



SarcomaFusion



FRANCAIS

Notice d'utilisation GENEXPATH SarcomaFusion.

Précautions d'utilisation.

CE Dispositif médical de diagnostic *in vitro* selon la directive (UE) 98/79/CE

IVD Pour un usage de diagnostic *in vitro*

Il est réservé à un usage professionnel.

Prendre connaissance de l'ensemble des informations portées sur la présente notice avant utilisation.

Contacts :

Fabricant : GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen - France

contact@genexpath.com

support@genexpath.com

Précautions importantes.....	5
Recommandations générales.....	5
Pictogrammes	5
Utilisation prévue.....	6
Principe du test.....	6
Réactifs.....	8
Contenu du kit de réactifs GENEXPATH SarcomaFusion	8
Format des kits de réactifs commercialisés et quantités	8
Réactifs non fournis dans le kit de réactifs	9
Matériels nécessaires	9
Avant de commencer.....	10
Echantillons biologiques.....	10
Programmation des Thermocycleurs	10
Programme 1 : Pré PCR.....	10
Programme 2 : PCR.....	11
Protocole détaillé.....	11
Etape 1 : Transcription inverse.....	11
Réactifs nécessaires	11
Transcription inverse	11
Etape 2 : Hybridation des sondes.....	12
Réactifs nécessaires	12
Hybridation des sondes	12
Etape 3 : Ligation.....	13
Réactifs nécessaires	13
Ligation	13
Etape 4 : Amplification et incorporation des barcodes et adaptateurs	14
Réactifs nécessaires	14
Amplification.....	14
Etape 5 : Purification et dosage des librairies de séquençage	15
Réactifs nécessaires	15
Etape 5.a : Purification des librairies de séquençage	15
Etape 5.b : Dosage des librairies de séquençage.....	15
Etape 6 : Dilution, pool et séquençage des librairies	15

Réactifs nécessaires	16
Séquençage sur un séquenceur Illumina MiSeq	16
• Etape 6.a : Dilution et pool des librairies	16
• Etape 6.b : Dénaturation et dilution du pool de librairies	16
• Etape 6.c : Préparation des amorces de séquençage	16
• Etape 6.d : Préparation de la feuille d'injection	17
• Etape 6.e : Lancement du séquençage	17
Séquençage sur une plateforme NextSeq 500/550 Illumina	17
• Etape 6.a : Dilution et pool des librairies	17
• Etape 6.b : Dénaturation et dilution du pool de librairies	18
• Etape 6.c : Préparation des amorces de séquençage	18
• Etape 6.d : Préparation de la feuille d'injection	18
• Etape 6.e : Lancement du séquençage	18
Etape 7 : Analyse des résultats	19
Limites de la procédure	19
Caractérisation de performances	20
Performances analytiques sur des échantillons de référence	20
Tableau 1 : récapitulatif des résultats	20
Performances analytiques sur une cohorte de patients	21
Répétabilité	21
<i>Répétabilité intra-run</i>	21
<i>Répétabilité inter-runs</i>	22
Reproductibilité	23
Sensibilité analytique	24
Bibliographie	25
Tableau des symboles	26
Notes	26

Précautions importantes.

Recommandations générales.

- Utilisable pour le diagnostic *in vitro*
- Respecter les bonnes pratiques de laboratoires relatives aux manipulations de produits de PCR (porter une blouse et des gants jetables, délimiter des zones dédiées pré et post PCR, utiliser des cônes à filtre).
- Prendre également des précautions afin d'éviter les contaminations par des nucléases susceptibles d'induire une dégradation des ARN et des ADN (utiliser des consommables et des réactifs nuclease-free).
- S'assurer que les thermocycleurs sont en bon état de fonctionnement et calibrés suivant les recommandations du constructeur.
- Il est particulièrement important de ne pas substituer les réactifs non fournis dans le kit, en particulier les tampons et enzymes utilisés aux étapes de transcription inverse, ligation et amplification par PCR. Les temps et températures d'incubation ainsi que les volumes et concentrations doivent également être respectés.
- Le kit pour test **SarcomaFusion** contient un contrôle positif interne GAPDH. Il est fortement recommandé de le réaliser pour valider la bonne réalisation de votre expérience.
- Les réactifs **GENEXPATH SarcomaFusion** sont destinés uniquement à une utilisation sur les plateformes de séquençage Miseq ou Nextseq 500/550 d'Illumina.
- Les fiches de données de sécurité sont disponibles sur l'espace utilisateur.
- Si l'utilisateur détecte des erreurs dans les instructions fournies : adressez un e-mail à contact@genexpath.com.
- Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif doit nous être notifié à l'adresse contact@genexpath.com.

Pictogrammes



Points importants et étapes critiques du protocole pouvant compromettre la qualité des résultats.



Etapes où le protocole peut être suspendu.

Utilisation prévue

Ce protocole est destiné à la mise en œuvre du test **GENEXPATH SarcomaFusion**. Il permet de préparer des bibliothèques de séquençage destinées aux séquenceurs Illumina de type MiSeq ou NextSeq 500/550.

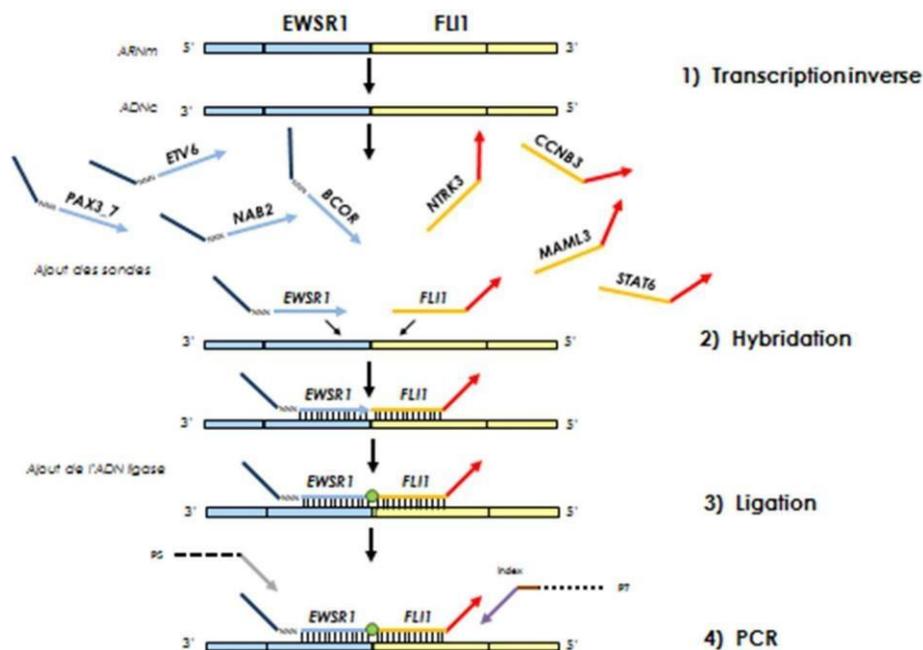
Les fichiers fastQ générés à l'aide de ce test contiennent des données relatives au comptage de séquences correspondant à la présence éventuelle d'un transcrite de fusion, c'est-à-dire à la ligation de deux sondes et à leur amplification.

