

TruSight^{MD} tumeur 170

Un test complet de séquençage nouvelle génération qui cible les variants d'ADN et d'ARN provenant d'un même échantillon tumoral de tissus fixés au formol et imprégnés à la paraffine (FFPE).

Points forts

- **Couverture complète des variants liés au cancer**
Efficacité en un seul test qui utilise l'ADN et l'ARN pour l'évaluation de petits variants, d'amplifications, de variants d'épissage et de fusions
- **Flux de travail intégré et rationalisé**
Les bibliothèques d'ADN et d'ARN sont préparées en parallèle grâce à un flux de travail intégré après le cisaillement de l'ADN/la synthèse de l'ADNc
- **Résultats précis pour les échantillons de mauvaise qualité**
Détection de variants avec une entrée d'ADN ou d'ARN de 40 ng et une fréquence allélique mutante des échantillons FFPE de seulement 5 %

Introduction

Le cancer est l'une des principales causes de décès dans le monde et peut se former dans n'importe quel tissu¹. Il est important d'analyser la base génétique d'une tumeur donnée pour comprendre sa progression et mettre au point de nouvelles méthodes de traitement. Cependant, de nombreux gènes peuvent provoquer ou influencer la progression tumorale, et de nombreuses tumeurs hétérogènes sont porteuses de multiples mutations. De plus, la fonction de n'importe quel gène peut être modifiée par plusieurs types de variations, notamment des variants à simple nucléotide (SNV), des variants à nucléotidiques multiples (MNV), de petites insertions ou délétions (indels), des amplifications, des variations d'épissage et des fusions géniques.

Par conséquent, il est difficile pour les chercheurs d'analyser efficacement les tumeurs lorsque les méthodes disponibles ne couvrent qu'une partie de ces variations et que les tests séquentiels consomment des tissus, du temps et des ressources précieux.

Pour aider les chercheurs à relever ce défi, Illumina propose TruSight tumeur 170, un test de séquençage nouvelle génération (SNG) conçu pour couvrir 170 gènes associés à des tumeurs solides. TruSight tumeur 170 est un panel ciblé basé sur l'enrichissement, qui analyse simultanément l'ADN et l'ARN, couvrant ainsi un large éventail de gènes et de types de variant. Le panel est conçu pour fonctionner sur les systèmes de séquençage NextSeq^{MC} 500, NextSeq 550 ou HiSeq^{MC} 2500 (figure 1).

Contenu exhaustif en matière de cancer

Le test TruSight tumeur 170 cible tous les exons codants, selon la base de données RefSeq actuelle², au sein de 170 gènes (tableau 1). Les gènes ainsi que le type d'analyse de variants pour chaque gène ont été soigneusement sélectionnés pour inclure le contenu cité par des organisations professionnelles telles que le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) et l'European Society for Medical Oncology (ESMO)^{3,4}. Des publications de consortiums indépendants et des recherches pharmaceutiques au stade avancé ont également influencé la conception du test TruSight tumeur 170. Le contenu comprend 55 gènes pour des fusions et des variants d'épissage, 148 SNV et indels et 59 amplifications. En tirant parti de l'expertise d'autorités reconnues dans la communauté de l'oncologie, le test TruSight tumeur 170 offre aux chercheurs une couverture complète des variants les plus susceptibles de jouer un rôle dans la tumorigenèse.

