

INSTRUCTIONS D'UTILISATION

16, 32, 48 ET 96 ECHANTILLONS

SOPHiA DDM™ Dx **Hereditary Cancer Solution**



Réservé à l'usage diagnostique in vitro
(IVD)

Non destiné au dépistage par autotest





INFORMATIONS RESUMEES

Nom du produit	SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution
Type de produit	Solution tout-en-un
Famille de produits	Application diagnostic moléculaire (kit + analyse)
ID de l'algorithme	ILL1XG1G6_CNV
ID du panel génétique	HCS v1.1
Version du produit	1,1
Type d'échantillon	ADN de lignée germinale isolé dans le sang périphérique
Séquenceur	Illumina - MiSeq
Description de la nomenclature mondiale des dispositifs médicaux (GMDN)	Kit de réactifs pour IVD / logiciel pour interprétation d'analyse génomique humaine
ID du document	SG-00675
Version du document	v9.0
Date de révision	Janvier 2025

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



SOPHiA GENETICS SA
ZA La Pièce 12
1180 Rolle
Switzerland



BS0102ILLCGLL01-016
BS0102ILLCGLL01-032
BS0102ILLCGLL01-048
BS0102ILLCGLL01-096



SOPHiA GENETICS SAS
Technopole Izarbel
158 allée Fauste d'Elhuyar
F-64210 Bidart, France





CODES PRODUITS

	CODE PRODUIT COMPLET	BOX 1	BOX 2	KIT DE PRÉPARATION DE BIBLIOTHÈQUE
REF	BS0102ILLCGLL01-016	B1.01.0002.C-16	B2.0001.C-16	700232
	BS0102ILLCGLL01-032	B1.01.0002.C-32	B2.0001.C-32	700232
	BS0102ILLCGLL01-048	B1.01.0002.C-48	B2.0001.C-48	700234
	BS0102ILLCGLL01-096	B1.01.0002.C-96	B2.0001.C-48	700234



AVIS DE NON-RESPONSABILITE

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 ou 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 quelque 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).

MARQUES DE COMMERCE

Illumina® et MiSeq® sont des marques déposées d'Illumina, Inc.

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

Qubit® et Dynabeads® sont des marques déposées de Thermo Fisher Scientific Inc.

KAPA™ est un nom de marque de Roche.

QIAseq® est un nom de marque déposé de Qiagen.

SOPHiA GENETICS™ et SOPHiA DDM™ Dx sont des marques de commerce de SOPHiA GENETICS SA et/ou de ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays. Tous les autres noms, logos et marques de commerce appartiennent à leurs propriétaires respectifs. SAUF PRÉCISION SPÉCIFIQUE, L'UTILISATION PAR SOPHiA GENETICS DE MARQUES DE COMMERCE 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 marques de commerce 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.



HISTORIQUE DES REVISIONS

ID DU DOCUMENT/ VERSION	DATE	Version équivalente en anglais des instructions d'utilisation	DESCRIPTION DE LA MODIFICATION
SG-00675 – 9.0	Janvier 2026	SG-00658 – 11.0	• Changement du système de numérotation des versions, aucune version supplémentaire entre 8.4 et 9.0. • Ajout d'une nouvelle colonne dans le tableau de l'historique des révisions afin de suivre la version anglaise correspondante ; la colonne est vide pour toutes les revisions précédentes. • Section 2 : La Déclaration générale des principes et de la procédure du test intègre la section Résumé et explication du test. • Section 4 : Retrait de la description des composants hors IVD du champ d'application des dispositifs. • Avertissements et précautions : Ajout du numéro CAS et de la concentration pour chaque composant dangereux listé. • Section 6 : Retrait des instructions d'analyse pour SOPHiA DDM Desktop App. • Section 7 : Retrait des limitations hors champ d'application. • Section 7 : Ajout d'une restriction concernant le mélange d'index. • « Application Web SOPHiA DDM™ » devient « SOPHiA DDM™ Dx mode » • Légères reformulations en lien avec la modification ci-dessus • Réduction du volume du contenu des sondes d'hybridation SOPHiA GENETICS de 20 µl à 18 µl (voir section 5.1.1 Contenu du kit - BOX 1) • Retrait de la propriété intellectuelle des fournisseurs tiers dans les sections 5.1.1 Contenu du kit, 5.3.1 Regroupement de bibliothèques et 5.3.2 Hybridation • Mise à jour du nom du composant de préparation de bibliothèque en SOPHiA GENETICS Library Prep Kit I
SG-00675 - 8.4	19 mars 2025		• Annexe 1 : Le tableau « 16 adaptateurs à index double compatibles avec Illumina® pour plaque à 96 puits (7 µl chacune) » a été supprimé de l'Annexe I en raison de l'abandon du format de plaque contenant 16 adaptateurs à index double. • Section 5.1.1 Contenu du kit – BOÎTE 1 : Mise à jour pour refléter le changement ci-dessus.
SG-00675- 8.3	19 mars 2025		• Section 5.1.1. Contenu du kit - BOÎTE 1: Augmentation du volume du tampon d'hybridation 2x de 50 µl à 75 µl ; Augmentation du volume de l'Amplificateur pour tampon d'hybridation de 20 µl à 30 µl.
SG-00675 - 8.2	22 novembre 2024		• Mise à jour de l'adresse EC REP



ID DU DOCUMENT/ VERSION	DATE	Version équivalente en anglais des instructions d'utilisation	DESCRIPTION DE LA MODIFICATION
SG-00675 - 8.1	09/01/23		Correction d'erreurs de mise en forme
SG-00675 - 8.0	5 décembre 2022		Correction de diverses erreurs d'écriture
SG-00675 - 7.0	2 décembre 2022		- Section 5.1.2 et Section 5.3.6 - Correction pour l'ajout d'éléments fournis par l'utilisateur - Correction de diverses erreurs d'écriture
SG-00675 - 6.0	14 septembre 2022		- Ajouts des symboles de marque de SOPHiA DDM et SOPHiA GENETICS - Remplacement du nom du kit de préparation de bibliothèque par SOPHiA GENETICS dans l'ensemble du document - Mise à niveau de la version du document sur le nombre entier suivant, sans décimale
SG-00675- 5.5	19/04/22		Ajout des instructions pour l'application Web SOPHiA DDM™
SG-00157 - 5.4	14/04/22		- Limites et avertissements : Modifié - Versions de produit rectifiées - Mise à jour de l'adresse des bureaux SOPHiA GENETICS - Modifications Wet Lab comme recommandé globalement - Modifications de l'ID du document
ID-60101-15 - 5.3	21/07/21		- Page 2, 30 - Modifications esthétiques. - Page 18 - Modification de l'ordre des étapes. - Page 27 - Volume de pré-mélange pour PCR « 48 échantillons » corrigé.
ID-60101-15 - 5.2	16/06/21		- Page 3 - Nom de marque modifié. - Page 45 - Ajout mineur aux spécifications de fichier. - Page 55, 56 - Erreur dans l'en-tête « Unique » supprimée.
ID-60101-15 - 5.1	28/05/21		- Page 2 - Tableau informations résumées modifiées. - Page 3 - Avis de non-responsabilité modifié. - Page 12, 14, 16, 30 - En-tête de tableau modifié. - Page 17 - Inversion de l'ordre des étapes 1 et 2. - Page 18 - Préparation d'éthanol déplacée vers « PRÉPARATION ». - Page 13, 19, 20, 22, 23, 24, 28, 36, 37, 38, 39, 44 - Changements esthétiques et erreurs typographiques. - Page 21 - Point 1, puce 2 - remplacement de « FX Enhancer » par « FX Reaction pre-mix ». - Page 47 - Ajout de la puce 2.
ID-60101-15 - 5.0	30/03/21		Page de titre, logo de l'entreprise, en-tête, pied de page, dernière page.



ID DU DOCUMENT/ VERSION	DATE	Version équivalente en anglais des instructions d'utilisation	DESCRIPTION DE LA MODIFICATION
			• Réorganisation des thèmes. • Inclusion des instructions pour l'installation de l'application Web de SOPHiA DDM™, le chargement et les conventions pour les noms. • Combinaison du « Mode d'emploi » de quatre tailles de kit pour inclure des nombres d'échantillons différents. Ajout des tableaux et modifications appropriées à cette fin si nécessaire. • Les documents suivants « Mode d'emploi » des kits ont été combinés : - PM_CEIVD_B.2.1.1.19_r3en - PM_CEIVD_B.2.1.1.17_r3en - PM_CEIVD_B.2.1.1.15_r3en - PM_CEIVD_B.2.1.1.26_r2en • Modifications mineures à des fins de clarté dans les sections suivantes : • Section 5.3.1 Regroupement de bibliothèques • Section 5.3.5 Lavage des billes de streptavidine pour retirer l'ADN non lié



TABLE DES MATIERES

1. Utilisation prévue/Finalité.....	10
2. Déclaration générale du ou des principes/de la procédure de test.....	11
3. Composants du produit.....	12
4. Consommables du kit et méthodes.....	13
4.1. Considérations initiales	13
4.1.1. Contenu du kit (16, 32, 48 et 96 échantillons).....	13
4.1.2. Matériel requis (non fourni).....	17
4.2. Préparation de bibliothèque	18
Génomique 5.2.1. Préparation de l'ADN.....	18
4.2.2. Préparation de pré-mélanges et de réactifs	20
4.2.3. Fragmentation enzymatique, réparation d'extrémité et poly-adénylation	22
4.2.4. Ligature.....	23
4.2.5. Nettoyage après ligature.....	24
4.2.6. Sélection de taille double	25
4.2.7. Amplification de bibliothèque.....	26
4.2.8. Nettoyage après amplification	28
4.2.9. Quantification et contrôle qualité individuels de la bibliothèque	29
4.3. Capture	30
5.3.1. Regroupement de bibliothèques	30
4.3.2. Hybridation.....	31
4.3.3. Préparation des billes de streptavidine	33
4.3.4. Liaison de cibles hybridées aux billes	34
4.3.5. Lavage des billes de streptavidine pour retirer l'ADN non lié	34
4.3.6. Amplification post-capture.....	36
4.3.7. Nettoyage de l'amplification post-capture	37
4.3.8. Quantification et contrôle qualité finals de la bibliothèque	39
4.4. Séquençage.....	40
5.4.1. Préparation de bibliothèque pour le séquençage.....	40
5. Procédure d'analyse	41
5.1. Instructions d'installation du SOPHiA DDM™ Dx Mode	41
5.2. Description du workflow d'analyses (pour la génération de résultats de diagnostics in vitro -IVD)	41
6. Limitations, avertissements et précautions	42
7. Évaluation des performances non cliniques.....	45
7.1. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE ANALYTIQUE	45
7.2. MÉTHODES	45
7.3. DONNÉES (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0).....	47
7.4. CONCLUSIONS GÉNÉRALES (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0).....	47
7.5. RÉSULTATS (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0).....	49
7.6. ÉTUDE DE TRANSITION (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1)	49
7.7. CONCLUSION	50



8. Symboles	51
9. Assistance	52
Annexe 1. Plaques pour adaptateurs à index double	53
Annexe 2. Matériel de laboratoire utilisé dans le laboratoire de SOPHiA GENETICS.....	56
Annexe 3. Workflow général – SOPHiA DDM™ Capture Solutions (SOPHiA DDM™ Solutions de capture).....	58
Annexe 4. Liste des régions cibles, problématiques et signalées applicables	60



1. UTILISATION PREVUE/FINALITE

SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS) est un test de diagnostic in vitro permettant d'identifier des variants de la lignée germinale dans 27 gènes les plus courants impliqués dans des prédispositions génétiques à des cancers du sein et des ovaires, ainsi que des cancers intestinaux, dans des échantillons d'ADN de la lignée germinale isolés du sang périphérique (Tableau 1). Le SOPHiA DDM™ Dx HCS est un test de séquençage nouvelle génération (NGS pour Next-Generation Sequencing) réalisé avec l'appareil Illumina MiSeq®. Il permet aux professionnels de santé de fournir une explication moléculaire pour prendre une décision clinique concernant les mutations de la ligne germinale associées aux maladies mentionnées dans le Tableau 1.



