



Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Référence : **BP-ANPGM_002**

Page : 1/19

Numéro de version : **1**

Date de Création : **04/05/2012**

Date de la remise à jour : **04/05/2012**

	Nom	Hôpital	Date
Rédacteur(s)	Bénédicte Gérard	Hôpitaux de Strasbourg	
	Emmanuelle Girodon-Boulandet	Groupe hospitalier Henri Mondor	
Validation	AG ANPGM		12/03/2012

Groupe de travail ANPGM : Marie-Pierre Busine, Bénédicte Gérard, Emmanuelle Girodon-Boulandet, Claude Houdayer, Cédric Lefol, Michael Morris, Etienne Rouleau, Anne-Françoise Roux, Pascale Saugier Veber, Véronique Tardy, Christian Vasseur



Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Référence : **BP-ANPGM_002**

Page : 2/19

Numéro de version : 1

Préambule

Les laboratoires de génétique utilisant la technique de séquençage par méthode de Sanger en diagnostic doivent avoir constitué un dossier de validation de leur méthode de séquençage, en portée flexible étendue (B).

Rappel de la définition du terme « validation » selon la norme ISO 9000 : « Confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites ».

Ce document pose les principes généraux de validation de la méthode de séquençage, qui s'appuient sur les documents du Cofrac et l'article de Mattocks et al., Eur J Hum Genet 2010 : méthode qualitative à éléments quantifiables. Il en décrit les critères de qualité en vue de son application dans le domaine de la génétique constitutionnelle. Ces critères de qualité ont été définis collégalement par un groupe de travail composé de membres de l'ANPGM et du groupe Interloqt.

Selon les applications du séquençage dans un laboratoire, plusieurs options sont possibles dans la constitution des dossiers de validation. Si les applications du séquençage sont multiples dans un laboratoire, il est proposé, pour simplifier le travail, de constituer les dossiers suivants :

- Un dossier de validation de la méthode de séquençage en génétique constitutionnelle. Ce dossier peut être constitué pour des applications sélectionnées (au moins dix amplicons, d'un même gène ou de gènes différents), pour lesquelles le laboratoire dispose de témoins de variations de séquence, quelle qu'en soit la signification clinique, au mieux caractérisés par une autre technique ou un autre laboratoire. Ce dossier doit contenir les éléments de preuve correspondant à la validation du séquençage dans son utilisation générale. Les paramètres clés de la méthode à valider sont les suivants :
 - Exactitude : sensibilité et spécificité
 - Robustesse
 - Limite de détection, dans le cas de détection de séquences minoritaires
- Un dossier de validation pour la mise en œuvre de chacun des tests au laboratoire, faisant référence au dossier précédent à partir du moment où les analyses sont réalisées selon des processus techniques équivalents (purification de la PCR, réactions de séquence, purification de la séquence, mode d'analyse sur le séquenceur). Ce dossier doit contenir les éléments suivants :
 - Vérification des points critiques pouvant interférer avec la **sélectivité** du test proposé (notamment vérification des amorces, vérification de la zone étudiée, image prouvant la qualité des PCR produites).
 - Vérification de la **spécificité et de la sensibilité** analytiques par la mesure des valeurs qualité (QV) type Phred obtenues sur au moins deux échantillons contrôles : les QV obtenues des bases doivent remplir les conditions citées dans le dossier de validation initiale; passage si possible de quelques sujets contrôles mutés.



Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Référence : **BP-ANPGM_002**

Page : 3/19

Numéro de version : 1

*La recherche d'une mutation inconnue par séquençage selon la méthode de Sanger est considérée ici comme relevant d'une méthode **qualitative** : il s'agit ici de détecter la présence d'une variation qualitative de séquence par rapport à une séquence de référence, à l'état homozygote, hémizygote ou hétérozygote. Elle repose sur des éléments quantifiables (QV type Phred) ; selon l'article de Mattocks et al. (Eur J Hum Genet 2010) sur la validation des tests en génétique, cette analyse est classée en type D : un résultat qualitatif peut correspondre à plusieurs valeurs quantitatives possibles, avec plusieurs mutations possibles à un nucléotide donné.*

*Le domaine d'application de la méthode peut également comprendre la recherche de variations de séquence minoritaires, par exemple pour les mutations hétéroplasmiques de l'ADN mitochondrial ou les mosaïques somatiques. Dans ce cas, le dossier de validation initiale doit obligatoirement comprendre un chapitre argumenté sur les **limites de détection** de la méthode de Sanger.*

Ce document contient donc des propositions pour la constitution de ces dossiers de validation, incluant des recommandations concernant les paramètres à évaluer et la démarche pour y parvenir. Le schéma suivi est celui du document Cofrac SH GTA 04 pour le dossier de validation initiale, mais libre à chaque laboratoire de l'adapter. Le plan suivi peut aussi être celui proposé par EuroGentest (Mattocks et al., Eur J Hum Genet 2010), comme ce qui est proposé pour le dossier de validation par gène. Il n'est évidemment pas nécessaire que les laboratoires ayant déjà l'expérience du séquençage refassent l'ensemble des expériences nécessaires à la validation. Ils peuvent simplement collecter les éléments de preuve à partir d'analyses déjà réalisées.