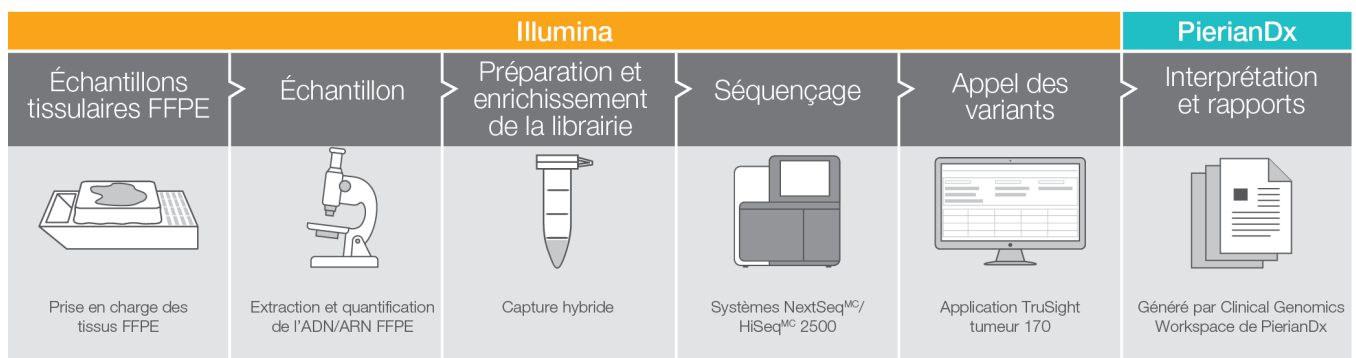


Figure 1 : Flux de travail TruSight tumeur 170 : Le test TruSight tumeur 170 est optimisé pour s'intégrer aux flux de travail de laboratoire actuels, passant des acides nucléiques extraits à l'appel de variants en moins de quatre jours. Le test peut être exécuté sur la gamme d'instruments NextSeq ou le système HiSeq 2500.

Tableau 1 : Contenu génétique du test TruSight tumeur 170

SNV et indels (provenant de l'ADN)									
AKT1	BRIP1	CREBBP	FANCI	FGFR2	JAK3	MSH3	PALB2	RAD51D	TSC1
AKT2	BTK	CSF1R	FANCL	FGFR3	KDR	MSH6	PDGFRA	RAD54L	TSC2
AKT3	CARD11	CTNNB1	FBXW7	FGFR4	KIT	MTOR	PDGFRB	RB1	VHL
ALK	CCND1	DDR2	FGF1	FLT1	KMT2A (MLL)	MUTYH	PIK3CA	RET	XRCC2
APC	CCND2	DNMT3A	FGF2	FLT3	KRAS	MYC	PIK3CB	RICTOR	
AR	CCNE1	EGFR	FGF3	FOXO2	MAP2K1	MYCL1	PIK3CD	ROS1	
ARID1A	CD79A	EP300	FGF4	GEN1	MAP2K2	MYCN	PIK3CG	RPS6KB1	
ATM	CD79B	ERBB2	FGF5	GNA11	MCL1	MYD88	PIK3R1	SLX4	
ATR	CDH1	ERBB3	FGF6	GNAQ	MDM2	NBN	PMS2	SMAD4	
BAP1	CDK12	ERBB4	FGF7	GNAS	MDM4	NF1	PPP2R2A	SMARCB1	
BARD1	CDK4	ERCC1	FGF8	HNF1A	MET	NOTCH1	PTCH1	SMO	
BCL2	CDK6	ERCC2	FGF9	HRAS	MLH1	NOTCH2	PTEN	SRC	
BCL6	CDKN2A	ERG	FGF10	IDH1	MLL2	NOTCH3	PTPN11	STK11	
BRAF	CEBPA	ESR1	FGF14	IDH2	MPL	NPM1	RAD51	TERT	
BRCA1	CHEK1	EZH2	FGF23	INPP4B	MRE11A	NRAS	RAD51B	TET2	
BRCA2	CHEK2	FAM175A	FGFR1	JAK2	MSH2	NRG1	RAD51C	TP53	
Amplifications (provenant de l'ADN)									
AKT2	BRCA2	CHEK1	ERCC2	FGF5	FGF14	FGFR4	MDM4	NRG1	RAF1
ALK	CCND1	CHEK2	ESR1	FGF6	FGF19	JAK2	MET	PDGFRA	RET
AR	CCND3	EGFR	FGF1	FGF7	FGF23	KIT	MYC	PDGFRB	RICTOR
ATM	CCNE1	ERBB2	FGF2	FGF8	FGFR1	KRAS	MYCL1	PIK3CA	RPS6KB1
BRAF	CDK4	ERBB3	FGF3	FGF9	FGFR2	LAMP1	MYCN	PIK3CB	TFRC
BRCA1	CDK6	ERCC1	FGF4	FGF10	FGFR3	MDM2	NRAS	PTEN	
Fusions et variants d'épissage (provenant de l'ARN)									
ABL1	BRAF	EML4	ETV4	FGFR4	KIF5B	MYC	NTRK2	PIK3CA	TMPRSS2
AKT3	BRCA1	ERBB2	ETV5	FLI1	KIT	NOTCH1	NTRK3	PPARG	
ALK	BRCA2	ERG	EWSR1	FLT1	KMT2A (MLL)	NOTCH2	PAX3	RAF1	
AR	CDK4	ESR1	FGFR1	FLT3	MET	NOTCH3	PAX7	RET	
AXL	CSF1R	ETS1	FGFR2	JAK2	MLL2	NRG1	PDGFRA	ROS1	
BCL2	EGFR	ETV1	FGFR3	KDR	MSH2	NTRK1	PDGFRB	RPS6KB1	