Ils sont analysables grâce au logiciel **GENEXPATH RT-MIS** qui héberge une application de démultiplexage de séquences spécifique.

Ce test permet, par l'étude de 138 gènes, la détection de transcrits de fusion retrouvés dans 58 types de tumeurs des os et des tissus mous.

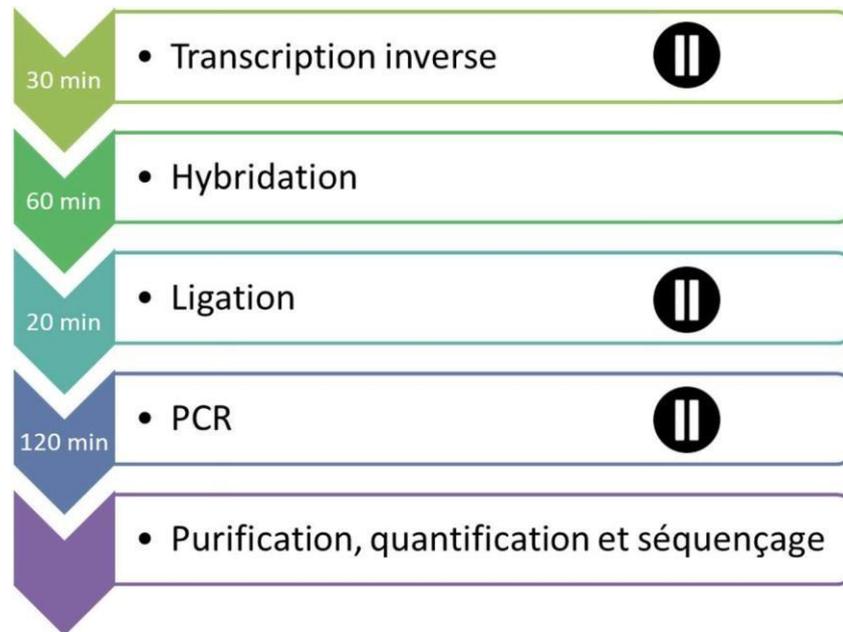
Principe du test.

Le test **GENEXPATH SarcomaFusion** repose sur une méthode de RT-PCR dépendante de ligation (LD-RT-PCR). Cette technique semi-quantitative permet de détecter des translocations chromosomiques à l'aide de couples de sondes oligo-nucléotidiques spécifiques. Un couple de sondes pour un gène de contrôle (GAPDH) est inclus dans le mix de sondes du test permettant ainsi de réaliser un contrôle interne à votre expérience.



A partir d'un extrait d'ARN total, quatre étapes sont suffisantes pour obtenir les librairies.

- Une étape de transcription inverse (RT).
- Une étape d'hybridation des sondes oligo-nucléotidiques spécifiques.
- Une étape de ligation.
- Une étape d'amplification par PCR.



Aucune purification n'est nécessaire jusqu'à l'obtention des librairies, ce qui limite les pertes de matériel et assure une très bonne sensibilité à cette technique. De plus, les séquences génétiques ciblées par les sondes sont particulièrement courtes (entre 40 et 60 bases) ce qui assure une très bonne robustesse vis-à-vis de la dégradation des ARN.

La LD-RT-PCR est donc une approche particulièrement adaptée à l'analyse d'échantillons biologiques difficiles comme les biopsies tissulaires fixées et incluses en paraffine.

Pour chaque échantillon, environ 10^5 séquences sont suffisantes pour obtenir un profil d'expression analysable, ce qui permet de tester un grand nombre d'échantillons en parallèle sur une même FlowCell de séquençage. Les librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** peuvent également être chargées en même temps que d'autres librairies de séquençage, générées par d'autres méthodes.

Réactifs.

Contenu du kit de réactifs GENEXPATH SarcomaFusion.

Mix de sondes GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SFPM
Barcodes GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BC-xxx
Amorce de séquence GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SP-001

Barcodes GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BCC-xxx
Amorce de séquence GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SP-002

XXX : n° de barcode

A réception, ces réactifs doivent être conservés entre -25°C et -15°C.

Ils sont prêts à l'emploi et n'ont pas besoin d'être dilués.

La durée de vie des réactifs est de 1 an.

Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation.

Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Format des kits de réactifs commercialisés et quantités :

	Kit de réactifs - U = nombre d'analyses			
	8U	16U	24U	48U
Mix de sondes GEP-SFPM	30 µL	48 µL	54 µL	108 µL
Barcodes GEP-BC-xxx (de 001 à 032 en fonction du nombre d'analyses achetées) BC=barcode	8 BC	8 BC	12 BC	24 BC
	N°017 à 024	N°001 à 008	N°021 à 032	N°001 à 024
	5 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC
Amorces de séquence GEP-SP-001	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL
Pour le contrôle interne				
Barcodes GAPDH GEP-BCC-xxx (de 001 à 032 en fonction du nombre d'analyses achetées) BCC=barcode de contrôle	8 BCC	8 BCC	12 BCC	24 BCC
	N°017 à 024	N°001 à 008	N°021 à 032	N°001 à 024
	5 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC
Amorces de séquence GAPDH GEP-SP-002	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL

Les réactifs sont fournis en quantité plus importante que le besoin réel. A l'issue du nombre d'analyses commandées, ils doivent être jetés. Si une nouvelle commande est passée, les réactifs seront livrés en conséquence.

Pour un kit de réactifs de plus de 8 analyses, chaque barcode sera à utiliser pour 2 analyses différentes.

Réactifs non fournis dans le kit de réactifs :

<i>Réactifs</i>	<i>Fournisseurs et références</i>
SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, ref 11754250
SALSA MLPA Buffer	MRC Holland, ref SMR33
SALSA Ligase Buffer A	MRC Holland, ref SMR12
SALSA Ligase Buffer B	MRC Holland, ref SMR13
SALSA Ligase 65	MRC Holland, ref SMR20
Red'y' Star PCR Mix	Eurogentec, ref PK-0073-02R
AMPure XP (billes magnétiques)	Beckman Coulter, ref A63880
Qubit® dsDNA HS Assay	Fisher Scientific, ref 10616763
Réactifs de séquençage	Illumina
Tampon TE (10 mM Tris-Acetate pH 8.0, 1 mM EDTA)	Variable
Ethanol 100%	Variable
NaOH 1 N	Variable
Tris Buffer 200 mM pH 7	Variable
Eau Nuclease Free	Variable

A réception et entre chaque utilisation, ces réactifs doivent être conservés en suivant les recommandations des différents fournisseurs.

