

Flux de travail rapide et facile pour identifier les événements de fusion d'ARN pour la recherche sur le cancer

Utilisation d'Illumina RNA
Prep with Enrichment pour
les panels TruSight^{MC} RNA
Fusion Panel et TruSight
RNA Pan-Cancer Panel



Introduction

Les transcrits d'ARN sont exprimés dynamiquement et hautement informatifs sur l'activité et l'état des tissus au niveau cellulaire. Le séquençage d'ARN (RNA-Seq) ciblé des échantillons tumoraux est une méthode puissante pour quantifier les transcrits d'ARN exprimés et identifier les fusions de gènes pertinentes pour la recherche sur le cancer. Les cellules cancéreuses accumulent de nombreux changements génétiques, mais en général, seuls quelques changements stimulent la progression tumorale¹⁻³. La mesure des modèles d'expression génique à l'aide du RNA-Seq peut aider à différencier ces mutations conductrices des mutations passagères¹⁻³. La détection des fusions géniques est importante pour la recherche sur le cancer, car 20 % de toutes les tumeurs chez l'humain sont porteuses de translocations et de fusions de gènes⁴⁻⁶. La plupart des fusions de gènes ont un impact significatif sur la tumorigenèse et une forte association avec le phénotype morphologique, ce qui les rend utiles en tant que biomarqueurs potentiels⁴⁻⁶.

Se concentrer sur un sous-ensemble de gènes pertinents permet le RNA-Seq sur un système de séquençage de paillasse avec une sensibilité élevée et une analyse efficace. L'enrichissement, ou le séquençage par capture hybride, offre une approche fiable et complète aux chercheurs qui ont besoin de renseignements plus approfondis sur les données génomiques complexes. Cette méthode excelle dans la détection de régions cibles plus grandes et fournit une sensibilité élevée, permettant l'identification d'un large éventail d'altérations génétiques, notamment les fusions connues et inconnues, les variants d'épissage et d'autres biomarqueurs essentiels. De plus, l'enrichissement permet de maintenir l'efficacité même pour les types d'échantillons difficiles, y compris les échantillons fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP) et d'autres sources d'ADN compromises.

TruSight RNA Fusion Panel et TruSight RNA Pan-Cancer Panel sont utilisés pour le RNA-Seq basé sur l'enrichissement afin d'aider les chercheurs cliniques à mesurer l'expression génique et à détecter les fusions géniques pertinentes pour le cancer^{7,8}. TruSight RNA Fusion Panel couvre 507 gènes associés à la fusion et TruSight RNA Pan-Cancer Panel cible 1 385 gènes pour une évaluation complète des transcrits d'ARN associés au cancer ([tableau 1](#)). Les deux panels ne nécessitent que 10 ng d'entrée d'ARN total pour l'ARN de haute qualité ou 20 ng pour l'ARN des échantillons FFIP.

Flux de travail rapide et facile

L'utilisation d'Illumina RNA Prep with Enrichment avec les panels TruSight RNA Fusion Oligo Panel et TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel offre un flux de travail rapide pour obtenir des résultats ciblés pour l'expression génique associée au cancer et la détection de fusions ([figure 1](#)). Le protocole rationalisé de préparation de bibliothèques comprend moins d'étapes, des temps d'incubation plus courts et de nombreux points d'arrêt de sécurité avec une durée de test totale de seulement neuf heures⁹. Illumina RNA Prep with Enrichment utilise la technologie de tagmentation sur billes comme agents médiateurs pour produire une réaction de tagmentation uniforme, éliminant ainsi la nécessité d'étapes de fragmentation distinctes et économisant du temps⁹. Cette étape est suivie d'une hybridation simplifiée à cycle unique pour l'enrichissement basé sur un panel de sondes. L'enrichissement peut être effectué au format à un niveau ou à trois niveaux. Un programme de PCR à cycle limité amplifie de manière exponentielle les fragments enrichis pour augmenter le nombre de bibliothèques. Le séquençage est effectué sur un système de séquençage de paillasse d'Illumina et les données sont analysées à l'aide de BaseSpace[™] Sequence Hub.

