

Février 2017

Manuel du kit *therascreen*[®] BRCA1 /2 NGS FFPE gDNA Partie 2 : Analyse

Version 1

Pour l'identification de variantes des gènes *BRCA1* et
BRCA2

IVD

Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*

À employer conjointement avec la plateforme Illumina[®]
MiSeqDx[™]

CE

REF

875011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R2 **MAT**

1103449FR

Sommaire : Partie 2

Utilisation prévue	5
Avertissement	5
Principe de la procédure	6
Matériel nécessaire mais non fourni Analyse	8
Équipement de séquençage	8
Logiciel pour l'analyse des séquences	8
Configuration système recommandée par CLC bio	8
Exigences spécifiques liées à la cartographie des lectures	9
Exigences spécifiques liées au 3D Molecule Viewer	10
Exigences système	10
Recommandations système	10
Avertissements et précautions	10
Précautions générales	11
Procédure : Partie 2	13
Présentation générale du flux de travail	13
Protocole : Analyse des données	14
Installation du flux de travail de l'analyse	15
Installation du plug-in de l'analyse	19
Exportation de fichiers Illumina FASTQ depuis l'instrument MiSeqDx	21
Importation de fichiers Illumina FASTQ	22
Analyse des séquences	27

Interprétation des résultats.....	42
Exportation d'un fichier VCF	43
Guide de dépannage.....	45
Contrôle qualité.....	50
Limitations.....	50
Caractéristiques des performances.....	52
Plage de couverture des rapports générés pour le test.....	52
Uniformité de l'amplification	53
Substances interférentes	53
Contamination croisée	53
Lectures sur cible (spécificité du test)	54
Précision du test	54
Limite de détection (LoD).....	58
Valeur seuil du test	58
Couverture minimale pour détecter une FAV à 5,75 %.....	59
Précision	60
Limites des variantes	62
Variantes faux positif	62
Variantes faux négatifs	65
Résultats de la validation	65

Références	70
Symboles	73
Pour commander	75

Utilisation prévue

Le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA (séquençage de nouvelle génération) est un test de diagnostic moléculaire destiné à être utilisé pour l'identification de variantes dans les régions codantes des gènes humains *BRCA1* et *BRCA2*, dans de l'ADN dérivé de tissu tumoral ovarien fixé au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE). Le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA a été conçu pour faciliter la classification des cancers de l'ovaire.

Avertissement

Le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA a été validé pour une utilisation conjointe avec la plateforme Illumina MiSeqDx et avec le logiciel Biomedical Genomics Workbench (incluant un flux de travail spécifique à l'analyse).

IMPORTANT : ce manuel s'articule en deux parties. La première partie contient un résumé et des explications, les principes de la procédure et la description du flux de travail du laboratoire humide :

- Extraction d'ADN génomique
- Amplification PCR de la cible
- Pooling et purification des échantillons
- Construction de la bibliothèque
- Nettoyage de l'ADN lié aux adaptateurs
- Sélection de la taille appropriée
- Amplification PCR de la bibliothèque purifiée
- Nettoyage, quantification et pooling de la bibliothèque
- Préparation de la bibliothèque rassemblée en pool pour le séquençage
- Configuration et démarrage de l'analyse de séquençage

- Guide de dépannage

La deuxième partie contient des informations sur l'analyse des données et les performances du kit :

- Analyse des données
 - Installation du flux de travail de l'analyse
 - Installation du plug-in de l'analyse
 - Exportation de fichiers Illumina FASTQ à partir du MiSeqDx
 - Importation de fichiers Illumina FASTQ
 - Analyse des séquences
- Interprétation des résultats
- Guide de dépannage
- Caractéristiques des performances

IMPORTANT : le flux de travail a été conçu et optimisé pour obtenir les performances décrites dans les Parties 1 et 2 du présent manuel. Les instructions d'utilisation doivent être suivies scrupuleusement. Toute utilisation non conforme aux instructions fournies dans les Parties 1 et 2 du présent manuel décharge QIAGEN de toute responsabilité. Le flux de travail doit être soumis dans son intégralité à une vérification indépendante effectuée par l'utilisateur final du laboratoire avant d'être adopté dans la pratique courante.

Principe de la procédure

Le séquençage est effectué conformément au protocole du fabricant de l'Illumina. Les fichiers FASTQ sont traités avec le logiciel Biomedical Genomics Cancer Research Workbench avec le flux de travail BRCA1/2 CE-IVD. Un fichier Variant Call Format est généré pour chaque échantillon et le logiciel Biomedical Genomics Cancer Workbench est recommandé pour l'interprétation des variantes.

Pour garantir la bonne qualité des résultats, des critères de contrôle au cours du processus sont utilisés à différentes étapes de l'analyse de préparation et de séquençage de la bibliothèque (Figure 7). Ces critères permettent de valider les différentes étapes du flux de travail et notamment d'identifier les échantillons qui donnent de mauvais résultats de séquençage ou d'indiquer une contamination potentielle.

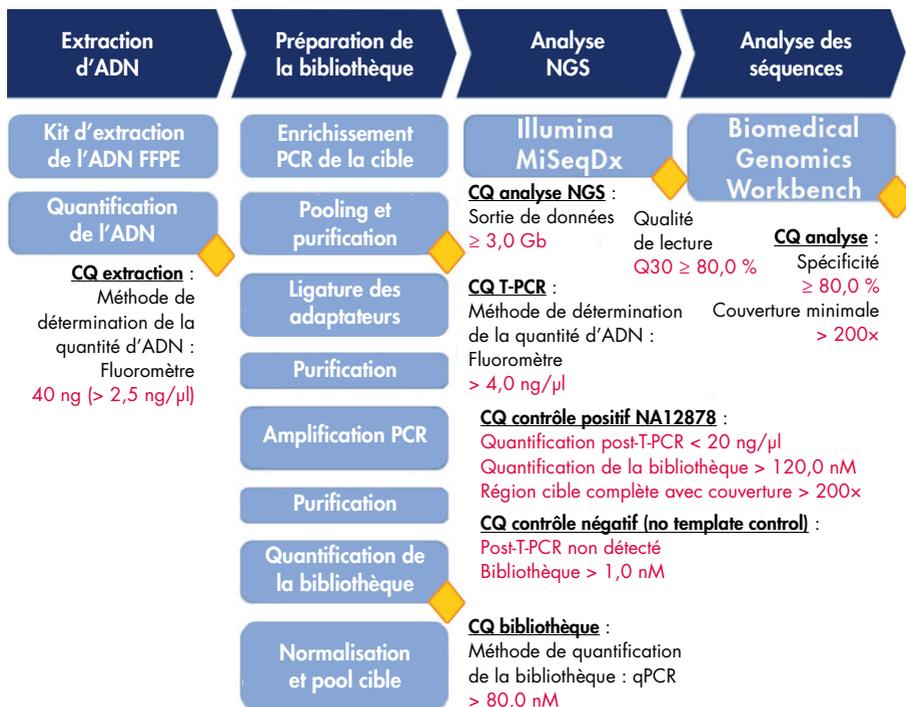


Figure 7. Critères de contrôle au cours du processus. Tout au long du flux de travail de séquençage (cases bleues), plusieurs étapes de contrôle en cours de processus sont réalisées (losanges jaunes) pour valider la T-PCR, la préparation de la bibliothèque et l'analyse de séquençage. Le critère final utilisé pour garantir une détection de bonne qualité des variantes à une position donnée est la couverture minimale obtenue. La spécificité a trait au pourcentage de lectures de paires alignées sur la région cible.

Matériel nécessaire mais non fourni Analyse

S'assurer que les instruments utilisés dans cette procédure ont été vérifiés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

Équipement de séquençage

- Illumina MiSeqDx (Illumina, Inc., réf. DX-410-1001)
- Logiciel Illumina MiSeq version 2.5.0.5 ou supérieure
- Logiciel Illumina Experiment Manager version 1.9 ou supérieure

Logiciel pour l'analyse des séquences

- Biomedical Genomics Workbench version 2.1.1 de CLC bio (www.clcbio.com)
- CLC Genomics Server 7.0.2 avec Biomedical Genomics Extension de CLC bio
- Plug-in QIAGEN GeneRead Panel Analysis
Disponible au téléchargement depuis l'onglet **Product Resources** (ressources produit) de la page produit du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sur le site Web de QIAGEN.
- Flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD
Disponible au téléchargement depuis l'onglet **Product Resources** (ressources produit) de la page produit du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sur le site Web de QIAGEN.

Configuration système recommandée par CLC bio

(www.clcbio.com/support/system-requirements)

- Windows Vista®, Windows® 7, Windows 8, Windows 10, Windows Server 2008 ou Windows Server 2012
Mac OS® 10.7 ou ultérieure

-
- Linux : Red Hat® 5.0 ou ultérieure ; SUSE® 10.2 ou ultérieure ; Fedora® 6 ou ultérieure
 - 8 Go de RAM requis ; 16 Go de RAM recommandés
 - Résolution 1024 × 768 requise ; résolution 1600 × 1200 recommandée
 - Processeur central Intel® ou AMD® requis
 - 100 Go minimum d'espace disque libre requis dans le répertoire Temp du profil utilisateur du système d'exploitation par défaut
 - 90 Go minimum d'espace disque libre requis dans le répertoire CLC_References (si vous n'êtes pas connecté à un serveur)

Si l'espace disque libre est moins important, l'emplacement des données de référence peut être modifié. Voir resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/biomedicalgenomicsworkbenchapplication/current/. Développer la section **Getting started** (pour commencer), ouvrir **Reference data** (données de référence) et cliquer sur **Download and configure reference data** (télécharger et configurer les données de référence).

Exigences spécifiques liées à la cartographie des lectures

Les chiffres ci-dessous indiquent la mémoire minimale et recommandée pour les systèmes exécutant des tâches d'analyse et de cartographie. Les exigences suggérées sont basées sur la taille du génome.

- Humain (3,2 Gb) et de souris (2,7 Gb)
 - Minimum : 6 Go de RAM ; recommandée : 8 Go de RAM

Les systèmes dont la mémoire est inférieure à la mémoire spécifiée bénéficieront de l'installation du plug-in legacy read mapper (voir www.clcbio.com/clc-plugin/read-mapper-legacy-version). Il est plus lent que le logiciel de cartographie standard mais il s'ajuste à l'espace mémoire disponible.

Exigences spécifiques liées au 3D Molecule Viewer

Exigences système

- Une carte graphique pouvant prendre en charge l'OpenGL® 2.0
- Des pilotes graphiques à jour
S'assurer que le dernier pilote disponible pour la carte graphique est installé.

Recommandations système

- Une carte graphique distincte NVIDIA® ou AMD/ATI™
Des cartes graphiques intégrées modernes (type Intel HD Graphics series) peuvent aussi être utilisées, mais elles sont généralement plus lentes que les cartes distinctes.
- Une version 64 bits de l'ensemble d'utilitaires est recommandée pour travailler avec des complexes de grande taille.

Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne au format PDF sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

Précautions générales

L'utilisation des tests NGS nécessite de bonnes pratiques de laboratoire, incluant la maintenance et la calibration de tout l'équipement utilisé, et en accord avec les réglementations applicables et les normes pertinentes.

- Jeter les échantillons et les tests usagés conformément aux procédures de sécurité locales.
- Les réactifs fournis dans le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sont dilués de manière optimale. Ne pas effectuer de dilution supplémentaire des réactifs : celle-ci pourrait entraîner une baisse des performances.
- Tous les réactifs fournis dans le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs fournis dans le même kit. Ne pas interchanger les réactifs des kits *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA, au risque de réduire les performances.
- Ne pas utiliser de composants du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA et des kits nécessaires mais non fournis périmés ou ayant été transportés et conservés dans de mauvaises conditions. Toujours vérifier ces points avant utilisation.
- Une modification des temps et/ou des températures d'incubation peut provoquer des données erronées ou discordantes.
- Faire preuve de prudence pour garantir un test correct des échantillons. Une attention toute particulière doit être accordée aux mauvaises entrées d'échantillons ainsi qu'aux erreurs de chargement, de pipetage ou de code-barres.
- S'assurer à tout moment de manipuler les échantillons de manière systématique afin d'assurer une identification correcte permettant de garantir leur traçabilité.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination croisée.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter les contaminations croisées par les produits de PCR, qui peuvent générer des signaux faux positifs.
- Faire preuve d'une extrême vigilance pour éviter la contamination par la DNase, qui peut provoquer la dégradation de l'ADN matrice.

-
- Utiliser des consommables exempts de nucléase (ex. pipettes, pointes de pipette, tubes). Utiliser de nouvelles pointes de pipettes aérosol-résistantes à toutes les étapes de pipetage pour éviter les contaminations croisées des échantillons et des réactifs.
 - Préparer les pré-mélanges pour PCR avec du matériel dédié (pipettes, pointes de pipette, etc.) dans une zone spéciale où aucune matrice d'ADN (ADNc, plasmides ou produits de PCR) n'est introduite. Ajouter les échantillons dans une zone séparée (de préférence dans une autre pièce) avec du matériel spécifique (pipettes, pointes, etc.).
 - Consulter le manuel d'utilisation de l'instrument Illumina MiSeqDx pour plus d'informations sur les avertissements, précautions et procédures. La plateforme NGS doit être installée correctement pour en assurer l'alimentation électrique et garantir qu'aucune interaction de l'utilisateur ne soit nécessaire une fois qu'elle est lancée.
 - Ne pas ouvrir l'instrument Illumina MiSeqDx avant la fin de l'analyse.

Procédure : Partie 2

Présentation générale du flux de travail

Les différentes parties du flux de travail décrites dans le schéma ci-dessous ont été optimisées pour cette procédure, y compris les étapes nécessitant des kits et des réactifs qui ne sont pas fournis.



Il est essentiel de lire attentivement la procédure suivante et de suivre exclusivement les instructions fournies dans les Parties 1 et 2 de ce manuel.

