

# Détectez les variants somatiques rares dans les échantillons de tumeur FFIP à l'aide d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

- Les identifiants moléculaires uniques pour la correction des erreurs permettent d'obtenir une meilleure précision pendant le séquençage
- Compatible avec les panels d'enrichissement fournis par l'utilisateur pour une conception expérimentale flexible
- Le flux de travail évolutif prend en charge l'ADN extrait des échantillons de biopsie liquide et de tissus FFIP

## Introduction

Les échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP) constituent une source importante de matériel disponible pour la caractérisation moléculaire des tumeurs. Malheureusement, le processus de fixation et d'inclusion en paraffine des échantillons de tissus peut provoquer la fragmentation, la réticulation ou des modifications chimiques des acides nucléiques<sup>1</sup>. Cela entraîne un acide nucléique de qualité faible ou variable pouvant rendre l'analyse génétique tumorale difficile, en particulier pour la détection de mutations rares. Par conséquent, des flux de travail de séquençage de nouvelle génération (SNG) fiables et sensibles sont nécessaires pour traiter le matériel d'entrée des échantillons FFIP pour l'analyse en aval.

L'association des résultats de l'analyse génomique de la biopsie tissulaire et des données complémentaires de biopsie liquide fournit des renseignements complets sur la biologie tumorale. Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment est une trousse polyvalente de préparation de bibliothèques qui peut être utilisée pour préparer des bibliothèques prêtes pour le séquençage à partir d'ADN acellulaire (ADNa) circulant ou d'ADN génomique (ADNg) extrait d'échantillons de tissus FFIP (figure 1). Le flux de travail comprend des identifiants moléculaires uniques (IMU) pour la correction des erreurs et la réduction des faux positifs, permettant une détection précise et sensible des mutations à basse fréquence dans les échantillons de tumeur FFIP. Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment est compatible avec les sondes ou panels d'enrichissement d'Illumina et de fournisseurs tiers pour permettre une conception expérimentale flexible. Cette note d'application démontre l'excellente performance d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment dans la génération de bibliothèques de SNG de haute qualité et l'identification de variants somatiques à basse fréquence à l'aide d'échantillons FFIP.

## Méthodes

### Échantillons

Les bibliothèques ont été préparées à partir d'une combinaison d'échantillons FFIP de tissus humains et de lignées cellulaires FFIP (tableau 1). Les lignées cellulaires FFIP testées provenaient d'Horizon Discovery (référence n° HD301 et HD653) et de SeraCare Life Sciences\* (FFPE TST Custom DNAv2). Les échantillons de tissus FFIP humains ont été fournis par Illumina Biological Specimen Inventory System. L'ADN FFIP a été extrait à l'aide de la trousse AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN, référence n° 80234), quantifié avec la trousse Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, référence n° Q32850) et qualifié à l'aide de la trousse TruSeq Custom Amplicon Dx-FFPE QC Kit (Illumina, référence n° 20006259).

### Fragmentation de l'ADN

Le cisaillement mécanique a été utilisé pour la fragmentation de l'ADN. L'ADN extrait d'échantillons FFIP a été dilué dans un tampon Tris-EDTA (TE) à 0,23 ng/μl pour une entrée de 10 ng, à 0,45 ng/μl pour une entrée de 20 ng ou à 0,90 ng/μl pour une entrée de 40 ng. Ensuite, 52 μl de chaque échantillon dilué ont été soniqués dans un puits d'une barrette de huit microTUBE (Covaris, référence n° 520053) à l'aide du Covaris LE220 Focused-ultrasonicator (tableau 2).

\* SeraCare Life Sciences fait désormais partie de LCG Diagnostics.