Les commentaires en italique constituent des propositions de la part du groupe de l'ANPGM et du groupe Interloq.

Les éléments en bleu correspondent aux éléments à regrouper dans ce dossier et aux actions à réaliser au sein de votre laboratoire pour compléter le document.

Il existe également des propositions de texte que vous pouvez inclure dans votre document final.



Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Référence : **BP-ANPGM_002**

Page : 4/19

Numéro de version : 1

Dossier type de validation initiale approfondie de la méthode de séquençage par Sanger pour la recherche de mutations

Proposition de maquette

- 1. Présentation de la technique, de l'appareillage et du mode opératoire ; domaine d'application et but de la validation de méthode**
- 2. Liste des critères de performance à vérifier et leurs limites acceptables** (spécifiées dans ce document)
- 3. Vérification bibliographique**
- 4. Etude de risques** (transmissible au Cofrac)
- 5. Plan d'expérience et mise en oeuvre dans le laboratoire**
- 6. Compilation et traitement statistique des données obtenues** (résultats bruts, à disposition dans le laboratoire)
- 7. Conclusion et décision quant à la validation opérationnelle de la technique, au regard des spécifications (limites acceptables) initialement fixées.**

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Référence : **BP-ANPGM_002**

Page : 5/19

Numéro de version : 1

1. Présentation de la technique, de l'appareillage et du mode opératoire ; domaine d'application et but de la validation de méthode

1.1 Description de la méthode

Décrire ici la méthode ou bien faire référence à un autre document de votre laboratoire (par exemple, document de référence sur le principe des techniques). Vous pouvez vous aider de la proposition de texte ci-jointe.

Proposition de texte : La recherche d'une mutation par séquençage selon la méthode de Sanger est considérée comme relevant d'une méthode **qualitative** : il s'agit ici de détecter la présence d'une variation qualitative de séquence nucléotidique par rapport à une séquence de référence.

La détermination du caractère homozygote, hémizyote ou hétérozygote pour une variation de séquence se fait en fonction de la détection ou non de l'allèle normal ou pathologique et du mode de transmission.

Base normale	Base variante	Résultat
+	-	Profil normal
+	+	hétérozygote
(-)	+	Homozygote muté ou hémizyote

Le séquençage est réalisé par la **méthode de Sanger**.

La réaction de séquence proprement dite consiste en une synthèse *in vitro* d'ADN à partir d'une matrice avec une incorporation aléatoire de dideoxynucléotides triphosphate (ddNTP). La matrice (produits de PCR purifiés préalablement obtenus) doit être présente en grande quantité (> 100 millions de copies dans le tube de réaction d'où la nécessité de la première étape d'amplification par PCR). Elle est ajoutée à un mélange réactionnel comprenant une ADN polymérase (Taq polymérase), une amorce s'hybridant en 5' du fragment à séquencer, un tampon et un mélange de dNTP (deoxynucléotide triphosphate) + ddNTP. Chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome spécifique. Le ratio ddNTP/dNTP est de l'ordre de 1/100. Il existe donc 100 fois plus de chance d'incorporer un dNTP qu'un ddNTP. L'incorporation d'un ddNTP stoppe la réaction d'élongation.

La synthèse d'ADN se fait de façon complémentaire à la matrice initiale. Ainsi, à chaque position de A sur le brin matrice, un dTTP ou d'un ddTTP fluorescent sera incorporé. Comme la réaction de séquence est réalisée à partir d'un très grand nombre de copies de la matrice, l'incorporation aléatoire des ddNTP conduit à leur incorporation à toutes les positions possibles sur le segment d'ADN. Ainsi, pour un produit PCR de 400 pb, il y aura donc génération de 400 types de fragments fluorescents ne différant en taille que d'une base et par la nature du ddNTP incorporé à leur extrémité. Ces fragments néosynthétisés sont ensuite séparés par migration dans les capillaires du séquenceur automatique. Un faisceau laser en regard des capillaires excite le fluorochrome des ddNTP. Une caméra CCD capture l'émission de fluorescence amplifiée par un photomultiplicateur. Un électrophérogramme est obtenu après analyse des données brutes restituées par la caméra CCD (raw data) par un logiciel d'analyse (correction du bruit de fond, reconnaissance des bases, calcul du score Phred ou valeur



Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Référence : **BP-ANPGM_002**

Page : 6/19

Numéro de version : **1**

qualité équivalente). L'électrophérogramme du patient est ensuite comparé à celui d'un sujet contrôle ou à une séquence de référence de manière à identifier, par une modification du profil, une variation de séquence à l'état homozygote (ou hémizygote selon le mode de transmission de la maladie considérée) ou hétérozygote.