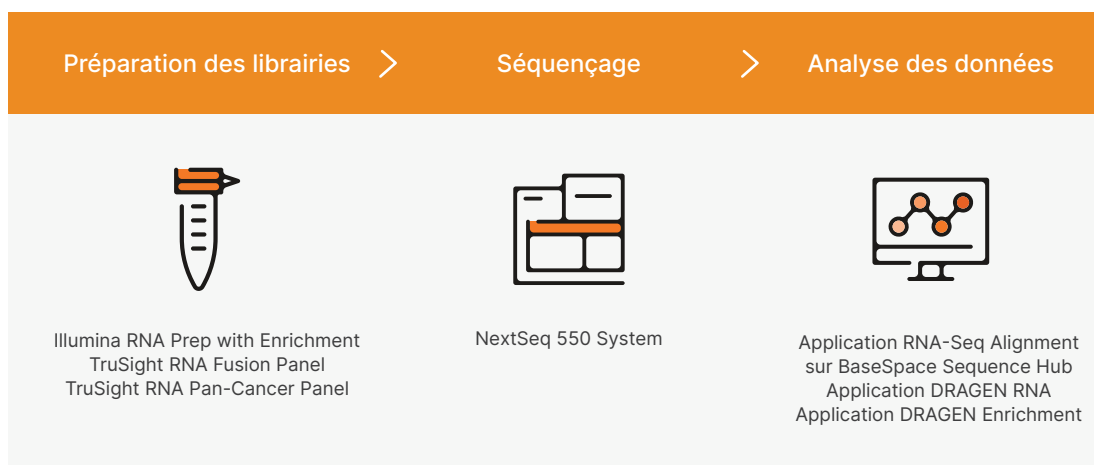


Figure 1 : Flux de travail des panels d'ARN TruSight utilisant Illumina RNA Prep with Enrichment : le RNA-Seq ciblé pour la recherche sur le cancer avec les panels TruSight RNA Fusion Panel et TruSight RNA Pan-Cancer Panel et Illumina RNA Prep with Enrichment suit un flux de travail complet rationalisé comprenant la préparation des bibliothèques, le séquençage et l'analyse des données.

Tableau 1 : Contenu du panel d'ARN TruSight

Nom du panel	Nbre de sondes	Nbre de gènes cibles	Nbre de régions exoniques ciblées
TruSight RNA Fusion Panel	21 283	507	7 690
TruSight RNA Pan-Cancer Panel	57 010	1 385	21 043

Cette note d'application fournit aux utilisateurs des conseils et des données de performance pour l'utilisation d'Illumina RNA Prep with Enrichment avec les panels TruSight RNA Fusion Panel et TruSight RNA Pan-Cancer Panel pour identifier les événements d'expression et de fusion des gènes d'ARN liés au cancer.

Méthodes

Préparation des bibliothèques

La performance de TruSight RNA Fusion Panel (Illumina, référence n° 20046101) et de TruSight RNA Pan-Cancer Panel (Illumina, référence n° 20046104) avec Illumina RNA Prep with Enrichment (Illumina, référence n° 20040536) a été testée à la fois à l'aide d'échantillons d'ARN de haute qualité (tableau 2) et d'ARN FFIP (tableau 3), à un enrichissement à un niveau et à trois niveaux.

Les échantillons d'ARN de haute qualité utilisés pour l'étude d'enrichissement à un niveau étaient de l'ARN de référence humaine universelle (UHR, Universal Human Reference) (Thermo Fisher Scientific, référence n° QS0639), de l'ARN total provenant de la lignée cellulaire leucémique humaine K562 (ATCC, référence n° CCL-243) et de l'ARN de référence extrait de tissus cérébraux humains (HBRR, Human Brain Reference RNA) (Thermo Fisher Scientific, référence n° QS0611) à des entrées de 10 ng et de 100 ng. Les échantillons FFIP utilisés pour l'étude d'enrichissement à un niveau étaient l'échantillon de cancer du côlon « FFIP-A », l'échantillon de cancer du poumon « FFIP-B », l'échantillon primaire de cancer inconnu « FFIP-C » et l'échantillon de lymphome « FFIP-D » à 20 ng d'entrée. Au moins trois bibliothèques de réplicats ont été générées à partir de chaque type d'échantillon et utilisées pour former des réactions d'enrichissement à un niveau. Les panels TruSight RNA Fusion Oligo Panel et TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel ont tous deux été testés pour chaque type d'échantillon lors de l'enrichissement à un niveau.