Matériels nécessaires :

Matériel	Fournisseurs et références
Thermocycleur en zone pré-PCR	Variable
Thermocycleur en zone post-PCR	Variable
Qubit® Fluorometer (ou équivalent)	Thermo Fisher Scientific, ref Q33238
Qubit® Assay Tubes	Fisher Scientific, ref 12037609
DynaMag™-96 Side Magnet - Plaque aimantée (purification AMPure XP)	Thermo Fisher Scientific, ref 12331D
Tubes et plaques PCR 200 µL	Variable

Avant de commencer.

Echantillons biologiques.

Le test **GENEXPATH SarcomaFusion** permet de préparer des bibliothèques de séquençage à partir d'ARN totaux extraits de tissus ou de biopsies tumorales de sarcomes (tumeurs des os et tissus mous).

Ces échantillons peuvent être frais, congelés ou fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE).

Pour l'extraction des ARN à partir de tissus fixés, il est recommandé d'utiliser le kit Promega Maxwell® RSC RNA FFPE (Promega, ref AS1440 et AS4500).

La quantité d'ARN à analyser doit être comprise entre **50 et 500 ng, dans un volume de 2,5 µL**. Si la concentration des solutions à analyser est trop élevée, ces ARN peuvent être dilués en eau nuclease free.

Programmation des Thermocycleurs.

Pour limiter les risques de contamination, utiliser deux thermocycleurs, un en zone pré-PCR et un en zone post-PCR.

Deux programmes sont nécessaires :

- Le premier permet de réaliser les trois premières étapes du protocole : **transcription inverse des ARN en ADNc, hybridation des sondes oligo-nucléotidiques et ligation**. Il doit être mis en œuvre dans le thermocycleur situé en zone pré-PCR.
- Le second permet d'amplifier les produits de ligation et d'incorporer les barcodes et adaptateurs nécessaires au séquençage. Il doit être mis en œuvre dans le thermocycleur situé en zone post-PCR.

Programme 1 : Pré PCR.

Les systèmes réactionnels étant faibles, s'assurer que la température du couvercle chauffant du thermocycleur reste à un niveau élevé (95°C) à toutes les étapes du programme pour éviter l'évaporation.



Des plages de pauses à 4°C ou 54°C sont prévues entre les différentes étapes du programme pour permettre l'ajout des réactifs nécessaires.

Etape 1 : Transcription inverse des ARN en ADNc.

- Couvercle chauffant : 95°C
- 10 minutes 25°C
- 60 minutes à 42°C
- 5 minutes 85°C
- 4°C infini

Etape 2 : Hybridation des sondes.

- Couvercle chauffant : 95°C
- 2 minutes 95°C
- 60°C infini (1h d'hybridation)

Etape 3 : Ligation.

- Couvercle chauffant : 95°C
- 54°C infini (distribution du mix de ligation)
- 15 minutes 54°C
- 5 minutes 98°C
- 4°C infini

Programme 2 : PCR.

- Couvercle chauffant : 95°C
- 6 minutes 94°C
- 35 x (30 secondes 94°C ; 30 secondes 58°C ; 30 secondes 72°C)
- 4 minutes 72°C
- 4°C infini

Protocole détaillé.

Etape 1 : Transcription inverse.

Cette étape doit être réalisée en zone pré-PCR.

Réactifs nécessaires.

- 5X Vilo reaction mix, 10X super script (SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit), eau nucléase free, extrait d'ARN totaux à tester (25 à 250 ng/ μ L).



Il est recommandé de réaliser l'ensemble de la procédure dans des tubes ou des plaques de PCR de 200 μ L.

Transcription inverse.

- Décongeler les réactifs suivants puis les conserver sur la glace ou sur un portoir réfrigérant : 5X Vilo reaction mix et 10X super script.
- Préparer un mix de transcription inverse. Pour chaque échantillon, mélanger (pour un volume total de 3 μ L par réaction) :
 - 5X Vilo reaction mix 1 μ L
 - Eau nucléase free 1 μ L
 - 10X super script 0,5 μ L
- Distribuer ce mix dans des tubes PCR de 200 μ L (2,5 μ L par tube) conservés sur la glace ou sur un portoir réfrigérant.

- Ajouter 2,5 µL de chacune des solutions d'ARN total dans les différents tubes.
- Vortexer, centrifuger brièvement.
- Placer les tubes dans le thermocycleur situé en zone pré-PCR et procéder à l'**étape 1 du programme Pré-PCR** (Transcription inverse des ARN en ADNc).



Procéder ensuite directement à l'étape 2 ou conserver les produits de ligations entre -25°C et -15°C.

Etape 2 : Hybridation des sondes.

Cette étape doit être réalisée en zone pré-PCR.

Réactifs nécessaires.

- Mix de sondes **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP- SFPM), SALSA MLPA Buffer

Hybridation des sondes.

- **A l'issue de l'étape 1**, lorsque la température du thermocycleur est redescendue à 4°C, sortir les tubes, les centrifuger brièvement, et les placer sur la glace ou sur un portoir réfrigérant.
- Décongeler le tampon Salsa MLPA buffer et le Mix de sondes **GENEXPATH SarcomaFusion**, puis les conserver sur la glace ou sur un portoir réfrigérant.
- Préparer un mix d'hybridation. Pour chaque échantillon, mélanger (pour un volume total de 3 µL par réaction) :
 - Salsa MLPA Buffer 1,5 µL
 - Mix de sonde **GENEXPATH SarcomaFusion** 1,5 µL
- Vortexer, centrifuger brièvement.
- Ajouter 3 µL de ce mix dans chacun des tubes d'ADNc.
- Centrifuger brièvement.
- Replacer les tubes dans le thermocycleur.
- Vérifier la température du couvercle chauffant (95°C).
- Procéder à l'**étape 2 du programme pré-PCR** (hybridation des sondes).

Etape 3 : Ligation.

Cette étape doit être réalisée en zone pré-PCR.

Réactifs nécessaires.

- SALSA Ligase Buffer A, SALSA Ligase Buffer B, SALSA Ligase 65, Eau nuclease free.

Ligation.

- 15 minutes avant la fin de l'étape 2, décongeler les tampons SALSA Ligase Buffer A et SALSA Ligase Buffer B et les conserver sur la glace ou sur un portoir réfrigérant.
- Placer l'enzyme SALSA ligase 65 sur la glace ou sur un portoir réfrigérant.
- Préparer un mix de ligation. Pour chaque échantillon, mélanger (pour un volume total de 32 µL par réaction) :
 - o Eau nuclease free 25 µL
 - o Salsa Ligase Buffer A 3 µL
 - o Salsa Ligase Buffer B 3 µL
- Vortexer, centrifuger brièvement
 - o Salsa Ligase 65 1 µL
- Vortexer, centrifuger brièvement.
- A l'issue des 60 minutes d'incubation, procéder à **l'étape 3 du programme pré-PCR (ligation)**.
- Abaisser la température du bloc chauffant à 54°C.
- Ajouter 32 µL du mix de ligation directement dans chaque tube, sans les sortir du bloc chauffant.
- Après distribution du mix, procéder à l'étape suivante du programme (15 minutes à 54°C, 5 minutes à 98°C).