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutationsRéférence : **BP-ANPGM_002**

Page : 7/19

Numéro de version : 1

1.2 Présentation de l'appareillage et du mode opératoire

Commentaires : La validation doit être effectuée dans un environnement de production (équipements, réactifs, logiciels d'analyse). Si un de ces éléments subit un changement, une nouvelle validation est nécessaire.

1.2.1 Présentation du séquenceur

Commentaires : La validation de la méthode de séquençage nécessite que l'automate utilisé (séquenceur automatique) ait été préalablement évalué et maîtrisé, en fonction des risques évalués :

- *Il faut avoir démontré que le matériel est capable d'atteindre les performances requises. Par exemple, le passage d'une séquence de contrôle peut permettre de montrer que cet appareil est capable de produire une séquence de 600 bases dans sa configuration actuelle, (à adapter en fonction de la taille des amplicons générés au laboratoire).*
- *Il faut que la maintenance préventive soit faite (cahier de vie du laboratoire).*
- *Une surveillance régulière du fonctionnement des instruments, des réactifs et des systèmes analytiques doit être faite, notamment au travers des CIQ. Par exemple, le passage régulier d'une séquence contrôle ou d'un marqueur de taille peut permettre de contrôler les performances de l'appareil.*
- *Le personnel doit être habilité à utiliser ces appareils.*

Faire référence dans ce paragraphe aux documents de votre laboratoire relatifs à la validation et à la maîtrise de l'automate dans ce contexte diagnostique.

Par exemple, faire référence aux documents suivants : utilisation et maintenance du séquenceur ; organisation des techniciens pour réaliser la maintenance ; habilitation des techniciens à l'usage du séquenceur ; passage des CIQ pour contrôler la qualité des séquences produites ...

1.2.2 Présentation du logiciel d'analyse

Commentaires : En génétique constitutionnelle, l'utilisation d'au moins un logiciel d'analyse permettant l'alignement sur une séquence de référence et le calcul de valeurs qualité est recommandée.

La validation de la méthode de séquençage nécessite que le ou les logiciels utilisés aient été préalablement évalués et validés pour les applications prévues :

- *lecture des bases*
- *alignement des données obtenues par rapport à une séquence de référence*
- *valeurs qualité (QV ou valeur Phred) pour toutes les bases analysées, ou tout autre moyen indicateur de la qualité des séquences (intensité du signal, bruit de fond, rapport signal/bruit de fond).*

La version du logiciel doit être documentée.

NB : il existe des logiciels gratuits fournissant des valeurs qualités (type FinchTV ou Sequence Scanner).

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutationsRéférence : **BP-ANPGM_002**

Page : 8/19

Numéro de version : 1

- *Il faut avoir démontré que le ou les logiciels utilisés sont capables d'atteindre les performances requises et en maîtriser les risques.*
- *Le personnel doit être habilité à utiliser ces logiciels.*

En cas d'utilisation de la méthode de séquençage pour la détection de variations de séquence minoritaires, le laboratoire doit adapter la méthode d'analyse en fonction du seuil de détection fixé (analyse manuelle des séquences ou paramétrage spécifique du logiciel d'analyse).

Faire référence dans ce paragraphe aux documents de votre laboratoire relatifs à la validation et à la maîtrise du logiciel d'analyse.

1.2.2 Présentation du ou des modes opératoires associés

Faire référence aux modes opératoires associés de votre laboratoire.

Ex : - Techniques de purification

- Techniques de marquage

- Utilisation du séquenceur

- Analyse des résultats par un logiciel

Faire référence au document sur l'habilitation du personnel à l'application de ces modes opératoires.

1.3 Domaine d'application et but de la validation de méthode

Attention, adapter le texte proposé en cas de détection de mutations en mosaïque, pour laquelle l'étude de limite de détection de la méthode est critique.

Proposition de texte : Ce dossier de validation concerne la recherche de mutations par séquençage.

Il est à noter que cette méthode ne détecte pas les grands réarrangements à type de délétion, insertion, duplication ou inversion.

