

Instructions d'utilisation

CE IVD

## LymphoTrack<sup>®</sup> Dx TRB Assay – MiSeq<sup>®</sup>

Destiné à l'identification et au suivi des réarrangements clonaux du gène de la chaîne bêta du récepteur des lymphocytes T (*TRB*) à l'aide du Séquençage de Nouvelle Génération (NGS) et du dispositif Illumina<sup>®</sup> MiSeq

**IVD** Destiné au diagnostic *in vitro*

Représentation schématique du locus du gène *TRB* :



Conditions de conservation : **-65 °C à -85 °C**

(Les ADN contrôles peuvent être séparés des kits de test et conservés entre 2 °C et 8 °C.)

N° de référence	Produits	Quantité
<b>REF</b> 9-225-0009	LymphoTrack Dx TRB Assay Kit A – MiSeq	8 index – 5 réactions chacun
<b>REF</b> 9-225-0019	LymphoTrack Dx TRB Assay Panel – MiSeq	24 index – 5 réactions chacun

## Table des matières

<b>1.</b>	<b>UTILISATION PREVUE .....</b>	<b>4</b>
<b>2.</b>	<b>RESUME ET EXPLICATION DU TEST .....</b>	<b>4</b>
2.1.	Contexte.....	4
2.2.	Résumé .....	4
<b>3.</b>	<b>PRINCIPES DE LA PROCEDURE .....</b>	<b>5</b>
3.1.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	5
3.2.	Purification des amplicons.....	5
3.3.	Quantification des amplicons .....	5
3.4.	Séquençage de nouvelle génération (NGS) .....	6
3.5.	Multiplexage des amplicons .....	6
<b>4.</b>	<b>REACTIFS.....</b>	<b>7</b>
4.1.	Composants .....	7
4.2.	Avertissements et précautions .....	7
4.3.	Conservation et manipulation .....	8
<b>5.</b>	<b>INSTRUMENTS.....</b>	<b>9</b>
5.1.	Thermocycleur.....	9
5.2.	Support magnétique.....	9
5.3.	Instrument de PCR en temps réel .....	9
5.4.	Instrument Illumina MiSeqDx.....	9
<b>6.</b>	<b>PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS.....</b>	<b>10</b>
6.1.	Précautions .....	10
6.2.	Substances interférentes.....	10
6.3.	Conditions de prélèvement et manipulation .....	10
6.4.	Conservation des échantillons .....	10
<b>7.</b>	<b>PROCEDURE DE TEST .....</b>	<b>11</b>
7.1.	Matériel fourni.....	11
7.2.	Matériel nécessaire mais non fourni .....	11
7.3.	Préparation des réactifs.....	11
7.4.	Amplification.....	12
7.5.	Purification avec AMPure XP .....	12
7.6.	Quantification des amplicons .....	14
7.7.	Groupement et quantification de la banque .....	15
7.8.	Dilution de la banque poolée .....	15
7.9.	Configuration de la qPCR pour la quantification de la banque .....	15
7.10.	Préparation de la banque pour le séquençage MiSeq.....	16
7.11.	Chargement de la Flow Cell MiSeq.....	17
7.12.	Configuration de la feuille d'échantillons MiSeq.....	17
7.13.	Démarrage de la réaction MiSeq .....	20
<b>8.</b>	<b>ANALYSE DES DONNEES .....</b>	<b>20</b>
<b>9.</b>	<b>VALEURS ATTENDUES.....</b>	<b>20</b>
<b>10.</b>	<b>LIMITES DE LA PROCEDURE .....</b>	<b>20</b>
<b>11.</b>	<b>INTERPRETATION ET RAPPORTS .....</b>	<b>20</b>
<b>12.</b>	<b>DONNEES DE L'ECHANTILLON.....</b>	<b>23</b>
<b>13.</b>	<b>CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE .....</b>	<b>23</b>
<b>14.</b>	<b>GUIDE DE DEPANNAGE .....</b>	<b>24</b>
<b>15.</b>	<b>SUPPORT TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT .....</b>	<b>25</b>
<b>16.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>25</b>
<b>17.</b>	<b>SYMBOLES.....</b>	<b>25</b>

**18.   INFORMATIONS LEGALES .....26**

**19.   LYMPHOTRACK DX *TRB* ASSAY : DIAGRAMME DU FLUX DE TRAVAIL.....27**

**20.   ANNEXE A : CREATION D'UNE BANQUE DE SEQUENÇAGE .....28**

## 1. Utilisation prévue

Le test LymphoTrack® Dx *TRB* Assay pour le dispositif Illumina MiSeq® est un produit de diagnostic *in vitro* destiné à déterminer la distribution des fréquences des réarrangements du gène *TRB* par séquençage de nouvelle génération (NGS) chez les patients suspectés d'être atteints d'une pathologie lymphoproliférative. Ce test facilite l'identification de syndromes lymphoprolifératifs.

## 2. Résumé et explication du test

### 2.1. Contexte

Le locus du gène de la chaîne bêta du récepteur des lymphocytes T humains (*TRB*, anciennement connu sous le nom de *TCRB*) localisé sur le chromosome 7 (7q34) comprend 65 segments géniques  $V_{\beta}$  (variable), suivis de deux clusters distincts de gènes contenant chacun un gène  $D_{\beta}$  (diversité), plusieurs gènes  $J_{\beta}$  (jonction) et une région  $C_{\beta}$  (constante) s'étalant sur 685 kilobases. Les 2 gènes  $C_{\beta}$ , *TRBC1* et *TRBC2*, codent pour des produits hautement homologues sans différences fonctionnelles.

Les cellules lymphoïdes sont différentes des autres cellules somatiques de l'organisme. Au cours du développement, les gènes du récepteur antigénique des cellules lymphoïdes subissent des réarrangements somatiques (Tonegawa S. et al., 1983). Ainsi, au cours du développement des lymphocytes T, les gènes codant pour les molécules *TRB* sont assemblés à partir de plusieurs segments de gènes polymorphiques subissant des réarrangements et une sélection, entraînant la formation de combinaisons  $V_{\beta}$ - $D_{\beta}$ - $J_{\beta}$  de longueur et de séquence uniques. Dans la mesure où les leucémies et les lymphomes sont dus à la transformation maligne de cellules lymphoïdes individuelles, toutes les leucémies et tous les lymphomes partagent généralement un ou plusieurs réarrangements cellules-spécifiques, ou « clonaux », de gène du récepteur antigénique. Par conséquent, les tests détectant les réarrangements clonaux du gène *TRB* peuvent être utiles à l'étude des tumeurs malignes impliquant les lymphocytes B et T.

À l'origine, les réarrangements clonaux ont été identifiés à l'aide des techniques d'analyse des fragments de restriction par Southern Blot (RF-SBH). Toutefois, ces tests se sont avérés fastidieux, laborieux, nécessitaient de grandes quantités d'ADN et n'étaient pas appropriés pour l'analyse de la plupart des loci moins diversifiés du récepteur antigénique.

Au cours des dernières décennies, les tests RF-SBH ont été remplacés par les tests de clonalité basés sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) développés par Alexander Morley (Trainor K.J. et al., 1990), qui sont maintenant considérés comme les méthodes de référence. Les tests PCR identifient la clonalité sur la base de la surreprésentation des produits V-D-J amplifiés (ou des produits D-J incomplets) suite à leur séparation par électrophorèse sur gel ou capillaire. Bien qu'ils soient sensibles et adaptés à l'analyse de petites quantités d'ADN, ces tests ne permettent pas de différencier aisément les populations clonales de taille identique qui ne diffèrent que par leurs séquences. Ils ne peuvent pas non plus détecter les réarrangements multiples qui pourraient être à l'origine d'un pic unique et ils ne sont pas conçus pour identifier la séquence d'ADN V-J spécifique, nécessaire au suivi des populations clonales dans les analyses ultérieures.

### 2.2. Résumé

Le test LymphoTrack Dx *TRB* Assay – MiSeq représente une avancée majeure par rapport aux tests de clonalité existants ayant recours à l'analyse de fragments, dans la mesure où il détecte efficacement la majorité des réarrangements du gène *TRB* à l'aide d'un mélange mère (master mix) de PCR multiplexé et identifie, simultanément, la séquence d'ADN spécifique à chaque réarrangement de gène clonal. Par conséquent, ce test comporte deux utilisations importantes et complémentaires : il permet la détection des populations clonales initiales et identifie les informations de séquence requises pour le suivi de ces clones dans les échantillons ultérieurs.

Chaque mélange mère (master mix) de multiplexes pour *TRB* cible les régions conservées au sein des régions  $V_{\beta}$  et  $J_{\beta}$  décrites dans les tumeurs malignes lymphoïdes. Les amorces incluses dans les mélanges mères (master mixes) sont conçues avec des adaptateurs Illumina et comportent jusqu'à 24 index différents. Cela permet

d'effectuer une seule réaction de PCR par index et de grouper les amplicons de plusieurs échantillons et de plusieurs cibles différents (générés par d'autres tests LymphoTrack Dx pour l'instrument Illumina MiSeq, vendus séparément) sur une seule Flow Cell MiSeq. Ainsi, 24 échantillons par cible peuvent être analysés en parallèle en une seule série.

Le logiciel LymphoTrack Dx Software - MiSeq associé fournit une méthode d'analyse et une visualisation des données simples et rationnelles. En suivant les recommandations fournies à la section 11 : Interprétation et rapports, il est possible d'interpréter facilement les résultats de l'échantillon résumés par le logiciel et de déterminer la présence ou l'absence de clonalité.

**Il convient de souligner que les résultats des tests de clonalité moléculaire doivent toujours être interprétés dans le contexte des données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.**

Les contrôles positifs et négatifs pour la clonalité sont inclus dans le kit.

**Remarque** : pour obtenir une explication plus détaillée du locus et de la stratégie de séquençage ciblé, se reporter à (Miller J.E., 2013).

### 3. Principes de la procédure

#### 3.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les analyses PCR sont utilisées en routine pour l'identification de populations clonales de lymphocytes B et T. Ces tests amplifient l'ADN des régions conservées V et J des gènes du récepteur antigénique. Ces régions conservées s'étendent de part et d'autre d'une zone marquée par des réarrangements génétiques programmés se produisant au cours de la maturation de tous les lymphocytes B et T. Différentes populations de lymphocytes B et T naissent de ces réarrangements génétiques.

