

Une meilleure couverture du promoteur *TERT* à l'aide de TruSight^{MC} Oncology 500 High-Throughput

Une simple modification
du protocole améliore les
performances dans les
régions riches en GC



Introduction

La longueur des télomères a des associations connues avec de nombreuses maladies humaines, notamment le cancer. L'enzyme transcriptase inverse de la télomérase (TERT) joue un rôle clé dans le maintien des télomères. Des mutations dans le promoteur *TERT* ont été détectées dans plus de 50 types de cancer¹. Plus précisément, deux mutations ponctuelles dans les points chauds du promoteur *TERT* ont été détectées dans 71 % des mélanomes^{2,3} et 83 % des glioblastomes⁴, rendant le séquençage précis de cette région du gène essentiel pour les applications pronostiques. Cependant, la région du promoteur *TERT* est riche en GC, comprenant > 80 % de bases GC⁵, compliquant ainsi l'amplification et le séquençage de l'ADN.

Dans cette note technique, nous décrivons une modification de l'étape d'amplification de la librairie enrichie (EL-PCR) dans le protocole TruSight Oncology 500 High-Throughput qui optimise l'amplification et le séquençage ultérieur des régions riches en GC, telles que le promoteur *TERT*, sans compromettre la performance des parties du génome non riches en GC. Des résultats similaires ont été démontrés avec TruSight Oncology 500 (données non présentées).

Méthodes

Protocole EL-PCR modifié

Pendant la préparation de la librairie, les sondes contenant les séquences d'amplification par PCR et les adaptateurs de séquençage se lient à des régions spécifiques de l'ADN. Ces parties d'ADN sont amplifiées par PCR et purifiées avant d'être chargées sur une Flow Cell qui lie les fragments à l'aide des adaptateurs ligaturés. Comme indiqué précédemment, les régions riches en GC peuvent être problématiques pour l'amplification par PCR, entraînant ainsi des rendements inférieurs et une couverture plus faible de ces régions pendant le séquençage de nouvelle génération (SNG). Pour surmonter les difficultés associées aux régions riches en GC rencontrées dans le SNG, les scientifiques d'Illumina ont augmenté les durées de cycle pendant l'amplification finale (EL-PCR) des librairies dans le protocole TruSight Oncology 500 High-Throughput ([tableau 1](#)).

Conditions expérimentales

Le test de la modification des durées de cycle a été effectué à l'aide d'échantillons d'ADN fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP) positifs au cancer de la vessie ou de la thyroïde et d'un échantillon de contrôle de lignée cellulaire SeraCare. Les librairies ont été générées conformément au Guide de référence de TruSight Oncology 500 High-Throughput⁶ en utilisant le protocole EL-PCR standard ou modifié.

Tableau 1 : Comparaison des protocoles EL-PCR standard et modifié

Étape	Température (°C)	Durée standard	Durée modifiée	Nbre de cycles
Dénaturation	98 °C	30 s	30 s	1
Hybridation	98 °C	10 s	30 s	18
	60 °C	30 s	30 s	
Hybridation	72 °C	30 s	60 s	18
	60 °C	30 s	30 s	
Extension	72 °C	5 min	5 min	1
Maintien	10 °C	maintien	maintien	–

Le protocole EL-PCR modifié a fait passer la durée d'amplification de 41 à 57 minutes. Les bibliothèques préparées ont été séquencées sur le NovaSeq^{MC} 6000 Sequencing System à l'aide de la Flow Cell S2 et d'une longueur de lecture de 2 × 101 pb. L'analyse a été effectuée à l'aide de DRAGEN^{MC} TruSight Oncology 500 Analysis Software v2.1.0.

Résultats

Une amélioration de la couverture de la région du promoteur *TERT* riche en GC, et de la plupart des régions à forte concentration de GC, a été observée pour les bibliothèques préparées à l'aide du protocole EL-PCR modifié (figure 1 et figure 2). Dans le même temps, la couverture des régions non riches en GC est restée élevée et n'a pas semblé affectée par les modifications apportées au protocole EL-PCR (figure 3). Les résultats ont également été confirmés par des études supplémentaires sur des échantillons positifs au cancer de la vessie, des os, du sein, des reins, des poumons, de la peau ou de l'utérus⁷. Il est important de noter que la qualité de l'échantillon d'origine aura des effets sur les résultats; les échantillons de qualité supérieure, ceux dont la valeur ΔCq est inférieure, montreront une meilleure couverture par rapport aux échantillons de qualité inférieure.