Flux de travail combiné pour l'ADN et l'ARN

La préparation de bibliothèque pour le test TruSight tumeur 170 utilise une méthode d'enrichissement pouvant être appliquée simultanément à l'ADN et à l'ARN extraits du même échantillon. Après les étapes initiales, dans lesquelles l'ADN génomique est cisailé et l'ARN est converti en ADNc, la préparation de bibliothèque devient un flux de travail combiné (figure 2).

- L'ADN cisailé et l'ADNc sont convertis en bibliothèques séquençables.
- Les régions d'intérêt sont hybridées à des sondes biotinylées, magnétiquement tirées vers le bas à l'aide de billes recouvertes de streptavidine, puis éluées pour enrichir le pool de bibliothèques.
- Les bibliothèques sont normalisées à l'aide d'un simple protocole à billes avant le regroupement et le séquençage.

Analyse de données du test TruSight tumeur 170

Les systèmes de séquençage d'Illumina offrent la possibilité de se connecter à BaseSpace^{MD} Sequence Hub, l'environnement informatique consacré à la génomique d'Illumina pour l'analyse et la gestion des données de séquençage. Les chercheurs peuvent stocker, analyser, archiver et partager en toute sécurité les données de séquençage. L'application TruSight tumeur 170 est conçue pour effectuer des appels de variants permettant des rapports en aval

dans un format facilement lisible. Des sorties de données brutes pour les petits variants, les amplifications, les fusions et les variants d'épissage sont fournies, ainsi que des sorties ciblées conviviales pour des résultats de variants d'ARN et de fusion de fiabilité élevée.

L'application TruSight tumeur 170 est offerte dans BaseSpace Sequence Hub. Pour les utilisateurs qui souhaitent obtenir une analyse secondaire réalisée localement, Illumina offre une image de l'application en technologie Docker. Communiquez avec votre représentant commercial ou votre représentant de l'assistance technique pour obtenir de plus amples renseignements.

Détection sensible et très fiable des variants

L'extrême sensibilité du séquençage approfondi effectué à l'aide du SNG permet de révéler la variation somatique au sein des sous-populations tumorales. La chimie de séquençage par synthèse (SBS) d'Illumina est la technologie SNG la plus largement adoptée, générant plus de 90 % des données mondiales de séquençage*. Lorsqu'il est associé au séquençage haute qualité sur les systèmes NextSeq et HiSeq, le test TruSight tumeur 170 offre une couverture uniforme des régions cibles et identifie les mutations somatiques à une fréquence allélique mutante de seulement 5 %, avec une couverture minimum supérieure ou égale à 250x (tableau 2).



Figure 2 : Flux de travail de préparation de bibliothèques combiné : Les échantillons d'ADN et d'ARN passent par le même flux de travail après l'étape de synthèse de l'ADNc (pour l'ARN) et de cisaillement (pour l'ADN).

