



N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 1/16		

**Recommandation à propos de l'utilisation du Kit
 Illumina® DNA PCR-Free Prep
 à partir de tissus tumoraux congelés**

Table des matières

1	OBJET	2
2	INTERETS POUR LES PLATES FORMES DU PLAN FRANCE MEDECINE GENOMIQUE	2
3	CHAMP D'APPLICATION DE LA RECOMMANDATION	2
4	PRESENTATION DU KIT.....	2
5	PLAN DE TESTS.....	2
5.1	Echantillons.....	2
5.2	Expériences	3
5.2.1	5.2.1 Extractions.....	3
5.2.2	5.2.2 Librairies.....	3
6	RESULTATS.....	4
6.1	Qualités des Librairies.....	4
6.2	Evaluation de la qualité des runs de séquençage	4
6.3	Validation technique.....	5
6.3.1	6.3.1 Résultats des critères de performance.....	5
6.3.2	6.3.2 Couverture des régions GC.....	5
6.4	Analyses Biologiques.....	6
6.4.1	6.4.1 Matériels & Méthodes bioinformatiques.....	6
6.4.2	6.4.2 Calcul du pourcentage de cellules tumorales.....	7
6.4.3	6.4.3 Analyse des Variants	7
6.4.4	6.4.4 Précision, Recall et F1-Score	8
6.4.5	6.4.5 Genotype Concordance.....	9
6.4.6	6.4.6 Signatures mutationnelles - Spectrum Mutations/96 mutational profile	9
6.4.7	6.4.7 Hotspots - catalogue Cancer Genome Interpreter (2700 hotspots).....	10
6.4.8	6.4.8 Copy Number Alteration	11
6.4.9	6.4.9 Variants structurels	13
7	LES POINTS DE VIGILANCES.....	13
8	CONCLUSION GENERALE.....	14
9	DOCUMENTS.....	15
10	HISTORIQUE DES MODIFICATIONS	16
11	VALIDATION DU DOCUMENT.....	16

N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 2/16		

1 OBJET

Evaluation du kit Illumina® DNA PCR-Free Prep (TAG), kit de préparation de bibliothèques par fragmentation enzymatique et sans amplification à partir d'ADN d'échantillons tumoraux congelés (FF) à faible quantité de départ (100ng - 300ng) pour du séquençage de génome entier.

Cette analyse est réalisée par comparaison avec le kit TruSeq DNA PCR-Free (TRU) qui est principalement utilisé dans le plan France Médecine Génomique aujourd'hui.

2 INTERETS POUR LES PLATES FORMES DU PLAN FRANCE MEDECINE GENOMIQUE

Ce kit permettrait :

- **D'abaisser la quantité de matrice** de départ nécessaire pour réaliser des bibliothèques, permettant de séquencer les échantillons avec peu d'ADN sans avoir recours à l'amplification par PCR,
- De l'utiliser pour tout type de matrice (tumoraux ou non) permettant de rationaliser la production de séquence,
- Une meilleure couverture **des régions GC**,
- Un **gain de temps**, lors de la préparation de bibliothèques,
- Un **gain économique**, l'étape de fragmentation ne demandant plus d'appareil spécifique (ni maintenance).

3 CHAMP D'APPLICATION DE LA RECOMMANDATION

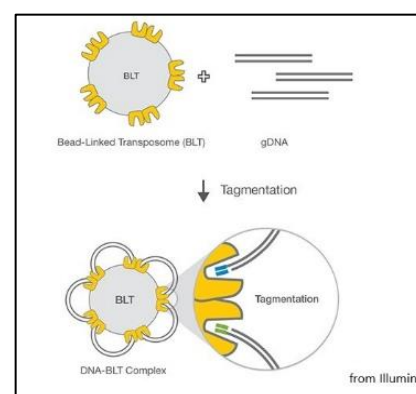
- Cette recommandation fait suite au document rédigé pour les échantillons non tumoraux (20221109_RT7_IlluminaDNAPCR-Free_Prep ref : 20221109_RT07)
- Cette recommandation s'applique aux ADN extraits à partir de tissus congelés (FF), les échantillons de type FFPE ne sont pas concernés.

4 PRESENTATION DU KIT

Utilisation de transposases accrochées sur des billes magnétiques permettant une coupure des brins d'ADN.

Ces transposases coupent de façon aléatoire l'ADN et ajoutent une partie d'adaptateur sur les extrémités finales. La répartition des transposases sur les billes permet d'obtenir des coupures de tailles homogènes.


La quantité de billes par réaction est fixe, les billes sont saturées dès que la quantité d'ADN atteint les 300 ng.



5 PLAN DE TESTS

5.1 Echantillons

Les expériences ont été réalisées à partir d'échantillons de tissus tumoraux congelés (FF) et leur sang correspondant (PBMC) fournis par la Biobanque CRB-Tumorothèque de Nice BB-0033-00025 et le CLB du centre Léon Bérard.

N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 3/16		

Echantillon	BREAU *	PATIENT 3	PATIENT 4	PATIENT 8	PATIENT 10	PATIENT 11
Tissu	Sein	Poumon				
Type	-	adénocarcinome acineux	adénocarcinome acineux	adénocarcinome micro-papillaire	adénocarcinome solide	adénocarcinome entérique
Fumeur	?	oui	oui	oui	oui	oui
Ischémie froide(min)	-	17	36	2	35	30
Nécrose (%)	-	Absence	40	Focale	30	30
Cellules tumorales (%)	78	70	80	70	80	70

* BREAU = échantillon cancer sein de la plateforme AURAGEN

5.2 Expériences

5.2.1 5.2.1 Extractions

Les extractions ont été réalisées en interne avec le kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen ref : 51304) pour l'ensemble des échantillons provenant du CRB de Nice. L'ADN extrait a été fournis par le CRB de Lyon pour BREAU.

Indicateurs de performance	Valeurs recommandées	PBMC Med (min-max)	FF Med (min-max)	Résultats
Quantité initiale	5 10 ⁶ cell 25 mg	4,91 10 ⁶ cell (2,2 – 7,85)	32,7 mg (23 – 35)	✓
Quantité ADN obtenue	>1µg	11,35 (6,8-19,6)	13,4 (8,9-18,3)	✓
A260/280	1,8 - 2,2	1,84 (1,83-1,88)	1,84 (1,78-1,9)	✓
A260/230	1,8 - 2,2	2,11 (1,749-2,64)	2,09 (1,73-3,2 *)	✓
DIN value	>7	8,8 (8,3-9)	7 (6,5-8,8)	✓ ≈

* Valeur aberrante, dosage réalisé sans connaître le tampon d'éluion de l'échantillon.

Les quantités et les qualités des ADNs extraits à partir FF et PBMC sont dans des valeurs attendues (quantité sup à 7 µg, DIN > 7, ...).


