INSTRUCTIONS D'UTILISATION

32 ÉCHANTILLONS

SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency Solution

Réservé à l'usage diagnostique in vitro (IVD)
Non destiné au dépistage par autotest

SOPHiA GENETICS™

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

INFORMATIONS RÉSUMÉES

Nom du produit	SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency Solution
Type de produit	Solution tout-en-un
Famille de produits	Application diagnostic moléculaire (kit + analyse)
ID de l'algorithme	ILL1XG1S7_FFPE_CNV_NextSeq_2
Séquenceur	Illumina® - NextSeq® 500/550
ID du panel génétique	HRD_v1
Version du produit	v1.0
Type d'échantillon	ADN somatique isolé dans des échantillons de tissu tumoral fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE)
Version du produit	1.0.0
ID du document	SG-00693
Version du document	2.0
Date de révision	05/2022

Ce mode d'emploi s'applique à toutes les versions de SOPHiA DDM.
Veuillez lire attentivement la totalité du mode d'emploi avant d'utiliser ce produit.

SOPHiA GENETICS SA
ZA La Pièce 12
1180 Rolle
Suisse

SOPHiA GENETICS SAS
Technopole Izarbel
374 Allée Antoine d'Abbadie
64210 Bidart, France

REF BS0121ILLCSMY08-32

CE IVD

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

CODES PRODUITS

	CODE PRODUIT COMPLET	BOÎTE 1	BOÎTE 2	KIT DE PRÉPARATION DE BIBLIOTHÈQUE
REF	BS0121ILLCSMY08-32	B1.H1.0021.C-32	B2.0021.C-32	5C0232 (x 2)

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

AVIS DE NON-RESPONSABILITÉ

Ce document et son contenu sont la propriété de SOPHiA GENETICS SA et de ses sociétés affiliées (« SOPHiA GENETICS ») et doivent uniquement être utilisés à des fins contractuelles par ses clients, conformément à l'utilisation du ou des produits décrits ci-après et à aucune autre fin. Ce document et son contenu ne doivent être utilisés ou distribués à aucune autre fin et/ou communiqués, divulgués, reproduits or référencés de quelque façon que ce soit sans le consentement écrit préalable de SOPHiA GENETICS.

SOPHiA GENETICS ne transmettra, par le présent document, aucune licence en vertu de tout brevet, de toute marque, de tout droit d'auteur ou de tout droit commun, ni de tout droit similaire, de quelconque partie tierce. Les instructions figurant dans le présent document doivent être strictement et explicitement suivies par un personnel qualifié et parfaitement formé afin de garantir l'utilisation correcte et sûre du ou des produits décrits ci-après. L'ensemble du contenu de ce document doit être lu et compris dans son intégralité, préalablement à l'utilisation dudit ou desdits produits.

VEUILLEZ LIRE L'INTÉGRALITÉ ET SUIVRE EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES CI- APRÈS, AU RISQUE D'ENDOMMAGER LE (S) PRODUIT (S), DE BLESSER DES PERSONNES, NOTAMMENT LES UTILISATEURS OU D'AUTRES PERSONNES, ET D'ENTRAÎNER DES DOMMAGES MATÉRIELS.

SOPHiA GENETICS N'ASSUME AUCUNE RESPONSABILITÉ LIÉE À UNE MAUVAISE UTILISATION DU OU DES PRODUITS DÉCRITS CI-APRÈS (Y COMPRIS DES PIÈCES DE CEUX-CI OU LEUR LOGICIEL).

NOMS DE MARQUE

Illumina® et MiSeq® sont des noms de marques déposés d'Illumina, Inc.

xGen® et Lockdown® sont des noms de marques déposés d'Integrated DNA Technologies, Inc.

AMPure® et Agencourt® sont des noms de marques déposés de Beckman Coulter, Inc.

Qubit® et Dynabeads® sont des noms de marque déposés de Thermo Fisher Scientific Inc.

Agilent Fragment Analyzer™ est un nom de marque déposé d'Agilent Technologies, Inc.

SOPHiA GENETICS et SOPHiA DDM sont des noms de marques de SOPHiA GENETICS SA et/ou de ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays. Tous les autres noms, logos et noms de marque appartiennent à leurs propriétaires respectifs. SAUF PRÉCISION SPÉCIFIQUE, L'UTILISATION PAR SOPHiA GENETICS DE NOMS DE MARQUE DE TIERS N'INDIQUE AUCUNE RELATION, AUCUN SPONSORING NI AUCUNE VALIDATION ENTRE SOPHiA GENETICS ET LES PROPRIÉTAIRES DE CES NOMS DE MARQUE. Toute référence faite par SOPHiA GENETICS à des noms de marques de tiers vise à identifier les produits et/ou services du tiers concerné et est considérée comme un usage loyal nominatif en vertu du droit des marques.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

HISTORIQUE DES RÉVISIONS

ID DU DOCUMENT/VERSION	DATE	DESCRIPTION DE LA MODIFICATION
SG-00693 (v2.0)	Mai 2022	• Changement du nom du kit de préparation de bibliothèque • Correction d'une erreur de typographie dans la section 5.2.4 • Mise à jour du tableau des symboles
SG-00609 (v1.0)	Mai 2022	• Publication initiale

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

TABLE DES MATIÈRES

1. Finalité **9**

2. Déclaration générale des principes et de la procédure de test **10**

3. Composants du produit **11**

4. Application Web SOPHiA DDM **12**

5. Consommables du kit et méthodes **13**

5.1. Considérations initiales 13

5.1.1. Contenu du kit (32 échantillons) *13*

5.1.2. Matériel requis (non fourni) *17*

5.2. Préparation de bibliothèque 18

5.2.1. DNA total *18*

5.2.2. Préparation de pré-mélanges et de réactifs *19*

5.2.3. Fragmentation enzymatique, réparation d'extrémité et poly-adénylation *21*

5.2.4. Ligature *22*

5.2.5. Nettoyage après ligature *23*

5.2.6. Amplification de bibliothèque *24*

5.2.7. Nettoyage après amplification *25*

5.2.8. Quantification et contrôle qualité individuels de la bibliothèque *26*

5.2.9. Regroupement de bibliothèques pour séquençage de génome entier (SGE) passe-bas *27*

5.3. Capture 28

5.3.1. Regroupement de bibliothèques pour hybridation et capture *28*

5.3.2. Hybridation *28*

5.3.3. Préparation des billes de streptavidine *31*

5.3.4. Liaison de cibles hybridées aux billes *32*

5.3.5. Lavage des billes de streptavidine pour retirer l'ADN non lié *33*

5.3.6. Amplification post-capture *35*

5.3.7. Nettoyage de l'amplification post-capture *36*

5.3.8. Quantification et contrôle qualité finals de la bibliothèque *37*

5.4. Séquençage 38

5.4.1. Préparation de bibliothèque pour le séquençage *38*

6. Procédure d'analyse **40**

6.1. Démultiplexage des données NGS 40

6.2. Chargement et analyse des données 40

6.3. Génération du rapport 40

7. Description et paramètres de l'analyse **43**

7.1. Fichiers de ressource 43

7.2. Prétraitement des données brutes 43

7.3. Analyse d'intégrité génomique 43

7.4. Calcul du statut SOPHiA DDM Dx HRD 46

8. Évaluation des performances **47**

8.1. Évaluation des performances analytiques 47

8.1.1. Concordance du statut d'intégrité génomique avec le test NGS de comparaison *47*

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

8.1.2. Limite de détection du contenu tumoral de l'échantillon pour le statut d'intégrité génomique ... 47
8.1.3. Répétabilité du statut d'intégrité génomique ... 47
8.1.4. Reproductibilité du statut d'intégrité génomique ... 47
8.2. Évaluation des performances cliniques ... 48
9. Avertissements, limitations et précautions ... **49**
9.1. Avertissements ... 49
9.2. Limitations ... 50
9.2.1. Pour les procédures de diagnostic in-vitro ... *50*
9.3. Précautions ... 50
9.3.1. Pour les procédures d'assistance à la décision clinique ... *51*
10. Symboles ... **55**
11. Assistance ... **57**
Annexe I. CDS SOPHiA DDM HRD ... **58**
1. Déclaration générale du composant CDS SOPHiA DDM HRD ... 58
2. Composants CDS SOPHiA DDM HRD ... 59
3. Commencer une analyse CDS SOPHiA DDM HRD ... 59
3.1. Examen/Modification du statut CDS SOPHiA DDM HRD ... *60*
3.2. Examen/Modification du statut BRCA ... *61*
3.3. Examen/Modification du statut d'intégrité génomique ... *64*
3.4. Définir le statut HRR ... *65*
3.5. Définir le statut d'amplification du gène CCNE1 ... *66*
3.6. Rapporter les variants inclus dans la portée ... *67*
3.7. Générer un compte rendu CDS SOPHiA DDM HRD ... *68*
4. Considérations relatives aux résultats non concluants ... 68
4.1. En cas de rejet d'intégrité génomique ... *68*
4.2. En cas de statut GI non concluant ... *70*
5. Considérations relatives aux statuts « GI Negative* » ... 71
5.1. En cas de résultat BRCA non concluant et/ou de présence d'un risque de FN pour BRCA ... *73*
6. Fichiers de ressource ... 75
6.1. Régions cibles ... *75*
7. Description et paramètres de l'analyse ... 76
7.1. Prétraitement des données brutes ... *76*
7.2. Liste des modules inclus ... *76*
8. Descriptions des livrables du pipeline ... 87
8.1. Emplacement des résultats ... *87*
8.2. Composition du fichier ... *88*
8.3. Visualisation des résultats ... *88*
8.4. Filtrage de variant ... *89*
8.5. Annotation de variant ... *90*
9. Évaluation des performances du statut CDS SOPHiA DDM HRD ... 93

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Annexe II. Plaques d'amorce Unique Dual Index Primer Plate 94
Annexe III. la concentration (ng/µl) obtenue à l'étape 5.2.8 comme suit :Workflow général – SOPHiA DDM Capture Solutions 96
Annexe IV. Coordonnées génomiques des « Régions cibles » de la solution HRD 98

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

1. FINALITÉ

La solution SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency (HRD) est un dispositif médical de diagnostic in vitro utilisable comme aide pour déterminer le statut de déficit de recombinaison homologue (HRD) de tumeurs chez des patientes présentant un cancer de l'ovaire, par détection semi-quantitative du biomarqueur d'instabilité génomique. Le dispositif est destiné à être utilisé par des professionnels de santé et il est basé sur un workflow de séquençage de nouvelle génération (NGS) en utilisant comme entrée de l'ADN génomique extrait de matériau tumoral FFPE.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

2. DÉCLARATION GÉNÉRALE DES PRINCIPES ET DE LA PROCÉDURE DE TEST

La solution SOPHiA DDM Dx est constituée d'un kit de séquençage nouvelle génération, d'un pipeline de bio-informatique et d'une plate-forme basée sur le cloud. Le produit est destiné au traitement et à l'analyse d'échantillons d'ADN extraits d'échantillons de cancer de l'ovaire fixés au formol, inclus en paraffine (FFPE) obtenus par biopsie ou issus d'une résection chirurgicale.

Le kit et le protocole de séquençage nouvelle génération ont été conçus pour permettre aux utilisateurs de traiter 50 à 100 ng d'ADN pour la création d'une bibliothèque de séquençage nouvelle génération, l'enrichissement par capture par hybridation de 28 gènes et le séquençage à l'aide de la plate-forme Illumina® NextSeq® 500/550. Les données de séquençage nouvelle génération ainsi obtenues présentent simultanément une faible couverture sur l'ensemble du génome avec une couverture attendue d'environ 1 x (données de séquençage de génome entier passe-bas, lpWGS) et une couverture élevée sur les régions de séquençage ciblées (couverture attendue : env. 3 000 x moyenne).

L'application Web cloud sécurisée SOPHiA DDM, qui héberge un pipeline de bio-informatique personnalisé, permet aux utilisateurs de charger les données de NGS et d'obtenir le compte rendu de solution SOPHiA DDM Dx HRD au format PDF. Le compte rendu décrit le statut de solution SOPHiA DDM Dx HRD de l'échantillon sur la base des résultats de l'analyse d'intégrité génomique (GI) calculés en traitant les données lpWGS.

La solution SOPHiA DDM Dx HRD propose aussi des fonctionnalités de CDS via l'application de bureau SOPHiA DDM. Les résultats de CDS incluent les SNP/INDEL et les amplifications de gène appelés dans les 28 gènes séquencés, un statut BRCA proposé et un statut SOPHiA DDM HRD proposé obtenu en combinant le statut BRCA proposé et les résultats d'intégrité génomique. L'application de bureau SOPHiA DDM permet aux utilisateurs de personnaliser et de générer un compte rendu CDS SOPHiA DDM HRD. Toutes les fonctionnalités de CDS sont disponibles exclusivement via l'application de bureau SOPHiA DDM. Les descriptions détaillées des fonctionnalités de CDS sont disponibles dans l'Annexe I.

Il est à noter que les résultats d'une analyse génétique ne doivent être interprétés que par un expert qualifié en génétique moléculaire, comme un généticien de laboratoire clinique (ErCLG) certifié par l'European Board of Medical Genetics (EBMG).

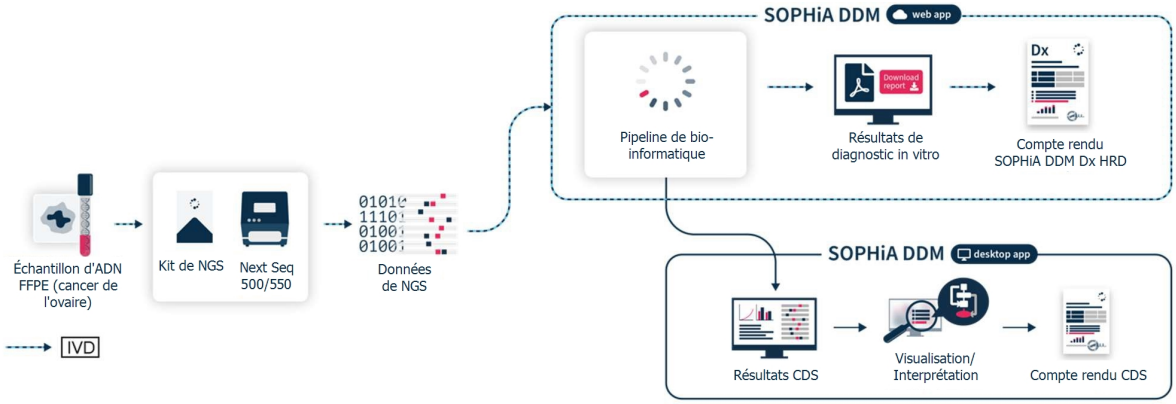
© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

3. COMPOSANTS DU PRODUIT

La solution SOPHiA DDM Dx HRD inclut trois composants principaux : le kit NGS, le pipeline de bio-informatique et l'application Web SOPHiA DDM.

- Le kit NGS consiste à préparer et à enrichir des bibliothèques d'ADN à partir d'échantillons FFPE de cancer de l'ovaire adaptés au séquençage sur un séquenceur Illumina® NextSeq® 500/550. Le kit NGS permet de générer, dans un seul run de séquençage, les données de séquençage de génome entier passe-bas (couverture de ~1x) et les données de séquençage en profondeur ciblées (couverture de ~3000x).
- Le pipeline de bio-informatique a principalement pour objectif de traiter les données de séquençage de génome entier passe-bas, via un algorithme d'apprentissage en profondeur capable d'évaluer l'intégrité génomique, et d'établir le statut SOPHiA DDM Dx HRD.
- L'application Web SOPHiA DDM héberge le pipeline de bio-informatique et sert d'interface pour le chargement des données NGS et la génération et le téléchargement du compte rendu de solution SOPHiA DDM Dx HRD.

Figure A. Vue d'ensemble des différents composants de la solution SOPHiA DDM Dx HRD



La solution SOPHiA DDM Dx HRD comprend aussi un composant supplémentaire, l'application de bureau SOPHiA DDM, qui permet aux utilisateurs de visualiser, d'interpréter et de signaler les résultats CDS (Clinical Decision Support pour « Aide à la prise de décisions cliniques ») calculé par le pipeline de bio-informatique via l'analyse des données de séquençage en profondeur ciblées. Les fonctionnalités CDS clés que prend en charge l'application de bureau SOPHiA DDM permettent aux utilisateurs de visualiser et d'interpréter les SNP et INDEL de 28 gènes (y compris BRCA1, BRCA2), de définir le statut BRCA de l'échantillon, et de le combiner aux résultats d'intégrité génomique afin d'établir le statut CDS SOPHiA DDM HRD. Toutes les informations sur les caractéristiques de CDS et les résultats pour les analyses CDS SOPHiA DDM HRD figurent dans l'Annexe I.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

4. APPLICATION WEB SOPHiA DDM

SOPHiA DDM est une application Web qui offre une solution destinée à aider les médecins et les chercheurs à prendre des décisions informées et à poser des diagnostics en oncologie et maladies héréditaires, y compris en cas de conditions de diagnostic difficiles, comme pour les maladies rares. Pour cela, elle analyse les données de séquençage nouvelle génération produites à partir de bibliothèques génomiques complètes, de bibliothèques de kits de capture d'ADN ou d'ARN, et de kits de produits d'amplification destinés aux applications de lignée germinale et somatiques. SOPHiA DDM est destinée à être utilisée par des professionnels de laboratoire qualifiés, des généticiens cliniques et des pathologistes moléculaires.

Pour accéder à la plateforme pour la première fois, vous devrez vous inscrire. Il vous sera demandé de :

- Sélectionner l'option « *Sign-up now* ».
- Saisir votre adresse e-mail. Vous devrez utiliser la même adresse e-mail que celle utilisée pour créer votre compte. En cas de doute, contactez l'administrateur de votre compte.
- Sélectionnez « *Send verification code* ».
- Le code de vérification sera envoyé à votre adresse e-mail. Vous devrez ensuite saisir le code reçu par e-mail et finaliser le processus en tapant votre nom et en créant un nouveau mot de passe.

Les instructions détaillées d'accès à la plateforme et de demande d'analyse génomique figurent dans le manuel d'utilisation de l'application Web SOPHiA DDM.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

5. CONSOMMABLES DU KIT ET MÉTHODES

5.1. Considérations initiales

Assurez-vous que tous les tubes sont physiquement intacts et stockés conformément aux températures recommandées, dès leur réception, pour garantir des performances optimales. Une manipulation et un stockage inappropriés des composants du kit dans des conditions autres risque de nuire à ses performances.

5.1.1. Contenu du kit (32 échantillons)

Veillez à toujours centrifuger brièvement les tubes avant de les utiliser pour recueillir tout le liquide.

BOÎTE 1 (STOCKER À UNE TEMPÉRATURE COMPRISE ENTRE -25 °C ET -15 °C)

- xGen® Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- HRD_v1 xGen® Lockdown® Probes by SOPHiA GENETICS (20 µl)
- 2 tampons d'hybridation (50 µl)
- Amplificateur pour tampon d'hybridation (20 µl)
- 2 tampons de lavage de billes (1 250 µl)
- 10 tampons de lavage rigoureux (200 µl)
- 10 tampons de lavage I (160 µl)
- 10 tampons de lavage II (110 µl)
- 10 tampons de lavage III (110 µl)
- 32 amorces compatible avec Illumina® Unique Dual Index Primers V2 dans une plaque à 96 puits (7 µl chacun) : voir Annexe II pour l'affichage et les séquences d'amorces.
- Post Capture Illumina® Primers Mix (20 µl)
- Amplificateur PCR (20 µl)
- Master Mix pour PCR post-capture (122 µl)
- Adaptateur universel Stubby (220 µl)

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

BOÎTE 2 (STOCKER À UNE TEMPÉRATURE COMPRISE ENTRE +2 °C ET +8 °C)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (8,7 ml)
- Tampon IDTE Low TE (10 ml)
- Eau exempte de nucléase (20 ml)

SOPHiA DDM Dx DNA LIBRARY PREPARATION KIT III* (STOCKEZ À UNE TEMPÉRATURE COMPRISE ENTRE -25°C ET -15°C)

- Master Mix pour PCR 2x (520 µl x 2)
- Tampon de fragmentation (77 µl x 2)
- Mélange d'enzymes pour fragmentation (116 µl x 2)
- Mélange pour ligature (836 µl x 2)
- Amplificateur pour ligature (87 µl x 2)

*** Pour 32 échantillons, deux kits de 16 échantillons sont fournis.**

*** SOPHiA GENETICS est le distributeur exclusif de ce kit de préparation de bibliothèque.**

Important : pour en savoir plus, consultez les avertissements et précautions ci-dessous

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Nom du produit	Pictogramme SGH	Mentions de dangers et conseils de prudence	Mot indicateur	Composant dangereux
2 Tampon d'hybridation		• H300 Mortel en cas d'ingestion. • H311 Toxique par contact cutané. • H315 Cause une irritation cutanée. • H370 Cause des dommages aux organes. • H370 Cause des dommages aux organes (système nerveux central). • H411 Toxique pour les organismes aquatiques, avec des effets durables à long terme. • P260 Ne pas respirer les vapeurs/vaporiser. • P264 Laver soigneusement la peau contaminée après manipulation. • P270 Ne pas ingérer, boire ou fumer durant l'utilisation de ce produit. • P273 Éviter de déverser dans l'environnement. • P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux et du visage. • P301+P310 En cas d'ingestion : appeler immédiatement un centre anti-poison/médecin. • P302+P352 En cas de contact avec la peau : laver abondamment à l'eau. • P308+P311 En cas d'exposition ou d'inquiétudes : appeler un centre anti-poison ou un médecin. • P321 Traitement spécifique (lire les conseils médicaux sur cette étiquette). • P330 Rincer la bouche. • P332+P313 En cas d'irritation cutanée : consulter un médecin. • P362+P364 Retirer les vêtements contaminés et les laver avant de les remettre. • P391 Recueillir le produit déversé. • P405 Entreposer dans un endroit fermé à clé. • P501 Jeter le contenu/contenant conformément aux réglementations nationales.	Danger	Chlorure de tétraméthyl-ammonium
Amplificateur pour tampon d'hybridation		• H351 Potentiellement cancérigène. • H360 Peut nuire à la fertilité ou au fœtus. • H373 Peut causer des dommages aux organes à la suite d'expositions répétées ou prolongées. • P201 Se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation. • P202 Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. • P260 Ne pas respirer les vapeurs/aérosols. • P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux et du visage. • P308+P313 En cas d'exposition ou d'inquiétudes : appeler un médecin. • P314 Appeler un médecin en cas de malaise. • P405 Entreposer dans un endroit fermé à clé. • P501 Jeter le contenu/contenant conformément aux réglementations nationales.	Danger	Formamide
10 tampons de lavage rigoureux		• H302 Mortel en cas d'ingestion. • H315 Cause une irritation cutanée. • H319 Cause une sévère irritation oculaire.	Danger	Sel disodique d'acide éthylènediamine-tétraacétique

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Nom du produit	Pictogramme SGH	Mentions de dangers et conseils de prudence	Mot indicateur	Composant dangereux
10 tampons de lavage I		• H228 Solide inflammable. • H302 Mortel en cas d'ingestion. • H315 Cause une irritation cutanée. • H318 Cause de graves lésions oculaires. • H332 Mortel en cas d'inhalation. • H401 Toxique pour les organismes aquatiques. • H402 Nocif pour les organismes aquatiques. • H412 Nocif pour les organismes aquatiques, avec des effets durables à long terme. • P273 Éviter de déverser dans l'environnement. • P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux et du visage. • P305+P351+P338 En cas de contact avec les yeux : rincer avec précaution avec de l'eau pendant plusieurs minutes. Si la personne porte des lentilles de contact, elle doit les enlever, si possible. Continuer de rincer les yeux. • P310 Appeler immédiatement un centre anti-poison/médecin. • P501 Jeter le contenu/contenant conformément aux réglementations nationales.	Danger	Dodécylsulfate de sodium
Tampon pour fragmentation		• H302 - Nocif en cas d'ingestion. • H370 - Risque avéré d'effets graves pour les organes. • H412 - Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. • P273 - Éviter le rejet dans l'environnement. • P260 - Ne pas respirer les vapeurs. • P270 - Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit. • P264 - Se laver … soigneusement après manipulation. • P308+P311 - En cas d'exposition : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. • P301 + P312, P330 - EN CAS D'INGESTION : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. Rincer la bouche. • P405 - Garder sous clef. • P501 - Éliminer le contenu/récipient conformément à la réglementation locale, régionale, nationale et internationale en vigueur.	Danger	Chlorure de tétraméthyl-ammonium

Veuillez utiliser et comme équipement de protection individuelle.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

5.1.2. Matériel requis (non fourni)

CONSOMMABLES FOURNIS PAR L'UTILISATEUR (À ACHETER SÉPARÉMENT)

- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase
- Tubes de 1,5 ml à faible liaison d'ADN
- Tubes de 1,5 ml
- Tubes coniques de 50 ml
- Pointes à filtre
- Éthanol (grade biologie moléculaire)
- Réactifs de séquençage Illumina®

MATÉRIEL DE LABORATOIRE

Pour qualifier les échantillons : système Agilent Fragment Analyzer™ (Analyseur de fragments Agilent)

Pour éviter la contamination de l'échantillon :

- Zone pré-PCR
    - Matériel et réactifs pour la quantification fluorimétrique
    - Support de séparation magnétique (96 puits)
    - Pipettes multicanaux (P10 ou P20 ; P100 ; P200)
    - Microcentrifugeuse de table (compatible avec des barrettes de 8 tubes)
    - Thermocycleur (couvercle chauffant à température programmable)
    - Mélangeur à vortex
- Zone post-PCR
    - Système d'électrophorèse capillaire
    - Concentrateur sous vide d'ADN
    - Matériel et réactifs pour la quantification fluorimétrique
    - Support de séparation magnétique (compatible avec les tubes de 1,5 ml)
    - Support de séparation magnétique (96 puits)
    - Pipettes multicanaux (P10 ou P20 ; P100 ; P200)
    - Microcentrifugeuse de table (compatible avec des barrettes de 8 tubes)
    - Thermocycleur (couvercle chauffant à température programmable)
    - Bloc thermique ou bain-marie (compatible avec les tubes de 1,5 ml)
    - Mélangeur à vortex

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

5.2. Préparation de bibliothèque

5.2.1. DNA total

CONSOMMABLES

- ADN extrait de tissus fixés au formaldéhyde et enrobés de paraffine (ADN FFPE)
- IDTE
- Eau exempte de nucléase
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

IMPORTANT

La solution SOPHiA DDM Dx HRD est conçue pour les échantillons présentant un contenu tumoral d'au moins 30 pourcent. Le traitement d'ADN issu d'échantillons ayant un contenu tumoral inférieur à 30 % n'est pas possible avec cette solution.

La qualité de l'ADN extrait de tissus FFPE est variable et risque d'avoir une incidence sur les données de séquençage. L'exposition au formol nuit à l'intégrité de la molécule et génère une fragmentation de l'ADN. Elle entraîne aussi le séquençage d'artéfacts en raison d'événements de désamination.

L'intégrité de l'ADN des échantillons d'ADN FFPE doit être évaluée avant toute expérience par électrophorèse sur gel haute résolution sur Fragment Analyzer (Agilent).

Évaluation de la qualité de l'ADN : Analyser 5 à 10 ng d'ADN génomique sur le système Fragment Analyzer™ d'Agilent en utilisant le kit HS Large Fragment 50 kb. La qualité de l'ADN génomique est évaluée avec le DQN (DNA quality number). Fixez le seuil pour le DQN à 300 pb et extrayez le DQN pour vos échantillons d'ADN.

Important : traiter un échantillon sans mesurer le DQN ou un DQN inférieur à 3 peut entraîner un rendement de préparation de bibliothèque de génome entier sous-optimal et une qualité de données de NGS insuffisante pouvant donner des résultats non concluants (voir la section Avertissements et limites).

En fonction de la qualité de l'ADN, adaptez le protocole comme indiqué dans le tableau 1. S'il n'est pas possible d'évaluer le DQN, suivez les recommandations d'entrée pour les échantillons dont le DQN est supérieur à 5.

Tableau 1. Quantités d'ADN recommandées pour l'entrée en fonction de la qualité de l'ADN

RECOMMANDATIONS D'ENTRÉE EN FONCTION DE LA QUALITÉ DE L'ADN			
Qualité de l'ADN	DQN < 3 Moins de 30 % de fragments d'ADN mesurant plus de 300 pb	3 ≤ DQN ≤ 5 30 à 50 % de fragments d'ADN mesurant plus de 300 pb	5 < DQN ≤ 10 Plus de 50 % de fragments d'ADN mesurant plus de 300 pb
Quantité d'ADN (ng)	Ne pas traiter l'échantillon	100 ng*	50 ng

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

*S'il n'est pas possible d'utiliser 100 ng de matériau d'entrée en raison de quantités insuffisantes de matériau d'origine, nous recommandons de traiter les échantillons par 10 cycles de PCR à l'étape 5.2.6 afin d'obtenir un rendement de bibliothèque suffisant.