Le but de la validation de méthode de séquençage est de vérifier :

1. que les modes opératoires mis en place génèrent des séquences de qualité suffisante
2. que le système est capable de détecter des mutations ponctuelles ainsi que des petites délétions, insertions ou duplications (internes aux fragments analysés), à l'état homozygote, hémizygote ou hétérozygote.

2. Liste des critères de performance à vérifier et leurs limites acceptables (peut être remplacée par le formulaire SH GTA 04 et/ou SH FORM 44)

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutationsRéférence : **BP-ANPGM_002**

Page : 9/19

Numéro de version : 1

Commentaires :

- *Cette validation peut être réalisée par l'analyse d'un ou plusieurs amplicons, d'un même gène ou de gènes différents, les amplicons choisis étant représentatifs des amplicons générés dans le laboratoire (notamment taille et pourcentage en GC des fragments, conditions de PCR), et pour le(s)quel(s) il existe des mutations connues qui ont été préalablement identifiées, soit par un autre laboratoire (échantillon reçu dans le cadre d'une EEQ ou par échange interlaboratoire), soit par une autre méthode dans le laboratoire.*
- *Le laboratoire qui a déjà l'expérience du séquençage peut simplement apporter les éléments de preuve collectés à partir d'analyses déjà réalisées, ou de publications du laboratoire, et apprécier au mieux la spécificité et la sensibilité. Le dossier de validation doit contenir ou faire référence à ces éléments de preuve.*
- *La performance du test est assurée par une maîtrise de l'étape analytique du séquençage proprement dit. Néanmoins, cette performance est par ailleurs très dépendante d'éléments en amont du séquençage, qui doivent être également maîtrisés. Ces éléments (choix des amorces de PCR, contrôle de la qualité des PCR produites) peuvent être détaillés dans le paragraphe "Maîtrise des risques" ou bien faire l'objet d'un paragraphe indépendant.*
- *La sensibilité diagnostique, qui correspond globalement au taux de détection des mutations, doit être évaluée pour chaque application clinique et ne fait pas partie du dossier de validation générale du séquençage.*
- *Les valeurs Phred (ou QV) permettent d'évaluer la probabilité que l'assignation de la base soit juste. Elles sont exprimées en $10 \times \log$ de la probabilité d'erreur (Phred 20 : 1% de risque d'erreur (99% de confiance que la base soit correctement identifiée) ; Phred 30 : 0,1% de risque d'erreur (99,9% de confiance que la base soit correctement identifiée). Elles peuvent servir d'outils pour évaluer la spécificité et la sensibilité analytiques de la méthode. Elles tiennent compte notamment de l'intensité du signal, du bruit de fond et du rapport signal/bruit de fond.*
- *Les valeurs qualité ne sont exploitables que pour des bases non mixées. En cas de bases mixées, (hétérozygotie, présence d'un frameshift), ne prendre en compte que des valeurs qualité obtenues sur les bases non mixées du fragment.*

2.1 Spécificité et Sensibilité analytiques : reflet de l'exactitude

Commentaires : La spécificité analytique de la méthode de séquençage (capacité à ne pas identifier de faux positifs) peut être évaluée sur un groupe de sujets contrôles dont la séquence d'intérêt ne comporte pas de variation nucléotidique par rapport à la séquence de référence.

La sensibilité analytique de la méthode (capacité à identifier les variations de séquence présentes) peut être évaluée sur un groupe de sujets contrôles normaux (sans mutation) et sur un groupe de sujets contrôles porteurs de mutation(s) (ou SNP) connue(s). La sensibilité analytique peut être également approchée par l'étude de la fréquence d'un SNP (comparaison de la fréquence observée et de la fréquence théorique pour une même population, concordance avec une autre méthode de détection de mutations utilisée au laboratoire ou échanges d'échantillons interlaboratoires).

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutationsRéférence : **BP-ANPGM_002**

Page : 10/19

Numéro de version : 1

Critères proposés par l'ANPGM et le groupe Interloqt à partir du panel d'amplicons choisis.

1. Evaluation de la spécificité analytique (Vrais Négatifs / Vrais Négatifs + Faux Positifs)

Il est proposé que les critères suivants soient obtenus pour que la méthode soit validée :

La valeur qualité (Phred ou autre QV) doit être au minimum de

- 20 pour l'ensemble des bases lues sur les deux sens de la région d'intérêt ;
- 30 pour l'ensemble des bases lues sur un seul sens de la région d'intérêt (en cas de lecture incomplète sur les deux brins ou de lecture en simple brin).

L'analyse des valeurs qualité doit être complétée par l'inspection visuelle de la séquence.

Ces critères sont adaptés des recommandations CMGS (Clinical Molecular Genetics Society).