5.2.2 Librairies

Les librairies ont été préparées avec le kit Illumina® DNA PCR-Free Prep (TAG) avec une quantité de départ de 100 ng et 300 ng et pour certains en duplicat expérimental à partir des échantillons FF et PBMC. L'ensemble de ceux-ci ont aussi été préparés en TruSeq DNA PCR-Free (TRU) afin de réaliser une analyse par comparaison.

Echantillon	BREAU	PATIENT 3	PATIENT 4	PATIENT 8	PATIENT 10	PATIENT 11
TRUSEQ PCR Free (quantité départ ng)	1000					
Illumina DNA PCR-Free (quantité départ ng)	300 D / 100 D	300 D / 100 D	100	100 D	100 D	100 D

D : duplicat expérimental

L'ensemble des librairies a été déposé sur Novaseq 6000 d'Illumina. Les Flow Cell (FC) sont de type S2 et S4, le dépôt se fait en mode XP ou standard. Le choix des FC et du dépôt s'est fait en fonction du nombre d'échantillons à déposer et de la profondeur désirée.

N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 4/16		

La profondeur cible est de 80-90X afin de respecter les recommandations du PFMG 2025 pour les échantillons tumoraux et 30-40 X pour les échantillons normaux appariés.

6 RESULTATS

L'analyse des résultats a été décomposée comme suit :

- La qualité et la quantité de librairies obtenues,
- Une validation technique des données de séquençage,
- Une analyse biologique des échantillons.

L'analyse a été réalisée sur la comparaison des duplicats expérimentaux entre eux en fonction de la quantité de départ puis par rapport aux données du kit TruSeq DNA PCR-Free (TRU).

6.1 Qualités des Librairies

		Quantité initiale d'ADN (ng)	Attendues (nM) Med (min-max)	Observées (nM) Med (min-max)	Résultats
TAG	PBMC	100	2,7 (1,7 - 4,2)*	7,7 (3,5 - 12,3)	✓
	Tissu			7,1 (4,1 - 11,5)	
	PBMC	300	≥ 7 **	9,6 (8,2 - 10,9)	
	Tissu			8,3 (6,6 - 10)	

* Valeurs obtenues lors des expériences sur des échantillons de référence.

** Valeurs seuils selon Illumina.

Les quantités de librairies obtenues sont dans la fourchette haute par rapport aux attendus. Il y a une plus grande dispersion des concentrations obtenues à 100 ng de matrice de départ par rapport aux concentrations à 300 ng. Les profils de migration, quelle que soit la quantité de départ, sont homogènes.


		Quantité initiale d'ADN (ng)	Attendues (nM)	Observées (nM) Med (min-max)	Résultats
TRU	PBMC	1000	> 15 *	23,7 (16 - 35,6)	✓
	Tissu			25,1 (13,2 - 41,2)	

* Valeurs obtenues lors des expériences sur des échantillons de référence non tumoraux.

6.2 Evaluation de la qualité des runs de séquençage

L'analyse des runs obtenus à partir des librairies TAG (4 runs) et TRU (3 runs) ne montrent pas de différence entre eux, les valeurs des métriques (Passing filter, pré phasing, ...) sont dans les valeurs attendues. Il n'y a pas d'impact du kit sur la qualité des runs.

Critères	Attendues (valeurs illumina)	TruSeq Med (min-max)	Illumina DNA PCR-Free Prep Med (min-max)	Résultats
Passing filter (%)	> 63	71,13 (70,04 - 83,68)	75,34 (68,43 - 76,96)	✓
Phasing (%)	< 0,3	0,09 (0,073 - 0,112)	0,085 (0,064 - 0,109)	✓
Prephasing (%)	< 0,3	0,08 (0,048 - 0,113)	0,054 (0,027 - 0,083)	✓
Q30 (%)	> 75	91,3 (88,28 - 92,93)	90,27 (89,02 - 92,09)	✓
Error Rate (%)	< 1 %	0,26 (0,14 - 0,6)	0,24 (0,15 - 0,46)	✓

N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 5/16		

Les résultats de séquençage sont dans les attendus. Il n'y a pas d'impact du kit sur les données du séquençage.

6.3 Validation technique

Cette phase de validation technique, en amont de la validation biologique, est une étape importante car elle permet d'apprécier la qualité intrinsèque des librairies et d'anticiper les erreurs d'interprétation biologique éventuelles. Il a été choisi d'uniformiser les fichiers fastq des librairies à un sous-échantillonnage à 350 Millions de paires de reads. La profondeur attendue est d'environ 30 X.

Des indicateurs de performance propres à la méthode testée ont été définis et permettent une comparaison ciblée entre les différents échantillons. Aussi, des seuils recommandés pour chaque indicateur, selon notre expérience, sont ajoutés comme référence attendue.

6.3.1 Résultats des critères de performance

Indicateurs de performance	Seuils recommandés (FF)	FF TRU (1000 ng) Méd (Min-Max)	FF TAG (100 ng) Méd (Min-Max)	FF TAG (300 ng) Méd (Min-Max)
% Couverture 30X	>30	45 (21-58)	34 (27-41)	37,5 (35-40)
Taille insert (pb)	TRU: 380 +/- 50 TAG: 450 +/- 70	382 (341-422)	387 (353-404)	410 (409-412)
IQR	< 12	10 (9-11)	10 (10-11)	10 (10-10)
% Adaptateurs	< 5	0,16 (0,08-0,22)	2,76 (2,16-3,3)	2,29 (2,27-2,3)
% Alignement	>95	97,84 (97,42-98,16)	98 (97,91-98,22)	98,18 (98,15-98,22)
% Chimère	< 5	1,74 (1,51-2,01)	1,36 (1,28-1,52)	1,33 (1,32-1,34)
% Duplicats Optique	NA	11,36 (6,02-19,58)	10,04 (9,04-16,22)	9,05 (8,79-9,31)
% Duplicats Autre	< 10	1,17 (0,49-5,99)	4,39 (2,94-6,59)	5,42 (5,25-5,58)

Aucune déviation critique des indicateurs de performances n'est observée pour le kit TAG et entre les deux inputs (100ng et 300ng) comparé au kit TRU. Seul bémol, au niveau du pourcentage de séquences dupliquées « Autre » (*colonne % Duplicats Autre*) qui est supérieur à celui observé sur les librairies TRU. Cette observation n'est pas impactante outre mesure mais **engendre un rendement plus bas sur le nombre de séquences utiles** pour les librairies TAG.

Les mêmes mesures ont été compilées sur les échantillons non tumoraux (PBMC) et les conclusions sont identiques à celles des échantillons FF.

6.3.2 Couverture des régions GC

La vérification de l'uniformité de couverture en fonction de la répartition du taux de GC dans le génome est réalisée à l'aide du logiciel Picard [5] (v4.1.7 ; CollectGcBiasMetrics). Les résultats ont été effectués sur les échantillons PBMC et les tissus tumoraux congelés (FF) entre les deux kits testés TRU et TAG. La distinction entre les deux inputs du kit TAG est prise en compte.