Pour éviter toute erreur avec l'entrée d'ADN, il est recommandé d'obtenir une concentration comprise entre 10 et 20 ng/µl. La concentration de l'ADN doit être confirmée par une détermination fluorimétrique (par ex. : Qubit®, Thermo Fisher) et la valeur obtenue permettra de calculer la dilution finale.

PROCÉDURE

1. Préparez les barrettes PCR suivantes, conformément au nombre de réactions :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	16	24	32
Barrette PCR	**4 tubes**	**8 tubes**	**8 tubes**	**8 tubes**
Nombre de barrettes	2	2	3	4

2. Préparez une dilution pour chaque échantillon d'ADN extrait dans le nombre approprié de barrettes PCR en procédant comme suit :

DILUTION D'ADN	
ADN	Quantité d'ADN (voir Tableau 1 ci-dessus)
IDTE	Complétez à 40 µl

3. Mélangez brièvement en pipettant doucement 5 fois de haut en bas, puis en centrifugeant brièvement dans une microcentrifugeuse pour recueillir tout le liquide.

Conseil : point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à 4 °C.

5.2.2. Préparation de pré-mélanges et de réactifs

COMPOSANTS ET RÉACTIFS

- Mélange d'enzymes pour fragmentation
- Tampon pour fragmentation
- Amplificateur pour ligature
- Mélange pour ligature
- Master Mix pour PCR x2
- Eau exempte de nucléase
- Billes AMPure® XP
- Éthanol

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

PRÉPARATION

- Retirez les composants du kit SOPHiA DDM DNA Library Prep Kit III du congélateur à -20 °C et laissez décongeler sur de la glace.
- Retirez les billes AMPure® XP du réfrigérateur à 2-8 °C et laissez-les atteindre la température ambiante en au moins 30 minutes. Mélangez soigneusement les billes AMPure® XP, afin de garantir une remise en suspension adéquate des billes avant de les utiliser pour toutes les étapes suivantes.
- Préparez de l'éthanol frais à 80 % (volume comme suit, en fonction du nombre de réactions).

80 % ÉTHANOL				
Nombre de réactions	**8**	**16**	**24**	**32**
80 % éthanol (en ml)	10	20	30	40

- Vérifiez que le tampon pour fragmentation du kit SOPHiA DNA Library Prep Kit III est entièrement décongelé.
- Mélangez soigneusement et centrifugez tous les réactifs avant de les utiliser et placez-les sur de la glace.

PRÉ-MÉLANGES

1. Préparez le **pré-mélange pour fragmentation** comme suit :

PRÉ-MÉLANGE POUR FRAGMENTATION				
Nombre de réactions	**8**	**16**	**24**	**32**
Tampon de fragmentation (en µl)	38,4	76,8	115,2	153,6
Enzyme de fragmentation (en µl)	57,6	115,2	172,8	230,4

***** Conservez sur de la glace.

2. Préparer le **pré-mélange pour ligature** comme suit :

PRÉ-MÉLANGE POUR LIGATURE				
Nombre de réactions	**8**	**16**	**24**	**32**
Mélange pour ligature (en µl)	418	836	1 254	1 672
Amplificateur pour ligature (en µl)	14,4	28,8	43,2	57,6

   - Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.
   - Conservez sur de la glace.

Important : Le mélange pour ligature est extrêmement visqueux ; pipettez doucement et veillez à obtenir un pré-mélange pour ligature homogène.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

5.2.3. Fragmentation enzymatique, réparation d'extrémité et poly-adénylation

CONSOMMABLES

- ADN double brin dilué dans 40 µl.
- Pré-mélange pour fragmentation
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

PRÉPARATION

- Programmez le thermocycleur pour la fragmentation avec les paramètres suivants :

TEMPÉRATURE (°C)		DURÉE (MINUTES)
Couvercle	99	
Étape 1	4	1
Étape 2	37	20
Étape 3	65	30
Maintien	4	∞

Démarrez le programme Fragmentation. Lorsque le bloc atteint l'étape 1 (4 °C), mettez le programme en pause.

PROCÉDURE

Important : veillez à toujours conserver les échantillons et le pré-mélange sur de la glace avant et après l'incubation pour bloquer la réaction enzymatique.

1. Pour faciliter le pipettage, créez un réservoir de pré-mélange pour Fragmentation en ajoutant les volumes suivants à un nouvel ensemble de barrettes à 4 ou 8 tubes, comme suit :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	16	24	32
Barrette PCR (1 barrette)	**4 tubes**	**8 tubes**	**8 tubes**	**8 tubes**
Pré-mélange pour fragmentation (en µl)	23	23	35	46

2. Combinez les résultats comme suit :
    - À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 10 µl de pré-mélange pour Fragmentation à chacun des 40 µl d'échantillons d'ADN (soit un total de 50 µl dans des barrettes de 4 ou 8 tubes).
    - À l'aide d'une pipette multicanaux configurée à 35 µl, mélangez soigneusement en pipettant 5 fois de haut en bas et en centrifugeant brièvement dans une microcentrifugeuse.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

3. Placez les échantillons dans le thermocycleur et continuez le programme Fragmentation.

   Passez directement à la section Ligature.

5.2.4. Ligature

CONSOMMABLES

- Produits de la réaction de fragmentation dans 50 µl chacun.
- Pré-mélange pour ligature
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

PRÉPARATION

- Pendant la fragmentation, préparez de nouvelles barrettes PCR avec 5 µl d'adaptateur universel Stubby par tube de la manière suivante :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	16	24	32
Barrette PCR (1 barrette)	**4 tubes**	**8 tubes**	**8 tubes**	**8 tubes**
Nombre de barrettes	2	2	3	4

- Configurez le thermocycleur à une température de 20 °C (couvercle ouvert).

PROCÉDURE

Important : veillez à toujours conserver les échantillons et le pré-mélange sur de la glace avant et après l'incubation pour bloquer la réaction enzymatique.

1. Pour faciliter le pipettage, créez un réservoir contenant un pré-mélange de ligature dans un nouvel ensemble de barrettes PCR, de la manière suivante :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	16	24	32
Barrette PCR (1 barrette)	**4 tubes**	**8 tubes**	**8 tubes**	**8 tubes**
Pré-mélange pour ligature (en µl)	100	100	150	200

2. À l'aide d'une pipette multicanaux, transférez les 50 µl de chaque produit de réaction de fragmentation vers les barrettes de 4 ou 8 tubes contenant 5 µl d'adaptateur universel Stubby.
3. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.
4. À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 45 µl du pré-mélange de ligature à chaque produit de réaction de fragmentation (55 µl dans chaque tube de la barrette de 4 ou 8 tubes).
5. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.
6. Incubez dans le thermocycleur à 20 °C pendant 15 minutes (couvercle ouvert).

Passez à la section Nettoyage suite à une ligature

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Important : veillez à ne pas placer la ou les barrettes sur de la glace à la fin de la ligature, au risque d'altérer la liaison de l'ADN aux billes.

5.2.5. Nettoyage après ligature

CONSOMMABLES

- Produits de la réaction de ligature dans 100 µl chacun
- Billes AMPure® XP équilibrées à température ambiante
- Éthanol frais à 80 %
- IDTE
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

PROCÉDURE

1. À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 80 µl de billes AMPure® XP dans chacun des 100 µl de produits de réaction de ligature. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas.
2. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez pendant quelques instants si nécessaire.
3. Placez la barrette de 4 ou 8 tubes sur un support magnétique à 96 puits pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
4. Éliminez avec précaution 170 µl de surnageant à l'aide d'une pipette multicanaux.

   Gardez les tubes sur le support magnétique pour les étapes suivantes.
5. Au moyen d'une pipette multicanaux, ajoutez 170 µl d'éthanol à 80 % aux billes. Incubez pendant 30 secondes à 1 minute.
6. Éliminez l'éthanol avec précaution en vous servant d'une pipette multicanaux.
7. Répétez les étapes 5 et 6 une fois.
8. Retirez l'éthanol résiduel en utilisant une pipette multicanaux P10 ou P20.
9. Séchez les billes à l'air libre à température ambiante pendant 5 minutes. Ne séchez pas trop les billes, cela pourrait diminuer la quantité d'ADN récupérée.

   Retirez les tubes du support magnétique.
10. À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 20 µl d'IDTE aux billes.

    Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.

    Passez à la section Amplification de bibliothèque.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

5.2.6. Amplification de bibliothèque

CONSOMMABLES

- Produits de la réaction de ligature et billes remises en suspension dans 20 µl d'IDTE chaque
- Master Mix pour PCR x 2
- 32 Unique Dual Index Primer Plate for Illumina®

PRÉPARATION

- Programmez le thermocycleur pour une amplification de bibliothèque avec les paramètres suivants :

	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE (SECONDES)	
Couvercle	99	-	
Étape 1 : dénaturation initiale	98	120	
Étape 2 : dénaturation	98	20	
Étape 3 : annelage	60	30	8 cycles
Étape 4 : extension	72	30	
Étape 5 : extension finale	72	60	
Maintien	10	∞	

PROCÉDURE

1. Pour faciliter le pipettage, créez un réservoir de Master Mix pour PCR x 2 pour PCR en ajoutant les volumes suivants à un nouvel ensemble de barrettes à 4 ou 8 tubes, comme suit :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	16	24	32
Barrette PCR (1 barrette)	**4 tubes**	**8 tubes**	**8 tubes**	**8 tubes**
Master Mix pour PCR x 2 (en µl)	60	60	85	120

2. Combinez les résultats comme suit :
    - À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 5 µl d'amorce à index double unique différente par tube aux produits de ligature et aux billes, selon votre stratégie d'indexation.
    - Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.
    - À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 25 µl de Master Mix x 2 pour PCR aux produits de ligature et aux billes (50 µl dans des barrettes de 4 ou 8 tubes). Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement. Placez les tubes dans le thermocycleur et exécutez le programme Amplification de bibliothèque.

Conseil : point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à 4 °C.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

5.2.7. Nettoyage après amplification

CONSOMMABLES

- Produits de la réaction de ligature dans 50 µl chacun
- Billes AMPure® XP équilibrées à température ambiante
- Éthanol frais à 80 %
- Eau exempte de nucléase
- Tubes à faible liaison d'ADN pour le stockage des bibliothèques

PROCÉDURE

1. À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 50 µl de billes AMPure® XP dans chacun des 50 µl de produit PCR. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas.
2. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez pendant quelques instants si nécessaire.
3. Placez les barrettes de 4 ou 8 tubes sur un support magnétique à 96 puits pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
4. Éliminez avec précaution 90 µl de surnageant à l'aide d'une pipette multicanaux.

   Gardez les tubes sur le support magnétique pour les étapes suivantes.
5. Au moyen d'une pipette multicanaux, ajoutez 170 µl d'éthanol à 80 % aux billes. Laissez les tubes reposer verticalement entre 30 secondes et 1 minute.
6. Éliminez l'éthanol avec précaution en vous servant d'une pipette multicanaux.
7. Répétez les étapes 5 et 6 une fois.
8. Retirez l'éthanol résiduel en utilisant une pipette multicanaux P10 ou P20.
9. Séchez les billes à l'air libre à température ambiante pendant 5 minutes. Ne séchez pas trop les billes, cela pourrait diminuer la quantité d'ADN récupérée.

   Retirez les tubes du support magnétique.
10. À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 30 µl d'eau exempte de nucléase aux billes. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez pendant quelques instants si nécessaire.
11. Placez la barrette de 4 ou 8 tubes sur un support magnétique à 96 puits pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
12. Transférez soigneusement 28 µl de surnageant vers un nouveau tube de stockage de bibliothèque étiqueté.

Conseil : point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à 4 °C ou -20 °C pour un stockage prolongé.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

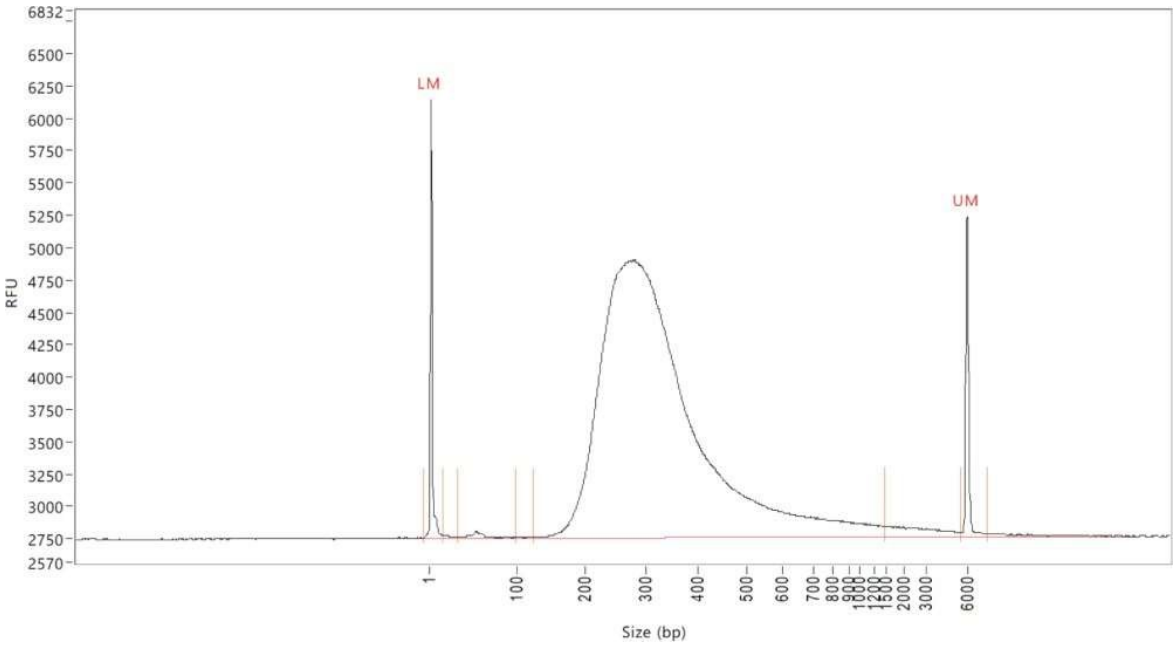
5.2.8. Quantification et contrôle qualité individuels de la bibliothèque

CONSOMMABLES

- Matériel et réactifs pour la quantification fluorimétrique
- Système d'électrophorèse capillaire
- Eau exempte de nucléase
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

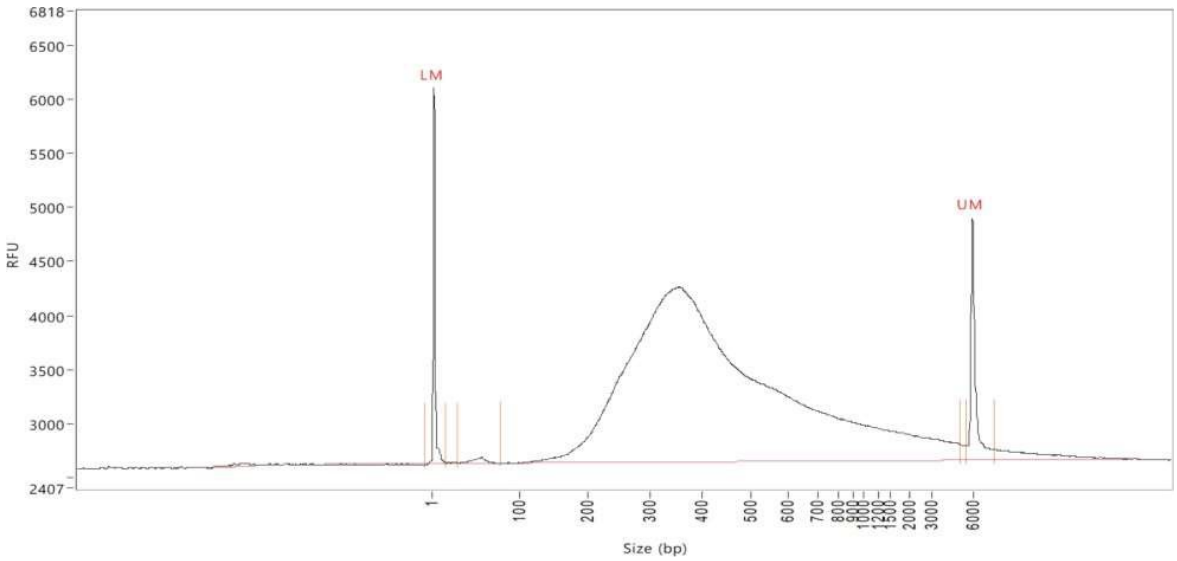
PROCÉDURE

1. Préparer une dilution quadruple de chaque bibliothèque avec de l'eau exempte de nucléase (p. ex., 2 µl de bibliothèque dans 6 µl d'eau exempte de nucléase).
2. Quantifier les bibliothèques par une méthode fluorimétrique (p. ex., quantification Qubit HS utilisant 2 µl de la dilution quadruple de bibliothèque mentionnée ci-dessus).
3. Contrôler la qualité des bibliothèques en analysant leur profil par électrophorèse capillaire. Les fragments d'ADN des bibliothèques doivent avoir une distribution de tailles comprise entre 200 pb et 800 pb.



Exemple d'une distribution de bibliothèques d'ADN obtenue avec le système d'électrophorèse capillaire Agilent Fragment Analyzer™. LM désigne le marqueur bas, UM le marqueur haut.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.



Exemple d'une distribution de bibliothèques d'ADN obtenue avec le système d'électrophorèse capillaire Agilent Fragment Analyzer™. LM désigne le marqueur bas, UM le marqueur haut.

5.2.9. Regroupement de bibliothèques pour séquençage de génome entier (SGE) passe-bas

CONSOMMABLES

- Bibliothèques individuelles
- IDTE
- Tubes de 1,5 ml à faible liaison d'ADN

PROCÉDURE

1. Déterminez la molarité de chaque bibliothèque avec la taille moyenne de la bibliothèque (taille du pic en paires de bases) et la concentration (ng/µl) obtenue à l'étape 5.2.8 comme suit :

$$\text{Molarité de la bibliothèque (nM)} = \frac{\text{Concentration de la bibliothèque (ng/µl)}}{\text{Taille moyenne en paires de bases x 649,5}} \times 10^6$$

2. Transférez 2 µl de chaque bibliothèque individuellement dans un nouveau tube et diluez à 10 nM avec de l'IDTE.
3. Regroupez les bibliothèques individuelles à 10 nM en combinant 5 µl de chaque dilution de bibliothèque. Combinez les mêmes bibliothèques dans un regroupement qui sera combiné dans le groupe de capture. Lors du traitement de plusieurs captures, créez le même nombre de groupes de séquençage de génome entier qu'il y a de groupes de captures.

Conseil : point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à 4 °C ou -20 °C pour un stockage prolongé.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

5.3. Capture

5.3.1. Regroupement de bibliothèques pour hybridation et capture

CONSOMMABLES

- Bibliothèques individuelles
- Human Cot DNA
- xGen® Universal Blockers - TS Mix
- Tubes de 1,5 ml à faible liaison d'ADN

PROCÉDURE

1. Préparez le pré-mélange suivant dans un tube à faible liaison d'ADN :

NOMBRE DE CAPTURES	1	2	3	4
Human Cot DNA (en µl)	5	11	16,5	22
xGen® Universal Blockers - TS Mix (en µl)	2	4,4	6,6	8,8

2. Dans le cas de deux captures ou plus, pipettez 7 µl du pré-mélange ci-dessus dans des tubes individuels à faible liaison d'ADN.
3. Ajoutez un regroupement de 8 bibliothèques individuelles en utilisant 200 ng de chaque (total de 1 600 ng) par capture dans les tubes individuels contenant le pré-mélange ci-dessus.
4. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.
5. Faites sécher chaque mélange en utilisant un concentrateur d'ADN sous vide jusqu'à ce que le mélange soit complètement lyophilisé. Chauffez modérément (45 - 50 °C) pour accélérer la lyophilisation.

Conseil : point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à -20 °C.

5.3.2. Hybridation

CONSOMMABLES

- Bibliothèques lyophilisées
- 2 tampons d'hybridation
- Amplificateur pour tampon d'hybridation
- HRD_v1 xGen® Lockdown Probes
- Eau exempte de nucléase
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase
- Tubes de 1,5 ml
- 10 tampons de lavage I
- 10 tampons de lavage II
- 10 tampons de lavage III
- 10 tampons de lavage rigoureux
- 2 tampons de lavage de billes

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

PRÉPARATION

1. Préchauffez le thermocycleur à 95 °C (couvercle à 99 °C).
2. Après une dénaturation de 10 minutes, passez directement à une température de 65 °C (couvercle à 75 °C).

Important : Il est recommandé d'utiliser différents thermocycleurs pour les incubations à 95 °C et 65 °C, si possible.

PROCÉDURE

1. Préparez un pré-mélange d'hybridation conformément au nombre de réactions de capture :

NOMBRE DE CAPTURES	1	2	3	4
2 tampons d'hybridation (en µl)	8,5	18,7	28,05	37,4
Amplificateur pour tampon d'hybridation (en µl)	3,4	7,48	11,22	14,96
Eau exempte de nucléase (en µl)	1,1	2,42	3,63	4,84

2. Resuspendez la pastille lyophilisée dans 13 µl du pré-mélange d'hybridation.
3. Transférez la pastille resuspendue vers un nouveau tube PCR (un tube par réaction de capture).
4. Incubez dans le thermocycleur à 95 °C pendant 10 minutes.

Important : Veillez à maintenir la température du tube à 65 °C des étapes 4 à 6, au risque d'obtenir un annelage incorrect de la sonde.

5. Transférez le tube PCR du thermocycleur à 95 °C vers celui à 65 °C, puis ajoutez 4 µl de sondes au mélange. À l'aide d'une pipette configurée à 13 µl, mélangez soigneusement en pipettant 5 fois de haut en bas.
6. Incubez dans le thermocycleur à 65 °C pendant 4 à 16 heures.
7. Préparez préalablement les solutions de travail des différents tampons de lavage, comme expliqué dans les pages suivantes, afin qu'ils puissent s'équilibrer pendant la réaction d'hybridation.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

PRÉPARATION D'UN TAMPON DE LAVAGE POUR 1 RÉACTION

TAMPON	STOCK TAMPON (µl)	EAU (µl)	1 VOLUME FINAL (µl)
10 tampons de lavage I	33	297	**330**
10 tampons de lavage II	22	198	**220**
10 tampons de lavage III	22	198	**220**
10 tampons de lavage rigoureux	44	396	**440**
2 tampons de lavage de billes	275	275	**550**

Important : préchauffez 1 tampon de lavage rigoureux et une aliquote de 110 µl d'un tampon de lavage I à 65 °C dans un bloc thermique ou au bain-marie pendant au moins 2 heures. Conservez le tampon de lavage I restant à température ambiante.

PRÉPARATION D'UN TAMPON DE LAVAGE POUR 2 RÉACTIONS

TAMPON	STOCK TAMPON (µl)	EAU (µl)	1 VOLUME FINAL (µl)
10 tampons de lavage I	66	594	**660**
10 tampons de lavage II	44	396	**440**
10 tampons de lavage III	44	396	**440**
10 tampons de lavage rigoureux	88	792	**880**
2 tampons de lavage de billes	550	550	**1 100**

Important : Préchauffez 1 tampon de lavage rigoureux et une aliquote de 220 µl d'un tampon de lavage I à 65 °C dans un bloc thermique ou au bain-marie pendant au moins 2 heures. Conservez le tampon de lavage I restant à température ambiante.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

PRÉPARATION D'UN TAMPON DE LAVAGE POUR 3 RÉACTIONS

TAMPON	STOCK TAMPON (µl)	EAU (µl)	1 VOLUME FINAL (µl)
10 tampons de lavage I	99	891	**990**
10 tampons de lavage II	66	594	**660**
10 tampons de lavage III	66	594	**660**
10 tampons de lavage rigoureux	132	1 188	**1 320**
2 tampons de lavage de billes	825	825	**1 650**

Important : Préchauffez 1 tampon de lavage rigoureux et une aliquote de 330 µl d'un tampon de lavage I à 65 °C dans un bloc thermique ou au bain-marie pendant au moins 2 heures. Conservez le tampon de lavage I restant à température ambiante.

PRÉPARATION D'UN TAMPON DE LAVAGE POUR 4 RÉACTIONS

TAMPON	STOCK TAMPON (µl)	EAU (µl)	1 VOLUME FINAL (µl)
10 tampons de lavage I	132	1 188	**1 320**
10 tampons de lavage II	88	792	**880**
10 tampons de lavage III	88	792	**880**
10 tampons de lavage rigoureux	176	1 584	**1 760**
2 tampons de lavage de billes	1 100	1 100	**2 200**

Important : préchauffez 1 tampon de lavage rigoureux et une aliquote de 440 µl d'un tampon de lavage I à 65 °C dans un bloc thermique ou au bain-marie pendant au moins 2 heures. Conservez le tampon de lavage I restant à température ambiante.

5.3.3. Préparation des billes de streptavidine

CONSOMMABLES

- Billes de streptavidine équilibrées à température ambiante
- 1 tampon de lavage de billes
- Tubes de 1,5 ml
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

PROCÉDURE

Exécutez ces étapes juste avant la fin de l'incubation d'hybridation.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

1. Mélangez les billes au vortex pendant 15 secondes.
2. Transférez 100 µl de billes par capture (200 µl pour 2 réactions, 300 µl pour 3 réactions, 400 µl pour 4 réactions) dans un seul tube de 1,5 ml.
3. Placez le tube sur un support magnétique et laissez-le reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
4. Ajoutez 200 µl du tampon de lavage de billes par capture (400 µl pour 2 réactions, 600 µl pour 3 réactions, 800 µl pour 4 réactions) dans le tube. Agitez au vortex pendant 10 secondes.
5. Placez le tube sur un support magnétique et laissez-le reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
6. Répétez les étapes 4 et 5 une fois.
7. Ajoutez 100 µl du tampon de lavage de billes par capture (200 µl pour 2 réactions, 300 µl pour 3 réactions, 400 µl pour 4 réactions) dans le tube. Agitez au vortex pendant 10 secondes.
8. Transférez 100 µl de billes nettoyées dans un nouveau tube PCR (un tube par réaction de capture).
9. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique à 96 puits et laissez-le(s) reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.

Important : Veillez à ce que les billes ne s'assèchent pas.

Passez immédiatement à la section Liaison de cibles hybridées aux billes.

5.3.4. Liaison de cibles hybridées aux billes

CONSOMMABLES

- Billes de streptavidine nettoyées dans un ou plusieurs tubes PCR
- Réaction(s) d'hybridation

PROCÉDURE

Important : Travaillez avec diligence pour maintenir une température proche de 65 °C.

1. Retirez la ou les réactions d'hybridation du thermocycleur et ralentissez brièvement la rotation du ou des tubes, puis replacez-le(s) dans le thermocycleur.
2. Placez les tubes de billes de streptavidine lavés dans le thermocycleur (pas plus de deux tubes à la fois pour éviter l'assèchement des billes).
3. Pour chaque réaction d'hybridation, transférez 17 µl de solution à la réaction d'hybridation dans un tube PCR contenant des billes nettoyées. Resuspendez les billes en pipettant de haut en bas jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

4. Liez l'ADN aux billes en plaçant le(s) tube(s) dans un thermocycleur à 65 °C (couvercle à 75 °C). Incubez pendant 45 minutes.
5. Pendant l'incubation, pipettez doucement le(s) tube(s) de haut en bas toutes les 15 minutes pour maintenir les billes en suspension.

Passez directement à la section Lavage des billes de streptavidine pour retirer l'ADN non lié.

5.3.5. Lavage des billes de streptavidine pour retirer l'ADN non lié

CONSOMMABLES

- Cibles hybridées sur des billes
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase
- Tubes de 1,5 ml à faible liaison d'ADN
- 1 tampon de lavage I (1/3 à 65 °C et 2/3 à température ambiante)
- 1 tampon de lavage II
- 1 tampon de lavage III
- 1 tampon de lavage rigoureux (à 65 °C)
- Eau exempte de nucléase
- IDTE

PROCÉDURE

Veillez à maintenir une température proche de 65 °C pour les étapes 1 à 7.

