



Recommandations et dossier type de validation de méthode lors de la mise en œuvre des analyses par séquençage par la méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Référence : **BP-ANPGM_003**

Page : 1/10

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 Emmanuelle Girodon- Boulandet | Hôpitaux de Strasbourg 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 méthode lors de la mise en œuvre des analyses par séquençage par la méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Référence : **BP-ANPGM_003**

Page : 2/10

Numéro de version : 1

Préambule

*Pour les laboratoires de génétique ayant préalablement constitué un dossier de validation initiale de leur méthode par séquençage, la **constitution de dossiers de validation est nécessaire pour l'implantation de chacun des tests au laboratoire**. Ces dossiers peuvent alors faire référence au dossier de validation initiale à partir du moment où les analyses sont réalisées avec des processus techniques équivalents.*

Ce dossier de validation par gène peut être constitué en collectant des éléments de preuve préalablement obtenus dans le laboratoire.

Il 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 (type Phred) obtenues sur au moins deux échantillons contrôles : les valeurs qualité obtenues doivent remplir les conditions citées dans le dossier de validation; passage si possible de quelques sujets contrôles mutés. Les valeurs qualité ne sont exploitables que pour des bases non mixées. En cas de bases mixées, (hétérozygotie, présence d'un frameshift), ne prendre compte que des valeurs obtenues sur les bases non mixées du fragment.*

Le domaine d'application peut également concerner 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 aura dû obligatoirement comprendre un chapitre argumenté sur les limites de détection de la méthode de Sanger. Y faire référence dans le dossier de validation par gène.

Ce document propose un dossier type de validation adapté d'un formulaire élaboré par EuroGentest (Mattocks, et coll., 2010).

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

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 méthode lors de la mise en œuvre des analyses par séquençage par la méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Page : 3/10

Référence : BP-ANPGM_003

Numéro de version : 1

Dossier de validation pour la mise en place d'une analyse de génétique constitutionnelle par séquençage (Méthode Sanger)

Ce dossier de validation s'appuie sur le dossier de validation initiale du séquençage constitué au laboratoire.

| | | |
|------------------------------------|---|-------------------|
| Nom du test | Définir le nom du test | Référence interne |
| Objet du test / application | Définir l'objectif du test, par exemple : « Détection de mutations par séquençage dans le gène XXX (méthode de Sanger). Cette technique permet de détecter les substitutions ou les petites délétions ou insertions à l'état hétérozygote, homozygote ou hémizygote. Cette technique peut être appliquée pour le diagnostic postnatal et prénatal. » | |
| Locus / Gène / Marqueur | A décrire pour chaque application | |
| Séquence de référence | Indiquer le numéro de référence avec le numéro de version : NM_ ou NG_ ou LRG | |
| Principe de la méthode | Séquençage de régions d'intérêt par la méthode de Sanger | |
| Modes opératoires associés | Citer les modes opératoires internes associés à ce test | |
| Références | Citer ici les publications/ textes de référence pour cette application | |
| Validation / Vérification | Validation des spécifications obtenues pour ce gène par rapport au dossier de validation initiale déjà réalisé dans le laboratoire (référence du document) | |
| Type du test | Test qualitatif ; Type D selon Mattocks et coll. | |
| Portée/limites | <p>Par exemple La performance attendue du test est de détecter 100 % des substitutions et des ins/del de petite taille dans les régions d'intérêt, bien qu'il soit impossible de démontrer que toutes les mutations peuvent effectivement être détectées par cette méthode. La performance attendue est établie sur les données actuelles de l'art.</p> <p>La sensibilité diagnostique de ce test est, selon les données bibliographiques disponibles, estimée à X% des patients. Limites : - SNP rare au site d'hybridation d'un primer entraînant la non-amplification d'un allèle. - Présence d'une variation de séquence minoritaire (mosaïque)</p> | |

Vérification des paramètres suivants



Sensibilité



Justesse



Reproductibilité



Limite de quantification



Spécificité



Répétabilité



Robustesse



Linéarité



Recommandations et dossier type de validation de méthode lors de la mise en œuvre des analyses par séquençage par la méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Page : 4/10

Référence : **BP-ANPGM_003**

Numéro de version : **1**

Fidélité

Fidélité Intermédiaire

Limite de détection (mosaïques)

Mesure de l'incertitude

Sélectivité

Analyse Bioinformatique



Recommandations et dossier type de validation de méthode lors de la mise en œuvre des analyses par séquençage par la méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Page : 5/10

Référence : **BP-ANPGM_003**

Numéro de version : **1**

Vérification de la sélectivité du test

Commentaires :

La sélectivité du test (capacité du test à doser « le bon analyte ») est dépendante des étapes préalables à la réalisation de la séquence : le choix de la séquence de référence, le choix des amorces, le contrôle de la bonne identité de la PCR obtenue et l'absence de pseudogène dans le génome doivent faire l'objet d'une documentation dans ce dossier de validation.