Les gènes du récepteur antigénique qui subissent un réarrangement sont ceux des chaînes lourdes de l'immunoglobuline (*IGH*), des loci de chaînes légères (*IGK* et *IGL*) des lymphocytes B, ainsi que les loci des gènes des récepteurs des lymphocytes T (*TRA*, *TRB*, *TRG* et *TRD*). Chaque lymphocyte B et T possède un ou deux réarrangements V-J fonctionnels dont la longueur et la séquence sont uniques. Ainsi, quand l'ADN d'une population normale ou polyclonale est amplifié avec des amorces qui flanquent la région V-J, des amplicons de séquence et de longueur uniques, qui reflètent une population hétérogène, sont générés. Dans certains cas, en l'absence d'ADN de lymphocyte, aucun amplicon n'est visible. Pour les échantillons contenant des populations clonales pour *TRB*, jusqu'à quatre amplicons majoritaires, de longueur et séquence identiques, sont détectés significativement plus fréquemment, sur un fond polyclonal réduit et amplifié avec une fréquence plus faible.

#### 3.2. Purification des amplicons

Les amplicons de PCR sont purifiés afin de retirer les amorces en excès, les nucléotides (dNTP), les sels et les enzymes à l'aide du système Agencourt® AMPure® XP. Cette méthode repose sur la technologie d'immobilisation réversible en phase solide (SPRI) au moyen de billes paramagnétiques pour la purification à haut débit d'amplicons de PCR. Grâce à un tampon optimisé, les amplicons de PCR supérieurs ou égaux à 100 paires de bases (pb) sont liés de manière sélective aux billes paramagnétiques, tandis que les contaminants tels que les amorces en excès, les dimères d'amorces, les sels et les dNTP non incorporés sont éliminés. Les amplicons peuvent alors être élués et séparés des billes paramagnétiques, permettant ainsi d'obtenir un produit de PCR d'une pureté supérieure pour l'analyse et la quantification d'amplicons en aval.

#### 3.3. Quantification des amplicons

Les amplicons purifiés sont quantifiés à l'aide des kits de quantification de banque KAPA™ pour les systèmes Illumina. Les amplicons de PCR purifiés et dilués, ainsi qu'un ensemble de six étalons d'ADN prédilués sont amplifiés à l'aide de méthodes quantitatives (qPCR) qui utilisent le mélange mère (master mix) et les amorces KAPA SYBR® FAST qPCR. Les amorces du kit KAPA ciblent les adaptateurs P5 et P7 de la Flow Cell Illumina.

Les scores Ct moyen des étalons d'ADN sont tracés sur une échelle de log10 afin de générer une courbe de référence qui peut être utilisée pour calculer la concentration (pM) des amplicons de PCR dérivés de l'échantillon

d'ADN. Le calcul de la concentration des amplicons de PCR permet une représentation égale des amplicons dans le mélange de banque final qui est chargée dans l'instrument MiSeq pour le séquençage.

### 3.4. Séquençage de nouvelle génération (NGS)

Les méthodes de séquençage de Sanger sont les plus populaires parmi les technologies de séquençage d'acides nucléiques de « première génération ». Les méthodes plus récentes, qui tirent largement parti des approches de séquençage en parallèle, sont souvent appelées « NGS ». Les technologies de NGS peuvent utiliser diverses stratégies combinées de préparation de la matrice, de séquençage, d'imagerie et de bio-informatique pour l'alignement et l'assemblage du génome.

Les technologies de NGS utilisées dans ce produit reposent sur l'amplification de séquences génétiques utilisant une série d'amorces consensus, sens et antisens comprenant des adaptateurs et des index. Les amplicons générés avec les mélanges mères (master mixes) LymphoTrack Dx sont quantifiés, groupés et chargés dans une Flow Cell pour le séquençage avec la plateforme de séquençage Illumina MiSeq. Plus précisément, les produits amplifiés de la banque sont hybridés à des oligonucléotides sur une Flow Cell, puis amplifiés pour former des colonies clonales locales (amplification en pont ou bridge amplification). Quatre types de bases, des terminateurs réversibles (bases RT), sont ajoutés et le brin d'ADN séquencé est étendu, nucléotide par nucléotide. Pour enregistrer l'incorporation des nucléotides, une caméra CCD capture une image de la lumière émise lorsque des nucléotides fluorescents sont ajoutés au brin séquencé. Un bloqueur en position terminale 3' est ajouté après chaque cycle du processus de séquençage et tout nucléotide non incorporé est retiré avant l'ajout de quatre nouvelles bases RT.

### 3.5. Multiplexage des amplicons

Ce produit est conçu pour effectuer deux niveaux différents de multiplexage afin de permettre aux laboratoires de réduire les coûts et de gagner du temps. Le premier niveau de multiplexage provient des index multiples fournis avec les tests (jusqu'à 24). Chacun de ces 24 index agit comme un code-barres unique qui permet aux amplicons d'échantillons individuels d'être regroupés après l'amplification par PCR afin de générer une banque de séquençage. Par la suite, les séquences obtenues peuvent être triées par un logiciel de bio-informatique afin d'identifier celles provenant d'un échantillon en particulier.

Le second niveau de multiplexage provient de la capacité du logiciel fourni à trier les données de séquençage par index et par cible. Cela permet aux amplicons générés avec les amorces cibles (y compris ceux comportant le même index) d'être regroupés pour générer la banque, puis d'être séquencés sur une seule Flow Cell. Il est notamment possible de séquencer conjointement les produits de différents kits Invivoscribe LymphoTrack Dx Assay pour le dispositif MiSeq, tels que *IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* et *TRG*. **Lors du multiplexage des amplicons de différents gènes cibles, il est important d'utiliser la chimie de séquençage appropriée. Le nombre de cycles de séquençage doit être suffisant pour séquencer le plus grand amplicon au cours de l'analyse multiplexe.** Ainsi, lors du multiplexage d'une combinaison d'amplicons des régions *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* et *TRG*, le kit de séquençage MiSeq v2 (500 cycles) jusqu'à 4 cibles ou v3 (600 cycles) doit être utilisé. Lors du multiplexage conjoint de l'un ou l'autre de ces amplicons avec *IGHV* Leader, le kit de séquençage MiSeq v3 (600 cycles) doit être utilisé. Lors du multiplexage conjoint des amplicons des régions *IGH* FR3 et *TRG* uniquement, qui ont des tailles d'amplicon plus courtes, les kits de séquençage MiSeq v2 (300 ou 500 cycles) peuvent être utilisés, mais les paramètres doivent être réglés dans la feuille d'échantillons. Pour plus d'instructions, se reporter à l'annexe A.

Le nombre d'échantillons pouvant être multiplexés sur une seule Flow Cell dépend également de la Flow Cell utilisée. Les Flow Cells standard d'Illumina peuvent générer 12 à 15 millions de lectures. Afin de déterminer le nombre de lectures par échantillon, le nombre total de lectures de la Flow Cell doit être divisé par le nombre d'échantillons à multiplexer et le nombre de lectures par échantillon doit être suffisant pour une interprétation valide. Pour plus d'informations, se reporter à la section 11.

## 4. Réactifs

### 4.1. Composants

Tableau 1. Kits disponibles

N° de référence	Description	Nb de mélanges mères indexés	Nombre total de réactions
<b>REF</b> 9-225-0009	LymphoTrack® Dx TRB Assay Kit A – MiSeq®	8 index – 5 séquençages chacun	40
<b>REF</b> 9-225-0019	LymphoTrack® Dx TRB Assay Panel – MiSeq®	24 index – 5 séquençages chacun	120

Tableau 2. Composition du kit

Réactif	Composants	Quantité unitaire	9-225-0009 d'unités	9-225-0019 Nb d'unités	Température de conservation	Remarques				
<b>Mélanges mères<sup>†</sup></b>	TRB MiSeq 01	250 µl	1	1	-65 à -85 °C	S.O. (sans objet)				
	TRB MiSeq 02		1	1						
	TRB MiSeq 03		1	1						
	TRB MiSeq 04		1	1						
	TRB MiSeq 05		1	1						
	TRB MiSeq 06		1	1						
	TRB MiSeq 07		1	1						
	TRB MiSeq 08		1	1						
	TRB MiSeq 09		0	1						
	TRB MiSeq 10		0	1						
	TRB MiSeq 11		0	1						
	TRB MiSeq 12		0	1						
	TRB MiSeq 13		0	1						
	TRB MiSeq 14		0	1						
	TRB MiSeq 15		0	1						
	TRB MiSeq 16		0	1						
	TRB MiSeq 18		0	1						
	TRB MiSeq 19		0	1						
	TRB MiSeq 20		0	1						
	TRB MiSeq 21		0	1						
	TRB MiSeq 22		0	1						
	TRB MiSeq 23		0	1						
	TRB MiSeq 25		0	1						
	TRB MiSeq 27		0	1						
	<b>ADN contrôle positif</b>		TRB POS (+) (n° de référence : 4-088-0058)	45 µl			1	3	2 à 8 °C ou -65 à -85 °C	ADN Vb12-4/Jb1-2 dilué dans l'ADN d'amygdale
	<b>ADN contrôle négatif</b>		NGS NÉG (-) (n° de référence : 4-092-0018)	45 µl			1	3	2 à 8 °C ou -65 à -85 °C	ADN d'amygdale, la fréquence de séquence la plus élevée peut varier d'un lot à l'autre

**Remarque** : aucun conservateur n'est utilisé dans la fabrication de ces kits.

**Remarque<sup>†</sup>** : les index 17, 24 et 26 ne sont pas utilisés dans ces kits.

### 4.2. Avertissements et précautions



Veillez lire attentivement les instructions d'utilisation avant de débiter la procédure de test et suivre attentivement chaque étape.

- **IVD** Ce produit est destiné au diagnostic *in vitro*.
- Le kit d'analyse forme un système qui doit être utilisé tel quel. Ne pas remplacer les réactifs par ceux d'un autre fabricant. Une dilution, une réduction des réactions d'amplification ou tout autre écart par rapport à ce protocole peut affecter la performance de ce test et/ou annuler toute sous-licence limitée accordée avec l'achat de ce kit.