2. DECLARATION GENERALE DU OU DES PRINCIPES/DE LA PROCEDURE DE TEST

La fonction validée de l'analyse de SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS) est d'analyser des données NGS brutes générées par un appareil Illumina® MiSeq® avec MiSeq® Reagent Kit v3, sur des échantillons de la lignée germinale avec SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I.

La méthode SOPHiA DDM™ Dx HCS se compose de trois étapes principales. La première étape consiste à qualifier l'échantillon d'ADN pouvant être utilisé pour le test. La seconde étape consiste à préparer manuellement les échantillons pour le séquençage (préparation de la bibliothèque). La préparation de la bibliothèque se compose de sept étapes clés : Fragmentation de l'ADN, ligature des adaptateurs, amplification PCR des bibliothèques individuelles, regroupement de bibliothèques, hybridation des sondes, amplification par PCR lors de la capture et post-capture. La troisième procédure consiste à séquencer l'échantillon préparé en utilisant la chimie SBS (« Sequencing By Synthesis » ou séquençage par synthèse) sur le séquenceur Illumina® MiSeq®.

Pour l'analyse, les résultats doivent être téléchargés sur SOPHiA DDM™ Dx mode et analysés en utilisant l'application SOPHiA DDM™ Dx HCS.

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

Le tableau suivant présente les gènes ciblés par la solution SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS), qui sont fréquemment associés à différents syndromes de cancer héréditaire.

Tableau 1 : Gènes ciblés par SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS)

ABRAXAS1	EPCAM	PMS2
APC	MLH1	PMS2CL
ATM	MRE11A	PTEN
BARD1	MSH2	RAD50
BRCA1	MSH6	RAD51C
BRCA2	MUTYH	RAD51D
BRIP1	NBN	STK11
CDH1	PALB2	TP53
CHEK2	PIK3CA	XRCC2



3. COMPOSANTS DU PRODUIT

SOPHiA DDM™ Dx HCS est composé de deux éléments : le kit NGS et le pipeline de bio-informatique utilisés en combinaison avec un accessoire d'IVD, le SOPHiA DDM™ Dx mode basé sur le cloud.

- Le kit NGS consiste à préparer et à enrichir des bibliothèques d'ADN à partir d'échantillons sanguins adaptés au séquençage sur un séquenceur Illumina® MiSeq®. Le kit NGS permet aux utilisateurs de générer des données de séquençage ciblées. Les différents éléments sont décrits dans les sections suivantes 5. Consommables du kit et méthodes – 5.1. Considérations initiales - 5.1.1 Contenu du kit.
- Le pipeline de bio-informatique (« pipeline HCS ») traite les données NGS brutes via des algorithmes capables d'évaluer l'intégrité génomique.
- SOPHiA DDM™ Dx mode est une application Web front-end disponible en tant que SaaS (Software-as-a-Service) et permettant de générer un rapport téléchargeable des gènes mentionnés dans le Tableau 1 pour les lignées germinales SNV et INDEL. Des limitations s'appliquant, consultez la section 7 - Limitations, avertissements et précautions.



4. CONSOMMABLES DU KIT ET METHODES

4.1. Considérations initiales

Assurez-vous que tous les tubes du kit 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.

4.1.1. Contenu du kit (16, 32, 48 et 96 échantillons)

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

Selon le format du kit, les composants suivants seront fournis :

COMPOSANT	NOMBRE D'ÉLÉMENTS, SELON LE FORMAT DU KIT			
	16 échantillons échantillons	32 échantillons échantillons	48 échantillons échantillons	96 échantillons échantillons
BOX 1	1	1	1	2 (48 échantillons chacun)
Adaptateurs à index double compatibles avec Illumina® (dans une plaque à 96 puits incluse dans la Box 1)	32	32	48	96 (Plaque figurant dans l'une des deux Box 1)
BOX 2	1	1	1	2 (48 échantillons chacun)
SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I	1	2 (16 échantillons chacun)	1	2 (48 échantillons chacun)

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

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- Hereditary Cancer Solution probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x Hybridization Buffer (75 µl)
- Hybridization Buffer Enhancer (30 µl)
- 2x Bead Wash Buffer (1250 µl)
- 10x Stringent Wash Buffer (200 µl)



- 10x Wash Buffer I (160 µl)
- 10x Wash Buffer II (110 µl)
- 10x Wash Buffer III (110 µl)
- Selon le format du kit : 32, 48 ou 96 adaptateurs à index double compatibles avec Illumina® dans une plaque à 96 puits (7 µl chacun) : voir Annexe 1 pour l’affichage et les séquences d’adaptateurs.

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

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (3 x 1,5 ml pour 16 échantillons, 8,7 ml pour 32 échantillons et 11,6 ml pour 48 échantillons, lire la Remarque pour 96 échantillons)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (20 ml)

Remarque : Pour 96 échantillons, deux boîtes 2 de 48 échantillons sont fournies (voir le tableau de la page précédente).



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

SOPHiA GENETICS™ DNA LIBRARY PREP KIT I* (STOCKEZ À UNE TEMPÉRATURE COMPRISE ENTRE -25°C ET -15°C)

- Pour 32 échantillons, deux kits de 16 échantillons sont fournis.
- Pour 96 échantillons, deux kits de 48 échantillons sont fournis.

COMPOSANTS	FORMAT DU KIT	
	Kit de 16 échantillons	Kit de 48 échantillons
HiFi PCR Master Mix 2x (en µl)	500	1 560
Mélange d’amorces pour amplification de bibliothèque Illumina® (en µl)	30	95
FX Mélange enzymatique (en µl)	200	625
10x FX tampons (en µl)	100	315
FX Amplificateur (en µl)	100	315
ADN ligase (en µl)	200	625
5 tampons d’ADN ligase (en µl)	400	1 250

* 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.



AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

PICTOGRAMME		Mentions de dangers et conseils de prudence	Mot indicateur	Composant dangereux
Nom du produit	SGH			
2x 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'inquiétude : 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 tétraméthylammonium Concentration: 49% CAS: 75-57-0
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.	Danger	Formamide Concentration: 100% CAS: 75-12-7



PICTOGRAMME		Mentions de dangers et conseils de prudence	Mot indicateur	Composant dangereux
Nom du produit	SGH			
		• 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'inquiétude : Consulter 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.		
10x tampon 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 éthylènediaminetétraacétique Concentration: 2.5% CAS: 6381-92-6
10x tampon 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 Concentration: 4.9% CAS: 151-21-3



Nom du produit	PICTOGRAMME		Mot indicateur	Composant dangereux
	SGH	Mentions de dangers et conseils de prudence		
5 tampons d'ADN ligase		- H335 Peut causer une irritation respiratoire. - P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux et des oreilles.	Avertissement	Polyéthylène glycol non Concentration: 1-5% CAS: 9002-93-1


 et
 
 comme équipement de protection individuelle.

4.1.2. Matériel requis (non fourni)

CONSOMMABLES FOURNIS PAR L'UTILISATEUR (À ACHETER SÉPARÉMENT)

- KAPA™ Library Amplification kit (Kit Amplification de bibliothèque) KK2620 (Roche Cat. Nbre : 07958978001)
- 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 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
 - Bloc thermostatique ou bain-marie (compatible avec les tubes d'1,5 ml)
 - Matériel et réactifs pour la quantification fluorimétrique
 - Support de séparation magnétique (compatible avec les tubes d'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)
 - Mélangeur à vortex

4.2. Préparation de bibliothèque

Génomique 5.2.1. Préparation de l'ADN

CONSOMMABLES

- ADN génomique (ADNg) double brin haute qualité
- FX Amplificateur
- IDTE
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

IMPORTANT

L'intégrité, la concentration et la pureté de l'ADN sont importantes dans cette étape. La pureté de l'ADN peut être évaluée en utilisant un spectrophotomètre à UV. Les rapports d'absorbance recommandés sont compris entre 1,8 et 2,0 pour un rapport de 260/280 et entre 1,6 et 2,4 pour un rapport de 260/230. Nous recommandons une confirmation de l'intégrité de l'échantillon par électrophorèse capillaire ou une technique équivalente. Pour éviter toute erreur avec l'ADN d'entrée, il est recommandé de procéder à une dilution initiale pour obtenir une concentration comprise entre 50 et 100 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.

PRÉPARATION

Retirez le FX Amplificateur du congélateur à -20 °C et décongelez à température ambiante. Une fois décongelé, mélangez les réactifs en retournant doucement le tube 5 fois et centrifugez brièvement dans une microcentrifugeuse.

Selon le format du kit, le nombre d'échantillons d'ADN à regrouper par réaction de capture va varier conformément au tableau suivant. Veillez à prendre ces informations en compte avant de commencer.



FORMAT DU KIT	Kit de 16 échantillons	Kit de 32 échantillons	Kit de 48 échantillons	Kit de 96 échantillons*
Nombre de bibliothèques individuelles par capture	4	8	12	12

* Pour 96 échantillons, deux kits de 48 échantillons sont fournis et comprennent 8 réactions de capture.

PROCÉDURE

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

NOMBRE DE RÉACTIONS	4	8	12	16	24	32	48
Barrette PCR	4 tubes	4 tubes	4 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes
Nombre de barrettes	1	2	3	2	3	4	6

2. Préparez une dilution pour chaque échantillon d'ADN génomique (ADNg) de haute qualité dans le nombre approprié de barrettes PCR en procédant comme suit :

DILUTION D'ADNg	
ADNg	200 ng
IDTE	Complète jusqu'à 30 µl

- Mélangez brièvement en pipetant doucement 5 fois, puis en centrifugeant brièvement dans une microcentrifugeuse pour recueillir tout le liquide.



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

- En fonction du nombre d'échantillons, procédez comme suit :
 - Dans le cas du traitement de **4 échantillons**, ajoutez 5 µl de FX Amplificateur dans chaque tube de la barrette à 4 tubes contenant 30 µl d'échantillons d'ADNg (soit un total de 35 µl dans chaque tube de la barrette à 4 tubes).
 - Dans le cas du traitement de **8 échantillons ou plus**, procédez de la manière suivante :
 - a. Pour faciliter le pipetage, créez un réservoir de FX Amplificateur en ajoutant les volumes suivants à un nouvel ensemble de barrettes à 4 ou 8 tubes, comme suit :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	12	16	24	32	48
Barrette PCR (1 barrette)	4 tubes	4 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes
FX Amplificateur (en µl)	11,5	17,5	11,5	17,5	24	36



- b. À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 5 µl de FX Amplificateur des tubes précédents aux 30 µl d'échantillons d'ADNg (soit un total de 35 µl dans chaque tube des barrettes à 4 ou 8 tubes).
 - À l'aide d'une pipette multicanaux configurée à 20 µl, mélangez doucement en pipetant 5 fois et en centrifugeant brièvement dans une microcentrifugeuse.
3. Conserver sur de la glace jusqu'à la configuration de la réaction de fragmentation enzymatique.

4.2.2. Préparation de pré-mélanges et de réactifs

COMPOSANTS ET RÉACTIFS

- FX Enzyme Mix (FX mélange enzymatique)
- FX Buffer 10x
- 5 tampons d'ADN ligase
- ADN ligase
- HiFi PCR Master Mix 2x
- Primer Mix Illumina® Library Amp (Mélange d'amorces Illumina® Library Amp)
- Eau exempte de nucléase
- Billes AMPure® XP
- Éthanol

PRÉPARATION

- Retirez les composants du kit SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I du congélateur à -20 °C et laissez décongeler sur de la glace.
- Retirer la Dual Index Adapters Plate (Plaque Dual Index Adapters) du congélateur à -20 °C et la placer au réfrigérateur à 4 °C pour une utilisation ultérieure.
- Retirer les AMPure® XP beads (AMPure® XP billes) du réfrigérateur à 2-8 °C et les laisser atteindre la température ambiante en au moins 30 minutes.
- Préparer de l'éthanol frais à 80 % (volume comme suit, en fonction du nombre de réactions) :

80 % ÉTHANOL							
Nombre de réactions	4	8	12	16	24	32	48
80 % éthanol (en ml)	10	20	30	30	40	50	70

- Lorsque les composants du SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I sont décongelés, mélangez les réactifs en retournant le tube 5-10 fois et centrifugez brièvement dans une microcentrifugeuse.