A l'issue de cette étape, lorsque la température du bloc PCR est redescendue à 4°C procéder immédiatement à l'étape 4 (amplification par PCR) ou congeler les produits de ligations (entre -25°C et -15°C).



Après cette étape, ne pas conserver les produits à des températures plus élevées (par exemple 4°C ou à température ambiante) afin d'éviter les ligations non spécifiques qui pourraient résulter d'une activité résiduelle de l'enzyme.

Etape 4 : Amplification et incorporation des barcodes et adaptateurs.

A cette étape, les produits de ligation sont amplifiés par PCR grâce aux queues additionnelles présentes aux extrémités des sondes. Ces amplifications sont réalisées à l'aide de couples d'amorces fournis dans les tubes de Barcodes **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx).

Pour permettre l'analyse de plusieurs échantillons sur une même FlowCell, l'amorce de PCR 3' porte un barcode moléculaire qui sera reconnu par l'algorithme de démultiplexage de la plateforme **GENEXPATH RT-MIS**.

Pour réaliser le contrôle interne avec les sondes GAPDH, deux PCR différentes sont réalisées, il faut donc dupliquer votre nombre de tubes. Pour un échantillon donnée, il faut utiliser le même numéro xxx de barcodes GEP-BC-xxx et GEP-BCC-xxx pour l'analyse informatique. Donc il faut ajouter, pour chaque échantillon, dans un tube le barcode GEP-BC-xxx et dans l'autre le barcode GEP-BCC-xxx associé.

Réactifs nécessaires.

- Barcodes **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx), Barcodes GAPDH **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BCC-xxx), Red'y' Star PCR Mix, eau nuclease free.

Amplification.

- Préparer un mix d'amplification en zone pré-PCR. Pour chaque échantillon, mélanger (pour un volume total de 18 µL par réaction) :
 - o Red'y' Star PCR Mix 12,5 µL
 - o Eau nuclease free 5,5 µL
- Vortexer, centrifuger brièvement.
- Distribuer 18 µL de ce mix d'amplification dans différents puits d'une plaque PCR.
- Ajouter 5 µL des produits de ligation générés à l'étape 3 dans chacun des puits.
- Ajouter 2 µL de Barcode **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx ou GEP-BCC-xxx selon le test).

Utiliser des barcodes BEP-BC-xxx différents pour chacun des échantillons testés mais pour un même échantillon, utiliser le même numéro pour BEP-BC-xxx et GEP-BCC-xxx.



- Placer la plaque dans le thermocycleur en zone post-PCR.
- Lancer le **programme 2** (PCR).



A la fin du programme, lorsque la température du thermocycleur est redescendue à 4°C, procéder rapidement à l'étape 5 (Purification) ou congeler les produits d'amplification entre -25°C et -15°C.



Ne pas conserver ces produits de façon prolongée à des températures plus élevées (par exemple 4°C dans le thermocycleur ou à température ambiante).

Etape 5 : Purification et dosage des librairies de séquençage.

A l'issue de l'étape d'amplification, les librairies de séquençage doivent être purifiées pour éliminer les amorces de PCR et les nucléotides non incorporés. Cette purification est réalisée à l'aide de billes magnétiques AMPure XP. Les librairies doivent ensuite être dosées par fluorimétrie avec le kit Qubit® dsDNA HS avant chargement sur le séquenceur.

Réactifs nécessaires.

- Ethanol 100%, eau nucléase free, billes AMPure XP, tampon TE (10 mM Tris-Acetate pH 8.0, 1 mM EDTA), Qubit® dsDNA HS Assay.

Etape 5.a : Purification des librairies de séquençage.



S'assurer que les billes sont complètement re-suspendues avant utilisation.

- Purifier 25 µL de produits de PCR avec 45 µL de billes AMPure XP (en suivant les recommandations du fournisseur).
- Eluer les produits de PCR purifiés dans 50 µL de tampon TE.



Après purification, les librairies peuvent être conservées entre -25°C et -15°C avant séquençage.

Etape 5.b : Dosage des librairies de séquençage.

- Doser 10 µL de chaque librairie de séquençage par fluorimétrie grâce au Qubit® dsDNA HS Assay.

Etape 6 : Dilution, pool et séquençage des librairies.

Après purification, les librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** doivent être diluées, regroupées et chargées sur le séquenceur.



Pour obtenir des résultats optimaux, un minimum de 10⁵ séquences doivent être lues pour chaque échantillon.

Contrairement à la plupart des librairies de séquençage classiques, la read des barcodes moléculaires nécessaire au démultiplexage des séquences **GENEXPATH SarcomaFusion** se fait en cours de read1. Ces séquences ne sont donc pas démultiplexées automatiquement par le séquenceur et seront sauvegardées dans les fichiers fastQ « Undetermined ». Le démultiplexage est réalisé grâce à l'algorithme spécifique mis à disposition sur la plateforme **GENEXPATH RT-MIS**.

Réactifs nécessaires.

- Amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001), amorces de séquençage de contrôle **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-002) (si contrôle interne réalisé), réactifs de séquençage Illumina.

Séquençage sur un séquenceur Illumina MiSeq.

Pour des informations détaillées relatives à la dilution et à la dénaturation des librairies, à la préparation du primer de séquence, à la feuille d'injection et au lancement du séquençage, se référer au guide Illumina du système Miseq.

- **Etape 6.a : Dilution et pool des librairies.**
 - Diluer chacune des librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** à une concentration comprise entre 2 nM et 4 nM, en considérant une taille moyenne de fragments amplifiés de 150 pb.
 - Regrouper les librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** en équivolume.
 - Si d'autres librairies sont séquencées sur la même flowcell, ajuster les concentrations des différents pools puis les combiner pour obtenir les nombres de séquences désirées (minimum 10^5 séquences pour chaque librairie **GENEXPATH SarcomaFusion**).

Exemple : Pour un pool de 10 librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** nécessitant 1 M de séquences (10^5 séquences pour chaque librairie), séquencé avec un pool de librairies B à la même concentration et nécessitant 3 M de séquences, mélanger 1 μ L du pool de librairies **GENEXPATH Sarcoma Fusion** et 3 μ L du pool de librairies B.

- **Etape 6.b : Dénaturation et dilution du pool de librairies.**
 - Dénaturer et diluer le pool final en suivant les recommandations du guide Illumina du système Miseq, pour obtenir une concentration finale de chargement entre 8 à 10 pM.
- **Etape 6.c : Préparation des amorces de séquençage.**
 - Si le pool de librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** est séquencé seul, diluer 3 μ L de chaque amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 et GEP-SP-002, si contrôle interne) dans un volume final de 600 μ L de tampon HT1, puis déposer ces 600 μ L dans le puits 18 de la cartouche de réactifs du MiSeq.
 - Si le pool de librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** est chargé avec d'autres librairies séquencées à l'aide des amorces de séquençage Illumina, pipeter la totalité du contenu du puits 12 (environ 600 μ L), ajouter 3 μ L de chaque amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 et GEP-SP-002, si contrôle interne) puis redéposer ce mix dans le puits 18 de la cartouche.