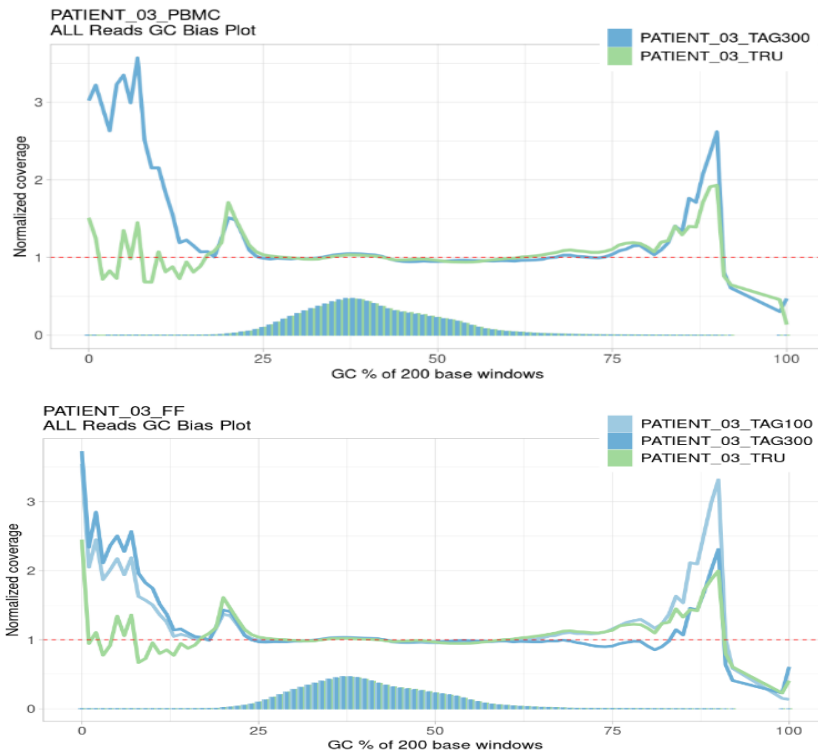


Figure 1: Représentation de l'uniformité de couverture normalisée selon le pourcentage de GC sur le génome pour le PATIENT_03 sur les librairies PBMC et FF.

Kit	AT DROPOUT	GC DROPOUT	NC GC<=20%	NC GC>=80%
TRU	1,24%	0,29%	1,10	3,21
TAG100ng	1,67%	1,85%	1,34	3,37
TAG300ng	1,27%	0,75%	1,37	2,88


Tableau 1: Mesures du AT/GC Dropout sur les échantillons PBMC, ainsi que sur la couverture normalisée (NC) sur les régions pauvres (GC_NC_0_19) et riches en contenu GC (GC_NC_80_100)

Le pourcentage de séquences mal alignées en fonction du contenu des régions AT riches (<50% GC;) ou GC riches (>=50% GC) est représenté dans le tableau n°1, selon les mesures d'Illumina (AT/GC DROPOUT). Les valeurs ont été moyennées suivant les patients présents dans chaque catégorie de librairies (TRU, TAG100 & TAG300). Il semble y avoir **un gain d'uniformité de couverture dans les régions riches en GC (>=80%)** sur les librairies TAG en 300ng comparé aux deux autres types de librairies. Cependant, il n'y a pas d'amélioration visible dans les régions AT riches (<=20%) pour ces dernières. Les librairies TAG à 100ng présentent quant à elles **des valeurs d'uniformités moins efficaces dans les régions AT et GC riches.**

6.4 Analyses Biologiques

6.4.1 Matériels & Méthodes bioinformatiques

Les fichiers bam proviennent de l'alignement des séquences (fastq) sur la référence GRCh38 à l'aide du logiciel bwa-mem2 (v2.1.1) [2]. Dans un souci d'uniformité, les fichiers d'alignements sont downsampelés à une

N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 7/16		

profondeur propre à chaque patient, à l'aide de l'outil samtools (v1.13) [3]. Les profondeurs obtenues sont validées en amont par le logiciel Mosdepth (v0.3.2) [4].

La détection des variants somatiques est effectuée par Mutect2 (GATK v4.1.7.0) [5] et les statistiques et les figures sont générées à l'aide du logiciel R (v4.1.1).

6.4.2 Calcul du pourcentage de cellules tumorales

La vérification de la teneur en cellules tumorales dans nos échantillons est réalisée par calcul bioinformatique, à partir des fichiers bam. Ce contrôle est réalisé à l'aide de l'outil FACETS (bioconductor/3.13) [6], package R qui analyse l'hétérogénéité clonale. La pureté, la ploïdie et les fractions cellulaires de la tumeur sont ainsi déduites.

Echantillon		ℓ tumorales histologie	ℓ tumorales WGS	Ploïdie	Downsampling bams (X)
BREAU	TRU		64.40	2.02	
	TAG100-1	78 %	65.08	1.97	70 X
	TAG100-2		75.73	2.00	
	TAG300-1		62.66	1.96	
	TAG300-2		62.40	1.97	
TRU	30.31		3.15		
PATIENT_08	TAG100-1	70%	30.89	3.14	75 X
	TAG100-2		38.15	2.92	

Tableau 2 : Teneur en cellules tumorales et ploïdie sur deux patients séquencés.


Le % de cellules tumorales semble avoir été surestimé par le(s) pathologiste(s) ou bien sous-estimé par le logiciel FACETS. Pour la suite de l'analyse, seuls les résultats moléculaires seront pris en compte. **L'estimation de la ploïdie et la pureté est similaire entre duplicats expérimentaux, entre input différent (100ng & 300ng) et entre les deux versions des kits testés TRU et TAG. Des résultats similaires sont observés pour l'ensemble des patients, non présentés ici.**

6.4.3 Analyse des Variants

Avant toute chose, il a été réalisé **une analyse de comparaison entre les échantillons non tumoraux (PBMC)** afin de s'assurer de l'absence de biais liés aux kits TRU et TAG. Les différentes métriques calculées (nombre de variants, F1-Score, % de concordance génotypique, ...) **n'ont montré aucune différence entre les librairies PBMC**. De même, un travail complet sur l'analyse des duplicats seuls entre les 2 quantités d'input à 100ng et 300ng n'a établi aucune divergence et valide la reproductibilité des résultats entre les duplicats TAG. Reste un point d'attention sur l'analyse des CNAs où les résultats montrent une certaine instabilité. Au vu de ces résultats, seul un duplicat de chaque catégorie d'input est présenté.