PRÉ-MÉLANGES

1. Préparer le **pré-mélange réactionnel FX** comme suit :

REACTION FX PRE-MELANGE							
Nombre de réactions	4	8	12	16	24	32	48
10x FX tampons (en µl)	23.6	47.1	75	95	150	190	300
FX Mélange enzymatique (en µl)	47.1	94.2	150	190	300	380	600

- Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois et centrifugez brièvement.
- Conservez sur de la glace.

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

PRE-MELANGE POUR LIGATURE							
Nombre de réactions	4	8	12	16	24	32	48
DNA Ligation Buffer 5x (en µl)	95	190	300	380	600	760	1 200
ADN ligase (en µl)	47.5	95	150	190	300	380	600
Eau exempte de nucléase (en µl)	71,3	142,5	225	285	450	570	900

- Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois et centrifugez brièvement.
- Conservez sur de la glace.

Important : Le tampon pour ligation d'ADN est extrêmement visqueux ; pipetez doucement et veillez à obtenir un pré-mélange pour ligation homogène.

3. Préparez le **pré-mélange pour PCR** comme suit :

PRÉ-MÉLANGE POUR PCR							
Nombre de réactions	4	8	12	16	24	32	48
HiFi PCR Master Mix 2x (en µl)	115	230	345	460	690	920	1 380
Mélange d'amorces pour amplification de bibliothèque Illumina® (en µl)	6,9	13,8	20,7	27,6	41,4	55,2	82,8
Eau exempte de nucléase (en µl)	16,1	32,2	48,3	64,4	96,6	128,2	193,2

- Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois et centrifugez brièvement.
- Conservez sur de la glace.



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

CONSOMMABLES

- ADNg double brin conditionné et dilué dans 35 µl
- Réaction FX Pré-mélange
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

PRÉPARATION

- Programmez le thermocycleur pour une fragmentation FX avec les paramètres suivants :

	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE (MINUTES)
Couvercle	70	-
Étape 1	4	1
Étape 2	32	5
Étape 3	65	30
Maintien	4	∞

Démarrez le programme FX 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.

- En fonction du nombre d'échantillons, procédez comme suit :
 - Dans le cas du traitement de **4 échantillons**, passez à l'étape 2.
 - Dans le cas du traitement de **8 échantillons ou plus**, pour faciliter le pipettage, créez un réservoir contenant un pré-mélange FX Réaction en ajoutant les volumes suivants à un nouvel ensemble de barrettes de 4 ou 8 tubes, comme suit :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	12	16	24	32	48
Barrette PCR (1 barrette)	4 tubes	4 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes
Pré-mélange FX Réaction (en µl)	33	52,5	33	52,5	66	105



2. Combinez les résultats comme suit :

- À l'aide d'une pipette multicanaux, dans le cas du traitement de 8 échantillons ou plus, ajoutez 15 µl de pré-mélange FX Réaction à chacun des 35 µl des échantillons d'ADNg (soit un total de 50 µl dans des barrettes de 4 ou 8 tubes).
- À l'aide d'une pipette configurée à 40 µl (multicanaux dans le cas du traitement de 8 échantillons ou plus), mélangez soigneusement en pipetant 5 fois et en centrifugeant brièvement dans une microcentrifugeuse.

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

Passez directement à la section Ligature.

4.2.4. Ligature

CONSOMMABLES

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

PRÉPARATION

- Sortez les plaques pour adaptateurs à index double de la température de 4 °C (transférés préalablement d'une température de -20 °C à 4 °C) et centrifugez brièvement la plaque pour recueillir tout le liquide. Consultez l'Annexe 1 pour connaître les formats de plaques respectifs.
- Pendant FX Fragmentation, préparez de nouvelles barrettes PCR avec 5 µl d'adaptateurs à double index différents par tube, conformément à votre stratégie d'indexation et de la manière suivante :

NOMBRE DE RÉACTIONS	4	8	12	16	24	32	48
Barrette PCR	4 tubes	4 tubes	4 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes
Nombre de barrettes	1	2	3	2	3	4	6

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

PROCÉDURE

1. En fonction du nombre d'échantillons, procédez comme suit :

- Dans le cas du traitement de **4 échantillons**, passez à l'étape 2.



- Dans le cas du traitement de **8 échantillons ou plus**, pour faciliter le pipettage, créez un réservoir contenant un pré-mélange de ligature dans un nouvel ensemble de barrettes PCR, comme suit :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	12	16	24	32	48
Barrette PCR (1 barrette)	4 tubes	4 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes
Pré-mélange pour ligature (en µl)	100	160	100	160	200	320

2. À l'aide d'une pipette multicanaux, transférez les 50 µl de chaque produit de réaction FX Fragmentation vers les barrettes de 4 ou 8 tubes contenant 5 µl d'adaptateurs à index double.
3. Mélangez soigneusement en pipétant 10 fois et centrifugez brièvement.
4. À l'aide d'une pipette multicanaux, dans le cas du traitement de 8 échantillons ou plus, ajoutez 45 µl du pré-mélange de ligature à chaque produit de réaction FX Fragmentation (55 µl dans chaque tube de la barrette de 4 ou 8 tubes).
5. Mélangez soigneusement en pipétant 10 fois et centrifugez brièvement.
6. Incubez dans le thermocycleur à 20 °C pendant 15 minutes (couvercle ouvert).



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.

Passez à la section Nettoyage suite à une ligature.

4.2.5. 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 %
- Eau exempte de nucléase
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

PROCÉDURE

1. En utilisant une pipette multicanaux, ajoutez 80 µl de billes AMPure XP dans chacun des 100 µl de produits de ligation. Mélangez soigneusement en pipétant 10 fois.
2. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
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. En utilisant une pipette multicanaux, ajoutez 105 µl d'eau sans nucléase aux billes, puis attendez quelques secondes.

Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
11. Placez des 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.
12. En utilisant une pipette multicanaux, transférez soigneusement 100 µl de surnageant dans de nouvelles barrettes de 4 ou 8 tubes étiquetées.

Passez à la section Sélection de taille double.

4.2.6. Sélection de taille double

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 60 µl de billes AMPure XP dans chacun des 100 µl de produits de la réaction de ligature. Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois.
2. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
3. Placez des 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. À l'aide d'une pipette multicanaux, transférez soigneusement 140 µl de surnageant dans de nouvelles barrettes de 4 ou 8 tubes étiquetées et contenant 20 µl de billes AMPure XP. Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois.
5. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
6. Placez les barrettes de 4 ou 8 tubes sur un support magnétique à 96 puits pendant 3 minutes, ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
7. Éliminez avec précaution 150 µl de surnageant à l'aide d'une pipette multicanaux.

Gardez les tubes sur le support magnétique pour les étapes suivantes.

8. 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.
9. Éliminez l'éthanol avec précaution en vous servant d'une pipette multicanaux.
10. Répétez les étapes 8 et 9 une fois.
11. Retirez l'éthanol résiduel en utilisant une pipette multicanaux P10 ou P20.
12. Séchez les billes à l'air libre et à température ambiante pendant 4 minutes. Ne séchez pas trop les billes, cela pourrait diminuer la quantité d'ADN récupérée.

Retirez les tubes du support magnétique.

13. À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 20 µl d'IDTE aux billes. Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois et centrifugez brièvement.

Passez à la section Amplification de bibliothèque.

4.2.7. Amplification de bibliothèque

CONSOMMABLES

- Ligature avec sélection de taille double Produits et billes resuspendues dans 20 µl d'IDTE chacun
- Pré-mélange pour PCR

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	8 cycles
Étape 3 : Hybridation	60	30	
Étape 4 : Extension	72	30	
Étape 5 : Extension finale	72	60	
Maintien	10	∞	

PROCÉDURE

1. En fonction du nombre d'échantillons, procédez comme suit :

- Dans le cas du traitement de **4 échantillons**, passez à l'étape 2.
- Dans le cas du traitement de **8 échantillons ou plus**, procédez de la manière suivante :
 - a. Pour faciliter le pipetage, créez un réservoir de pré-mélange pour PCR en ajoutant les volumes suivants à un nouvel ensemble de barrettes à 4 ou 8 tubes, comme suit :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	12	16	24	32	48
Barrette PCR (1 barrette)	4 tubes	4 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes
Pré-mélange pour PCR (en µl)	65	100	65	100	130	200

2. Combinez les résultats comme suit :

- À l'aide d'une pipette multicanaux, dans le cas du traitement de 8 échantillons ou plus, ajoutez 30 µl de pré-mélange pour PCR aux produits ligature avec sélection de taille double et aux billes (volume total 50 µl = 30 µl + 20 µl).
- Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois et centrifugez brièvement.

3. 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.



4.2.8. Nettoyage après amplification

CONSOMMABLES

- Produits de la réaction de ligation 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 pipetant 10 fois.
2. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
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 20 µl d'eau exempte de nucléase aux billes. Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez pour recueillir tout le liquide.
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 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.



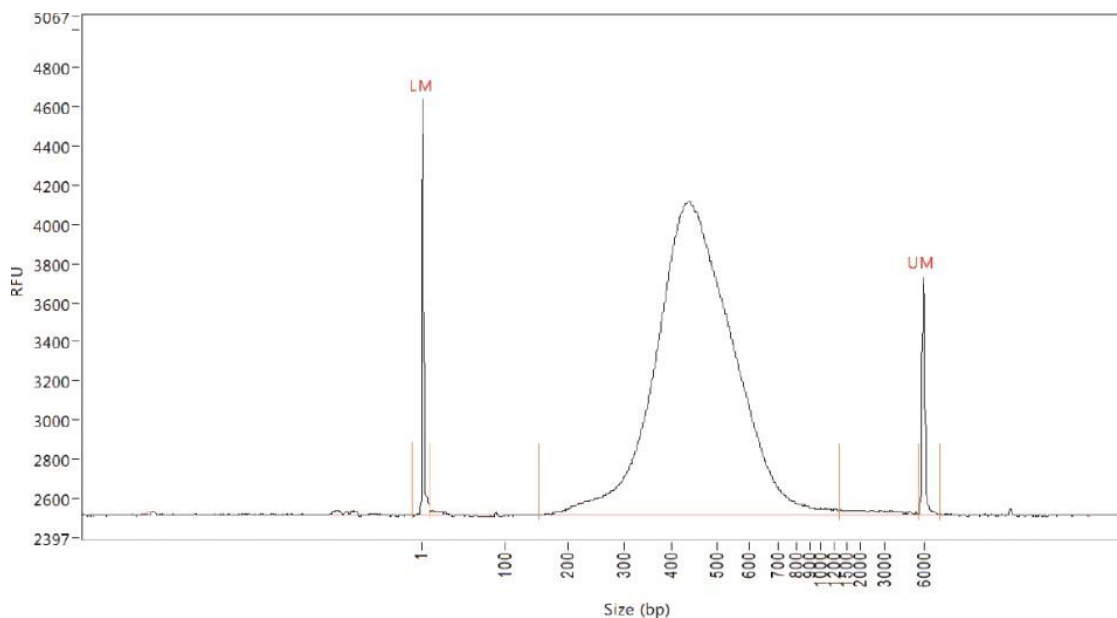
4.2.9. Quantification et contrôle qualité individuels de la bibliothèque

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 300 pb et 700 pb.



