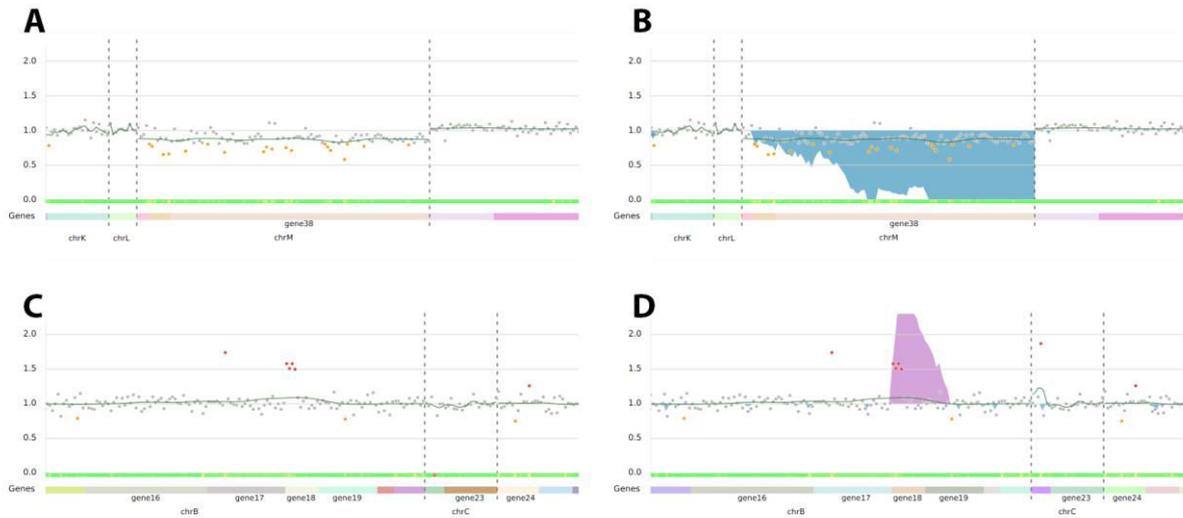


Figure 76 : Visualisation des graphiques obtenus avec le logiciel Cov'Cop2 en appliquant l'option « CUSUM chart ».

A- Délétion du chromosome M, avec un ratio proche de 1, non mise en évidence par le logiciel par visualisation standard.

B- L'option "CUSUM chart" permet d'indiquer la délétion du chromosome M en bleu.

C- Duplication d'un faible nombre d'amplicons dans le gène 18, non mise en évidence par le logiciel par visualisation standard.

D- L'option "CUSUM chart" permet de repérer la duplication du gène 18 en violet.

Une dernière option graphique permet de mettre en évidence la valeur moyenne des ratios normalisés pour chaque gène. Celle-ci est alors représentée par une ligne bleue et peut aider à l'interprétation des CNV (Figure 77).



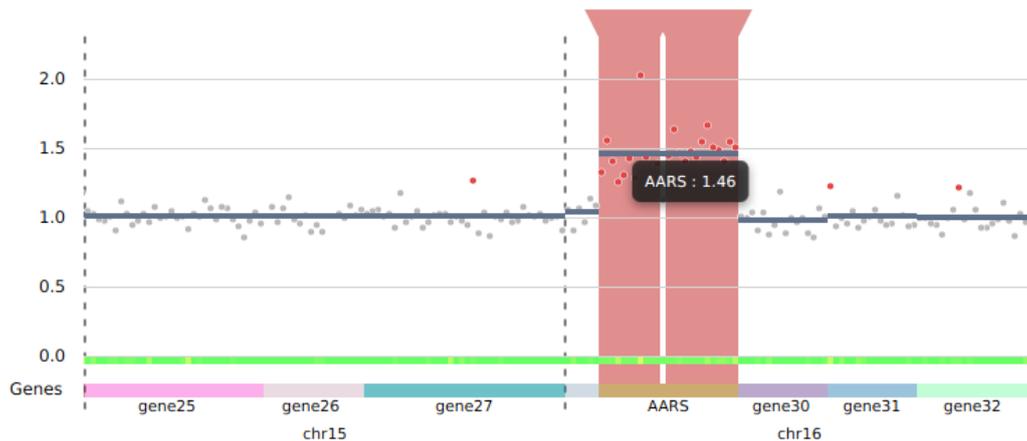


Figure 77 : Représentation graphique avec le logiciel Cov'Cop2 d'une duplication du gène AARS avec l'option de visualisation de la valeur moyenne des ratios normalisés par gène. Dans ce cas, la valeur moyenne pour le gène AARS est de 1,46.