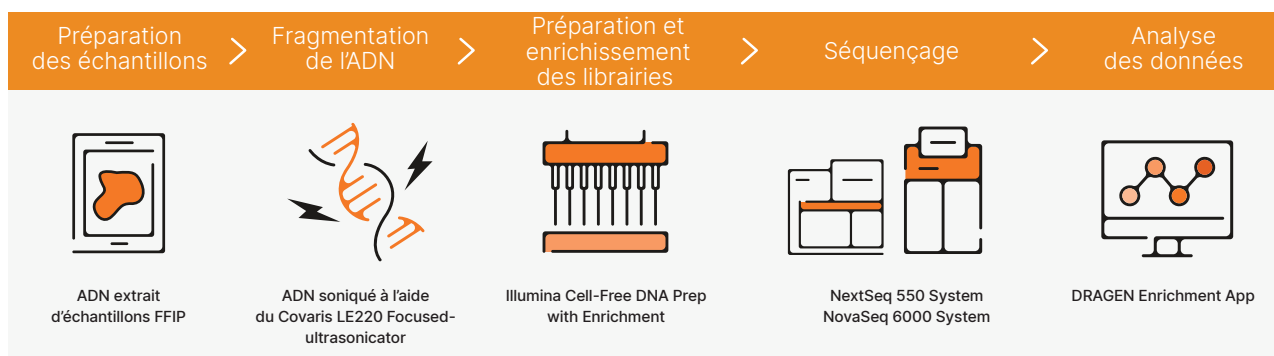


Figure 1 : Flux de travail Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment pour le traitement des échantillons FFIP.

Tableau 1 : Échantillons analysés à l'aide d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

Identifiant de l'échantillon	Type d'échantillon	Source de l'échantillon	Valeur $\Delta Cq$
8752	Tissu FFIP (humain)	Cancer du poumon non à petites cellules	5,7
315	Tissu FFIP (humain)	Cancer du poumon non à petites cellules	5,5
4075	Tissu FFIP (humain)	Cancer colorectal	4,2
679	Tissu FFIP (humain)	Cancer du sein	4,1
11883	Tissu FFIP (humain)	Cancer colorectal	2,9
3952	Tissu FFIP (humain)	Cancer du sein	2,2
448	Tissu FFIP (humain)	Cancer du poumon non à petites cellules	2,1
449	Tissu FFIP (humain)	Cancer du poumon non à petites cellules	1,5
FFPE TST Custom DNAv2	Lignée cellulaire FFIP	S. O.	0,87
HD653	Lignée cellulaire FFIP	S. O.	-1,23
HD301	Lignée cellulaire FFIP	S. O.	-1,87

Tableau 2 : Paramètres de cisaillement recommandés pour les sonicateurs à ultrasons Covaris

Paramètre	Covaris LE220	Covaris E220	Covaris ME220
Puissance de crête d'incident	450 W	175 W	50 W
Facteur d'utilisation	30 %	10 %	30 %
Cycles par rafale	200	200	1 000
Durée de traitement	250 s	280 s	10 s
Température	7 °C	7 °C	12 °C
Répétitions d'impulsions	S. O.	S. O.	20
Puissance moyenne	S. O.	S. O.	15 W
Autre	S. O.	Intensificateur	Guide d'ondes

Les données de cette étude ont été générées à l'aide du Covaris LE220 Focused-ultrasonicator.

## Préparation et enrichissement de bibliothèques

Après la sonication, les bibliothèques ont été préparées à partir d'ADN fragmenté conformément aux instructions détaillées dans le guide de l'utilisateur d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Des protocoles d'enrichissement spécifiques ont été utilisés en fonction du type de panel et du format d'enrichissement. Pour cette étude, deux panels d'enrichissement ont été utilisés : un panel personnalisé d'ADN simple brin (ADNsb) 80 pb de 2 000 kb et un panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel d'ADN double brin (ADNdb) 120 pb de 37,5 Mb. L'enrichissement a été effectué selon le flux de travail d'enrichissement à 1 ou 4 niveaux comme décrit dans le [guide de l'utilisateur d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#).

## Séquençage

Les bibliothèques enrichies à l'aide du panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel ont été séquencées<sup>†</sup> sur NovaSeq<sup>MC</sup> 6000 System à une longueur de lecture de 2 × 151 pb. Toutes les autres bibliothèques ont été séquencées sur NextSeq<sup>MC</sup> 550 System à une longueur de lecture de 2 × 149 pb.

<sup>†</sup> Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment est compatible avec tous les systèmes à débit moyen à élevé d'Illumina. Cependant, les performances des bibliothèques utilisant des échantillons FFIP n'ont été démontrées que sur les systèmes NovaSeq 6000 et NextSeq 550.