- Les matériels sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.
- Le strict respect du protocole garantit une performance ainsi qu'une reproductibilité optimales. Il convient de veiller à utiliser le programme de thermocycleur adéquat, d'autres programmes peuvent donner des résultats imprécis/faussés, comme des faux positifs et des faux négatifs.
- Ne pas mélanger ou combiner les réactifs de kits comportant des numéros de lots différents.
- Éliminer les réactifs non utilisés et les déchets conformément à la réglementation en vigueur dans votre pays.
- Toutes les procédures de laboratoire doivent être réalisées avec un équipement de protection individuelle standard (gants, blouse et lunettes de protection). Le personnel de laboratoire doit suivre les bonnes pratiques de laboratoire et les précautions universelles lors de la manipulation des échantillons. Ne pas pipeter à la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire. Se laver soigneusement les mains après manipulations des échantillons et des réactifs de test. Les échantillons doivent être manipulés dans des installations de confinement de sécurité biologique approuvées, et les récipients doivent être ouverts uniquement dans une enceinte de sécurité biologique certifiée. Il est recommandé d'utiliser de l'eau de qualité « biologie moléculaire » pour la préparation de l'échantillon d'ADN.
- En raison de la sensibilité analytique de ce test, il convient de prendre de très grandes précautions pour éviter la contamination des réactifs ou des mélanges d'amplification avec des échantillons, des contrôles ou des matériels amplifiés. Utiliser de nouvelles pointes de pipette à filtre entre les échantillons et entre chaque transfert de réactifs. Tous les réactifs doivent être contrôlés attentivement pour détecter tout signe de contamination (*p. ex.*, contrôles négatifs donnant des signaux positifs). Jeter les réactifs suspectés d'être contaminés.
- Afin de minimiser la contamination, porter des gants propres lors de la manipulation des échantillons et des réactifs et nettoyer fréquemment les plans de travail et les pipettes avant de réaliser la PCR.
- La progression du travail dans le laboratoire réalisant la PCR doit toujours se faire en sens unique entre des zones de travail séparées : préparation des mélanges mères (master mixes), suivie de la préparation des échantillons, puis amplification et enfin détection. L'autoclavage n'élimine pas l'ADN issu d'une contamination. N'introduire aucun ADN amplifié dans les zones réservées à la préparation des mélanges mères (master mixes) ou des échantillons.
- Toutes les pipettes et les pointes de pipette, ainsi que tout le matériel utilisé dans une zone particulière doivent être réservés à cette zone du laboratoire et ne jamais la quitter.
- Les articles non jetables doivent être décontaminés avec une solution contenant 10 % de javel et rincés à l'eau distillée à deux reprises avant d'être replacés dans les zones où ils sont initialement utilisés.
- Le matériel plastique doit être jetable et stérile dans la mesure du possible pour éviter toute contamination.

#### 4.3. Conservation et manipulation

- Si le kit de test n'est pas utilisé immédiatement, il doit être conservé entre **-65 et -85 °C**.
- La température de conservation optimale des ADN contrôles est de 2 à 8 °C, mais l'ADN peut également être conservé entre -65 et -85 °C.
- Tous les réactifs et les contrôles doivent être décongelés et agités ou mélangés soigneusement avant utilisation pour une remise en suspension totale.
- En raison de la concentration élevée en sel, les mélanges mères (master mixes) de PCR sont sensibles aux cycles de congélation/décongélation. Le nombre de cycles doit être limité à un maximum de quatre.

Pour toute question, veuillez contacter le personnel technique d'Invivoscribe. Nous vous aiderons volontiers à déterminer vos conditions de conservation optimales.



## 5. Instruments

### 5.1. Thermocycleur

- Utilisation ou fonction : amplification d'échantillons d'ADN
- Instrument suggéré : thermocycleur Veriti™ Dx ou équivalent
- Caractéristiques de performance et spécifications :
  - Plage de température minimale : 15 à 96 °C
  - Vitesse minimale de montée en température : 0,8 °C/s
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.
- Voir la section 7.4 *Amplification* pour le programme du thermocycleur.

### 5.2. Support magnétique

- Utilisation ou fonction : purification des produits PCR
- Instrument suggéré : Ambion® Magnetic Stand 96\* (N° de référence : AM10027), Agencourt SPRI Plate® 96 Ring Super Magnet Plate\* (N° de référence : A32782) ou Thermo Fisher Scientific DynaMag™-96 Side Skirted Magnet\* (N° de référence : 12027) ou équivalent
- Caractéristiques de performance et spécifications :
  - Précipitation des billes paramagnétiques
- Voir la section 7.5 *Purification avec AMPure XP* pour les méthodes de purification des produits de PCR.

### 5.3. Instrument de PCR en temps réel

- Utilisation ou fonction : quantification des produits de PCR
- Instrument suggéré : instrument en temps réel Applied Biosystems® 7500 Fast Dx ou équivalent
- Caractéristiques de performance et spécifications :
  - Détection des longueurs d'ondes vertes SYBR
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.
- Voir la section 7.6 *Quantification des amplicons* pour le programme de PCR en temps réel.

### 5.4. Instrument Illumina MiSeqDx

- Utilisation ou fonction : séquençage de banque d'ADN normalisée
- Caractéristiques de performance et spécifications :
  - Utiliser MiSeq Reagent Kit v2\*
  - Utiliser MiSeq Reagent Kit v3\*
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.
- Voir les sections 7.11 *Chargement de la Flow Cell MiSeq*, 7.12 *Configuration de la feuille d'échantillons MiSeq* et 7.13 *Démarrage de la réaction MiSeq* pour les paramètres MiSeq.

\*Avertissement : ces produits ne comportent pas le marquage CE.

## 6. Prélèvement et préparation des échantillons

### 6.1. Précautions

Les échantillons biologiques humains peuvent contenir des matériels potentiellement infectieux. Tous les échantillons doivent être manipulés conformément au programme de contrôle des pathogènes transmissibles par le sang de votre établissement et/ou au Niveau 2 de sécurité biologique.

### 6.2. Substances interférentes

Les substances suivantes sont connues pour interférer avec la PCR :

- Chélateurs de cations divalents
- Pointes de pipette à faible rétention
- EDTA (non significatif à faible concentration)
- Héparine

### 6.3. Conditions de prélèvement et manipulation

- La quantité ajoutée minimale est de 50 ng d'ADN de haute qualité (5 µl d'échantillon d'ADN à la concentration minimale de 10 ng/µl).
- Ce test analyse l'ADN génomique extrait et purifié. L'ADN doit être quantifié au moyen d'une méthode spécifique à l'ADN double brin (ADNdb) et être dépourvu d'inhibiteurs de PCR.
- Remettre en suspension l'ADN dans une solution appropriée telle qu'un tampon TE dilué au 1/10 (1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0, préparée dans de l'eau de qualité biologie moléculaire) ou dans de l'eau de qualité biologie moléculaire.

### 6.4. Conservation des échantillons

Les échantillons doivent être conservés à l'aide d'une méthode prévenant la dégradation de l'ADN.

## 7. Procédure de test

### 7.1. Matériel fourni

Voir le Tableau 2, pour le matériel fourni.

### 7.2. Matériel nécessaire mais non fourni

**Tableau 3.** Matériel non fourni

Réactif/Matériel	Réactifs nécessaires ou recommandés/fournisseurs	N° de référence	Remarques
ADN polymérase	Roche : ADN polymérase EagleTaq™	05206944190	5 U/µl
Eau de qualité biologie moléculaire	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	L'eau doit être stérile et exempte de toute DNase et RNase.
Pipettes étalonnées	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	Précision requise pour mesurer des volumes allant de 0,2 à 1 000 µl.
Plaques ou tubes de PCR	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	Exempts de DNase/RNase/inhibiteur de PCR
Pointes de pipette à filtre	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	Stériles, exempts de RNase/DNase/pyrogène
Tubes de microcentrifugation	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	Stériles
Kit de purification des produits de PCR	Beckman Coulter, Inc : Agencourt AMPure XP (5 ml pour 100 échantillons)	A63880	S.O. (sans objet)
Purification des produits de PCR	Thermo Fisher Scientific : Ambion Magnetic Stand 96 DynaMag-96 Side Skirted Magnet ou Beckman Coulter : Agencourt SPRIPlate 96 Ring Super Magnet Plate ou équivalent	AM10027 12027 ou A32782	S.O. (sans objet)
Quantification des amplicons et de la banque	KAPA Biosystems : Kit de quantification de la banque KAPA – Illumina	KK4824	S.O. (sans objet)
Analyse MiSeq	Illumina : MiSeq Reagent v2 kit (500 cycles) ou Kit v3 (600 cycles)	MS-102-2003 ou MS-102-3003	Flow Cell standard
Logiciel MiSeq	Logiciel de commande MiSeq v2.6	S.O. (sans objet)	Illumina Experiment Manager v.1.4 à v1.13*
Tampon de dilution A	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	Préparer une solution de 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0 + 0,05 % avec Tween 20

\* **Remarque:** Contactez le support technique Illumina pour les versions IEM v1.4 à v1.13.

### 7.3. Préparation des réactifs

Afin de garantir que les échantillons d'ADN ne contiennent pas d'inhibiteur de la PCR et qu'ils sont de qualité adéquate et en quantité suffisante pour générer des résultats fiables, les échantillons peuvent être analysés avec le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder d'Invivoscribe (n° de référence : 2-096-0021 pour la détection ABI ou n° de référence : 2-096-0020 pour la détection sur gel). Le Specimen Control Size Ladder cible différents gènes et génère une série d'amplicons d'environ 100, 200, 300, 400 et 600 pb. Cela est particulièrement important avec l'ADN d'échantillons difficiles, *p. ex.* le tissu fixé au formol et inclus dans la paraffine (FFIP).

Les **contrôles positifs et négatifs doivent toujours être utilisés** pour vérifier que l'analyse a été réalisée correctement.

Un **contrôle négatif sans ADN (no template control, NTC) doit toujours être utilisé** pour rechercher une éventuelle contamination au cours de la procédure de préparation de la PCR.

- 7.3.1. Enfiler des gants et retirer les mélanges mères (master mixes) du congélateur. Laisser les tubes décongeler complètement, puis vortexer doucement pour mélanger et terminer par une centrifugation très brève.
- 7.3.2. Sous une hotte de confinement, pipeter 45 µl de chaque mélange mère (master mix) dans une plaque PCR propre (un puits pour chaque mélange mère (master mix) et un mélange mère (master mix) par échantillon). Chaque analyse doit inclure deux contrôles (un positif et un négatif) et un NTC. Pour le NTC, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire à la place de l'ADN.
- 7.3.3. Ajouter 0,2 µl d'ADN polymérase EagleTaq (EagleTaq à 5 U/µl) dans chaque puits contenant les mélanges mères (master mixes) aliquotés.
- 7.3.4. Ajouter 5 µl d'échantillon d'ADN (à la concentration minimale de 10 ng/µl), d'ADN contrôle ou d'eau de qualité biologie moléculaire (NTC) respectivement dans chacun des puits individuels contenant les réactions de mélange mère (master mix). Aspirer et expulser 5 à 10 fois avec la pipette pour mélanger. Sceller la plaque et la placer dans le thermocycleur.

**Tableau 4.** Mise au point de la réaction

Réactif	Volume
Mélange mère	45 µl
ADN polymérase EagleTaq	0,2 µl
Échantillon ou ADN contrôle	5 µl
Volume total	<b>50,2 µl</b>

#### 7.4. Amplification

- 7.4.1. Amplifier les échantillons en utilisant le programme PCR du Tableau 5.