Par ailleurs, la méthode de détection des CNV a été revue dans cette version de Cov'Cop. Initialement, le seuil de détection d'une anomalie était déterminé par l'utilisateur (*cf.* seuils arbitraires). Cependant, selon les amplicons, l'application d'un seuil fixe n'est pas optimale. Un z-score est maintenant calculé pour chaque amplicon ($z\text{-score} = (\text{Nombre de séquences lues normalisé} - \text{moyenne}) / \text{écart type}$). Celui-ci suit une loi normale. Le seuil de significativité a été fixé à une $p\text{-value}=0,01$. Toute valeur sortant de l'intervalle de référence est considérée comme anormale. Il reste toutefois possible d'appliquer un seuil donné arbitraire comme dans la version initiale de Cov'Cop. En effet, cette méthode augmente la sensibilité et diminue la spécificité de la détection d'une anomalie.

D'autre part, certaines anomalies peuvent être fréquentes dans une même puce et entraîner un biais dans le calcul du ratio normalisé. En effet, dans le cas de notre panel permettant le passage simultané de 7 à 8 échantillons par puces, il est arrivé que la moitié des patients soient porteurs d'une $del(13q)$. Dans ce cas, le logiciel rendait parfois une duplication de cette région chez les patients non porteurs de l'anomalie et la sensibilité de détection de la délétion était diminuée (Figure 78). Pour améliorer cela, une nouvelle étape de normalisation a été ajoutée (double normalisation). Celle-ci exclut du calcul les amplicons détectés comme anormaux à l'issue de la première étape de normalisation.



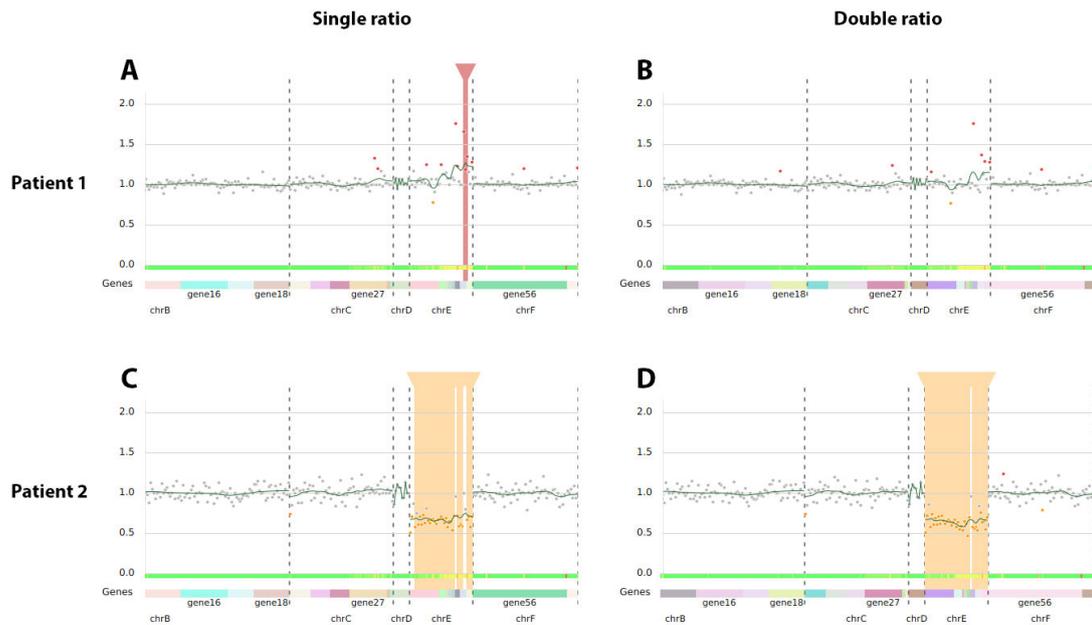


Figure 78 : Visualisation des graphiques obtenus avec Cov'Cop avec en abscisse les régions chromosomiques et en ordonnée les ratios normalisés obtenus.

Cas d'une puce pour laquelle la moitié des patients sont porteurs de la même anomalie (délétion du bras long du chromosome 13, noté E sur la figure). Les régions en jaunes sont détectées comme délétées par le logiciel.

A- Graphique obtenu sans la normalisation en deux étapes pour le patient 1. Le logiciel met en évidence une fausse duplication au niveau du chromosome 13.