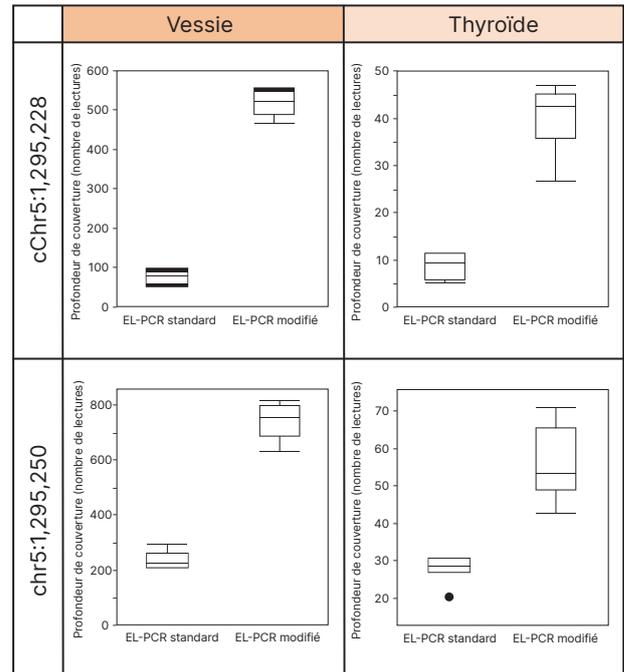


Figure 1 : Amélioration de la couverture du promoteur *TERT* à l'aide du protocole EL-PCR modifié : analyse présentée pour deux positions de mutation récurrentes dans les points chauds du promoteur *TERT*, chr5:1,295,228 et chr5:1,295,250, dans les échantillons de cancer de la vessie (n = 8) et de la thyroïde (n = 6). Après mutation, ces sites présentent une transition de la cytidine à la thymidine³.

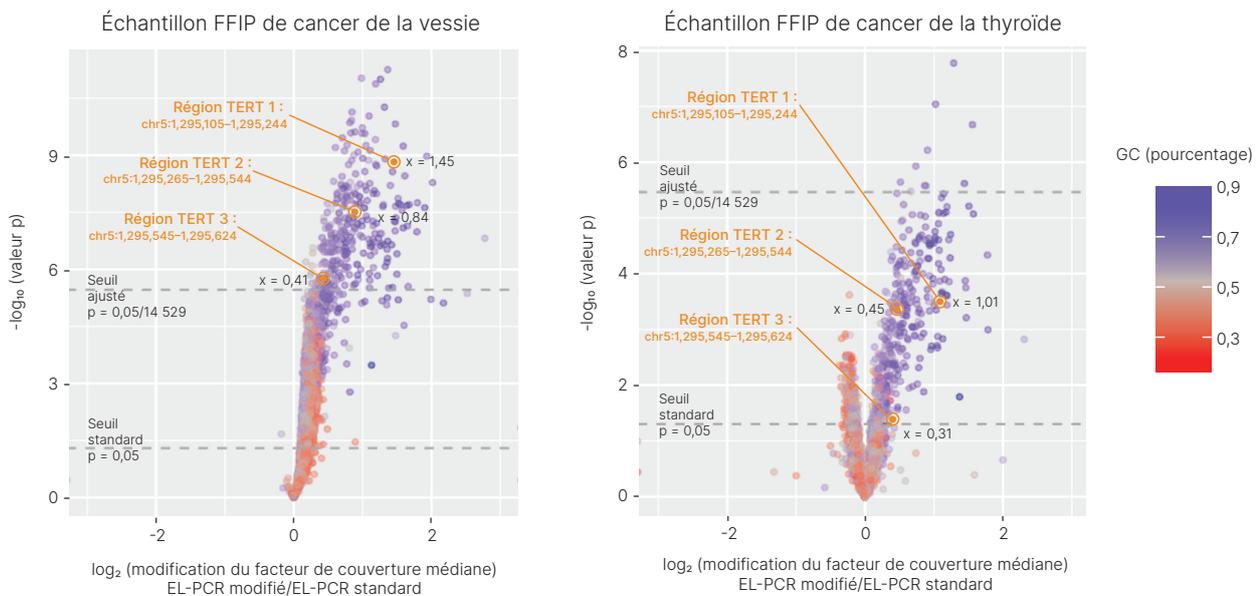


Figure 2 : Le protocole EL-PCR modifié augmente la couverture de la plupart des régions à forte concentration de GC : TruSight Oncology 500 High-Throughput avec le protocole EL-PCR modifié a été utilisé pour analyser les échantillons FFIP de cancer de la vessie et de la thyroïde. Les données FASTQ ont été sous-échantillonnées à 100 millions de paires de lectures pour analyse par diagramme en volcan. Les graphiques montrent l'analyse statistique par rapport à la modification de facteur de la couverture. Les valeurs p de seuil standard ($p < 0,05$) et ajusté ($p < 0,05/14\ 529$) sont présentées. X indique la modification de facteur entre les protocoles EL-PCR modifié et standard pour une région de sonde particulière.