Remarque :

Si 2 tubes de capture ou plus sont utilisés, travaillez de manière échelonnée entre les étapes 2 et 8, notamment :

1. **Lorsque le premier tube est placé dans le bloc thermique à 65 °C pour la première incubation de 5 min (étape 5), activez une minuterie.**
2. **Commencez le traitement du second tube.**
3. **Lors du placement du second tube à 65 °C, notez le temps séparant les différents tubes et veillez à respecter cet écart tout au long des étapes 2 à 8 afin de garantir un temps d'incubation exact de 5 min à 65 °C pour chaque tube avec un lavage rigoureux.**

1. Ajoutez 100 µl du tampon de lavage I (à 65 °C) dans chaque tube de billes de streptavidine/cible hybridé.
2. Pour chaque tube, resuspendez et transférez le mélange vers un nouveau tube de 1,5 ml à faible liaison d'ADN. Si deux tubes de capture ou plus sont utilisés, travaillez de manière échelonnée comme indiqué ci-dessus :
3. Placez le tube sur un support magnétique et laissez-le reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

4. Ajoutez 200 µl du tampon de lavage rigoureux (à 65 °C) dans le tube. Resuspendez doucement les billes en pipettant de haut en bas.

   Un mélange vigoureux des billes avec le tampon de lavage rigoureux pourrait altérer la qualité de la capture.

5. Incubez à 65 °C pendant 5 minutes.
6. Placez le tube sur un support magnétique et laissez-le reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
7. Répétez les étapes 4 et 6 une fois.

   Travaillez à température ambiante.

8. Ajoutez 200 µl du tampon de lavage I (à température ambiante) dans votre tube. Resuspendez doucement les billes en pipettant de haut en bas.

   Remarque : Si 2 tubes de capture ou plus sont utilisés pour effectuer le travail ; à partir de cette étape, traitez tous les tubes simultanément.

9. Agitez au vortex pendant 2 minutes.
10. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique et laissez-le(s) reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
11. Ajoutez 200 µl du tampon de lavage II dans chaque tube. Agitez au vortex pendant 1 minute.
12. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique et laissez-le(s) reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
13. Ajoutez 200 µl du tampon de lavage III dans chaque tube. Agitez au vortex pendant 30 secondes. Centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
14. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique et laissez-le(s) reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
15. Ajoutez 200 µl d'IDTE dans chaque tube. Resuspendez les billes. Centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
16. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique et laissez-le(s) reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
17. Retirez tout le liquide restant à l'aide d'une pipette P10 ou P20.
18. Ajoutez 20 µl d'eau exempte de nucléase dans chaque tube, resuspendez et transférez le mélange billes/eau vers un nouveau tube PCR.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

5.3.6. Amplification post-capture

CONSOMMABLES

- Suspension de billes de streptavidine/d'eau exempte de nucléase (20 µl)
- Master Mix pour PCR post-capture 2X
- Post Capture Illumina® Primers Mix
- Amplificateur PCR
- Eau exempte de nucléase

PRÉPARATION

- Programmez le thermocycleur pour une amplification post-capture avec les paramètres suivants :

	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE (SECONDES)	
Couvercle	99	-	
Étape 1 : dénaturation initiale	98	120	
Étape 2 : dénaturation	98	20	
Étape 3 : annelage	60	30	15 cycles
Étape 4 : extension	72	30	
Étape 5 : extension finale	72	60	
Maintien	10	∞	

PROCÉDURE

1. Préparez le pré-mélange pour PCR comme suit :

PRÉ-MÉLANGE pour PCR				
Nombre de réaction(s)	**1**	**2**	**3**	**4**
Master Mix pour PCR post-capture 2X (en µl)	25	55	82,5	110
Post Capture Illumina® Primers Mix (en µl)	2,5	5,5	8,25	11
Amplificateur PCR (en µl)	2,5	5,5	8,25	11

2. Ajoutez 30 µl de pré-mélange pour PCR à chaque suspension de billes. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.
3. Placez le(s) tube(s) dans le thermocycleur et exécutez le programme Amplification post-capture.

Conseil : point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à 4 °C ou -20 °C pour un stockage prolongé.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

5.3.7. Nettoyage de l'amplification post-capture

CONSOMMABLES

- Produits de la réaction de ligature dans 50 µl chacun
- Billes AMPure® XP équilibrées à température ambiante
- Éthanol frais à 80 %
- IDTE
- Tubes à faible liaison d'ADN pour le stockage des bibliothèques

PROCÉDURE

1. Ajoutez 50 µl de billes AMPure® XP dans chacun des 50 µl de produits de la réaction PCR. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas.
2. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement si nécessaire pour éliminer le liquide des parois du tube.
3. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
4. Éliminez avec précaution 90 µl de surnageant à l'aide d'une pipette multicanaux.

   Gardez le(s) tube(s) sur le support magnétique pour les étapes suivantes.
5. Au moyen d'une pipette multicanaux, ajoutez 170 µl d'éthanol à 80 % aux billes. Laissez le(s) tube(s) reposer verticalement entre 30 secondes et 1 minute.
6. Éliminez l'éthanol avec précaution.
7. Répétez les étapes 5 et 6 une fois.
8. Retirez l'éthanol résiduel en utilisant une pipette P10 ou P20.
9. Séchez les billes à l'air libre à température ambiante pendant 5 minutes. Ne séchez pas trop les billes, cela pourrait diminuer la quantité d'ADN récupérée.

   Retirez le(s) tube(s) du support magnétique.
10. Ajoutez 20 µl d'IDTE aux billes. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour éliminer le liquide des parois du tube.
11. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
12. Transférez soigneusement 18 µl de surnageant (il est recommandé de transférer deux fois 9 µl dans cette étape) vers un nouveau tube de stockage de bibliothèque étiqueté.

Conseil : point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à 4 °C ou -20 °C pour un stockage prolongé.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

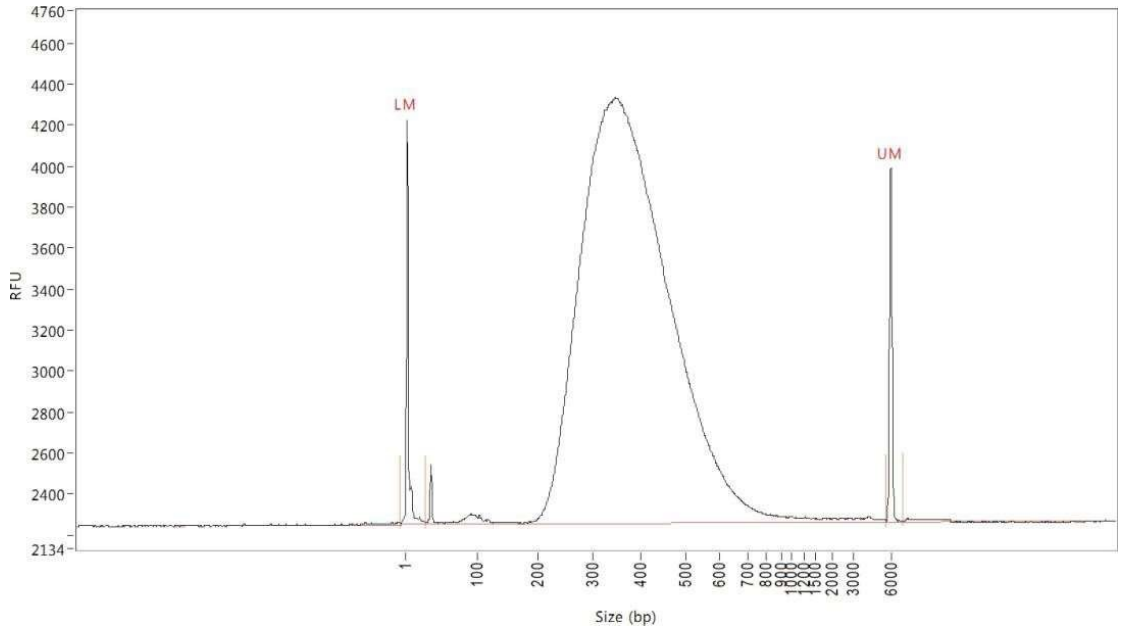
5.3.8. Quantification et contrôle qualité finals de la bibliothèque

CONSOMMABLES

- Matériel et réactifs pour la quantification fluorimétrique
- Système d'électrophorèse capillaire

PROCÉDURE

1. Quantifier chaque regroupement de bibliothèques capturé par une méthode fluorimétrique (p. ex., quantification Qubit HS utilisant 2 µl de la bibliothèque).
2. Contrôler la qualité du regroupement de bibliothèques capturé en analysant leur profil par électrophorèse capillaire. Les fragments d'ADN des bibliothèques doivent avoir une distribution de tailles comprise entre 200 pb et 800 pb.



Exemple de distribution de tailles d'un regroupement de bibliothèques post-capture obtenue avec le système d'électrophorèse capillaire Agilent Fragment Analyzer™. LM désigne le marqueur bas, UM le marqueur haut.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

5.4. Séquençage

5.4.1. Préparation de bibliothèque pour le séquençage

CONSOMMABLES

- Kit de séquençage Illumina® NextSeq®
- Bibliothèques capturées finales
- Tampon EBT ou similaire

PROCÉDURE

1. Déterminez la molarité de chaque regroupement capturé avec la taille moyenne de la bibliothèque (taille du pic en paires de bases) et la concentration (ng/µl) obtenue à l'étape 5.3.8 comme suit :

$$\text{Molarité de la bibliothèque (nM)} = \frac{\text{Concentration de la bibliothèque (ng/µl)}}{\text{Taille moyenne en paires de bases x 649,5}} \times 10^6$$

2. Diluer chaque regroupement capturé à 10 nM.
3. Décongelez le regroupement de séquençage de génome entier généré en 5.3.1.
4. Pour générer le groupe de séquençage, combinez chaque regroupement capturé avec son groupe de séquençage de génome entier correspondant en mélangeant 3,3 µl de regroupement capturé avec 6,7 µl de groupe de séquençage de génome entier.
5. En cas de traitement de plusieurs groupes de séquençage, mélangez-les en quantités égales (ex. : 5 µl de chaque) en suivant le tableau de recommandations de séquençage ci-dessous :

TYPE DE KIT POUR SYSTÈME NEXTSEQ 500/ 550	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS PAR RUN
Mid-Output	8 échantillons (1 regroupement)
High-Output	24 échantillons (3 regroupements)

6. Mélangez soigneusement et utilisez cette dilution conformément aux recommandations de dénaturation standard Illumina®.
7. Pour charger la dilution, voir le tableau ci-dessous :

TYPE DE KIT POUR SYSTÈME NEXTSEQ 500/ 550	CHARGEMENT DE LA DILUTION
Mid-Output	1,3 pM
High-Output	1,4 pM
[Ajustez la dilution (1,1 pM à 1,5 pM) selon le nombre de clusters obtenus lors du premier run]	

8. Pour connaître le nombre de lectures recommandé par échantillon, voir le tableau ci-dessous :

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

LONGUEUR DE LECTURE (EN PB)	NOMBRE TOTAL DE LECTURES RECOMMANDÉ PAR ÉCHANTILLON	PAIRES DE LECTURES RECOMMANDÉES (FRAGMENTS) PAR ÉCHANTILLON
2 X 150	32 millions	16 millions

Remarque : l'augmentation du nombre de lectures par échantillon devrait fournir des appels de variants plus sûrs et plus sensibles, plus particulièrement dans les régions qui présentent une profondeur de lecture relativement faible. Consultez les avertissements, limitations et précautions à la section 9.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

6. PROCÉDURE D'ANALYSE

6.1. Démultiplexage des données NGS

L'utilisateur doit effectuer un démultiplexage des données NGS en suivant les instructions contenues dans le guide d'utilisation du séquenceur Illumina® NextSeq® 500/550 (ex. : Guide des systèmes NextSeq® 550, Document # 15069765 v07). Comme cela est indiqué par Illumina®, un démultiplexage autonome d'analyses de tiers peut être effectué avec bcl2fastq v2.0 ou au-delà (Guide du logiciel de conversion bcl2fastq2 v2.20, Document #15051736 v03).

Remarque : les utilisateurs doivent noter que l'usage de l'option de séparation sans trajectoire dans bcl2fastq ou l'usage d'autres workflows de démultiplexage automatisés peut provoquer des noms de fichiers incompatibles avec l'application Web SOPHiA DDM. Consultez le manuel d'utilisation de l'application Web SOPHiA DDM pour prendre connaissance des instructions.

6.2. Chargement et analyse des données

L'utilisateur se connecte à l'application Web SOPHiA DDM et sélectionne la solution SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency dans la fenêtre « My product(s) » pour lancer le chargement des données de NGS. Pour créer une nouvelle demande d'analyse génomique, veuillez consulter la section « Créer une demande d'analyse » du manuel d'utilisation SOPHiA DDM pour application Web de diagnostic in vitro pour plus d'instructions. Une fois l'analyse achevée, les utilisateurs reçoivent une notification par courrier électronique. Si aucune notification n'est reçue dans les 24 heures suivant le lancement du processus de chargement des données, les utilisateurs doivent contacter l'assistance.

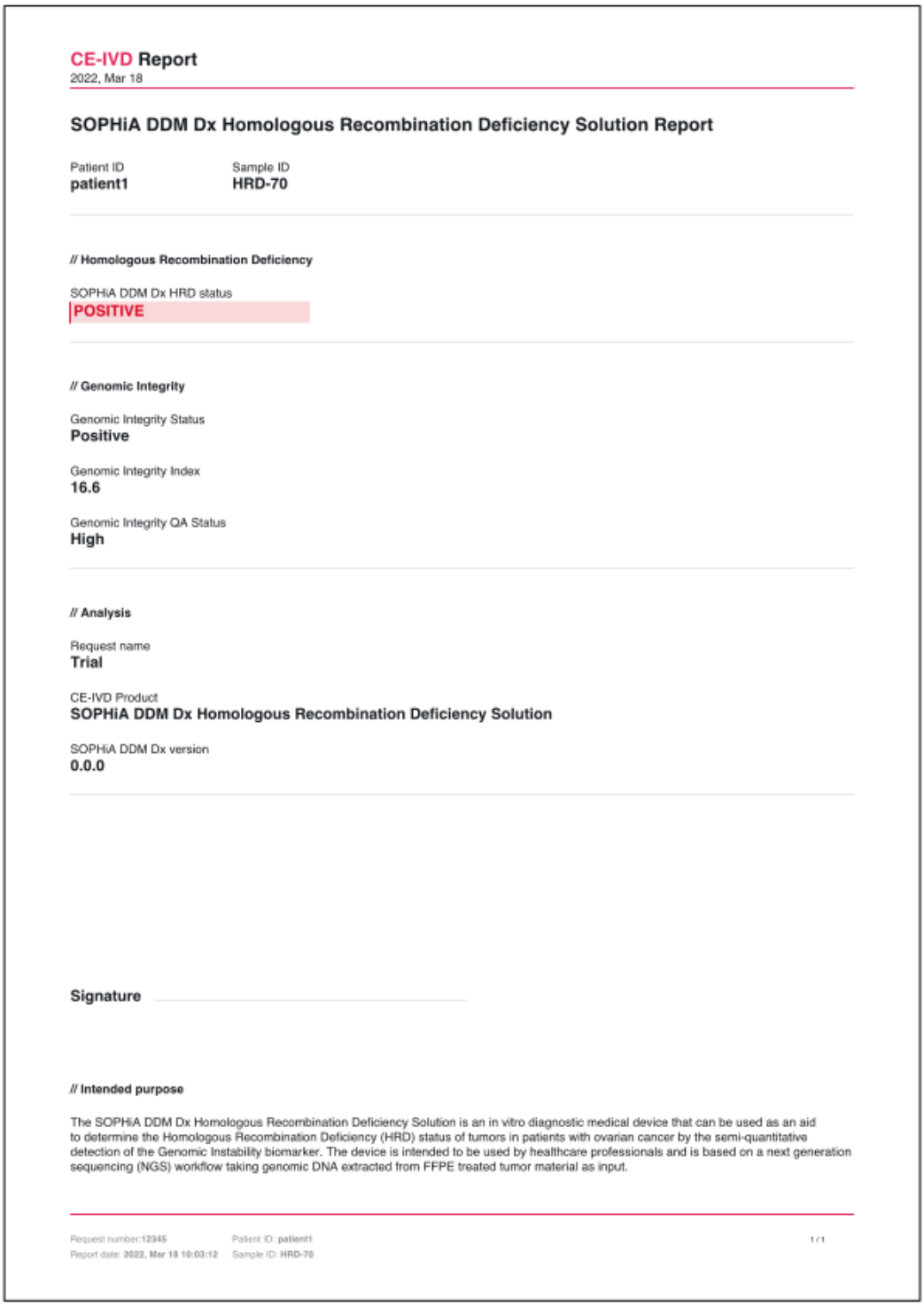
Remarque : tous les échantillons de la nouvelle demande d'analyse doivent avoir été traités dans le même run de séquençage et avoir été préparés avec les mêmes réactifs de test.

6.3. Génération du rapport

Une fois que les fichiers de séquençage ont été téléchargés, l'évolution de l'analyse peut être suivie dans le widget « My Genomic Analysis Requests » du tableau de bord ou dans le navigateur. Une fois l'opération terminée, le compte rendu de solution SOPHiA DDM Dx HRD généré pour chaque échantillon de la demande est accessible et peut être téléchargé au format PDF. Le manuel d'utilisation de l'application Web SOPHiA DDM peut être utilisé pour obtenir des instructions détaillées à propos de l'analyse.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Figure B. Exemple de compte rendu de solution SOPHiA DDM Dx HRD.



CE-IVD Report
2022, Mar 18

SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency Solution Report

Patient ID
patient1

Sample ID
HRD-70

// Homologous Recombination Deficiency

SOPHiA DDM Dx HRD status
POSITIVE

// Genomic Integrity

Genomic Integrity Status
Positive

Genomic Integrity Index
16.6

Genomic Integrity QA Status
High

// Analysis

Request name
Trial

CE-IVD Product
SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency Solution

SOPHiA DDM Dx version
0.0.0

Signature

// Intended purpose

The SOPHiA DDM Dx Homologous Recombination Deficiency Solution is an in vitro diagnostic medical device that can be used as an aid to determine the Homologous Recombination Deficiency (HRD) status of tumors in patients with ovarian cancer by the semi-quantitative detection of the Genomic Instability biomarker. The device is intended to be used by healthcare professionals and is based on a next generation sequencing (NGS) workflow taking genomic DNA extracted from FFPE treated tumor material as input.

Request number:12345 Patient ID: patient1 1 / 1
Report date: 2022, Mar 18 10:03:12 Sample ID: HRD-70

Le compte rendu de solution SOPHiA DDM Dx HRD présente : le statut SOPHiA DDM Dx HRD, le statut d'intégrité génomique, l'indice d'intégrité génomique, le statut d'AQ d'intégrité génomique. Le tableau suivant contient une vue d'ensemble des résultats possibles.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Statut SOPHiA DDM Dx HRD	Statut d'intégrité génomique	Statut d'AQ d'intégrité génomique	Description
Positive	Positive	High	Appel positif à niveau de confiance élevé.
Positive	Positive	Medium	Appel positif à niveau de confiance élevé. Les données NGS satisfont les critères de qualité nécessaires pour juger un échantillon comme positif. Cependant, les données NGS sont de qualité sous-optimale et/ou le contenu tumoral de l'échantillon est faible.
Negative	Negative	High	Appel négatif à niveau de confiance élevé.
Negative	Negative	Medium	Appel négatif à niveau de confiance élevé. Les données NGS satisfont les critères de qualité nécessaires pour juger un échantillon comme négatif. Cependant, les données NGS sont de qualité sous-optimale et/ou le contenu tumoral de l'échantillon est faible.
Negative	Negative*	Medium	Appel négatif à niveau de confiance moyen avec risque accru de faux-négatif. Les données NGS ne satisfont pas les critères de qualité nécessaires pour juger un échantillon comme négatif avec un niveau de confiance élevé. Le rapport signal/bruit au sein des données NGS est faible, ce qui peut refléter un contenu tumoral insuffisant de l'échantillon. Nous recommandons de vérifier que l'échantillon d'ADN satisfait les exigences de qualité de contenu tumoral et d'ADN.
Undetermined	Inconclusive	Medium	Le statut SOPHiA DDM Dx HRD ne peut pas être déterminé en raison d'un rapport signal/bruit insuffisant au sein des données NGS utilisées pour l'analyse d'intégrité génomique. Ce résultat peut refléter soit l'absence d'importantes altérations du nombre de copies au sein de l'échantillon, soit un contenu tumoral insuffisant de l'échantillon. Nous recommandons de répéter l'expérience avec un nouvel échantillon d'ADN et de vérifier que son contenu tumoral et sa qualité sont suffisants.
Undetermined	Rejected	Low	Le statut SOPHiA DDM Dx HRD ne peut pas être déterminé, car les données NGS utilisées pour l'analyse d'intégrité génomique sont de qualité insuffisante. Nous recommandons de répéter l'expérience en vérifiant que le contenu tumoral de l'échantillon et la qualité de l'ADN sont suffisants et que les instructions du protocole sont bien respectées.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

7. DESCRIPTION ET PARAMÈTRES DE L'ANALYSE

7.1. Fichiers de ressource

L'alignement est effectué par rapport au génome de référence GRCh37 (aussi nommé hg19). Les sources disponibles publiquement de toutes ces exigences se trouvent à l'adresse suivante :

Génome de référence GRCh37 - hg19 :

https://storage.googleapis.com/genomics-public-data/references/b37/Homo_sapiens_assembly19.fasta.gz

7.2. Prétraitement des données brutes

Prétraitement

- Collectez les mesures de la qualité sur la base des fichiers bruts fastq.
- Tronquez les fichiers fastq à une taille maximum de 2 500 MB.

Alignement

- Coupez les adaptateurs et réduisez les extrémités de qualité basse des lectures (qualité de base inférieure à 20).
- Alignez les lectures sur le génome de référence hg19 en mode extrémités associées.
- Calculez les statistiques d'alignement et les mesures de couverture sur les fichiers d'alignement bruts.
- Réduisez les séquences d'adaptateurs saillantes.

7.3. Analyse d'intégrité génomique

L'analyse d'intégrité génomique vise à détecter le HRD en évaluant le degré d'instabilité génomique. Une réparation fonctionnelle de la recombinaison homologue est nécessaire pour réparer sans erreur les cassures de double brin et pour maintenir l'intégrité génomique. L'une des conséquences du HRD est la perte d'intégrité génomique via l'accumulation d'aberrations génomiques dues à l'incapacité de la cellule à réparer les cassures de double brin. Notre analyse de l'intégrité génomique vise à évaluer ces aberrations génomiques à l'aide du séquençage de génome entier (SGE). Plus particulièrement, notre méthode utilise un algorithme d'apprentissage en profondeur qui a été spécifiquement formé pour reconnaître les types d'instabilité génomique au sein du profil de couverture de séquençage de génome entier. L'algorithme analyse les données de séquençage de génome entier passe-bas (lpWGS) et produit un indice d'intégrité génomique (IG) qui reflète le niveau d'intégrité génomique. Un indice d'intégrité génomique supérieur à 0 indique une faible intégrité génomique. Un indice d'intégrité génomique inférieur à 0 indique une intégrité génomique élevée.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Pendant l'analyse d'intégrité génomique, les étapes algorithmiques suivantes sont exécutées successivement pour chaque échantillon : les premières données de séquençage de génome entier passe-bas (lpWGS) sont prétraitées et subissent une évaluation de qualité, puis l'indice d'intégrité génomique est calculé, et un statut d'intégrité génomique est affecté à l'échantillon. Ces étapes sont décrites dans les sections ci-dessous.

Étape 1 : prétraitement des données et évaluation de la qualité de l'échantillon :

1. Les lectures de séquençage de génome entier à extrémités associées sont cartographiées par rapport au génome de référence humain et traitées afin de restreindre les adaptateurs et les appels de base de mauvaise qualité. Le profil de couverture de séquençage de génome entier est calculé et normalisé.
2. Le profil de couverture de séquençage de génome entier normalisé subit une assurance qualité sur la base des mesures définies à la fin de cette section. L'un des statuts d'assurance qualité d'intégrité génomique suivants est affecté à l'échantillon :
    - « High quality » : la qualité des données est suffisante pour calculer en toute confiance un indice et un statut d'intégrité génomique.
    - « Medium quality » : la qualité des données est moins bonne (par rapport à la qualité élevée) et, par conséquent, l'algorithme d'apprentissage en profondeur ne peut calculer d'indice d'intégrité génomique.
    - « Low quality » : la qualité des données ne satisfait pas les critères requis pour calculer un indice d'intégrité génomique.

Étape 2 : calcul de l'indice d'intégrité génomique :

L'indice d'intégrité génomique est obtenu en traitant le profil de couverture de séquençage du génome entier normalisé à l'aide d'un algorithme d'apprentissage en profondeur exclusif qui a été formé afin de reconnaître les types d'instabilité génomique.

Étape 3 : détermination du statut d'intégrité génomique :

Un statut d'intégrité génomique qui s'applique à des échantillons de cancer ovarien est déterminé en combinant le statut d'assurance qualité de l'échantillon et l'indice d'intégrité génomique. Cinq résultats sont possibles :

- **« GI positive » :** échantillons à indice d'intégrité génomique supérieur ou égal à 0.
- **« GI negative » :** échantillons à indice d'intégrité génomique inférieur à 0.
- **« GI negative* » :** échantillons à indice d'intégrité génomique inférieur à 0 mais présentant un risque accru d'appels faux-négatifs en raison du faible rapport signal/bruit.
- **« GI inconclusive » :** échantillons de qualité moyenne pour lesquels l'algorithme d'apprentissage en profondeur n'a pas réussi à calculer d'indice d'intégrité génomique en raison d'un rapport signal/bruit insuffisant.
- **« GI rejected » :** échantillons de mauvaise qualité éliminés de l'analyse d'intégrité génomique. Les échantillons sont rejetés si le nombre de fragments d'ADN disponibles pour le calcul du profil de couverture de séquençage de génome entier est insuffisant, si le bruit du profil de couverture de séquençage de génome entier est excessif, ou si la part de valeurs aberrantes de couverture est excessive.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Définition des mesures d'assurance qualité et d'intégrité génomique

- **« Total nb. of fragments » :** nombre total de fragments d'ADN (lectures à extrémités associées) correctement cartographiés.
- **« Nb. WGS fragments » :** nombre total de fragments d'ADN disponibles pour le calcul du profil de couverture de séquençage de génome entier brut. Les fragments d'ADN cartographiés par rapport aux régions génomiques enrichies pour l'appel de variant sont exclus. Cette mesure d'assurance qualité est comparée avec un seuil de 4 millions afin de déterminer le statut d'assurance qualité d'intégrité génomique.
- **« Percentage WGS fragments » :** fraction du nombre total de fragments de séquençage du génome entier par rapport au nombre total de fragments.
- **« Proportion of Coverage Outliers » :** pourcentage de régions de séquençage du génome entier pris en considération pour l'analyse d'intégrité génomique et qui présentent une couverture localisée artéfactuelle et excessive qui est compensée par l'algorithme de normalisation de couverture. Cette mesure d'assurance qualité est comparée avec un seuil de 20 % afin de déterminer le statut d'assurance qualité d'intégrité génomique.
- **« Purity/ploidy ratio » :** rapport entre le contenu tumoral de l'échantillon et la ploïdie de l'échantillon, estimé en mesurant l'intensité du signal induit dans le profil de couverture de séquençage du génome entier normalisé par un changement de nombre de copies. Cette mesure d'assurance qualité d'intégrité génomique est comparée avec un seuil de 0,1 (suggérant un faible contenu tumoral) afin de déterminer le statut d'assurance qualité d'intégrité génomique. L'incapacité à mesurer le rapport pureté/ploïdie à partir des données est également utilisée pour déterminer le statut d'assurance qualité d'intégrité génomique.
- **« Residual noise » :** le bruit résiduel est calculé en mesurant l'écart-type du profil de couverture de séquençage du génome entier normalisé par rapport au profil de couverture lissé. Cette mesure d'assurance qualité est comparée avec un seuil de 0,17 afin de déterminer le statut d'assurance qualité d'intégrité génomique.
- **« SNR » :** intensité du signal induit dans le profil de couverture de séquençage du génome entier normalisé par toutes les aberrations de nombre de copies présentes dans l'échantillon, divisée par le bruit résiduel. Cette mesure d'assurance qualité d'intégrité génomique est comparée avec un seuil de 0,55 afin de déterminer le statut d'assurance qualité d'intégrité génomique. Le SNR est également pris en considération par l'algorithme afin d'affecter le statut « GI Negative* » et « GI Inconclusive ».
- **« QA Status » :** statut d'évaluation de qualité d'intégrité génomique d'un échantillon.
- **« GI Index » :** l'indice d'intégrité génomique est une valeur scalaire, comprise entre −20 et 20, qui reflète le niveau d'intégrité génomique. Des indices d'intégrité génomique élevés reflètent de faibles niveaux d'intégrité génomique. Des indices d'intégrité génomique faibles reflètent des niveaux d'intégrité génomique élevés.
- **« GI Status » :** statut d'intégrité génomique d'un échantillon.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

7.4. Calcul du statut SOPHiA DDM Dx HRD

Le pipeline de bio-informatique calcule le statut SOPHiA DDM Dx HRD sur la base du statut d'intégrité génomique conformément au tableau suivant.