Les échantillons d'ARN utilisés pour l'étude d'enrichissement à trois niveaux étaient l'ARN de référence humaine universelle de haute qualité et l'ARN total K562 à 10 ng d'entrée, et l'échantillon de cancer du côlon « FFIP-E » à 20 ng d'entrée. Trois bibliothèques de réplicats ont été générées à partir de chaque type d'échantillon et utilisées pour former des réactions d'enrichissement à trois niveaux. Les panels TruSight RNA Fusion Oligo Panel et TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel ont tous deux été testés pour chaque type d'échantillon lors de l'enrichissement à trois niveaux.

Tableau 2 : Échantillons d'ARN de haute qualité

Description	Remarque	Quantité d'entrée
ARN de référence humaine universelle	Issu d'un mélange exclusif de 10 lignées cellulaires humaines	10 ng, 100 ng
ARN total K562	Issu d'une lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique	10 ng, 100 ng
ARN de référence extrait de tissus cérébraux humains	Issu d'un groupe de donneurs de tissus cérébraux humains	10 ng, 100 ng

Tableau 3 : Échantillons d'ARN FFIP

Échantillon	Tissu	Diagnostic	DV ₂₀₀ ^a	Quantité d'entrée
FFIP-A	Culot de cellules	Cancer du côlon	81,9	20 ng
FFIP-B	Poumon	Cancer du poumon	45,5	20 ng
FFIP-C	Inconnu	Cancer inconnu ou non spécifié	36,5	20 ng
FFIP-D	Inconnu	Lymphome	56,1	20 ng
FFIP-E	Inconnu	Cancer du côlon	59,7	20 ng

a. La valeur DV₂₀₀ est le pourcentage de fragments d'ARN > 200 nucléotides. Valeurs DV₂₀₀ fournies par le référentiel d'échantillons.

Les bibliothèques ont été préparées en suivant les instructions du guide de référence d'Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation (Illumina, document n° 1000000124435 v03) à l'aide des panels TruSight RNA Fusion Panel et TruSight RNA Pan-Cancer Panel pour les étapes d'enrichissement.

Séquençage

Les bibliothèques préparées ont été diluées à une concentration de chargement finale de 1,8 pM, conformément au Guide de dénaturation et de dilution des bibliothèques de NextSeq 550 System (Illumina, document n° 15048776 v18) et séquencées sur NextSeq 550 System à une longueur de lecture de 2 × 74 pb à l'aide de NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 cycles) (Illumina, référence n° 20024907) à une profondeur de ≥ 3 millions de lectures par échantillon. Les 3 millions de lectures par échantillon correspondent à la profondeur de séquençage minimale choisie pour cette étude afin d'examiner les indicateurs à un niveau de performance bas. De nombreuses applications clientes bénéficient d'une profondeur de séquençage plus importante, jusqu'à 30 millions de lectures par échantillon.

Analyse des données

Les résultats de couverture et d'alignement des transcrits ont été générés à l'aide d'Illumina RNA-Seq Alignment App v2.0.2 sur BaseSpace Sequence Hub. Les résultats de l'analyse de l'expression ont été générés à l'aide de l'application DRAGEN[™] RNA App v4.2.4. Les résultats d'enrichissement par lectures élargies (PRE, Padded Read Enrichment) et d'enrichissement

par lectures élargies uniques (PURE, Padded Unique Read Enrichment) ont été générés à l'aide de l'application DRAGEN Enrichment App v4.2.4. La détection des fusions a été vérifiée à l'aide de l'application RNA-Seq Alignment App v2.0.2 et de l'application DRAGEN RNA App v4.2.4. Les données ont été sous-échantillonnées à 1 million de lectures par échantillon (pour l'enrichissement à un niveau) ou à 4 millions de lectures par échantillon (pour l'enrichissement à trois niveaux) pour normaliser les différences de chargement.