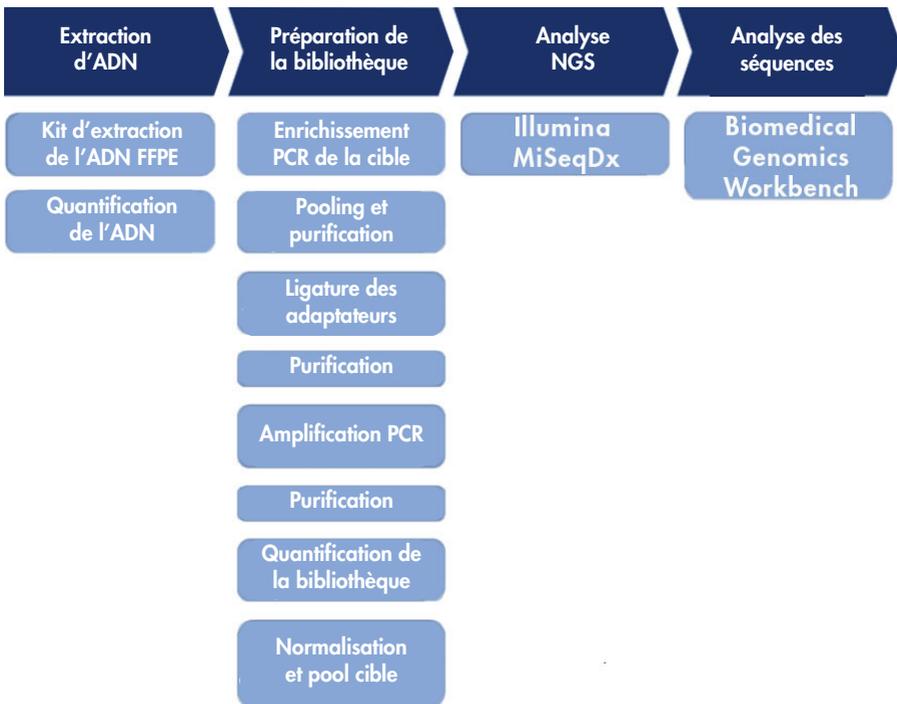


Figure 8. Présentation du flux de travail NGS.

Protocole : Analyse des données

Cette section inclut une description de l'installation du logiciel et de l'analyse des fichiers FASTQ générés lors du séquençage.

Produits et logiciels nécessaires à l'analyse des données :

- Logiciel Biomedical Genomics Workbench version 2.1.1 (www.clcbio.com)
- CLC Genomics Server 7.0.2 avec Biomedical Genomics Extension (www.clcbio.com)
- Les fichiers FASTQ (deux fichiers FASTQ sont attendus par échantillon pour les lectures appariées)

Il est important d'utiliser le flux de travail d'analyse spécifique du test pour réaliser l'analyse des séquences. Les analyses sur le logiciel CLC devraient être effectuées à partir d'un compte utilisateur qui ne soit pas un compte administrateur.

À effectuer avant de commencer

- S'il ne l'est pas déjà, le flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD de l'analyse du test doit être installé avant l'analyse des séquences. Une version est disponible au téléchargement depuis l'onglet **Product Resources** (ressources produit) de la page produit du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sur le site Web de QIAGEN.
- S'il ne l'est pas déjà, le plug-in QIAGEN GeneRead Panel Analysis doit être installé avant l'analyse des séquences.

Installation du flux de travail de l'analyse

Il existe deux possibilités pour installer le flux de travail de l'analyse :

- l'installation locale (suivre les instructions fournies dans la partie « Flux de travail : processus d'installation locale ») ;
- l'installation sur le serveur CLC Genomics (ignorer la partie « Flux de travail : processus d'installation locale » et suivre les instructions décrites dans la partie « Flux de travail : processus d'installation sur serveur »).

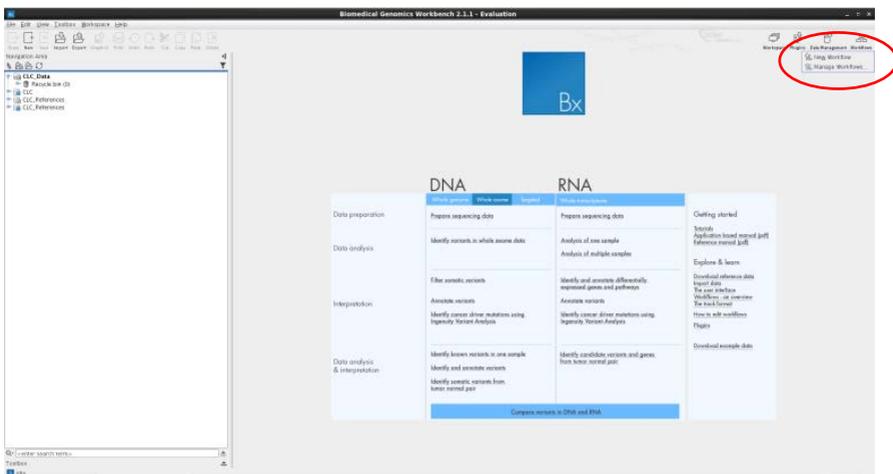
Si le flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD de l'analyse du test est déjà installé, ignorer les parties « Flux de travail : processus d'installation locale » et « Flux de travail : processus d'installation sur serveur ».

Flux de travail : processus d'installation locale

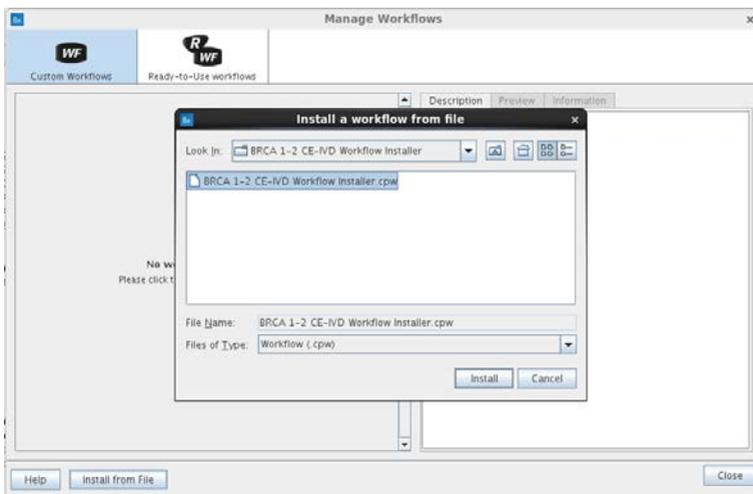
Cette procédure installera le flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD de l'analyse du test sur votre ordinateur local au même emplacement que le logiciel Biomedical Genomics Workbench.

Procédure

1. Lancer le logiciel **Biomedical Genomics Workbench**.
2. Cliquer sur **Workflows** (flux de travail) puis sur **Manage Workflows** (gérer les flux de travail).

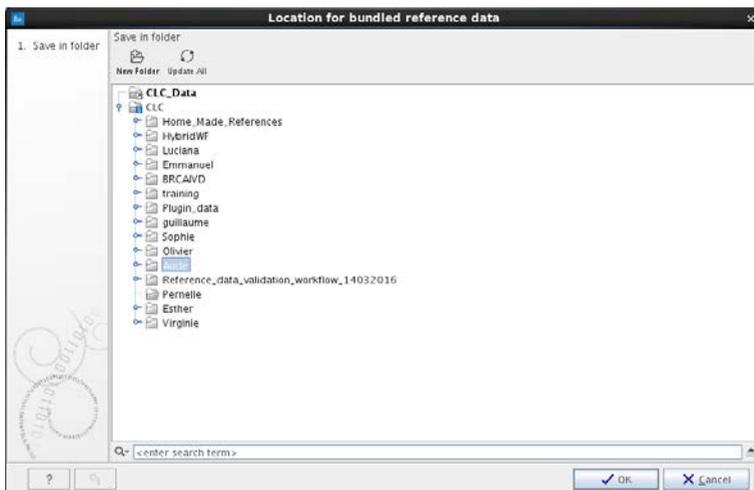


3. Cliquer sur **Install from File** (installer à partir d'un fichier).

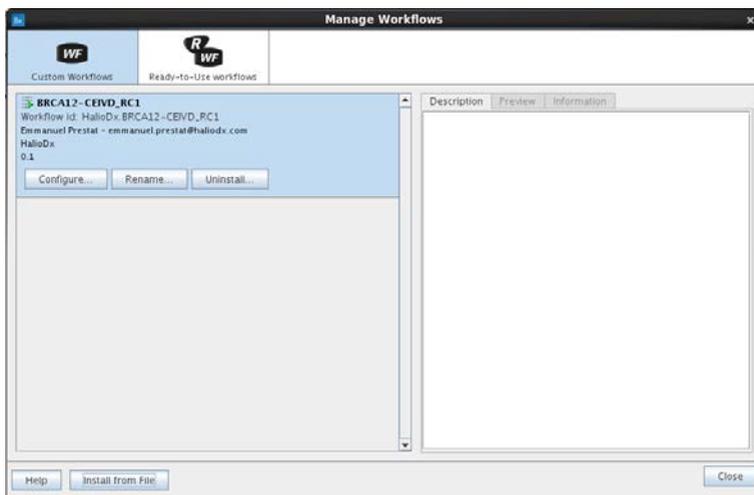


4. Sélectionner le fichier de flux de travail **BRCA 1-2 CE-IVD Workflow Installer.cpw**.
Cliquer sur **Install** (installer).

5. Créer un nouveau dossier et le sélectionner, puis cliquer sur **OK**.



6. Cliquer sur **Close** (fermer).

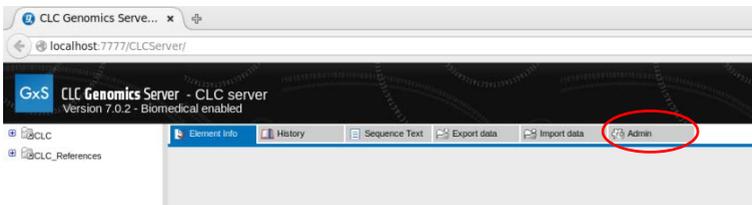


Flux de travail : processus d'installation sur serveur

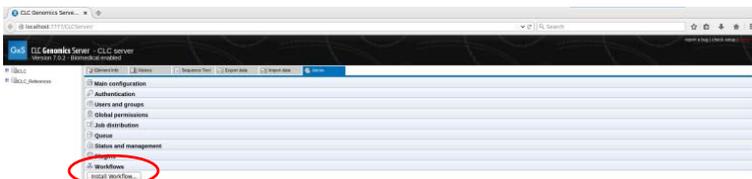
Cette procédure installera le flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD de l'analyse du test sur le serveur CLC Genomics (avec activation Biomedical). Dans la procédure suivante, on entend par « IPserveur » l'adresse IP du serveur et on suppose que le port du CLC Genomics Server est « 7777 » (port par défaut).

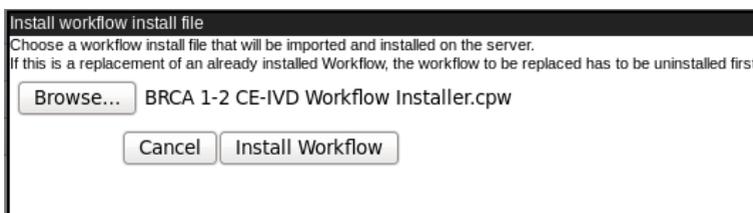
Procédure

1. À partir d'un navigateur Internet, se connecter à **http://IPserveur:7777/**.
Remplacer « IPserveur » par l'IP du serveur, ou utiliser « localhost » (hôte local) si le navigateur Internet est exécuté directement sur le serveur.
2. Saisir l'identifiant et le mot de passe administrateur CLC (par défaut, l'identifiant est « root » et le mot de passe est « default »).
3. Cliquer sur l'onglet **Admin**.



4. Ouvrir **Workflows** (flux de travail) et cliquer sur **Install Workflow** (installer le flux de travail).





5. Sélectionner le fichier de travail **BRCA 1-2 CE-IVD Workflow Installer.cpw** puis cliquer sur **Install Workflow** (installer le flux de travail).

Remarque : une fois l'installation du flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD terminée, le logiciel Biomedical Genomics Workbench doit être redémarré avant l'importation des fichiers FASTQ depuis l'instrument MiSeq.

Installation du plug-in de l'analyse

Il existe deux possibilités pour installer le plug-in de l'analyse :

- l'installation locale (suivre les instructions fournies dans la partie « Plug-in : processus d'installation locale ») ;
- l'installation sur le serveur CLC Genomics (ignorer la partie « Plug-in : processus d'installation locale » et suivre les instructions décrites dans la partie « Plug-in : processus d'installation sur serveur »).

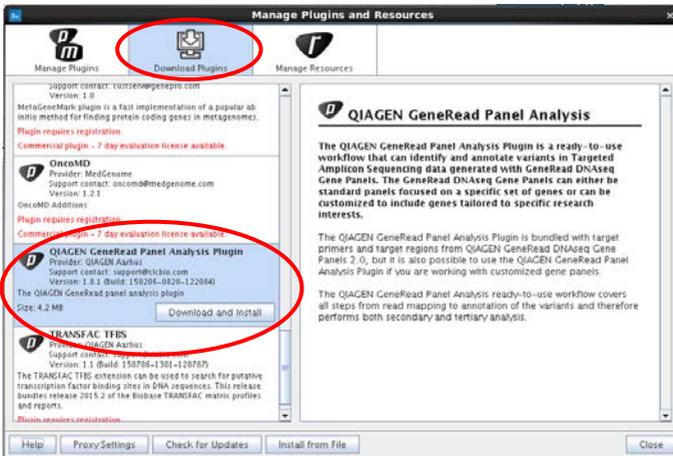
Si le plug-in de l'analyse du test est déjà installé, ignorer les parties « Plug-in : processus d'installation locale » et « Plug-in : processus d'installation sur serveur ».

Plug-in : processus d'installation locale

Cette procédure installera le Plug-in QIAGEN GeneRead Panel Analysis sur votre ordinateur local au même emplacement que le logiciel CLC Biomedical Genomics.

Procédure

1. Lancer le logiciel Biomedical Genomics Workbench.
2. Cliquer sur **Plugins** (plug-ins), puis sélectionner **Download Plugins** (télécharger les plug-ins).



3. Sélectionner le plug-in QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin puis cliquer sur **Download and Install** (Télécharger et installer).

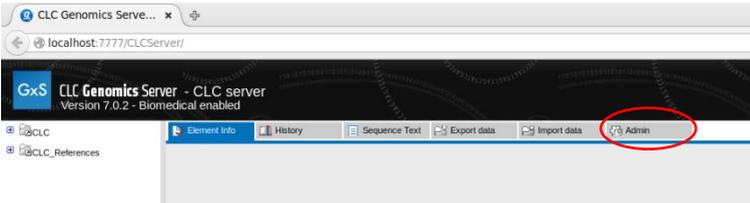
Plug-in : processus d'installation sur serveur

Cette procédure installera le plug-in QIAGEN GeneRead Panel Analysis sur le serveur CLC Genomics (avec activation Biomedical). Dans la procédure suivante, on entend par « IPserveur » l'adresse IP du serveur et on suppose que le port du CLC Genomics Server est « 7777 » (port par défaut).