Tableau 2 : Caractéristiques

Paramètre	Détails
Système	Système NextSeq ou HiSeq 2500
Taille du panel	533 kb d'ADN 358 kb d'ARN
Taille d'insert minimum	79 pb d'ADN 63 pb d'ARN
Exigence d'entrée d'ADN	40 ng au total
Exigence d'entrée d'ARN	40 ng au total
Temps de préparation des bibliothèques	32 heures
Durée de l'analyse de séquençage	24 heures (systèmes NextSeq) ou 27 heures (système HiSeq 2500)
Analyse de séquençage	2 × 101 cycles
Taille de la trousse	24 échantillons (ADN et ARN)
Débit d'échantillons	8 échantillons par analyse (systèmes NextSeq) ou 6 échantillons par analyse rapide (système HiSeq 2500)
Sensibilité	Fréquence allélique mutante de 5 % > 95 % de sensibilité et spécificité

Couverture élevée des cibles à partir d'échantillons de mauvaise qualité

Les acides nucléiques extraits de tissus FFPE peuvent échouer aux vérifications du contrôle de la qualité et offrir une faible couverture cible, ce qui se traduit par une faible sensibilité analytique. Le test TruSight tumeur 170 résout ce problème en générant des bibliothèques à partir de petits fragments d'acides nucléiques, de seulement 79 pb pour l'ADN et 63 pb pour l'ARN. Cela permet une couverture profonde des échantillons FFPE, même lorsque la qualité des acides nucléiques extraits est mauvaise (figure 3).

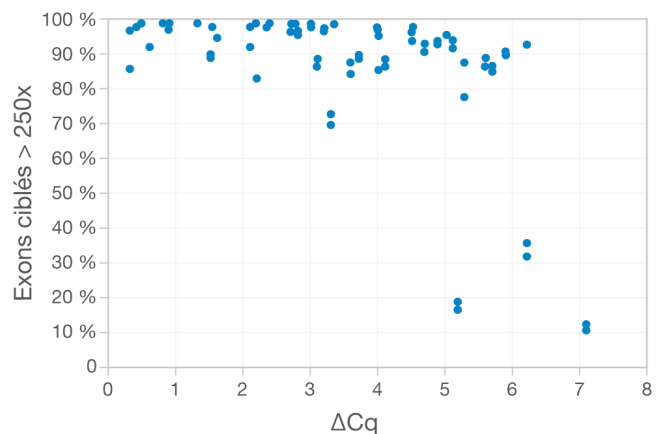


Figure 3 : Couverture cible pour les échantillons FFPE : De l'ADN provenant d'échantillons tumoraux FFPE de qualité variable a été extrait et évalué à l'aide du test TruSight tumeur 170, puis séquençé sur le système NextSeq 500. On a également évalué la qualité de chaque échantillon par qPCR pour mesurer le potentiel d'amplification de l'ADN. La valeur ΔCq indique le cycle seuil (Ct) de chaque échantillon d'ADN moins la valeur Ct d'une norme ADN.

* Calculs des données internes, Illumina, Inc., 2015.

Détection fiable de petits variants à partir d'échantillons de haute qualité et de mauvaise qualité

Le test TruSight tumeur 170 offre sensibilité et précision pour l'identification des variations de basse fréquence dans des échantillons de qualité variable. Une couverture de cible élevée permet un appel fiable des variants faibles dans des lignées cellulaires caractérisées (tableau 3). Le test TruSight tumeur 170 permet la détection de variants dans des échantillons tumoraux FFPE, avec une fréquence allélique mutante de seulement 5 % (tableau 4).