- Etape 6.d : Préparation de la feuille d'injection.
 - Si la librairie **GENEXPATH SarcomaFusion** est séquencée seule, réaliser la feuille d'injection pour générer les FASTQ en prévoyant 120 cycles en read 1.
 - Si les librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** sont combinées à d'autres librairies de séquençage, générer la feuille d'injection en utilisant les paramètres habituels, sans renseigner les échantillons **GENEXPATH SarcomaFusion**.
 - Spécifier l'utilisation de custom lors de la configuration du run (Avec Local Run Manager, sur la page Create Run. En mode run manuel, sur l'écran Run Setup).

Da  *les cas, veiller à ce que la read en read 1 se fasse avec un minimum de 120 cycles et que la case*
Cus *timer for Read 1 soit sélectionnée.*

- Dans tous les cas, les séquences des librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** ne seront pas démultiplexées par le séquenceur mais seront enregistrées dans le fichier FastQ « Undetermined », qui devra être ensuite chargé sur la plateforme **GENEXPATH RT-MIS**.

- Etape 6.e : Lancement du séquençage.
 - Lancer le séquençage en suivant la procédure décrite dans le guide Illumina du système MiSeq.

Séquençage sur une plateforme NextSeq 500/550 Illumina.

Pour des informations détaillées relatives à la dilution et à la dénaturation des librairies, à la préparation du primer de séquence, à la feuille d'injection et au lancement du séquençage, se référer au guide Illumina du système NextSeq.

- Etape 6.a : Dilution et pool des librairies.
 - Diluer chacune des librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** à une concentration comprise entre 0.5 nM et 4 nM, en considérant une taille moyenne de fragments amplifiés de 150 pb.
 - Regrouper les librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** en équivolume.
 - Si d'autres librairies sont séquencées sur la même flowcell, ajuster les concentrations des différents pools puis les combiner pour obtenir les nombres de séquences désirées (minimum 10^5 séquences pour chaque librairie **GENEXPATH SarcomaFusion**).

Exemple : Pour un pool de 10 librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** nécessitant 1 M de séquences (10^5 séquences pour chaque librairie), séquencé avec un pool de librairies B à la même concentration et nécessitant 3 M de séquences, mélanger 1 μ L du pool de librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** et 3 μ L du pool de librairies B.

- Etape 6.b : Dénaturation et dilution du pool de librairies.
 - Dénaturer et diluer le pool final en suivant les recommandations du guide Illumina du système NextSeq, pour obtenir une concentration finale de chargement de 0.8 pM à 1 pM.
- Etape 6.c : Préparation des amorces de séquençage.
 - Si le pool de librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** est séquençé seul, diluer 6 µL de chaque amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 et GEP-SP002, si contrôle interne) dans un volume final de 2000 µL de tampon HT1 puis déposer ces 2 mL dans le puits 7 de la cartouche de réactifs du NextSeq.
 - Si le pool de librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** est combiné avec d'autres librairies séquencées à l'aide des amorces de séquençage Illumina, pipeter la totalité du contenu du puits 20 (environ 2 mL), ajouter 6 µL de chaque amorce de séquençage **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001 et GEP-SP-002, si contrôle interne) puis redéposer ce mix dans le puits 7 de la cartouche.
- Etape 6.d : Préparation de la feuille d'injection.
 - Si la librairie **GENEXPATH SarcomaFusion** est séquencée seule, réaliser la feuille d'injection pour générer les FASTQ en prévoyant 120 cycles en read 1.
 - Si les librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** sont combinées à d'autres librairies de séquençage, générer la feuille d'injection en utilisant les paramètres habituels, sans renseigner les échantillons **GENEXPATH SarcomaFusion**.
 - Spécifier l'utilisation de custom lors de la configuration du run (Avec Local Run Manager, sur la page Create Run. En mode run manuel, sur l'écran Run Setup).

*Dans tous les cas, veiller à ce que la read en read 1 se fasse avec un minimum de 120 cycles et que la case **Custom** **Index for Read 1** soit sélectionnée.*

- Dans tous les cas, les séquences des librairies **GENEXPATH SarcomaFusion** ne seront pas démultiplexées par le séquenceur mais seront enregistrées dans les quatre fichiers FastQ « Undetermined », qui devront être ensuite chargés sur la plateforme **GENEXPATH RT-MIS**.
- Etape 6.e : Lancement du séquençage.
 - Lancer le séquençage en suivant la procédure décrite dans le guide Illumina du système NextSeq.

Etape 7 : Analyse des résultats.

Les fichiers de séquences générés par plateforme de séquençage Illumina (MiSeq ou NextSeq), au format FastQ, doivent ensuite être analysés grâce au logiciel **GENEXPATH RT-MIS** disponible en ligne à l'adresse suivante : <https://connect.genexpath.com/>.



Afin de faciliter le téléchargement du fichier FastQ, celui-ci ne doit pas être décompressé (fastq.gz).

Ce logiciel est une solution bio-informatique complète qui intègre différents algorithmes de traitement de données. Il réalise le démultiplexage permettant l'attribution des séquences à chaque échantillon. Il réalise ensuite une identification précise des marqueurs d'expression génique et leur quantification.

Le test **GENEXPATH SarcomaFusion** repose sur une quantification de marqueurs qualitatifs caractérisant la présence ou absence de translocations chromosomiques.

GENEXPATH RT-MIS génère des rapports concis et transparents allant de la mise en place des réactions de séquençage jusqu'à l'analyse automatisée des résultats de séquençage.

GENEXPATH RT-MIS nécessite le chargement des fichiers du séquenceur au format FASTQ ainsi que la liste des barcodes utilisés lors de l'expérimentation.

GENEXPATH RT-MIS évalue la qualité du séquençage de chaque échantillon en quantifiant le nombre de reads identifiées et le nombre d'UMI (unique molecular identifier) détectés.

GENEXPATH RT-MIS génère pour chaque échantillon un rapport d'analyse indiquant la présence ou non d'un transcrite de fusion, le nombre de reads et d'UMI obtenus ainsi qu'une référence bibliographique correspondant au transcrite (dans le cas où une fusion a été détectée). Ces données sont disponibles au téléchargement.

GENEXPATH RT-MIS intègre un manuel utilisateur directement accessible en ligne pour faciliter la prise en main de l'outil, pour décrire l'ensemble des résultats générés et pour détailler la présentation des résultats.

L'entreprise **GENEXPATH** ne stocke pas de manière durable les résultats générés par le logiciel **GENEXPATH RT-MIS**. Les données doivent être téléchargées directement après chaque analyse et stockées par l'utilisateur dans son système de gestion documentaire.