Résultats

Déplétion des transcrits abondants

Les résultats de l'application RNA-Seq Alignment comprennent une estimation de la proportion d'ARN provenant d'espèces de transcrits hautement abondantes comme l'ARN ribosomique (ARNr), qui ont généralement une faible valeur informative. Ces espèces de transcrits abondantes sont réduites dans le flux de travail d'Illumina RNA Prep with Enrichment pendant la phase d'enrichissement. Avec la préparation à un niveau et à trois niveaux, les espèces de transcrits abondantes sont réduites à moins de 20 % des lectures et, fréquemment, à moins de 10 % des lectures (figure 2).

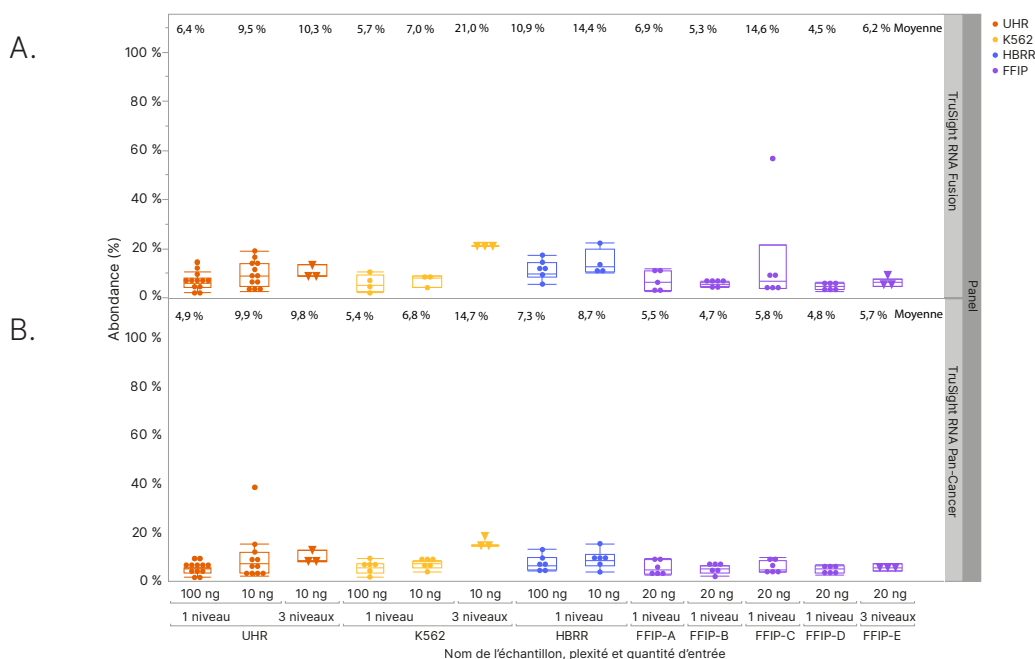


Figure 2 : Déplétion efficace des espèces d'ARN abondantes à l'aide d'Illumina RNA Prep with Enrichment : à l'aide des panels (A) TruSight RNA Fusion Oligo Panel et (B) TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel pour l'enrichissement, moins de 20 % des transcrits d'ARN séquencés étaient de l'ARNr ou d'autres transcrits hautement abondants. UHR, ARN de référence humaine universelle; HBRR, ARN de référence extrait de tissus cérébraux humains.