**Tableau 5.** Programme PCR

Étape	Température	Durée	Cycle
1	95 °C	7 minutes	1
2	95 °C	45 secondes	29 x
3	60 °C	45 secondes	
4	72 °C	90 secondes	
5	72 °C	10 minutes	1
6	15 °C	« infini »	1

- 7.4.2. Retirer la plaque d'amplification du thermocycleur. À défaut de passer immédiatement aux étapes suivantes, les produits de PCR peuvent être conservés à 4 °C pendant 1 jour.

#### 7.5. Purification avec AMPure XP

Purifier les produits de PCR issus des échantillons, des contrôles positifs et négatifs et des NTC à l'aide du système de purification Agencourt AMPure XP.

##### Préparation :

- 7.5.1. Préparer une solution extemporanée (0,5 ml pour chaque échantillon à purifier) d'éthanol à 80 % en utilisant de l'eau stérile. Agiter doucement le flacon Agencourt AMPure XP pour remettre en suspension toutes les particules magnétiques ayant pu se déposer.

Volume de réactif AMPure XP ajouté à 50 µl de produit de PCR par dosage :

*TRB* : 35 µl

*IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* et *TRG* : 50 µl

- 7.5.2. Transférer le volume approprié de réactif Agencourt AMPure XP nécessaire à la plaque dans un nouveau tube de 2 ml afin de minimiser le risque de contamination par les pointes de pipette. Le volume de réactif Agencourt AMPure XP est égal à  $n \times 35 \mu\text{l}$  (n représente le nombre d'échantillons à purifier).

#### Liaison des amplicons aux particules magnétiques :

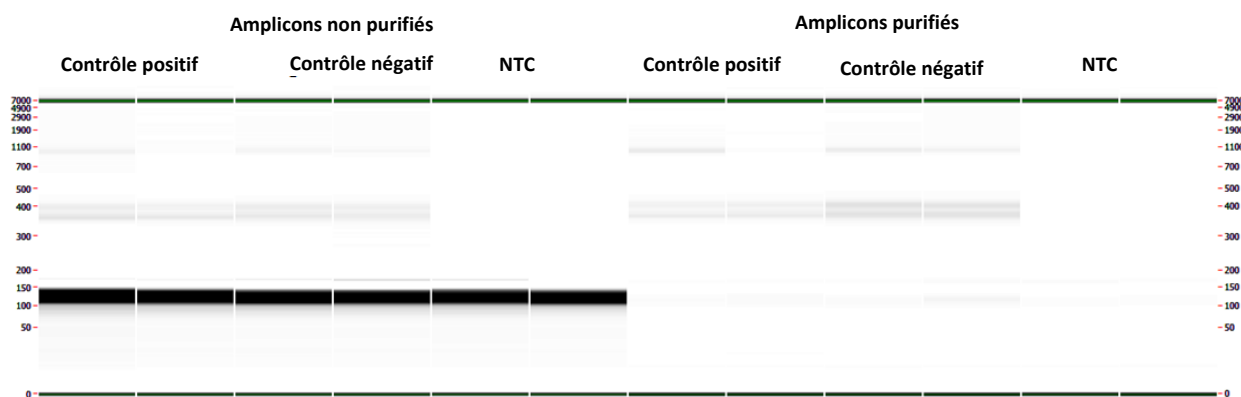
- 7.5.3. Ajouter **35  $\mu\text{l}$**  de réactif Agencourt AMPure XP, aliquoté et à **température ambiante**, à chaque échantillon à purifier. Mélanger en aspirant et en expulsant 10 fois avec la pipette. La couleur doit être homogène après le mélange. Incuber 10 minutes à température ambiante.
- 7.5.4. Placer les échantillons mélangés sur un support Ambion Magnetic Stand-96 et incuber à température ambiante pendant 5 minutes afin de séparer les particules magnétiques de la solution. **(Conserver la plaque sur le support magnétique en permanence au cours de cette procédure, jusqu'à l'étape 7.5.9 ci-dessous.)**
- 7.5.5. À l'aide d'une pipette P200 (ou d'une pipette multicanaux équivalente) réglée sur 95  $\mu\text{l}$ , aspirer le surnageant clarifié et le jeter. Utiliser une pipette P10 (ou une pipette multicanaux équivalente) réglée sur 10  $\mu\text{l}$  afin de retirer l'éventuel excès de surnageant. Éviter de retirer les particules magnétiques.

#### Lavage :

- 7.5.6. Ajouter 200  $\mu\text{l}$  d'éthanol à 80 % à chaque échantillon. Incuber pendant 30 secondes à température ambiante. À l'aide d'une pipette P200 (ou d'une pipette multicanaux équivalente) réglée sur 195  $\mu\text{l}$ , aspirer l'éthanol et le jeter. Utiliser une pipette P10 (ou une pipette multicanaux) réglée sur 10  $\mu\text{l}$  afin de retirer l'éventuel excès d'éthanol. Éviter de retirer les particules magnétiques.
- 7.5.7. Répéter l'étape 7.5.6.
- 7.5.8. Avec la plaque toujours sur le support magnétique, laisser les particules magnétiques sécher à l'air libre pendant 5 minutes.

#### Élution :

- 7.5.9. Retirer la plaque du support magnétique. Ajouter 25  $\mu\text{l}$  d'un tampon contenant 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Mélanger en pipetant jusqu'à ce que la solution soit homogène. Vérifier que toutes les particules magnétiques sont présentes dans la solution.
- 7.5.10. Incuber 2 minutes à température ambiante.
- 7.5.11. Placer la plaque sur le support magnétique pendant 5 minutes ou jusqu'à la clarification du surnageant.
- 7.5.12. Transférer 22  $\mu\text{l}$  d'éluat dans une nouvelle plaque. Sceller avec des bouchons en bande. Étiqueter la plaque et centrifuger brièvement afin de garantir que le surnageant soit bien déposé au fond du puits. Conserver à  $-20^\circ\text{C}$  ou passer à l'étape suivante.
- 7.5.13. L'image du gel de la Figure 1 illustre l'efficacité d'une purification type (en montrant les amplicons avant et après purification).



**Figure 1** : exemple de résultat d'une purification des amplicons des mélanges mères (master mixes) TRG MiSeq. L'image a été générée en analysant les produits non purifiés et purifiés avec le LabChip GX.

## 7.6. Quantification des amplicons

Les étapes suivantes permettent de quantifier les amplicons de PCR purifiés générés à partir des échantillons, des contrôles positifs et négatifs, ainsi que des contrôles sans ADN, à l'aide du kit de quantification de la banque KAPA (KAPA Biosystems).

### 7.6.1. Dilution des amplicons

finale : 1/4 000 :

Le tampon de dilution A ci-dessous fait référence à : 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 0,05 % Tween 20

**Étape A** : 2 µl d'éluat d'amplicon purifié + 198 µl de tampon de dilution A.  
Bien mélanger en aspirant et en expulsant 10 fois avec la pipette.

**Étape B** : 5 µl provenant de l'étape A + 195 µl de tampon de dilution A.  
Bien mélanger en aspirant et en expulsant 10 fois avec la pipette.

7.6.2. Préparer une réaction de qPCR pour la quantification des amplicons d'après le Tableau 6 pour chaque réaction (se reporter aux instructions du kit de quantification de la banque KAPA pour plus d'informations) :

**Tableau 6.** Configuration de la qPCR

Réactif	Volume
Eau de qualité PCR	3,6 µl
Mélange mère (master mix) KAPA SYBR FAST qPCR avec pré-mélange d'amorce	12,0 µl
ROX	0,4 µl
Amplicons dilués ou étalon (1-6)	4,0 µl
Volume total	20 µl

7.6.3. Se reporter au Tableau 7 pour le programme du thermocycleur pour la qPCR.

**Tableau 7.** Programme qPCR

Étape	Température	Durée	Cycle
1	95 °C	5 minutes	1
2	95 °C	30 secondes	35 x
	60 °C	45 secondes (lecture de la plaque)	

- 7.6.4. Utiliser les données du test qPCR pour vérifier la contamination en calculant les valeurs  $\Delta Ct$  entre les contrôles (positifs et négatifs) et le NTC, en utilisant l'équation suivante :

$$\Delta Ct = Ct (NTC) - Ct (\text{Contrôle})$$

Si  $\Delta Ct \geq 3,0$  pour les deux contrôles, passer à l'étape suivante. Si  $\Delta Ct < 3,0$  pour chaque contrôle, voir la Section 14 *Guide de dépannage* pour plus d'instructions.

Remarque :  $\Delta Ct$  pour le test *TRB* est réglé différemment des autres tests LymphoTrack Dx :

$$TRB \Delta Ct \geq 3,0$$

*IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* et *TRG*  $\Delta Ct \geq 4,0$

- 7.6.5. Utiliser les données d'exécution de la qPCR pour déterminer la concentration d'amplicon de chaque échantillon en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Concentration d' amplicon non dilué (nM)} = \frac{452 \times \text{Conc. moyenne (pM) Calculé par qPCR}}{A} \times 4$$

A = Longueur moyenne du fragment des amplicons générés par le test :

La longueur moyenne du fragment des amplicons générés à l'aide du test *TRB* Assay est de 400 pb (A = 400).  
(Remarque : la longueur de la séquence inclut des nucléotides supplémentaires nécessaires au séquençage).

La longueur moyenne du fragment de l'étalon d'ADN KAPA Illumina est de 452 pb.

## 7.7. Groupement et quantification de la banque

La quantité d'ADN de la banque chargée dans la Flow Cell MiSeq est essentielle pour générer des clusters de densité optimale sur la Flow Cell et obtenir des données de haute qualité lors du séquençage. **La quantification de la banque par qPCR est vivement recommandée.**

- 7.7.1. Sur la base de la concentration d'amplicon calculée à partir des résultats de qPCR, ajouter une quantité égale d'amplicons (à l'exception de NTC, qui peut être exclu), *p. ex.*, ajouter 4 nM de chaque amplicon dans un volume total de 10  $\mu$ l en utilisant le tampon de dilution A comme diluant. Pour les échantillons dont la concentration est  $< 4$  nM, ajouter la quantité maximale d'échantillon possible (10  $\mu$ l) et ne pas ajouter de tampon de dilution A pour cet échantillon.
- 7.7.2. Vortexer doucement pour mélanger, puis centrifuger brièvement.

## 7.8. Dilution de la banque poolée

Finale : 1/1 000 :

**Étape A :** 2  $\mu$ l de la banque poolée + 198  $\mu$ l de tampon de dilution A.  
Bien mélanger en aspirant et en expulsant 10 fois avec la pipette.

**Étape B :** 20  $\mu$ l provenant de l'étape A + 180  $\mu$ l de tampon de dilution A.  
Bien mélanger en aspirant et en expulsant 10 fois avec la pipette.

## 7.9. Configuration de la qPCR pour la quantification de la banque

Se reporter au Tableau 6 pour la configuration de la qPCR et au Tableau 7 pour le programme du thermocycleur.