Procédure

1. À partir d'un navigateur Internet, se connecter à **http://IPserveur:7777/**.
Remplacer « IPserveur » par l'IP du serveur, ou utiliser « localhost » (hôte local) si le navigateur Internet est exécuté directement sur le serveur.

- Saisir l'identifiant et le mot de passe administrateur CLC (par défaut, l'identifiant est « root » et le mot de passe est « default »).
- Cliquer sur l'onglet **Admin**.



- Ouvrir **Plugins** (plug-ins).



- Aller dans le panneau **Install new plugin** (installer un nouveau plug-in) et **Browse...** (parcourir...) pour identifier l'emplacement du fichier.



Installer la version téléchargeable du plug-in GeneRead Panel Analysis Server (disponible depuis l'onglet **Product Resources** (Ressources produit) de la page produit du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FPPE gDNA sur le site Web de QIAGEN).

Exportation de fichiers Illumina FASTQ depuis l'instrument MiSeqDx

Les fichiers FASTQ enregistrés sur l'ordinateur MiSeq doivent être exportés de l'instrument MiSeq vers la destination de votre choix (disque ou serveur externe) pour être mis à la disposition du logiciel Biomedical Genomics Workbench.

Remarque : les fichiers FASTQ se trouvent dans le dossier d'analyse de séquençage suivant : **MiSeqAnalysis\RunID\Data\Intensities\BaseCalls**.

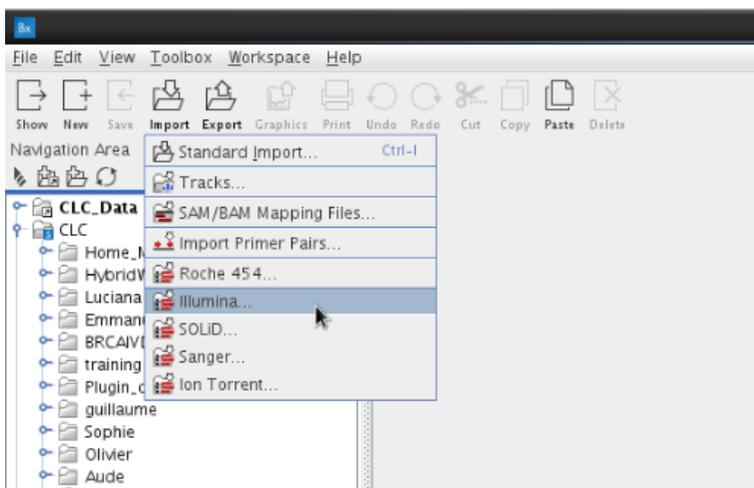
Nous recommandons de ne pas conserver le fichier de résultats trop longtemps sur la plateforme NGS afin d'éviter toute confusion entre les analyses successives et de conserver suffisamment d'espace disque libre.

Importation de fichiers Illumina FASTQ

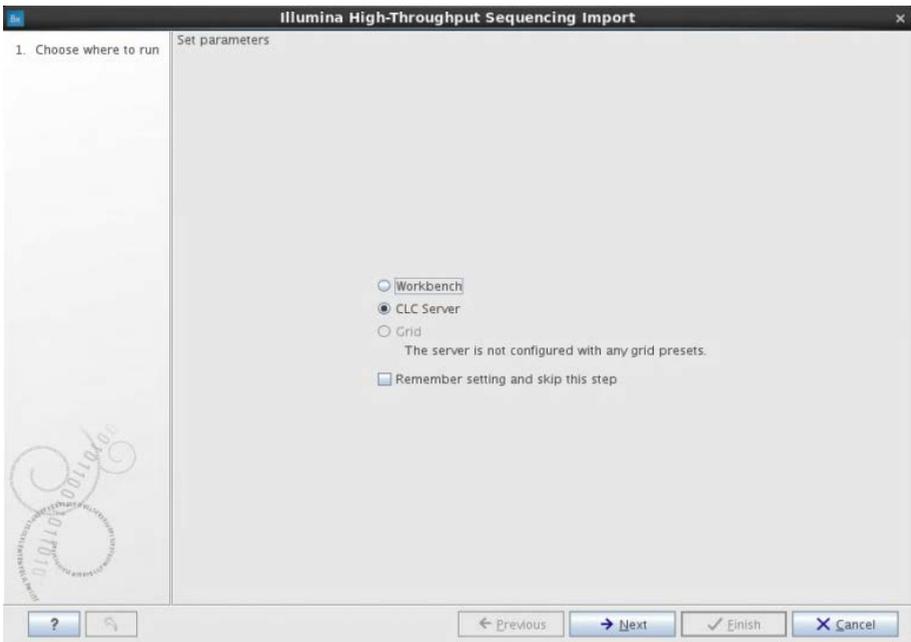
Il y a deux fichiers Illumina FASTQ par échantillon.

Procédure

1. Ouvrir le logiciel Biomedical Genomics Workbench.
2. Cliquer sur **Import** (importer) et sélectionner **Illumina** dans le menu.

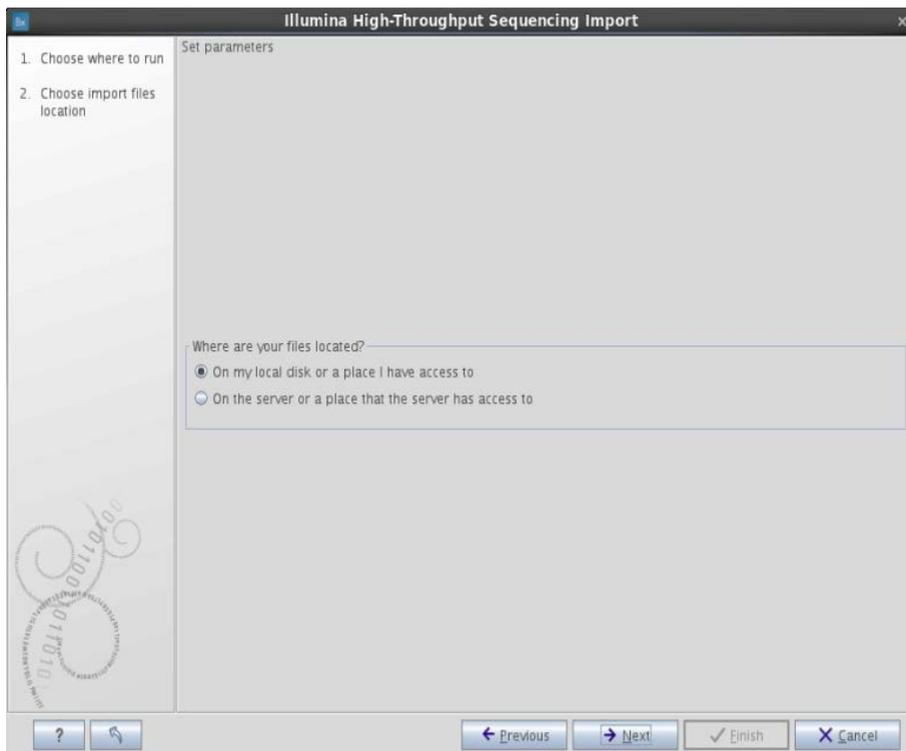


3. Choisir l'emplacement où exécuter l'importation en sélectionnant l'option qui convient.
- Sélectionner **Workbench** si le flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD est installé localement (autrement dit, s'il a été installé en suivant les instructions fournies dans la partie « Flux de travail : processus d'installation locale »).
 - Sélectionner **CLC Server** si le flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD est installé sur un serveur (autrement dit, s'il a été installé en suivant les instructions fournies dans la partie « Flux de travail : processus d'installation sur serveur »).



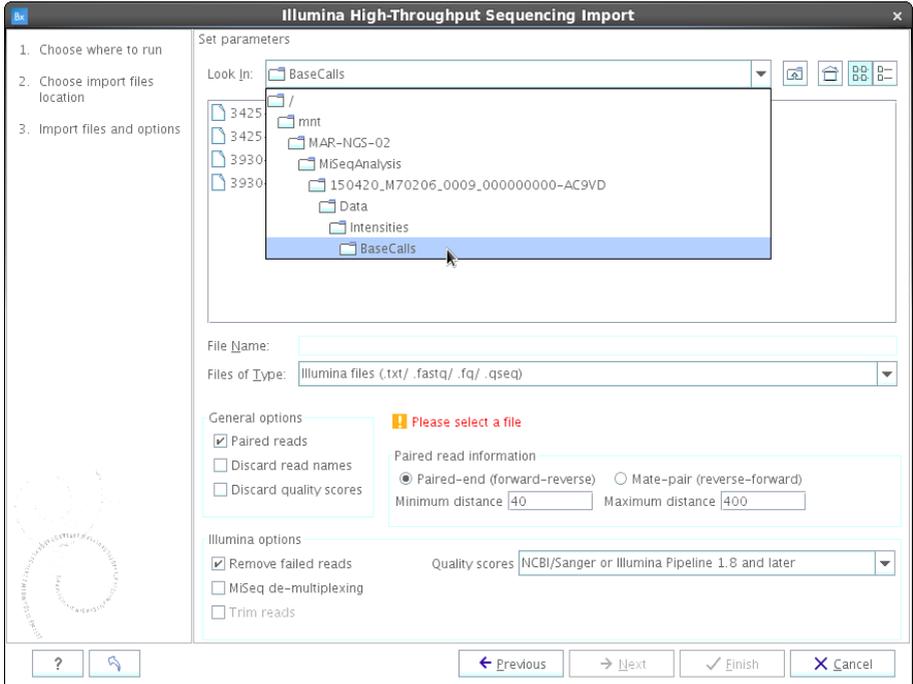
4. Cliquer sur **Next** (suivant).

5. Si **CLC Server** (serveur CLC) a été sélectionné à l'étape précédente, la fenêtre suivante s'ouvre.



6. Sélectionner **On my local disk or a place I have access to** (sur mon disque local ou à un emplacement auquel j'ai accès) et cliquer sur **Next** (suivant).

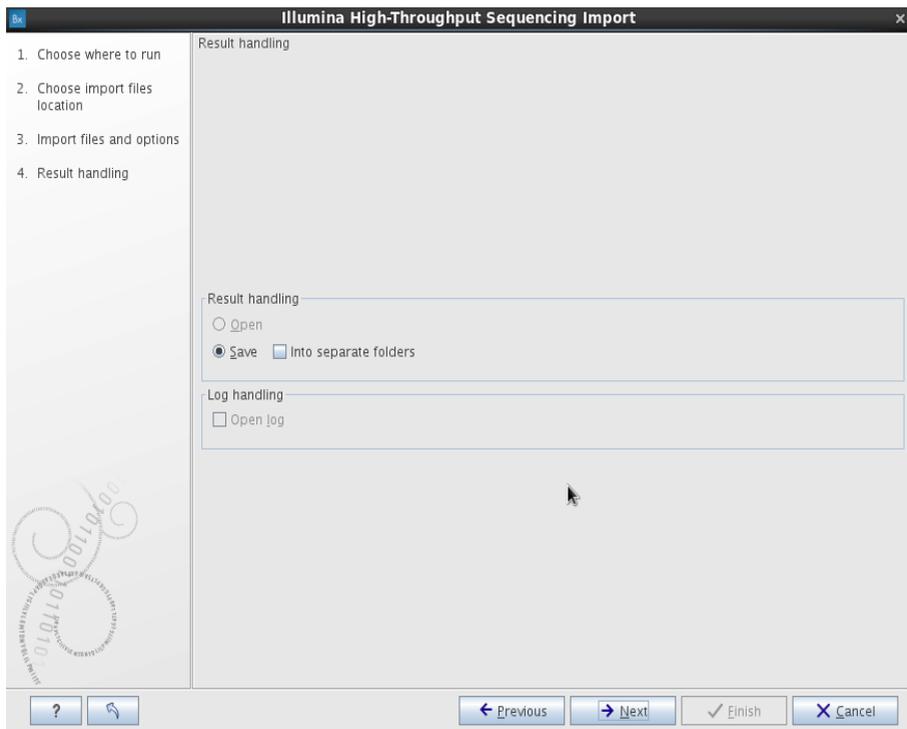
7. Sélectionner tous les fichiers FASTQ à analyser à partir du chemin suivant dans le fichier MiSeq : **Analysis/Data/Intensities/BaseCalls**.



8. Sélectionner les étapes suivantes :

- Cocher **Paired reads** (lectures appariées)
 - Sélectionner **Paired-end (forward-reverse)** (extrémités appariées - avant, arrière)
 - Indiquer **40** dans le champ **Minimum distance** (distance minimum) et **400** dans le champ **Maximum distance** (distance maximum)
 - Cocher **Remove failed reads** (supprimer les lectures erronées)
9. Cliquer sur **Next** (suivant).

10. La fenêtre suivante s'ouvre. Sélectionner **Save** (enregistrer) et cliquer sur **Next** (suivant).



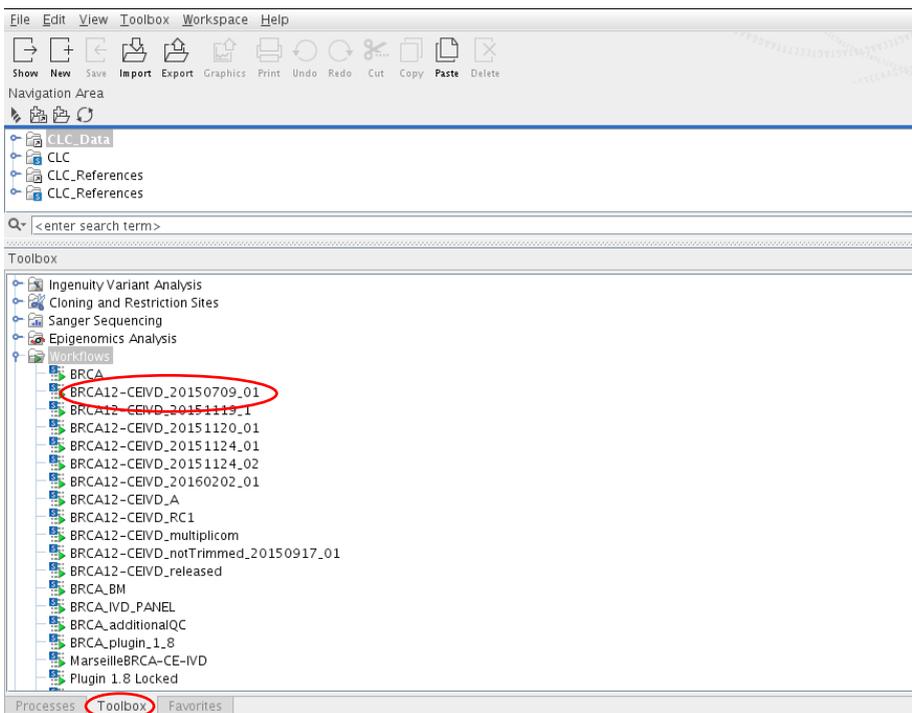
11. Créer un dossier où enregistrer les fichiers FASTQ appariés et cliquer sur **Finish** (terminer).