Exemple d'une distribution de bibliothèques d'ADN obtenue avec le système d'électrophorèse capillaire Agilent Fragment Analyzer (Agilent analyseur de fragment). UM - Marqueur haut, LM - Marqueur bas



4.3. Capture

5.3.1. Regroupement de bibliothèques

CONSOMMABLES

- Bibliothèques individuelles
- Human Cot DNA
- 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 (Voir le tableau au point 3)	1	2	3	4
Human Cot DNA (en µl)	5	11	16,5	22
Universal Blockers - TS Mix (en µl)	2	4,4	6,6	8,8

2. Dans le cas de deux captures ou plus, pipetez 7 µl du pré-mélange ci-dessus dans des tubes individuels à faible liaison d'ADN.
3. Dans les tubes individuels contenant le pré-mélange ci-dessus, ajoutez un regroupement de bibliothèques individuelles conformément au format du kit :

FORMAT DU KIT	Kit de 16 échantillons	Kit de 32 échantillons	Kit de 48 échantillons	Kit de 96 échantillons
Nombre de bibliothèques individuelles par capture	4	8	12	12
Quantité de chaque bibliothèque par capture	300 ng	200 ng	150 ng	150 ng
Quantité totale de bibliothèques par capture	1 200 ng	1 600 ng	1 800 ng	1 800 ng

4. Mélangez soigneusement en pipétant 10 fois 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.



4.3.2. Hybridation

CONSOMMABLES

- Bibliothèques lyophilisées
- 2x tampons d'hybridation
- Amplificateur pour tampon d'hybridation
- Sondes Hereditary Cancer Solution
- Eau exempte de nucléase
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase
- Tubes de 1,5 ml
- 10x tampon de lavage I
- 10x tampon de lavage II
- 10x tampon de lavage III
- 10x tampon de lavage rigoureux
- 2x tampon de lavage de billes

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
2x tampon 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 3 à 5, afin d'éviter une mauvaise hybridation des sondes.

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 pipetant 5 fois.
6. Incubez dans le thermocycleur à 65 °C pendant 4 heures.
7. Préparez préalablement les 1x 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.



PRÉPARATION D'UN TAMPON DE LAVAGE POUR 1 RÉACTION

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



Important : Préchauffez 1x tampon de lavage rigoureux et aliquotez 110 μl de 1x tampon de lavage I à 65 °C dans un bloc thermostatique ou un 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)	1X VOLUME FINAL (μl)
10x tampon de lavage I	66	594	660
10x tampon de lavage II	44	396	440
10x tampon de lavage III	44	396	440
10x tampon de lavage rigoureux	88	792	880
2x tampon de lavage de billes	550	550	1 100



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

PRÉPARATION D'UN TAMPON DE LAVAGE POUR 3 RÉACTIONS

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



Important : Préchauffez 1x tampon de lavage rigoureux et aliquotez 330 μl de 1x tampon de lavage I à 65 °C dans un bloc thermostatique ou un 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)	1X VOLUME FINAL (µl)
10x tampon de lavage I	132	1 188	1 320
10x tampon de lavage II	88	792	880
10x tampon de lavage III	88	792	880
10x tampon de lavage rigoureux	176	1 584	1 760
2x tampon de lavage de billes	1 100	1 100	2 200



Important : Préchauffez 1x tampon de lavage rigoureux et aliquotez 440 µl de 1x tampon de lavage I à 65 °C dans un bloc thermostatique ou un bain-marie pendant au moins 2 heures. Conservez le tampon de lavage I restant à température ambiante.

4.3.3. Préparation des billes de streptavidine

CONSOMMABLES

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

PROCÉDURE

Exécutez les étapes suivantes juste avant la fin de l'incubation d'hybridation de 4 heures.

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 de 1x 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 de 1x 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.

4.3.4. 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 l'échantillon à 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 remplacez-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 pipetant jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.
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, pipetez doucement le(s) tube(s) 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.

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

CONSOMMABLES

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



PROCÉDURE



Important : 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 thermostatique 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 de 1x 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 d'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.
4. Ajoutez 200 µl de 1x tampon de lavage rigoureux (à 65 °C) dans le tube.

Resuspendez doucement les billes en pipetant.

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 de 1x tampon de lavage I (à température ambiante) dans votre tube. Resuspendez doucement les billes en pipetant.

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 de 1x 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 de 1x 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 de 1x 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.

4.3.6. Amplification post-capture

CONSOMMABLES

- Suspension de billes de streptavidine/d'eau exempte de nucléase (20 µl)
- 2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix
- 10x mélanges d'amorces pour amplification de bibliothèque
- Eau exempte de nucléase

PRÉPARATION

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

	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE (SECONDES)	
Couvercle	99	-	14 cycles
Étape 1 : Dénaturation initiale	98	45	
Étape 2 : Dénaturation	98	15	
Étape 3 : Hybridation	60	30	
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
2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix (en µl)	25	55	82,5	110
10x mélanges d'amorces pour amplification de bibliothèque (en µl)	2,5	5,5	8,25	11
Eau exempte de nucléase (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 pipetant 10 fois 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.

4.3.7. Nettoyage de l'amplification post-capture

CONSOMMABLES

- Produits de la réaction de ligation 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 pipetant 10 fois.
2. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
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 les tubes 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 pipetant 10 fois. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
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.



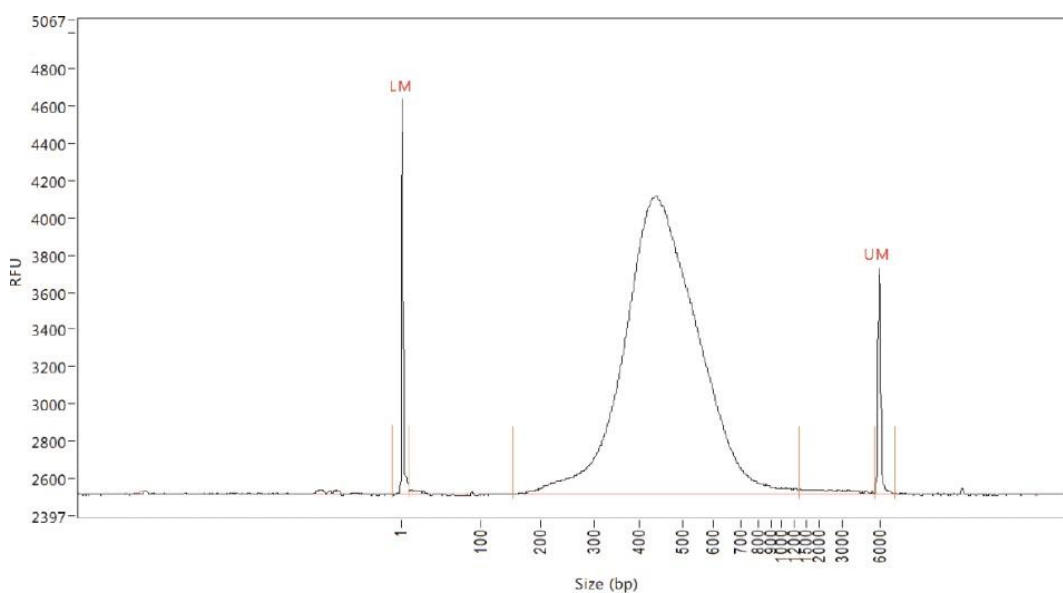
4.3.8. Quantification et contrôle qualité finals de la bibliothèque

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 300 pb et 700 pb.



Exemple de distribution de tailles d'un regroupement de bibliothèques capturé obtenue avec le système d'électrophorèse capillaire Agilent Fragment Analyzer (Agilent analyseur de fragment). UM-Marqueur haut, LM-Marqueur bas



4.4. Séquençage

5.4.1. Préparation de bibliothèque pour le séquençage

CONSOMMABLES

- Illumina MiSeq® Reagent Kit v3
- Bibliothèques capturées finales
- Tampon EBT ou similaire

PROCÉDURE

1. Déterminer la molarité de chaque regroupement 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 :

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

2. Diluer chaque regroupement à 4 nM et mélanger en quantité égale (p. ex., 5 μl de chaque). Bien mélanger et utiliser cette dilution conformément aux recommandations de dénaturation standard Illumina®.
3. Charger une dilution à 10 pM des bibliothèques dénaturées sur MiSeq®.
4. Les lectures minimum recommandées sont 1,0 million de lectures par échantillon, avec une longueur de lecture de 300 pb.

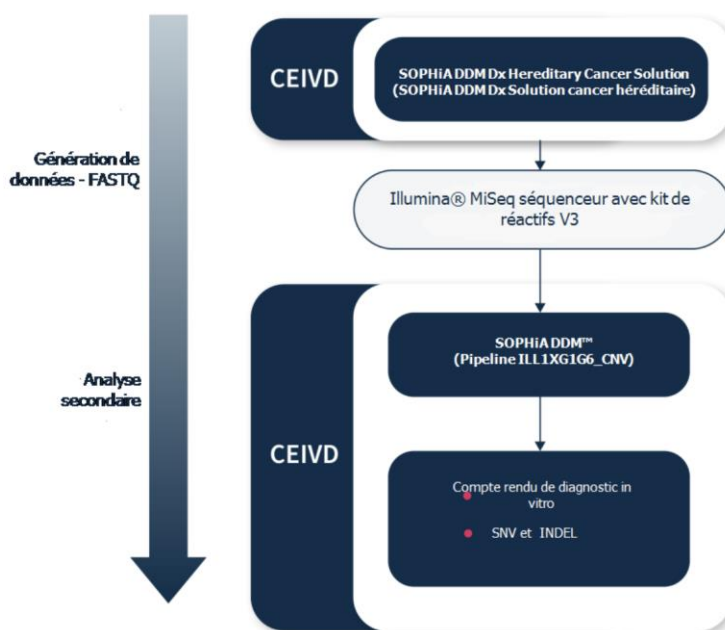


5. PROCEDURE D'ANALYSE

5.1. Instructions d'installation du SOPHiA DDM™ Dx Mode

Aucune installation n'est nécessaire pour utiliser le SOPHiA DDM™ Dx mode. Vous recevrez un e-mail avec des instructions et un lien vers le SOPHiA DDM™ Dx mode. Pour obtenir plus d'informations sur la gestion des comptes, les compatibilités avec les différents navigateurs et d'autres informations importantes, consultez le Manuel d'utilisation du SOPHiA DDM™ Dx mode. Les documents de support sont aussi disponibles directement avec SOPHiA DDM™ Dx mode.

5.2. Description du workflow d'analyses (pour la génération de résultats de diagnostics in vitro -IVD)



Description du workflow d'analyse pour SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution

Pour obtenir un descriptif complet du workflow de téléchargement, consulter le Manuel d'utilisation SOPHiA DDM™ Dx mode.



6. LIMITATIONS, AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

AVERTISSEMENTS GÉNÉRAUX

- Pour des instructions détaillées sur le logiciel, consultez le manuel d'utilisation de SOPHiA DDM™ Dx mode.
- Si un élément quelconque de la manipulation, du protocole, du séquenceur, du multiplexage, etc. est modifié, les analyses ne sont pas couvertes par le mode d'emploi.
- Les données fournies dans le rapport de qualité (téléchargeable depuis la plateforme SOPHiA DDM™ Dx mode) le sont à titre informatif uniquement et ne sont pas destinées à être utilisées pour le diagnostic.
- L'exactitude des résultats d'analyses ne peut pas être garantie. Les laboratoires de séquençage doivent réaliser des contrôles de qualité des échantillons et marquer les échantillons disqualifiés. Les échantillons disqualifiés (p. ex., échantillon de biopsie insuffisant) pourraient aboutir à des résultats compromis. SOPHiA GENETICS n'est pas responsable des résultats et des décisions ensuite prises sur la base de ces résultats.
- 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. Pour des informations spécifiques relatives à la sécurité, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes fournies avec chaque composant du produit.
- Des pièces distinctes pré- et post-PCR doivent être définies afin d'empêcher la contamination des échantillons d'ADN. Utiliser systématiquement des réactifs frais, et de l'ADN correctement extrait et conservé. Pour plus de détails sur la qualité et l'intégrité de l'ADN, voir la section 5 du mode d'emploi. Matériel du kit et méthodes - Section 5.2.1 Préparation de l'ADN génomique.
- Utiliser des pipettes correctement étalonnées et un équipement de laboratoire approprié pour réaliser l'expérience.
- Ne pas mélanger des réactifs portant des numéros de lot différents.
- 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.