Limites de la procédure

- Le test SarcomaFusion a été développé à partir des données de la littérature pour détecter les transcrits de fusion les plus fréquents chez des patients atteints d'un sarcome. Il est destiné à être utilisé sur des échantillons FFPE ou congelés, possiblement obtenus à partir de biopsies à l'aiguille.

- Les performances démontrées dans le paragraphe « Caractérisation des performances » ont été validées selon les instructions décrites ci-dessus.

- Une faible quantité d'ARN ou un échantillon de faible qualité peut engendrer un résultat ininterprétable.

- Le séquençage doit être réalisé avec des séquenceurs de la technologie Illumina (Miseq et NextSeq).

Caractérisation de performances

Performances analytiques sur des échantillons de référence

Pour démontrer les performances analytiques du test SarcomaFusion, c'est-à-dire sa capacité à détecter les translocations, plusieurs échantillons de référence ont été analysés :

- 4 ARN extraits à partir d'échantillons FFPE (3 positifs et 1 négatif)
- 3 ARN extraits à partir d'échantillons congelés (tous positifs)
- 2 lignées cellulaires (toutes négatives)

Les échantillons positifs désignent des échantillons pour lesquels les fusions étaient connues et validées. Ces échantillons ont été analysés selon la procédure décrite dans cette notice d'utilisation et les résultats du test SarcomaFusion sont reportés dans le tableau 1.

Tableau 1 : récapitulatif des résultats

Echantillon	Résultat attendu / obtenu	Valeurs prédictives	
Echantillon 1	EWSR1 exon 7 - CREB1 exon 7 <i>EWSR1 exon 7 - CREB1 exon 7</i>	Vrai positif (VP)	6
Echantillon 2	JAZF1 exon 3 - SUZ12 exon 2 <i>JAZF1 exon 3 - SUZ12 exon 2</i>	Vrai négatif (VN)	3
Echantillon 3	PAX3_7 exon 7 - FOXO exon 2 <i>PAX3_7 exon 7 - FOXO exon 2</i>	Valeur prédictive positive (%)	100%
Echantillon 4	Négatif <i>Absence d'anomalie détectée</i>	Rappel (%)	100%
Echantillon 5	SS18 exon 10 – SSX exon6 <i>SS18 exon 10 – SSX exon6</i>	Taux faux positif (%)	0%
Echantillon 6	PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2 <i>PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2</i>	Sensibilité (%)	100%
Echantillon 7	EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6 <i>EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6</i>	Faux positif (FP)	0
Lignée cellulaire 1	Négatif <i>Absence d'anomalie détectée</i>	Faux négatif (FN)	0

Lignée cellulaire 2	Négatif <i>Absence d'anomalie détectée</i>	Valeur prédictive négative (%)	100%
		Précision (%)	100%
		Taux faux négatif (%)	0%
		Spécificité (%)	100%

Les résultats démontrent que le test SarcomaFusion fournit une haute sensibilité et spécificité pour la détection de transcrits de fusion associés au sarcome.

Performances analytiques sur une cohorte de patients

Une étude publiée en 2022 sur 158 échantillons de tumeurs osseuses et de tissus mous (Lanic MD et al., Modern Pathology, 2022) a démontré les performances suivantes :

- Sensibilité = 98.1%
- Spécificité = 100 %

Dans cet article, les auteurs rapportent que les quelques anomalies non détectées par le test SarcomaFusion sont expliquées par :

- La présence de translocations rares ou complexes non couvertes par le test SarcomaFusion
- La faible qualité et quantité d'ARN de quelques échantillons

Répétabilité

La répétabilité du test SarcomaFusion est définie comme sa capacité à quantifier avec précision un transcrit de fusion attendu. Deux tests ont été réalisés :

- Un test permettant de tester la répétabilité des résultats de 3 échantillons au sein d'un même run
- Un second permettant de tester la répétabilité des résultats de 5 échantillons sur 3 runs différents

Répétabilité intra-run

3 échantillons analysés en triplicata par le test SarcomaFusion ont été étudiés (Figure 1). Les données de comptage de chaque anomalie en fonction des répliques sont parfaitement comparables.

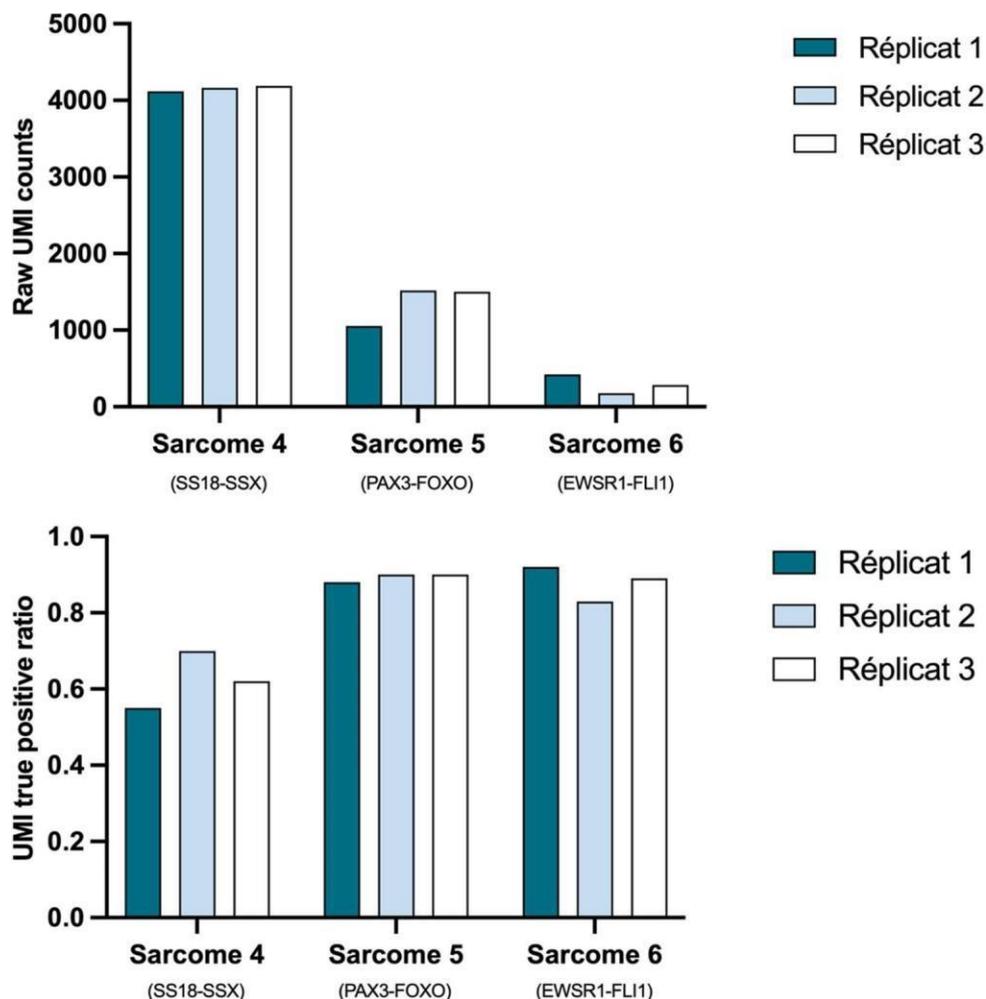


Figure 1 : Les histogrammes représentent en haut le nombre brut d'UMI détectés et en bas celui-ci rapporté au nombre total d'UMI de l'échantillon en fonction de la fusion attendue et des répliques.