Analyse des séquences

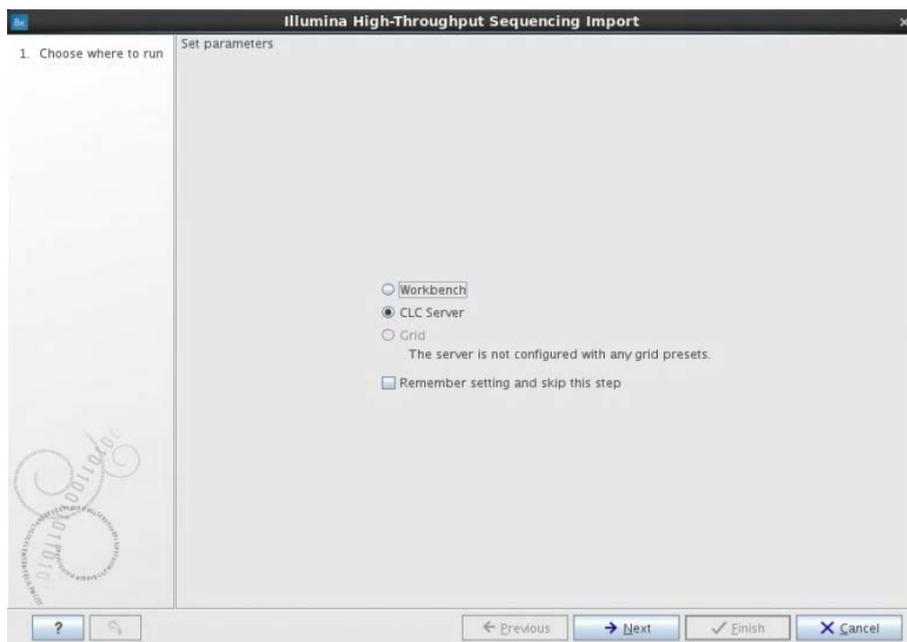
Traiter les fichiers FASTQ avec le flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD de l'analyse du test qui a été installé en suivant les instructions fournies dans la partie « Flux de travail : processus d'installation locale » ou « Flux de travail : processus d'installation sur serveur ». Suivre la procédure d'analyse des fichiers FASTQ appariés détaillée ci-dessous.

Procédure

1. Sélectionner l'onglet **Toolbox** (boîte à outils) et double-cliquer sur le nom du flux de travail.



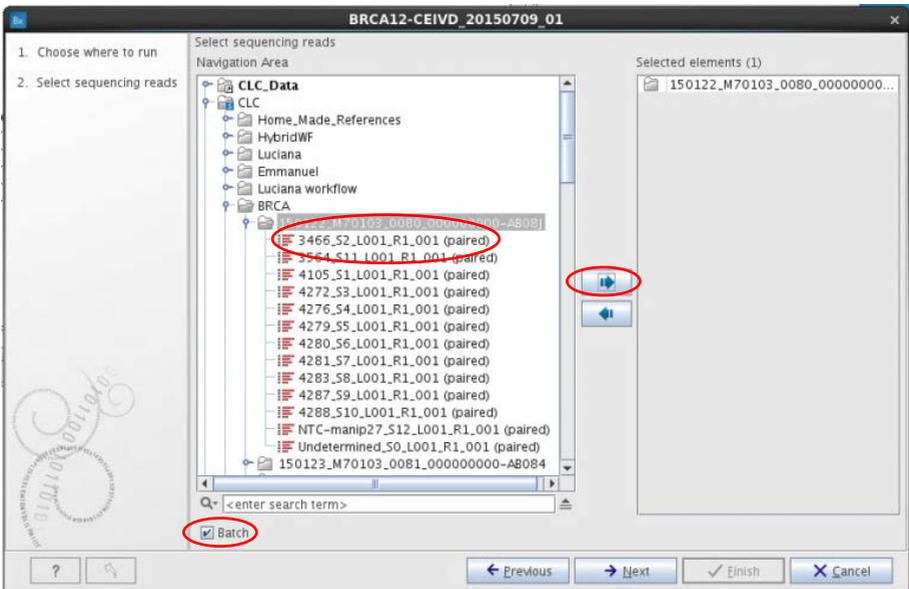
La fenêtre suivante s'ouvre.



2. Sélectionner l'option qui convient :

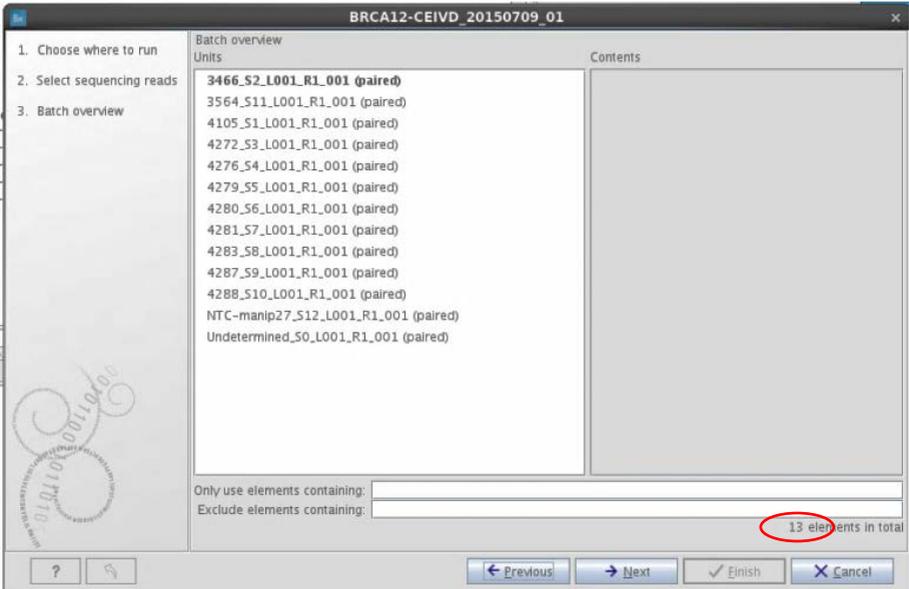
- Sélectionner **Workbench** si le flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD est installé localement.
- Sélectionner **CLC Server** si le flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD est installé sur serveur.

3. Cliquer sur **Next** (suivant).



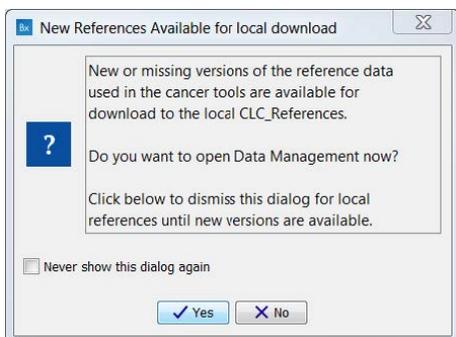
4. Choisir le dossier contenant les fichiers FASTQ, cocher **Batch** (lot) et cliquer sur la flèche bleue  pour sélectionner le dossier.
5. Cliquer sur **Next** (suivant).

6. Vérifier que 13 éléments sont bien sélectionnés dans le panneau **Units** (unités). Cliquer sur **Next** (suivant).



Remarque : lors de la première utilisation du flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD, les données de référence doivent être sélectionnées dans le dossier **CLC_References**.

Lors de la première ouverture du Biomedical Genomics Workbench, une boîte de dialogue s'affiche indiquant que les données de référence peuvent être téléchargées vers le répertoire **CLC_References** local ou sur serveur.

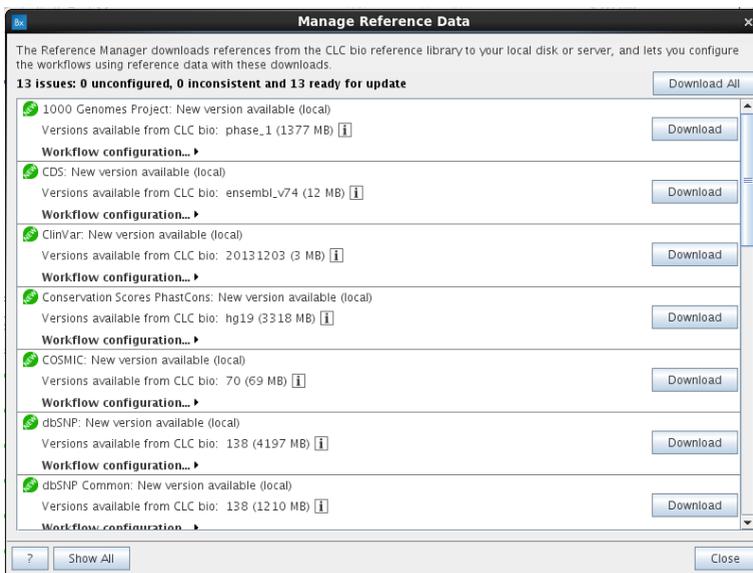


Cliquer sur **Yes** (oui). L'assistant **Manage Reference Data** (gérer les données de référence) s'ouvre alors.

Il est également possible d'accéder à cet assistant à partir du coin supérieur droit du logiciel Biomedical Genomics Workbench en cliquant sur **Data Management** (gestion des données).



Pour installer les données de référence, cliquer sur **Data Management** et télécharger les bases de données de référence ci-dessous : 1000 Genomes Project, CDS, ClinVar, Conservation Scores PhastCons, Cosmic, dbSNP, dbSNP Common, Genes, HapMap, mRNA, Sequence, Target Primers, Target Regions.



Consulter le *Biomedical Genomics Workbench Application Manual* (Manuel d'application du Biomedical Genomics Workbench), Section 4.1 « Reference data » (données de référence) pour de plus amples informations.

Sélectionner les données de référence dans **CLC_References** pour réaliser les étapes 7 à 22 ci-dessous.

Par exemple, pour l'étape 7, l'entrée du flux de travail pour le CDS doit être sélectionnée à partir du chemin suivant :

CLC_References/homo_sapiens/cds/ensemble_V74/Homo_sapiens_ensembl_v74_CDS

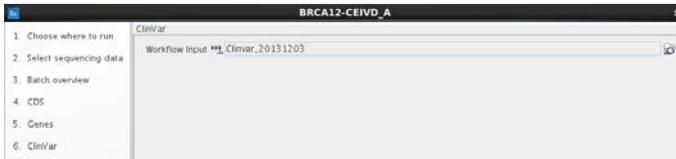
Remarque : après la première utilisation, pour les 16 étapes suivantes (7 à 22), il suffit de cliquer sur **Next** (suivant) au bas des écrans qui s'affichent successivement.



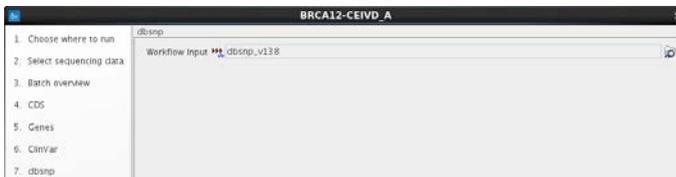
7. Cliquer sur **Next** (suivant).



8. Cliquer sur **Next** (suivant).



9. Cliquer sur **Next** (suivant).



10. Cliquer sur **Next** (suivant).



11. Cliquer sur **Next** (suivant).



12. Cliquer sur **Next** (suivant).



13. Cliquer sur **Next** (suivant).



14. Cliquer sur **Next** (suivant).



15. Cliquer sur **Next** (suivant).



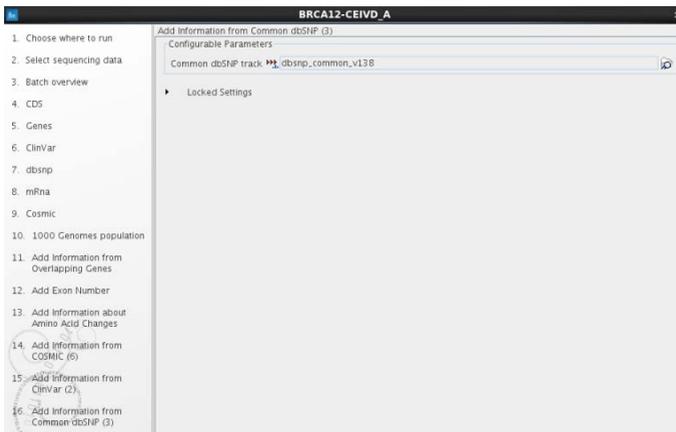
16. Cliquer sur **Next** (suivant).



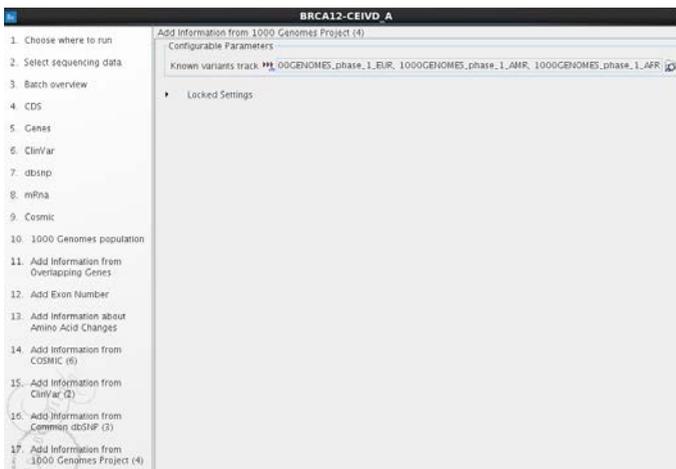
17. Cliquer sur **Next** (suivant).



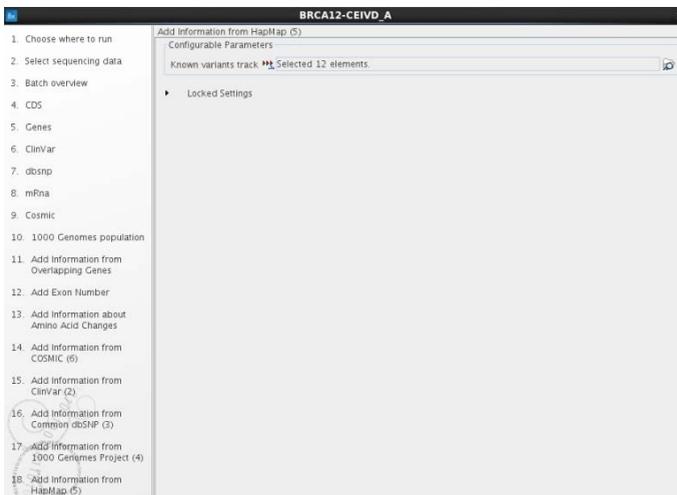
18. Cliquer sur **Next** (suivant).