LIMITATIONS GÉNÉRALES

- Une mauvaise qualité des données liée à des problèmes rencontrés lors de la préparation ou du séquençage de l'échantillon peut perturber l'analyse des données et donner des résultats faux-positifs et/ou faux-négatifs.
- L'absence de variant dans le compte rendu n'exclut pas la présence d'un variant à un niveau inférieur aux limites de détection du test.
- Le crosstalk des échantillons causé par le mélange d'index peut générer des détections de variants faux positifs. Dans la plupart des cas, elles seront détectées avec une faible fraction de variants (0,1 à 2 %) et seront donc



filtrées en tant que variants de faible confiance. Les facteurs suivants peuvent aggraver le crosstalk des échantillons dû au mélange d'index et entraîner des fractions de variants plus élevées :

- Couverture très élevée dans un ou plusieurs échantillons en raison de problèmes intervenus pendant la quantification/normalisation de l'échantillon ou des amplifications de gène de haut niveau.

SNV / INDEL

- La détection de variants avec ce produit est optimisée pour la détection des SNV et des INDEL courtes (jusqu'à 2/3 de la longueur de lecture). Il est à noter que tout autre type d'altération peut ne pas être détecté par l'algorithme.
 1. Des fusions ou inversions génétiques peuvent ne pas être détectées.
 2. Des délétions ou des insertions avec breakpoint en dehors de la région cible peuvent ne pas être détectées.
 3. Les grandes délétions de plus de 5 000 pb environ peuvent ne pas être cartographiées correctement et ne pas être détectées.
 4. Les grandes insertions correspondant à environ plus des 2/3 de la longueur de lecture peuvent ne pas être détectées en raison d'une longueur insuffisante de l'ancre pour l'identification du site d'insertion.
 5. Les duplications qui ne sont pas totalement couvertes par des lectures complètes (y compris la séquence de référence qui est dupliquée) peuvent ne pas être détectées.
 6. Si une duplication en tandem a une longueur supérieure au tiers de la longueur de lecture, le nombre exact de répétitions en tandem peut ne pas être déterminé.
 7. Les insertions Alu d'une longueur supérieure aux 2/3 de la longueur de lecture peuvent être détectées si elles correspondent à au moins une séquence dans une base de données de séquences Alu connues. Dans le cas contraire, elles peuvent ne pas être détectées.
 8. La quantification des insertions d'une longueur supérieure à la longueur de lecture peut augmenter le risque de surestimation des fractions de variant.
- La détection de variant dans ce produit a été optimisée sur les régions définies comme « régions cibles ». Il est à noter que les régions en dehors de cette définition peuvent donner lieu à des faux-négatifs et/ou à des faux-positifs.
- Pour obtenir des performances stables dans l'analyse des données, nous recommandons une couverture d'au moins 200x. Une couverture minimum de 50x est recommandée pour un appel de variant fiable. Les variants peuvent ne pas être détectés dans des régions présentant une couverture moindre.
- Des variants peuvent ne pas être appelés ou être appelés à tort en raison de limites de conception du kit
- Les variants présents dans les régions pour lesquelles le fragment pertinent de l'ADN n'est pas extrait par les sondes ne peuvent pas être détectés par le produit. La capture des variants peut être limitée par :
 1. des INDEL affectant l'hybridation des sondes. Ceci peut entraîner l'échec de la détection ou une estimation incorrecte de la fraction de variant.



2. La présence d'une ou plusieurs mutations supplémentaires dans la région cible de la sonde sur le même allèle.

- Des SNV ou des INDELS dans des homopolymères de longueur dix ou plus ne peuvent pas être appelés en toute confiance car leur détection est perturbée par un bruit de fond élevé.
- 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.
- Les régions problématiques de l'Annexe 4 sont certaines régions introniques dans la cible qui pourraient causer une incertitude dans l'appel de variant. Cela peut être lié à la technologie de séquençage. Un variant dans cette région sera désigné comme « Bas » dans le tableau de confiance dans SOPHiA DDM™.
- Les régions avec indicateur dans l'Annexe 4 présentent des caractéristiques rendant non fiable la détection de variant. Elles sont signalées avec des avertissements sur l'interface de SOPHiA DDM™, et les variants détectés dans ces régions sont rapportés avec un indicateur.
- 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.
- Les variants peuvent être représentés sous des formes différentes dans une région donnée. Si un variant est représenté de deux façons différentes dans les lectures alignées ou partiellement non aligné dans certaines lectures, la fraction de variant peut être sous-estimée ou le variant peut ne pas être détecté en raison d'une faible fraction de variant.
- En cas d'insertions/duplications multiples présentes dans la même région, il est possible qu'elles ne soient pas toutes rapportées correctement. En particulier, lorsqu'une petite insertion est entièrement contenue dans une insertion plus grande, il peut ne pas y avoir de lectures identifiant de manière unique l'insertion plus petite et elle peut ne pas être détectée, seule l'insertion plus grande étant rapportée.
- En cas d'insertions/duplications multiples présentes dans la même région, il est possible qu'elles ne soient pas toutes quantifiées correctement. En particulier, lorsqu'une petite insertion est entièrement contenue dans une insertion plus grande, il peut ne pas y avoir de lectures identifiant de manière unique l'insertion plus petite, la fraction de variant rapportée pour l'insertion plus petite peut être sous-estimée et la fraction de variant pour l'insertion plus grande peut être surestimée.
- La présence d'un mosaïcisme génétique chez un patient peut mener à une interprétation inexacte des résultats.



7. ÉVALUATION DES PERFORMANCES NON CLINIQUES

7.1. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE ANALYTIQUE

L'étude suivante se divise en deux parties. La première partie décrit l'étude d'évaluation des performances réalisée pour SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 et KAPA™ Library Amplification Kit. La deuxième partie contient l'étude de non-régression entre SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 et v1.1 à l'aide du KAPA™ Library Amplification Kit ou du SOPHiA GENETICS DNA Library Prep I Kit. Cette dernière partie contient des informations concernant le gène APC inclus dans SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1.

7.2. MÉTHODES

Généralités

Dans cette étude, les performances du kit SOPHiA DDM™ Dx HCS et du pipeline ILL1XG1G6_CNV de SOPHiA DDM™ Dx ont été évaluées avec les données générées sur un appareil Illumina MiSeq® en utilisant le test SOPHiA DDM™ Dx HCS. Les filtres par défaut liés à une faible couverture (limite de 50X), à une fraction de variants (limite de 20 % pour les SNV et limite de 15 % pour les INDEL) et à la longueur de la région homopolymère (limite de 10 pb) ont été appliqués. Pour chaque échantillon, les variants détectés par le pipeline ont été comparés aux variants confirmés de référence fournis par chaque centre de séquençage. Tout variant détecté en dehors des régions cibles n'a pas été pris en compte.

Étant donné que le panel SOPHiA DDM™ Dx HCS porte sur la détection de variants de la lignée germinale, il était inutile d'évaluer la limite de détection (LOD), car les fractions des variants attendues sont nettement supérieures aux niveaux de bruit de séquençage possibles.

Définitions de la sensibilité, de la spécificité, de l'exactitude, de la précision, de la répétabilité et de la reproductibilité

Chaque position ayant été analysée par la méthode de référence et la méthode combinant l'utilisation de l'appareil MiSeq® et du panel de SOPHiA DDM™ Dx HCS a été prise en compte pour calculer les paramètres de performance analytique, tels que la sensibilité, la spécificité, l'exactitude, la précision et la cohérence.

En ce qui concerne toutes les positions couvertes par le panel de SOPHiA DDM™ Dx HCS et pour lesquelles les informations de référence étaient disponibles, les nombres des catégories suivantes ont été déterminés : Des vrais positifs (True Positives (TP)) et des vrais négatifs (True Negatives (TN)) sont présents dans les deux ensembles, des faux positifs (False Positives (FP)) sont uniquement présents dans les variants détectés par SOPHiA DDM™ Dx et des faux négatifs (False Negatives (FN)) sont uniquement présents dans le tableau des variants confirmés. Toutes les positions analysées (TP+FP+TN+FN) ont été déterminées en soustrayant des positions indéterminées de la région cible :

Région cible du panel SOPHiA DDM™ Dx HCS : CDS $\pm$ 25 pb (voir Annexe 4 pour obtenir la liste complète des régions cibles, ainsi que des régions problématiques et signalées applicables).

Régions indéfinies : Régions présentant une couverture < 50x

Régions problématiques identifiées ou régions présentant des pseudogènes, comme spécifié dans notre documentation du pipeline SOPHiA DDM™ Dx HCS (Annexe 4).



Par ailleurs, les INDEL situées dans les régions homopolymères supérieures à 9 pb étaient exclues des calculs.

Tous les paramètres ont été calculés à l'aide des formules suivantes :

1. La **sensibilité** a été déterminée sous la forme d'un pourcentage des variants confirmés détectés :

$$\text{Sensibilité} = \frac{TP}{TP+FN} \times 100$$

2. La **spécificité** a été déterminée sous la forme d'un pourcentage des positions négatives correctement identifiées comme étant négatives :

$$\text{Spécificité} = \frac{TN}{TN+FP} \times 100$$

(avec TN= toutes les positions analysées-TP-FP-FN)

3. L'**exactitude** a été déterminée sous la forme d'un pourcentage des appels corrects (positifs et négatifs) :

$$\text{Exactitude} = \frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN} \times 100$$

4. La **précision** a été déterminée sous la forme d'un pourcentage des appels positifs corrects sur l'ensemble des appels positifs :

$$\text{Précision} = \frac{TP}{TP+FP} \times 100$$

5. La **répétabilité d'un séquençage** a été déterminée, pour chaque paire des réplicats A et B intra-run, comme le pourcentage des bases bien définies (SP) dans les deux échantillons, parmi les bases bien définies dans au moins un échantillon. Les bases sont considérées comme étant bien définies si elles sont suffisamment couvertes et qu'elles ne contiennent aucun appel de variant de faible confiance.

$$\text{Répétabilité de séquençage} = \frac{\sum_{ie} [SP_A \cap SP_B]^1}{\sum_{ie} [SP_A \cup SP_B]^1}$$

6. **Répétabilité d'un variant** : toutes les positions bien définies dans les deux réplicats sont prises en compte pour calculer la fraction des bases qui sont identiques dans les deux réplicats. Les réplicats A et B intra-run spécifiés, avec des positions SPA et SPB bien définies, SPA[i] et SPB[i] sont les états des variants à la position i. dx étant l'opérateur qui renvoie 1 lorsque x=0 et 0 lorsque x'0, la définition de la répétabilité d'un variant est donc la suivante :

$$\text{Répétabilité de variant} = \frac{\sum_{ie} [SP_A \cap SP_B]^{\delta_{SPA[i]-SPB[i]}}}{\sum_{ie} [SP_A \cap SP_B]^1}$$

7. La **répétabilité** a été définie comme le produit des deux mesures ci-dessus :

$$\text{Répétabilité} = \text{Répétabilité de variant} \times \text{Répétabilité de séquençage} \times 100$$



8. **La reproductibilité** a été définie de façon équivalente à la répétabilité (voir les formules (5)-(7)) pour les réplicats A et B inter-run.

Les vrais positifs (True Positives (TP)), les faux positifs (False Positives (FP)), les vrais négatifs (True Negatives (TN)) et les faux négatifs (False Negatives (FN)) ont été calculés en additionnant tous les échantillons de chaque run. La sensibilité, la spécificité, l'exactitude et la précision ont été calculées en fonction de ces totaux, conformément aux formules mentionnées ci-dessus. La spécificité, l'exactitude et la précision ont uniquement été calculées en utilisant des échantillons pleinement caractérisés en raison du manque de positions vraies négatives (True Negative (TN)) dans les échantillons partiellement caractérisés. La répétabilité et la reproductibilité ont été calculées en utilisant toutes les positions de l'ensemble des échantillons et runs pris en compte.