## Analyse des données

Pour l'analyse des données en nuage, les données de séquençage brutes (fichiers BCL) ont été démultiplexées et converties en fichiers FASTQ dans BaseSpace<sup>MC</sup> Sequence Hub. L'analyse secondaire en aval a été effectuée avec l'application DRAGEN<sup>MC</sup> Enrichment App v4.0.3, permettant l'utilisation de la fonction d'appel de petits variants somatiques avec les paramètres par défaut. Le génome sensible à la valeur du champ ALT hg19 de l'UCSC a été utilisé comme génome humain de référence. Les paramètres d'IMU ont été activés, l'appel des variants compatible avec les IMU étant défini sur « Faible profondeur ». Le nombre minimum de lectures de support pour les IMU a été défini sur 1. L'annotation des variants par Illumina Connected Annotation (auparavant connu sous le nom de Nirvana) pour l'étiquetage germlinal a été activée, avec des arguments de ligne de commande<sup>†</sup> DRAGEN supplémentaires. Les variants transmis ont été filtrés à l'aide du logiciel bcftools 1.17 et comparés aux variants réels à l'aide de l'outil rtg vcfeval 3.12.1.

## Résultats

Pour démontrer l'excellente performance d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment dans la génération de bibliothèques de séquençage de haute qualité à partir d'ADN FFIP, les indicateurs clés de performance ont été évalués pour l'ADN extrait de lignées cellulaires FFIP et d'échantillons de tumeur FFIP.

### Excellents indicateurs de performance de bibliothèque pour les échantillons FFIP

La couverture cible moyenne a été évaluée à deux profondeurs de séquençage, 10 millions et 20 millions d'amplifiats, pour s'assurer que les bibliothèques préparées avaient la profondeur de couverture nécessaire dans les régions ciblées pour permettre la détection des variants de faible abondance. Les résultats démontrent que l'ADN FFIP de haute qualité ( $\Delta Cq \leq 2$ ) génère des bibliothèques qui atteignent une profondeur de couverture cible moyenne  $> 100\times$ , même à des entrées aussi faibles que 10 ng d'ADN (figure 2). La couverture diminue en cas d'échantillons de mauvaise qualité (valeur  $\Delta Cq$  plus élevée), mais peut être améliorée avec un séquençage approfondi ou une entrée d'ADN plus importante (figure 2B). Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment Kit produit des bibliothèques avec une longueur de fragment  $> 110$  pb et fournit des données de séquençage de haute qualité, évaluées comme enrichissement des lectures et pourcentage de cibles avec une couverture  $\geq 50\times$  pour les échantillons FFIP avec une valeur  $\Delta Cq \leq 4$  (figure 2C).

<sup>†</sup> --umi-verbose-metrics true --umi-start-mask-length 1 --umi-end-mask-length 3 --germline-tagging-db-threshold 10 --tmb-enable-proxi-filter true --vc-enable-germline-tagging true