2. Evaluation de la sensibilité analytique (Vrais Positifs / Vrais Positifs + Faux Négatifs)

Il est proposé que les critères suivants soient obtenus pour que la méthode soit validée :

100 % de concordance doit être observée avec le génotype connu antérieurement (selon une autre méthode ou dans un autre laboratoire).

Proposition de texte : En séquençage, les **faux positifs** analytiques (détection d'une mutation qui n'existe pas) et les **faux négatifs** analytiques (défaut de détection d'une mutation présente) peuvent être secondaires à une qualité insuffisante des profils de fluorescence (notamment à un bruit de fond trop important). En pratique, la sensibilité et la spécificité analytiques, difficiles à déterminer de façon rigoureuse (analyse d'un très grand nombre d'échantillons nécessaire, absence de contrôle positif pour chaque base potentiellement mutée), peuvent cependant être approchées par la valeur de qualité (ou Quality Value, QV, type Phred) obtenue pour chaque base identifiée, indiquée par un logiciel d'analyse adapté.

La valeur qualité, type Phred, indique la probabilité que le résultat soit juste. Il est exprimé en 10xlog de la probabilité d'erreur :

Phred 20 : 1% de risque d'erreur (99% de confiance que la base soit correctement identifiée)

Phred 30 : 0,1% de risque d'erreur (99,9% de confiance que la base soit correctement identifiée)

Phred 40 : 0.01% de risque d'erreur (99,99% de confiance que la base soit correctement identifiée)

- **Spécificité analytique**

Critères retenus : définir les critères retenus dans votre laboratoire. Le choix de ces critères peut s'appuyer sur les propositions de l'ANPGM

Le plan d'analyse proprement dit sera détaillé chapitre 5.

- **Sensibilité analytique**

Critères retenus : définir les critères retenus dans votre laboratoire. Le choix de ces critères peut s'appuyer sur les propositions de l'ANPGM

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutationsRéférence : **BP-ANPGM_002**

Page : 11/19

Numéro de version : 1

Le plan d'analyse proprement dit sera détaillé chapitre 5.

2.2 Robustesse

Commentaires : la robustesse évalue la capacité du séquençage à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode, en dehors des recommandations des fournisseurs. Le choix des paramètres doit se faire en fonction de l'étude des risques.

Les paramètres à faire varier peuvent être les suivants :

- Concentration de produits de PCR
- Protocole de purification
- Volumes de tampon
- Concentration de Big Dye
- Thermocycleurs (peut être aussi évalué lors de la qualification/validation des appareils)
- Séquenceurs (peut être aussi évalué lors de la qualification/validation des appareils)
- Autres paramètres à faire varier en fonction de l'étude des risques

Critères proposés par l'ANPGM et le groupe Interloqt

Les valeurs qualité doivent être au minimum de :

- 20 pour l'ensemble des bases lues dans les deux sens de la région d'intérêt
- 30 pour l'ensemble des bases lues dans un seul sens de la région d'intérêt.

Critères retenus : définir les critères retenus dans votre laboratoire. Le choix de ces critères peut s'appuyer sur les propositions de l'ANPGM

Le plan d'analyse proprement dit sera détaillé chapitre 5

2.3 Limite de détection (en fonction de l'activité du laboratoire)

Commentaires : Ce paramètre doit faire l'objet d'une évaluation dans le cas où le séquençage est appliqué à la détection de variations de séquence minoritaires. La limite de détection correspond au seuil de positivité, c'est-à-dire au seuil au delà duquel le séquençage est capable de détecter la présence d'un variant nucléotidique par rapport à la séquence de référence. Elle correspond à la proportion de variant la plus faible pouvant être distinguée du bruit de fond.

La méthode de séquençage doit alors permettre la détection d'un variant nucléotidique présent en proportion supérieure au seuil établi par le laboratoire. Ce seuil peut être défini expérimentalement ou selon la revue de la littérature. Il peut être différent en fonction des paramètres étudiés.

Critères proposés par l'ANPGM et le groupe Interloqt

La limite de détection peut être évaluée selon le même type d'expériences défini pour appréhender la sensibilité et la spécificité analytiques, à partir d'une gamme d'échantillons dilués.

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutationsRéférence : **BP-ANPGM_002**

Page : 12/19

Numéro de version : 1

Critères retenus : définir les critères retenus dans votre laboratoire. Le choix de ces critères peut s'appuyer sur les propositions de l'ANPGM

Le plan d'analyse proprement dit sera détaillé chapitre 5.

2.4 Contamination entre échantillons

Commentaires : Le laboratoire doit avoir mis en place des procédés garantissant l'absence de contamination inter-échantillons aux différentes étapes de l'analyse. En particulier, une absence de contamination inter-échantillons doit être démontrée lors de l'utilisation des plate-formes de pipetage ou au niveau du séquenceur automatique.