Pour déterminer les intervalles de confiance dans le cas d'une sensibilité de 100 % ou d'autres mesures, les méthodes décrites par Mattocks et coll. (2010) ont été utilisées (Mattocks CJ et coll., EuroGentest Validation Group, 2010). Si les critères mesurés étaient inférieurs à 100 %, la méthode exacte (Clopper, et coll. 1934) a alors été utilisée afin d'obtenir l'intervalle de confiance de la probabilité binomiale pour la sensibilité, la spécificité, l'exactitude et la précision (Clopper C et coll., Biometrika, 1934). Pour refléter la véritable diversité des variants, seuls des vrais positifs (True Positives (TP)), des faux positifs (False Positives (FP)), des faux négatifs (False Negatives (FN)) et des vrais négatifs (True Negatives (TN)) uniques ont été utilisés pour calculer l'intervalle de confiance.

7.3. DONNÉES (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

Les échantillons disponibles ont été divisés en deux catégories en fonction de la caractérisation de haute confiance disponible pour l'ensemble des analyses comparatives. Tout d'abord, les échantillons partiellement caractérisés, dans lesquels des variants de haute confiance connus ont été identifiés, ont été traités par SOPHiA GENETICS (Site A) ou des partenaires externes (Sites B à G). Ces résultats contiennent un large éventail de cas cliniques représentatifs et permettent d'estimer la sensibilité de l'appel de variant. Des réplicats ont également été inclus pour estimer la répétabilité et la reproductibilité.

La deuxième catégorie d'échantillons se compose d'échantillons de référence et cliniques dans lesquels la majorité des régions cibles SOPHiA DDM™ Dx HCS ont été analysées à l'aide d'un pipeline de diagnostics marqué CE-IVD, SOPHiA DDM™ Dx—BRCA—MASTR Dx—GL—MiSeq ou au moins de deux expériences NGS distinctes, dans lesquelles seules des positions consensuelles sont prises en compte.

7.4. CONCLUSIONS GÉNÉRALES (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

Le tableau suivant récapitule de façon exhaustive les variants détectés et les compare à la liste des variants confirmés (Vrais positifs (True Positives (TP))/Faux négatifs (False Negatives (FN))) pour chaque run contenant des échantillons partiellement caractérisés.

Tableau 2. Récapitulatifs des différents variants obtenus à chaque run d'échantillons partiellement caractérisés

Run	Nombre d'échantillons	TP	FN
SiteA_01	22	343	0
SiteA_02	10	11	0
SiteA_03	11	124	0



Run	Nombre d'échantillons	TP	FN
SiteA_04	5	5	0
SiteB_01	12	27	0
SiteB_02	8	9	0
SiteC_01	12	115	0
SiteC_02	12	72	0
SiteD	13	28	0
SiteE	9	57	0
SiteF	18	286	0
SiteG	27	180	0
Total	159	1 257	0

Le tableau 3 suivant récapitule de façon exhaustive les variants détectés et les compare à la liste des variants confirmés (Vrais positifs (True Positives (TP))/Faux négatifs (False Negatives (FN))/Faux positifs (False Positives (FP))) et les positions de base exemptes de variants (Vrais négatifs (True Negatives (TN))) pour chaque run d'échantillons entièrement caractérisés.

Tableau 3. Récapitulatifs des différents variants obtenus à chaque run d'échantillons entièrement caractérisés

Run	Nombre d'échantillons	TP	FN	FP	TN
Run A	24	665	0	0	1515530
Run B	24	329	0	2	583462
Run C	11	439	0	0	980668
Total	59	1 433	0	2	3079660

Le tableau ci-dessous affiche les positions de base des vrais négatifs (True Negatives (TN)) uniques et les différents variants détectés dans cette étude d'évaluation des performances. Les positions de base dans les régions analysées totalisaient 90 754 bases. Trois cent soixante-treize (373) variants uniques ont été détectés dans l'étude. Les vrais négatifs (True Negatives (TN)) ont été fusionnés dans tous les échantillons dans lesquels les données de référence de haute confiance étaient disponibles et couvraient un total de 90 623 positions.

Tableau 4. Récapitulatifs des différents variants obtenus dans l'ensemble des runs

TP	373
FP	2
FN	0
TN	90623



7.5. RÉSULTATS (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

L'association de l'appareil Illumina MiSeq®, du test SOPHiA DDM™ Dx HCS et de SOPHiA DDM™ entraîne une performance observée de 100 % de sensibilité, 99,99 % de spécificité, 99,99 % d'exactitude, 99,86 % de précision, 99,983 % de répétabilité et 99,93 % de reproductibilité.

Tableau 5. Résumé des performances

N°	Mesure des performances	Moyenne	5e percentile
A	Taux dans la cible	79,39 %	[59,23 %]
B	Homogénéité	99,72 %	[98,24 %]

N°	Mesure des performances	Observé	[limite inférieure IC 95 %]*
1	Sensibilité	100 %	[99,20 %]
2	Spécificité	99,99 %	[99,99 %]
3	Exactitude	99,99 %	[99,99 %]
4	Précision	99,86 %	[96,42 %]
5	Répétabilité	99,98 %	[99,98 %]
6	Reproductibilité	99,93 %	[99,92 %]

*Les IC 95 % ont été calculés sur les variants uniques dans l'étude d'évaluation des performances afin de refléter la diversité réelle des variants.

**Les IC 95 % ont été calculés sur toutes les positions pour tous les échantillons. La répétabilité et la reproductibilité sont basées sur des répliques.

7.6. ÉTUDE DE TRANSITION (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1)

SOPHiA GENETICS HCS version 1.0 a déjà fait l'objet de tests sur un large éventail de variantes confirmées et utilisé des échantillons bien caractérisés. Nous avons traité ces mêmes échantillons en utilisant différents kits (SOPHiA GENETICS HCS v1.0 et SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1) et des réactifs pour préparation de bibliothèque du KAPA™ Library Preparation Kit (KAPA™) ou Qiaseq® FX DNA Library Kit (Qiagen®) pour établir que :

- Les performances obtenues avec le kit SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 et la préparation de bibliothèque KAPA™ sont identiques à celles du kit SOPHiA GENETICS HCS v1.0 et de la préparation de bibliothèque KAPA™.
- Les performances obtenues avec le kit SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 et la préparation de bibliothèque Qiagen sont également identiques à celles du kit SOPHiA GENETICS HCS v1.0 et de la préparation de bibliothèque KAPA™.



- Les performances analytiques dans les nouvelles régions ciblées par SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 (APC CDS+-25 pb) sont élevées.

Tableau 6 : Comparatif récapitulant les performances de chaque kit

N°	Mesure des performances	Observé	[limite inférieure IC 95 %]**
1	Comparaison de la reproductibilité de KAPA™ v1.1 à KAPA™ v1.0 (3 runs sur 59 échantillons)	99,99 %	[99,99 %]
2	Comparaison de la reproductibilité de Qiagen® v1.1 à KAPA™ v1.0 (3 runs sur 23 échantillons)	99,99 %	[99,99 %]
3	Reproductibilité de KAPA™ (2 runs sur 24 échantillons)	99,95 %	[99,95 %]
4	Reproductibilité de Qiagen® (2 runs sur 23 échantillons)	99,99 %	[99,99 %]
5	Reproductibilité de KAPA™-Qiagen® (2 runs sur 23 échantillons)	99,99 %	[99,99 %]

**Les IC 95 % ont été calculés sur toutes les positions pour tous les échantillons. La reproductibilité se base sur des répliques.

7.7. CONCLUSION

D'après les données analysées en interne, le kit SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 a permis d'obtenir des performances similaires au kit SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 précédent, en termes de taux cibles, de régions couvertes, d'uniformité et de détection de variants, à la fois avec les kits de préparation de bibliothèque KAPA™ et Qiagen®. Pour les nouvelles régions ciblant le gène APC, l'association de l'appareil Illumina MiSeq®, du test SOPHiA DDM™ Dx HCS et de SOPHiA DDM™ entraîne une performance observée de 100 % de sensibilité, de 100 % de spécificité, de 100 % d'exactitude et de 100 % de précision. La reproductibilité globale utilisant les kits de préparation de bibliothèque KAPA™ ou Qiagen® était supérieure à 99,9 %.



8. 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
	Dispositif médical pour diagnostic in vitro
	Contient suffisamment de réactifs pour <n> tests
	Importateur
	Date de fabrication
	Consultez les avertissements et précautions à la « Section 5. Matériel du kit et méthodes »
	Consultez les avertissements et précautions à la « Section 5. Matériel du kit et méthodes »



9. ASSISTANCE

En cas de difficulté lors de l'utilisation de SOPHiA DDM™ Dx mode, consultez la section Dépannage du Manuel d'utilisation de SOPHiA DDM™ Dx mode sur le SOPHiA DDM™ Dx mode 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™ Dx mode.



ANNEXE 1. PLAQUES POUR ADAPTATEURS A INDEX DOUBLE

32 adaptateurs à index double compatibles avec Illumina® pour plaque à 96 puits (7 µl chacune)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	701-501	701-502	701-503	701-504					
B	702-501	702-502	702-503	702-504					
C	703-501	703-502	703-503	703-504					
D	704-501	704-502	704-503	704-504					
E	705-501	705-502	705-503	705-504					
F	706-501	706-502	706-503	706-504					
G	707-501	707-502	707-503	707-504					
H	708-501	708-502	708-503	708-504					



48 adaptateurs à index double compatibles avec Illumina® pour plaque à 96 puits (7 µl chacune)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	701-501	703-502	705-503	707-501	709-502	711-503			
B	702-501	704-502	706-503	708-501	710-502	712-503			
C	703-501	705-502	701-504	709-501	711-502	707-504			
D	704-501	706-502	702-504	710-501	712-502	708-504			
E	705-501	701-503	703-504	711-501	707-503	709-504			
F	706-501	702-503	704-504	712-501	708-503	710-504			
G	701-502	703-503	705-504	707-502	709-503	711-504			
H	702-502	704-503	706-504	708-502	710-503	712-504			

96 adaptateurs à index double compatibles avec Illumina® pour plaque à 96 puits (7 µl chacune)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	701-501	702-501	703-501	704-501	705-501	706-501	707-501	708-501	709-501	710-501	711-501	712-501
B	701-502	702-502	703-502	704-502	705-502	706-502	707-502	708-502	709-502	710-502	711-502	712-502
C	701-503	702-503	703-503	704-503	705-503	706-503	707-503	708-503	709-503	710-503	711-503	712-503
D	701-504	702-504	703-504	704-504	705-504	706-504	707-504	708-504	709-504	710-504	711-504	712-504
E	701-505	702-505	703-505	704-505	705-505	706-505	707-505	708-505	709-505	710-505	711-505	712-505
F	701-506	702-506	703-506	704-506	705-506	706-506	707-506	708-506	709-506	710-506	711-506	712-506
G	701-507	702-507	703-507	704-507	705-507	706-507	707-507	708-507	709-507	710-507	711-507	712-507
H	701-508	702-508	703-508	704-508	705-508	706-508	707-508	708-508	709-508	710-508	711-508	712-508



i5	Séquences i5 pour la feuille d'échantillon
D501	TATAGCCT
D502	ATAGAGGC
D503	CCTATCCT
D504	GGCTCTGA
D505	AGGCGAAG
D506	TAATCTTA
D507	CAGGACGT
D508	GTACTGAC

i7	Séquences i7 pour la feuille d'échantillon
D701	ATTACTCG
D702	TCCGGAGA
D703	CGCTCATT
D704	GAGATTCC
D705	ATTCAGAA
D706	GAATTCGT
D707	CTGAAGCT
D708	TAATGCGC
D709	CGGCTATG
D710	TCCGCGAA
D711	TCTCGCGC
D712	AGCGATAG