- 7.9.1. Détermination de la concentration de la banque poolée d'après les résultats de qPCR.

$$\text{Concentration d' amplicon non dilué (nM)} = \frac{452 \times \text{Conc. moyenne (pM) Calculé par qPCR}}{A}$$



A = Longueur moyenne du fragment des amplicons générés par le test :

La longueur moyenne du fragment des amplicons générés à l'aide du test **TRB** Assay est de 400 pb (**A = 400**).

(Remarque : la longueur de la séquence inclut des nucléotides supplémentaires nécessaires au séquençage).

La longueur moyenne du fragment de l'étalon d'ADN KAPA Illumina est de 452 pb.

### 7.10. Préparation de la banque pour le séquençage MiSeq

À la fin de cette section, la concentration de la banque d'ADN doit être de **12 pM** pour le **kit de réactif MiSeq v2** et entre **12 et 20 pM** pour le **kit de réactif MiSeq v3**.

Pour multiplexer les amplicons provenant de différents tests LymphoTrack Dx pour le dispositif MiSeq dans une seule banque, se reporter à l'annexe A.

7.10.1. Déterminer la quantité de la banque à préparer d'après la concentration de la banque poolée à partir des résultats de qPCR et diluer si nécessaire :

- Si la concentration de la banque est supérieure à 4 nM, diluer la banque à 4 nM dans un volume final de 10 µl à l'aide du tampon de dilution A.
- Si la concentration de la banque est inférieure à 4 nM, utiliser 10 µl de la banque directement pour l'étape suivante.

7.10.2. Suivre les instructions suivantes pour dénaturer la banque d'ADN :

- Préparer une solution extemporanée de NaOH 0,2 N. Une solution extemporanée est essentielle pour dénaturer totalement l'échantillon d'ADN et pour la génération optimale des clusters avec MiSeq.
- Ajouter 10 µl de NaOH 0,2 N à la banque diluée (10 µl) préparée à l'étape précédente.

**Tableau 8.** Dénaturation des banques

Réactif	Volume
Banque diluée	10 µl
NaOH 0,2 N	10 µl
Volume total	20 µl

7.10.3. Vortexer brièvement pour mélanger la solution, puis centrifuger brièvement pour garantir que toute la solution s'est déposée au fond du tube. Incuber pendant 5 minutes à température ambiante pour dénaturer la banque d'ADNdb en ADN simple brin (ADNsb).

7.10.4. Ajouter 980 µl de tampon HT1 préalablement refroidi (fourni dans les kits de réactif MiSeq) au tube contenant la banque d'ADN dénaturée :

**Tableau 9.** Ajout du tampon HT1

Réactif	Volume
Banque dénaturée	20 µl
Tampon HT1	980 µl
Volume total	1 000 µl

- 7.10.5. Vortexer brièvement pour mélanger, puis centrifuger brièvement la solution d'ADN de la banque diluée et dénaturée.
- 7.10.6. Placer la banque diluée et dénaturée dans de la glace jusqu'au moment de son utilisation.
- 7.10.7. Retirer la banque d'ADNsb diluée de la glace et utiliser les instructions suivantes pour diluer davantage la banque en préparation pour le chargement sur le MiSeq

**Pour le logiciel de commande MiSeq (MCS v2.6) :**

La concentration de la banque d'ADN doit être égale à 12 pM pour le kit de réactif MiSeq v2.

La concentration de la banque d'ADN doit être comprise entre 12 et 20 pM pour le kit de réactif MiSeq v3.

- Si la concentration de la banque d'ADNsb diluée est de 40 pM (la concentration initiale était de 4 nM), diluer jusqu'à la concentration du chargement de MiSeq désirée en utilisant les exemples suivants :

**Tableau 10.** Préparation de la banque pour le chargement dans MiSeq

Concentrations finales	12 pM	15 pM	20 pM
Banque dénaturée	300 µl	375 µl	500 µl
Tampon HT1	700 µl	625 µl	500 µl
Concentration finale en NaOH (mM)	0,60	0,75	1,0

- Si la concentration de la banque d'ADNsb diluée est inférieure à 40 pM (la concentration initiale était inférieure à 4 nM), diluer l'ADN dénaturé de manière appropriée à la concentration de chargement de MiSeq désirée (par exemple 12 pM). **Veillez à ce que la concentration finale en NaOH ne dépasse pas 1,0 mM.**

- 7.10.8. Mélanger par inversion, 5 fois, les tubes contenant les solutions finales de banques, puis centrifuger brièvement.
- 7.10.9. Placer les préparations finales de banques dans de la glace jusqu'au moment de leur chargement dans la cartouche de réactifs MiSeq.

## 7.11. Chargement de la Flow Cell MiSeq

- 7.11.1. Charger 600 µl de la préparation finale de banque dans la cartouche de réactifs MiSeq.

## 7.12. Configuration de la feuille d'échantillons MiSeq

Configurer une Feuille d'échantillons MiSeq à l'aide d'Illumina Experiment Manager (utiliser v1.4 à v1.13).

**Caractères dans le nom de l'échantillon :**

Attribuer un nom et un identifiant unique à chaque échantillon lorsque vous les nommez.

Si vous utilisez des échantillons en double par exemple, vous pouvez nommer les doublons Échantillon1a et Échantillon1b.

Si des noms uniques ne sont pas attribués aux échantillons analysés ensemble dans la même Flow Cell, un seul échantillon est analysé par le logiciel LymphoTrack Dx Software – MiSeq au cours du processus.

Assurez-vous d'utiliser uniquement ces caractères lors de la configuration de la feuille d'échantillons (A-Z, a-z, 0-9, -, \_ , ) et pas plus d'un espace consécutif.

**Nom de l'échantillon lors du multiplexage :**

Chaque index ne peut être répertorié qu'une seule fois dans la feuille d'échantillons. Par conséquent, toute information de suivi nécessaire pour les échantillons séquencés avec de multiples cibles en utilisant le même index doit figurer dans un seul champ Sample ID (ID de l'échantillon) (qui est intégré dans le fichier FASTQ).

Il est conseillé de garder la trace de tous les échantillons et toutes les cibles d'une analyse MiSeq qui sont séquencés à l'aide du même index. Un identifiant unique doit être attribué à ce lot d'échantillons/de cibles, et celui-ci doit figurer dans le champ Sample ID (ID de l'échantillon) de la feuille d'échantillons. Lors de l'attribution du nom, garder à l'esprit que ce champ ne peut pas contenir plus de 20 caractères.

Des exemples de noms attribués au champ Sample ID (ID de l'échantillon) à des fins de suivi sont présentés ci-après :

- S1\_FR1\_FR2\_FR3\_IGK (un échantillon séquencé avec plusieurs tests à l'aide du même index)
- S1\_FR1\_S4\_Leader (plusieurs échantillons séquencés avec plusieurs tests à l'aide du même index)
- Pool12\_A012 (Pool12 fait référence à tous les échantillons/toutes les cibles séquencés avec l'index A012 et suivis ailleurs)



Le champ Nom de l'échantillon de la feuille d'échantillons est incorporé par défaut dans le nom du fichier FASTQ au lieu de l'ID de l'échantillon lorsque des informations sont entrées dans ce champ. Veuillez laisser ce champ vide ou copier les informations qui ont été entrées pour l'ID d'échantillon. Si d'autres informations sont entrées dans le champ Nom de l'échantillon, assurez-vous qu'il contient un identifiant unique et qu'il est conforme aux recommandations ci-dessus pour le suivi des échantillons.

- 7.12.1. Ouvrir Illumina Experiment Manager (utiliser v1.4 à v1.13).
- 7.12.2. Sélectionner *Create Sample Sheet* (Créer une feuille d'échantillons).
- 7.12.3. Dans la page *Instrument Selection* (Sélection de l'instrument), cliquer sur **MiSeq**, puis sur **Next** (Suivant).
- 7.12.4. Dans la page *MiSeq Workflow Selection* (Sélection du flux de travail MiSeq), sélectionner **Other** (Autre) pour *Category* (Catégorie), **FASTQ only** (FASTQ uniquement) pour *Application*, puis **Next** (Suivant).
- 7.12.5. Dans la page des paramètres du flux de travail
  - Taper le code-barres dans la case *MiSeq Reagent Cartridge Barcode* (Code-barres de la cartouche de réactifs MiSeq).

7.12.6. Sélectionner **TruSeq LT** dans la case *Assay* (Test).

- Sélectionner **1** pour les *Index Reads* (Lectures d'index).
- Renseigner les champs Experiment Name (Nom de l'expérience), Investigator Name (Nom du chercheur), Description et Date.
- Sélectionner **Paired End** (Lecture appariée) pour *Read Type* (Type de lecture).
- Sélectionner **251** pour *Cycles Read 1* (Lecture de cycles 1).
- Sélectionner **251** pour *Cycles Read 2* (Lecture de cycles 2).
- Vérifier que **Use Adapter Trimming** (Utiliser le rognage de l'adaptateur) est coché.
- Vérifier que *Use Adapter Trimming Read 2* (Utiliser le rognage de l'adaptateur de la lecture 2) est coché.
- Sélectionner **Next** (Suivant).

## 7.12.7. Dans la page Sample selection (Sélection de l'échantillon)

- Décocher **Maximize** (Maximiser).
- Sélectionner **New Plate** (Nouvelle plaque) pour *Sample Plate* (Plaque d'échantillon).

7.12.8. Dans la page ouverte *Assay Parameters* (Paramètres du test)

- Renseigner la case *Unique Plate Name* (Nom de plaque unique).
- Sélectionner **1** pour *Index Reads* (Lectures d'index).
- Sélectionner **Next** (Suivant).

7.12.9. Dans la page ouverte *Plate Samples* (Échantillons de la plaque)

- Renseigner la colonne *Sample ID* (Identifiant de l'échantillon).
- Sélectionner **A0XX** pour la colonne *Index1 (I7)* (XX doit être corrélé à l'identifiant du mélange mère (master mix), *p. ex.* si l'identifiant du mélange mère (master mix) est **01**, sélectionner **A001**).
- Sélectionner **Finish** (Terminer).
- Enregistrer le fichier.
- Sélectionner **Select All** (Sélectionner tout) sur la *Sample Plate* (Plaque d'échantillons).
- Sélectionner **Add Selected Samples =>** (Ajouter les échantillons sélectionnés) sur la *Sample Plate* (Plaque d'échantillons).
- Sélectionner **Finish** (Terminer).

**Important!**

Les séquences des adaptateurs ne sont pas reconnues par le logiciel LymphoTrack Dx Software - MiSeq.

Adapter Trimming (Rognage de l'adaptateur) doit être sélectionné lors de la création de la feuille d'échantillons.