Statut d'intégrité génomique	Statut SOPHiA DDM Dx HRD
Positive	Positive
Negative	Negative
Negative*	Negative
Inconclusive	Undetermined
Rejected	Undetermined

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

8. ÉVALUATION DES PERFORMANCES

8.1. Évaluation des performances analytiques

8.1.1. Concordance du statut d'intégrité génomique avec le test NGS de comparaison

Les performances analytiques du statut d'intégrité génomique ont été évaluées sur 238 échantillons d'ADN extraits d'échantillons FFPE de cancer de l'ovaire ayant un DQN ≥3, séquencés sur Illumina® NextSeq® 550, pour lesquels un résultat d'instabilité génomique concluant avait été obtenu avec le test NGS de comparaison.

Sur les 238 échantillons inclus à l'analyse, 5 ont donné un statut d'intégrité génomique non concluant (taux de rejet : 2,1 %). Le tableau suivant montre les performances calculées des 233 échantillons restant pour lesquels un statut d'intégrité génomique concluant a été obtenu.

Mesure	Valeur
Pourcentage de concordance positive (PPA)	92,9 %
Pourcentage de concordance négative (NPA)	95,8 %
Pourcentage de concordance globale (OPA)	94,4 %

8.1.2. Limite de détection du contenu tumoral de l'échantillon pour le statut d'intégrité génomique

La limite de détection pour le statut d'intégrité génomique en relation avec le contenu tumoral de l'échantillon a été établie en mesurant le contenu tumoral le plus faible pour lequel la sensibilité est supérieure ou égale à 95 %. La limite de détection mesurée est de 28,5 % de contenu tumoral.

8.1.3. Répétabilité du statut d'intégrité génomique

La répétabilité du statut d'intégrité génomique a été établie sur la base des résultats obtenus lors d'expériences indépendantes réalisées avec plusieurs échantillons.

Caractéristique	Répétabilité du statut GI	Écart type de l'index d'intégrité génomique (moyenne/plage des échantillons)
Répétabilité	100 %	0,26 / [0,23 - 0,32]

8.1.4. Reproductibilité du statut d'intégrité génomique

La reproductibilité du statut d'intégrité génomique a été établie sur la base des résultats obtenus par des laboratoires indépendants auxquels avaient été fournies des aliquotes des mêmes échantillons de référence.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Caractéristique	Reproductibilité du statut GI	Écart type de l'index d'intégrité génomique (moyenne/plage des échantillons)
Reproductibilité inter-tests	100 %	0,47 / [0,00 - 1,48]
Reproductibilité inter-sites	100 %	1,00 / [0,43 - 2,14]
Reproductibilité inter-lots	100 %	-

8.2. Évaluation des performances cliniques

Les performances cliniques de la solution SOPHiA DDM Dx HRD ont été établies dans une étude clinique observationnelle rétrospective sur 110 extraits d'ADN de matériau tumoral dérivés de FFPE. Tous les échantillons ont été dérivés de cancers de l'ovaire. Le contenu tumoral défini de tous les échantillons était compris entre 30 et 90 %. La qualité des extraits d'ADN a été évaluée par détermination du DQN sur Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Inc.) en utilisant comme seuil 300 pb. Tous les extraits d'ADN avaient un DQN >3, 105 extraits d'ADN avaient un DQN >5, 5 extraits d'ADN avaient un DQN ≤5.

Le statut HRD de référence de tous les échantillons avait été établi par un test génomique de DIV du commerce combinant l'analyse de l'instabilité génomique et de la mutation de BRCA1/BRCA2. La comparaison de ce statut HRD de référence avec le statut SOPHiA DDM Dx HRD défini dans l'étude clinique a permis de calculer la sensibilité diagnostique, la spécificité diagnostique, les valeurs prédictives positives et négatives et les ratios de probabilité positifs et négatifs. Sur les 110 échantillons, 15 ont été exclus des calculs en raison de résultats invalides : 8 échantillons avaient un statut SOPHiA DDM Dx HRD indéterminé, 12 un échec pour le statut HRD de référence et 5 un statut invalide avec les deux méthodes.

Mesure	Valeur (IC 95 %)
Sensibilité diagnostique	80,9 % [67,5 %-89,6 %]
Spécificité diagnostique	93,7 % [83,2 %-97,9 %]
Valeur prédictive positive	92,7 %
Valeur prédictive négative	83,3 %
Ratio de probabilité positif	12,9
Ratio de probabilité négatif	0,2

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

9. AVERTISSEMENTS, LIMITATIONS ET PRÉCAUTIONS

9.1. Avertissements

- Pour les diagnostics in-vitro uniquement. Toute décision relative à la prise en charge et au traitement de patients doit être fondée sur l'avis médical indépendant du médecin traitant, en tenant compte de toutes les informations applicables concernant l'état du patient, comme ses antécédents personnels et familiaux, les examens physiques, les informations apportées par d'autres tests diagnostiques et les préférences du patient, conformément aux normes de soins en vigueur dans une communauté donnée.
- Toute fonctionnalité de CDS est à titre informatif uniquement et n'est pas destinée à être utilisée pour le diagnostic. Les fonctions de CDS n'ont pas été entièrement validées dans le cadre du produit de diagnostic in vitro. L'utilisation des fonctions de CDS est à la discrétion du médecin et devra être évaluée indépendamment.
- La solution SOPHiA DDM Dx HRD a été validée sur de l'ADN extrait d'échantillons FFPE de cancer de l'ovaire avec un DQN ≥3 (mesuré à l'aide du système Agilent Fragment Analyzer™), un contenu tumoral ≥30 %, et séquencé sur Illumina® NextSeq® 500/550.
- Une mauvaise qualité des données de séquençage nouvelle génération brutes peut perturber l'analyse des données et donner des résultats faux-positifs, faux-négatifs et non concluants.
- Les utilisateurs doivent vérifier que la qualité de leurs échantillons d'ADN satisfait les critères minimum de qualification :
    - Contenu tumoral ≥ 30 %
    - DQN ≥3, mesuré à l'aide du système Agilent Fragment Analyzer™
    - 50 ng ou 100 ng d'ADN d'entrée selon le DQN (voir protocole)
- Les dispositifs d'électrophorèse sur gel haute résolution autres que le système Agilent Fragment Analyzer™ (comme Agilent TapeStation) se sont avérés provoquer une estimation biaisée du DQN sur des échantillons d'ADN FFPE. Le système Agilent Fragment Analyzer™ est le seul dispositif adéquat pour qualifier les échantillons pour la solution SOPHiA DDM Dx HRD.
- Le traitement d'échantillons disqualifiés peut aboutir à des résultats erronés. SOPHiA GENETICS n'est pas responsable des résultats et des décisions ensuite prises sur la base de ces résultats.
- Un DQN supérieur ou égal à 3 ne peut exclure la présence d'autres problèmes de qualité au sein de l'échantillon d'ADN. Étant donné que la précision d'analyse dépend de la qualité et de la quantité d'ADN, les utilisateurs doivent s'assurer que le workflow complet utilisé pour obtenir l'ADN d'entrée est compatible avec le dosage, avant de passer aux analyses cliniques.
- Le statut SOPHiA DDM Dx HRD repose exclusivement sur les résultats de l'analyse d'intégrité génomique et ne prend pas en considération le statut mutationnel de BRCA1 et BRCA2 (et des autres gènes ciblés par le produit). Un statut SOPHiA DDM Dx HRD négatif n'exclut pas la présence de mutations de BRCA1 et BRCA2 (et d'autres gènes).

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

9.2. Limitations

- Le produit a été conçu pour traiter le volume de données produit par un seul run de Illumina® NextSeq® 500/550 (cellules de débit MidOutput et HighOutput). La taille maximale de la demande ne peut dépasser 200 Go. La taille maximale de fichier par échantillon ne peut dépasser 50 Go. Le pipeline effectue un sous-échantillonnage aléatoire des lectures pour tous les échantillons qui dépassent 5 Go de fichiers fastq compressés.
- Même si les recommandations de multiplexage des échantillons sont respectées, le nombre total de lectures peut être insuffisant pour pouvoir donner des résultats concluants, pour différentes raisons, comme une mauvaise qualité de l'échantillon, une mauvaise qualité des données NGS, une affectation de lectures très irrégulière entre les bibliothèques WGS et les bibliothèques capturées, ou une affectation de lectures très irrégulière les échantillons multiplexés au cours du même run.
- Le produit ne détecte ni ne signale les évènements de contamination croisée d'échantillons.

9.2.1. Pour les procédures de diagnostic in-vitro

- L'exécution incorrecte de l'extraction de l'ADN, de la préparation de la bibliothèque et/ou du séquençage peut mener au rejet de l'échantillon et à des résultats faux positifs ou faux négatifs.
- L'exécution incorrecte de l'étape de capture peut mener au rejet de l'échantillon en raison d'une couverture de lecture hors cible excessive.
- Le produit ne mesure ni ne signale le contenu tumoral des échantillons.
- La limite de détection pour la détermination du statut SOPHiA DDM Dx HRD et du statut d'intégrité génomique est un contenu tumoral de 30 %. Traiter des échantillons présentant un contenu tumoral <30 % entraînera probablement l'obtention de résultats GI non concluants ou négatifs*, mais peut aussi donner des résultats faux négatifs.
- Les échantillons avec statut SOPHiA DDM Dx HRD négatif et statut d'intégrité génomique négatif* sont associés à une valeur prédictive négative plus faible.
- Les données de séquençage de génome entier passe-bas ne permettent pas de distinguer de manière fiable les échantillons sans altérations importantes du nombre de copies des échantillons dont le contenu tumoral est insuffisant. Traiter des échantillons ne présentant pas d'altérations importantes du nombre de copies donnera des résultats GI non concluants.

9.3. Précautions

- Les normes et procédures des bonnes pratiques de laboratoire ainsi que le strict respect des instructions du mode d'emploi sont nécessaires pour obtenir de bonnes performances du produit. Tout écart par rapport aux instructions relatives à la manipulation des échantillons, au protocole de laboratoire, au multiplexage et au séquençage peut affecter négativement la qualité des données NGS brutes.
- Des pièces distinctes pré- et post-PCR doivent être utilisées afin d'empêcher la contamination des échantillons d'ADN.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

- Utilisez des pipettes correctement étalonnées et un équipement de laboratoire approprié pour réaliser l'expérience.
- Ne mélangez pas des réactifs portant des numéros de lot différents.
- Conservez et manipulez les réactifs conformément aux instructions qui figurent sur les boîtes des kits, et ne les réutilisez pas si leur date d'expiration est dépassée.
- Certains réactifs peuvent nécessiter des précautions de sécurité. Pour des informations spécifiques relatives à la sécurité, consultez les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes pour chaque composant du produit.
- La concentration en EDTA recommandée dans le tampon de stockage d'ADN est de 0,1 mM. Tout excédent d'EDTA dans les tampons de stockage d'échantillons peut affecter le traitement des échantillons.
- Pour des instructions détaillées sur le logiciel, consultez le manuel d'utilisation de l'application Web SOPHiA DDM.

9.3.1. Pour les procédures d'assistance à la décision clinique

SNP / INDEL

- Les SNV et les INDEL rapportés peuvent inclure des variants somatiques (non héréditaires) ou de lignée germinale (héréditaires) ; cependant, l'algorithme ne permet pas de distinguer les variants de lignée germinale des variants somatiques.
- Les SNV et les INDEL avec VAF <4 % (seuil du test) sont filtrés et considérés comme de confiance faible.
- Des SNV ou des INDELS dans des homopolymères de longueur 10 ou supérieure ne peuvent pas être appelés en toute confiance car leur détection est perturbée par un bruit de fond élevé pour des homopolymères de cette longueur. Lorsqu'ils sont détectés, ils sont rapportés comme de confiance faible.
- Pour une performance fiable d'appel de variant, une couverture d'au moins 100 molécules uniques est nécessaire. Les régions à faible couverture augmentent significativement le risque de faux négatifs et sont rapportées avec des avertissements dans l'application de bureau SOPHiA DDM.
- Le module d'appel de variant a été développé et vérifié pour appeler des SNV et des INDEL jusqu'à une longueur de 50 pb. Des INDEL >50 pb peuvent être détectées, mais les performances du module dépendent de plusieurs facteurs, dont la nature du variant, le contexte génomique et la qualité des données de séquençage.
- Les génotypes résultant de duplications, d'insertions ou de types d'INDEL complexes (p. ex., insertions et délétions multiples dans les mêmes régions) qui ne sont pas totalement couverts par des lectures complètes (y compris la séquence de référence qui est dupliquée) peuvent être rapportés de manière inexacte ou donner des faux négatifs.
- La fréquence allélique de variant des insertions d'une longueur supérieure à la longueur de lecture risque d'être surestimée.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

- La détection de variant a été optimisée uniquement dans les régions génomiques définies comme « régions cibles » (voir Annexe IV). Dans les régions proches hors cible, tout variant supplémentaire détecté par le module sera rapporté comme de confiance faible. Les variants situés à plus de 500 pb des régions cibles ne sont pas rapportés. Des délétions ou des insertions avec un point de cassure en dehors de la région cible peuvent ne pas être détectées.
- Dans les régions génomiques complexes, l'alignement de lecture par rapport aux génotypes possibles peut entraîner des appels scindés dans lesquels deux représentations équivalentes ou plus du même variant sont rapportées comme des variants distincts, ce qui dilue entre elles la fréquence de l'allèle. Cela pourrait entraîner des sous-estimations de la fraction de variant ou des faux négatifs.
- Des types de variant menant à des allèles très différents du génome de référence (p. ex., SNV multiples, variants nucléotidiques multiples [MNV] ou INDEL) peuvent abaisser l'affinité de la sonde de capture de l'ADN pour les régions d'ADN concernées. Ces fragments d'ADN peuvent ne pas être capturés efficacement, ce qui peut entraîner des faux négatifs ou une sous-estimation de la fréquence allélique de variant.
- Les régions génomiques d'intérêt incluant des séquences nucléotidiques de faible complexité, un biais nucléotidique, des répétitions de longueur quelconque (p. ex., répétitions mono-, di- ou trinucléotidiques, répétitions Alu, etc.) ont un plus grand risque d'artefacts de l'appel de variant incluant des appels de variant faux-positifs et faux-négatifs.
- Les régions avec homologie de séquence élevée peuvent entraîner des incertitudes dans la cartographie et le risque de ne pas détecter des variants ou d'appeler des variants incorrects.
- Des mutations delins complexes peuvent être signalées comme variants multiples si elles sont représentées dans l'alignement comme plusieurs variants plus petits séparés par plus de 2 nucléotides.

Statut BRCA et SOPHiA DDM HRD proposé

- Le statut BRCA proposé est calculé sur la base des SNV et des INDEL rapportés par le pipeline avec une confiance élevée. Les SNV et les INDEL rapportés par le pipeline avec une confiance faible, ainsi que les autres types d'aberrations génomiques, ne sont pas pris en compte pour le calcul du statut BRCA proposé. Un statut BRCA proposé négatif n'exclut pas la présence des types suivants d'événement dans l'échantillon :
    - Gains ou pertes de nombre de copies affectant un ou plusieurs exons de BRCA1 ou de BRCA2
    - Insertions d'élément mobile
    - Méthylations du promoteur
    - Autres variations structurelles
    - SNV et INDEL situés sous le seuil de déclaration de 4 % de fréquence allélique de variant
    - SNV et INDEL rapportés avec une confiance faible (voir tableau 12 à l'Annexe I- CSD)
- Le statut BRCA proposé s'appuie sur les données fournies par la base de données BRCA Exchange, qui sera mise à jour de manière asynchrone pour assurer un contrôle de qualité approprié de l'importation des données. En conséquence, les annotations de BRCA Exchange dans SOPHiA DDM peuvent différer de celles visibles sur le portail web de cette base de données.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

- Une incapacité à couvrir au moins 99 % des régions ciblées de BRCA1 et BRCA2 peut entraîner un statut BRCA proposé non concluant (inconclusive).
- Les variants introniques, faux-sens et UTR non listés dans la base de données BRCA Exchange sont supposés bénins (predicted negative) et ne sont donc pas jugés suffisants pour émettre un statut BRCA proposé positif, prédit positif, cas complexe ou indéterminé (positive, predicted positive, complexe case ou undetermined).
- Le statut SOPHiA DDM HRD proposé est calculé en combinant le statut BRCA proposé et le statut GI. Toutes les limites qui s'appliquent au statut BRCA proposé et au statut GI s'appliquent aussi au statut SOPHiA DDM HRD.
- Le statut SOPHiA DDM HRD proposé et le statut GI ne sont applicables qu'aux échantillons de cancer de l'ovaire.

Amplification de gène (variation du nombre de copies ou CNV)

- Le module CNV n'a été vérifié qu'avec des données in silico en montrant que les gains de nombre de copies avec un nombre de copies >6 sont détectés.
- Les niveaux de nombre de copies rapportés par le module CNV quantifient le nombre de copies effectif dans l'échantillon d'ADN en cours d'analyse et non le nombre de copies absolu de l'ADN tumoral présent dans l'échantillon.
- Le module CNV fonctionne au niveau du gène complet et n'est pas conçu pour détecter les gains de nombre de copies affectant seulement une partie du gène (sauf si ces événements augmentent significativement la profondeur de lecture moyenne sur le gène).
- Le module CNV est optimisé pour réduire l'occurrence de faux-négatifs et n'a été vérifié que pour des nombres de copies supérieurs à 6. Procédez avec précaution dans l'interprétation des événements détectés, en particulier lorsque le nombre de copies rapporté est compris entre 3,25 et 6 : il pourrait s'agir de faux-positifs. Il est alors recommandé de refaire le test avec une méthode indépendante.
- Le module CNV implique une procédure de normalisation de la couverture inter-échantillons. Les gains de nombre de copies présents dans une fraction importante des échantillons traités dans la même demande peuvent être manqués ou le nombre de copies peut être sous-estimé.
- Le module CNV n'est appliqué qu'aux demandes incluant au moins 8 échantillons. Si le nombre total d'échantillons non rejetés dans le lot est inférieur à 4, l'ensemble de la demande est rejeté de l'analyse d'amplification de gène. Les performances du module devraient s'améliorer avec l'augmentation du nombre d'échantillons. Les échantillons peuvent être rejetés pour deux raisons : soit en raison de problèmes de qualité lors de la préparation de la bibliothèque, soit en raison d'un autre schéma de couverture du reste des échantillons.
- Pour des performances optimales du module CNV, tous les échantillons inclus dans la requête doivent être traités en parallèle, de la préparation de la bibliothèque jusqu'au séquençage.
- Le module CNV ne prend en compte que les régions génomiques ciblées par le panel HRD, les régions suivantes étant exclues : ESR1 (régions génomiques entières), AKT1 (régions génomiques entières), FANCL_ex1, BARD1_ex1, PPP2R2A_ex1, NBN_ex1, PTEN_ex1, CHEK1_ex1, BRCA2_ex1, PALB2_ex1, FANCA_ex1, RAD51D_ex1, CDK12_ex1, BRCA1_ex1, RAD51C_ex1, CHEK2_ex1; FANCD2, exons 14-23.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

- En présence d'un nouveau pseudogène présentant une identité de séquence suffisante pour être amplifié, c'est-à-dire un pseudogène non présent dans le génome de référence, les lectures venant du pseudogène seront attribuées au gène parent. Dans ce cas, le module CNV pourra surestimer le nombre de copies du gène affecté. Si le pseudogène continue à être amplifié, cela augmente encore le nombre estimé de copies.
- Lors de l'étape de PCR de la préparation de la bibliothèque, évitez autant que possible les gradients de température (p. ex., ne pas utiliser les rangées externes des plaques de PCR). Les gradients de température peuvent donner des appels de CNV faux-positifs.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

10. SYMBOLES

Symbole	Titre
	Consulter le mode d'emploi
	Numéro de référence
	Code du lot (Numéro de lot)
	Attention
	Fabricant
	Limite de température
	Date de péremption
	Conformité européenne
	Représentant agréé au sein de la communauté européenne
	Contient suffisamment de réactifs pour <n> tests
	Importateur
	Consultez la **Section 5 - Avertissements et précautions.**
	Consultez la **Section 5 - Avertissements et précautions.**
	Consultez la **Section 5 - Avertissements et précautions.**
	Consultez la **Section 5 - Avertissements et précautions.**

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Symbole	Titre
	Consultez la **Section 5 - Avertissements et précautions.**
	Boîte 1
	Boîte 2

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

11. ASSISTANCE

En cas de difficulté lors de l'utilisation de SOPHiA DDM, consultez la section « Dépannage » du manuel de l'utilisateur de l'application Web SOPHiA DDM ou contactez notre assistance téléphonique au +41 21 694 10 60 ou envoyez-nous un e-mail à l'adresse support@sophiagenetics.com. Consultez le site www.sophiagenetics.com pour plus de détails. Vous pouvez aussi contacter l'assistance par demande sur le Web sur l'écran Dashboard de la section Support de SOPHiA DDM.

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif doit être signalé rapidement à SOPHiA GENETICS et aux autorités compétentes de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient sont établis.

N'utilisez pas des composants endommagés. Contactez support@sophiagenetics.com en cas de problème avec les kits.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

ANNEXE I. CDS SOPHIA DDM HRD

TABLE DES MATIÈRES POUR CDS SOPHiA DDM HRD

1. Déclaration générale du composant CDS SOPHiA DDM HRD 58
2. Composants CDS SOPHiA DDM HRD 59
3. Commencer une analyse CDS SOPHiA DDM HRD 59
3.1. Examen/Modification du statut CDS SOPHiA DDM HRD 60
3.2. Examen/Modification du statut BRCA 61
3.3. Examen/Modification du statut d'intégrité génomique 64
3.4. Définir le statut HRR 65
3.5. Définir le statut d'amplification du gène CCNE1 66
3.6. Rapporter les variants inclus dans la portée 67
3.7. Générer un compte rendu CDS SOPHiA DDM HRD 68
4. Considérations relatives aux résultats non concluants 68
4.1. En cas de rejet d'intégrité génomique 68
4.2. En cas de statut GI non concluant 70
5. Considérations relatives aux statuts « GI Negative* » 71
5.1. En cas de résultat BRCA non concluant et/ou de présence d'un risque de FN pour BRCA 73
6. Fichiers de ressource 75
6.1. Régions cibles 75
7. Description et paramètres de l'analyse 76
7.1. Prétraitement des données brutes 76
7.2. Liste des modules inclus 76
8. Descriptions des livrables du pipeline 87
8.1. Emplacement des résultats 87
8.2. Composition du fichier 88
8.3. Visualisation des résultats 88
8.4. Filtrage de variant 89
8.5. Annotation de variant 90
9. Évaluation des performances du statut CDS SOPHiA DDM HRD 93

1. Déclaration générale du composant CDS SOPHiA DDM HRD

La solution SOPHiA DDM Dx HRD permet aux utilisateurs de détecter un déficit de recombinaison homologue (HRD) via l'observation de l'intégrité génomique en tant que marqueur validé, pour le diagnostic in vitro. De plus, le produit sert d'outil de support de décision clinique (CDS) supplémentaire via l'application de bureau SOPHiA DDM.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Les fonctionnalités de CDS incluent la détection de SNP et d'INDEL somatiques et de lignée germinale ainsi que des amplifications de gène dans BRCA1, BRCA2 et dans d'autres gènes impliqués dans la réparation de la recombinaison homologue (HRR) (voir la section 6.1 de l'Annexe I-CDS SOPHiA DDM HRD pour la liste des gènes). Le pipeline calcule un statut BRCA proposé et utilise conjointement le statut GI calculé dans l'application Web SOPHiA DDM pour calculer le statut CDS SOPHiA DDM HRD proposé. Pour le CDS, l'application de bureau SOPHiA DDM permet la visualisation des résultats et permet à l'utilisateur final de vérifier et, si nécessaire, de corriger les statuts BRCA, GI et SOPHiA DDM HRD proposés. L'application de bureau SOPHiA DDM permet aussi à l'utilisateur d'évaluer et de rapporter le statut de gènes non BRCA impliqués dans l'HRR ainsi que le statut d'amplification de gène de CCNE1.

2. Composants CDS SOPHiA DDM HRD

Tous les résultats de CDS sont calculés automatiquement par le pipeline de bio-informatique hébergé par l'application Web SOPHiA DDM en traitant les mêmes données de NGS que celles utilisées pour l'analyse du DIV. Les résultats de CDS sont obtenus en analysant les lectures NGS correspondant aux régions génomiques ciblées par le panel génétique de la solution SOPHiA DDM Dx HRD. Les résultats de CDS calculés par le pipeline de bio-informatique incluent :

- SNP/INDEL
- Amplification de gène
- Statut BRCA proposé
- Statut GI proposé
- Statut CDS SOPHiA DDM HRD proposé (obtenu en combinant le statut BRCA proposé et le statut GI calculés dans l'application Web SOPHiA DDM).

Tous les résultats de CDS sont disponibles exclusivement via l'application de bureau SOPHiA DDM. Toutes les références au statut HRD dans cette annexe sont faites uniquement à des fins de CDS.

Remarque : Le mode d'emploi du kit NGS et de la plate-forme de l'application Web SOPHiA DDM est disponible dans la section principale du mode d'emploi de la solution SOPHiA DDM Dx HRD et il n'est pas couvert par cette annexe CDS SOPHiA DDM HRD.

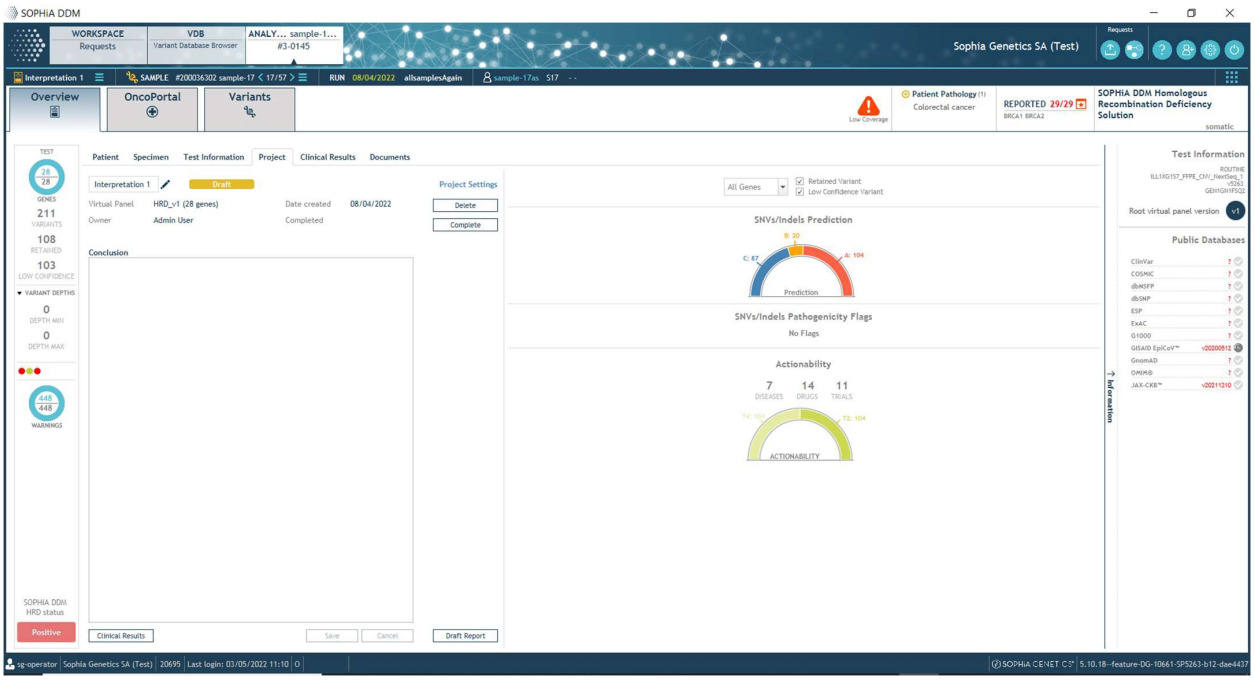
3. Commencer une analyse CDS SOPHiA DDM HRD

Après achèvement de l'analyse de bio-informatique hébergée par l'application Web SOPHiA DDM, les utilisateurs peuvent réaliser une analyse CDS SOPHiA DDM HRD via l'application de bureau SOPHiA DDM. Pour créer une interprétation CDS SOPHiA DDM HRD (aussi abrégé CDS-HRD), consultez la section 3.12 du Manuel d'utilisation de l'application de bureau SOPHiA DDM.