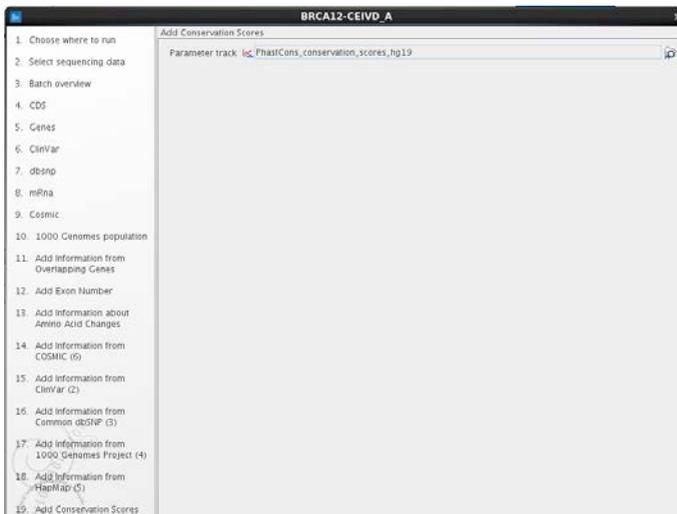
19. Cliquer sur **Next** (suivant).



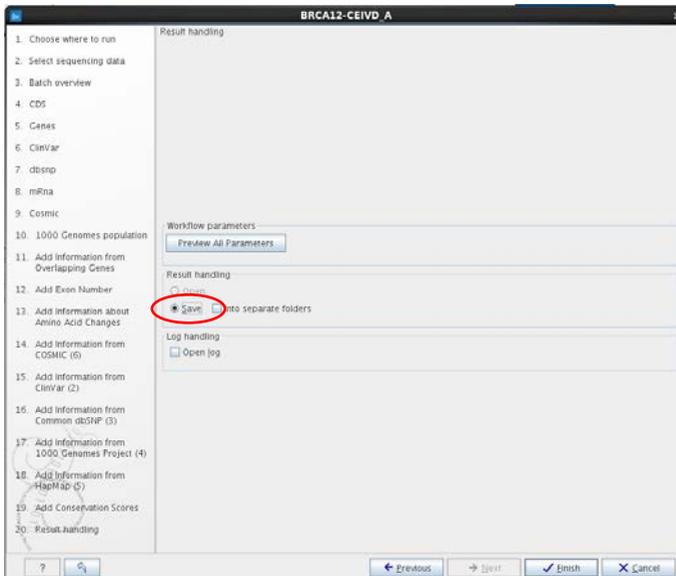
20. Cliquer sur **Next** (suivant).



21. Cliquer sur **Next** (suivant).



22. Cliquer sur **Next** (suivant).



23. Sélectionner **Save** (enregistrer) puis cliquer sur **Finish** (terminer). L'analyse des séquences commence.

Une fois l'analyse des séquences terminée et avant de passer à l'analyse des variantes :

- vérifier que le nombre minimum de lectures par amplicon pour le contrôle positif est > 200x.

Cela indique une homogénéité suffisante entre les amplicons des gènes *BRCA1/BRCA2*.

- Vérifier que le nombre minimum de lectures par amplicon pour les échantillons est > 200x.

IMPORTANT : nous recommandons de n'utiliser que les cibles dont la couverture est > 200 lectures pour l'analyse finale. La couverture minimale obtenue par amplicon peut être consultée dans le rapport « Locally realigned trimmed reads read mapping (coverage) region statistics » (statistiques par région de la cartographie (couverture) des lectures trimmed réalignées localement).

La spécificité de lecture correspond au pourcentage de lectures alignées sur la région cible. Pour calculer la spécificité de séquençage et vérifier qu'elle est suffisante, ouvrir le « Mapping summary report » (rapport récapitulatif de la cartographie) (voir Tableau 7) afin d'identifier le nombre total de lectures puis ouvrir le « Coverage summary report » (rapport récapitulatif de la couverture). Les données correspondant aux lectures alignées sur la région cible sont indiquées dans la section « Target regions overview » (vue d'ensemble des régions cibles) du « Coverage summary report » (voir Tableau 8). Dans le cas de l'exemple, la spécificité de lecture est de 92 %. Nous recommandons une spécificité de lecture > 80 %.

Tableau 7. Mapping summary report (rapport récapitulatif de la cartographie)

Statistiques sommaires					
	Nombre	Pourcentage de lectures	Longueur moyenne	Nombre de bases	Pourcentage de bases
Références	25	–	123 827 759,24	3 095 693 981	–
Lectures cartographiées	3 012 232	98,91 %	143,92	433 521 188	99,16 %
Lectures non cartographiées	33 274	1,09 %	110,32	3 670 839	0,84 %
Lectures appariées	2 962 962	97,29 %	148,38	426 681 289	97,60 %
Lectures mésappariées	49 270	1,62 %	138,82	6 839 899	1,56 %
Lectures totales	3 045 506	100 %	143,55	437 192 027	100 %

Tableau 8. Vue d'ensemble des régions cibles

Référence	Nombre total de lectures cartographiées	Lectures cartographiées dans la région cible	Spécificité (%)	Nombre total de lectures cartographiées, en excluant les lectures ignorées	Nombre total de lectures cartographiées dans la région cible, en excluant les lectures ignorées	Spécificité, en excluant les lectures ignorées (%)
1	0	0	–	0	0	–
2	0	0	–	0	0	–
3	0	0	–	0	0	–
4	0	0	–	0	0	–
5	0	0	–	0	0	–
6	0	0	–	0	0	–
7	0	0	–	0	0	–
8	0	0	–	0	0	–
9	0	0	–	0	0	–
10	0	0	–	0	0	–
11	0	0	–	0	0	–
12	0	0	–	0	0	–
13	1 606 916	1 606 916	100,0	1 606 916	1 606 916	100,0
14	0	0	–	0	0	–
15	0	0	–	0	0	–
16	0	0	–	0	0	–
17	1 200 127	1 200 127	100,0	1 200 127	1 200 127	100,0
18	0	0	–	0	0	–
19	0	0	–	0	0	–
20	0	0	–	0	0	–
21	0	0	–	0	0	–
22	0	0	–	0	0	–
X	0	0	–	0	0	–
Y	0	0	–	0	0	–
MT	0	0	–	0	0	–
Total	2 807 043	2 807 043	100,0	2 807 043	2 807 043	100,0

Critères de contrôle qualité

- On doit observer une couverture minimale de 200x par amplicon pour le contrôle positif NA12878.

La profondeur de lecture est suffisante pour la couverture entre les amplicons pour garantir la validation de l'analyse de séquençage et de l'alignement des séquences.

- On doit observer une couverture minimale de 200x par amplicon pour les échantillons. Cela garantit l'homogénéité de la couverture et la qualité des échantillons.
- Pour assurer la spécificité des amorces, > 80 % des lectures doivent être alignées sur la région cible pour le contrôle positif NA12878.
- Pour assurer la spécificité des amorces, > 80 % des lectures doivent être alignées sur la région cible pour les échantillons.

Si ces critères de contrôle qualité ne sont pas remplis, se reporter au « Guide de dépannage », page 45.

Interprétation des résultats

Pour chaque échantillon, exporter le fichier VCF (Variant Call Format) conformément aux instructions décrites ci-dessous, et le soumettre à la base de données des variantes des gènes *BRCA1/BRCA2* de votre choix afin de déterminer la signification clinique des variantes. Afin de déterminer si les variantes ont un impact pathologique clinique, vérifier si la variante détectée figure dans la liste des variantes faux positifs identifiées (voir « Variantes faux positif », page 62, et Tableau 16, page 67).

Faire attention au type de séquence dans lequel une variante est trouvée :

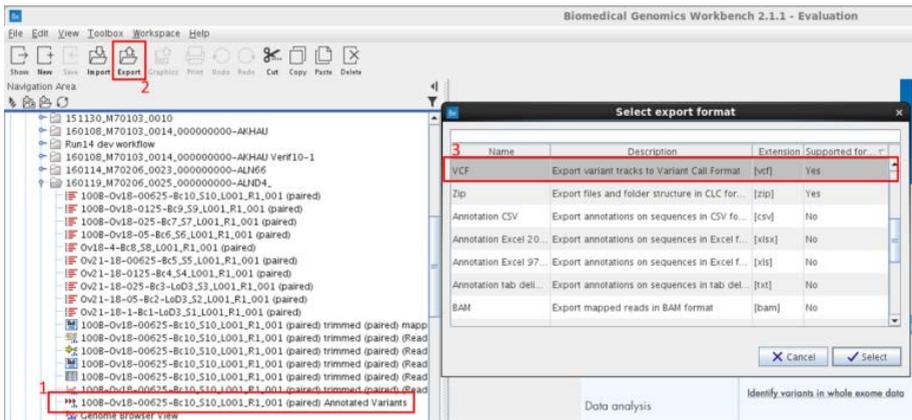
- Séquence intronique
- Séquence exonique
- Séquence adjacente/flanquante (= 20 nt avant ou après la région cible)
- Homopolymère
- Région d'un tronçon de nucléotides

Remarque : les homopolymères (> 6 nucléotides) et les régions de tronçons de nucléotides (répétitions de dinucléotides ou de trinucléotides) sont des sources de faux positifs. Les variantes correspondantes doivent être évaluées avec précaution. Nous recommandons de réaliser une analyse de confirmation avec une autre méthode de séquençage (séquençage Sanger, par exemple).

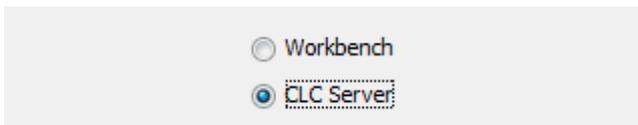
Remarque : l'interprétation des variantes doit être effectuée par un généticien clinicien.

Exportation d'un fichier VCF

1. Sélectionner le fichier « Annotated Variants » (variantes annotées) dans le panneau **Navigation Area** (zone de navigation) (1).
2. Cliquer sur le bouton **Export** (exporter) dans la barre d'outils (2).
3. Dans la fenêtre **Select export format** (sélectionner le format d'exportation), choisir **VCF** (3) et cliquer sur **Select** (sélectionner).

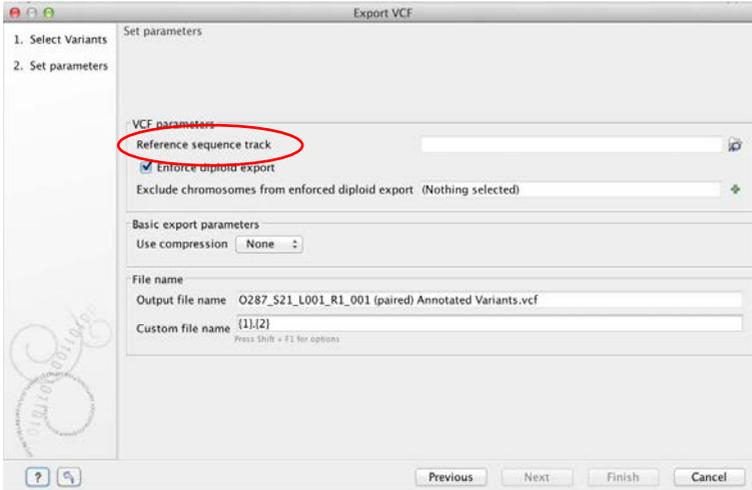


4. En cas de connexion sur un serveur CLC, un message demandant si la tâche d'exportation doit être exécutée en utilisant le logiciel Workbench ou le serveur CLC s'affiche. Sélectionner **Workbench** ou **CLC Server**.



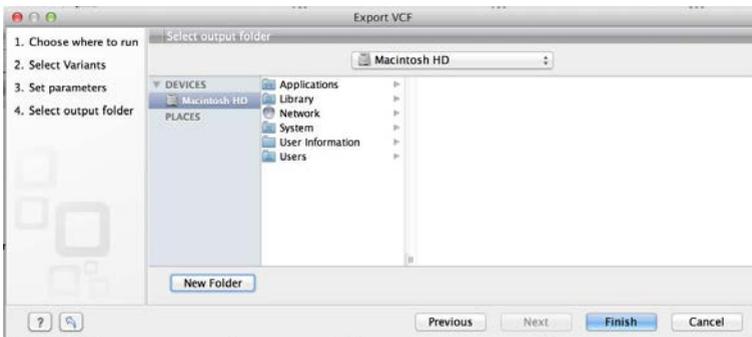
5. Cliquer sur **Next** (suivant).

6. Confirmer la sélection des données à exporter. La boîte de dialogue **Export VCF** (exporter les fichier VCF) s'ouvre.



Remarque : lors de la première utilisation, il est nécessaire de sélectionner **Reference sequence track** (suivre la séquence de référence) à partir du chemin suivant : **CLC_References/homo_sapiens/sequence/hg19/Homo_sapiens_sequence_hg19**.

7. Cliquer sur **Next** (suivant).



8. Sélectionner le dossier d'exportation et cliquer sur **Finish** (terminer).

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser lors de l'évaluation de l'état mutationnel *BRCA1/2* au moyen du kit *therascreen BRCA1/2* NGS FFPE gDNA. Pour obtenir des informations de contact, voir quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com.

Pour toute information relative au dépannage des autres kits, prière de se reporter aux manuels des kits correspondants.

Pour toute information concernant le dépannage de l'instrument Illumina MiSeqDx et les logiciels correspondants, y compris le Biomedical Genomics Workbench et le flux de travail *BRCA 1/2 CE-IVD*, prière de se référer aux guides et manuels de l'utilisateur correspondants.

Commentaires et suggestions

Faible rendement de l'ADN cible

- a) Vérifier la concentration en ADNg
- Nous recommandons l'utilisation d'un fluoromètre pour la quantification de l'ADNg à partir du matériel initial FFPE.
- La concentration d'ADNg doit être $> 2,5$ ng/ μ l pour garantir une quantité suffisante d'échantillons pour les expériences en aval. Le kit est optimisé pour 10 ng d'ADNg par réaction PCR cible (40 ng au total).