Pourcentage de doublons

Le pourcentage de lectures dupliquées représente le pourcentage de lectures totales qui correspondent aux copies de fragments d'échantillons uniques (fréquemment des duplicats de PCR). Un pourcentage inférieur de valeurs dupliquées est généralement préférable et montre une utilisation efficace de la capacité de séquençage. Dans cette étude, les lectures ont été normalisées à 3 millions de lectures par échantillon, auquel cas un pourcentage inférieur de valeurs dupliquées indique une augmentation du contenu de lectures uniques. Ici, les taux de duplication sont corrélés à la qualité de l'échantillon d'ARN d'entrée et à la taille du panel d'oligos (figure 3). Le panel TruSight RNA Fusion Panel plus petit produit plus de doublons par échantillon que le panel TruSight RNA Pan-Cancer Panel, car les panels les plus récents ont plus de cibles uniques qui peuvent être capturées. Pour les bibliothèques enrichies à un niveau, les échantillons d'ARN de haute qualité présentent un pourcentage inférieur de doublons par rapport à la plupart des échantillons FFIP, cela est dû à la qualité de l'échantillon d'entrée. Pour les bibliothèques enrichies à trois niveaux, les échantillons UHR montrent un taux de duplication moyen $\leq 32\%$, tandis que les échantillons de lignée cellulaire K562 et FFIP-E montrent des taux de duplication plus élevés, ce qui indique un contenu de lectures uniques moindre dans la bibliothèque finale.

Enrichissement des lectures

Des valeurs élevées d'enrichissement des lectures démontrent que les sondes du panel ont capturé efficacement les bibliothèques cibles pendant l'enrichissement, entraînant ainsi une réduction du séquençage des régions hors cibles indésirables. PRE et PURE sont deux mesures d'enrichissement. L'indicateur PRE fait référence au pourcentage de lectures qui correspondent aux régions ciblées par le panel ou à proximité immédiate (régions élargies), y compris les lectures dupliquées. L'indicateur PURE exclut les lectures dupliquées et peut sembler inférieur lorsque la proportion de lectures dupliquées est élevée (figure 4). L'indicateur PRE est considéré plus utile pour certaines applications de RNA-Seq.

Pour l'étude d'enrichissement à un niveau, l'enrichissement des échantillons d'ARN de haute qualité était généralement $> 70\%$ pour les deux indicateurs, ce qui indique un enrichissement réussi. Cela était vrai pour les échantillons à entrée élevée et faible. L'efficacité de l'enrichissement des échantillons FFIP était élevée pour tous les échantillons pour l'indicateur PRE et hautement variable pour l'indicateur PURE, mais était en moyenne $> 50\%$. Cette variabilité est corrélée au nombre de lectures dupliquées par échantillon, comme indiqué par le gradient de couleur sur le graphique (figure 4).