Le statut HRD proposé s'affiche en bas à gauche de l'onglet Overview de l'interprétation (Figure 1). Pour accéder à la fenêtre de vérification HRD (Figure 1), cliquez sur le bouton de statut HRD.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Figure 1. Fenêtre de vue d'ensemble de l'interprétation avec l'indicateur de statut HRD.



3.1. Examen/Modification du statut CDS SOPHiA DDM HRD

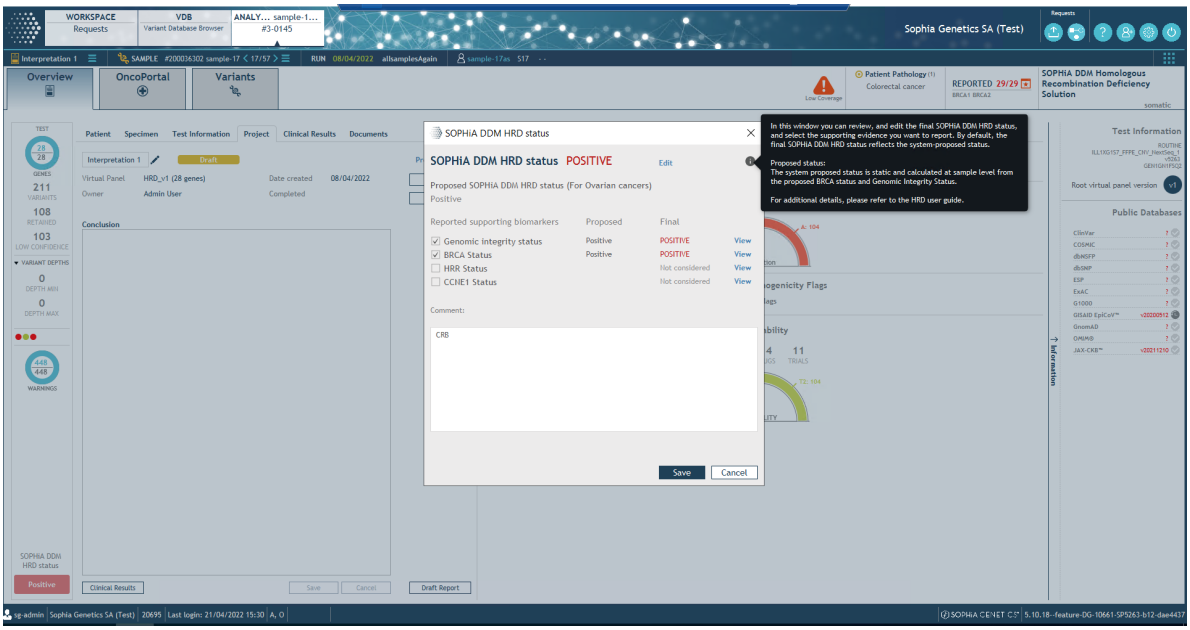
La fenêtre d'examen/de modification du statut CDS SOPHiA DDM HRD présente :

- Le statut HRD. Par défaut, le statut final repose sur le statut HRD proposé calculé par le pipeline.
- Un statut HRD proposé calculé par le pipeline en suivant les règles décrites dans le tableau 8.
- Le HRD prenant en charge l'indice d'intégrité génomique (GII), et les statuts BRCA, HRR et CCNE1. Par défaut, seuls les statuts GII et BRCA sont sélectionnés pour être signalés avec le HRD.

Pour modifier le statut HRD final, cliquez sur « edit » et sélectionnez la valeur de statut. Pour examiner ou modifier un quelconque des statuts prenant en charge le HRD, cliquez sur « view » (Figure 2).

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Figure 2. Fenêtre d'examen/de modification du statut CDS SOPHiA DDM HRD.



3.2. Examen/Modification du statut BRCA

La fenêtre de statut BRCA (figure 3) présente :

- Le statut BRCA final. Par défaut, le statut final repose sur le statut BRCA proposé en suivant les règles décrites dans le tableau 2.
- Un statut BRCA proposé calculé par le pipeline qui peut être modifié.
- La liste des variants de BRCA prenant en charge le statut proposé (seuls les variants à niveau de confiance élevé ayant un score de variant de BRCA « positive », « predicted positive », « complex case » ou « undetermined » seront renseignés ; ces variants sont signalés si le statut BRCA est sélectionné pour le rapport). Un commentaire associé au statut BRCA final peut également être ajouté.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Figure 3. Fenêtre d'examen/de modification du statut BRCA.

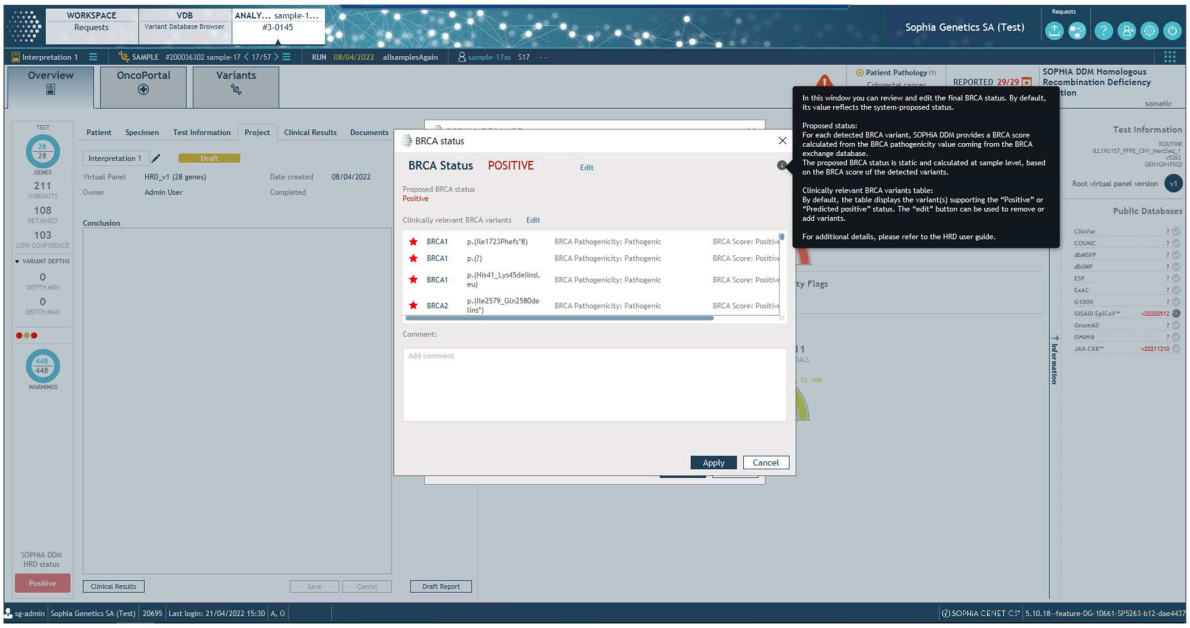


Tableau 2. Traduction du statut BRCA proposé en statut BRCA final par défaut.

STATUT BRCA PROPOSÉ	STATUT BRCA FINAL
Positive	Positive
Predicted positive	Positive
Complex case	Undetermined
Undetermined	Undetermined
Inconclusive	Undetermined
Predicted negative	Negative
Negative	Negative

La fenêtre BRCA peut également présenter des avertissements afin d'informer les utilisateurs du

1. **Risque de faux-négatif :** moins de 99% des régions BRCA1, BRCA2 ciblées par le panel sont couverts avec >100x molécules uniques. Dans ce cas, les utilisateurs doivent vérifier les régions à faible couverture afin de voir si la qualité des données est suffisante pour pouvoir indiquer en toute confiance un statut BRCA final. L'utilisateur peut rapidement vérifier le pourcentage de régions BRCA1, BRCA2 couvertes avec >100x molécules uniques à l'aide de l'indicateur de qualité dédié (Figure 4). Pour plus d'informations sur les indicateurs de qualité, consultez la section 3.10 du Manuel d'utilisation de l'application de bureau SOPHiA DDM.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Figure 4 : indicateur de couverture BRCA.

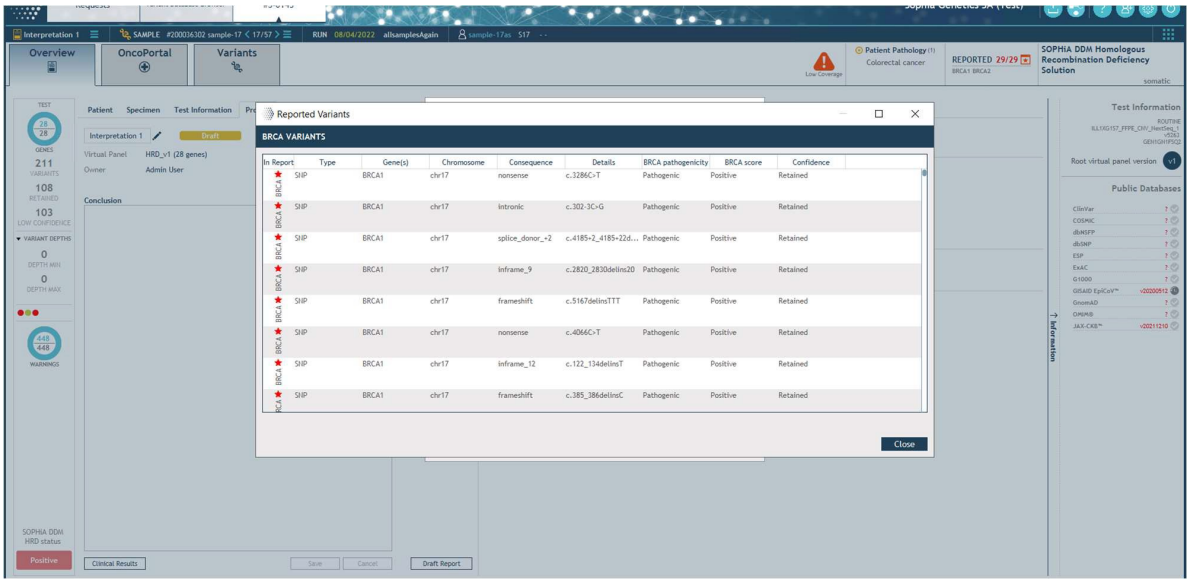
2. **Review clinical interpretation :** des variants à niveau de confiance élevé prenant en charge un statut BRCA « complex case » ou « undetermined » ont été détectés, et nécessitent un examen clinique.
3. **Review low confidence variants :** certains variants BRCA pertinents ont été détectés par le pipeline avec un avertissement de niveau de confiance faible. Dans ce cas, les utilisateurs peuvent les vérifier et les soumettre à une interprétation BRCA (consultez la section 4 du Manuel d'utilisation de l'application de bureau SOPHiA DDM).

Pour modifier le statut BRCA final, cliquez sur « edit » et sélectionnez la valeur de statut.

Pour ajouter ou supprimer des variants de la liste de variants BRCA, cliquez sur « edit ». Le panel affiché (Figure 5) présente tous les variants BRCA détectés et permet de les ajouter au compte rendu ou de les supprimer. Les variants sont également accessibles à l'aide du tableau de variants.

Remarque : si les utilisateurs choisissent de restreindre l'interprétation à l'aide d'un panel virtuel qui exclut les gènes BRCA, le statut BRCA est alors désactivé.

Figure 5. Vue d'ensemble des variants BRCA.



© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

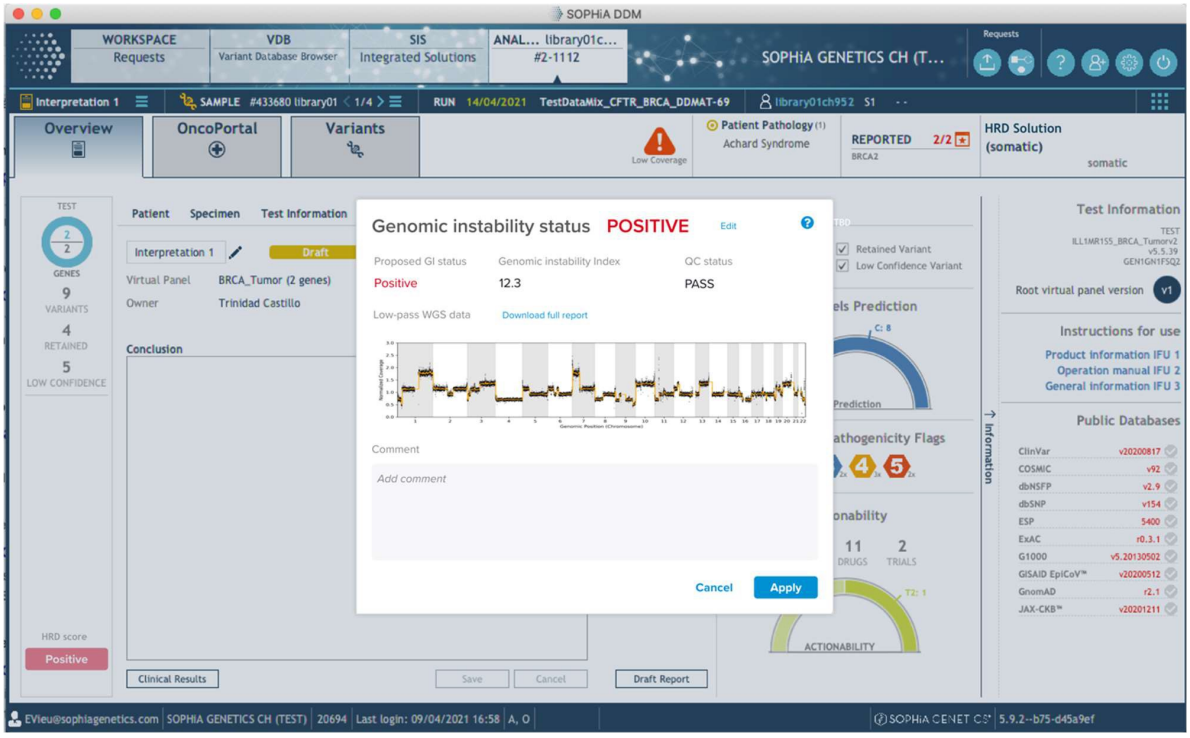
3.3. Examen/Modification du statut d'intégrité génomique

Le statut d'intégrité génomique calculé sur l'application Web SOPHiA DDM sera disponible ici sous la forme d'un statut d'intégrité génomique proposé. La fenêtre de modification/d'examen du statut d'intégrité génomique (figure 6) présente :

- Le statut d'intégrité génomique final. Par défaut, le statut final repose sur le statut d'intégrité génomique proposé en suivant les règles décrites dans le tableau 3.
- Le statut d'intégrité génomique proposé pour le cancer de l'ovaire, calculé directement à partir de l'application Web SOPHiA DDM (consultez la section 7.3).
- L'indice d'intégrité génomique calculé directement à partir de l'application Web SOPHiA DDM. L'indice d'intégrité génomique n'est pas indiqué pour les échantillons « Rejected » ou « Inconclusive ».
- Le statut AQ d'intégrité génomique calculé directement à partir de l'application Web SOPHiA DDM.
- Le profil de couverture passe-bas WGS (lpWGS), qui indique les données utilisées pour calculer l'indice d'intégrité génomique.

Consultez la section 7.3 du mode d'emploi de la solution SOPHiA DDM Dx HRD (section DIV) pour plus d'informations.

Figure 6. Vue d'ensemble de la fenêtre d'examen/de modification du statut d'intégrité génomique.



© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Tableau 3. Traduction du statut d'intégrité génomique proposé en statut d'intégrité génomique final par défaut.

STATUT D'INTÉGRITÉ GÉNOMIQUE PROPOSÉ	STATUT D'INTÉGRITÉ GÉNOMIQUE FINAL
Positive	Positive
Negative	Negative
Negative*	Negative
Inconclusive	Undetermined
Rejected	Undetermined

Pour modifier le statut d'intégrité génomique final, cliquez sur le bouton « edit ».

Cliquez sur « Download full report » pour accéder au compte rendu d'intégrité génomique au format PDF, qui contient des mesures de CQ supplémentaires. Il est utile d'étudier plus en profondeur les échantillons à intégrité génomique indéterminée et de comprendre les raisons pour lesquelles un échantillon a été rejeté.

3.4. Définir le statut HRR

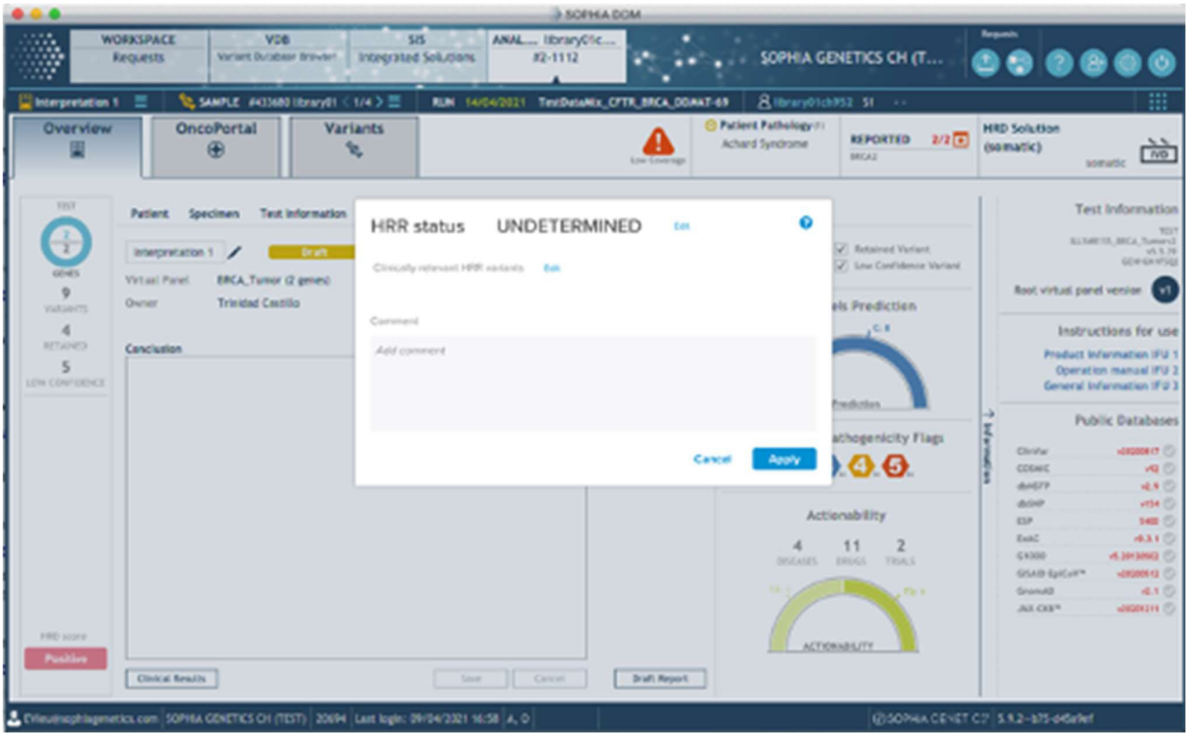
Avec la solution SOPHiA DDM Dx HRD, les utilisateurs peuvent rapporter les variants non-BRCA qui sont jugés pertinents pour l'évaluation de l'HRD.

La fenêtre HRR edit/review (figure 7) présente :

- Le statut HRR final. Par défaut, la valeur est réglée sur « Undetermined », le pipeline ne calcule pas de statut proposé.
- La liste des variants de support du statut du gène HRR. La liste contient tous les variants rapportés par l'utilisateur dans le champ de la détermination du statut du gène HRR. Par défaut, cette liste est vide car le système ne renseigne pas à l'avance les variants de HRR. La section 3.1.6 de l'Annexe I décrit comment rapporter des variants.
- Pour modifier le statut HRR final, cliquez sur le bouton « edit ».

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Figure 7. Vue d'ensemble de la fenêtre HRR edit/review.



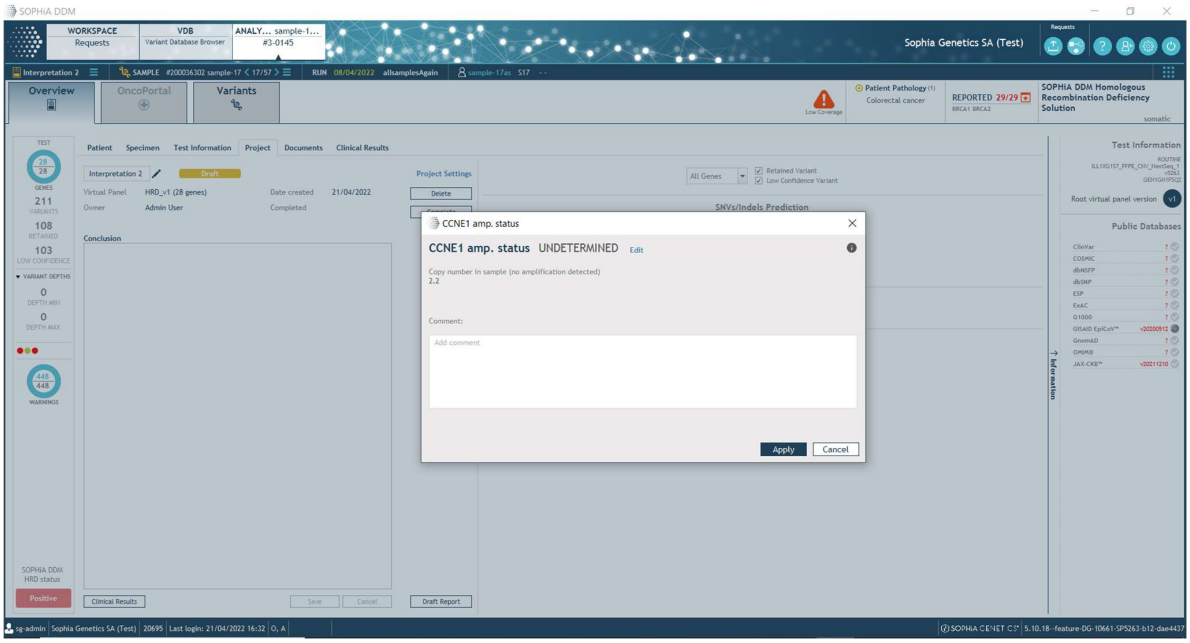
3.5. Définir le statut d'amplification du gène CCNE1

Avec la solution SOPHiA DDM Dx HRD, les utilisateurs peuvent aussi rapporter la présence d'amplifications du gène CCNE1. La fenêtre CCNE1 amplification statuts edit/review (figure 8) présente :

- Le statut CCNE1 final défini par l'utilisateur. Par défaut, la valeur est réglée sur « Undetermined ». Le pipeline de bio-informatique ne calcule pas un statut d'amplification du gène CCNE1 proposé.
- Le nombre de copies effectif de CCNE1 détecté par le module d'amplification du gène (voir section 7.1.3 de l'Annexe I ; voir aussi la section 7 du manuel d'utilisation de l'application de bureau SOPHiA DDM).
- Pour les échantillons avec un nombre de copies >3,25 (p. ex., si une amplification du gène est rapportée), l'utilisateur peut interpréter l'ampleur du gain de nombre de copies de CCNE1 par inspection visuelle de la courbe de profil de nombre de copies de CCNE1 lpWGS (voir aussi section 7.1.4. de l'Annexe I). La courbe n'est pas disponible pour les échantillons avec un statut GI rejeté.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Figure 8. Vue d'ensemble de la fenêtre CCNE1 gene amplification edit/review.



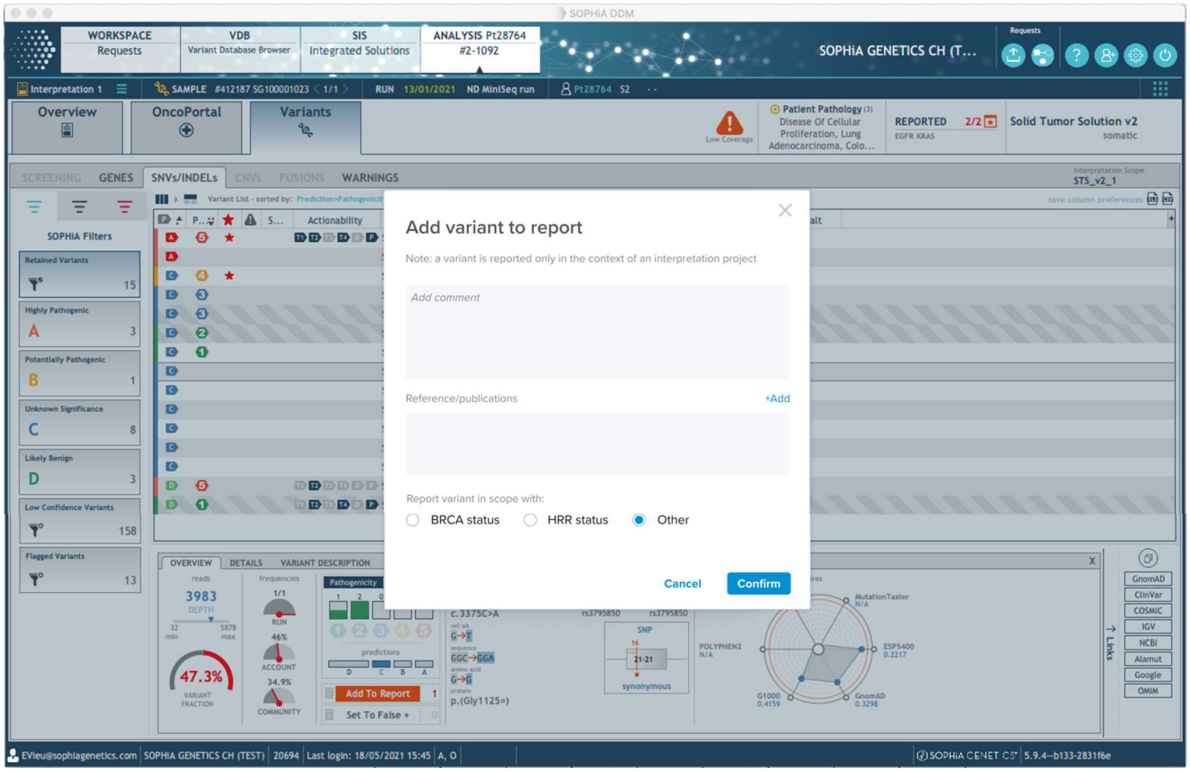
3.6. Rapporter les variants inclus dans la portée

Avec la solution SOPHiA DDM Dx HRD, les utilisateurs peuvent rapporter les variants comme pertinents pour l'évaluation du statut BRCA ou HRR. Dans la vue détaillée du variant du tableau des variants, cliquez sur « Add to report », puis choisissez entre BRCA, HRR et Other (Figure 9).

Les variants rapportés inclus dans la portée de BRCA et HRR apparaîtront dans le tableau des variants de support de BRCA/HRR dans la fenêtre BRCA/HRR edit/review. Les variants rapportés comme « Other » seront affichés dans une autre section du compte rendu.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Figure 9. Rapporter les variants inclus dans la portée avec HRR ou BRCA.



3.7. Générer un compte rendu CDS SOPHiA DDM HRD

Pour générer le compte rendu CDS SOPHiA DDM HRD, consultez le Manuel d'utilisation de l'application de bureau SOPHiA DDM. Il est à noter que le compte rendu est destiné à être utilisé uniquement en soutien de décisions cliniques. Il n'est pas destiné à servir d'outil de diagnostic principal.

- La première partie du compte rendu est dédiée à la présentation des statuts HRD, GI et BRCA (s'ils sont sélectionnés).
- La deuxième partie du compte rendu est dédiée aux statuts HRR et CCNE1 (s'ils sont sélectionnés).
- La troisième partie du compte rendu est dédiée aux éventuels variants supplémentaires pouvant être rapportés hors HRD.

4. Considérations relatives aux résultats non concluants

4.1. En cas de rejet d'intégrité génomique

En cas de rejet d'intégrité génomique, nous suggérons à l'utilisateur de consulter les mesures d'assurance qualité des échantillons (disponibles dans le compte rendu d'intégrité génomique du pipeline) et le tableau 4a suivant afin d'identifier la cause sous-jacente.

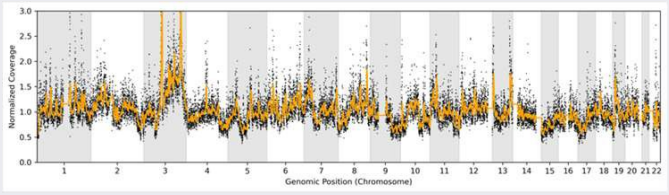
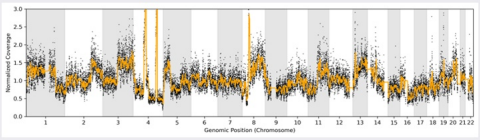
© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Tableau 4a. Recommandations en cas de rejet d'intégrité génomique.