Une analyse globale et générale des résultats de Mutect2 est présentée dans le tableau ci-dessous. Le logiciel rtg vcftstats (v.3.12.1) [7] a permis de sortir différentes statistiques, dont le nombre de variants « Passed », « Failed », le nombre d'insertions et de délétions, ainsi que le ratio transition/transversion (Ti/Tv). Seules les positions incluses dans les régions de haute confiance sont conservées.

Echantillon	Failed Somatiques	Passed Somatiques	TAG/TRU ratio Passed	SNVs Somatiques	MNPs Somatiques	SNV Ti/Tv	Ins/Del ratio
BREAU_TRU	142 868	3 512		2 772	175	1.43	0.75
BREAU_TAG300-1	158 905	4 339	1,2	3 444	327	1.15	0.71
BREAU_TAG100-1	144 293	4 460	1,3	3 482	322	1.22	0.77
PATIENT_03_TRU	133 182	3 036		2 397	204	1.35	0.48

N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 8/16		

PATIENT_03_TAG300-1	159 072	4 144	1,4	3 379	300	0.96	0.61
PATIENT_03_TAG100-1	135 260	3 974	1,3	3 212	244	1.17	0.77
PATIENT_04_TRU	142 721	19 869	1,0	17 902	791	0.46	0.49
PATIENT_04_TAG100-1	134 210	20 651	1,0	18 701	898	0.45	0.49
PATIENT_08_TRU	153 085	153 082	1,0	141 425	5 607	0.41	0.38
PATIENT_08_TAG100-1	149 518	150 006	1,0	138 751	5 575	0.40	0.37
PATIENT_10_TRU	146 445	40 803	1,0	38 789	717	0.86	0.59
PATIENT_10_TAG100-1	153 794	41 648	1,0	39 557	848	0.85	0.62
PATIENT_11_TRU	140 149	65 453	1,0	60 358	2 030	0.32	0.50
PATIENT_11_TAG100-1	142 838	65 575	1,0	60 506	2 135	0.32	0.50

Tableau 3: Comparaison générale des variants somatiques entre les librairies TRU et TAG, dans les régions de haute confiance avec une profondeur normalisée par patient. Les librairies TRU servant de référence pour le calcul du ratio « Passed ».

Dans la majorité des comparaisons, le ratio sur la détection des variants somatiques entre les librairies TRU et TAG est de 1. Comme, pour les ratios Transition/Transversion (Ti/Tv) et d'insertion/Deletion (Ins/Del). Ces valeurs sont équivalentes selon les deux inputs (100ng & 300ng) pour les librairies TAG. Les patients BREAU et PATIENT_03 présentent un ratio supérieur à 1, probablement dû au faible nombre de variants somatiques détectés comparé aux autres patients.

Les p-value des tests de student entre les deux conditions (TRUvsTAG100 & TRUvsTAG300) sont supérieures au seuil de 5%, ainsi, il n'y a pas de différence significative entre les SNVs et Indels pour ces 2 kits.

6.4.4 Précision, Recall et F1-Score

Les indicateurs de performance Précision et Recall ont été calculés avec des seuils de VAF adaptés à la cellularité tumorale de chaque patient (c.a.d éliminer les SNVs de faible VAF, correspondant essentiellement aux erreurs de séquençage). Les SNVs détectés dans les échantillons TRU servent de référence pour les différents calculs. La Précision donne une indication sur les faux positifs (= FP, c.-à-d. les SNVs trouvés uniquement dans les échantillons TAG) et le Recall sur la part des faux négatifs (=FN, c.-à-d. les SNVs trouvés uniquement dans les échantillons TRU).

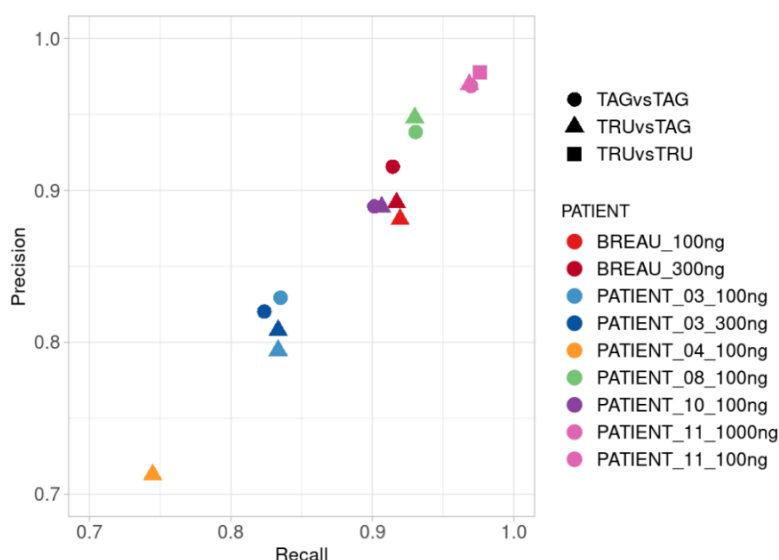


Figure 2: Représentation des valeurs du pourcentage de Précision et Recall selon les patients

- Les pourcentages de Recall et de Précision sont satisfaisants pour l'ensemble des patients, exceptés pour le PATIENT_04 possédant un F1-Score seulement de 73%.
- Bonne corrélation entre les deux inputs (100ng & 300ng) pour le kit TAG, visible sur les patients BREAU et PATIENT_03 (représenté par les nuances claires/foncées).
- Performances similaires lors des comparaisons TAGvsTAG (duplicats) et TRUvsTAG pour l'ensemble des patients.

- **Les librairies TRU se comportent comme des duplicats TAG (et inversement)**, Appuyé, par l'ajout du F1-Score du PATIENT_11 réalisé également en duplicat par le kit TRU (TRUvsTRU, représenté par le carré rose).

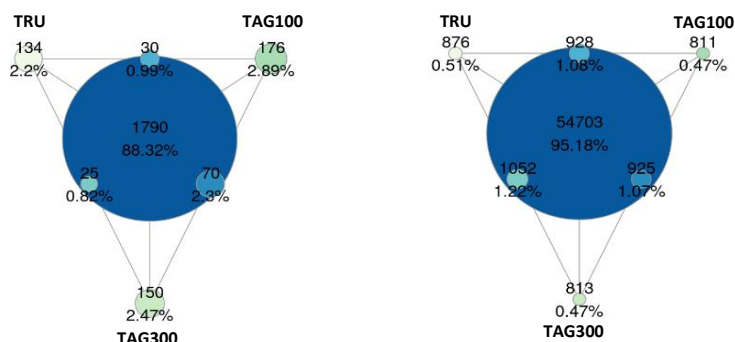


Figure 3: Diagramme de Venn représentant les SNVs communs et spécifiques selon la librairie séquencée sur les patients BREAU (à gauche) et PATIENT_11 (à droite)

Présence de nombreux variants communs (>88% et >95%) entre les deux versions de kits et entre inputs TAG 100ng et 300ng. De même, la cohérence dans le pourcentage de variants spécifiques entre chaque librairie, montre que les erreurs de séquençage sont comparables quel que soit le kit testé. Ainsi, une clusterisation et une stabilité des résultats sont obtenues par patient et non en fonction du kit des librairies TRU ou TAG : **les performances sont équivalentes.**

6.4.5 Genotype Concordance

Le pourcentage de concordance génotypique sur les variants somatiques communs est calculé à l'aide du logiciel GATK (GenotypeConcordance). Les résultats sont la comparaison des kits TRU et TAG.