B- L'application du ratio en deux étapes améliore la stabilité de la région observée avec l'absence de détection d'anomalie au niveau du chromosome 13 pour le patient 1.

C- Graphique obtenu sans la normalisation en 2 étapes chez le patient 2 : 6 amplicons (sur 39) ne sont pas détectés comme délétés au niveau du chromosome 13. Le logiciel interprète la région comme porteuse de 3 CNV.

D- L'application du ratio en deux étapes permet d'améliorer la détection des amplicons délétés (seuls 3 amplicons sont considérés comme normaux), et un seul amplicon considéré comme normal coupe la région d'intérêt.

De plus, dans certains cas, le ratio normalisé d'un amplicon isolé au sein d'une région délétée peut être non significatif, donnant comme résultat brut issu du logiciel deux délétions chromosomiques proches. Une option permet maintenant de fusionner ces régions si les amplicons non considérés comme délétés ont un z-score significatif au seuil de 0,05 (contre 0,01 initialement) (Figure 79).



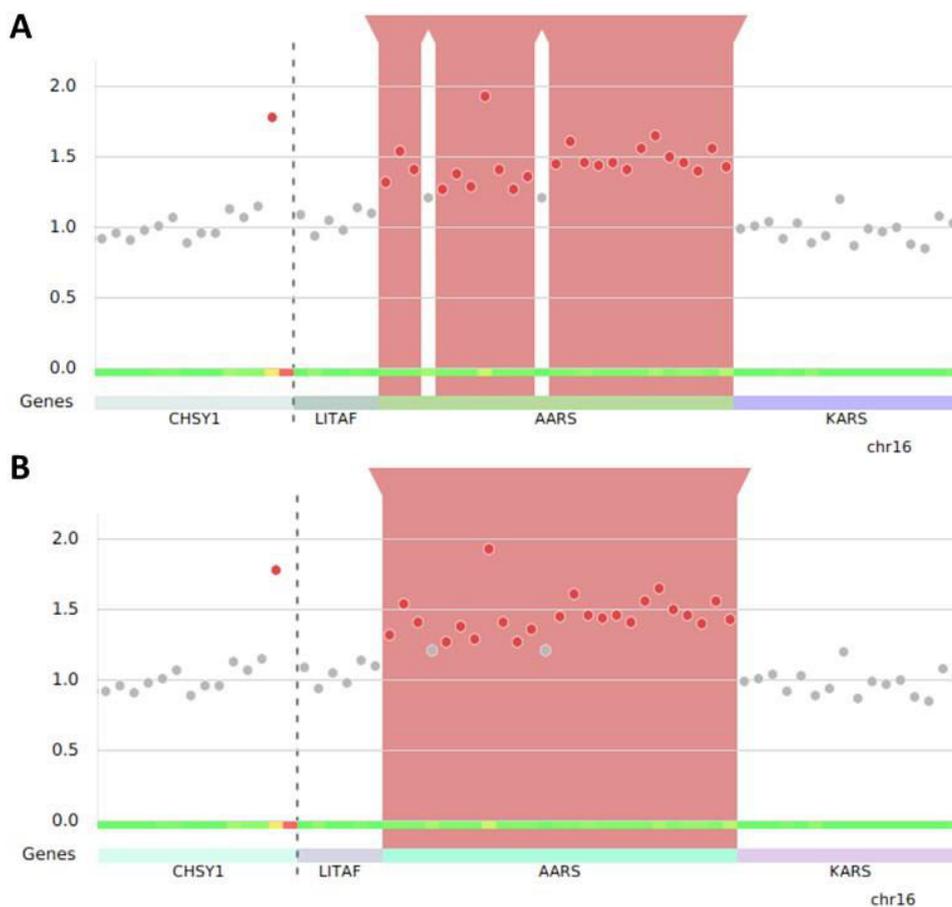


Figure 79 : Visualisation graphique à partir du logiciel Cov'Cop2 de la duplication du gène AARS.
A- Représentation graphique sans l'option permettant de fusionner les amplicons ayant un z-score significatif avec un p compris entre 0,01 et 0,05. Le logiciel détecte trois CNV différents.
B- Représentation graphique avec l'option permettant de fusionner les amplicons ayant un z-score significatif avec un p compris entre 0,01 et 0,05. La duplication détectée inclut le gène AARS en entier. Les amplicons fusionnés par cette méthode sont distinguables par coloration en gris.

Par ailleurs, l'utilisateur peut maintenant sélectionner manuellement des amplicons de référence pour l'analyse, ou à l'inverse exclure certains amplicons.