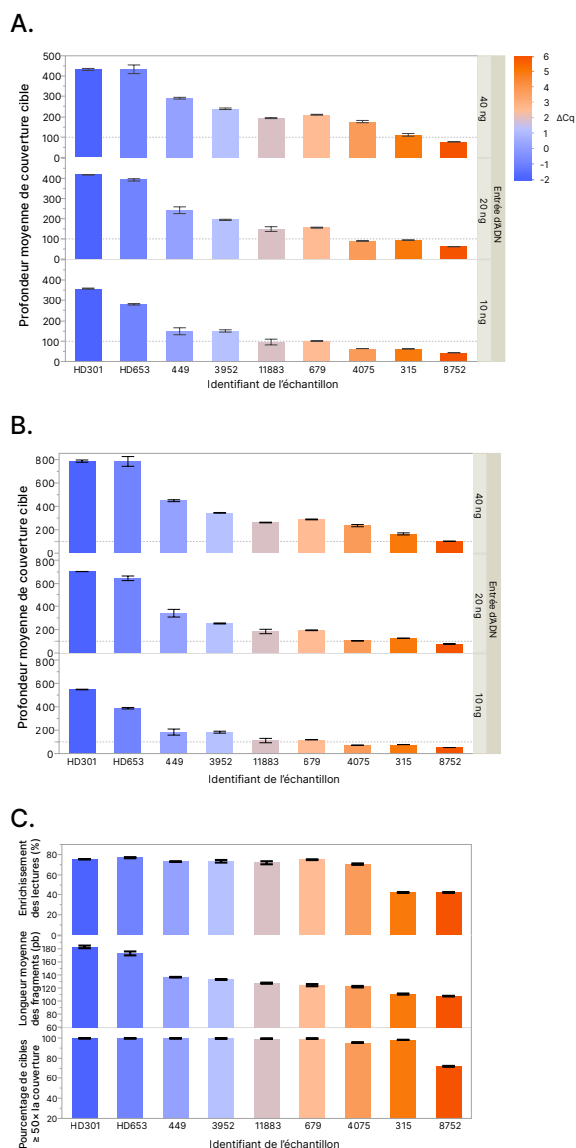


Figure 2 : Indicateurs de performance pour les bibliothèques préparées à partir d'échantillons FFIP à l'aide d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment : les bibliothèques ont été préparées en trois exemplaires à l'aide d'ADN extrait de lignées cellulaires FFIP (HD301 et HD653) et de tissus FFIP de tumeurs mammaires, coliques et pulmonaires de qualité et de quantités d'entrée variables (10 ng, 20 ng et 40 ng). Les échantillons sont représentés de gauche à droite par ordre décroissant de qualité, comme indiqué par la valeur  $\Delta Cq$ , la couleur bleue représentant des échantillons de la plus haute qualité et la couleur rouge représentant ceux de la plus faible qualité. Les bibliothèques ont été enrichies avec un panel d'ADNs 80 pb de 2 000 kb et séquençées sur NextSeq 550 System à  $2 \times 149$  pb. La couverture cible moyenne a été évaluée à deux profondeurs de lecture : (A) 10 millions et (B) 20 millions d'amplifiats. (C) Indicateurs de performance de bibliothèque supplémentaires pour les échantillons FFIP. Les données présentées correspondent à une entrée d'ADN de 20 ng et à 20 millions d'amplifiats.

## Détection sensible des variants à faible fréquence

La sensibilité de la trousse Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment Kit pour la détection des variants mononucléotidiques (SNV, Single Nucleotide Variant) et des mutations d'insertion et de suppression (indel) a été déterminée à l'aide d'une lignée cellulaire FFIP personnalisée renfermant des variants associés au cancer (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare). Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment a démontré une sensibilité analytique élevée, avec la capacité de détecter ~ 90 % des SNV à une fréquence allélique des variants (FAV) comprise entre 1 % et 2 % (figure 3, tableau 3). La sensibilité pour la détection des indels à une FAV supérieure à 2 % était > 80 % (figure 3, tableau 3).

## Compatibilité avec les formats d'enrichissement à 1 et 4 niveaux

Des indicateurs de performance comparables, notamment la profondeur moyenne de couverture cible, le pourcentage de cibles avec une couverture  $\geq 50\times$  et le pourcentage d'enrichissement des lectures ont été obtenus pour les formats d'enrichissement à 1 et 4 niveaux sur les échantillons dont la qualité varie de  $\Delta Cq$  1,5 à 4,2 (figure 4).

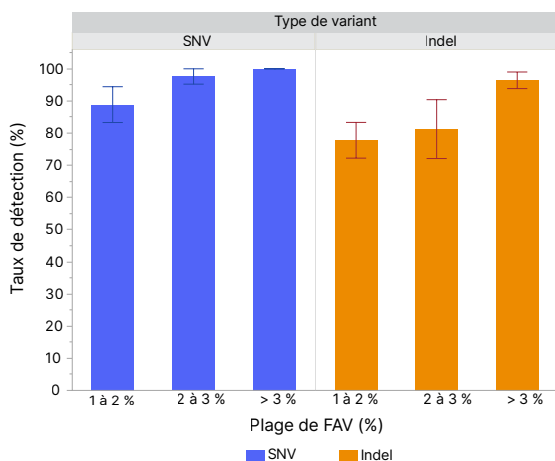


Figure 3 : Détection des variants à de faibles fréquences alléliques : les variants ont été dilués à au moins trois niveaux de fréquence allélique ciblés avec de l'ADN FFIP provenant d'un échantillon de lignée cellulaire de type sauvage (GM24385). Six réplicats de bibliothèques ont été préparés avec une entrée d'ADN de 10 ng par niveau de fréquence allélique et enrichis avec un panel d'ADNsb 80 pb de 2 000 kb selon le flux de travail d'enrichissement à 1 niveau. Les bibliothèques ont été séquencées à l'aide du NextSeq 550 System à  $2 \times 149$  pb. Les lectures de séquençage ont été sous-échantillonnées à 20 millions d'amplifiats. Le taux de détection (n/6) a été évalué pour chaque type de variant à différentes plages de FAV.