Echantillon	TRU vs TAG	VARIANT_TYPE	% GENOTYPE CONCORDANCE
BREAU	TAG100-1	SNP	98,05
		INDEL	93,71
	TAG300-1	SNP	98,14
		INDEL	94,08
PATIENT_03	TAG100-1	SNP	97,84
		INDEL	95,97
	TAG300-1	SNP	97,9
		INDEL	96,05
PATIENT_04	TAG100	SNP	86,96
		INDEL	92,5
PATIENT_08	TAG100-1	SNP	94,02
		INDEL	94,48
PATIENT_10	TAG100-1	SNP	92,58
		INDEL	94,72
PATIENT_11	TAG100-1	SNP	97,67
		INDEL	95,36

Le pourcentage de concordance génotypique est identique entre les deux versions de kits de librairie et entre les deux inputs (100ng et 300ng) pour TAG.

6.4.6 Signatures mutationnelles - Spectrum Mutations/96 mutational profile

La caractérisation des signatures mutationnelles est réalisée en utilisant uniquement les substitutions de base et les informations incluses dans la séquence contextuelle de chaque mutation. Il y a donc 6 classes de substitutions

et 96 mutations possibles dans la classification regardée. Le package R MutationalPatterns (V3.8.0 ; <http://bioconductor.org/packages/MutationalPatterns>) [8] a été utilisé à cet effet.

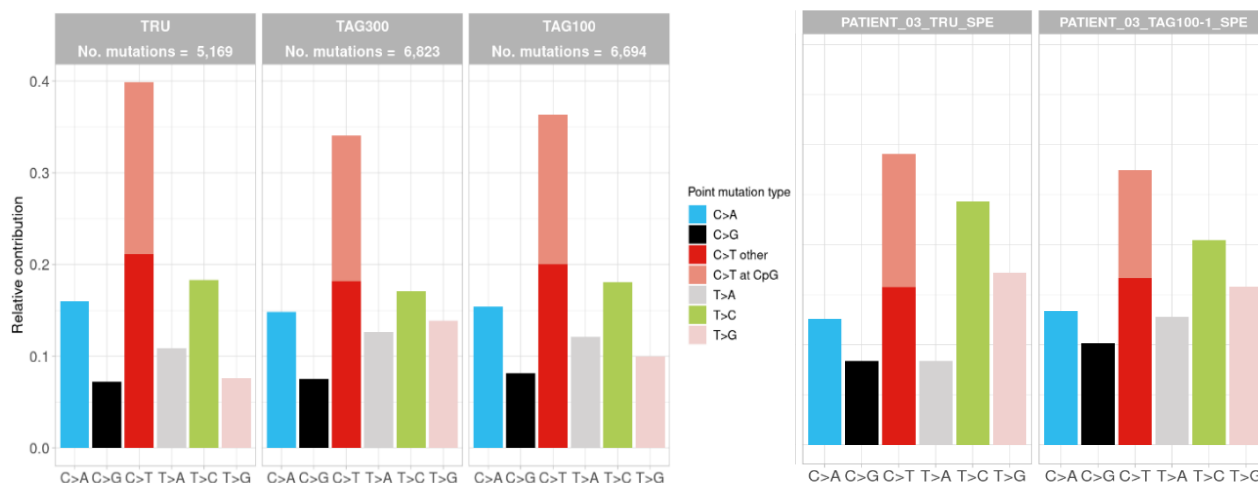


Figure 4: Répartition des six classes de substitutions sur les mutations somatiques de type « Passed » (régions de haute confiance, downsampling intra-patient et VAF >0). A gauche, distribution généralisée pour l'ensemble des patients et selon le type de librairie. A droite, distribution des classes des SNVs spécifiques selon les librairies TRU et TAG sur le PATIENT_03

La répartition des 6 classes de substitution est similaire entre les librairies TRU et TAG et également entre les 2 inputs (100ng & 300ng). Un exemple sur le PATIENT_03 montre la distribution sur les SNVs spécifiques de chaque librairie, aucune disparité visible.

Le profil des 96 mutations est comparé au catalogue des signatures mutationnelles connues défini par COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/sbs/>). Les Single Base Substitutions (SBS) présentant une contribution relative d'au moins 10% avec le profil mutationnel du patient sont conservées.

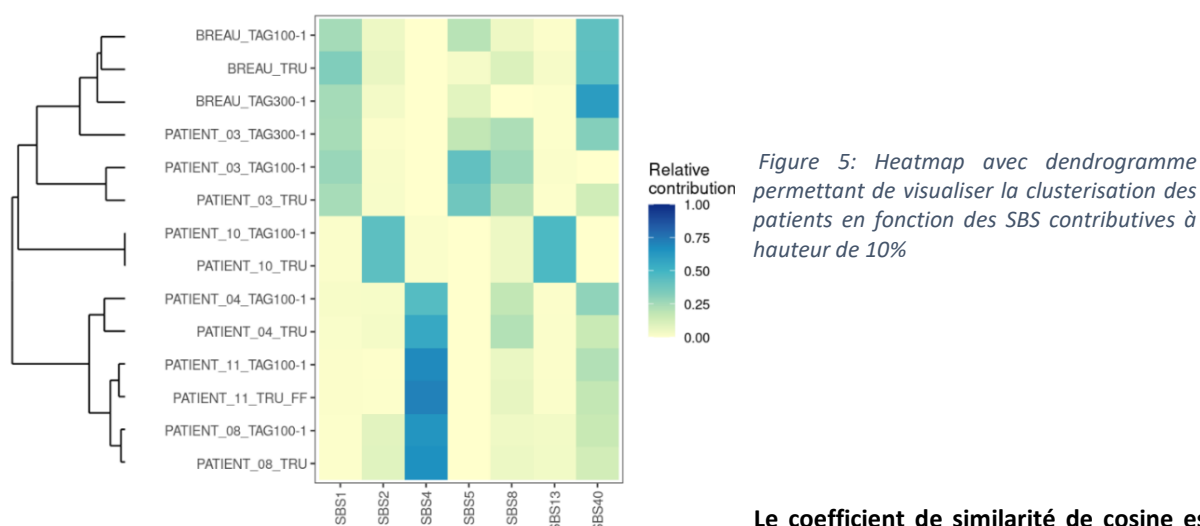



Figure 5: Heatmap avec dendrogramme permettant de visualiser la clusterisation des patients en fonction des SBS contributives à hauteur de 10%