En application à la problématique des pathologies somatiques, il est possible au moment de lancer l'analyse de déterminer le contexte somatique versus germlinal de détection des CNV. Dans un contexte somatique, la détermination d'un ou plusieurs échantillons contrôles sains, servant alors de référence, est une option intégrée au lancement de l'analyse. L'application d'un seul contrôle sain par puce est possible. L'exemple d'une puce comportant 8 patients dont 5 présentent une del(13q) est présenté en Figure 80 : l'assignation d'un contrôle sain permet de stabiliser la région 13q en évitant la détection de fausse duplication chez les sujets normaux, et en augmentant la sensibilité de détection de cette anomalie.



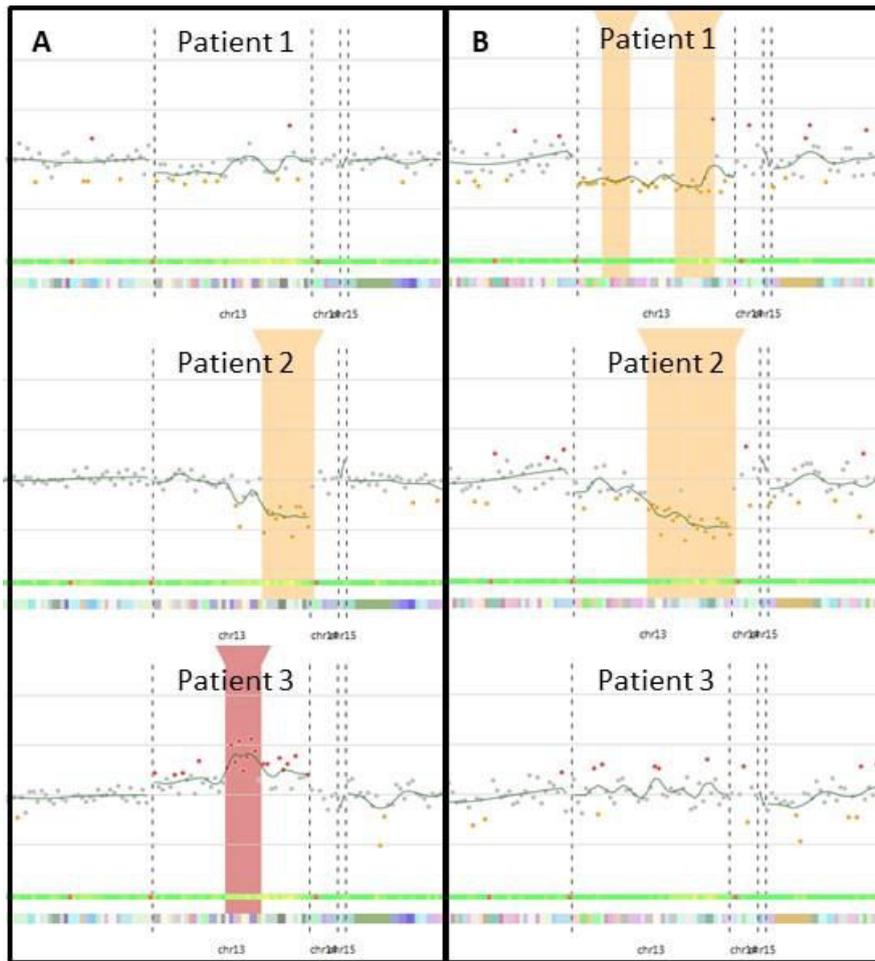


Figure 80 : Visualisation graphique à partir du logiciel Cov'Cop2 du chromosome 13 chez 3 patients. Cas d'une puce comprenant 8 patients dont 5 sont porteurs d'une del(13q).

A- Avant assignation d'un contrôle sain, la del(13q) n'est pas identifiée chez le patient 1, elle est détectée chez le patient 2. Une fausse duplication est visualisée chez le patient 3 ne présentant pas d'anomalie au niveau du locus 13q.

B- Après assignation d'un contrôle sain, la del(13q) est détectée le patient 1. Le locus est stabilisé avec l'absence de fausse duplication identifiée chez le patient 3. La del(13q) du patient 2 est mieux visible avec plus d'amplicons significativement touchés.