Rétabilité inter-runs

5 échantillons analysés par le test SarcomaFusion ont été étudiés sur 3 runs différents (Figure 2). Les données de comptage de chaque anomalie sont parfaitement comparables.

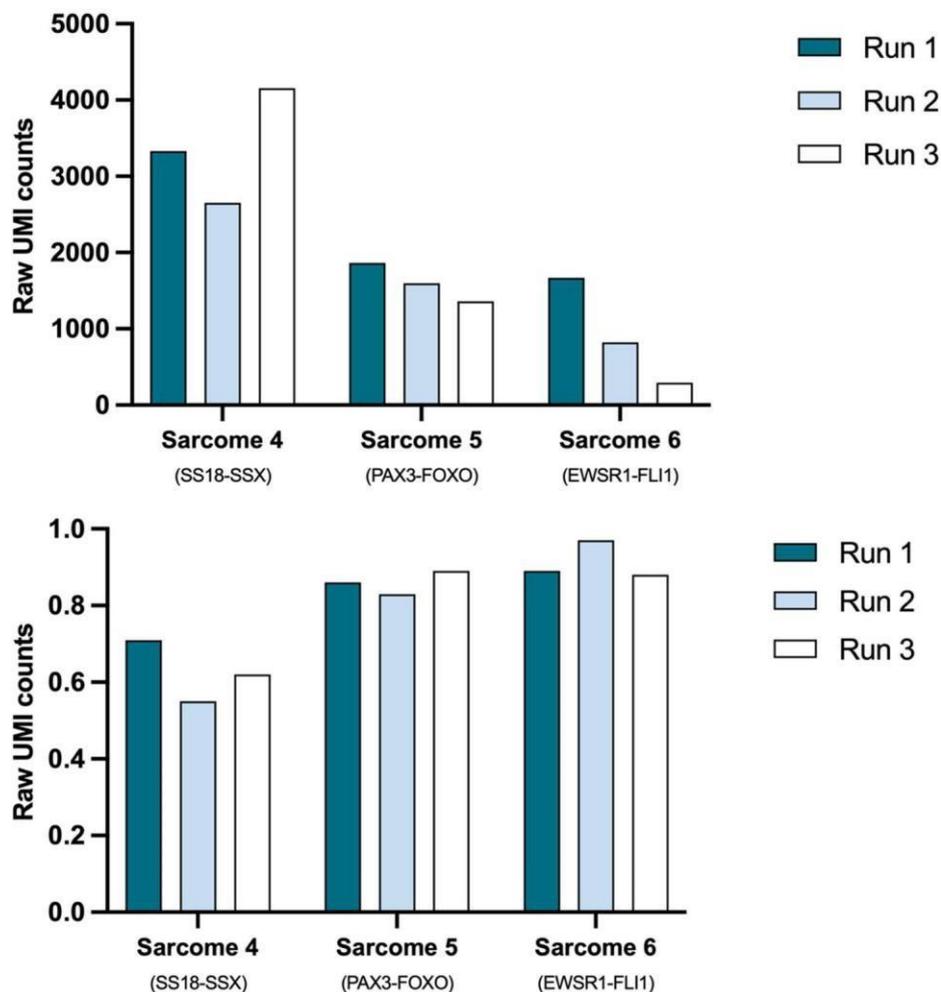


Figure 2 : Les histogrammes représentent en haut le nombre brut d'UMI détectés et en bas celui-ci rapporté au nombre total d'UMI de l'échantillon en fonction de la fusion attendue et du run.

Reproductibilité

La reproductibilité désigne la capacité du test SarcomaFusion à détecter dans des conditions identiques des translocations entre différents utilisateurs.

Afin d'évaluer ce paramètre, 5 échantillons ont été analysés par 3 utilisateurs différents :

- 3 échantillons positifs (SS18 exon 10 – SSX exon6, PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2, EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6)
- 2 échantillons négatifs (lignées cellulaires)

Les données, représentées sur la Figure 3, montrent une quantification reproductible entre les différents utilisateurs.