Le coefficient de similarité de cosinus est supérieur à 0,99 entre les profils des librairies TRU et TAG, et ce pour tous les patients. Les SBS COSMIC sont semblables entre les librairies TRU et TAG et **les patients clusterisent parfaitement ensemble au sein de la heatmap.**

6.4.7 Hotspots - catalogue Cancer Genome Interpreter (2700 hotspots)

N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 11/16		

La liste de hotspots du catalogue de CancerGenomeInterpreter (CGI ; <https://www.cancergenomeinterpreter.org/mutations>) est utilisée pour faciliter l'identification des altérations tumorales de patients qui pourrait être cliniquement exploitables. CGI s'appuie sur des méthodes computationnelles ainsi que sur des connaissances collectées dans le domaine public (DoCM, ClinVar, OncoKB). Cette liste de hotspots est composée de 2 749 mutations. L'idée ici est de s'assurer que le kit TAG n'altère pas la découverte des hotspots s'il en existe dans les bibliothèques TRU (ou inversement).

Les résultats et positions de l'analyse de Mutect2 sont comparés à celles de la liste de hotspots CGI, aucun critère sur le champ FILTER, ni de filtre sur la VAF n'est appliqué.

Echantillon	Gene	HGVSc	HGVSp	VAF	Depth (X)
BREAU_TRU	PIK3CA	c.3140A>T	p.H1047L	31,40%	86
BREAU_TRU	ERBB2	c.2264T>C	p.L755S	14,00%	186
BREAU_TAG100-1	PIK3CA	c.3140A>T	p.H1047L	25,60%	86
BREAU_TAG100-1	ERBB2	c.2264T>C	p.L755S	6,50%	139
BREAU_TAG300-1	PIK3CA	c.3140A>T	p.H1047L	25,70%	70
BREAU_TAG300-1	ERBB2	c.2264T>C	p.L755S	16,10%	137
PATIENT_04_TRU	KRAS	c.34G>T	p.G12C	14,30%	56
PATIENT_04_TAG100-1	KRAS	c.34G>T	p.G12C	10,80%	74
PATIENT_08_TRU	KRAS	c.33_34delinsCT	p.G12C	21,90%	64
PATIENT_08_TAG100-1	KRAS	c.33_34delinsCT	p.G12C	18,20%	77
PATIENT_10_TRU	TP53	c.638G>A	p.R213Q	28,20%	85
PATIENT_10_TAG100-1	TP53	c.638G>A	p.R213Q	30,70%	101
PATIENT_11_TRU	KRAS	c.35G>T	p.G12V	36,60%	101
PATIENT_11_TAG100-1	KRAS	c.35G>T	p.G12V	36,60%	123


Pas de perte de hotspots entre les comparaisons des bibliothèques, et sont tous retrouvés comme « Passed » lors de l'analyse Mutect2. **Les VAF sont comparables entre elles**, sauf pour le gène ERBB2 pour le patient BREAU où la VAF varie entre 6% (TAG100ng) et 14% à 16% respectivement pour le kit TRU et TAG300ng.

6.4.8 Copy Number Alteration

Les CNAs (Copy Number Alteration) sont obtenues en analysant les paires appariées PBMC-FF_TRU et PBMC-FF_TAG par le logiciel FACETS (bioconductor/3.13) [5], l'échantillon PBMC servant de normal apparié.

Le nombre d'évènements de CNAs entre les bibliothèques TRU et TAG diverge selon les patients. La bibliothèque TRU du PATIENT_11 présente un nombre d'amplifications et de gains plus important (3 fois plus) que pour la bibliothèque TAG. Cette même tendance est visible sur le PATIENT_10. Inversement, la bibliothèque TAG pour le patient BREAU montre un nombre de LOH légèrement supérieur (1,5 fois) mais observé uniquement avec l'input à 300ng.

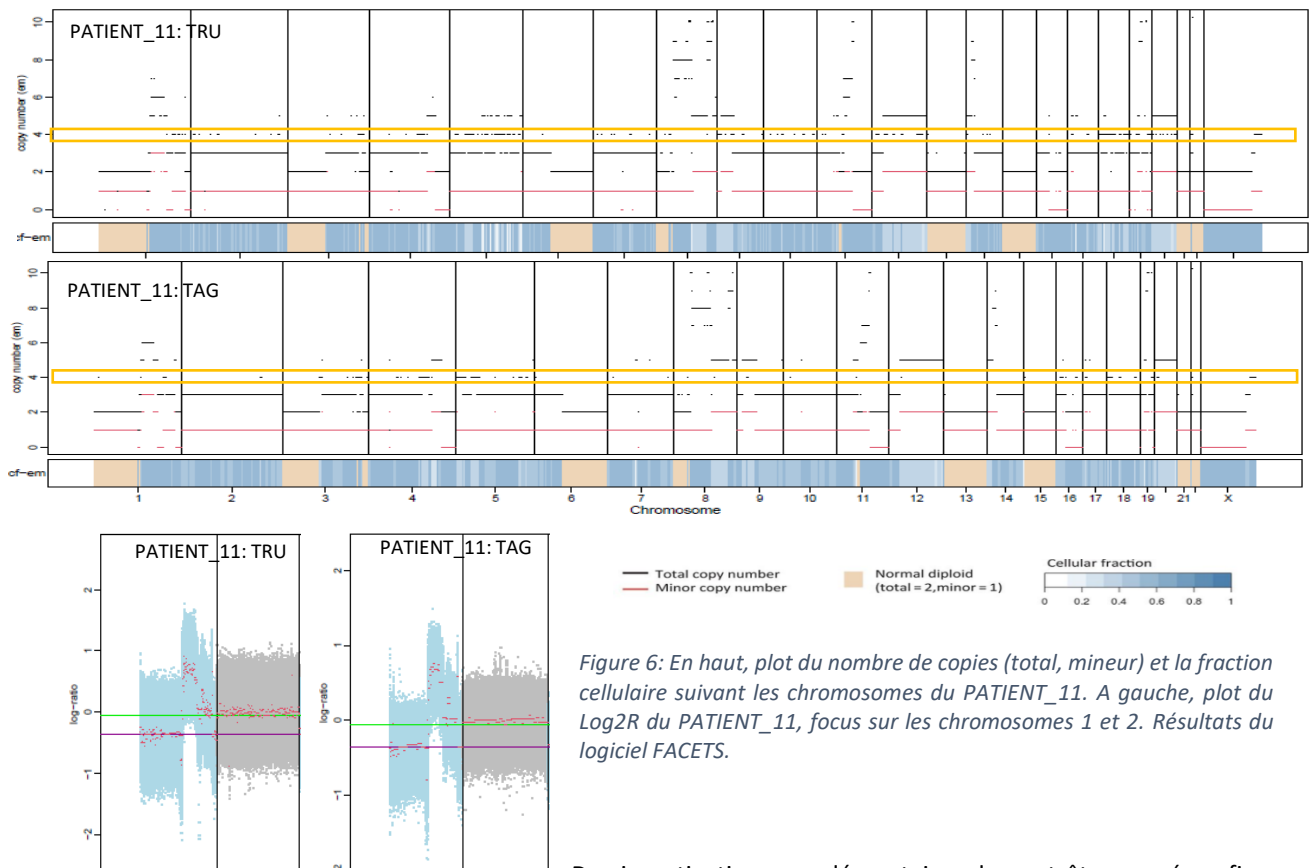
	Total	Ratio TAG/TRU	Amplification (>=6 copies)	Gain	cnLOH	LOH	Loss	Uniparental Gain
BREAU_TRU	243		65	81	0	95	2	0
BREAU_TAG100-1	241	1	65	91	0	83	2	0
BREAU_TAG300-1	301	1,2	73	105	0	123	0	0