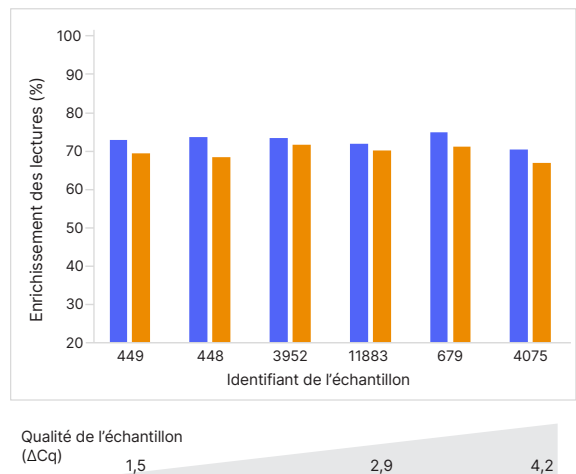
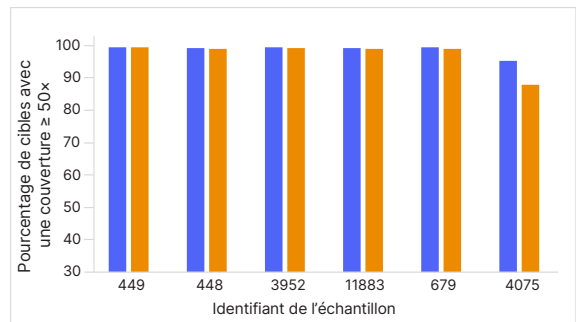
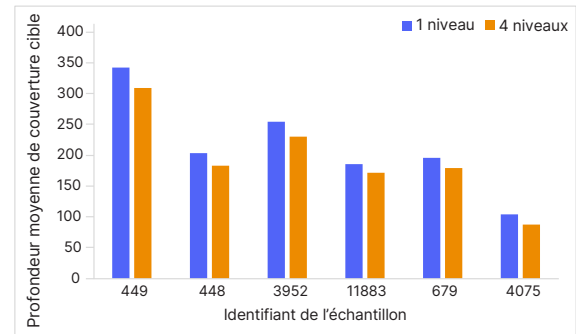


Figure 4 : Indicateurs de performance pour les formats d'enrichissement à 1 et 4 niveaux : les bibliothèques provenant d'échantillons de tissus d'ADN FFIP sélectionnés (entrée d'ADN de 20 ng) à valeurs  $\Delta Cq$  différentes ont été enrichies individuellement avec un panel d'ADNsb 80 pb de 2 000 kb (1 niveau, barres bleues). Ces mêmes bibliothèques ont été réenrichies avec le même panel pour le format d'enrichissement multiplex (4 niveaux, barres orange). Les bibliothèques ont été séquencées sur NextSeq 550 System à  $2 \times 149$  pb, et les lectures de séquençage ont été sous-échantillonnées à 20 millions d'amplifiats.

Tableau 3 : Résumé des variants somatiques individuels détectés à l'aide d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