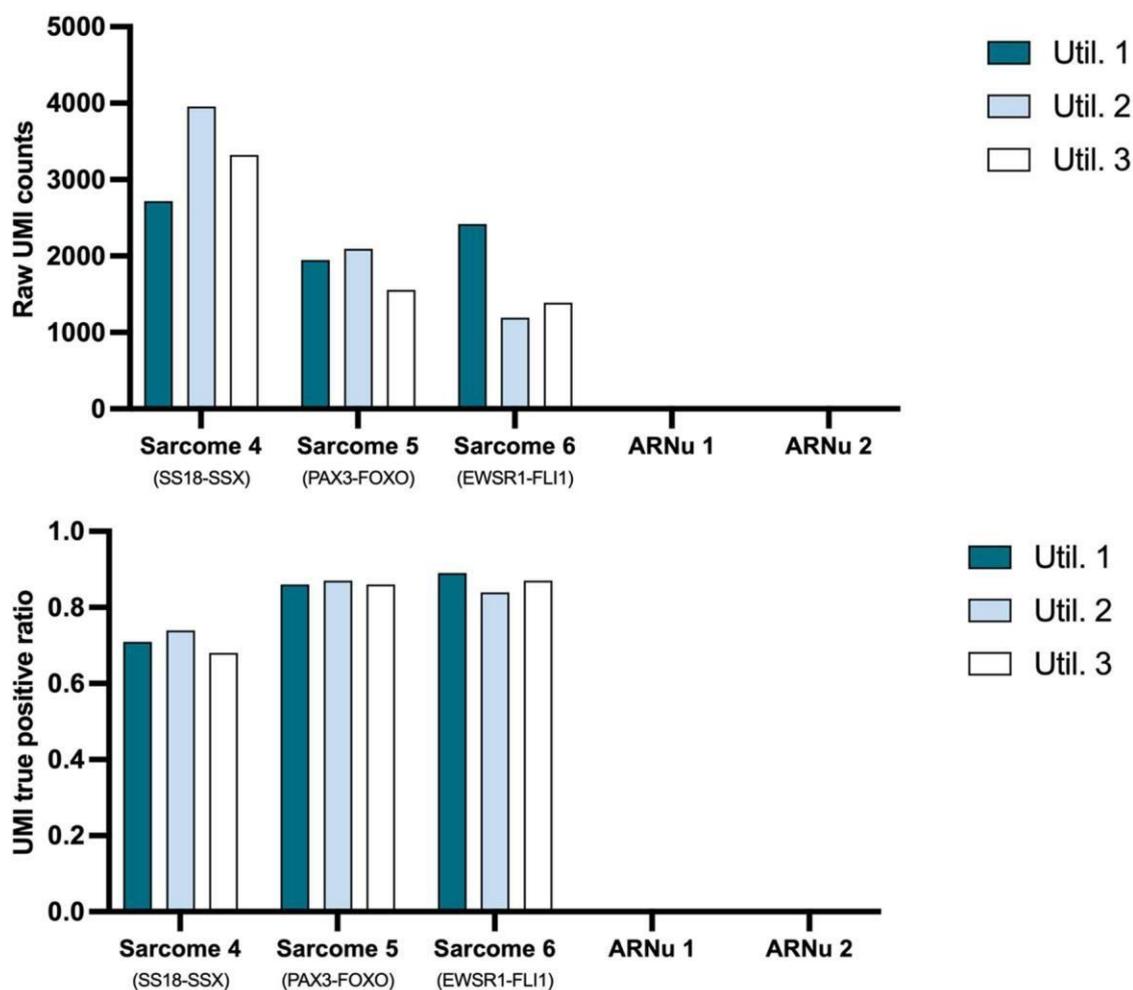


Figure 3 : Les histogrammes représentent en haut le nombre brut d'UMI détectés et en bas celui-ci rapporté au nombre total d'UMI de l'échantillon en fonction de la fusion attendue et de l'utilisateur.

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du test SarcomaFusion est définie comme étant sa capacité à détecter des translocations en fonction de la quantité d'ARN de l'échantillon et du pourcentage de cellules tumorales de l'échantillon.

Afin de déterminer ces deux limites de sensibilité, deux dilutions sériées ont été réalisées à partir de 2 échantillons :

- Une dilution dans de l'eau afin de simuler une baisse de quantité d'ARN
- Une dilution de l'échantillon à tester dans de l'ARN universel afin de simuler une baisse de l'enrichissement tumoral

Les résultats sont rapportés sur la Figure 4.

La dilution de deux échantillons témoins à des quantités initiales de 529 et 489 ng d'ARN dans de l'eau nuclease free montre que les fusions attendues sont toujours détectées à des quantités d'ARN de 4 ng. Même si la quantification des anomalies est fonction de l'enrichissement tumoral de l'échantillon testé, la limite obtenue est bien en deçà des préconisations d'utilisation du test SarcomaFusion (entre 50 et 500 ng).

La deuxième gamme de dilutions réalisée à partir de deux échantillons positifs et d'ARN universel montre que les anomalies attendues sont toujours détectées à 3% d'échantillon tumoral. A 0% d'ARN positif, le test ne détecte plus aucune trace des fusions.

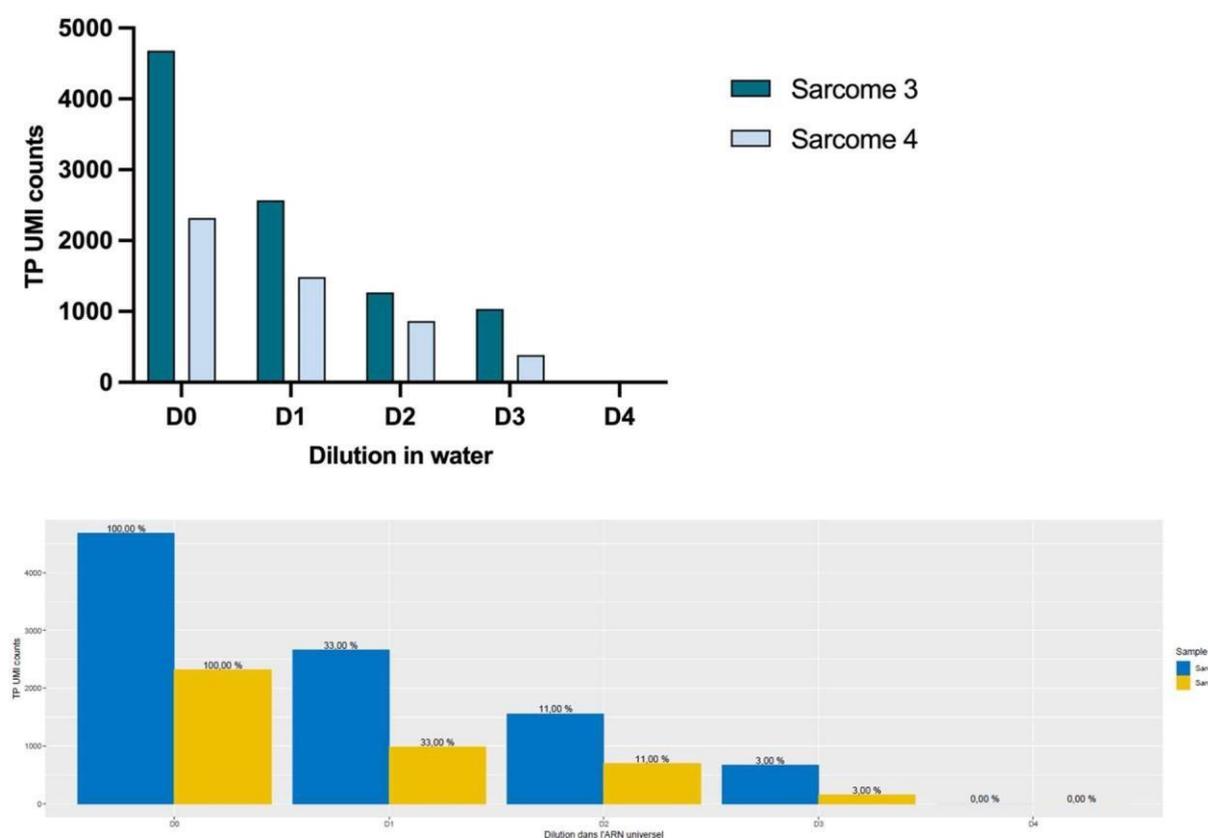


Figure 4 : Les histogrammes représentent le nombre brut d'UMI détectés des fusions attendues dans deux échantillons en fonction des gammes de dilution réalisées dans de l'eau (haut) ou dans de l'ARN universel (bas).

Bibliographie

Detection of sarcoma fusions by a next-generation sequencing based-ligation-dependent multiplex RT-PCR assay. Lanic MD et al., Mod Pathol 2022 (PMID : 35075283).

 Fabricant	 Nom du réactif
 Date de fabrication	 limite de température
 Date limite d'utilisation	 Consulter les instructions d'utilisation
 Code de lot	 Marquage CE – conformité européenne
	 Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>

Notes

Les réactifs **GENEXPATH SarcomaFusion** sont protégés par des droits de propriété intellectuelle et ne peuvent pas être modifiés, reproduits, vendus ou transmis sans autorisation du fabricant.

Les informations contenues dans le présent document sont susceptibles d'être modifiées.