Tableau 3 : Appel de petits variants avec des lignées cellulaires caractérisées

Gène	Mutation	Fréquence signalée	Fréquence détectée	Couverture
APC	R2714C	0,33	0,31	2 547x
ARID1A	P1562fs	0,34	0,31	419x
BRAF	V600E	0,10	0,11	2 282x
BRCA2	A1689fs	0,33	0,30	1 097x
EGFR	G719S	0,24	0,22	2 207x
EP300	K291fs	0,08	0,06	1 359x
FBXW7	G667fs	0,34	0,30	2 870x
FGFR1	P150L	0,08	0,08	1 102x
FLT3	S985fs	0,10	0,10	1 925x
FLT3	V197A	0,12	0,10	1 908x
IDH1	S261L	0,10	0,09	2 052x
KIT	D816V	0,10	0,15	1 239x
KRAS	G13D	0,15	0,14	1 507x
KRAS	G12D	0,06	0,07	1 503x
MET	V237fs	0,06	0,06	3 700x
MLH1	L323M	0,08	0,09	1 725x
NF1	L626fs	0,08	0,10	1 270x
NOTCH1	P668S	0,32	0,32	1 637x
NRAS	Q61K	0,12	0,14	1 824x
PDGFRA	G426D	0,34	0,29	2 018x
PIK3CA	E545K	0,09	0,16	773x
PIK3CA	H1047R	0,18	0,15	1 694x

L'ADN issu de la lignée cellulaire fixée au formol HD200 (Horizon Diagnostics) contenant des variants connus a été évalué à l'aide du test TruSight tumeur 170 et séquençé sur le système NextSeq 500. Une concordance de 100 % a été observée avec la fréquence attendue de tous les variants HD200.

Tableau 5 : Appels d'amplification avec des échantillons tumoraux FFPE

Échantillon	Amplification rapportée	Niveau d'amplification rapporté	Amplification détectée	Niveau d'amplification détecté
FFPE_Bone	FGF19	1,4	FGF19	2,9
FFPE_Brain2	PDGFRA	2,3	PDGFRA	2,9
FFPE_Breast	RPS6KB1	2,4	RPS6KB1	2,4
FFPE_Colon	BRCA2	2,2	BRCA2	2,0
FFPE_Lung1	PIK3CA	2,4	PIK3CA	2,7
FFPE_Lung2	FGFR1	2,4	FGFR1	2,9
FFPE_Lung3	MYC	2,2	MYC	2,8
FFPE_Lung4	CCNE1	2,1	CCNE1	2,2
FFPE_Lung5	EGFR	2,2	EGFR	4,5
FFPE_Lung6	CCND1	2,3	CCND1	2,9
FFPE_Stomach1	CDK6	2,3	CDK6	1,7
FFPE_Stomach2	MET	1,5	MET	1,4

L'ADN a été extrait des échantillons tumoraux FFPE, puis évalué à l'aide du test TruSight tumeur 170 et séquençé sur le système NextSeq 500. Les 12 échantillons FFPE ont tous présenté 100 % de concordance de variants.

Tableau 4 : Détection de petits variants avec des échantillons tumoraux FFPE

Échantillon	Mutation rapportée	Mutation détectée	Fréquence détectée	Couverture
FFPE_Colon	TP53 R158C	TP53 R158C	0,057	1 545x
FFPE_Bone	TP53 P72R	TP53 P72R	0,059	515x
FFPE_Brain1	PIK3CA E545G	PIK3CA E545G	0,078	289x
FFPE_Brain2	PIK3CA H1047R	PIK3CA H1047R	0,076	531x
FFPE_Breast	KRAS G12D	KRAS G12D	0,049	1 671x
FFPE_Lung1	KRAS G12D	KRAS G12D	0,059	575x
FFPE_Lung2	TP53 C242F	TP53 C242F	0,080	691x
FFPE_Skin	TP53 R248Q	TP53 R248Q	0,050	1 240x

L'ADN a été extrait des échantillons tumoraux FFPE, puis évalué à l'aide du test TruSight tumeur 170 et séquençé sur le système NextSeq 500. Chacun des huit échantillons FFPE présentait une concordance de 100 % avec les mutations rapportées.

Appels fiables des amplifications, fusions et variants d'épissage à partir d'échantillons FFPE

Le test TruSight tumeur 170 allie la sensibilité des systèmes de séquençage d'Illumina à de nouvelles plateformes logicielles et permet ainsi l'appel simultané d'amplifications, de fusions et de variants d'épissage. L'application TruSight tumeur 170 comporte de nouveaux algorithmes d'appel de variants qui produisent des appels précis pour des variants d'épissage, des fusions et des amplifications de gènes à partir de données de séquençage brutes dans des échantillons de qualité variable (tableaux 5 et 6).