7.12.10. Enregistrer le fichier. Vérifier que le nom du fichier est celui du code-barres qui figure sur la cartouche de réactifs MiSeq utilisée pour la réaction MiSeq en cours, *p. ex.*, MS200xxxx-500v2. (Ce fichier .csv sera utilisé pour l'analyse MiSeq.)

- Copier ce fichier dans le dossier de la feuille d'échantillons du logiciel de commande MiSeq.

### 7.13. Démarrage de la réaction MiSeq

Démarrer la réaction MiSeq en suivant les instructions du logiciel de commande MiSeq sur l'instrument MiSeq. Les durées d'analyse approximatives du MiSeq sont indiquées dans le tableau suivant.

**Tableau 11.** Durées de réaction MiSeq

Kit de réactif MiSeq	Longueur de lecture	Version MCS	Durée de réaction MiSeq totale
v2	2x251 pb	v2,6	~ 39 heures
v3	2x301 pb	v2,6	~ 56 heures

## 8. Analyse des données

Le test LymphoTrack Dx *TRB* Assay est destiné à produire des données de séquençage qui peuvent être analysées à l'aide de la suite logicielle LymphoTrack Dx Software – MiSeq fournie sur le CD qui est inclus avec la commande du test (n° de référence 9-500-0009). **Ce CD comprend les instructions détaillées pour l'installation et l'utilisation de la suite logicielle.**

Le séquençage MiSeq des échantillons préparés avec le test LymphoTrack Dx *TRB* Assay génère des fichiers FASTQ qui peuvent être facilement traités en données analysées intégralement grâce à l'application LymphoTrack Dx Data Analysis - MiSeq.

## 9. Valeurs attendues

- % de lectures le plus important du contrôle positif *TRB*  $\geq 2,5$  %
- % de lectures le plus important du contrôle négatif NGS  $< 1,0$  %
- Validité de la réaction MiSeq Q30  $\geq 75,0$  % pour v2 (2x251) ; Q30  $> 70$  % pour v3 (2x301)

\* Le score Q30 de toutes les validations analytiques répondent aux critères MiseQ Q30 d'Illumina, ci-dessus. Cependant, le score Q30 peut varier en fonction de la qualité de l'échantillon. Si le score Q30 est inférieur aux spécifications Q30 d'Illumina, vérifiez la valeur de l'index Q30 générée par le logiciel LymphoTrack Dx Software – MiSeq dans le rapport LymphoTrack Dx. Si l'index Q30 ne correspond pas non plus aux spécifications d'Illumina, l'utilisateur doit considérer que l'index a invalide.

## 10. Limites de la procédure

- Ce test n'identifie pas 100 % des populations cellulaires clonales.
- Les analyses PCR sont sujettes à des interférences dues à la dégradation de l'ADN ou à l'inhibition de l'amplification par PCR par l'héparine ou d'autres agents qui peuvent être présents dans l'échantillon analysé.

## 11. Interprétation et rapports

Le rapport *Merged Read Summary* (Résumé des lectures fusionnées) doit être utilisé pour identifier les séquences de lecture fusionnées les plus importantes et leurs fréquences avant la détermination de la clonalité à l'aide des critères figurant ci-dessous. Consulter la section Analyse des données pour plus d'informations sur le rapport *Merged Read Summary* (Résumé de lecture fusionné). Certains processus clonaux peuvent entraîner la détection de deux clones ou plus. Ceci peut inclure une population dominante avec une population sous-clonale réduite ou la présence de syndromes lymphoprolifératifs multiples. Il est particulièrement important d'interpréter ces causes dans leur contexte clinique.

Tableau 12. Critères d'interprétation

Critère 1	Critère 2	Critère 3	Critère 4	Résultat
Le nombre total de lectures pour chaque échantillon est $\geq 20\ 000$ .	La séquence fusionnée la plus importante est $\geq 2,5\ %$ du nombre de lectures total.	<b>Au moins un réarrangement D-J</b> a été détecté dans les <b>quatre</b> séquences fusionnées les plus fréquentes.	Le pourcentage (%) de lectures pour une séquence fusionnée clonale suspectée est $> 2 \times$ le % de lectures pour la <b>5<sup>e</sup></b> séquence fusionnée la plus fréquente. <sup>1</sup>	PREUVE DE CLONALITÉ DÉTECTÉE
			Le pourcentage (%) de lectures pour une séquence fusionnée clonale suspectée est $\leq 2 \times$ le % de lectures pour la <b>5<sup>e</sup></b> séquence fusionnée la plus fréquente. <sup>1</sup>	Aucune preuve de clonalité détectée
		<b>Aucun réarrangement D-J</b> n'a été détecté dans les <b>quatre</b> séquences fusionnées les plus fréquentes.	Le pourcentage (%) de lectures pour une séquence fusionnée clonale suspectée est $> 2 \times$ le % de lectures pour la <b>3<sup>e</sup></b> séquence fusionnée la plus fréquente. <sup>1</sup>	PREUVE DE CLONALITÉ DÉTECTÉE
			Le pourcentage (%) de lectures pour une séquence fusionnée clonale suspectée est $\leq 2 \times$ le % de lectures pour la <b>3<sup>e</sup></b> séquence fusionnée la plus fréquente. <sup>1</sup>	Aucune preuve de clonalité détectée
Le nombre total de lectures pour chaque échantillon est $\geq 10\ 000$ et $< 20\ 000$ .	La séquence fusionnée la plus importante est $\geq 5\ %$ du nombre de lectures total.	<b>Au moins un réarrangement D-J</b> a été détecté dans les <b>quatre</b> séquences fusionnées les plus fréquentes.	Le pourcentage (%) de lectures pour une séquence fusionnée clonale suspectée est $> 2 \times$ le % de lectures pour la <b>5<sup>e</sup></b> séquence fusionnée la plus fréquente. <sup>1</sup>	PREUVE DE CLONALITÉ DÉTECTÉE
			Le pourcentage (%) de lectures pour une séquence fusionnée clonale suspectée est $\leq 2 \times$ le % de lectures pour la <b>5<sup>e</sup></b> séquence fusionnée la plus fréquente. <sup>1</sup>	Aucune preuve de clonalité détectée
		<b>Aucun réarrangement D-J</b> n'a été détecté dans les <b>quatre</b> séquences fusionnées les plus fréquentes.	Le pourcentage (%) de lectures pour une séquence fusionnée clonale suspectée est $> 2 \times$ le % de lectures pour la <b>3<sup>e</sup></b> séquence fusionnée la plus fréquente. <sup>1</sup>	PREUVE DE CLONALITÉ DÉTECTÉE
			Le pourcentage (%) de lectures pour une séquence fusionnée clonale suspectée est $\leq 2 \times$ le % de lectures pour la <b>3<sup>e</sup></b> séquence fusionnée la plus fréquente. <sup>1</sup>	Aucune preuve de clonalité détectée
Le nombre total de lectures pour chaque échantillon est $< 10\ 000$ .	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	S.O. (sans objet)	Non évaluable

<sup>1</sup>Arrondir les valeurs au dixième pour la comparaison.

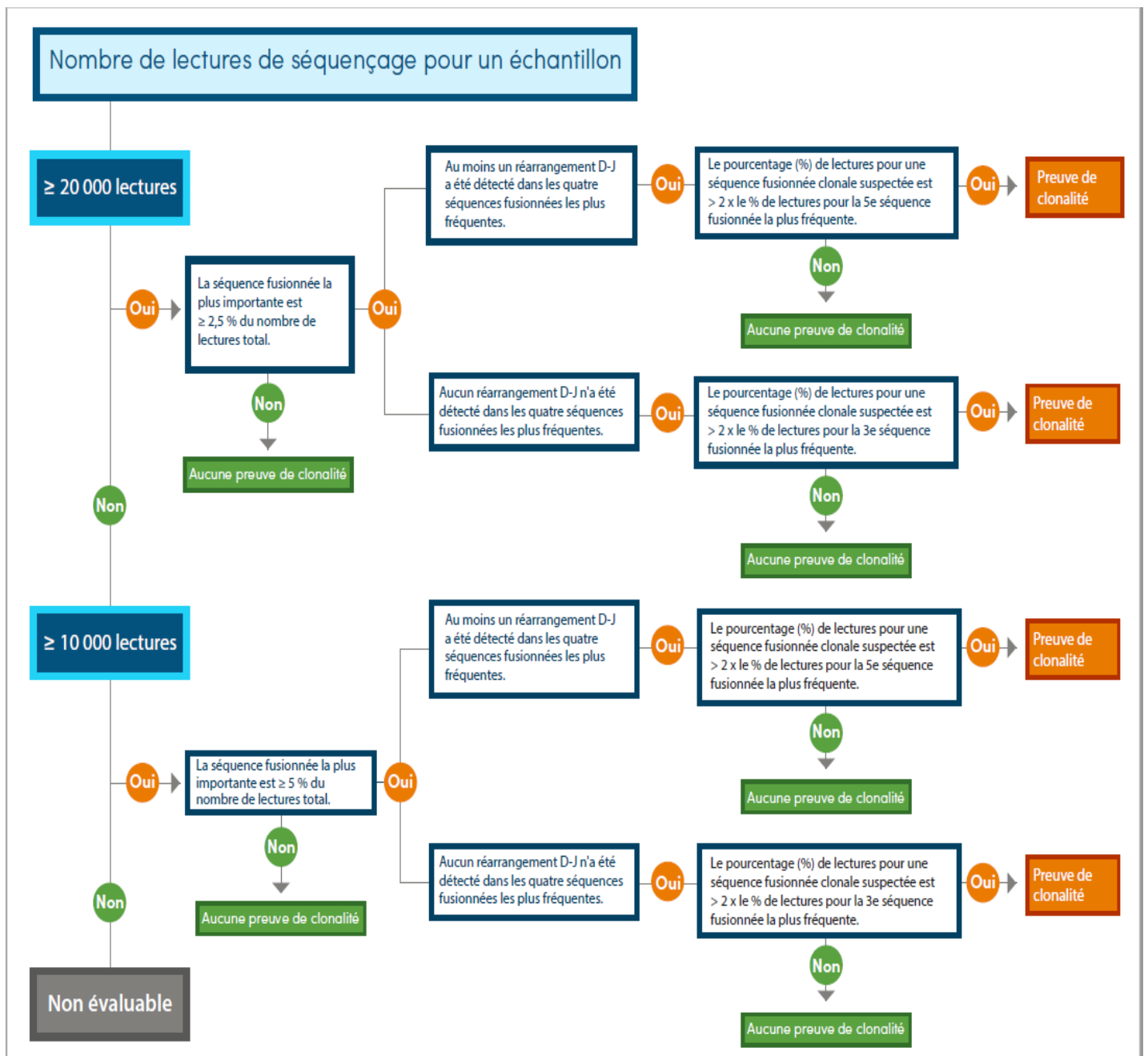


Figure 2 : interprétation des données d'après les critères du Tableau 12. Critères d'interprétation.