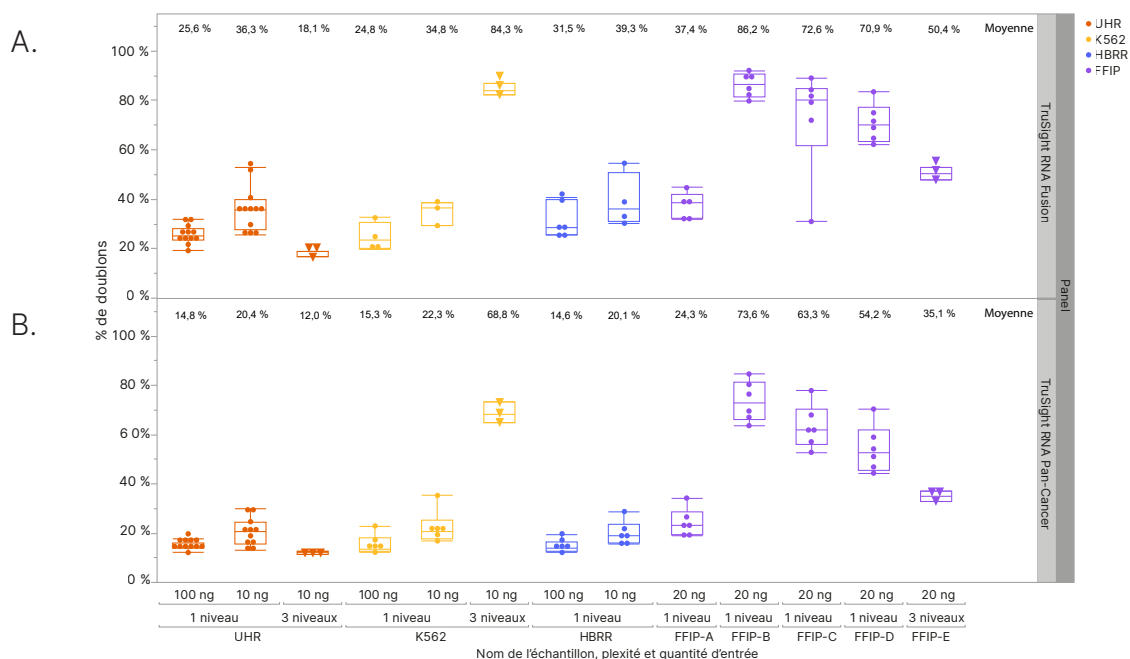


Figure 3 : Pourcentage de doublons à l'aide des panels d'ARN TruSight et d'Illumina RNA Prep with Enrichment : en utilisant les panels (A) TruSight RNA Fusion Oligo Panel et (B) TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel pour l'enrichissement, les taux de duplication sont corrélés à la qualité de l'échantillon d'ARN d'entrée et à la taille du panel d'oligos.

Pour l'étude d'enrichissement à trois niveaux, la valeur PRE pour l'ARN de haute qualité est > 70 % et > 90 % pour les échantillons FFIP, ce qui suggère un enrichissement suffisant avec les panels TruSight RNA Fusion Panel et TruSight RNA Pan-Cancer Panel (figure 4).

Détection de la fusion des gènes

Les panels TruSight RNA Fusion Panel et TruSight RNA Pan-Cancer Panel ont permis une détection fiable de la fusion des gènes (tableau 4). L'échantillon d'ARN de la lignée cellulaire K562 contenant la fusion *BCR-ABL1* a été utilisé comme type d'échantillon applicable pour tester la détection lors de l'utilisation d'Illumina RNA Prep with Enrichment. Les résultats ont montré un taux d'appel de 100 % pour la fusion des gènes *BCR-ABL1* dans la lignée cellulaire K562 sur six réplicats (10 ng et 100 ng, enrichissement à un niveau) et trois réplicats (10 ng, enrichissement à trois niveaux) lorsqu'ils sont analysés via l'application DRAGEN RNA App v4.2.4 et l'application RNA-Seq Alignment App v2.0.2. sur BaseSpace Sequence Hub.

Couverture des exons

L'analyse des données avec l'application DRAGEN Enrichment a révélé qu'Illumina RNA Prep with Enrichment permettait d'obtenir l'alignement de > 85 % des bases couvertes sur la séquence codante et les régions non traduites (UTR, Untranslated Region) d'ARN. Ces résultats démontrent des captures extrêmement efficaces permettant de cibler les efforts de séquençage sur le contenu à valeur élevée des régions de codage de l'ARN (figure 5).