Identifiant COSMIC	Gène	Type de variant	Changement d'acide aminé	FAV détectée (%) <sup>a</sup>	Nbre de répliquats détectés <sup>b</sup>
COSV51614178	<i>MLH1</i>	SNV	p.V384D	2,0	6
COSV57169334	<i>MYD88</i>	SNV	p.L273P	2,3	6
COSV58963463	<i>CSF3R</i>	SNV	p.T618I	2,6	6
COSV55545304	<i>KRAS</i>	SNV	p.K117N	2,9	6
COSV50630049	<i>CBL</i>	SNV	p.L380P	2,9	5
COSV61615239	<i>IDH1</i>	SNV	p.R132H	3,0	5
COSV52274101	<i>MSH6</i>	SNV	p.E1322*	3,5	6
COSV59205440	<i>SF3B1</i>	SNV	p.G742D	3,9	6
COSV56057713	<i>BRAF</i>	MNV	p.V600K	2,1	6
COSV64288359	<i>PTEN</i>	Suppression	p.C250Wfs*2	2,3	6
COSV56542602	<i>VHL</i>	Suppression	p.P99Qfs*60	2,5	6
COSV52740986	<i>TP53</i>	Suppression	p.K291Tfs*48	2,7	6
COSV55388067	<i>KIT</i>	Suppression	p.W557_E561del	3,2	5
COSV61376874	<i>ARID1A</i>	Suppression	p.A339Lfs*24	3,2	6
COSV62688630	<i>CTNNB1</i>	Suppression	p.S45del	4,7	6
COSV67575778	<i>JAK2</i>	Suppression	p.N542_E543del	5,3	5
COSV56060749	<i>BRAF</i>	Insertion	p.T599dup	1,9	6
COSV55386625	<i>KIT</i>	Insertion	p.A502_Y503dup	2,8	6
COSV64290304	<i>PTEN</i>	Insertion	E242Lfs*15	3,1	6
COSV51766549	<i>EGFR</i>	Insertion	p.A767_V769dup	3,5	6
COSV51772596	<i>EGFR</i>	Insertion	p.N771_H773dup	3,6	6
COSV57195669	<i>CEBPA</i>	Insertion	p.H24Afs*84	5,0	6

a. Moyenne des répliquats détectés.

b. Sur un total de 6 répliquats.

## Excellentes performances de librairie avec le panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel

La trousse Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment Kit associée au panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel a généré systématiquement des librairies de longueur > 150 pb à partir de lignées cellulaires FFIP (figure 5). Des indicateurs haute performance ont été obtenus pour toutes les librairies préparées avec une entrée  $\geq 20$  ng, notamment l'enrichissement des lectures, le pourcentage de lectures alignées et l'uniformité de la couverture. Les indicateurs de performance étaient comparables entre les librairies enrichies à 1 et 4 niveaux.

## Détection sensible des variants avec le panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel

L'effet de la profondeur de séquençage sur la couverture cible moyenne et la détection des variants a été évalué pour les librairies enrichies à l'aide du Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel. Les résultats démontrent qu'une couverture cible moyenne jusqu'à  $500\times$  a été obtenue lorsque huit librairies d'exomes ont été séquencées sur une ligne de Flow Cell S4 NovaSeq 6000 (figure 6). Lorsque les lectures de séquençage ont été sous-échantillonnées à 200 millions et 400 millions de lectures totales passant le filtre, les librairies ont atteint une couverture cible moyenne d'environ  $150\times$  et  $300\times$ , respectivement, indépendamment des quantités d'entrée et de la plexité d'enrichissement.