Critères proposés par l'ANPGM et le groupe Interloqt

Une absence significative de contamination entre tubes/puits doit être démontrée dans le plan d'expérience choisi.

Critères retenus : définir les critères retenus dans votre laboratoire. Le choix de ces critères peut s'appuyer sur les propositions de l'ANPGM

Le plan d'analyse proprement dit sera détaillé chapitre 5.

2.5 Stabilité des réactifs

Commentaires : Un défaut de stabilité des réactifs peut occasionner une baisse de la qualité des séquences obtenues. Des recommandations générales doivent être mises en place dans le laboratoire pour éviter une dégradation de la qualité des séquences réalisées liée à un problème de stabilité des réactifs (polymère, kit de séquence, dilution des amorces, qualité de la matrice utilisée ...) : par exemple, la température et la durée de conservation des produits d'amplification (purifiés ou non) doit être définie et mentionnée dans les modes opératoires. Elle peut être vérifiée lors de l'utilisation en routine.

Critère proposé par l'ANPGM et le groupe Interloqt

Le suivi des valeurs qualité par des CIQ peut permettre de mettre en évidence une baisse de la qualité des séquences liée à un problème de stabilité des réactifs.

Critères retenus : définir les critères retenus dans votre laboratoire. Le choix de ces critères peut s'appuyer sur les propositions de l'ANPGM

Le plan d'analyse proprement dit sera détaillé chapitre 5.

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutationsRéférence : **BP-ANPGM_002**

Page : 13/19

Numéro de version : 1

2.6 Comparaison avec une méthode de référence ou avec une méthode déjà utilisée au laboratoire**Proposition de texte :**

La méthode de séquençage constitue la méthode de référence.

Par défaut, une comparaison peut être obtenue par d'autres techniques utilisées au laboratoire (reverse dot blot, restriction enzymatique...).

2.7 Confirmation des performances en pratique quotidienne : CIQ et EEQ**• Description et suivi des CIQ**

Commentaire : Le laboratoire définit ses CIQ en fonction des besoins et de son organisation (séquenceur sur une plateforme ou d'utilisation restreinte au laboratoire).

Exemples de CIQ à suivre :

- un échantillon normal sur un amplicon donné avec relevé périodique des valeurs qualité en fonction de la fréquence du séquençage de cet amplicon
- un blanc réactif séquençage périodique, en fonction du débit du séquenceur
- CIQ « fabricant », type PGEM ou SeqStand Applied, qui peut être passé périodiquement, par exemple à chaque changement de capillaire ou une fois par mois.

Un système simple de relevé des valeurs sur feuille Excel peut être mis en place pour le suivi et l'évaluation périodique.

Critères retenus : définir les critères de gestion des CIQ retenus dans votre laboratoire : analyses et conduite à tenir en cas d'écart par rapport aux critères retenus (ou bien faire référence au document qui décrit la gestion des CIQ).

• Suivi des EEQ

Commentaire : Le laboratoire doit participer régulièrement à des programmes d'évaluation externe de la qualité ou à des échanges inter-laboratoires et en tracer les résultats.

Programmes formels existants :

- Par maladie : par exemple, EMQN, CF Network, UKNEQAS
- Spécifique « séquençage » : EMQN

Critères retenus : définir les critères de gestion des EEQ retenus dans votre laboratoire : analyses et conduite à tenir en cas d'écart par rapport aux critères retenus (ou bien faire référence au document qui décrit la gestion des EEQ).

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutationsRéférence : **BP-ANPGM_002**

Page : 14/19

Numéro de version : 1

3. Vérification bibliographique**Proposition de références :**

- Practice guidelines for Sanger Analysis and Interpretation (*Clinical Molecular Genetics Society* 2009)
- Norme NF EN ISO 15189
- Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale– SH GTA 04
- Mattocks et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet.* 2010 Dec;18(12):1276-88.

4. Etude de risques

Commentaires : La validation s'appuie également sur une étude des risques. Celle-ci peut être, soit intégrée aux autres sections du document de validation, comme cela est abordé au travers de ces recommandations (échantillon primaire, extraction, matériel, habilitation du personnel...), soit faire l'objet d'une section à part. L'étude de risques peut alors suivre le plan proposé dans le document SH GTA 04 ou la méthode des 5M (exemples proposés en annexes 1 et 2).

Détailler cette étude des risques appliquée au séquençage dans votre laboratoire. Cette étude peut se baser sur les exemples présentés en annexes 1 et 2.