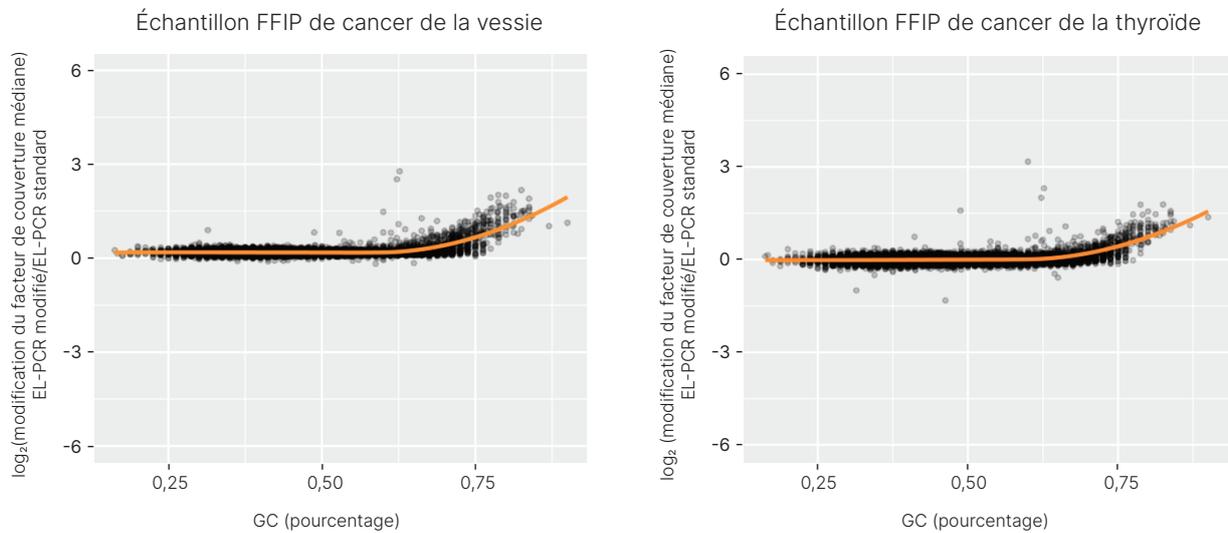


Figure 3 : Des performances élevées ont continué d'être observées pour les régions non riches en GC : bien que le protocole EL-PCR modifié améliore la couverture des régions riches en GC, cela n'a pas d'effet sur la performance globale du test. Les points de données correspondant aux régions ayant une teneur en GC > 70 % tendent vers le haut, tandis que ceux correspondant aux régions ayant une teneur en GC < 70 % restent constants, ce qui indique que l'augmentation observée de la couverture n'extrait pas les lectures de manière significative d'autres régions.

Résumé

Les parties du génome riches en GC, comme le promoteur *TERT*, peuvent présenter des difficultés pour le SNG. L'augmentation des durées de cycle pendant l'étape EL-PCR du protocole de préparation de la bibliothèque TruSight Oncology 500 High-Throughput peut améliorer la couverture de ces régions potentiellement problématiques tout en maintenant les performances élevées observées dans les régions non riches en GC.

Questions

Communiquez avec nous à l'adresse techsupport@illumina.com

Références

1. Bell RJA, Rube HT, Xavier-Magalhães A, et al. [Understanding TERT Promoter Mutations: a Common Path to Immortality](#). *Mol Cancer Res*. 2016;14(4):315-323. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0003
2. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. [TERT Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma](#). *Science*. 2013;339(6122):959-961. doi:10.1126/science.1230062
3. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. [Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma](#). *Science*. 2013;339(6122):957-959. doi:10.1126/science.1229259
4. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, et al. [TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal](#). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):6021-6026. doi:10.1073/pnas.1303607110
5. Kang SY, Kim DG, Kim H, et al. [Direct comparison of the next-generation sequencing and iTERT PCR methods for the diagnosis of TERT hotspot mutations in advanced solid cancers](#). *BMC Med Genomics*. 2022;15:25. doi:10.1186/s12920-022-01175-2
6. Illumina. TruSight Oncology 500 High Throughput Reference Guide (1000000094853). <https://support.illumina.com/downloads/trusight-oncology-500-ht-reference-guide.html>. Publié le 15 avril 2022. Consulté le 5 décembre 2023.
7. Données internes. Illumina, Inc. 2023.



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.

M-GL-02492 FRA v1.0