CAUSE	COMMENT IDENTIFIER LA CAUSE	RECOMMANDATION
Couverture insuffisante due à des problèmes d'équilibrage du séquençage de génome entier avec la capture.	• Consultez la section QA de l'échantillon du compte rendu GI du pipeline. Un échantillon est rejeté lorsque le nombre de fragments de séquençage de génome entier est inférieur à 4M. • La section « QA de l'échantillon » du compte rendu d'intégrité génomique du pipeline indique le pourcentage de fragments de séquençage de génome entier. Comparez cette mesure pour tous les échantillons qui se trouvaient dans le même groupe de capture. Vérifiez si tous les échantillons du groupe présentent une valeur inhabituellement faible (<50 % de fragments de séquençage de génome entier).	Le groupe de séquençage du génome entier n'a pas été séquencé à la profondeur suffisante. Nous recommandons de séquencer à nouveau le groupe d'échantillons. Si nécessaire, ajustez le ratio entre le groupe de capture et le groupe SGE pour obtenir suffisamment de lectures de séquençage de génome entier.
Couverture insuffisante due à des problèmes d'équilibrage des échantillons multiplexés dans le même run.	• Consultez la section QA de l'échantillon du compte rendu GI du pipeline. Un échantillon est rejeté lorsque le nombre de fragments de séquençage de génome entier est inférieur à 4M. • Consultez la section QA de l'échantillon du compte rendu GI du pipeline. Comparez le nombre de fragments de SGE (M) entre les échantillons du même run. Vérifiez si la distribution des lectures dans le run est équilibrée ou s'il y a des valeurs aberrantes avec très peu ou trop de lectures (différence d'un facteur de 3).	Si vous observez un déséquilibre important dans le run de séquençage : nous vous recommandons de séquencer à nouveau vos échantillons, en vous assurant de quantifier soigneusement vos bibliothèques et d'ajuster tous les échantillons sur la même molarité avant le regroupement.
Couverture insuffisante due à un mauvais rendement du run de séquençage.	• Consultez la section QA de l'échantillon du compte rendu GI du pipeline. Un échantillon est rejeté lorsque le nombre de fragments de séquençage de génome entier est inférieur à 4M. • Accédez au compte rendu d'intégrité génomique du pipeline puis vérifiez le nombre total de lectures produites par le run de séquençage. Comparez ce nombre avec le nombre prévu de lectures (~260M lectures pour un run NextSeq Mid Output, ~800M lectures pour un run NextSeq High Output).	Répétez le run de séquençage en ajustant la concentration de chargement de la bibliothèque de séquençage finale afin d'éviter tout sous- or sur-regroupement du run.
Bruit résiduel excessif	• Consultez la section QA de l'échantillon du compte rendu GI du pipeline. Un bruit résiduel >= 0,17 provoque un rejet d'échantillon si le rapport pureté-ploïdie n'est pas détecté. *Exemples de profils de couverture lpWGS à bruit résiduel excessif, pour lesquels aucun PPR n'a été détecté.*	Des niveaux élevés de bruit peuvent indiquer un ADN d'entrée de mauvaise qualité, possiblement dû à une extraction d'ADN de mauvaise qualité également Pour améliorer l'efficacité de

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Tableau 4a. Recommandations en cas de rejet d'intégrité génomique. (Suite)

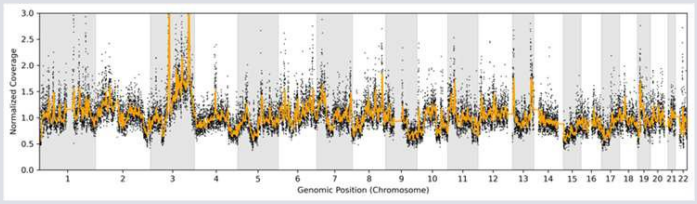
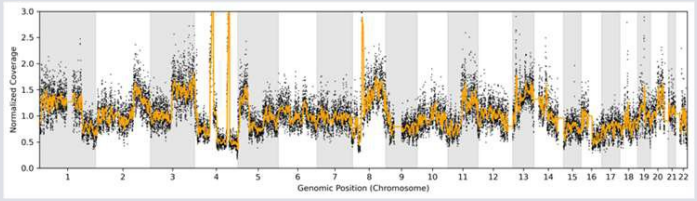
CAUSE	COMMENT IDENTIFIER LA CAUSE	RECOMMANDATION
	 	préparation de la bibliothèque, répétez la préparation de la bibliothèque, en doublant la quantité d'ADN d'entrée et, si possible, en commençant par une nouvelle extraction de l'ADN
Forte proportion de valeurs aberrantes de couverture	• Consultez la section QA de l'échantillon du compte rendu GI du pipeline. Un échantillon est rejeté si la proportion de valeurs aberrantes de couverture est supérieure ou égale à 20 %. • Une forte proportion de valeurs aberrantes de couverture qui affecte le profil de couverture lpWGS peut être provoquée par une exécution sous-optimale de l'étape de capture ou par un ADN de mauvaise qualité. • Pour distinguer les deux scénarios, comparez la proportion de valeurs aberrantes de couverture pour tous les échantillons qui se trouvaient dans le même groupe de capture. Vérifiez si tous les échantillons du groupe présentent une valeur inhabituellement élevée (>=20 %).	• Si tous les échantillons du groupe sont rejetés en raison des valeurs aberrantes de couverture, nous recommandons de répéter en totalité le workflow pour l'échantillon en lisant attentivement les instructions de capture. • Si seule une minorité des échantillons du groupe est rejetée en raison des valeurs aberrantes de couverture, nous recommandons de répéter en totalité le workflow uniquement pour les échantillons rejetés, en doublant la quantité d'ADN d'entrée.

4.2. En cas de statut GI non concluant

En cas de statut GI non concluant, nous suggérons à l'utilisateur de consulter les mesures d'assurance qualité de l'échantillon (disponibles dans le compte rendu d'intégrité génomique du pipeline) et le tableau 4b suivant afin d'identifier la cause sous-jacente.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Tableau 4b. Recommandations en cas de statut GI non concluant

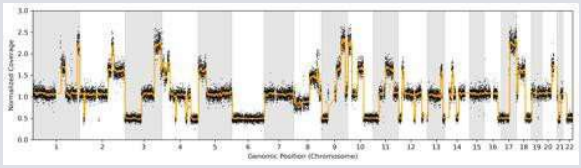
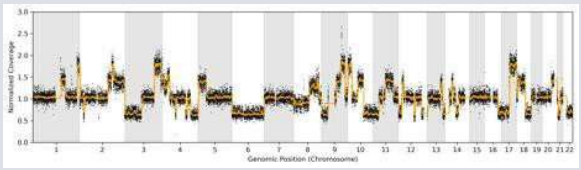
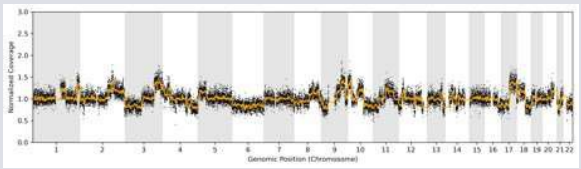
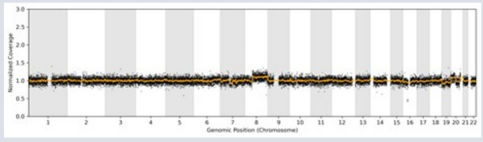
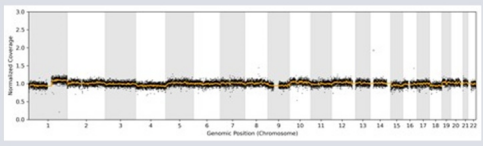
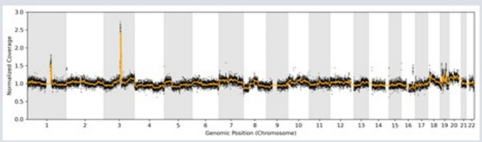
CAUSE	COMMENT IDENTIFIER LA CAUSE	RECOMMANDATION
L'échantillon ne présente pas de grandes aberrations de nombre de copies	• Consultez la section QA de l'échantillon du compte rendu GI du pipeline. Un échantillon est classé avec un statut GI non concluant si le ratio signal/bruit est insuffisant (inférieur à 0,55). • Procédez à l'inspection visuelle du profil lpWGS du compte rendu d'intégrité génomique. Le profil de couverture lissé (ligne orange) doit être plat, sans signe de grandes aberrations de nombre de copies. Le ratio signal/bruit insuffisant est dû à une absence de signal, ce qui peut résulter de : i) l'absence de changements du nombre de copies dans l'échantillon ou ii) un contenu tumoral extrêmement faible. ***Exemples de profil de couverture lpWGS sans grandes aberrations de nombre de copies***   	• Si le contenu tumoral de l'échantillon est supérieur à 30 %, il est probable que l'échantillon ne présente pas de grandes aberrations de nombre de copies Répéter l'expérience n'aura pas d'effet sur les résultats de l'analyse de l'intégrité génomique. • S'il y a des doutes quant au contenu tumoral de l'échantillon, nous recommandons de répéter l'intégrité du workflow en laboratoire en commençant avec un échantillon présentant un contenu tumoral plus élevé.

5. Considérations relatives aux statuts « GI Negative* »

Les statuts « GI Negative* » sont des appels négatifs à niveau de confiance moyen qui présentent un risque accru de faux-négatifs. Les appels « GI Negative* » résultent d'un rapport signal/bruit faible au sein des données NGS, ce qui peut refléter un contenu tumoral insuffisant de l'échantillon. Le tableau 5a ci-dessous illustre la manière dont un contenu tumoral insuffisant affecte le rapport signal/bruit.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Tableau 5a. Considérations relatives aux statuts « GI Negative* ».

CAUSE	COMMENT IDENTIFIER LA CAUSE	RECOMMANDATION
Contenu tumoral insuffisant	• Vérifiez que le contenu tumoral de l'échantillon estimé avant le traitement de l'échantillon d'ADN est supérieur à 30 %. • Consultez le compte rendu d'intégrité génomique et vérifiez que le PPR était inférieur à 0,1 ou non détecté. • Notez que l'analyse d'intégrité génomique n'effectue pas d'estimation du contenu tumoral. *Illustration d'un profil lpWGS obtenu en réduisant le contenu tumoral de l'échantillon. L'ampleur des changements de couverture entre les segments diminue avec le contenu tumoral.* Contenu tumoral=100 %  Contenu tumoral=66 %  Contenu tumoral=33 %  *Exemples de profils de couverture lpWGS pour des échantillons à contenu tumoral insuffisant pour lesquels aucun PPR n'a été détecté.*   	S'il y a des doutes quant au contenu tumoral de l'échantillon, nous recommandons de répéter l'intégrité du workflow en laboratoire en commençant avec un échantillon présentant un contenu tumoral plus élevé.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

5.1. En cas de résultat BRCA non concluant et/ou de présence d'un risque de FN pour BRCA

Évaluer l'importance du risque de FN en vérifiant le % des régions BRCA1/2 couvertes avec >100x molécules uniques. Pour cela, il est possible de vérifier l'indicateur de qualité « BRCA Cov Percentile 100 » qui est présenté sous forme d'un feu tricolore dans DDM (voir la description dans la section sur les indicateurs de qualité, et Figure 4). Un bon échantillon doit donner un score d'au moins 99 %.

Remarque : la lecture des instructions de dépannage ci-dessous (Tableau 5) montre que plusieurs causes sont possibles. Lisez le guide dans sa totalité et identifiez la cause la plus pertinente.

Tableau 5b. Recommandations en cas de résultat BRCA non déterminé associé à un avertissement de risque de FN.

CAUSE	COMMENT IDENTIFIER LA CAUSE	RECOMMANDATION
Couverture insuffisamment uniforme	• Vérifiez l'hétérogénéité de la couverture (<0,01) dans le compte rendu QA du pipeline • Déterminez si l'uniformité de la couverture est faible pour tous les échantillons du groupe de capture ou uniquement pour certains échantillons.	• Si vous observez un effet pour le groupe : l'efficacité de la capture est faible, nous recommandons de répéter l'analyse de la totalité du lot d'échantillons et de lire attentivement la section du mode d'emploi décrivant la procédure d'hybridation et de capture. • Si vous observez l'effet sur un seul échantillon : l'efficacité de préparation de la bibliothèque et/ou la qualité de l'échantillon sont insuffisantes. Pour améliorer la qualité de la bibliothèque, nous recommandons de doubler la quantité d'ADN d'entrée et de répéter en totalité le workflow en commençant par une nouvelle extraction de l'ADN, si possible.
Nombre insuffisant de fragments correspondant aux régions cibles du panel	• Consultez la section QA de l'échantillon du compte rendu GI du pipeline. Calculez le nombre de fragments (M) sur les régions cibles du panel en soustrayant le nombre de fragments de séquençage de génome entier du nombre total de fragments. Chaque échantillon doit avoir au moins 2M de fragments correspondant aux régions cibles du panel. • Déterminez si le nombre de fragments correspondant aux régions cibles du panel est faible dans tous les échantillons du groupe de capture ou uniquement dans certains échantillons.	• Si vous observez un effet pour le groupe : le groupe de capture n'a pas été séquencé à la profondeur suffisante ; nous recommandons de séquencer à nouveau le groupe d'échantillons. Si nécessaire, ajustez le ratio entre le groupe de capture et le groupe de séquençage de génome entier pour obtenir suffisamment de lectures correspondant aux régions cibles. • Si vous observez l'effet dans un seul échantillon : répétez la totalité du worklow pour l'échantillon et assurez-vous de quantifier soigneusement vos bibliothèques avant le regroupement et la capture. • Si vous observez un déséquilibre important dans le groupe de capture : assurez-vous

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Tableau 5b. Recommandations en cas de résultat BRCA non déterminé associé à un avertissement de risque de FN. (Suite)

CAUSE	COMMENT IDENTIFIER LA CAUSE	RECOMMANDATION
	• Vérifiez si la distribution des lectures dans la capture est équilibrée ou s'il y a des valeurs aberrantes avec très peu ou trop de lectures (différence d'un facteur de 3).	de quantifier soigneusement vos bibliothèques avant le regroupement et la capture. Si vous connaissez la qualité de l'ADN d'entrée, vous pouvez améliorer l'équilibre des lectures en regroupant des échantillons de qualité similaire dans le même groupe. *Avertissement : les deux premiers scénarios ne s'appliquent que si l'uniformité de couverture des échantillons était de qualité suffisante.*
Bibliothèque insuffisamment diverse	• Vérifiez les statistiques de cartographie dans le compte rendu QA du pipeline pour déterminer la fraction en double dans l'échantillon. Les duplicats de PCR doivent être similaires pour tous vos échantillons.	• Des pourcentages élevés de duplicats de PCR suggèrent une faible efficacité dans la préparation de la bibliothèque. Nous recommandons de répéter en totalité le workflow en doublant la quantité d'ADN d'entrée, si possible.
Petite taille de fragment de la bibliothèque	• Vérifiez si la taille de la bibliothèque est inhabituellement petite comparativement aux autres échantillons traités. Vous pouvez obtenir la taille moyenne de fragment de la bibliothèque par électrophorèse capillaire haute résolution, qui est utilisée pour vérifier la qualité de la bibliothèque à la fin du workflow de préparation de la bibliothèque.	• Des bibliothèques d'échantillons individuelles de petite taille peuvent être le signe d'un ADN d'entrée de mauvaise qualité (en supposant que des pipettes multicanaux ont été utilisées pour traiter les échantillons conformément aux bonnes pratiques de laboratoire). Pour améliorer l'efficacité de la préparation de la bibliothèque, nous recommandons de doubler la quantité d'ADN d'entrée.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

6. Fichiers de ressource

6.1. Régions cibles

Tableau 6. Régions cibles du panel génétique de la solution SOPHiA DDM Dx HRD.

GÈNE	BASES COUVERTES PAR HRD_V1	TOTAL DES BASES DANS LA RÉGION CODANTE	% DU GÈNE COUVERT PAR HRD_V1
AKT1	387	4 329	8,94
ATM	9 171	9 171	100
BARD1	7 311	7 311	100
BRCA1	21078	21078	100
BRCA2	10257	10257	100
BRIP1	3 750	3 750	100
CCNE1	4 605	4 605	100
CDK12	8 919	8 919	100
CHEK1	8 250	8 250	100
CHEK2	5 907	5 907	100
ESR1	856	11664	7,34
FANCA	9 537	9 537	100
FANCD2	13128	13128	100
FANCL	2 271	2 271	100
FGFR1	5 523	21459	25,7
FGFR2	4 909	26337	18,6
FGFR3	1 531	6 933	22,1
MRE11	6 294	6 294	100
NBN	4 284	4 284	100
PALB2	3 561	3 561	100
PIK3CA	1 147	3 207	35,8
PPP2R2 A	2 718	2 718	100
PTEN	3 564	3 564	100
RAD51B	12525	12525	100
RAD51C	1 539	1 539	100
RAD51D	2 685	2 685	100

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

GÈNE	BASES COUVERTES PAR HRD_V1	TOTAL DES BASES DANS LA RÉGION CODANTE	% DU GÈNE COUVERT PAR HRD_V1
RAD54L	4 488	4 488	100
TP53	13338	13338	100

7. Description et paramètres de l'analyse

7.1. Prétraitement des données brutes

7.1.1. Prétraitement

- Collectez les mesures de la qualité sur la base des fichiers bruts fastq.
- Tronquez les fichiers fastq à une taille maximum de 2 500 MB.

7.1.2. Alignement

- Coupez les adaptateurs et réduisez les extrémités de qualité basse des lectures (qualité de base inférieure à 20).
- Alignez les lectures sur le génome de référence hg19 en mode extrémités associées.
- Calculez les statistiques d'alignement et les mesures de couverture sur les fichiers d'alignement bruts.
- Réduisez les séquences d'adaptateurs saillantes.
- Supprimez les lectures dont la qualité de cartographie est basse ou dont les scores phred de base moyens sont faibles. Utilisez un seuil <30 dans les deux cas.
- La couverture locale pour toute position située dans les régions cibles est limitée à 30 000 x et à 10 000 en dehors des régions cibles. Une couverture excessive est éliminée après un sous-échantillonnage aléatoire.
- Supprimer les lectures chimériques avec structure en épingle à cheveux.
- Réalignez les soft clips.
- Affectez les lectures aux groupes de lecture sur la base des coordonnées de début et de fin.
- Annotez les régions de couverture faible sur la base d'un seuil de 100 molécules (groupes de lecture).
- Calculez les statistiques et les mesures de couverture sur le fichier d'alignement traité.

7.2. Liste des modules inclus

7.2.1. Indicateurs de qualité

Pour chaque échantillon analysé, un panel d'indicateurs de qualité sous forme de feux de signalisation s'affiche dans DDM afin d'informer sur les mesures de qualité spécifiques de l'échantillon. Chaque indicateur est de couleur verte lorsque la mesure de qualité correspondante se trouve dans les limites prévues, ou de couleur rouge dans le cas contraire. Les indicateurs suivants sont affichés pour chaque échantillon :

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

- **Panel_cov_percentile_100 :** pourcentage du panel génétique couvert avec >100x molécules. Les limites prévues pour cette mesure sont comprises entre 95 % et 100 %
- **BRCA_cov_percentile_100 :** pourcentage des régions ciblées de BRCA1 et BRCA2 couvertes avec >100x molécules. Les limites prévues pour cette mesure sont comprises entre 99 % et 100 %. En cas d'échec de cet indicateur (c'est-à-dire lorsqu'il est inférieur à 99 %), un avertissement de risque de FN se déclenche dans le contexte de l'analyse de statut BRCA.
- **BRCA_cov_unif :** uniformité de couverture dans les régions ciblées de BRCA1 et BRCA2. L'uniformité de couverture est définie comme la fraction des régions génomiques qui présentent une couverture comprise entre 5 et 1/5 de la couverture moyenne. Les limites prévues pour cette mesure sont comprises entre 0,9 et 1.
- **Group_size :** la taille de groupe est définie comme le nombre moyen de lectures dans chaque groupe de lectures. Une taille de groupe élevée reflète un faible taux de conversion de la bibliothèque et un nombre de duplications élevé. Les limites prévues pour cette mesure sont comprises entre 1 et 10.
- **DeamScore :** le score de désamination est un score prévu pour refléter le taux de désamination artificielle dans un échantillon FFPE donné. Les limites prévues pour ce score sont comprises entre 0 et 0,8.
- **FragLength :** longueur moyenne d'un fragment d'ADN dans un échantillon. Les limites prévues pour cette mesure sont comprises entre 75 et 250.

7.2.2. SNV/INDEL

Les modules de détection de SNV/INDEL incluent des algorithmes de réalignement local, un logiciel d'appel de variant qui applique des tests statistiques à des mésappariements identifiés par rapport au génome de référence, des fonctions de régularisation de variant, des fonctions de quantification de variant et des fonctions de filtrage de variant.

Appel de variant

- Identifiez les variants (SNV et INDEL) en choisissant les positions dans lesquelles le signal supportant l'allèle alternatif est significativement différent du bruit de fond.
- Réalisez un appel de variant dédié pour les duplications longues et les insertions longues qui ne peuvent pas être identifiées par accumulation de lectures.
- Fusionnez les variants ensemble s'ils sont sur le même allèle (phasing)
- Quantifiez la fraction de variant en tenant compte de tous les haplotypes dans la région voisine.
- Unifiez les annotations d'homopolymère selon les normes pour les ancres longues.

Filtrage de variant

- Filtrage des variants qui se trouvent en-dessous du niveau de bruit de fond du panel et du séquenceur (filtre = high_background_noise).
- Filtrage des variants qui présentent une fraction de variants inférieure à 4% (filtre = low_variant_fraction).
- Filtrage des variants qui présentent une couverture de lecture inférieure à 30 (filtre = low_coverage).
- Filtrage des variants qui se trouvent en dehors des régions cibles (filtre = off_target).

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

- Filtrage des Indels dans les homopolymères d'une longueur égale ou supérieure à 10 (filtre = homopolymer_region).
- Calcul d'un score sur la base de la fraction de variants C:G>T:A qui présentent une faible prise en charge moléculaire et application d'un seuil différentié selon le score faible/élevé propre à l'échantillon (filtre = low_molecular_support).
- Suppression des variants au-delà des régions cibles qui présentent un remplissage de 500 pb.
- Suppression des duplications d'une longueur supérieure à 500 pb.
- Filtrage des variants qui présentent un score de confiance inférieur à 0 (filtre = low_quality).

Les variants auxquels aucun filtre n'est associé sont considérés comme des appels « à niveau de confiance élevé » et sont ceux utilisés pour l'évaluation des performances analytiques. Les variants étiquetés avec un quelconque des filtres indiqués ci-dessus sont considérés comme « de confiance faible » et sont présentés dans l'unique but de faciliter l'interprétation de tous les signaux faibles présents dans le fichier BAM.

Annotation de variant

Le système d'annotation calcule les annotations propres à la transcription en suivant les normalisations de coordonnées HGVS et les instructions de notation (notation d'ADN-c et de protéine). Ce module fournit en outre des informations fonctionnelles pour les conséquences sur le codage du variant ; en plus des informations de position et contextuelles telles que le rang et la distance par rapport à l'exon le plus proche, la séquence ref et codon alt, et la séquence d'acide aminé ref et alt. Des informations relatives à la transcription (identifiants RefSeq) et au gène (symbole HGNC, numéro de gène OMIM) sont également fournies à cette étape. Le système d'annotation interroge ensuite des bases de données externes, via des correspondances de coordonnées génomiques, afin de récupérer les informations relatives au variant, comme l'identifiant dbSNP, les fréquences allèles issues de GnomAD, du projet 1000 génomes, d'ExAC, d'ESP5400, de CG69, les scores de prédiction issus de dbNSFP (SIFT, PolyPhen2, MutationTaster) et les affirmations de signification clinique issues de ClinVar. Le système annote enfin les variants avec des catalogues sous licence tels que OMIM, CKB (preuve pragmatique affichée dans OncoPortal) et les bases de données BRCA Exchange.

Remarque : les variants BRCA1 et BRCA2 sont annotés conformément à « BRCA_pathogenicity » ; ce score est obtenu en regroupant les champs « Pathogenicity_expert » et « Pathogenicity_all » de BRCA Exchange, en suivant les règles détaillées ci-dessous dans le tableau 7.

Tableau 7. Règles suivies pour regrouper les informations BRCA_Exchange en « BRCA_Pathogenicity » affiché dans le tableau de variant.

RÈGLES SUIVIES POUR REGROUPER LES INFORMATIONS BRCA_EXCHANGE EN « BRCA_PATHOGENICITY » AFFICHÉ DANS LE TABLEAU DE VARIANT
Le BRCA_pathogenicity est affecté variant par variant, via des règles de classification qui utilisent les attributs « Pathogenicity_expert » et « Pathogenicity_all » récupérés à partir de BRCA Exchange et en appliquant ces règles selon l'ordre de priorité suivant :
1 : tout variant annoté avec « pathogenic », « likely pathogenic », « risk factor », « probable pathogenic » dans **Pathogenicity_expert** obtient un « BRCA_pathogenicity » de type « pathogenic ».
2 : tout variant annoté avec « likely benign », « benign », « probably not pathogenic », « benign/little clinical significance » dans **Pathogenicity_expert** obtient un « BRCA_pathogenicity » de type « benign ».

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Tableau 7. Règles suivies pour regrouper les informations BRCA_Exchange en « BRCA_Pathogenicity » affiché dans le tableau de variant. (Suite)

RÈGLES SUIVIES POUR REGROUPER LES INFORMATIONS BRCA_EXCHANGE EN « BRCA_PATHOGENICITY » AFFICHÉ DANS LE TABLEAU DE VARIANT
3 : tout variant annoté avec « pathogenic », « likely pathogenic », « risk factor », « probable pathogenic » dans **Pathogenicity_all** obtient un « BRCA_pathogenicity » de type « pathogenic »
4 : tout variant annoté avec « likely benign », « benign », « probably not pathogenic », « benign / little clinical significance » dans **Pathogenicity_all** obtient un « BRCA_pathogenicity » de type « benign ».
5 : tout variant qui présente un conflit entre les règles 3 et 4 obtient un « BRCA_pathogenicity » de type « unclear ».
6 : tout variant sans « BRCA_pathogenicity » affecté selon les règles 1 à 5 ; et annoté avec « uncertain significance », « no known pathogenicity », « variant of unknown significance » dans **Pathogenicity_all** obtient un « BRCA_pathogenicity » de type « unclear ».
Règles de traçabilité : les valeurs « pathogenic » et « benign » sont en outre précédées d'un préfixe « ex: » (expert) lorsqu'elles proviennent des règles de priorité 1 et 2, ou « ag: » (agrégé) lorsqu'elles sont générées par les règles 3 et 4. Ainsi, les valeurs finales disponibles pour le champ « BRCA_pathogenicity » sont : • ex:pathogenic • ag:pathogenic • ex:benign • ag:benign • unclear • “” (en l'absence d'entrée dans BRCA Exchange).

7.2.3. Amplification de gène/CNV

Les variations du nombre de copies (CNV) sont des modifications structurales de l'ADN associées à des variations du nombre de copies des sections d'ADN affectées. L'analyse de CNV dans ce produit est un appel d'amplification de gène et elle s'appuie sur les données de NGS ciblant le panel HRD.

La version amplification de gène du module CNV est conçue principalement pour l'analyse des échantillons FFPE. Elle ne détecte que les événements d'amplification de gène : réplications multiples de grands segments d'ADN impliquant typiquement des gènes complets. Les délétions ne sont pas détectées.

La détection d'amplification de gène, utilisant les données de séquençage ciblé, est réalisée par :

- Normalisation des niveaux de couverture des régions cibles par échantillon et entre échantillons au sein du même lot (par région cible dans le contexte de la détection de la CNV, nous entendons une région continue couverte par les sondes).
- Les niveaux moyens de nombre de copies par gène (ou autres grandes régions prédéfinies) sont estimés.
- Les gènes associés à des niveaux de nombre de copies :
    a. supérieurs à 3,25 sont rapportés comme amplifiés
    b. inférieurs à 3,25 sont rapportés comme non amplifiés

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

- Les échantillons avec des niveaux élevés de bruit de couverture (bruit résiduel supérieur à 0,25) sont rejetés de l'analyse. Les niveaux de nombre de copies de gène des échantillons rejetés ne peuvent pas être estimés en toute confiance et ces échantillons sont rapportés comme ayant un statut CNV non déterminé.

  Remarque : veuillez télécharger et consulter le compte rendu CNV complet (format PDF) pour une description détaillée des méthodes et des résultats.

7.2.4. Graphique d'amplification du gène CCNE1 lpWGS

Les niveaux de nombre de copies rapportés par le module CNV quantifient le nombre de copies dans l'échantillon d'ADN (nombre de copies effectif) et non le nombre de copies absolu de l'ADN tumoral présent dans l'échantillon. Les graphiques d'amplification du gène CCNE1 lpWGS sont conçus pour aider les utilisateurs à estimer le nombre de copies absolu de l'ADN tumoral présent dans l'échantillon, lors de l'inspection visuelle (voir figure 10a, 10b).