5. Plan d'expérience et mise en œuvre dans le laboratoire

Commentaires : Quelle que soit l'approche envisagée (éléments de preuve collectés sur des données antérieures, publications antérieures, réalisation d'analyses), le laboratoire doit décrire le plan d'expérience choisi (nombre et type d'échantillons testés, et les modalités d'analyse).

Les nombres indiqués dans les exemples de plan d'analyse sont donnés à titre indicatif. Ils doivent être choisis par le biologiste responsable de la validation et refléter l'activité du laboratoire, en particulier par rapport au volume d'analyse, en répondant au mieux à la question posée et aux objectifs poursuivis, notamment en terme de sensibilité et spécificité analytiques.

5.1 Spécificité et Sensibilité analytiques

Commentaires : Le plan d'analyse peut comprendre l'étude d'un ou plusieurs amplicons représentatifs des amplicons générés au laboratoire.

Il est recommandé que :

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutationsRéférence : **BP-ANPGM_002**

Page : 15/19

Numéro de version : 1

- *L'analyse statistique des valeurs qualité des séquences normales soit faite avec un minimum de 30 valeurs*
- *L'analyse de concordance entre les génotypes connus et les génotypes observés soit faite si possible avec 30 valeurs*

Détailler le plan d'analyse choisi ou la collection d'éléments de preuve.**5.2 Robustesse**

Commentaires : Les paramètres à faire varier dépendent de l'organisation, de l'activité et de l'équipement du laboratoire.

Exemple de plan d'expérience ou de collection d'éléments de preuve :

Etude d'échantillons porteurs de mutations (3 suffisent à chaque série), en faisant varier, à titre d'exemple et selon la pertinence pour le laboratoire en fonction de la portée demandée :

- *le type d'extraction : ADN extrait par un autre laboratoire selon une autre technique*
- *le modèle de thermocycleur*
- *le protocole de purification*
- *variation de volume de certains réactifs, de produits de PCR*
- *le séquenceur*

Détailler le plan d'analyse choisi ou la collection d'éléments de preuve.**5.3 Limite de détection (en fonction de l'activité du laboratoire)**

Commentaires : Le plan d'analyse peut comprendre l'étude d'un ou de plusieurs amplicons. Il peut faire référence à la validation spécifique d'un gène ou d'un locus.

Exemple de plan d'expérience :

Etude d'échantillons porteurs à l'état homozygote ou hétérozygote de variations nucléotidiques connues, de différents types si cela est pertinent, mélangés à différentes concentrations à un ADN sans variation nucléotidique sur la région d'intérêt. Plusieurs points de dilution encadrant le seuil défini par le laboratoire doivent être testés.

Détailler le plan d'analyse choisi ou la collection d'éléments de preuve.**5.4 Contamination entre échantillons**

Exemple de plan d'expérience ou de collection d'éléments de preuve :

Analyse de 15 échantillons connus, sur un amplicon, en une ou plusieurs séries. Au minimum, passer des échantillons normaux avec des blancs réactifs.

Détailler le plan d'analyse choisi ou la collection d'éléments de preuve.**5.5 Stabilité des réactifs**

Exemple de plan d'analyse ou de collection d'éléments de preuve :

- *Analyse rétrospective de séquence à partir de produits de PCR, conservés à -20°C ou à +4°C plusieurs semaines ;*



Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Référence : **BP-ANPGM_002**

Page : 16/19

Numéro de version : 1

- *Analyse rétrospective de séquence à partir de produits de réaction de séquence conservés à -20°C plusieurs semaines ;*

Détailler le plan d'analyse choisi ou la collection d'éléments de preuve.

6. Compilation et traitement statistique des données obtenues

Indiquer ici les résultats des valeurs qualité pour les différentes expériences réalisées.

7. Conclusion et décision quant à la validation opérationnelle de la technique, au regard des spécifications (limites acceptables) initialement fixées

Commentaire : Indiquez vos conclusions

Proposition de texte : L'ensemble des résultats répond aux critères d'exigence de la validation.