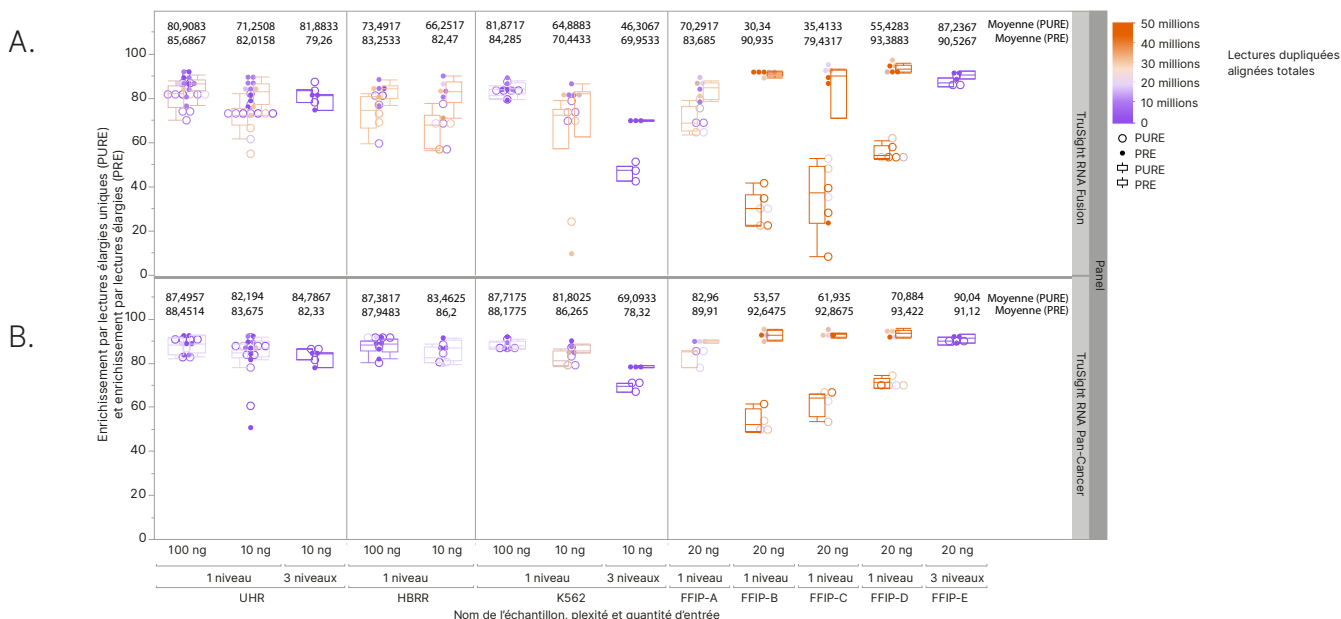
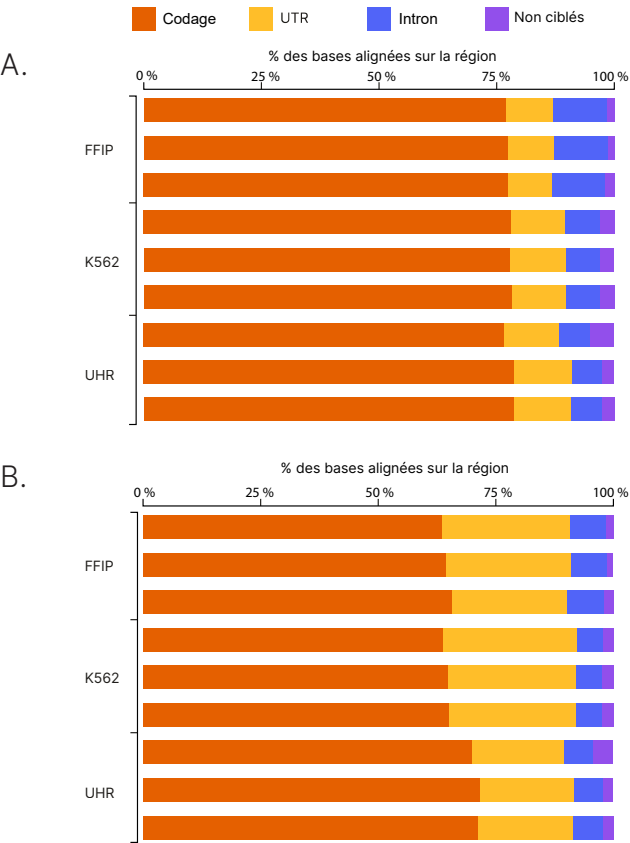


Figure 4 : Une efficacité d'enrichissement élevée à l'aide des panels d'ARN TruSight et d'Illumina RNA Prep with Enrichment : l'enrichissement à l'aide des panels (A) TruSight RNA Fusion Oligo Panel et (B) TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel a montré une efficacité élevée dans tous les types d'échantillons avec PRE, un indicateur qui inclut les doublons. L'indicateur PURE, qui exclut les doublons, n'est pas aussi utile pour les applications de RNA-Seq. Les échantillons ayant des taux de doublons élevés montrent une variabilité élevée avec l'indicateur PURE. Ici, le nombre de lectures dupliquées suit un code couleur de 0 (violet) à 50 millions (orange). L'analyse avec DRAGEN Enrichment est exécutée sans supprimer les lectures dupliquées (c.-à-d. que la case « Mark Duplicates » (Marquer les doublons) par défaut doit être décochée dans l'application). Pour générer une analyse d'enrichissement pour les panels TruSight RNA Fusion Panel et TruSight RNA Pan-Cancer Panel à l'aide de l'application DRAGEN Enrichment, le fichier *.bed doit être téléchargé manuellement pour chaque panel dans BaseSpace Sequence Hub.