Commentaires et suggestions

- | | | |
|----|---|---|
| b) | Vérifier la concentration de contrôle positif après le pooling et la purification par amplification PCR de la cible (T-PCR) | Si la concentration du contrôle positif NA12878 est inférieure à 20 ng/µl, une erreur a pu survenir pendant la T-PCR ou pendant l'étape de pooling et de purification des échantillons.

Répéter l'étape de T-PCR pour tous les échantillons. |
| c) | Vérifier la concentration des échantillons après le pooling et la purification par T-PCR | Une concentration d'échantillons inférieure au critère de contrôle qualité de 4 ng/µl pourrait indiquer une dégradation de l'ADN.

Répéter l'extraction d'ADN des échantillons ayant échoué. |

Faibles rendements de la bibliothèque

- | | | |
|----|-------------------------------------|--|
| a) | Vérifier les rendements de la T-PCR | Après la T-PCR et avant de passer à la préparation de la bibliothèque, les concentrations du contrôle positif et des échantillons doivent être > 20 ng/µl et > 4 ng/µl, respectivement. <ul style="list-style-type: none">● Si la concentration du contrôle positif est trop faible, répéter l'étape de T-PCR pour tous les échantillons.● Si la concentration d'un échantillon est trop faible, répéter l'extraction d'ADN de cet échantillon. |
|----|-------------------------------------|--|

Commentaires et suggestions

- b) Vérifier la concentration du contrôle positif après les étapes de préparation de la bibliothèque et de sélection de la taille
- Au moyen d'un kit de quantification de bibliothèque qPCR compatible avec Illumina, quantifier les bibliothèques purifiées et dont la taille a été sélectionnée. Répéter la quantification de la bibliothèque si les critères de contrôle qualité ne sont pas remplis.
- Si la concentration du contrôle positif NA12878 est inférieure à 120 nM, une erreur peut être survenue lors de l'étape de préparation de la bibliothèque, de sélection de la taille, d'amplification PCR ou de purification PCR.
- Relancer la construction de la bibliothèque à partir de l'ADNg pour tous les échantillons.
- c) Vérifier la concentration des échantillons après les étapes de préparation de la bibliothèque et de sélection de la taille
- Au moyen d'un kit de quantification de bibliothèque qPCR compatible avec Illumina, quantifier les bibliothèques purifiées et dont la taille a été sélectionnée. Faire attention aux critères de contrôle qualité qPCR décrits dans le protocole.
- Si une concentration d'échantillon est inférieure à 80 nM, une erreur peut être survenue pendant l'étape de préparation de la bibliothèque, de sélection de la taille, d'amplification PCR ou de purification PCR.
- Relancer la construction de la bibliothèque à partir de l'ADNg pour cet échantillon.

Commentaires et suggestions

Faible sortie de données de séquençage (lectures totales < 3 Gb)

Vérifier la quantité du matériel de bibliothèque ajouté à la cartouche de séquençage Illumina

Pour éviter les erreurs de lectures de certaines parties de la région cible des gènes *BRCA1/2*, une sortie de données de séquençage de 3 Gb au total est recommandée. Si le critère de qualité de 3 Gb n'est pas rempli, recommencer le protocole à partir de l'étape de quantification de la bibliothèque.

Vérifier les images du Flow Cell Illumina conformément aux instructions du fabricant.

- Si la bibliothèque est surchargée (densité des amplifiats saturée), réduire la quantité de bibliothèques rassemblées en pool ajoutées à la cartouche.
- Si la densité des amplifiats est faible, augmenter la quantité de bibliothèques rassemblées en pool ajoutées à la cartouche.

Faible spécificité du séquençage (% de lectures alignées sur la région cible des gènes *BRCA1/2*)

Vérifier la taille moyenne des bibliothèques purifiées et dont la taille a été sélectionnée

Si le critère de qualité de 80 % de spécificité n'est pas rempli, évaluer la qualité de la purification en analysant la taille du fragment de la bibliothèque. La taille moyenne de l'amplicon doit être d'environ 280 pb.

Redémarrer le protocole à partir de la T-PCR.

Commentaires et suggestions

Faible couverture des lectures

Vérifier la couverture minimale par amplicon

Si le critère de qualité de couverture 200x n'est pas rempli, nous recommandons :

- de vérifier que les 4 réactions d'amplification PCR de la cible ont été rassemblées en pool à des volumes équivalents ;
- de vérifier l'homogénéité des lectures en termes de nombre de lectures obtenues par échantillon pour les 10 échantillons plus le contrôle positif.

Contamination du contrôle négatif (no template control, NTC)

a) Vérifier la NTC après la T-PCR

Si l'échantillon est détecté dans le NTC, une contamination peut être survenue lors de la T-PCR ou lors de l'étape de pooling et de purification.

Redémarrer la T-PCR.

b) Vérifier la concentration de NTC après les étapes de préparation de la bibliothèque et de sélection de taille

Si la concentration du contrôle négatif NTC est inférieure à 1 nM, une contamination peut être survenue lors de l'étape de préparation de la bibliothèque, de sélection de la taille, d'amplification PCR ou de purification PCR.

Redémarrer la T-PCR.

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Limitations

Ce kit est réservé à un usage professionnel.

Le produit est destiné à être utilisé uniquement par le personnel ayant reçu les instructions et la formation spécialement liées aux techniques de biologie moléculaires et étant familiarisé avec cette technologie.

Ce kit doit être utilisé selon les instructions données dans ce manuel, en combinaison avec les instruments validés mentionnés sous « Matériel nécessaire mais non fourni Analyse », page 8.

Il est important de respecter les dates de péremption imprimées sur les boîtes et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants périmés.

Le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA n'est validé que pour les tissus fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine.

L'Illumina MiSeqDx est le seul système validé pour le séquençage des bibliothèques d'échantillons.

Toute utilisation non conforme avec les informations portées sur l'étiquetage ou la notice de ce produit et/ou modification de l'un de ses composants décharge QIAGEN de toute responsabilité.

L'utilisateur est responsable de la validation des performances du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire qui ne sont pas couvertes par les études de performances de QIAGEN.

La détection des mutations dépend de l'intégrité des échantillons, du contenu tumoral et de la quantité d'ADN amplifiable présent dans le prélèvement.

Le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA associé au flux de travail de l'analyse ne convient pas à une analyse de la variabilité du nombre de copies.

Tout résultat de diagnostic généré avec le produit doit être interprété en tenant compte de tout autre résultat clinique ou de laboratoire correspondant.

Caractéristiques des performances

IMPORTANT : Les caractéristiques des performances du test pour le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA ont été obtenues sur l'outil de génération de rapports du logiciel Biomedical Genomics Workbench avec le flux de travail BRCA 1/2 CE-IVD. Le flux de travail doit être soumis dans son intégralité à une vérification indépendante effectuée par le laboratoire utilisateur avant d'être adopté dans la pratique courante.

Plage de couverture des rapports générés pour le test

Le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA est conçu pour couvrir toutes les régions codantes des gènes *BRCA1* et *BRCA2*, plus au moins 20 pb flanquant chaque exon codant. Le Tableau 9 fournit des informations sur la couverture offerte par le kit.

Tableau 9. Informations relatives à la couverture

Couverture	Nombre de valeurs	FFPE	NA12878
		82 échantillons	67 échantillons
Couverture minimale	Minimum	1 863	813
	Médiane	5 624	4 725
	Moy.	5 591	5 187
	Maximum	11 890	14 187
	% de données avec une couverture $\geq 200\times$	100 %	100 %
Couverture minimale normalisée* (équivalente à 3 Go de données par analyse de séquençage)	Minimum	1 142	539
	Médiane	3 499	3 124
	Moy.	3 494	3 416
	Maximum	7 383	9 211
	% de données avec une couverture $\geq 200\times$	100 %	100 %

* La couverture des amplicons par analyse de séquençage a été normalisée en multipliant la couverture minimale obtenue avec le kit par le rapport : 3 Gb (sortie de données de séquençage minimale recommandée/sortie de données de séquençage de l'analyse, en Gb).

Uniformité de l'amplification

Sur 82 ensembles de données d'échantillons FFPE, les données ont montré que 99,29 % des positions ciblées sont couvertes par un nombre de lectures supérieur de 20 % à la profondeur moyenne de couverture (intervalle de prévision à 95 % : 96,81-100 %).

Substances interférentes

Les réactifs du kit d'extraction d'ADN FFPE et les substances potentiellement interférentes des échantillons FFPE ont été analysés afin de déterminer leur effet potentiel sur les performances du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA. Aucun effet des conditions ou substances interférentes n'a été observé sur les performances d'après la quantification de l'ADN et de la bibliothèque, la sortie de données de séquençage ou la détection des variantes.

Contamination croisée

La ligation de séquences d'oligonucléotides spécifiques est utilisée pour la génération des amplifiats Illumina et l'identification des échantillons. L'utilisation en alternance de 2 séries de 12 codes-barres entre les analyses successives permet de réduire le risque de contamination.

Les échantillons marqués d'un code-barres issu de la première série d'adaptateurs ont été utilisés dans une analyse de séquençage, l'Analyse 1. Deux autres analyses de séquençage ont ensuite été réalisées sans échantillon, l'Analyse 2 et l'Analyse 3, et les codes-barres restants de la première série ont été quantifiés dans l'Analyse 2 et l'Analyse 3 afin de mesurer la contamination croisée entre les analyses. La même expérience a été réalisée avec la seconde série de codes-barres. Le pourcentage global de contamination croisée entre analyses a été déterminé en comparant le rapport entre le nombre de lectures obtenues avec l'Analyse 1 et l'Analyse 3 avec les deux séries de codes-barres, en considérant que le client utilise les deux séries de codes-barres disponibles en alternance.

La contamination inter-analyse, définie comme le pourcentage de lectures des échantillons de l'Analyse 1 toujours détectés dans l'Analyse 3 (sans échantillon), était de 0,43 % et de 0,47 % pour la première série de codes-barres et pour la seconde série de codes-barres, respectivement.

Lectures sur cible (spécificité du test)

On entend par lectures sur cible le pourcentage de lectures alignées sur la région cible par rapport au nombre total de lectures obtenues par échantillon. Ce pourcentage est calculé comme suit :

$$\text{Lectures sur cible (\%)} = \frac{\text{Nombre de lectures alignées sur la région cible} \times 100}{\text{Nombre total de lectures}}$$

Les statistiques sur cible ont été obtenues à partir de 82 ensembles de données générés en utilisant 52 extraits d'ADN dérivé de tissu FFPE en utilisant 3 lots de kits différents. En moyenne, 94,51 % des lectures étaient alignées sur la région cible (Tableau 10).

Tableau 10. Lectures sur cible (spécificité du test)

Moyenne	Minimum	Maximum	Écart-type
94,51 %	87,67 %	96,17 %	1,4 %

Précision du test

La répétabilité (précision intra-analyse) et la reproductibilité (précision inter-analyses) du test ont été évaluées en termes de fréquence d'allèles (FA). Deux échantillons mélangés ont été produits afin de générer un maximum de variantes avec une fréquence d'allèles attendue comprise entre 5 et 15 %. Ces échantillons ont été testés en double lors de 6 analyses de séquençage, sur 2 plateformes MiSeqDx (reproductibilité inter-instruments), à l'aide de 3 opérateurs (reproductibilité inter-opérateurs) et de 3 lots de kits (variabilité inter-lots).

L'objectif était de déterminer les pourcentages respectifs de variabilité totale introduite à chaque niveau : lot, opérateur, instrument, réplicats. L'analyse des composantes de la variance indique que la composante principale de la variance totale est la répétabilité ; en d'autres termes, elle provient des duplicats intra-analyse (voir Tableau 11, colonne É_r).

Tableau 11. Compilation de toutes les variantes détectées dans les 36 ensembles de données pour 2 échantillons

Position de la variante et allèle de référence > Allèle de la variante	FA attendue	FA moyenne calculée (n = 36)	É.-T.*	CV* (%)	É _r *	É _i *	É _o *	É _{in} *	É _{total} *	Fiabilité [†]
S1/32913055 A>G	99,9	99,9	0,06	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	0,06	100,00
S2/32913055 A>G	99,9	99,9	0,05	0,05	0,05	0,01	0,02	0,01	0,05	84,18
S1/32929387 T>C	99,9	99,7	0,16	0,16	0,11	0,09	0,12	0,02	0,18	33,41
S2/32915005 G>C	99,9	99,7	0,38	0,38	0,26	0,22	0,29	0,00	0,44	34,25
S2/32929387 T>C	99,9	99,7	0,19	0,19	0,15	0,10	0,12	0,00	0,21	47,81
S1/32915005 G>C	99,9	99,7	0,45	0,46	0,31	0,27	0,33	0,00	0,53	34,18
S2/32906729 A>C	90,3	90,1	0,85	0,95	0,80	0,00	0,00	0,36	0,88	83,49
S1/32906729 A>C	88,6	91,8	0,70	0,76	0,64	0,00	0,34	0,00	0,73	78,30
S1/32936646 T>C	54,5	52,5	1,78	3,40	1,54	0,48	0,69	0,74	1,90	65,44
S2/32936646 T>C	51	50,2	1,90	3,78	1,40	0,18	1,17	1,02	2,09	44,49
S1/32913691 C>T	43,9	46,2	1,68	3,64	1,56	0,00	0,25	0,72	1,73	80,86
S1/41251931 G>A	42,5	43,1	1,31	3,04	1,11	0,00	0,71	0,46	1,40	63,31
S2/32913691 C>T	42,3	44,9	1,27	2,84	1,10	0,00	0,79	0,00	1,35	65,87