ANNEXE 2. MATERIEL DE LABORATOIRE UTILISE DANS LE LABORATOIRE DE SOPHIA GENETICS

CONSOMMABLES FOURNIS PAR L'UTILISATEUR	FOURNISSEUR	NOM DU PRODUIT	RÉFÉRENCE CATALOGUE
Barrettes de 8 tubes (0,2 ml) exempts de RNase/DNase	Thermo Fisher Scientific	EasyStrip Snap Tubes (Tubes EasyStrip Snap)	AB-2000
Tubes à faible liaison d'ADN (1,5 ml)	Axygen	MaxyClear Microcentrifuges Tubes (Tubes microcentrifuges MaxyClear)	MCT-175-C
Tubes (1,5 ml)	Eppendorf	Eppendorf Tubes (Tubes Eppendorf)	3810X
Tubes coniques (15 ml et 50 ml)	Falcon	Tubes à centrifuger coniques de 15 ml et 50 ml	352096 et 352070
Pointes à filtre	Starlab	TipOne RPT	S1180-3710, S1183-1740, S1180-8710, S1180-9710, S1182-1730
Éthanol (grade biologie moléculaire)	Merck	Éthanol absolu	1.00983.1000

ZONE PRÉ-PCR	FOURNISSEUR	NOM DU PRODUIT	RÉFÉRENCE CATALOGUE
Mélangeur à vortex	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifugeuse de table (compatible avec des barrettes de 8 tubes)	Starlab	Mini Centrifuge (Mini centrifugeuse)	N2631-0007
Support de séparation magnétique à 96 puits	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Support de séparation magnétique à 96 puits	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet	12331D
Pipettes multicanaux (P10 ; P100 ; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108-1100, S7108-3300
Thermocycleur avec couvercle chauffant à température programmable	Biometra	TAdvanced 96	
Matériel et réactif pour la quantification fluorimétrique	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer et Qubit dsDNA HS Assay kit	Q33216 et Q32854

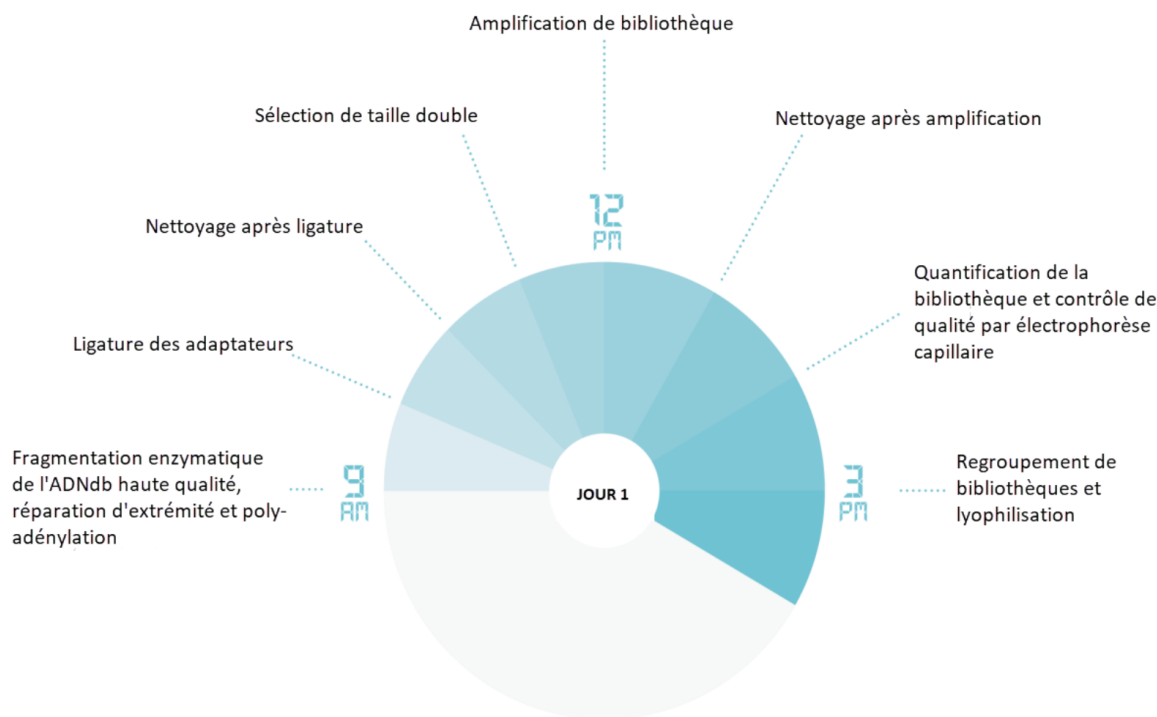


ZONE PRÉ-PCR	FOURNISSEUR	NOM DU PRODUIT	RÉFÉRENCE CATALOGUE
Pipettes monocanal (P10 ; P100 ; P200 ; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100-1100, S7100-2200, S7100-1000

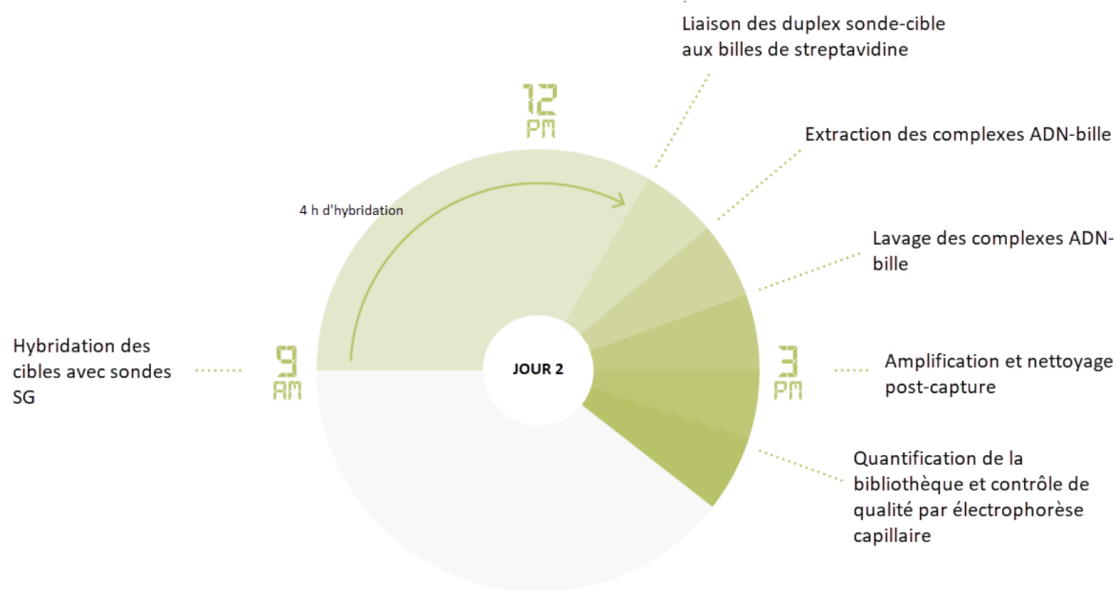
ZONE POST-PCR	FOURNISSEUR	NOM DU PRODUIT	RÉFÉRENCE CATALOGUE
Thermocycleur avec couvercle chauffant à température programmable	Biometra	TAdvanced 96	
Système d'électrophorèse capillaire	Advanced Analytical	Agilent Fragment Analyzer (Analyseur de fragments Agilent)	
Concentrateur sous vide (SpeedVac™ ou similaire)	Thermo Fisher Scientific	Savant DNA120-230	
Bain à sec ou bain-marie (compatible avec les tubes d'1,5 ml)	Techne	Dri-Block DB-1	
Support de séparation magnétique (compatible avec les tubes d'1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific	MagJET Separation Rack (Support de séparation MagJET), tubes 12 x 1,5 ml	MR02
Support de séparation magnétique (96 puits)	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Support de séparation magnétique à 96 puits	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet	12331D
Mélangeur à vortex	Grant Instruments	Multi-tube Vortex Mixer (Mélangeur à vortex multitubes), V32	
Mélangeur à vortex	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifugeuse de table (compatible avec des barrettes de 8 tubes)	StarLab	Mini Centrifuge (Mini centrifugeuse)	N2631-0007
Pipettes multicanaux (P10 ; P100 ; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108-1100, S7108-3300
Matériel et réactif pour la quantification fluorimétrique	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer et Qubit dsDNA HS Assay kit	Q33216 et Q32854
Pipettes monocanal (P10 ; P100 ; P200 ; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100-1100, S7100-2200, S7100-1000



ANNEXE 3. WORKFLOW GENERAL – SOPHIA DDM™ CAPTURE SOLUTIONS (SOPHIA DDM™ SOLUTIONS DE CAPTURE)



Préparation de bibliothèque Avec SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I



CAPTURE

FLUX DE TRAVAIL SIMPLE

- 1-4 TUBES SEULEMENT À MANIPULER (BIBLIOTHÈQUES REGROUPÉES MULTIPLEX)
- 3 HEURES DE PRÉSENCE SEULEMENT



ANNEXE 4. LISTE DES REGIONS CIBLES, PROBLEMATIQUES ET SIGNALEES APPLICABLES

RÉGIONS CIBLES*

Régions cibles		
CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
1	45794953	45795134
1	45796163	45796254
1	45796829	45797031
1	45797067	45797253
1	45797308	45797546
1	45797670	45797783
1	45797813	45798007
1	45798038	45798185
1	45798221	45798384
1	45798410	45798531
1	45798565	45798656
1	45798744	45798867
1	45798932	45799021
1	45799060	45799300
1	45800038	45800208
1	45805866	45805951
2	47596620	47596745
2	47600577	47600734
2	47600922	47601212
2	47602348	47602463
2	47604128	47604241
2	47606067	47606218
2	47606883	47607069
2	47612280	47612374
2	47613686	47613777



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
2	47630306	47630566
2	47635515	47635719
2	47637208	47637536
2	47639528	47639724
2	47641383	47641582
2	47643410	47643593
2	47656871	47657105
2	47672662	47672821
2	47690145	47690318
2	47693772	47693972
2	47698079	47698226
2	47702139	47702434
2	47703481	47703735
2	47705386	47705683
2	47707810	47708035
2	47709893	47710113
2	48010348	48010657
2	48018041	48018287
2	48023008	48023227
2	48025725	48028319
2	48030534	48030849
2	48032024	48032191
2	48032732	48032871
2	48033318	48033522
2	48033566	48033815
2	48033893	48034024
2	215593375	215593757
2	215595110	215595257
2	215609766	215609908
2	215610421	215610603
2	215617146	215617304
2	215632181	215632403



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
2	215633931	215634061
2	215645259	215646258
2	215656996	215657194
2	215661760	215661866
2	215674111	215674318
3	37035014	37035179
3	37038085	37038225
3	37042421	37042569
3	37045867	37045990
3	37048457	37048579
3	37050280	37050421
3	37053286	37053378
3	37053477	37053615
3	37055898	37056060
3	37058972	37059115
3	37061776	37061979
3	37067103	37067523
3	37070250	37070448
3	37081652	37081810
3	37083734	37083847
3	37088985	37089199
3	37089983	37090125
3	37090370	37090533
3	37091952	37092169
3	178916589	178916990
3	178917453	178917712
3	178919053	178919353
3	178921307	178921602
3	178922266	178922401
3	178927358	178927513
3	178927949	178928151
3	178928194	178928378