Tableau 4 : Détection des fusions de gènes à l'aide des panels d'ARN TruSight et d'Illumina RNA Prep with Enrichment

Fusion (source)	Panel	Enrichissement	Entrée d'ARN	Détection avec RNA-Seq Align v2.0.2	Détection avec DRAGEN RNA v4.2.4
BCR-ABL1 (K562)	TruSight RNA Fusion	1 niveau	10 ng	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
			100 ng	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
		3 niveaux	10 ng	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)
	TruSight RNA Pan-Cancer	1 niveau	10 ng	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
			100 ng	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
		3 niveaux	10 ng	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)



Résumé

Étant axé sur les gènes d'intérêt essentiels, le séquençage ciblé de l'ARN permet aux chercheurs d'étudier du contenu de grande valeur enrichi par des transcrits associés au cancer. Illumina RNA Prep with Enrichment et TruSight RNA Fusion Panel ou TruSight RNA Pan-Cancer Panel démontrent des résultats hautement reproductibles avec la sensibilité analytique nécessaire pour détecter les transcrits et les fusions rares. Ce flux de travail a fourni une performance fiable pour les deux panels, même avec des niveaux d'entrée d'ARN inférieurs ou un ARN de qualité inférieure. Les chercheurs en cancérologie peuvent bénéficier d'un flux de travail rapide et facile pour l'analyse ciblée de l'ARN.

En savoir plus

[TruSight RNA Fusion Panel](#)

[TruSight RNA Pan-Cancer Panel](#)

[Illumina RNA Prep with Enrichment](#)

Renseignements relatifs à la commande

Produit	N° de référence
TruSight RNA Fusion Oligo Panel	20046101
TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel	20046104
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 échantillons)	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 échantillons)	20040537
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20091660

Références

1. Pon JR, Marra MA. [Driver and passenger mutations in cancer.](#) *Annu Rev Pathol.* 2015;10:25-50. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040312

2. Green MR, Vicente-Duenas C, Romero-Camarero I, et al. [Transient expression of BCL6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma.](#) *Nat Commun.* 2014;5:3904 doi:10.1038/ncomms4904.

3. Piskol R, Ramaswami G, Li JB. [Reliable identification of genomic variants from RNA-seq data.](#) *Am J Hum Genet.* 2013;93(4):641-651.

4. Mertens F, Tayebwa J. [Evolving techniques for gene fusion detection in soft tissue tumours.](#) *Histopathology.* 2014;64(1):151-162. doi:10.1111/his.12272

5. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. [mitelmandatabase.isb-cgc.org/](#). Mis à jour le 15 octobre 2024. Consulté le 20 novembre 2024.

6. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. [The emerging complexity of gene fusions in cancer.](#) *Nat Rev Cancer.* 2015;15(6):371-381.

7. Illumina. Illumina RNA Prep with Enrichment. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-rna-prep-enrichment-data-sheet-m-gl-02145/illumina-rna-prep-enrich-data-sheet-m-gl-02145.pdf](#). Publié en 2020. Mis à jour en 2023. Consulté le 7 septembre 2024.

8. Illumina. TruSight RNA Fusion Panel. [illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-rna-fusion-data-sheet-1170-2016-003.pdf](#). Publié en 2017. Consulté le 7 septembre 2024.

9. Illumina. TruSight RNA Pan-Cancer Panel. [illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-rna-pan-cancer-data-sheet-1170-2015-004.pdf](#). Publié en 2015. Consulté le 7 septembre 2024.



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

© 2025 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](#).
M-GL-03103 FRA v1.0