Position de la variante et allèle de référence > Allèle de la variante	FA attendue	FA moyenne calculée (n = 36)	É.-T.*	CV* (%)	Ér*	Éi*	Éo*	Éin*	Étotal*	Fiabilité†
S2/41251931 G>A	41	43,5	1,75	4,01	1,39	0,00	1,23	0,33	1,89	54,60
S2/41244000 T>C	14,3	9,6	0,99	10,27	0,99	0,00	0,00	0,00	0,99	100,00
S2/41231516 C>T	14,2	12,9	0,94	7,29	0,65	0,00	0,65	0,50	1,05	39,14
S2/41219780 T>C	14,2	12,2	0,98	8,05	0,91	0,00	0,44	0,00	1,01	81,35
S2/41219804 T>C	14,2	12,2	0,97	7,95	0,91	0,00	0,41	0,00	1,00	83,03
S2/41244435 T>C	14,2	11,9	0,66	5,58	0,62	0,00	0,11	0,25	0,68	83,56
S2/41245466 G>A	14,2	11,8	0,96	8,17	0,93	0,00	0,21	0,16	0,97	92,56
S2/41234470 A>G	14,2	11,7	0,57	4,90	0,54	0,00	0,15	0,19	0,59	83,18
S2/41245237 A>G	14,2	11,6	1,12	9,65	1,07	0,00	0,21	0,33	1,14	88,24
S2/41244936 G>A	14,2	11,5	0,87	7,55	0,73	0,00	0,40	0,39	0,92	62,78
S2/41223094 T>C	14,2	11,4	0,65	5,70	0,62	0,00	0,22	0,00	0,66	88,91
S2/41215416 T>C	13,6	9,3	0,78	8,43	0,78	0,00	0,00	0,00	0,78	100,00
S1/32890572 G>A	9,6	6,6	0,72	10,95	0,72	0,00	0,11	0,00	0,72	97,88
S2/32929232 A>G	9,5	12,4	0,76	6,13	0,76	0,00	0,00	0,00	0,76	100,00
S1/32929232 A>G	9,5	6,7	0,68	10,07	0,68	0,00	0,00	0,00	0,68	100,00
S2/32911888 A>G	9,4	9,5	0,60	6,33	0,52	0,13	0,35	0,00	0,64	65,08
S2/32890572 G>A	9,4	9,1	0,88	9,72	0,80	0,08	0,19	0,40	0,92	76,65
S1/32911888 A>G	9,3	6,2	0,45	7,33	0,42	0,00	0,03	0,20	0,47	81,41

Position de la variante et allèle de référence > Allèle de la variante	FA attendue	FA moyenne calculée (n = 36)	É.-T.*	CV* (%)	Ér*	Éi*	Éo*	Éin*	Étotal*	Fiabilité†
S1/32914236 C>T	9,3	5,8	0,60	10,27	0,55	0,00	0,26	0,12	0,62	78,49
S2/32915411 32915414 AATT>	9,2	9,7	0,76	7,83	0,70	0,00	0,26	0,26	0,79	78,35
S1/32915411 32915414 AATT>	9,2	5,6	0,51	9,03	0,50	0,00	0,11	0,00	0,51	95,65
S2/32907259 G>A	9,0	9,6	0,53	5,52	0,53	0,00	0,00	0,08	0,53	97,53
S1/41244936 G>A	5,7	7,0	0,70	9,96	0,57	0,00	0,48	0,00	0,75	59,27
S1/41219780 T>C	5,6	6,9	0,78	11,23	0,73	0,00	0,00	0,33	0,80	83,21
S1/41219804 T>C	5,6	6,9	0,77	11,20	0,72	0,00	0,00	0,34	0,80	81,37
S1/41245237 A>G	5,6	6,6	0,68	10,39	0,69	0,00	0,00	0,00	0,69	100,00
S1/41244000 T>C	5,6	6,4	0,42	6,54	0,41	0,00	0,04	0,10	0,42	93,21
S1/41223094 T>C	5,5	6,3	0,46	7,29	0,44	0,00	0,18	0,00	0,47	85,03
S1/41245471 C>T	5,4	6,6	0,72	10,90	0,67	0,15	0,28	0,00	0,74	81,60
S1/41234470 A>G	5,4	6,5	0,56	8,61	0,54	0,00	0,09	0,15	0,57	90,40
S1/41245466 G>A	5,4	6,5	0,68	10,55	0,62	0,00	0,35	0,00	0,71	75,93
S1/41231516 C>T	5,4	6,4	0,62	9,81	0,54	0,00	0,35	0,13	0,66	68,51
S1/41244435 T>C	5,4	6,3	0,66	10,61	0,63	0,00	0,24	0,00	0,68	87,22
S2/32913603 G>A	5,3	4,9	0,68	14,02	0,65	0,00	0,25	0,10	0,70	85,68

* É.-T. : écart-type ; CV : coefficient de variation (Étotal/Moyenne) ; Ér : É.-T. répétabilité (précision intralot) ; Éi : É.-T. inter-lots ; Éo : É.-T. inter-opérateurs ; Éin : É.-T. inter-instruments ; Étotal : É.-T. total (précision intra-laboratoire).

† Fiabilité = (Ér²/Étotal²) × 100

Limite de détection (LoD)

Valeur seuil du test

La valeur seuil du test pour la fréquence des allèles a été définie comme la fréquence d'allèles minimum pour laquelle 99,9 % des variantes détectées sont des variantes réellement positives après l'élimination des variantes faux-positifs décrites dans les Tableaux 13, 14 et 16. La valeur seuil de la fréquence des allèles des variantes (FAV) a été calculée à 5,75 % pour 53 échantillons déjà caractérisés auparavant : 13 échantillons obtenus à partir du répertoire du Coriell Institute for Medical Research et 20 échantillons cliniques FFPE testés en double en utilisant 3 lots de kits.

Pour démontrer que le test peut détecter une FAV de 1,5 %, 4 échantillons d'ADN dérivés de tissu tumoral FFPE individuels ont été mélangés en différentes proportions avec un autre échantillon d'ADN dérivé de tissu tumoral FFPE. Pour reproduire une réduction de l'homogénéité entre les échantillons multiplexés, des analyses de séquençage ont été réalisées avec des quantités décroissantes de matériel de la bibliothèque d'échantillon allant de 4 nM (la quantité recommandée) à 0,125 nM de bibliothèque chargée dans la cartouche. La quantité totale de bibliothèque a été maintenue à une concentration constante de 4 nM en augmentant la quantité d'ADN du contrôle positif NA12878.

La sensibilité du test a été calculée par l'analyse Probit et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 12. Pour une quantité de bibliothèque de 4 nM, le test détecte les variantes à une FAV de 1,54 %.

Tableau 12. Sensibilité du test : FAV minimale détectée avec une quantité de bibliothèque décroissante

Quantité de bibliothèque (échantillon)	LOD FAV
4 nM	1,54 %
2 nM	1,54 %
1 nM	1,54 %
0,5 nM	1,93 %
0,25 nM	3,16 %
0,125 nM	3,88 %

Couverture minimale pour détecter une FAV à 5,75 %

La couverture minimale (nombre total de lectures) requise pour obtenir la valeur seuil de FAV de 5,75 % a été évaluée. Quatre échantillons individuels d'ADN dérivé de tissu tumoral FFPE ont été mélangés en différentes proportions avec un autre échantillon d'ADN dérivé de tissu tumoral FFPE afin d'obtenir des valeurs FAV comprises entre 5,25 % et 6,25 %, avec une FAV médiane estimée de 5,75 %. Plusieurs analyses de séquençage ont été réalisées avec des dilutions en séries de deux fois du même ensemble d'échantillons mélangés avec des quantités de bibliothèque allant de 4 nM à 0,015625 nM. Par exemple, si une couverture de 15 000x est obtenue avec une quantité de bibliothèque de 4 nM, la même variante sera détectée 59x avec une quantité de 0,015625 nM.

L'analyse Probit a été utilisée pour déterminer la limite de détection de chaque classe de fréquence d'allèles avec une méthode conforme aux recommandations formulées dans la norme NCCLS EP17-A2 (20). La valeur finale correspond à la couverture nécessaire pour détecter la fréquence d'allèles avec un indice de confiance de 95 %. La Figure 9 en représente graphiquement un exemple.

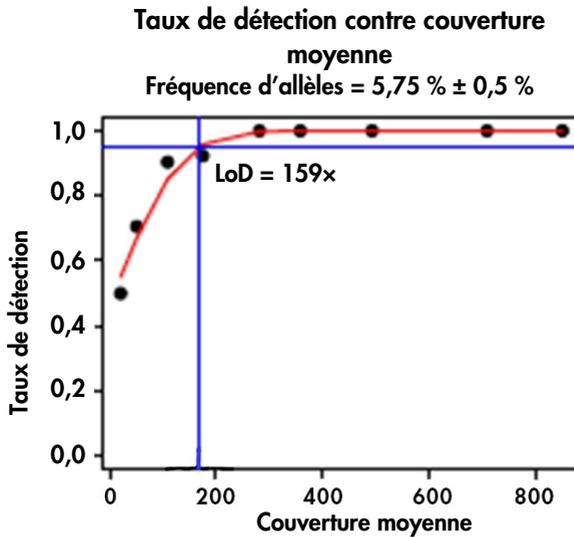


Figure 9. Analyse Probit. Le taux de détection correspond au pourcentage de variantes détectées d'après la couverture.

200 lectures par position sont nécessaires au minimum pour détecter une FAV à 5,75 %. (La limite de détection était de 159x, arrondie à 200x.)

Précision

La précision a été estimée à partir d'échantillons déjà caractérisés auparavant, parmi lesquels des échantillons d'ADN du répertoire du Coriell Institute for Medical Research et de l'ADN extrait d'échantillons de tissu tumoral ovarien FFPE.

- Ensemble 1 : 13 échantillons du répertoire Coriell entièrement caractérisés pour la région cible (191 variantes attendues)
- Ensemble 2 : 27 échantillons du répertoire Coriell partiellement caractérisés pour 25 variantes pathogènes (27 variantes attendues)

- Ensemble 3 : 20 échantillons d'ADN extrait d'échantillons de tissu tumoral ovarien FFPE entièrement caractérisés pour la région cible (570 variantes attendues)

Toutes les variantes attendues ont été détectées dans les échantillons Coriell (Ensemble 1 et Ensemble 2), y compris deux grandes délétions de 40 nucléotides dans le gène *BRCA1* (*BRCA1* : c.1175_1214del40 p.Leu392Glnfs).

La précision a été calculée comme suit :

$$\text{Précision (\%)} = \frac{(\text{Nombre de vrais positifs} + \text{Nombre de vrais négatifs}) \times 100}{\text{Région cible (21 150 bases)}}$$

La précision des échantillons FFPE (ensemble 3) a été calculée à 99,988 % en utilisant une approche Probit pour établir le seuil de fréquence d'allèles à 5,75 %.

Limites des variantes

Variantes faux positif

Une liste de 47 variantes faux positif a été établie pour un ensemble d'échantillons déjà caractérisés auparavant : 13 échantillons obtenus à partir du répertoire du Coriell et de 20 échantillons cliniques FFPE testés en double ; n = 53. Les variantes faux positifs surviennent du fait de limites de l'instrument en lien avec les séquences contenant des tronçons homopolymériques > 6 nt et/ou des régions incluant des répétitions de tronçons de dinucléotides et de trinucléotides. Les variantes faux positifs peuvent également correspondre à des artefacts provenant de dimères d'amorces.

Le Tableau 13 dresse la liste de variantes faux positifs pour le gène *BRCA1* sur le chromosome 17. Le Tableau 14 dresse la liste de variantes faux positifs pour le gène *BRCA2* sur le chromosome 13. La position du faux positif (FP) est décrite dans la première colonne (coordonnées Hg19) suivie par les nucléotides de référence (REF) et alternatifs (ALT) identifiés. Le pourcentage d'ensembles de données pour lequel la variante FP a été trouvée (sur 53 ensembles de données) est indiqué dans la colonne « % d'ensemble de données (n = 53) ». Les pourcentages minimum, moyen et maximum de fréquences d'allèles issus des 53 ensembles de données sont indiqués dans les colonnes « FA minimale (%) », « FA moyenne (%) » et « FA maximale (%) ». Les variantes sont réparties en 4 catégories : « Homopol. » (FP de segments homopolymériques > 6 nt), « Dimère d'amorces » (FP d'artefacts de dimères d'amorces), « Segments » (FP de répétitions de dinucléotides et trinucleotides), et « Autre » (FP d'erreurs de séquençage et de synthèse de polymérase).

Tableau 13. Liste des variantes faux positifs (FP) détectées dans le gène *BRCA1* sur le chromosome 17

Région	RÉF	ALT	Type	% d'ensembles de données (n = 53)	FA minimale (%)	FA moyenne (%)	FA maximale (%)	Classification des faux positifs
41231323	C	T	VSN	9,4	1,3	2,0	2,5	Autres
41231324	G	A	VSN	9,4	1,1	1,4	2,6	Autres
41231333	G	C	VSN	7,5	1,0	1,5	1,7	Tronçon
41231352	T	C	VSN	9,4	1,4	1,8	2,1	Autres
41231370	C	A	VSN	5,7	1,1	1,2	1,3	Autres
41231401	C	T	VSN	1,9	1,4	1,4	1,4	Autres
41231404	T	C	VSN	11,3	1,2	2,4	3,8	Autres
41231419	G	A	VSN	9,4	1,3	2,5	3,4	Autres
41242939.41242940	CA	-	Délétion	100	3,1	4,8	6,1	Tronçon
41243524	A	C	VSN	92,5	1,1	1,7	2,7	Dimère d'amorces
41244613	G	A	VSN	3,8	2,0	2,1	2,1	Autres
41245586^41245587	-	T	Insertion	96,2	1,1	1,4	2,4	Homopol.
41245587	T	-	Délétion	100	2,3	3,2	3,9	Homopol.
41246532	T	-	Délétion	13,2	1,0	1,1	1,2	Homopol.
41246926	A	-	Délétion	94,3	1,0	1,4	2,0	Homopol.
41267808	G	-	Délétion	77,4	1,0	1,2	1,5	Homopol.
41276152^41276153	-	AT	Insertion	94,3	1,1	1,5	2,0	Tronçon
41276153.41276154	AT	-	Délétion	100	1,9	2,7	3,3	Tronçon

Tableau 14. Liste des variantes faux positifs (FP) détectées dans le gène *BRCA2* sur le chromosome 13

Région	RÉF	ALT	Type	% d'ensembles de données (n = 53)	FA minimale (%)	FA moyenne (%)	FA maximale (%)	Classification des faux positifs
32893197^32893198	-	T	Insertion	100	4,3	5,6	6,8	Homopol.
32893198	T	-	Délétion	100	11,0	12,6	13,5	Homopol.
32893198.32893199	TT	-	Délétion	5,7	1,1	1,2	1,3	Homopol.
32893318	G	A	VSN	3,8	1,3	1,8	2,2	Autres
32900364	T	-	Délétion	75,5	1,0	1,3	1,9	Homopol.
32905197	T	-	Délétion	18,9	1,0	1,1	1,3	Homopol.
32905219^32905220	-	T	Insertion	100	8,8	10,4	11,4	Homopol.
32905219^32905220	-	TT	Insertion	96,2	1,0	1,2	1,6	Homopol.
32905220	T	-	Délétion	100	19,7	21,1	23,1	Homopol.
32905220.32905221	TT	-	Délétion	100	3,8	4,4	5,4	Homopol.
32907421	A	-	Délétion	94,3	2,2	3,1	3,9	Homopol.
32907535^32907536	-	T	Insertion	100	6,8	7,7	10,0	Homopol.
32907535^32907536	-	TT	Insertion	3,8	1,0	1,1	1,1	Homopol.
32907536	T	-	Délétion	100	21,4	23,8	26,3	Homopol.
32907536.32907537	TT	-	Délétion	100	3,6	4,6	6,2	Homopol.
32911074	A	-	Délétion	11,3	1,0	1,2	1,6	Homopol.
32911443	A	-	Délétion	9,4	1,0	1,1	1,2	Homopol.
32912346	A	-	Délétion	77,4	1,0	1,2	1,5	Homopol.
32913559	A	-	Délétion	100	1,0	1,5	2,0	Homopol.
32913837	A	-	Délétion	18,9	1,0	1,0	1,1	Homopol.
32914828	A	G	VSN	100	2,4	4,1	6,8	Dimère d'amorces
32921032	C	T	VSN	3,8	1,4	1,4	1,4	Autres
32953633	A	-	Délétion	17,0	1,0	1,1	1,3	Homopol.
32954022^32954023	-	A	Insertion	13,2	1,0	1,1	1,2	Homopol.
32954023	A	-	Délétion	100	2,1	3,3	4,1	Homopol.
32954303	T	-	Délétion	100	1,5	2,3	2,8	Homopol.