## 12. Données de l'échantillon

### LymphoTrack Dx Report pour test TRB

Nom de l'échantillon id1-MM-Lot-2-P1\_S1\_L001\_001\_combiné

Nombre total de lectures : 354 356

#### Top 10 Fusionné Lire le récapitulatif

Rang	Séquence	Longueur	Fusionner le nombre	Gène V	Gène J	% de lectures totales	% cumulé	Séquence CDR3
1	GAGTTGCTCATTACTTT+	198	34 085	Vb12-4	Jb1-2	9,62	9,62	GCCAGCAGTTTCTCGACQ+
2	GGAGGTGAGAAGGAAG+	221	6 376	Db1	Jb1-3	1,80	11,42	non trouvé
3	AACAATCGATTCTTAGC+	135	272	Vb14	aucun	0,08	11,49	GCCAGCAGCCAAGATCTA+
4	AACAATCGATTCTTAGC+	130	263	Vb14	Jb1-1	0,07	11,57	non trouvé
5	AACAATCGATTCTTAGC+	141	247	Vb14	Jb1-1	0,07	11,64	GCCAGCAGCCAAACCTTT+
6	AACAATCGATTCTTAGC+	133	245	Vb14	Jb1-1	0,07	11,71	non trouvé
7	AACAATCGATTCTTAGC+	150	201	Vb14	Jb1-1	0,06	11,76	GCCAGCAGCCAAGACC+
8	AGGGCCTGGAGGTGAG+	228	195	Db1	Jb1-3	0,06	11,82	non trouvé
9	AACAATCGATTCTTAGC+	140	187	Vb14	Jb1-1	0,05	11,87	non trouvé
10	AACAATCGATTCTTAGC+	153	171	Vb14	Jb1-1	0,05	11,92	GCCAGCAGCCAAGATGQ+

**Figure 3** Exemple d'un échantillon de contrôle positif avec preuve de clonalité. Ce tableau, généré via le LymphoTrack Dx Reporter, montre les 10 premières lectures du résumé des lectures fusionnées avec les 500 premières lectures; une lecture fusionnera avec une autre si elles sont seulement 1 ou 2 nucléotides (nts) différentes.

## 13. Caractéristiques de performance

Les résultats du test LymphoTrack Dx *TRB* Assay- MiSeq ont été comparés au Identiclone™ *TCRB* Gene Clonality Assay (méthode de contrôle) et la concordance (ou pourcentage d'accord), l'accord de pourcentage positive (PPA) et la pourcentage négative d'accord (NPA) étaient respectivement de 84,1 % (37/44 cas), 70,8% et 100 %.

**Tableau 13.** Comparaison entre LymphoTrack Dx *TRB* Assay – MiSeq et Identiclone *TCRB* Gene Clonality Assay (Méthode contrôle)

		Identiclone™ <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay (Méthode contrôle)	
		Clonal	Non clonal
LymphoTrack Dx <i>TRB</i> Assay - MiSeq	Clonal	17	0
	Non clonal	7	20

La performance analytique du test LymphoTrack Dx *TRB* Assay – MiSeq a été évaluée en analysant l'ajout d'ADN de lignées de cellules clonales à différentes dilutions dans l'ADN d'amygdale. La limite de détection (LD) était observée avec la dilution de l'ADN à 5 %. Les % de lecture les plus élevés dans l'ADN d'amygdale étaient < 1 %. La régression linéaire  $R^2$  était > 0,97 pour une plage de dilution de l'ADN comprise entre 0 et 10 %. Le coefficient de variation (CV en %) pour 8 analyses effectuées par 2 opérateurs avec 2 lots de réactif et 2 instruments était inférieur à 20 % lors de l'analyse des dilutions de l'ADN à 5 % et 10 %.

## 14. Guide de dépannage

**Tableau 14.** Guide de dépannage

Survenue pendant	Erreur	Action
Préparation de l'échantillon et du réactif	La quantité d'ADN est inférieure à 50 ng par une méthode basée sur l'ADNdb	Ne pas analyser l'échantillon
Préparation de l'échantillon et du réactif	L'intégrité de l'ADN de l'échantillon est faible	Analyser l'échantillon à l'aide du Specimen Control Size Ladder d'Invivoscribe (n° de référence : 2-096-0021 pour la détection par ABI ou n° de référence : 2-096-0020 pour la détection sur gel)
Quantification des amplicons à l'aide du kit de quantification de la banque KAPA	$\Delta Ct < 3,0$	Vérifier NTC sur BioAnalyzer/LabChip la contamination dans la région cible (300-500 bp) en utilisant la correction de la ligne de base. Si aucun produit n'est présent dans la région cible (300-500 pb), passer à l'étape suivante, sinon répéter.
Création de la banque par quantification des amplicons et groupement	La concentration des amplicons est inférieure à 1 nM	Vérifier la courbe de référence en qPCR et répéter la PCR si inférieure à 1 nM
Configuration de l'analyse du MiSeq	Feuille d'échantillons non trouvée	Se reporter au dépannage Illumina ou appeler le support technique Illumina au +1-800-809-4566
	Format de la feuille d'échantillons incorrect	
	Échec lors de la vérification du système fluidique	
	Espace disque faible	
	Flacon à déchets vide	
	Réseau déconnecté	
	Échec RFID	
Analyse MiSeq	*Q30 < 75 % pour v2 (2x251) Q30 < 70 % pour v3 (2x301)	Appeler le support technique Invivoscribe au +1-858-224-6600
Installation du CD	Le logiciel LymphoTrack Dx n'est pas installé correctement	Appeler le support technique Invivoscribe au +1-858-224-6600
Analyse des données	L'exécution du logiciel LymphoTrack Dx est interrompue	Appeler le support technique Invivoscribe au +1-858-224-6600
Analyse des données	Aucune séquence clonale n'est détectée pour le contrôle positif	Appeler le support technique Invivoscribe au +1-858-224-6600
Contrôle négatif sans ADN (NTC)	Le NTC montre une amplification dans la région cible (300-500 bp) sur BioAnalyzer/LabChip après PCR	Répéter le test

\*\* Le score Q30 de toutes les validations analytiques répondent aux critères MiseQ Q30 d'Illumina, ci-dessus. Cependant, le score Q30 peut varier en fonction de la qualité de l'échantillon. Si le score Q30 est inférieur aux spécifications Q30 d'Illumina, vérifiez la valeur de l'index Q30 générée par le logiciel LymphoTrack Dx Software – MiSeq dans le rapport LymphoTrack Dx. Si l'index Q30 ne correspond pas non plus aux spécifications d'Illumina, l'utilisateur doit considérer que l'index a invalidé. Q30 peut varier en fonction de la qualité de l'échantillon. Si Q30 tombe en dessous de cette spécification, vérifier que chaque index Q30 répond aux spécifications dans les rapports d'échantillons après le logiciel LymphoTrack Dx - Analyse MiSeq.

## 15. Support technique et service client

Nous vous remercions d'avoir acheté le test LymphoTrack Dx *TRB* Assay - MiSeq et vous sommes reconnaissants de votre fidélité. Nous sommes à votre disposition pour vous aider à comprendre ce test, et notre support technique est disponible du lundi au vendredi pour vous permettre de réaliser les tests efficacement dans votre laboratoire.

### Coordonnées

Invivoscribe Technologies, Inc.  
10222 Barnes Canyon Road, Building 1  
San Diego, CA 92121-2711  
États-Unis  
15.1.1.  
Téléphone : +1 858 224-6600  
Fax : +1 858 224-6601  
Service technique : [support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com)  
Service client : [sales@invivoscribe.com](mailto:sales@invivoscribe.com)  
Site Internet : [www.invivoscribe.com](http://www.invivoscribe.com)  
Heures ouvrables : 7h00 - 17h00 Heure du Pacifique



### Fabricant Représentant agréé et assistance technique UE









Invivoscribe Technologies, SARL  
Le Forum – Bât B  
515 Avenue de la Tramontane  
ZI Athélia IV  
13600 La Ciotat, France  
Téléphone : +33 (0)4 42 01 78 10  
Fax : +33 (0)4 88 56 22 89  
Service technique : [support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com)  
Service client : [sales-eu@invivoscribe.com](mailto:sales-eu@invivoscribe.com)  
Site Internet : [www.invivoscribe.com](http://www.invivoscribe.com)  
Heures ouvrables : 9h00 - 17h00 Heure du Pacifique

## 16. Bibliographie

- Tonegawa, S. (1983). [Somatic Generation of Antibody Diversity](#). *Nature* 302, 575-581.
- Trainor KJ., *et al.*, (1990) [Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level](#). *Blood* 75, 2220-2222.
- Miller, J. E. (2013). [Principle of Immunoglobulin and T Cell Receptor Gene Rearrangement](#). In Cheng, L., Zhang, D., Eble, J. N. (Eds), *Molecular Genetic Pathology* (2<sup>nd</sup> Ed., sections 30.2.7.13 and 30.2.7.18). New York, USA: Springer Science & Business Media.
- LymphoTrack Dx Software - MiSeq Package Instructions for Use (Cat# 9-500-0009)
- <https://www.beckmancoulter.com>
- <http://www.illumina.com>
- <http://www.invitrogen.com>
- <http://www.kapabiosystems.com>
- <http://www.thermofisher.com>

## 17. Symboles

Les symboles suivants sont désormais utilisés pour l'étiquetage des produits de diagnostic NGS d'Invivoscribe.

	Numéro de référence		Date de péremption
	Volume du réactif		Représentant agréé dans la Communauté européenne
	Numéro de lot		Consulter les instructions d'utilisation
	Conditions de conservation		Destiné au <i>diagnostic in vitro</i>

## 18. Informations légales

Ce produit est couvert par un ou plusieurs brevets et demandes de brevets suivants détenus par ou sous licence exclusive d'Invivoscribe Technologies, Inc. (IVS). Brevet américain n° 7,785,783, brevet américain n° 8,859,748 (ainsi que les demandes divisionnaires liées à la même demande d'origine), brevet européen n° EP 1549764B1 (validé dans 16 pays et complété par les brevets européens liés n° EP2418287A3 et EP 2460889A3), brevet japonais n° JP04708029B2, demande de brevet japonais n° 2006-529437, demande de brevet brésilien n° PI0410283.5, brevet canadien n° CA2525122, brevet indien n° IN243620, brevet mexicain n° MX286493, brevet chinois n° CN1806051 et brevet coréen n° 101215194.

L'utilisation de ce produit peut nécessiter des méthodes d'amplification des acides nucléiques telles que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les licences nécessaires à la pratique des méthodes d'amplification ou à l'utilisation des réactifs, des enzymes d'amplification ou d'équipements couverts par les brevets de tiers relèvent de la responsabilité de l'utilisateur, et aucune de ces licences n'est accordée par Invivoscribe Technologies, Inc, expressément ou implicitement.