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
3	178935973	178936147
3	178936959	178937090
3	178937334	178937548
3	178937712	178937865
3	178938749	178938970
3	178941844	178942000
3	178942463	178942634
3	178943725	178943853
3	178947035	178947255
3	178947767	178947934
3	178947988	178948189
3	178951857	178952177
4	84383597	84384080
4	84384622	84384786
4	84388582	84388716
4	84390160	84390329
4	84391331	84391574
4	84393350	84393466
4	84397771	84397857
4	84403282	84403422
4	84406114	84406250
5	112043390	112043604
5	112090563	112090747
5	112101998	112102132
5	112102861	112103112
5	112111301	112111459
5	112116462	112116625
5	112128118	112128251
5	112136951	112137105
5	112151167	112151315
5	112154638	112155066
5	112157568	112157713



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
5	112162780	112162969
5	112163601	112163728
5	112164528	112164694
5	112170623	112170887
5	112173225	112179848
5	131892992	131893170
5	131894951	131895084
5	131911444	131911645
5	131914984	131915219
5	131915529	131915783
5	131923229	131923407
5	131923591	131923806
5	131924354	131924597
5	131925298	131925554
5	131926891	131927123
5	131927544	131927751
5	131930536	131930761
5	131931240	131931527
5	131938967	131939206
5	131939587	131939763
5	131940473	131940716
5	131944282	131944442
5	131944784	131944926
5	131944950	131945113
5	131951670	131951751
5	131951754	131951847
5	131953737	131954011
5	131972782	131972917
5	131973748	131973940
5	131976339	131976522
5	131977845	131978081
7	6013005	6013198



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
7	6017194	6017413
7	6018202	6018352
7	6022430	6022647
7	6026365	6027276
7	6029406	6029611
7	6031579	6031713
7	6035140	6035289
7	6036932	6037079
7	6038714	6038931
7	6042059	6042292
7	6043296	6043448
7	6043578	6043714
7	6045498	6045687
7	6048603	6048675
7	6776682	6777592
7	6781291	6781508
7	6785694	6785844
7	6786642	6786861
7	6790855	6791257
7	152345702	152346473
7	152357761	152357892
7	152373101	152373189
8	90947785	90947865
8	90949229	90949328
8	90955456	90955619
8	90958343	90958548
8	90960027	90960145
8	90965447	90965944
8	90967486	90967808
8	90970928	90971107
8	90976613	90976760
8	90982567	90982810



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
8	90983376	90983543
8	90990423	90990576
8	90992937	90993146
8	90993578	90993776
8	90994925	90995108
8	90996728	90996814
10	89624202	89624330
10	89653757	89653891
10	89685245	89685339
10	89690778	89690871
10	89692745	89693033
10	89711850	89712041
10	89717585	89717801
10	89720626	89720900
10	89725019	89725254
11	94153266	94153372
11	94163052	94163177
11	94168973	94169090
11	94170318	94170426
11	94178951	94179084
11	94180360	94180629
11	94189417	94189529
11	94192549	94192772
11	94194077	94194227
11	94197254	94197430
11	94200954	94201084
11	94203612	94203833
11	94204715	94204950
11	94209430	94209594
11	94211876	94212067
11	94212815	94212952
11	94219065	94219275



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
11	94223974	94224156
11	94225923	94225992
11	108098327	108098448
11	108098478	108098640
11	108099880	108100075
11	108106372	108106586
11	108114655	108114870
11	108115490	108115778
11	108117666	108117879
11	108119635	108119854
11	108121403	108121824
11	108122539	108122783
11	108123519	108123664
11	108124516	108124791
11	108126917	108127092
11	108128183	108128358
11	108129688	108129827
11	108137873	108138094
11	108139112	108139361
11	108141766	108141898
11	108141953	108142158
11	108143234	108143359
11	108143424	108143604
11	108150193	108150360
11	108151697	108151920
11	108153412	108153631
11	108154929	108155225
11	108158302	108158467
11	108159679	108159855
11	108160304	108160553
11	108163321	108163545
11	108164015	108164229



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
11	108165629	108165811
11	108167989	108168134
11	108170416	108170637
11	108172350	108172541
11	108173555	108173781
11	108175377	108175604
11	108178599	108178736
11	108180862	108181067
11	108183113	108183250
11	108186525	108186663
11	108186713	108186865
11	108188075	108188273
11	108190656	108190810
11	108192003	108192172
11	108196012	108196296
11	108196760	108196977
11	108198347	108198510
11	108199723	108199990
11	108200916	108201173
11	108202146	108202309
11	108202581	108202789
11	108203464	108203652
11	108204588	108204720
11	108205671	108205861
11	108206547	108206713
11	108213924	108214123
11	108216445	108216660
11	108217981	108218117
11	108224468	108224632
11	108225513	108225626
11	108235784	108235970
11	108236027	108236260



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
13	32890573	32890689
13	32893189	32893487
13	32899188	32899346
13	32900213	32900312
13	32900354	32900444
13	32900611	32900775
13	32903555	32903654
13	32905031	32905192
13	32906384	32907549
13	32910377	32915358
13	32918670	32918815
13	32920939	32921058
13	32928973	32929450
13	32930540	32930771
13	32931854	32932091
13	32936635	32936855
13	32937291	32937695
13	32944514	32944719
13	32945068	32945262
13	32950782	32950953
13	32953429	32953677
13	32953862	32954075
13	32954119	32954307
13	32968801	32969095
13	32971010	32971206
13	32972274	32972932
16	23614755	23615015
16	23619160	23619358
16	23625300	23625437
16	23632667	23632824
16	23634265	23634476
16	23635305	23635440



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
16	23637532	23637743
16	23640500	23640621
16	23640936	23641815
16	23646158	23647680
16	23649146	23649298
16	23649366	23649475
16	23652406	23652503
16	68771294	68771391
16	68772175	68772339
16	68835548	68835821
16	68842302	68842495
16	68842571	68842776
16	68844075	68844269
16	68845562	68845787
16	68846013	68846191
16	68847191	68847423
16	68849393	68849687
16	68853158	68853353
16	68855879	68856153
16	68857277	68857554
16	68862052	68862232
16	68863532	68863725
16	68867168	68867427
17	7572902	7573033
17	7573902	7574058
17	7576568	7576682
17	7576828	7576951
17	7576994	7577180
17	7577474	7577633
17	7578152	7578314
17	7578346	7578579
17	7579287	7579615



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
17	7579675	7579746
17	7579814	7579937
17	33427947	33428080
17	33428195	33428409
17	33430248	33430368
17	33430448	33430588
17	33433380	33433525
17	33433982	33434166
17	33434360	33434491
17	33443909	33444081
17	33445495	33445663
17	33446105	33446216
17	33446526	33446657
17	41197670	41197844
17	41199635	41199745
17	41201113	41201236
17	41203055	41203159
17	41209044	41209177
17	41215325	41215415
17	41215866	41215993
17	41219600	41219737
17	41222920	41223280
17	41226323	41226563
17	41228480	41228656
17	41231326	41231441
17	41234396	41234617
17	41242936	41243074
17	41243427	41246902
17	41247838	41247964
17	41249236	41249331
17	41251767	41251922
17	41256114	41256303



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
17	41256860	41256998
17	41258448	41258575
17	41267718	41267821
17	41276009	41276138
17	56769980	56770174
17	56772267	56772579
17	56774029	56774245
17	56780532	56780715
17	56787195	56787376
17	56798082	56798198
17	56801376	56801486
17	56809820	56809930
17	56811454	56811608
17	59760632	59761526
17	59763172	59763551
17	59770766	59770898
17	59793287	59793449
17	59820349	59820520
17	59821768	59821977
17	59853737	59853948
17	59857597	59857787
17	59858176	59858391
17	59861606	59861810
17	59870933	59871115
17	59876436	59876685
17	59878589	59878860
17	59885803	59886143
17	59924437	59924606
17	59926465	59926642
17	59934394	59934617
17	59937132	59937293
17	59938783	59938925



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
19	1206888	1207227
19	1218391	1218524
19	1219298	1219431
19	1220347	1220529
19	1220555	1220741
19	1221187	1221364
19	1221923	1222030
19	1222959	1223196
19	1226428	1226671
22	29083860	29083999
22	29085098	29085228
22	29089995	29090130
22	29091090	29091255
22	29091673	29091886
22	29092864	29093000
22	29095801	29095950
22	29099468	29099579
22	29105969	29106072
22	29107872	29108030
22	29115358	29115498
22	29120940	29121137
22	29121206	29121380
22	29130366	29130734

*Une région cible est la position où le pipeline rapportera des variants de haute confiance lorsqu'ils sont présents. Les coordonnées sont basées sur 1 et la coordonnée finale est incluse dans la région.

RÉGIONS APPLICABLES PROBLÉMATIQUES**

CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
chr2	48018282	48018315
chr3	37067075	37067120



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
chr5	112111309	112111311
chr11	94152620	94152662
chr17	59757835	59757859

**Une région problématique est une certaine région intronique dans la cible qui pourrait causer une incertitude dans l'appel de variant. Cela peut dépendre de la technologie de séquençage. Un variant dans cette région sera classé comme Bas dans le tableau de confiance dans SOPHiA DDM™. La colonne filtre du variant correspondant dans le tableau de variant complet final sera marquée « régions problématiques ». Les coordonnées sont basées sur 1 et la coordonnée finale est incluse dans la région.

RÉGIONS APPLICABLES MARQUÉES D'UN INDICATEUR***

Régions applicables marquées d'un indicateur			
CHROMOSOME	DÉBUT	FIN	DESCRIPTION
2	47635515	47635560	les variants dans cette région peuvent être confondus en raison d'artéfacts de séquençage
2	48032732	48032820	les variants dans cette région peuvent être confondus en raison d'artéfacts de séquençage
3	37067103	37067240	les variants dans cette région peuvent être confondus en raison d'artéfacts de séquençage
7	6036932	6037079	les variants dans cette région peuvent être confondus en raison d'artéfacts de séquençage
3	178937334	178937548	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité est chr22:17053913- 17054324, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence
3	178937712	178937865	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité est chr22:17054288- 17054442, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence
7	6012845	6013198	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité se trouve dans le pseudogène PMS2CL, chr7:6790854-6791209, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence
7	6017194	6017413	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité se trouve dans le pseudogène PMS2CL, chr7:6786641-6786861, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN	DESCRIPTION
7	6018202	6018352	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité se trouve dans le pseudogène PMS2CL, chr7:6785693-6785844, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence
7	6022430	6022647	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité se trouve dans le pseudogène PMS2CL, chr7:6781290-6781508, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence
7	6026365	6027276	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité se trouve dans le pseudogène PMS2CL, chr7:6776681-6777592, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence
7	6776682	6777592	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité se trouve dans le gène PMS2, chr7:6026364-6027276, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence
7	6781291	6781508	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité se trouve dans le gène PMS2, chr7:6022429-6022647, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence
7	6785694	6785844	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité se trouve dans le gène PMS2, chr7:6018201-6018352, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence
7	6786642	6786861	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité se trouve dans le gène PMS2, chr7:6017193-6017413, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence
7	6790855	6791257	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité se trouve dans le gène PMS2, chr7:6012796-6013198, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence
22	29085098	29085228	région très similaire à une autre région génomique (la région présentant la plus forte similarité est chr16:33366704-33366835, hg19/GRCh37) - les variants doivent être interprétés avec prudence

***Une région marquée d'un indicateur est une certaine région chevauchant un exon et pourrait causer une incertitude dans l'appel de variant, p. ex., faible complexité, bruit, pseudogène, etc. Cela peut dépendre de la technologie de séquençage. Un variant détecté dans cette région ne sera pas classé comme de faible confiance dans SOPHiA DDM™ mais il sera associé à un triangle d'avertissement et un message d'avertissement détaillé est consultable dans l'onglet avertissements. La colonne filtre du variant correspondant dans le tableau de variant complet final ne sera pas marquée à cause de cette région. Les coordonnées sont basées sur 1 et la coordonnée finale est incluse dans la région.



Document Approvals
Approved Date: 28 Jan 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 28-Jan-2026 01:11:18 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Claire Mullane, (cmullane@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 28-Jan-2026 08:57:33 GMT+0000