Région	RÉF	ALT	Type	% d'ensembles de données (n = 53)	FA minimale (%)	FA moyenne (%)	FA maximale (%)	Classification des faux positifs
32968809	T	-	Délétion	96,2	2,3	2,6	3,2	Homopol.
32972287	T	-	Délétion	5,7	1,0	1,1	1,2	Homopol.
32972526	G	A	VSN	3,8	1,4	1,4	1,4	Autres

Variantes faux négatifs

Des paires de bases supplémentaires peuvent être ajoutées (insertions) ou effacées (délétions) de l'ADN d'un gène. Leur nombre peut aller de un à plusieurs milliers. Le terme indel est utilisé pour désigner l'ensemble de ces mutations. La performance du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA a été déterminée d'après la détection de variantes de substitution et de petits indels (≤ 3 nt). Les grands indels (> 3 nt) ont été détectés mais les caractéristiques des performances pour leur détection n'ont pas pu être déterminées.

Le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA associé à ce flux de travail de l'analyse ne convient pas à une analyse de la variabilité du nombre de copies (CNV).

Les sites de liaison des amorces du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sont sélectionnés pour éviter la présence de variantes dans les régions sélectionnées. Ceci n'exclut pas la présence de variantes rares dans un site de liaison d'amorces conduisant à une erreur d'amplification et au masquage de la présence de mutations potentiellement pertinentes sur le plan clinique. En cas de suspicion d'un tel phénomène, nous recommandons de réaliser une analyse de confirmation avec une autre méthode.

Résultats de la validation

L'étude de validation du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA a été réalisée sur des échantillons FFPE de tissu tumoral ovarien en utilisant 2 lots de kits indépendants. Cette étude

a évalué les performances dans des conditions normales d'utilisation : quantité de 40 ng, fréquence d'allèles des variantes seuil de 5,75 % et couverture 200x.

Au total, 171 échantillons de tumeur de l'ovaire FFPE ont été fournis et caractérisés par 3 laboratoires collaborateurs : l'Institut Curie en France, un laboratoire en Allemagne et un autre au Royaume-Uni. Les laboratoires étaient libres d'opter pour la méthode d'identification des variantes des gènes *BRCA1/2* de leur choix, et ils ont utilisé des plateformes, des tests, des logiciels et des algorithmes différents pour détecter les variantes.

Pour caractériser plus précisément les échantillons cliniques, un prestataire de service de séquençage externe a utilisé le test Multiplicom BRCA Tumor MASTR™ Plus Dx afin de fournir des résultats obtenus à partir d'une plateforme bioanalytique indépendante.

Les résultats issus de toutes les méthodes ont permis de classer les variantes comme suit :

- Vrais positifs (VP) : détection de variantes basée sur les données du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA et présente avec au moins une autre méthode
- Vrais négatifs (VN) : aucune variante détectée d'après les résultats obtenus avec le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA ni lors des analyses réalisées par les laboratoires collaborateurs
- Faux positifs (FP) : détection de variantes d'après les données obtenues avec le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA mais pas avec les autres méthodes
- Faux négatifs (FN) : aucune variante détectée d'après les données du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA mais variantes détectées avec au moins une autre méthode

Pour calculer le nombre de variantes faux négatifs, la région cible a été définie comme l'intersection entre les 3 méthodes qui représentent 19 612 nucléotides. Trois variantes uniques extérieures à cette région cible ont été exclues de l'analyse.

Après cette classification, une variante faux négatif et 4 variantes faux positifs ont été observées sur les 2 130 variantes obtenues avec les 3 méthodes. Le résultat discordant pour

le gène *BRCA1* sur le chromosome 17 (faux négatif) est présenté dans le Tableau 15. Les résultats discordants pour le gène *BRCA2* sur le chromosome 13 (faux positifs) sont décrits dans le Tableau 16.

Tableau 15. Résultat discordant d'après 3 méthodes (toutes variantes confondues) pour le gène *BRCA1* sur le chromosome 17

Locus génomique GRCh37	RÉF*	ALT*	Type	FAV* du kit <i>therascreen</i> (%)	FAV attendue (%)	Signification clinique	Classification des variantes
41276067	29	-	Délétion	Non détectée	71,11	Pathogène	Faux négatif

* RÉF : nucléotide de référence ; ALT : nucléotide alternatif ; FAV : fréquence d'allèles des variantes ; VSN : variation d'un seul nucléotide.

Tableau 16. Résultats discordants d'après 3 méthodes (toutes variantes confondues) pour le gène *BRCA2* sur le chromosome 13

Locus génomique GRCh37	RÉF*	ALT*	Type	FAV* du kit <i>therascreen</i> (%)	FAV attendue (%)	Signification clinique	Classification des variantes
32906729	A	C	VSN*	99,83	Non détectée	Inconnu	Faux positif
32912299	T	C	VSN	34,59	Non détectée	Inconnu	Faux positif
32912299	T	C	VSN	71,86	Non détectée	Inconnu	Faux positif
32913709	T	-	Délétion	43,18	Non détectée	Pathogène	Faux positif

* RÉF : nucléotide de référence ; ALT : nucléotide alternatif ; FAV : fréquence d'allèles des variantes ; VSN : variation d'un seul nucléotide.

La variante faux négatif, *BRCA1* g.41276067 c.19_47del29, correspondait à une grande délétion de 29 nucléotides sur le gène *BRCA1* d'un échantillon de tissu tumoral ovarien FFPE. Cette délétion avait déjà été détectée auparavant avec le flux de travail du kit *therascreen* *BRCA1/2* NGS FFPE gDNA sur un échantillon FFPE de vessie.

Trois variantes faux positifs impliquant un seul nucléotide ont été détectées. L'une d'elles était située dans la région *BRCA2* g.32906729 et deux se trouvent dans la région *BRCA2*

g.32912299. Le test Multiplicom a mis en évidence une très faible couverture de ces régions, respectivement de 28x, 38x et 0x. Les recherches dans les fichiers d'alignement des séquences BAM ont montré que les deux variantes sont apparues aux fréquences d'allèles correspondantes : 28/28 (100 % FAV) et 9/38 (24 % FAV) respectivement. Les discordances proviennent probablement d'un décrochage d'amplicon.

La variante faux positif *BRCA2* g.32913709delT se trouve dans le premier nucléotide de l'amplicon. L'amorce d'amplification correspondante s'hybride dans une séquence contenant une véritable variante pathogène g.32913703 del TACT. Cette délétion a été détectée par le test du kit *therascreen* *BRCA1/2* NGS FFPE gDNA et sa présence pourrait expliquer le mauvais alignement de l'amorce conduisant à la libération de cette variante faux positif. Ce faux positif ne conduira jamais à une erreur de classification d'une patiente car il est systématiquement lié à la détection d'une véritable variante pathogène.

Les résultats de cette étude sont présentés dans un tableau de contingence (Tableau 17), et l'évaluation globale de la sensibilité et de la spécificité est décrite dans le Tableau 18.

- La sensibilité clinique correspond à la concordance positive :
 $\text{Vrais positifs} / (\text{Vrais positifs} + \text{Faux négatifs})$
- La spécificité clinique correspond à la concordance négative :
 $\text{Vrais négatifs} / (\text{Faux positifs} + \text{Vrais négatifs})$
- La précision est définie comme la concordance globale entre les résultats du test, ceux des laboratoires collaborateurs et ceux de la troisième méthode :
 $\text{Vrais positifs} + \text{Vrais négatifs} / \text{Nombre de bases dans la région cible}$

Tableau 17. Tableau de contingence avec les performances calculées du kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA

		Résultats des laboratoires collaborateurs et du test Multiplicom (méthode de référence)		
		Positif	Négatif	Total
Résultats du test du kit <i>therascreen</i> BRCA1/2 NGS FFPE gDNA	Positif	2 125 Vrais positifs	4 Faux positifs	2129
	Négatif	1 Faux négatif	3 351 522 Vrais négatifs	3 351 523
Total		2126	3 351 526	3 353 652

Tableau 18. Sensibilité, spécificité et précision entre les méthodes

Paramètre	Résultat	IC à 95 %
Sensibilité	99,9530 %	99,7382-100 %
Spécificité	99,9999 %	99,9997-100 %
Précision	99,9998 %	99,9996-100 %

Références

1. WHO, IARC GLOBOCAN. (2012) Cancer incidence and mortality worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr/>.
2. Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2013) Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **63**, 11–30.
3. Kanchi, K.L. et al. (2014) Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer. *Nature Communications* **5**, 3156.
4. Hennessy, B.T. et al. (2010) Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in OvCa. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3570.
5. Gilks, C.B. and Prat, J. (2009) Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Hum. Pathol.* **40**, 1213.
6. Kurman, R.J. and Shih, le M. (2010) The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. A proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol.* **34**, 433.
7. Pal, T. et al. (2005) BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer* **104**, 2807.
8. Risch, H.A. et al. (2001) Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with OvCa. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 700.
9. Cancer Genome Atlas Research Network. (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609.

-
10. Foley, O.W., Rauh-hain, J.A. and Del Carmen, M.G. (2013) Recurrent epithelial OvCa: an update on treatment. *Oncology* **27**, 288, 298. Review.
 11. Yap, T.A., Carden, C.P. and Kaye, S.B. (2009) Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 167.
 12. Audeh, M.W. et al. (2010) Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent OvCa: a proof-of-concept trial. *Lancet* **376**, 245.
 13. Alsop, K. et al. (2012) BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with OvCa: a report from the Australian OvCa Study Group. *J. Clin. Oncol.* **30**, 2654.
 14. Ledermann, J. et al. (2014) Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous OvCa: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **15**, 852.
 15. Burgess, M. and Puhalla, S. (2014) BRCA 1/2-mutation related and sporadic breast and OvCas: more alike than different. *Front. Oncol.* **4**, 19.
 16. Marth, C. et al. (2015) AGO Austria recommendations for genetic testing of patients with OvCa. *Wien Klin. Wochenschr.* **127**, 652.
 17. Casey, G. (1997) The BRCA1 and BRCA2 breast cancer genes. *Curr. Opin. Oncol.* **9**, 88.
 18. Prat, J. (2012) Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch.* **460**, 237.

-
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006) *Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods: Approved Guideline*, 1st ed. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
 20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Symboles

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l’emballage et l’étiquetage :

Symbole	Définition des symboles
	Numéro de référence
	Fabricant
	Numéro de matériel
Rn	R indique qu’il s’agit d’une révision du manuel et n indique le numéro de révision
	Numéro de lot
	Code article international (GTIN)
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Symbole CE pour la conformité européenne
	À utiliser avant
 <N>	Contient des réactifs suffisants pour N réactions

Symbole

Définition des symboles



Limite de température

COMP

Composants (c.-à-d. liste des éléments inclus)

CONT

Contient (contenu)

NUM

Quantité (flacons, tubes)



Attention



Consulter les instructions d'utilisation



Conserver à l'abri des rayons du soleil

Pour commander

Des informations relatives aux commandes des produits et réactifs supplémentaires nécessaires sont fournies dans le Tableau 1, page 15 de la Partie 1.

Produit	Contenu	N° réf.
<i>therascreen</i> BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit CE (20)	Pour 20 réactions : Pour l'identification de variantes dans les gènes <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i> avec la plateforme Illumina MiSeqDx ; le mélange d'amorces BRCA 1, le mélange d'amorces BRCA 2, le mélange d'amorces BRCA 3, le mélange d'amorces BRCA 4, l'ADN polymérase HotStarTaq, le tampon GR NGS Panel 5x PCR Buffer V2, l'eau sans nucléase servant de contrôle négatif NTC	875011

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Ce kit est destiné au diagnostic *in vitro*. Les produits QIAGEN ne peuvent être revendus, modifiés pour la revente ou utilisés pour fabriquer d'autres produits commerciaux sans l'autorisation écrite de QIAGEN.

Les informations contenues dans ce document peuvent être modifiées sans préavis. QIAGEN décline toute responsabilité pour toute éventuelle erreur apparaissant dans ce document. Ce document est considéré comme complet et exact au moment de sa publication. QIAGEN ne pourra en aucun cas être tenu responsable de dommages accessoires, particuliers, multiples ou consécutifs en relation avec, ou découlant de, l'utilisation de ce document.

Les spécifications présentées par les produits QIAGEN sont garanties. La seule obligation de QIAGEN ainsi que le seul recours de tout client sont limités au remplacement sans frais des produits dans le cas où ces derniers ne correspondent pas aux performances garanties.

Marques déposées : QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, *therascreen*® (groupe QIAGEN) ; AMD® (Advanced Micro Devices, Inc.) ; ATI™ (ATI Technologies) ; Eppendorf® (Eppendorf AG) ; Windows®, Windows Vista® (Microsoft Corporation) ; Fedora®, Red Hat® (Red Hat, Inc.) ; Illumina®, MiSeqDx™ (Illumina, Inc.) ; Intel® (Intel Corporation) ; Mac OS® (Apple Computer, Inc.) ; MASTR™ (Multiplicom N.V.) ; NVIDIA® (NVIDIA Corporation) ; OpenGL® (Khronos Group) ; SUSE® (SUSE PLC). Les noms déposés, marques déposées etc. utilisés dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement indiqués comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Accord de licence limitée pour le kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou sa ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir le site www.qiagen.com

HB-2197-002 1103449 157014158 02/2017

© 2017 QIAGEN, tous droits réservés.