N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 12/16		


PATIENT_03_TRU	50		0	41	1	8	0	0
PATIENT_03_TAG100-1	46	1	0	36	1	8	1	0
PATIENT_03_TAG300-1	52	1,1	0	43	1	8	0	0
PATIENT_04_TRU	118		1	70	13	17	4	13
PATIENT_04_TAG100-1	338	2,9	1	62	25	135	101	14
PATIENT_08_TRU	324		27	205	27	4	2	59
PATIENT_08_TAG100-1	341	1,1	25	207	25	8	10	66
PATIENT_10_TRU	1565		109	1169	126	8	1	152
PATIENT_10_TAG100-1	1324	0,9	95	957	152	18	1	101
PATIENT_11_TRU	1345		130	1092	97	10	1	15
PATIENT_11_TAG100-1	467	0,3	57	371	32	2	0	5

Tableau 4: Tableau comparatif des évènements de CNAs (gains et pertes) détectés parmi les bibliothèques TRU et TAG.

Pour le PATIENT_11, la bibliothèque TRU a occasionné un signal légèrement plus perturbé dans la détermination du nombre de copies (régions gagnées, encadré jaune sur la figure n°6), la cause principale étant une plus grande dispersion dans les valeurs de log2R que les bibliothèques TAG. Cette variabilité semble avoir une distribution aléatoire et uniforme sur le génome.



Des investigations supplémentaires devront être menées afin d'éclaircir ce phénomène, une première piste pourrait être la variabilité dans les dépôts des batches de séquençage. Aussi, d'autres logiciels pourront également être testés.

N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 13/16		

6.4.9 Variants structurels

Le logiciel d'Illumina Manta (v1.0.3) [9] est utilisé pour la détection de variants structurels ou SVs de tous types (délétions, duplications, insertions, translocations et remaniements complexes) en utilisant les approches « split-reads » (ou reads chimériques) et « paired-reads ». L'approche de cette méthode est l'assemblage local d'un sous ensemble de lectures d'intérêt, qui permet de valider la présence d'un variant de structure et d'affiner sa position sur le génome.

La fusion et la comparaison des événements au sein de chaque patient est réalisé à l'aide du logiciel SURVIVOR (v1.0.3) [10] à partir de fichiers vcf (régions de haute confiance et downsampling). Une distance maximale de 1kb est paramétrée permettant la fusion des événements. Les résultats sont ensuite annotés avec le logiciel AnnotSV (v3.1) [11], un chevauchement de 70% est autorisé permettant la caractérisation génomique pertinentes des résultats : annotation des gènes, des éléments régulateurs, annotation de base de données (1000 Genomes, GnomAD, ...), pathogénicité ...

	Whole Genome	Cancer Genes	ACMG Genes
BREAU_TRU	327	128	19
BREAU_TAG300-1	360	140	21
Ratio	1.1	1.1	1.1
BREAU_TAG100-1	355	139	20
Ratio	1.1	1.1	1.1
PATIENT_10_TRU	355	98	34
PATIENT_10_TAG100-1	373	99	37
Ratio	1.1	1	1.1
PATIENT_11_TRU	226	45	14
PATIENT_11_TAG100-1	233	45	13
Ratio	1.0	1.0	0.9

Tableau 5: Répartition des événements de SVs selon 3 catégories de régions génomiques. Seuls les SVs considérés comme PASS par le logiciel Manta sont représentés ici.

De façon globale, un ratio de 1 est obtenu après comparaison des événements de SVs entre les librairies TRU et TAG et entre les différents inputs (100ng vs 300ng) : **aucune disparité n'est visible**. Des résultats similaires pour les patients non présentés dans le tableau ci-avant sont obtenus.


7 LES POINTS DE VIGILANCES

Les points de vigilances déjà évoqués dans le document n° 20221109_RT07 sont toujours à prendre en considération. Pour rappel :

- le dosage des librairies (librairies en simple brin),
- la création du pool,
- l'influence des index sur le rendement du séquençage,
- le nombre de librairies par Flow Cell, lié à un taux de duplicats plus important,
- la capacité de re-dépôt, liée à une plus faible quantité de librairies générées,

Concernant les régions riches en GC, le CRefIX a noté **un léger gain d'uniformité** avec une quantité de 300 ng par rapport à 100 ng. Malgré une légère baisse de l'uniformité dans le cas des expériences à 100 ng, **cet impact semble minime**.


L'analyse des CNAs étant sujet à plusieurs facteurs (logiciels, design d'expérience, ...) le CRefIX ne statue pas sur l'équivalence entre les deux kits, et attire l'attention des futurs utilisateurs sur ce point. Des analyses supplémentaires sont en cours.

N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 14/16		

8 CONCLUSION GENERALE


	TRU	TAG	Commentaires
Quantité	☹️ --	😊 ++	1/10 en moins
Temps	☹️ --	😊 ++	1h30 au lieu de 5h00
Bio-IT	😊 ++	😊 ++	- Aucune disparité visible sur les indicateurs de performances
GC Biais	😊 ++	100ng : 😊 + 300ng : 😊 ++	- Gain d'uniformité sur les régions GC pour le kit TAG à 300ng, - Valeurs d'uniformité moins efficaces dans les régions AT et GC riche pour l'input à 100ng pour TAG
Pureté et Ploïdie	😊 ++	😊 ++	- Estimation de la pureté tumorale et ploïdie similaires entre les deux versions de kits
Général Overview	😊 ++	😊 ++	- Nombre de variants PASS et FAILED similaires (Ratio=1) entre les deux versions de kits - Différence non significative (P-value > 5%) - Aucune disparité visible sur les différentes métriques
Précision, Recall, F1 score	😊 ++	😊 ++	- La précision, le % de Recall et le F1-score >= à 80% - Performances similaires entre les résultats TAGvsTAG, TRUvsTAG et TRUvsTRU
Signature mutationnelle	😊 ++	😊 ++	- Les profils mutationnels sont identiques entre les deux versions de kits - Coefficients de similarité de cosine sont >=0,99 (~ à 1) - Corrélations des patients prouvées entre les deux versions de kits
Hotspots	😊 ++	😊 ++	- Pas de perte de hotspots - VAF similaires (sauf pour 1 hotspot pour le patient BREAU_TAG100-1)
CNAs	☹️ -	☹️ -	- Profils similaires entre les deux versions de kits - Disparités visibles sur le nombre d'évènements entre les deux kits (Ratio != 1) - Plus d'amplifications/Gains pour le kit TRU et plus de LOH pour le kit TAG
SVs	😊 ++	😊 ++	-Nombre d'évènements similaires entre les deux versions de kits (Ratio ~1)