Figure 10a. Exemple de graphique d'amplification du gène CCNE1 à forte amplification.

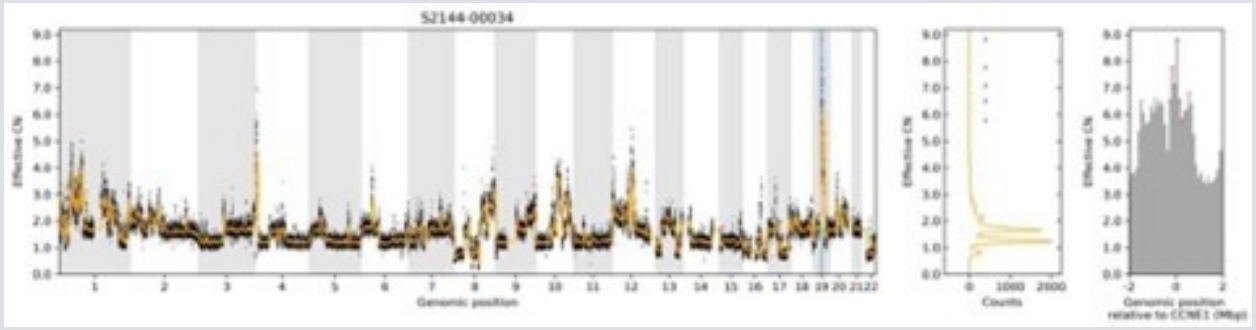
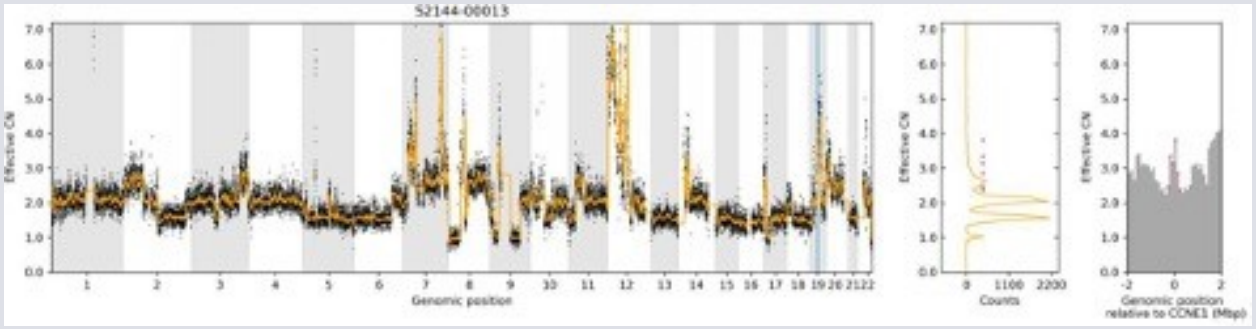


Figure 10b. Exemple de graphique d'amplification du gène CCNE1 à faible gain de nombre de copies.



Le volet de gauche indique le profil de couverture lpWGS après normalisation (en noir : données brutes à une résolution de 100 ko, en orange : version lissée des données brutes), avec la ligne bleue verticale qui indique la position génomique du gène CCNE1.

Le volet du milieu indique : i) en orange : l'histogramme du profil de couverture lpWGS lissé qui figure dans le volet de gauche ; ii) en points rouges : la valeur du profil de couverture lpWGS normalisé mesuré autour du gène CCNE1 (±300 Kpb de position génomique du gène CCNE1). Les pics distincts de l'histogramme correspondent aux niveaux de nombre de copies distincts présents dans l'ADN tumoral. La position des points rouges par rapport aux pics de l'histogramme permet à l'utilisateur d'interpréter l'ampleur du gain de nombre de copies du gène CCNE1 présent dans l'ADN tumoral. Sur la figure 10a, les points rouges sont éloignés de tous les pics de

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

l'histogramme, ce qui suggère la présence d'un gain de nombre de copies élevé au sein du gène CCNE1. Sur la figure 10b, les points rouges chevauchent certains pics de l'histogramme, ce qui suggère la présence d'un faible gain de nombre de copies au sein du gène CCNE1.

Le volet de droite contient une vue agrandie du profil de couverture lpWGS après normalisation (données identiques au volet de gauche) autour de l'emplacement génomique du gène CCNE1 (±2 Mpb). Les régions qui se trouvent à ±300 Kpb du gène CCNE1 sont mises en exergue par des points rouges (identiques à ceux qui se trouvent dans le volet du milieu).

7.2.5. Statut CDS SOPHiA DDM HRD proposé

Le statut SOPHiA DDM HRD proposé est calculé à partir de l'agrégation du « Statut GI proposé » et du « Statut BRCA proposé ». L'ensemble des règles qui déterminent le « Statut CDS SOPHiA DDM HRD proposé », représenté dans les cellules du tableau, peut être déduit du tableau suivant (tableau 8) dans lequel le « Statut GI proposé » est représenté le long de la ligne d'entrée et le « Statut BRCA proposé » est représenté le long de la colonne d'entrée.

Tableau 8. Calcul du statut HRD proposé. La négativité HRD est restreinte par le type d'aberrations génomiques couvertes par le produit. Consultez les limites de la détermination du statut BRCA proposé.

Tableau 8. Statut CDS SOPHiA DDM HRD proposé

Statuts GI proposés	Statut BRCA proposé						
	Positive	Predicted positive	Complex case	Undetermined	Predicted negative	Negative	Inconclusive
Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Inconclusive	Positive	Positive	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
Rejected	Positive	Positive	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
Negative*	Positive	Positive	Undetermined	Negative	Negative	Negative	Undetermined
Negative	Positive	Positive	Undetermined	Negative	Negative	Negative	Undetermined

7.2.6. Statut BRCA proposé

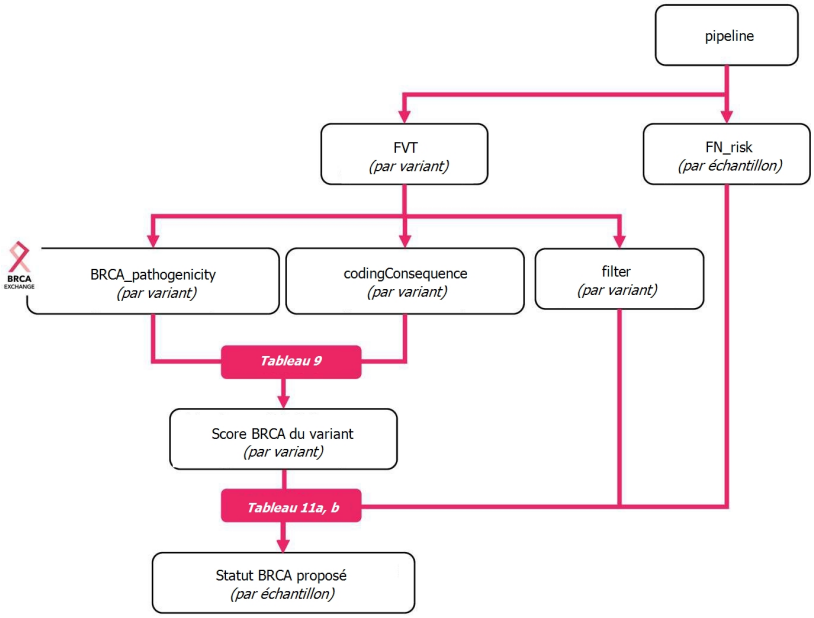
Le « Statut BRCA proposé » expose l'utilisateur à la connaissance clinique de pointe des variants de BRCA1/2 tout en communiquant de manière transparente l'incertitude en termes de détection et d'appel de variant. Le Statut BRCA proposé combine donc des connaissances cliniques et des mesures de détection de variant rassemblées aux niveaux du variant et de l'échantillon.

Le système procède séquentiellement :

1. En établissant l'impact fonctionnel et la pertinence clinique de chaque variant de BRCA1/2 détecté dans l'échantillon
2. En établissant le statut fonctionnel de BRCA1/2, au niveau de l'échantillon, via un « Statut BRCA proposé »

Cette section expose le flux de données, les règles et les étapes intermédiaires impliqués dans l'établissement du « Statut BRCA proposé ». Les nomenclatures et les définitions des étiquettes émises par le pipeline sont détaillées dans les tableaux 9, 10 et 11.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.



L'analyse commence avec le tableau de variant complet (colonnes « BRCA_ pathogenicity » et « codingConsequence »). Le système établit l'impact fonctionnel (c'est-à-dire la conséquence sur le codage) et la pertinence clinique (c'est-à-dire la pathogénicité de BRCA) de chaque variant détecté dans l'échantillon. Il en résulte que chaque variant de BRCA obtient un « score de variant de BRCA » suivant les règles détaillées dans le tableau 9 (la nomenclature et les conventions étant présentées dans le tableau 10). Ces règles classent chaque variant de BRCA1/2 comme suit :

- Positive : variant connu comme étant pathogène au vu des connaissances cliniques
- Predicted positive : variant avec des conséquences sur le codage prédictives d'une perte de fonction
- Complex case : VUS avec des conséquences sur le codage nécessitant une inspection plus poussée par l'utilisateur final.
- Predicted Negative : variant avec des conséquences sur le codage prédictives d'une absence d'altération fonctionnelle
- Negative : variant connu comme étant bénin au vu des connaissances cliniques
- Undetermined : autre.

Le système rapporte une catégorie « NA » en cas d'absence de détection d'un variant de BRCA.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Tableau 9. Règles utilisées pour établir le score de variant de BRCA.

Conséquence sur le codage	Alertes de pathogénicité de BRCA			
	ex:pathogenic OU ag:pathogenic	ex:benign OU ag:benign	unclear	NA
3'UTR	Positive	Negative	Undetermined	Predicted negative
5'UTR	Positive	Negative	Undetermined	Predicted negative
intronic	Positive	Negative	Undetermined	Predicted negative
synonymous	Positive	Negative	Undetermined	Predicted negative
splice_*	Positive	Negative	Complex case	Complex case
inframe*	Positive	Negative	Complex case	Complex case
missense	Positive	Negative	Undetermined	Undetermined
no_stop	Positive	Negative	Undetermined	Undetermined
frameshift_ 5'	Positive	Negative	Predicted positive	Predicted positive
frameshift_ 3'	Positive	Negative	Undetermined	Undetermined
nonsense_5'	Positive	Negative	Predicted positive	Predicted positive
nonsense_3'	Positive	Negative	Undetermined	Undetermined
aucun variant détecté pour BRCA 1/2	NA			

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Tableau 10. Nomenclature et conventions

TERME	DESCRIPTION
AA_position	Position d'acide aminé du variant sur la référence BRCA1_refTranscript ou BRCA2_refTranscript.
BRCA1_refTranscript	NM_007294.3
BRCA2_refTranscript	NM_000059.3
AA_threshold_BRCA1	AA_threshold_BRCA1 = position AA_position la plus en 3' des variants pathogènes selon le catalogue BRCAexchange (version en cours de production). Sachant que le variant pathogène le plus en 3' pour BRCA1 selon BRCA_Exchange est p.(Ala1823_*1864del), ceci place la valeur AA_threshold_BRCA1 qui est l'acide aminé 1863, ce qui correspond à la longueur complète de la protéine.
AA_threshold_BR CA2	AA_cutoff = 3326 (coordonnées d'AA), selon Mazoyer S et al., Nature Genetics 1996, 14:253-254. Ceci équivaut à la position génomique hg19:13:32972627
codingConsequence	Conformément à la colonne codingConsequence du fichier tableau de variant complet produit par le système d'annotation.
Alertes BRCA_ pathogenicity	Conformément à la colonne BRCA_pathogenicity du fichier tableau de variant complet produit par le système d'annotation. Affirmations de pathogénicité fournies par variant, extraites de BRCA Exchange après reformulation des étiquettes et vérification des erreurs exposées dans les sections annotées.
splice_*	toute codingConsequence correspondant à l'étiquette « splice »
inframe*	toute codingConsequence correspondant à l'étiquette « inframe »
frameshift_ 5'	BRCA1 : codingConsequence est « frameshift » et AA_position <= AA_threshold_BRCA1
	BRCA2 : codingConsequence EST « frameshift » ET AA_position <= AA_threshold_BRCA2
frameshift_3'	BRCA1 : codingConsequence EST « frameshift » ET AA_position > AA_threshold_BRCA1
	BRCA2 : codingConsequence EST « frameshift » ET AA_position > AA_threshold_BRCA2
nonsense_5'	BRCA1 : codingConsequence EST « nonsense » ET AA_position <= AA_threshold_BRCA1
	BRCA2 : codingConsequence EST « nonsense » ET AA_position <= AA_threshold_BRCA2
nonsense_3'	BRCA1 : codingConsequence EST « nonsense » ET AA_position > AA_threshold_BRCA1
	BRCA2 : codingConsequence EST « nonsense » ET AA_position > AA_threshold_BRCA2

L'étape suivante appelle le « Statut BRCA proposé », rapporte l'ensemble de variants et émet des avertissements pour l'utilisateur. L'ensemble de règles est présenté dans le tableau 11. Pour cela, le pipeline de bio-informatique prend en compte :

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

a. Le score de variant de BRCA (établi à l'étape 1) et les rangs pour tous les variants de BRCA détectés dans un échantillon en fonction de leur pertinence clinique : « Positive » > « Predicted positive » > « Complex case » > « Undetermined » > « Predicted negative » > « Negative » > « NA ».

b. L'incertitude de la détection de variant, considérant séparément les appels de variant de confiance élevée et faible.

c. La présence ou l'absence d'un risque de faux négatif (voir section 7.2.1 de l'Annexe I, Indicateur de qualité : BRCA_cov_percentile_100).

   Les variants rassemblés à partir d'appels de confiance élevée sont utilisés pour établir le statut BRCA proposé. L'échantillon est appelé comme BRCA :

   - Positive : le score du variant de confiance élevée le plus pertinent est « Positive », ou
   - Predicted positive : le score du variant de confiance élevée le plus pertinent est « Predicted positive », ou
   - Complex case : le score du variant de confiance élevée le plus pertinent est « Complex case », ou
   - Predicted negative : le score du variant de confiance élevée le plus pertinent est « Predicted negative » et il n'y a pas de risque de FN, ou
   - Negative : le score de tous les variants est « Negative » (ou aucun variant n'est détecté) et il n'y a pas de risque de FN, ou
   - Inconclusive : le score du variant de confiance élevée le plus pertinent est « Predicted negative » ou « Negative » et il y a un risque de FN, ou
   - Undetermined : aucun des cas précédents. Résulte de connaissances cliniques insuffisantes concernant les variants de BRCA1/2 rapportés (BRCA_Pathogenicity est « unclear »).

Les avertissements signalent trois situations possibles à l'utilisateur :

a. « Review low-confidence variants with relevant BRCA score » : Un ou plusieurs variants de confiance faible avec score BRCA pertinent ont été détectés.

b. « Review clinical interpretation » : les preuves les plus pertinentes identifiées sont un « Complex case » ou un variant de confiance élevée « Undetermined ».

c. « False negative risk » : aucune preuve pertinente n'a été identifiée, mais un risque de faux négatif ne peut pas être exclu pour l'échantillon.

   Le « statut BRCA proposé » obtenu, la liste des preuves en soutien et les avertissements ensuite utilisés pour initier les interfaces utilisateur sont présentés en détail à la section 8.

Tableau 11. Statut BRCA proposé. L'ensemble de règles suivant est appliqué pour agréger les *scores de variant de BRCA* en *statut BRCA proposé* au niveau de l'échantillon. Les *scores de variant de BRCA* des variants obtenus sont combinés en un *statut BRCA proposé* au niveau de l'échantillon selon les règles qui s'appliquent soit **a)** aux échantillons pour lesquels aucun risque de faux négatifs n'a été identifié (c'est-à-dire avec FN_risk = PASS) soit **b)** aux échantillons avec risque de faux négatifs (c'est-à-dire avec FN_risk = FAIL). Les tableaux sont formatés de manière à exposer les entrées de règle sous forme de lignes (*score BRCA* du variant le plus pertinent du point de vue clinique dans les appels de confiance élevée) et de colonnes (*score BRCA* du variant le plus pertinent du point de vue clinique dans les appels de confiance faible). Les valeurs dans le tableau représentent le statut BRCA proposé au niveau de l'échantillon. Enfin, le système de règles émet une série d'avertissements pour l'utilisateur, listés en bas du tableau 11b.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Tableau 11a. Risque de faux négatif de l'échantillon : FAIL

Score BRCA du variant le plus pertinent appelé avec une confiance élevée	Score BRCA du variant de BRCA le plus pertinent appelé avec une confiance faible						
	Positive	Predicted positive	Complex case	Undetermined	Predicted negative	Negative	NA
Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Predicted positive	Predicted positive	Predicted positive	Predicted positive	Predicted positive	Predicted positive	Predicted positive	Predicted positive
Complex case	Complex case[1,2,3]	Complex case[1,2,3]	Complex case[2,3]	Complex case[2,3]	Complex case[2,3]	Complex case[2,3]	Complex case[2,3]
Undetermined	Undetermined 1,2,3	Undetermined 1,2,3	Undetermined 1,2,3	Undetermined 2.3	Undetermined 2.3	Undetermined 2.3	Undetermined 2.3
Predicted negative	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3
Negative	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3
NA	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3	Inconclusive 1.3

Tableau 11b. Risque de faux négatif de l'échantillon : PASS

Score BRCA du variant le plus pertinent appelé avec une confiance élevée	Score BRCA du variant de BRCA le plus pertinent appelé avec une confiance faible						
	Positive	Predicted positive	Complex case	Undetermined	Predicted negative	Negative	NA
Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Predicted positive	Predicted positive	Predicted positive	Predicted positive	Predicted positive	Predicted positive	Predicted positive	Predicted positive
Complex case	Complex case 1.2	Complex case 1.2	Complex case 2	Complex case 2	Complex case 2	Complex case 2	Complex case 2
Undetermined	Undetermined[1,2]	Undetermined[1,2]	Undetermined[1,2]	Undetermined[2]	Undetermined[2]	Undetermined[2]	Undetermined[2]
Predicted negative	Predicted negative[1]	Predicted negative[1]	Predicted negative[1]	Predicted negative[1]	Predicted negative	Predicted negative	Predicted negative
Negative	Negative[1]	Negative[1]	Negative[1]	Negative[1]	Negative	Negative	Negative
NA	Negative[1]	Negative[1]	Negative[1]	Negative[1]	Negative	Negative	Negative

Avertissements pour l'utilisateur : [1]Vérifiez les variants de confiance faible avec le *score BRCA* pertinent, [2]Vérifiez l'interprétation clinique, [3]Risque de faux négatif

7.2.7. Statut d'intégrité génomique proposé

Le statut d'intégrité génomique proposé est hérité du statut GI rapporté dans le mode d'emploi de la solution SOPHiA DDM Dx HRD. Veuillez consulter la section 7.3 du mode d'emploi.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

8. Descriptions des livrables du pipeline

8.1. Emplacement des résultats

Les fichiers de sortie de l'application de bureau SOPHiA DDM peuvent être retrouvés au niveau du run (presse-papier) ou de l'échantillon (carré de 9 grilles).

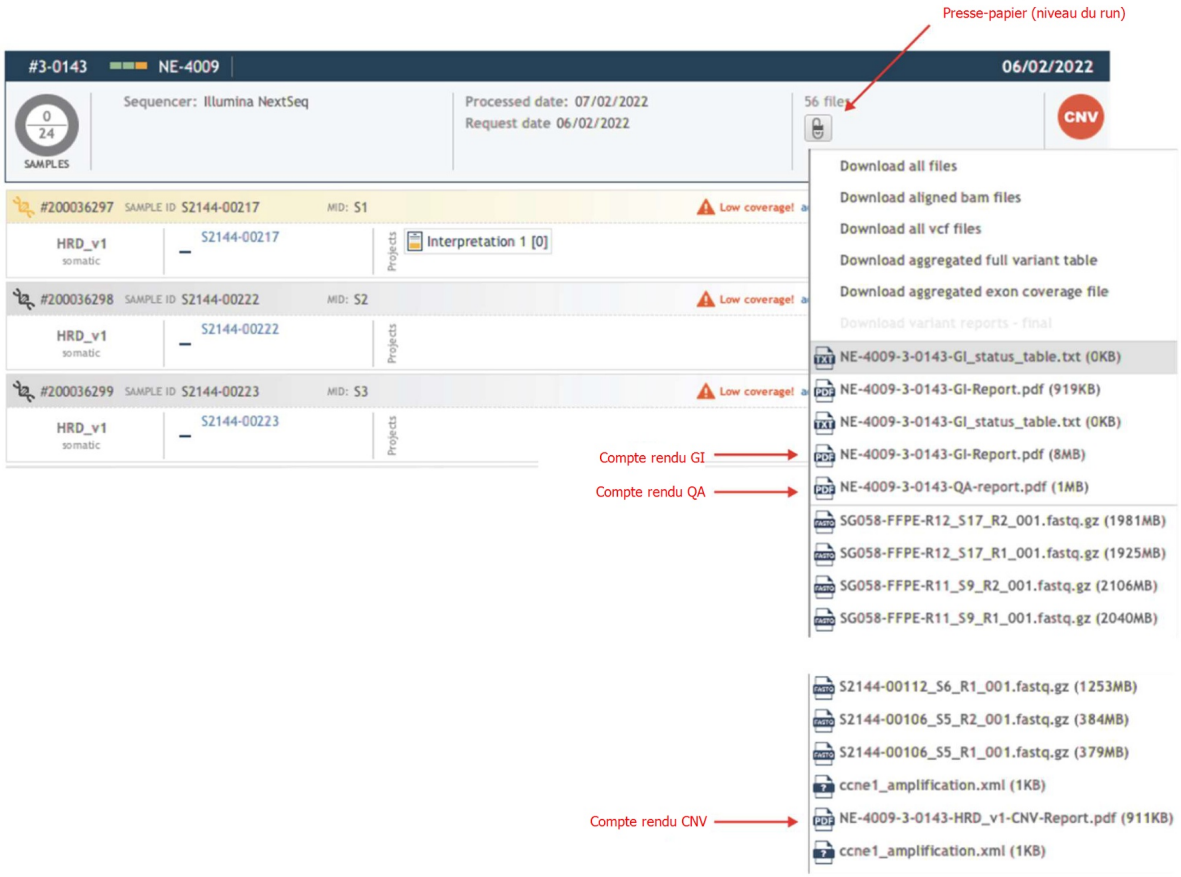
Au niveau du run, un groupe de fichiers peut être téléchargé – tous les fichiers (y compris fastq), tous les fichiers vcf, tous les fichiers BAM alignés, le tableau de variant complet regroupé, la couverture d'exons regroupée et les comptes rendus de variant final.

Le « compte rendu QA » de synthèse du pipeline peut être téléchargé ici, tout comme d'autres comptes rendus de synthèse (ex. : compte rendu de synthèse de CNV).

Au niveau de l'échantillon, les fichiers propres à l'échantillon peuvent être téléchargés – fastq, BAM aligné, statistiques de couverture de région cible, régions marquées, tableau de variant complet, compte rendu QA de pipeline propre à l'échantillon et comptes rendus de synthèse au niveau du run (compte rendu QA, compte rendu de synthèse de CNV).

Un exemple est illustré sur la figure 11 ci-dessous :

Figure 11 : représentation schématique des fichiers disponibles sur l'application de bureau SOPHiA DDM.



© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

8.2. Composition du fichier

Fichiers Fastq.gz : fichiers fastq d'entrée zippés.

Fichiers Bam et Bai : le fichier d'alignement par échantillon et son index.

Full_variant_table.txt/vcf : les variants détectés aux formats texte et vcf.

Cosmic_info_table.txt : fichier texte contenant des informations issues de la base de données cosmic.

Exon_coverage_stats_v3.txt : fichier texte contenant la couverture au niveau de l'exon.

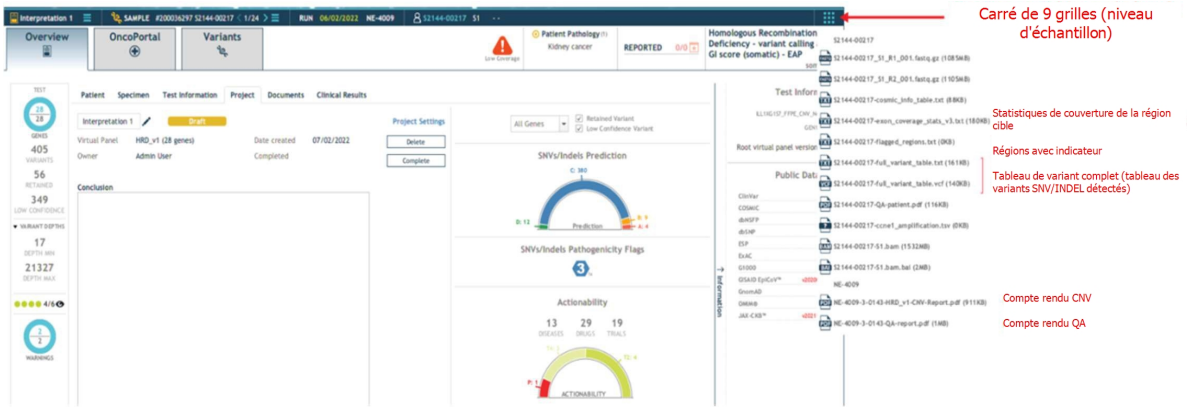
QA-report : compte rendu QA du pipeline au format PDF aux niveaux de l'échantillon et du run.

CNV-Report.pdf : compte rendu des amplifications de gène au format pdf.

CNV-Report.pdf : compte rendu de l'analyse d'intégrité du génome au format pdf.

GI_status_table.txt : fichier texte résumant les résultats de GI.

Figure 12. Liste des fichiers de sortie disponibles pour téléchargement.



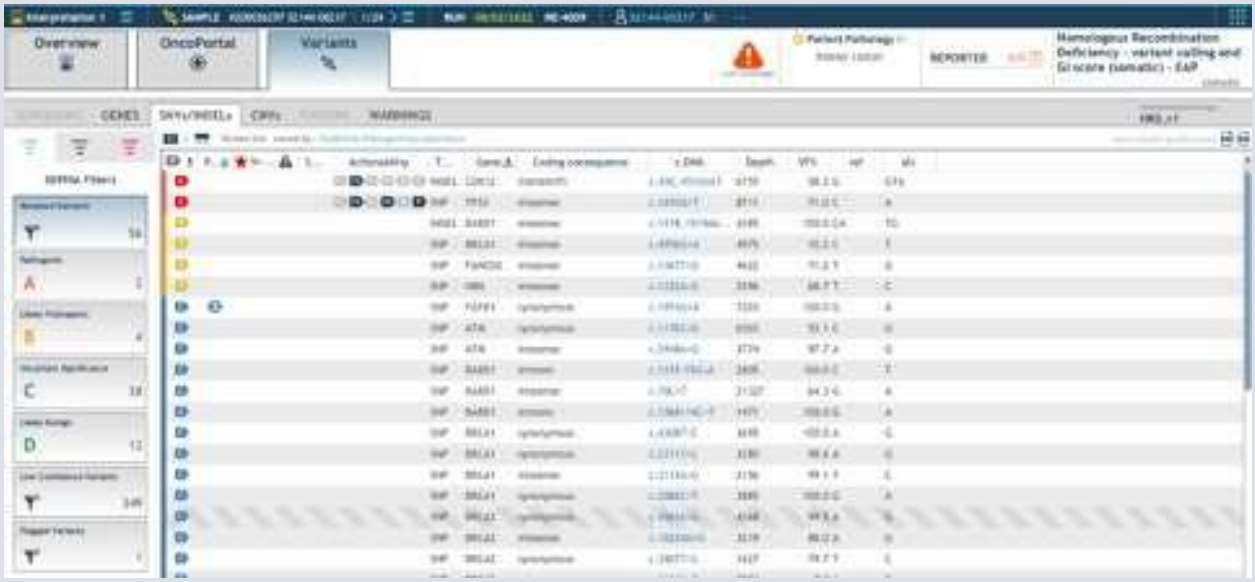
8.3. Visualisation des résultats

Pour plus d'informations sur l'accès aux résultats d'analyse (affichage du variant, compte rendu QA), consultez la section 4 « Analyse des données » du manuel d'utilisation de l'application de bureau SOPHiA DDM. Notez que, étant donné que certains modules sont actifs uniquement pour des pipelines sélectionnés, la section de la plateforme sera grisée ou mise en gras.

Par exemple, l'onglet « SNVs and INDELs » est activé, tandis que l'onglet « Fusions » est inactif dans ce pipeline.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Figure 13. Volet « Results Visualization » sur l'application de bureau SOPHiA DDM.