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Référence : **BP-ANPGM_002**

Page : 17/19

Numéro de version : 1

ANNEXE 1 : ETUDE DE RISQUES POUR LA VALIDATION DU SEQUENCAGE PAR METHODE DE SANGER POUR LA RECHERCHE DE MUTATIONS SELON LE DOCUMENT SH GTA 04

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
<p>Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :</p>	<p>Extraction d'ADN à partir de tout échantillon reçu au laboratoire : sang total sur EDTA, Liquide amniotique, Villosités choriales, Tissus (amniocytes cultivés, tissus fœtaux, tissus post-natals, écouvillon buccal ...)</p> <p>ADN déjà extrait par un autre laboratoire</p>	<p>Contrôle de la qualité et de la quantité d'ADN extrait par dosage au nanodrop (étude du rapport 260/280 et de l'aspect de la courbe) (# procédure)</p> <p>Test de la robustesse des techniques de PCR lors de leur mise au point sur deux méthodes d'extraction différentes (# procédure)</p>
<p>Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :</p>	<p>Réalisation préalable de la PCR</p>	<p>Vérification de l'absence de SNP au niveau des amorces : les amorces doivent suivre les critères définis dans le document en annexe 3.</p> <p>Vérification du design du test (couverture des amorces ; séquence de référence choisie ...) : le design du test doit être vérifié selon les critères définis dans le document de validation par gène</p> <p>Vérification de la qualité et de l'absence de contamination des PCR par électrophorèse sur gel : la photo du gel des PCR obtenues lors de la mise au point doit être conservée dans le document de vérification</p>
<p>Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.</p>	<p>Habilitation du personnel technique A la technique du séquençage A l'analyse du test en particulier</p> <p>Habilitation du personnel médical</p>	<p>Fiche de poste et carnet de formation et d'habilitation individuel (# procédure)</p> <p>Diplôme, formation, expérience ; agrément de l'ABM (# procédure) Fiche de poste et carnet d'habilitation individuel (# procédure)</p>
<p>Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :</p>	<p>Sectorisation des pièces pré et post-PCR Température adaptée</p>	<p>Autorisation ARS du laboratoire Entretien des locaux (# procédure) Climatisation Formation du personnel à l'usage des locaux (formulation bof) (# procédure)</p>
<p>Référence du réactif (référence fournisseur, version) :</p>	<p>Réactif : (# procédures utilisées pour cette analyse)</p>	<p>Usage de réactifs non périmés ; Stockage selon les recommandations du fournisseur (# procédure) Précision dans les modes opératoires ? de</p>



Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Référence : BP-ANPGM_002

Page : 18/19

Numéro de version : 1

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
		la durée de stockage des PCR purifiées (# procédure)
Matériaux de références (témoins) :	Contrôles de qualité (CQI)	Cf dossier de validation
	Contrôle de qualité EEQ	Cf dossier de validation
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Séquenceur automatique	Maintenance et suivi du séquenceur automatique par les CIQ et EEQ séquences (# procédure)
	Logiciel d'analyse	Validation du projet d'analyse informatique par le biologiste (# procédure) Formation des techniciens habilités à l'usage de ce logiciel (# procédure)
	Thermocycleurs, pipettes, Nanodrop, Centrifugeuse, Robot	Suivi métrologique (# procédure)

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations

 Référence : **BP-ANPGM_002**

Page : 19/19

Numéro de version : 1

ANNEXE 2 : ETUDE DE RISQUES POUR LA VALIDATION DU SEQUENCAGE PAR METHODE DE SANGER POUR LA RECHERCHE DE MUTATIONS SELON LA METHODE DES 5M

M	Facteur de risque	Moyen de maîtrise
Matériel	Pipettes : imprécision du pipetage	- Vérification - Etalonnage - Raccordement COFRAC
	Nanodrop : mauvaise appréciation de la qualité et/ou de la quantité de l'ADN	- Maintenance préventive programmée - Etalonnage (gamme d'ADN)
	Thermocycleurs : altération de la qualité et/ou de la quantité de l'amplification	- Maintenance préventive programmée - Suivi métrologique des températures
	Centrifugeuse de plaques : perte des échantillons et/ou mauvaise purification des produits de PCR	- Maintenance préventive programmée - Raccordement COFRAC si possible
	Séquenceur : mauvaise migration des échantillons	- Maintenances préventives programmées - Contrôles internes (CIQ et CQE)
Main d'œuvre	Personnel mal qualifié	- Habilitation
Méthode	Imprécisions du résultat ou résultats faux	- CQE - CIQ - Validation de la méthode
Milieu	Contamination des échantillons par mauvaise sectorisation/mauvais circuit des échantillons	- Sectorisation adaptée - Respect du circuit des personnels, des déchets et des échantillons - Nettoyage des paillasse
	Température inadaptée au fonctionnement des appareils critiques	- Entretien de la climatisation - Mise en place de sondes de température dans les pièces
Matière	Mauvaises conditions de stockage de l'échantillon	- Suivi des températures des enceintes thermostatées et des pièces de stockage - Sondes de température
	Mauvaises conditions de stockage et d'utilisation des réactifs	- Stockage selon les recommandations du fournisseur - Logiciels de gestion des stocks et dates de péremptions
	Mauvaise qualité de l'échantillon	- Définition des critères d'acceptabilité - Manuel de prélèvement