Enfin, nous avons tenté de déterminer un seuil d'infiltration minimum par des cellules porteuses d'un CNV. Pour cela, une matrice de simulation a été générée pour la détection d'une délétion complète d'un gène couvert par 80 amplicons (sur un panel de 2394). Celle-ci a été construite à partir des données de couverture obtenues avec une puce contenant 16 patients. Le nombre de lectures en cas de délétion a été calculé de la façon suivante :

$$SRC_i = RRC_i \times (1 - \text{Proportion de cellules cancéreuses}) + \frac{RRC_i}{2} \times \text{Proportion de cellules cancéreuses}$$



avec SRC_i, la valeur simulée de l'amplicon *i*, RRC_i le nombre de lectures de l'amplicon *i* et la proportion de cellules cancéreuses correspondant à la quantité relative de cellules porteuses de l'anomalie (valeur comprise entre 0 et 1, simulé par étapes de 0,1). Ce CNV était alors détectable grâce à l'option « CUSUM charts » pour une infiltration tumorale fixée à 15 % des cellules cancéreuses et apparaît clairement lorsque l'infiltration atteint 20 % (Figure 81). L'utilisation isolée du z-score ne permet la détection de la délétion que lorsque 40 % des cellules sont porteuses de l'anomalie. Enfin, la délétion quasi-complète du gène (concernant 67 amplicons sur 80) détectée par le z-score n'est visible qu'à 60 %.

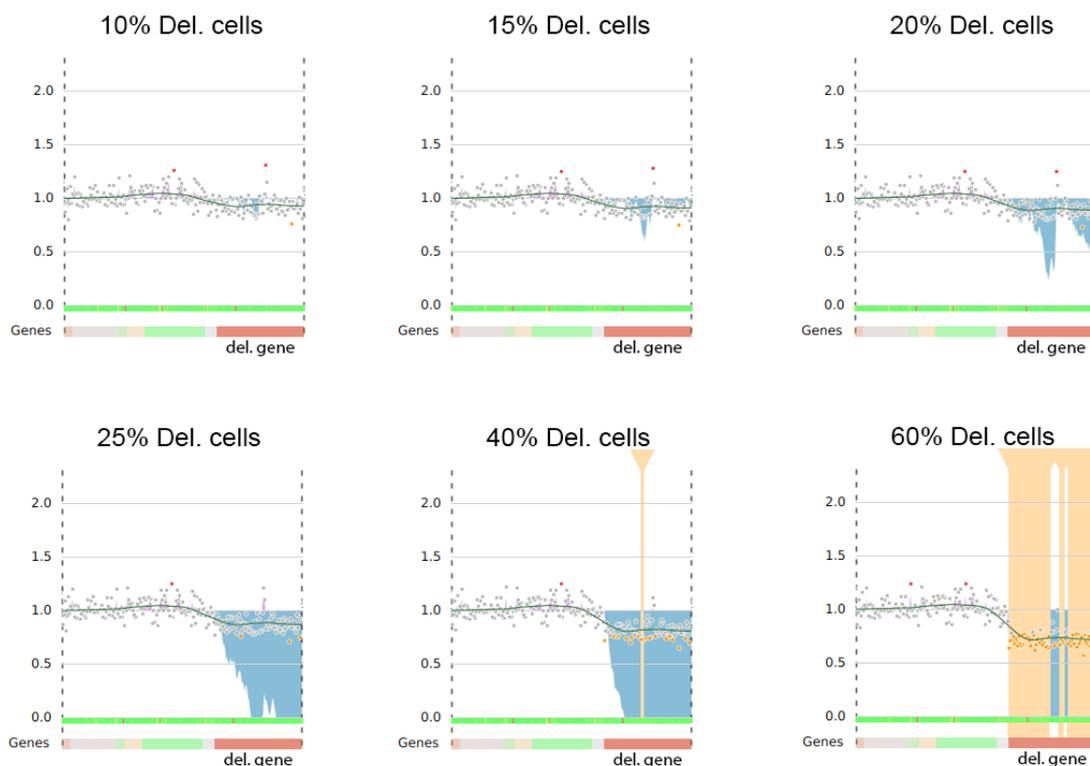


Figure 81 : Visualisation graphique avec le logiciel Cov'Cop2 de la simulation de la délétion d'un gène (visualisé par un trait rouge-orangé sous les graphiques), avec différentes proportions de cellules contenant la délétion.

L'option « CUSUM charts » (surlignage en bleu de la courbe) apparaît dès 15 à 20 % de cellules contenant l'anomalie. La détection grâce au z-score apparaît à partir d'une infiltration à 40 % de cellules cancéreuses.