©2018 Invivoscribe Technologies, Inc. Tous droits réservés. Les marques commerciales mentionnées dans ce document sont la propriété de Invivoscribe Technologies, Inc. et/ou de ses filiales, ou (en ce qui concerne les marques commerciales d'autres détenteurs utilisées dans ce document) de leurs propriétaires respectifs.

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

BECKMAN COULTER®, AGENCOURT®, AMPURE® et SPRIPLATE® sont des marques déposées de Beckman Coulter, Inc.

ROCHE® est une marque déposée et EAGLETAQ™ est une marque commerciale de Roche.

VERITI®, SYBR®, AMBION®, APPLIED BIOSYSTEMS® et LIFE TECHNOLOGIES® sont des marques déposées de Thermo Fisher Scientific et de ses filiales.

KAPA™ est une marque commerciale de Kapa Biosystems.

MICROSOFT®, WINDOWS® et EXCEL® sont des marques déposées de Microsoft Corporation.

## 19. LymphoTrack Dx *TRB* Assay : Diagramme du flux de travail

- 19.1. Enfiler des gants et retirer les mélanges mères (master mixes) du congélateur. Laisser les tubes décongeler ; puis vortexer doucement pour mélanger.
- 19.2. Sous la hotte de préparation des réactifs, pipeter 45 µl de mélange mère (master mix) dans les puits individuels d'une plaque de PCR. Un puits pour chaque mélange mère (master mix) et un mélange mère (master mix) par échantillon, contrôle positif, contrôle négatif et contrôle sans ADN.
- 19.3. Ajouter 0,2 µl d'ADN polymérase EagleTaq (EagleTaq à 5 U/µl) à chaque mélange mère (master mix).
- 19.4. Ajouter 5 µl d'ADN des échantillons (à une concentration minimale de 10 ng/µl) et 5 µl des échantillons de contrôle dans les puits contenant les réactions de mélanges mères (master mixes) respectives, aspirer et expulser 5 à 10 fois avec la pipette pour mélanger.
- 19.5. Ajouter 5 µl d'eau de qualité biologie moléculaire au puits contenant le mélange mère (master mix) respectif pour le contrôle négatif sans ADN, puis aspirer et expulser 5 à 10 fois avec la pipette pour mélanger.
- 19.6. Amplifier l'ADN cible à l'aide du programme de thermocycleur :

Étape	Température	Durée	Cycle
1	95 °C	7 minutes	1
2	95 °C	45 secondes	29 x
3	60 °C	45 secondes	
4	72 °C	90 secondes	
5	72 °C	10 minutes	1
6	15 °C	« infini »	1

- 19.7. Retirer la plaque d'amplification du thermocycleur.
- 19.8. Purifier les produits de PCR à l'aide du système de purification Agencourt AMPure XP. Ajouter **35 µL** de particules à chaque réaction de 50 µL ; éluer l'ADN dans une élution de 25 µL.
- 19.9. Quantifier les amplicons à l'aide du kit de quantification de la banque KAPA conformément aux instructions du kit. Diluer les amplicons à 1/4 000 avant de procéder à la qPCR.
- 19.10. Grouper des quantités égales d'amplicons provenant des échantillons (ne pas inclure le contrôle sans ADN), diluer à 1/1 000 et quantifier la banque à l'aide du kit de quantification de la banque KAPA.
- 19.11. Dénaturer et diluer la banque à 12 pM pour le kit de réactif MiSeq v2 et entre 12 et 20 pM pour le kit de réactif MiSeq v3 (MCS 2.6).
- 19.12. Charger 600 µl de banque dénaturée et diluée dans la cartouche de réactifs MiSeq.
- 19.13. Configurer une feuille d'échantillons MiSeq à l'aide d'Illumina Experiment Manager (utiliser v1.4 à v1.13).
- 19.14. Démarrer la réaction MiSeq.
- 19.15. Analyser et visualiser les données acquises avec la suite logicielle LymphoTrack Dx Software - MiSeq incluse.

## 20. Annexe A : création d'une banque de séquençage

Cette annexe comporte les instructions pour l'association des tests LymphoTrack Dx *IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* et *TRG* en une seule banque de séquençage. Deux ou plusieurs banques de séquençage générées à partir des mêmes mélanges cibles de gènes LymphoTrack (*par exemple*, deux banques de séquençage *TRG*, provenant de lots identiques ou différents) peuvent également être multiplexées ensemble dans une banque de séquençage unique à condition que chaque index pour ce mélange mère ne soit inclus qu'une fois par cycle de séquençage. Se reporter au tableau suivant pour déterminer les paramètres de cycle et les kits de réactif Illumina MiSeq à utiliser avec les différentes combinaisons de cibles. Il est recommandé d'utiliser le kit de réactifs MiSeq v3 lors du séquençage des 7 cibles afin d'obtenir suffisamment de lectures par échantillon.

**Tableau 15.** Paramètres de cycle et kits de réactif pour une analyse MiSeq à cibles multiples

Cibles de multiplexage	Paramètres de la feuille d'échantillons	Kit de réactif MiSeq	N° de référence
Uniquement <i>IGH</i> FR3 et <i>TRG</i> conjointement	151 cycles Lecture 1 151 cycles Lecture 2	Kit v2 (300 cycles) ou Kit v2 (500 cycles)	MS-102-2002 ou MS-102-2003
Toute combinaison de ces cibles conjointement : <i>IGH</i> FR1, <i>IGH</i> FR2, <i>IGH</i> FR3, <i>IGK</i> , <i>TRB</i> et <i>TRG</i>	251 cycles Lecture 1 251 cycles Lecture 2	Kit v2 (500 cycles) jusqu'à 4 cibles ou Kit v3 (600 cycles)	MS-102-2003 ou MS-102-3003
Lors de la combinaison de l'un ou l'autre des tests avec : <i>IGHV</i> Leader	301 cycles Lecture 1 301 cycles Lecture 2	Kit v3 (600 cycles)	MS-102-3003

20.1. Déterminer la concentration de chaque banque individuelle (*p. ex.*, *IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* et *TRG*).

20.2. Déterminer la quantité de chaque banque à dénaturer.

Dans le tableau ci-dessous, les cas A, B, C et D sont différents exemples d'analyses multiplexes (*p. ex.*, le cas A est une analyse multiplexe d'*IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* et *TRG*). T, U, V, W, X, Y et Z sont les volumes en  $\mu$ l.

$n$  = nombre de cibles chargées dans une cartouche MiSeq

$T = 40 \text{ fmole} / [n \times \text{concentration de la banque } IGHV \text{ Leader (nM)}]$

$U = 40 \text{ fmole} / [n \times \text{concentration de la banque } IGH \text{ FR1 (nM)}]$

$V = 40 \text{ fmole} / [n \times \text{concentration de la banque } IGH \text{ FR2 (nM)}]$

$W = 40 \text{ fmole} / [n \times \text{concentration de la banque } IGH \text{ FR3 (nM)}]$

$X = 40 \text{ fmole} / [n \times \text{concentration de la banque } IGK \text{ (nM)}]$

$Y = 40 \text{ fmole} / [n \times \text{concentration de la banque } TRG \text{ (nM)}]$

$Z = 40 \text{ fmole} / [n \times \text{concentration de la banque } TRB \text{ (nM)}]$

**Remarque** : la valeur 40 fmole correspond aux 20  $\mu$ l de 2 nM obtenus à la fin de l'étape 20.3.

**Tableau 16.** Calcul des entrées d'une banque individuelle afin de générer une banque de séquençage à cibles multiples pour l'analyse MiSeq.

Banque			Volume de la banque individuelle (µl)					
			Cas A	Cas B	Cas C	Cas D	Cas E	Cas F
Nom du test	Concentration (nM)		n = 7	n = 6	n = 5	n = 4	n = 3	n = 2
<i>IGHV</i> Leader	2,3	T	2,5	2,9	3,5	4,3		
<i>IGH</i> FR1	1,5	U	3,8	4,4	5,3	6,7	8,9	
<i>IGH</i> FR2	4	V	1,4	1,7	2,0	2,5	3,3	
<i>IGH</i> FR3	2,1	W	2,7	3,2	3,8	4,8	6,4	
<i>IGK</i>	3,5	X	1,6	1,9	2,3			5,7
<i>TRG</i>	2,6	Y	2,2	2,6				7,7
<i>TRB</i>	2	Z	2,9					
		T+U+V+W+X+Y+Z	17,1	16,7	16,9	18,3	18,6	13,4

### 20.3. Dénaturer les banques combinées à 2 nM.

- Ajouter les réactifs conformément au Tableau 17. Dénaturation des banques d'après la quantité déterminée lors de l'étape précédente.

Si  $T+U+V+W+X+Y+Z > 18$ , comme dans les cas D et E du Tableau 16, mélanger d'abord les banques applicables, puis ajouter 18 µl à la réaction de dénaturation comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 17.** Dénaturation des banques

Réactif	Volume (µl)
Banque <i>IGHV</i> Leader	T
Banque <i>IGH</i> FR1	U
Banque <i>IGH</i> FR2	V
Banque <i>IGH</i> FR3	W
Banque <i>IGK</i>	X
Banque <i>TRG</i>	Y
Banque <i>TRB</i>	Z
NaOH 1N	2
10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,05 % Tween 20	18 – (T+U+V+W+X+Y+Z)
<b>Total</b>	<b>20</b>

Vortexer brièvement pour mélanger la solution, puis centrifuger brièvement pour garantir que toute la solution s'est déposée au fond du tube. Incuber pendant 5 minutes à température ambiante pour dénaturer la banque d'ADN combinée en ADN simples brins.



20.4. Diluer la banque dénaturée à 40 pM.

Ajouter 980 µl de tampon HT1 préalablement refroidi (fourni dans le kit de réactif MiSeq) au tube contenant 20 µl de banque d'ADN dénaturée. Vortexer brièvement pour mélanger et centrifuger brièvement l'échantillon.

20.5. Préparer la banque dénaturée pour la charger dans le MiSeq.

Diluer la banque à 12 pM pour le kit de réactif MiSeq v2 et à 20 pM pour le kit de réactif MiSeq v3 (MCS v2.6) en suivant le tableau ci-dessous. Vortexer brièvement pour mélanger et centrifuger brièvement l'échantillon.

**Tableau 18.** Préparation de la banque combinée pour le chargement dans le MiSeq

Réactif	Volume (µl)	
	12 pM	20 pM
Banque 40 pM	300	500
Tampon HT1 refroidi	700	500
<b>Total</b>	<b>1 000</b>	<b>1 000</b>

20.6. Charger 600 µl de banque dénaturée combinée obtenue à l'étape précédente dans une cartouche de réactifs MiSeq.