Tableau 6 : Fusion et appel de variants d'épissage avec tissu FFPE et lignées cellulaires

Échantillon	DV200	Variant rapporté	Variant détecté
FFPE_Brain Tissue	s.o.	EGFR VIII Variant d'épissage	EGFR VIII Variant d'épissage
FFPE_Breast Tissue	81	Fusions RPS6KB1-VMP1, RPS6KB1-DIAPH3, CCDC170-ESR1	Fusions RPS6KB1-VMP1, RPS6KB1-DIAPH3, CCDC170-ESR1
FFPE_Ewing's Tissue	48,9	Fusion EWSR1-FLI1	Fusion EWSR1-FLI1
FFPE_Gastric Cell Line	93	MET Exon 14 ignorant le variant d'épissage	MET Exon 14 ignorant le variant d'épissage
FFPE_Lung CellLine	93	Fusion CCDC6-RET	Fusion CCDC6-RET
FFPE_Lung Tissue1	73,3	Fusion EML4-ALK	Fusion EML4-ALK
FFPE_Lung Tissue2	95	Fusions FGFR3-TACC3	Fusions FGFR3-TACC3
FFPE_Prostate Cell Line	95,5	Variant d'épissage ARv7	Variant d'épissage ARv7
FFPE_Prostate Tissue	28,7	Fusions TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-GNPT	Fusions TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-GNPT

L'ARN a été extrait des échantillons tumoraux FFPE, puis évalué à l'aide du test TruSight tumeur 170 et séquençé sur le système NextSeq 500. Les neuf échantillons FFPE ont tous présenté 100 % de concordance de variants. La valeur DV200 est utilisée pour évaluer la qualité de l'ARN utilisé pour préparer les bibliothèques de séquençage et représente le pourcentage de fragments d'ARN supérieur à 200 nucléotides.

Résumé

Le test TruSight tumeur 170 constitue une solution de flux de travail intégré pour la détection des variants somatiques communément présents dans les tumeurs solides. Les bibliothèques d'ADN et d'ARN sont préparées, séquençées et analysées simultanément pour une évaluation efficace de nombreux types de variants somatiques. Mis au point d'après des recommandations factuelles, avec la contribution des guides d'opinion de premier rang et de recherches pharmaceutiques en phase avancée, le panel offre aux laboratoires une vue complète sur les gènes pertinents du cancer et permet d'analyser avec précision les variants basse fréquence à partir d'ADN et d'ARN FFPE. En évaluant 170 gènes et plusieurs types différents de variants dans un seul test, TruSight tumeur 170 permet une recherche génétique complète des échantillons tumoraux, dans une solution rationalisée.

En savoir plus

Pour obtenir plus de renseignements sur le test TruSight tumeur 170, visitez le site www.illumina.com/TruSightTumor170.

Références

1. American Cancer Society. www.cancer.org. Consulté le 17 octobre 2017.
2. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, et al. [Reference sequence \(RefSeq\) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation](#). *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D733-45.
3. National Comprehensive Cancer Network. www.nccn.org. Consulté le 17 octobre 2017.
4. European Society for Medical Oncology. www.esmo.org. Consulté le 17 octobre 2017.

Renseignements relatifs à la commande

Trousses de préparation des bibliothèques	Nombre d'échantillons	N° de référence
Trousse TruSight tumeur 170	24	OP-101-1004
Trousse TruSight tumeur 170 et PierianDx	24	20032628
Trousse TruSight tumeur 170 et réactifs NextSeq v2.5	24	20028821
Trousse TruSight tumeur 170, réactifs NextSeq v2.5 et PierianDx	24	20032629

illumina, Inc. • 1 800 809 4566 (numéro sans frais aux États-Unis) • tél. +1 858 202 4566 • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

©2019 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html. Pub. n° 1170-2016-017-E-FRA QB5141