Au vu des avantages liés à ce kit, le CRefIX considère qu'il peut être utilisé dans le cas d'échantillons tumoraux. Selon la qualité de l'échantillon, il est **possible de réaliser** des bibliothèques avec une quantité de **matrice de 100ng**. Si la quantité initiale n'est pas limitante, **le CRefIX recommande une quantité de 300ng**.

N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 15/16		

9 DOCUMENTS

- Illumina DNA PCR-Free Reference Guide :
Comprehensive information on Illumina DNA PCR-Free Library Prep, including a detailed protocol. Ref Document # 1000000086922 v03 (February 2021)
 - TRUSEQ PCR free
 - Illumina DNA PCR-Free Checklists :
 - Illumina DNA PCR-Free Library Prep Standard Input Checklist Ref Document # 1000000086923 (Jul 21, 2020)
 - Illumina DNA PCR-Free Library Prep Low Input Checklist Ref Document # 1000000130333 (Jul 21, 2020)
 - Illumina DNA PCR-Free Library Prep Hybex Protocol Checklist Ref Document # 1000000130364 (Jul 21, 2020)
 - Bruinsma S, et al. Bead-linked transposomes enable a normalization-free workflow for NGS library preparation. *BMC Genomics*. 2018 Oct 1;19(1):722.
- [1] The full BWA package is distributed under GPLv3 as it uses source codes from BWT-SW which is covered by GPL. Sorting, hash table, BWT and IS libraries are distributed under the MIT license.
- [2] Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19505943; PMCID: PMC2723002.
- [3] Pedersen BS, Quinlan AR. Mosdepth: quick coverage calculation for genomes and exomes. *Bioinformatics*. 2018 Mar 1;34(5):867-868. doi: 10.1093/bioinformatics/btx699. PMID: 29096012; PMCID: PMC6030888.
- [4] Calling Somatic SNVs and Indels with Mutect2. David Benjamin, Takuto Sato, Kristian Cibulskis, Gad Getz, Chip Stewart, Lee Lichtenstein bioRxiv 861054; doi: <https://doi.org/10.1101/861054>
- [5] Shen R, Seshan VE. FACETS: allele-specific copy number and clonal heterogeneity analysis tool for high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2016 Sep 19;44(16):e131. doi: 10.1093/nar/gkw520. Epub 2016 Jun 7. PMID: 27270079; PMCID: PMC5027494.
- [6] Chen YC, Liu T, Yu CH, Chiang TY, Hwang CC. Effects of GC bias in next-generation-sequencing data on de novo genome assembly. *PLoS One*. 2013 Apr 29;8(4):e62856. doi: 10.1371/journal.pone.0062856. PMID: 23638157; PMCID: PMC3639258.
- [7] Shen R, Seshan VE. FACETS: allele-specific copy number and clonal heterogeneity analysis tool for high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2016 Sep 19;44(16):e131. doi: 10.1093/nar/gkw520. Epub 2016 Jun 7. PMID: 27270079; PMCID: PMC5027494.
- [8] RTG Tools: Utilities for accurate VCF comparison and manipulation. <https://github.com/RealTimeGenomics/rtg-tools>
- [9] Manders F, Brandsma AM, de Kanter J, Verheul M, Oka R, van Roosmalen MJ, van der Roest B, van Hoeck A, Cuppen E, van Boxtel R. MutationalPatterns: the one stop shop for the analysis of mutational processes. *BMC Genomics*. 2022 Feb 15;23(1):134. doi: 10.1186/s12864-022-08357-3. PMID: 35168570; PMCID: PMC8845394.
- Blokzijl F, Janssen R, van Boxtel R, Cuppen E. MutationalPatterns: comprehensive genome-wide analysis of mutational processes. *Genome Med*. 2018 Apr 25;10(1):33. doi: 10.1186/s13073-018-0539-0. PMID: 29695279; PMCID: PMC5922316.
- [10] Chen X, Schulz-Trieglaff O, Shaw R, Barnes B, Schlesinger F, Källberg M, Cox AJ, Kruglyak S, Saunders CT. Manta: rapid detection of structural variants and indels for germline and cancer sequencing applications. *Bioinformatics*. 2016 Apr 15;32(8):1220-2. doi: 10.1093/bioinformatics/btv710. Epub 2015 Dec 8. PMID: 26647377.
- [11] Transient structural variations have strong effects on quantitative traits and reproductive isolation in fission yeast. Jeffares, Daniel C; Jolly, Clemency; Hoti, Mimoza; Speed, Doug; Shaw, Liam; Rallis, Charalampos; Balloux, Francois; Dessimoz, Christophe; Bähler, Jürg; Sedlazeck, Fritz J. *Nature communications*, Vol. 8, 14061, 24.01.2017, p. 1-11. DOI:10.1038/NCOMMS14061; <https://github.com/fritzsedlazeck/SURVIVOR>
- [12] Geffroy V, Guignard T, Kress A, Gaillard JB, Solli-Nowlan T, Schalk A, Gatinois V, Dollfus H, Scheidecker S, Muller J. AnnotSV and knotAnnotSV: a web server for human structural variations annotations, ranking and analysis. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jul 2;49(W1):W21-W28. doi: 10.1093/nar/gkab402. PMID: 34023905; PMCID: PMC8262758

N°: 20230315_DT02 Version : 01 Date : 15/03/2023	Document Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Illumina® DNA PCR-Free Prep	
Page 16/16		

10 HISTORIQUE DES MODIFICATIONS

Version	Date	Nature de la modification
V01	15/03/2023	Revue et correction
V00	01/02/2023	Création

11 VALIDATION DU DOCUMENT

RÉDACTEURS	RELECTEURS
Edouard Turlotte, Mélanie Letexier	Jean François Deleuze, Alain Viari, Violette Turon
PLAN EXPERIMENTAL	Fonction : Direction Unité
Edouard Turlotte, Margaux Gras, Alice Moussy	Date : 22/03/2023
ANALYSE	Visa :
Mélanie Letexier, Marine Rouillon	
Date : 22/03/2023	
Visa :	