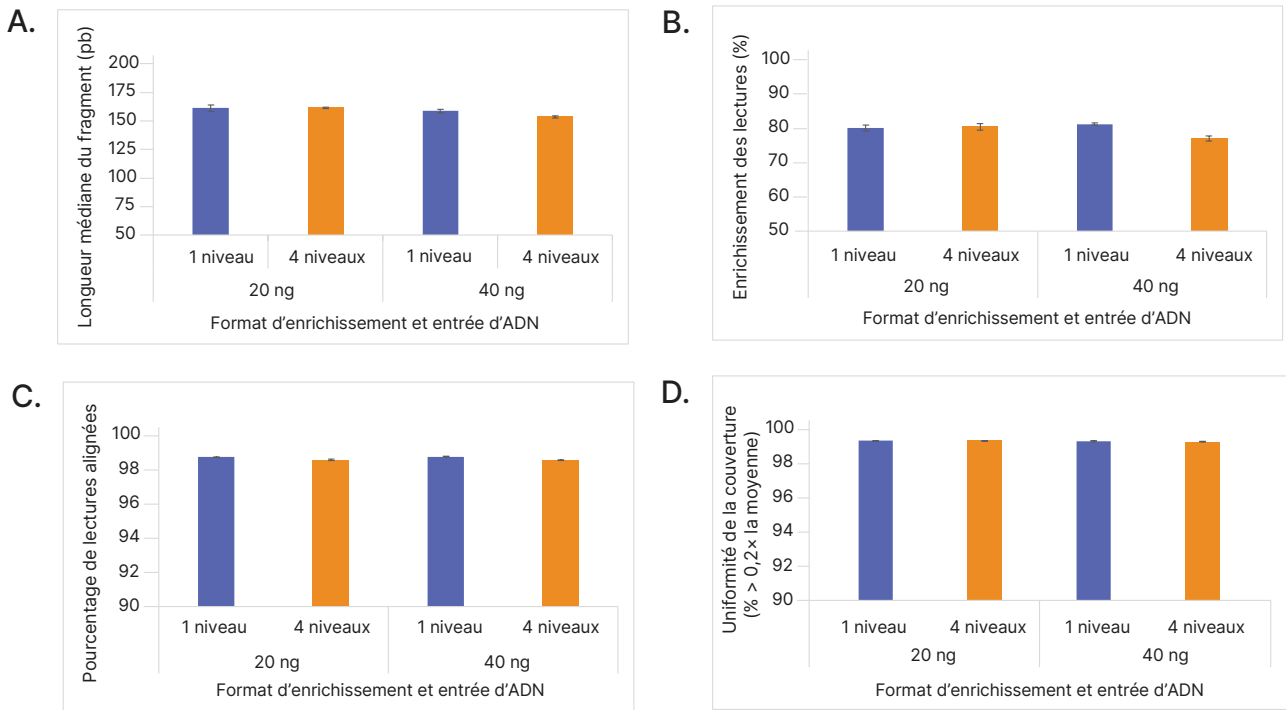


Figure 5 : Indicateurs de performance de librairie avec le panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel : quatre répliqués de librairies ont été préparés à l'aide d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment à partir d'une lignée cellulaire FFIP personnalisée renfermant des variants associés au cancer (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare). Les variants ont été dilués à une fréquence allélique ciblée d'environ 2 %, et les librairies ont été préparées avec 20 ng ou 40 ng d'entrée d'ADN. L'enrichissement a été effectué avec le panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel selon le flux de travail d'enrichissement à 1 ou 4 niveaux pour les sondes d'ADNs décrit dans le guide de l'utilisateur d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Huit librairies enrichies par le panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel ont été séquencées par ligne S4 sur NovaSeq 6000 System à  $2 \times 151$  pb. Les données de séquençage ont été sous-échantillonnées à 200 millions d'amplifiats (ou 400 millions de lectures totales passant le filtre) et les indicateurs de performance de librairie ont été comparés entre les deux entrées.

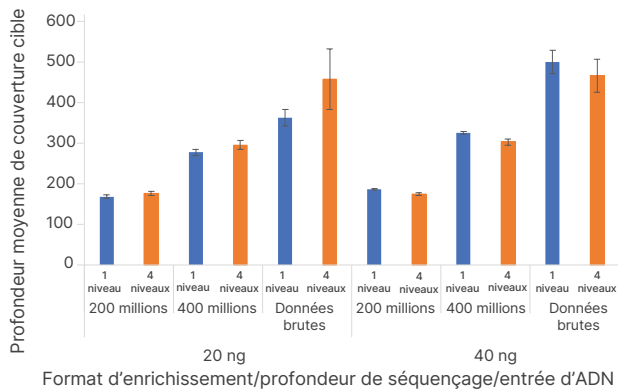
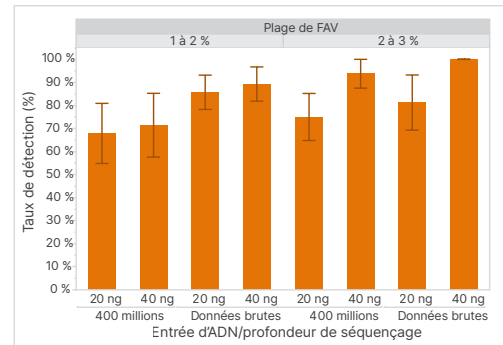