Ces données ont été confirmées expérimentalement à partir de nos résultats obtenus sur notre série de cas de LLC. Nous avons choisi d'illustrer la sensibilité de la méthode en comparant les profils de 5 patients présentant un clone avec délétion 11q (correspondant à



une délétion d'*ATM*). La proportion du clone avait été précédemment évaluée par caryotype et/ou FISH. La délétion n'est pas détectée lorsque l'anomalie n'est présente que dans 17,5 % des cellules. L'option CUSUM charts permet la détection pour une proportion de 19,5 % (Figure 82).

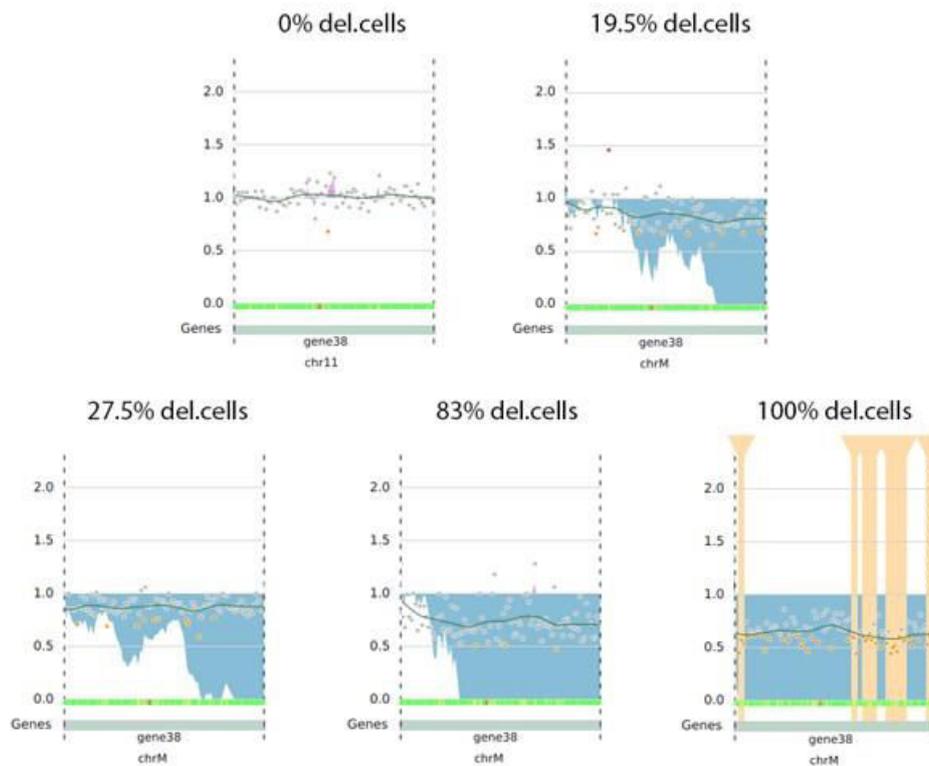


Figure 82 : Visualisation graphique avec le logiciel Cov'Cop2 de la délétion du gène 38 (soit *ATM*) chez différents patients présentant une infiltration clonale variant entre 0 et 100 % (estimation par caryotype et/ou FISH).

L'option « CUSUM charts » permet la détection de l'anomalie pour une proportion de cellules cancéreuses estimée à 19,5 % dans cet exemple.

Dans cet exemple, le seuil de sensibilité de la technique a donc été démontré à 19,5 % pour cette cible. La méthode a été évaluée à plus large échelle sur la série de 82 patients de l'article 3 ainsi qu'au cours de l'étude prospective en routine diagnostique sur les 12 derniers mois, soit environ 64 autres patients. Les résultats montrent que le seuil d'infiltration minimum détectable est dépendant de la qualité des bibliothèques, de l'efficacité d'amplification des amplicons (profondeur globale), du nombre d'amplicons ciblant la région d'intérêt et du nombre d'échantillons. Cette validation de l'approche Cov'Cop dans une série réelle de patients est, entre autre, discutée de façon plus approfondie dans l'article 3.



Au final, cette nouvelle version du logiciel fournit une visualisation rapide des résultats obtenus par patients. Des options d'aide à l'interprétation, en particulier pour les anomalies sous-clonales, ont été intégrées. Enfin, l'utilisation d'un contrôle sain dans la recherche d'anomalies dans un contexte somatique permet de corriger les biais induits par des anomalies fréquentes au sein d'une même puce. Ce logiciel est un outil performant pour la détection des CNV à partir de données de NGS basé sur des librairies par amplicons.