Indicateurs de qualité : pour plus d'informations sur la manière dont interpréter les codes couleur des points des indicateurs de qualité, consultez la section 3.10 du manuel d'utilisation de l'application de bureau SOPHiA DDM.

8.4. Filtrage de variant

Les raisons pour lesquelles des variants se trouvent dans l'onglet « Niveau de confiance faible » (c'est-à-dire sont considérés comme de faible confiance) figurent dans le tableau 12.

Tableau 12. Raisons pour lesquelles des variants se trouvent dans l'onglet « Niveau de confiance faible ».

TYPE DE FILTRE	DESCRIPTION
off_target	Le variant est placé en dehors de la région cible.
low_variant_ fraction	Variant ayant une fraction de variant < 4 %.
homopolymer_ region	Variant dans la région d'homopolymère >= 10 pb.
low_coverage	Le variant est pris en charge par un nombre insuffisant de lectures de grande qualité (score phred > 20)
low_molecular_ support	Le variant est suspecté d'être un artéfact de désamination
low_quality	Le score de qualité du variant est insuffisant
high_background_ noise	Le variant est suspecté d'être le résultat d'un bruit de séquençage

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

8.5. Annotation de variant

8.5.1. Description du contenu du FVT (tableau de variant complet)

Vous trouverez ci-dessous un exemple du tableau de variant complet avec une description de chaque champ et un exemple lorsque c'est possible. Veuillez noter que les exemples mentionnés dans le tableau en italiques ne correspondent pas au même variant.

Tableau 13. Exemple de tableau de variant complet.

CHAMP	DESCRIPTION	EXEMPLE
id	ID du run de variant, interne au FVT	1
annotation_id	ID du variant dans la base de données d'annotation	60245
gène	Symbole HGNC du gène	BRCA2
overlapKnown	rsid des entrées clinvar pathogènes	rs1555760738
type	type de variant	SNP / INDEL
codingConsequence	conséquence sur la protéine	5'UTR
refGenome	génome de référence	GRCh37/hg19
chromosome	chromosome	13
genome_position	position génomique (de l'algorithme d'appel de variant)	32890572
depth	profondeur de séquençage	12224
var_percent	fraction de variant (profondeur relative de l'allèle alternatif)	49,32 %
exon_rank	identifiant de l'exon	2
c.DNA	ADNc HGVQ	c.-26G>A
protein	Protéine HGVS	
ref	ref dans le génome de référence	G
alt	allèle alternatif	A
refNum	profondeur allèle de référence	6 178
altNum	profondeur allèle alternatif	6 029
refSeq	codon ref	
altSeq	codon alt	
refAA	acide aminé de référence	
altAA	acide aminé alt	
tx_id	ID du transcrit dans la base de données	35315

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Tableau 13. Exemple de tableau de variant complet. (Suite)

CHAMP	DESCRIPTION	EXEMPLE
	d'annotation	
tx_name	symbole du transcrit dans la base de données d'annotation	NM_000059
refSeqId	symbole du transcrit dans RefSeq	NM_000059
tx_version	version du transcrit dans la base de données d'annotation	3
refSeqIdVersion	version du transcrit dans RefSeq	3
gene_boundaries	Exome/qualificateur intergénique	within
exon_id	ancien identifiant de l'exon	2
pos_in_exon	position dans l'exon (spécifique de brin)	14
dist2exon	position dans l'intron (distance à l'exon le plus proche)	0
filter	indique si un filtre de qualité doit être appliqué	.
dbSNP	dbSNP's rsid	rs1799943
g1000	Fréquence de l'allèle	0,2093
esp5400	Fréquence de l'allèle	0,2078
ExAC	Fréquence de l'allèle	0,243
GnomAD	Fréquence de l'allèle	0,2427
LJB_PhyloP	Score PhyloP précalculé pour dbNSFP	
LJB_SIFT	Score SIFT précalculé pour dbNSFP	
LJB_PolyPhen2	Score PolyPhen2 précalculé pour dbNSFP	
LJB_PolyPhen2_ HumDiv	Score PolyPhen2_HumDiv précalculé pour dbNSFP	
LJB_LRT	Score LRT précalculé pour dbNSFP	
LJB_MutationTaster	Score Mutation Taster précalculé pour dbNSFP	
LJB_GERP	Score GERP précalculé pour dbNSFP	
id_cosmic_coding	Variants codants COSMIC ID	COSN20442808
id_cosmic_non_ coding	Variants non codants COSMIC ID	
id_clinvar	Rsid de Clinvar	rs1799943
CLNSIG	Assertion de pathogénicité Clinvar	Benign
CLNREVSTAT	Métadonnées de Clinvar	reviewed_by_expert_panel

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Tableau 13. Exemple de tableau de variant complet. (Suite)

CHAMP	DESCRIPTION	EXEMPLE
gene_strand	brin	+
ref1	ref normalisée (3' alnmt, en direction du brin)	G
alt1	allèle alternatif normalisé (3' alnmt, en direction du brin)	A
first1	genome_position normalisée (3' alnmt, en direction du brin)	32890572
last1	genome_position normalisée (3' alnmt, en direction du brin)	32890572
multiTranscriptId		1
flagged_region_id		
depth_uniq	Nombre de fragments moléculaires uniques dans la position d'un variant en tenant compte des scores Phred de base	400
refNum_uniq	Nombre de fragments moléculaires uniques soutenant l'allèle de référence en tenant compte de la qualité de base (score Phred)	203
altNum_uniq	Nombre de fragments moléculaires uniques soutenant l'allèle alternatif en tenant compte de la qualité de base (score Phred)	197
matchStatus		exact
OMIM	identifiant mim2gene	600185
hg38_chrom	Chromosome en hg38	1
hg38_pos	Position du génome en hg38	46259775
hg38_ref	Allèle de référence en hg38	C
hg38_alt	Allèle alternatif en hg38	T
lift_diagnostic		PICARD
hg38_refGenome	Référence pour hg38	GRCh38/hg38
sgid		00010001c698114b5b53cf60b6cdb5d02a62beba
Hg38_sgid		00010101651f8aaff0d56960c3121277b4d53606
BRCA_pathogenicity	« BRCA_pathogenicity » ; obtenu par agrégation des champs « Pathogenicity_expert » et « Pathogenicity_all » de BRCA Exchange, suivant les règles d'agrégation exposées dans le tableau X	ex:pathogenic

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

9. Évaluation des performances du statut CDS SOPHiA DDM HRD

Les performances du statut CDS SOPHiA DDM HRD ont été évaluées à l'aide des données générées dans le contexte de l'étude de validation clinique (voir la section 8.2 du mode d'emploi) et mesurées en comparant le statut CDS SOPHiA DDM HRD avec le statut HRD de référence établi par un test de comparaison.

Sur les 110 échantillons inclus à l'analyse, 12 avaient un échec pour le statut HRD de référence et ont été exclus de l'analyse. Sur les 98 échantillons restants, 3 avaient un statut CDS SOPHiA DDM HRD « Indéterminé » (taux de rejet : 3,1 %).

Le tableau suivant montre les mesures de concordance calculées sur les 95 échantillons restants.

Mesure	Valeur
Pourcentage de concordance positive (PPA)	95,8 %
Pourcentage de concordance négative (NPA)	93,6 %
Pourcentage de concordance globale (OPA)	94,7 %

Remarque : les 95 échantillons utilisés pour calculer ces mesures comprennent un échantillon avec un statut CDS SOPHiA DDM HRD « Indéterminé » résultant d'un statut BRCA de cas complexe (qui nécessite un examen clinique). Étant donné que le variant de cas complexe était le même que celui signalé par le test de comparaison afin de prendre en charge un statut BRCA positif, cet échantillon a été considéré comme un vrai positif.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

ANNEXE II. PLAQUES D'AMORCE UNIQUE DUAL INDEX PRIMER PLATE

32 amorces compatible avec Illumina® Unique Dual Index Primers V2 dans une plaque à 96 puits (7 µl chacun)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	sgUDI-49	sgUDI-57	sgUDI-65	sgUDI-73					
B	sgUDI-50	sgUDI-58	sgUDI-66	sgUDI-74					
C	sgUDI-51	sgUDI-59	sgUDI-67	sgUDI-75					
D	sgUDI-52	sgUDI-60	sgUDI-68	sgUDI-76					
E	sgUDI-53	sgUDI-61	sgUDI-69	sgUDI-77					
F	sgUDI-54	sgUDI-62	sgUDI-70	sgUDI-78					
G	sgUDI-55	sgUDI-63	sgUDI-71	sgUDI-79					
H	sgUDI-56	sgUDI-64	sgUDI-72	sgUDI-80					

Séquences d'indices pour les amorces compatible avec Illumina® Unique Dual Index Primers

Index	Séquences i5 pour la feuille d'échantillon NextSeq	i7
sgUDI-49	CAGTGAGC	ACCAAGGA
sgUDI-50	CAATCCTG	CAGACCTG
sgUDI-51	AACTAGAC	CGAGCAAC
sgUDI-52	GCCATTCA	TCTTGACT
sgUDI-53	ATTGTCGT	GACAATGG
sgUDI-54	TGGCGTTC	GTTCTACG
sgUDI-55	CAGGACAG	AACGCTGC
sgUDI-56	GTCCTTAT	GGACATCA
sgUDI-57	GGAATGTA	TTGAGCTC
sgUDI-58	AGCTAACC	ACGTTGAG
sgUDI-59	TCAGCAGG	CTTCAGGA
sgUDI-60	GATTGAGG	TGCCAACT
sgUDI-61	ATTCTTCG	AGGTCATG
sgUDI-62	CTCGACTA	TACTAGCA
sgUDI-63	GTGAGGAT	GTAACTGT
sgUDI-64	ACTGCAGC	TGAGTTGA
sgUDI-65	CGATTGCC	CCTTAGAC

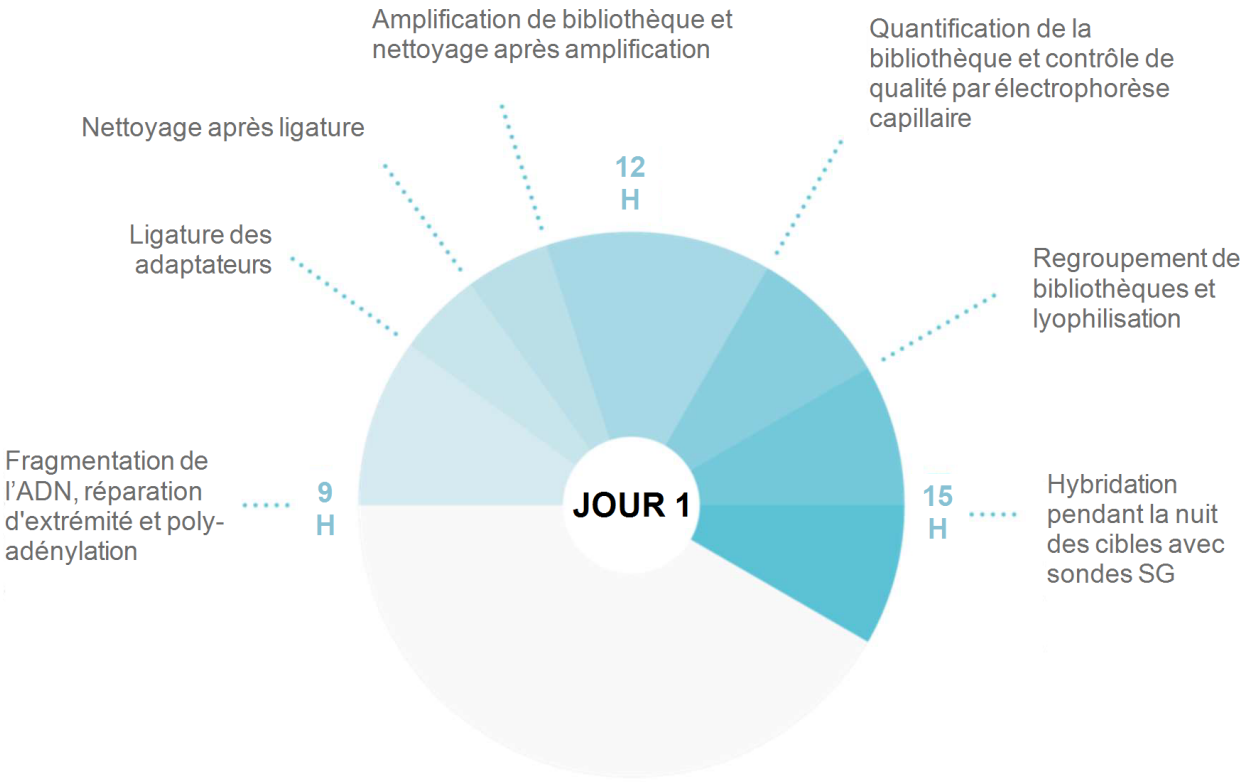
© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Séquences d'indices pour les amorces compatible avec Illumina® Unique Dual Index Primers (Suite)

Index	Séquences i5 pour la feuille d'échantillon NextSeq	i7
sgUDI-66	TAAGATGC	TATCGCCA
sgUDI-67	TTCAGCAC	GCAGAACA
sgUDI-68	GCGTCAAT	AGGAATGC
sgUDI-69	AATGCGGC	CGTGAGGT
sgUDI-70	TGACTACA	CAATTCAG
sgUDI-71	TCGGAGGA	GGTCCTTC
sgUDI-72	CTCGATTG	TTCCGGCA
sgUDI-73	CGGACTTA	ATGCCTGA
sgUDI-74	AACTGTCC	TCCAGGAC
sgUDI-75	TCACTCAA	GCTGTCAC
sgUDI-76	ATGTTACG	CGACGATT
sgUDI-77	ACTGCGTA	TCGCAACG
sgUDI-78	GGTCAGGT	GAGTTGTA
sgUDI-79	TCAGGTGG	CGCTAAGG
sgUDI-80	CACGGTGA	TTGCGTGC

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

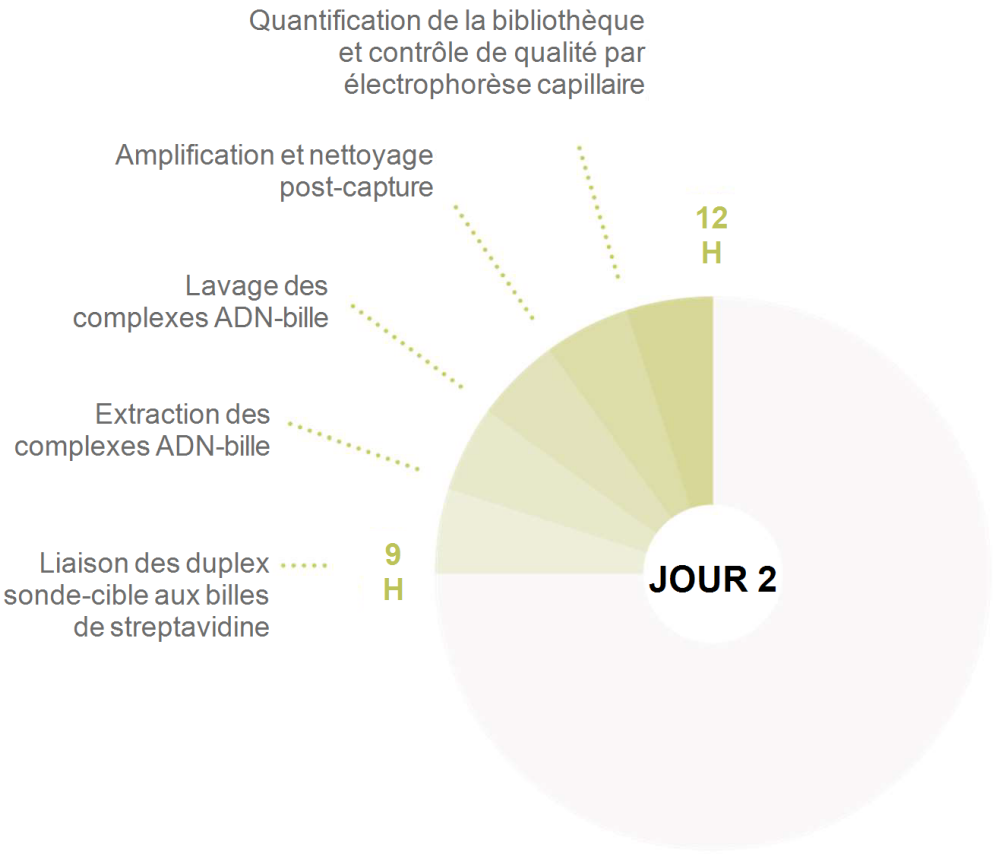
ANNEXE III. LA CONCENTRATION (NG/ML) OBTENUE À L'ÉTAPE 5.2.8 COMME SUIT :WORKFLOW GÉNÉRAL - SOPHIA DDM CAPTURE SOLUTIONS



PRÉPARATION DE BIBLIOTHÈQUE

Avec le kit SOPHiA DDM Dx DNA Library Preparation Kit III

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.



CAPTURE
FLUX DE TRAVAIL SIMPLE
- 1-2 TUBES SEULEMENT À MANIPULER (BIBLIOTHÈQUES REGROUPÉES MULTIPLEX)
- 3 HEURES DE PRÉSENCE SEULEMENT

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

ANNEXE IV. COORDONNÉES GÉNOMIQUES DES « RÉGIONS CIBLES » DE LA SOLUTION HRD

Chromosome	Début	Fin
1	46714052	46714105
1	46714158	46714295
1	46715646	46715816
1	46724332	46724443
1	46725610	46725796
1	46726188	46726308
1	46726373	46726712
1	46726907	46727082
1	46733105	46733306
1	46736305	46736482
1	46738112	46738237
1	46738318	46738499
1	46739001	46739162
1	46739270	46739444
1	46739784	46739913
1	46740184	46740414
1	46743463	46743677
1	46743718	46743979
2	58386874	58386960
2	58387217	58387339
2	58388631	58388798
2	58389975	58390107
2	58390138	58390234
2	58390543	58390677
2	58392833	58393034
2	58425688	58425822
2	58431239	58431386

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
2	58449051	58449202
2	58453837	58453944
2	58456923	58457034
2	58459163	58459272
2	58468327	58468473
2	215593374	215593757
2	215595109	215595257
2	215609765	215609908
2	215610420	215610603
2	215617145	215617304
2	215632180	215632403
2	215633930	215634061
2	215645258	215646258
2	215656995	215657194
2	215661759	215661866
2	215674110	215674318
3	10070337	10070410
3	10074511	10074661
3	10076148	10076225
3	10076374	10076487
3	10076852	10076922
3	10077966	10078028
3	10080958	10081046
3	10081400	10081534
3	10083302	10083399
3	10084238	10084352
3	10084729	10084839
3	10085163	10085281
3	10085508	10085553
3	10088259	10088412
3	10089596	10089740

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
3	10091053	10091194
3	10094066	10094186
3	10101973	10102092
3	10103830	10103900
3	10105471	10105600
3	10106035	10106118
3	10106408	10106564
3	10107073	10107183
3	10107543	10107668
3	10108888	10109006
3	10114550	10114670
3	10114932	10115051
3	10116209	10116362
3	10119760	10119886
3	10122779	10122917
3	10123025	10123153
3	10127491	10127611
3	10128813	10128953
3	10130128	10130231
3	10130507	10130639
3	10131971	10132074
3	10133860	10133941
3	10134964	10135012
3	10135968	10136052
3	10136879	10136963
3	10138005	10138161
3	10140399	10140639
3	10142867	10142951
3	178916528	178916975
3	178921322	178921587
3	178927964	178928136

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
3	178935988	178936132
3	178951872	178952162
4	1803552	1803762
4	1806048	1806257
4	1807847	1807910
4	1808263	1808420
6	152332822	152332880
6	152415525	152415555
6	152419900	152419945
8	26149310	26149367
8	26150737	26150824
8	26151156	26151281
8	26196380	26196528
8	26211958	26212174
8	26217659	26217822
8	26218464	26218692
8	26220174	26220389
8	26221211	26221431
8	26223805	26223947
8	26227624	26227954
8	38272287	38272429
8	38274814	38274944
8	38277041	38277263
8	38287190	38287476
8	90947784	90947865
8	90949228	90949328
8	90955455	90955619
8	90958342	90958548
8	90960026	90960145
8	90965446	90965944
8	90967485	90967808

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
8	90970927	90971107
8	90976612	90976760
8	90982566	90982810
8	90983375	90983543
8	90990422	90990576
8	90992936	90993146
8	90993577	90993776
8	90994924	90995108
8	90996727	90996814
10	89623702	89624310
10	89653777	89653871
10	89685265	89685319
10	89690798	89690851
10	89692765	89693013
10	89711870	89712021
10	89717605	89717781
10	89720646	89720880
10	89725039	89725234
10	123247495	123247637
10	123257999	123258129
10	123279483	123279693
11	94153265	94153372
11	94163051	94163177
11	94168972	94169090
11	94170317	94170426
11	94178950	94179084
11	94180359	94180629
11	94189416	94189529
11	94192548	94192772
11	94194076	94194227
11	94197253	94197430

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
11	94200953	94201084
11	94203611	94203833
11	94204714	94204950
11	94209429	94209594
11	94211875	94212067
11	94212814	94212952
11	94219064	94219275
11	94223973	94224156
11	94225922	94225992
11	108098347	108098428
11	108098498	108098620
11	108099900	108100055
11	108106392	108106566
11	108114675	108114850
11	108115510	108115758
11	108117686	108117859
11	108119655	108119834
11	108121423	108121804
11	108122559	108122763
11	108123539	108123644
11	108124536	108124771
11	108126937	108127072
11	108128203	108128338
11	108129708	108129807
11	108137893	108138074
11	108139132	108139341
11	108141786	108141878
11	108141973	108142138
11	108143254	108143339
11	108143444	108143584
11	108150213	108150340

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
11	108151717	108151900
11	108153432	108153611
11	108154949	108155205
11	108158322	108158447
11	108159699	108159835
11	108160324	108160533
11	108163341	108163525
11	108164035	108164209
11	108165649	108165791
11	108168009	108168114
11	108170436	108170617
11	108172370	108172521
11	108173575	108173761
11	108175397	108175584
11	108178619	108178716
11	108180882	108181047
11	108183133	108183230
11	108186545	108186643
11	108186733	108186845
11	108188095	108188253
11	108190676	108190790
11	108192023	108192152
11	108196032	108196276
11	108196780	108196957
11	108198367	108198490
11	108199743	108199970
11	108200936	108201153
11	108202166	108202289
11	108202601	108202769
11	108203484	108203632
11	108204608	108204700

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
11	108205691	108205841
11	108206567	108206693
11	108213944	108214103
11	108216465	108216640
11	108218001	108218097
11	108224488	108224612
11	108225533	108225606
11	108235804	108235950
11	108236047	108236240
11	125495630	125495932
11	125496618	125496753
11	125497476	125497750
11	125499101	125499216
11	125499260	125499380
11	125503032	125503271
11	125505298	125505453
11	125507318	125507464
11	125513661	125513820
11	125513960	125514188
11	125514381	125514563
11	125523615	125523767
11	125525094	125525240
13	32890572	32890689
13	32893188	32893487
13	32899187	32899346
13	32900212	32900312
13	32900353	32900444
13	32900610	32900775
13	32903554	32903654
13	32905030	32905192
13	32906383	32907549

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
13	32910376	32915358
13	32918669	32918815.
13	32920938	32921058
13	32928972	32929450
13	32930539	32930771
13	32931853	32932091
13	32936634	32936855
13	32937290	32937695
13	32944513	32944719
13	32945067	32945262
13	32950781	32950953
13	32953428	32953677
13	32953861	32954075
13	32954118	32954307
13	32968800	32969095
13	32971009	32971206
13	32972273	32972932
14	68290235	68290369
14	68292155	68292319
14	68301771	68301938
14	68331694	68331881
14	68352560	68352730
14	68353712	68353946
14	68758575	68758722
14	68878115	68878269
14	68934863	68934992
14	68937214	68937275
14	68944339	68944406
14	68963815	68963882
14	69006891	69006961
14	69061176	69061345

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
14	69069354	69069412
14	69077697	69077989
14	69149628	69149686
14	105246415	105246563
16	23614754	23615015
16	23619159	23619358
16	23625299	23625437
16	23632657	23632824
16	23634264	23634476
16	23635304	23635440
16	23637531	23637743
16	23640499	23640621
16	23640935	23641815
16	23646157	23647680
16	23649145	23649298
16	23649365	23649475
16	23652405	23652503
16	89805004	89805121
16	89805285	89805387
16	89805532	89805702
16	89805881	89805966
16	89806397	89806512
16	89807207	89807279
16	89809203	89809351
16	89811362	89811484
16	89812987	89813101
16	89813234	89813303
16	89815062	89815180
16	89816133	89816315
16	89818541	89818635
16	89824980	89825118

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
16	89828352	89828435
16	89831293	89831479
16	89833544	89833650
16	89836240	89836437
16	89836569	89836672
16	89836967	89837047
16	89838081	89838227
16	89839674	89839797
16	89842145	89842228
16	89845204	89845263
16	89845346	89845416
16	89846272	89846370
16	89849262	89849331
16	89849410	89849515
16	89851257	89851377
16	89857806	89857949
16	89858330	89858481
16	89858874	89858960
16	89862309	89862431
16	89865482	89865492
16	89865569	89865645
16	89866008	89866051
16	89869662	89869754
16	89871683	89871805
16	89874697	89874780
16	89877110	89877215
16	89877332	89877484
16	89880923	89881026
16	89882280	89882399
16	89882940	89883028
17	7572901	7573033

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
17	7573894	7574058
17	7576511	7576682
17	7576827	7577180
17	7577449	7577660
17	7578114	7578579
17	7579264	7579615
17	7579664	7579746
17	7579813	7579937
17	33427946	33428080
17	33428194	33428409
17	33430247	33430368
17	33430447	33430588
17	33433379	33433525
17	33433981	33434166
17	33434359	33434491
17	33443852	33444081
17	33445494	33445663
17	33446104	33446216
17	33446525	33446657
17	37618299	37619395
17	37627106	37628041
17	37646784	37647011
17	37648978	37649168
17	37650751	37650972
17	37657477	37657717
17	37665932	37666039
17	37667756	37667908
17	37671958	37672086
17	37673667	37673834
17	37676183	37676365
17	37680901	37681163

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
17	37682091	37682594
17	37686831	37687594
17	41197585	41197592
17	41197669	41197844
17	41199634	41199745
17	41201112	41201236
17	41203054	41203159
17	41209043	41209177
17	41215324	41215415
17	41215865	41215993
17	41219599	41219737
17	41222919	41223280
17	41226322	41226563
17	41228479	41228656
17	41231325	41231441
17	41234395	41234617
17	41242935	41243074
17	41243426	41246902
17	41247837	41247964
17	41249235	41249331
17	41251766	41251922
17	41256113	41256303
17	41256859	41256998
17	41258447	41258575
17	41267717	41267821
17	41276008	41276138
17	56769979	56770174
17	56772266	56772579
17	56774028	56774245
17	56780531	56780715
17	56787194	56787376

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
17	56798081	56798198
17	56801375	56801486
17	56809819	56809930
17	56811453	56811608
17	59760631	59761526
17	59763171	59763551
17	59770765	59770898
17	59793286	59793449
17	59820348	59820520
17	59821767	59821977
17	59853736	59853948
17	59857596	59857787
17	59858175	59858391
17	59861605	59861810
17	59870932	59871115
17	59876435	59876685
17	59878588	59878860
17	59885802	59886143
17	59924436	59924606
17	59926464	59926642
17	59934393	59934617
17	59937131	59937293
17	59938782	59938925
19	30303458	30303490
19	30303591	30303688
19	30303871	30303949
19	30308039	30308194
19	30308308	30308453
19	30311604	30311760
19	30312624	30312729
19	30312898	30313042

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Chromosome	Début	Fin
19	30313142	30313263
19	30313348	30313515
19	30314557	30314689
22	29083859	29083999
22	29085097	29085228
22	29089994	29090130
22	29091089	29091255
22	29091672	29091886
22	29092863	29093000
22	29095800	29095950
22	29099467	29099579
22	29105968	29106072
22	29107871	29108030
22	29115357	29115498
22	29120939	29121137
22	29121205	29121380
22	29126382	29126561
22	29130365	29130734

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

© SOPHiA GENETICS 2022. Tous droits réservés.

Document Approvals

Approved Date: 31 Oct 2022

Approval Task Verdict: Approve	Souvik Ghosh, (sghosh@sophiagenetics.com) Technical Approval 28-Oct-2022 14:23:16 GMT+0000

Task: QA Approval Verdict: Approve	Dawn Little, (DLittle@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 31-Oct-2022 07:33:35 GMT+0000

This copy of the document was retrieved from the system by System on 02 Nov 2022