Figure 6 : Couverture cible moyenne obtenue avec le panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel : quatre répliqués de librairies ont été préparés à l'aide d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment à partir de 20 ng ou 40 ng d'ADN dérivé d'une lignée cellulaire FFIP personnalisée renfermant des variants associés au cancer (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare). Les variants ont été dilués à une fréquence allélique ciblée d'environ 2 %. L'enrichissement a été effectué avec le panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel selon le flux de travail d'enrichissement à 1 niveau (barres bleues) ou à 4 niveaux (barres orange) pour les sondes d'ADNdb. Huit librairies ont été séquencées par ligne S4 sur NovaSeq 6000 System à 2 × 151 pb. Les données de séquençage ont été sous-échantillonnées à 100 millions ou 200 millions d'amplifiats (200 millions ou 400 millions de lectures totales passant le filtre) et les indicateurs de performance de librairie ont été évalués. Les lectures brutes allaient de 296 millions à 417 millions d'amplifiats (592 millions à 834 millions de lectures totales passant le filtre) pour les amplifiats à 1 niveau ou de 319 millions à 544 millions (638 millions à 1,08 milliard de lectures totales passant le filtre) pour les librairies enrichies à 4 niveaux.

Les librairies multiplexées (4 niveaux) préparées à l'aide du panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel ont obtenu une sensibilité de 80 % pour les SNV à une FAV comprise entre 2 % et 3 % lorsque les lectures pour les librairies de 20 ng étaient sous-échantillonnées à 200 millions d'amplifiats. Le taux de détection des SNV s'est amélioré avec une entrée de 40 ng ou avec un séquençage approfondi, en particulier pour les variants à FAV comprise entre 1 et 2 % (figure 7A). Les librairies multiplexées préparées à l'aide du panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel ont obtenu une sensibilité se situant entre 80 et 90 % pour les indels à FAV comprise entre 2 et 3 %, en fonction de la quantité d'entrée et de la profondeur de séquençage. Au-dessus de 3 % de FAV, 100 % des indels ont été détectés à des quantités d'entrée de 20 ng et 40 ng (figure 7B).

## A. Détection des SNV



## B. Détection des indels

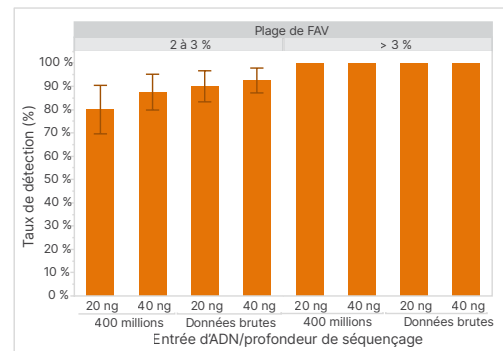


Figure 7 : Détection des variants somatiques à l'aide du panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel : quatre répliqués de librairies ont été préparés à l'aide d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment à partir de 20 ng ou 40 ng d'ADN dérivé d'une lignée cellulaire FFIP personnalisée renfermant des variants associés au cancer (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare). Les variants ont été dilués à une fréquence allélique ciblée d'environ 2 %. L'enrichissement a été effectué avec le panel Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel selon le flux de travail d'enrichissement à 4 niveaux pour les sondes d'ADNdb. Huit librairies ont été séquencées par ligne S4 sur NovaSeq 6000 System à 2 × 151 pb. Les données de séquençage ont été sous-échantillonnées à 200 millions d'amplifiats (400 millions de lectures totales passant le filtre) et les indicateurs de performance de librairie ont été évalués. Les lectures brutes allaient de 319 millions à 544 millions d'amplifiats (638 millions à 1,08 milliard de lectures totales passant le filtre) pour les librairies enrichies.



## Résumé

La préparation de bibliothèques de haute qualité à partir d'ADN FFIP est un facteur clé de la performance de la caractérisation moléculaire tumorale basée sur le SNG. Cette note d'application démontre l'excellente performance d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment dans la préparation de bibliothèques prêtes pour le séquençage à partir d'ADN extrait d'échantillons FFIP, produisant des données précises pour l'appel des variants somatiques et l'analyse en aval. Cette trousse polyvalente de préparation de bibliothèques est compatible avec les panels d'enrichissement fournis par l'utilisateur jusqu'à la taille de l'exome et permet le transfert du contenu, donnant l'occasion aux laboratoires d'adapter leur conception expérimentale en fonction de leurs besoins de recherche.

## En savoir plus

[Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#)

[DRAGEN Enrichment App](#)

[DRAGEN recipe for analyzing FFPE sample libraries prepared using Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#)

## Référence

1. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 2015;61(1):64-71. doi:10.1373/clinchem.2014.223040



Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809-4566 | Téléphone : + (1) 858 202-4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 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](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-02524 FRA v1.0