Le design du test doit être basé sur les données bibliographiques qui déterminent les **zones du gène à explorer**, particulièrement en cas de transcrits alternatifs (**exons particuliers ou bien cDNA entier, cDNA et jonctions introns exons, 5' et 3' UTR, promoteur...**). De plus, une bonne connaissance préalable du gène est **nécessaire** pour positionner correctement les amorces de PCR : présence ou non de pseudogène ou de gènes homologues ; SNP connus ; zones répétées ; mutations délétères déjà identifiées. Enfin, le séquençage des premières PCR obtenues permet de vérifier que le design des PCR correspond bien au gène attendu.

L'analyse des séquences est réalisée via un ou plusieurs logiciels bioinformatiques capables d'aligner les séquences du patient sur une séquence de référence et également d'interpréter les valeurs qualité (type Phred) pour toutes les bases analysées. Ce projet d'analyse est mis en place pour chaque test et doit être vérifié avant son utilisation.

| | |
|--------------------------------|--|
| Sélectivité (1) | Choix de la séquence de référence et des régions analysées par le logiciel |
| Méthodologie | Critères proposés par l'ANPGM et le groupe Interloqt Définition des régions d'intérêt par : - la recherche bibliographique - et/ou des critères génériques : en cas de couverture de la jonction intron-exon, l'analyse doit en général garantir par défaut une lecture recommandée de 6 bases dans le site donneur et 20 bases dans le site accepteur. Définir les critères retenus pour ce test. Le choix de ces critères peut s'appuyer sur les propositions de l'ANPGM |
| Résultats expérimentaux | Justifier le choix de la séquence de référence choisie et des régions analysées par l'analyse bibliographique notamment. Justifier si nécessaire les écarts par rapport aux critères standards définis (par exemple, séquence répétée ne permettant pas une lecture de 20 bases introniques ...). |
| Conclusion / limites | Utilisation de l'isoforme XXX selon la publication YYY ; validation du projet d'analyse bioinformatique |

| | |
|------------------------|--|
| Sélectivité (2) | Contrôle du design des amorces PCR pour vérifier la sélectivité et l'absence de SNP au niveau des amorces |
| Méthodologie | Critères proposés par l'ANPGM et le groupe Interloqt - Les amorces ne doivent pas contenir de SNP fréquent (> 1 %), dans les 3 dernières bases. Une étude par exemple par SNPcheck (https://ngml.manchester.ac.uk/SNPcheckV2/snpcheck.htm) ou autre (http://snpper.chip.org/bio/snpper-enter) peut permettre de contrôler ce critère. Il est recommandé de contrôler ce critère annuellement et d'en conserver la trace. - La sélectivité d'hybridation des amorces peut être contrôlée par SNPcheck (https://ngml.manchester.ac.uk/SNPcheckV2/snpcheck.htm) ou bien par http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi . Dans ce dernier cas, les critères d'analyse sont à paramétrer sur le site Blast. - La bonne identité des PCR obtenues est confirmée par l'alignement sur la séquence de référence. En validation continue, cela peut être également documenté par : l'identification de variants répertoriés dans les bases de données chez les sujets contrôles ; la vérification de la concordance |



Recommandations et dossier type de validation de méthode lors de la mise en œuvre des analyses par séquençage par la méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Page : 6/10

Référence : **BP-ANPGM_003**

Numéro de version : **1**

| | |
|--------------------------------|---|
| | <i>des fréquences obtenues avec les fréquences connues dans les bases de données pour la même population.</i> Définir les critères retenus pour ce test. Le choix de ces critères peut s'appuyer sur les propositions de l'ANPGM |
| Résultats expérimentaux | Décrire si nécessaire les écarts observés par rapport aux critères définis |
| Conclusion / limites | <i>Par exemple : Absence de SNP de fréquence connue détecté dans les primers utilisés</i> |



Recommandations et dossier type de validation de méthode lors de la mise en œuvre des analyses par séquençage par la méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Page : 7/10

Référence : **BP-ANPGM_003**

Numéro de version : **1**

Validation de la spécificité et de la sensibilité du test

Commentaire : les valeurs qualité obtenues pour ce test doivent répondre aux critères définis dans le dossier de validation initiale. Ceci permet de vérifier la sensibilité et la spécificité analytiques du test. Dans la mesure du possible, des échantillons porteurs d'une mutation connue peuvent être analysés également s'ils sont disponibles.

| | |
|---------------------------------------|--|
| spécificité et sensibilité (1) | Critères qualité de la ou des PCR initiale(s) |
| Echantillons | <i>Critères proposés par l'ANPGM et le groupe Interloqt La qualité est vérifiée pour toutes les PCR sur au moins 2 échantillons contrôle</i> Définir le nombre d'échantillons testés |
| Méthodologie | <i>Critères proposés par l'ANPGM et le groupe Interloqt La mise au point de la PCR servant à réaliser la réaction de séquençage doit être de qualité suffisante : Intensité suffisante de la bande PCR ; Bande de taille attendue ; Absence de bandes parasites ; Absence d'amplification dans le contrôle blanc PCR (absence d'ADN). La qualité de la PCR obtenue doit être démontrée dans le dossier de validation, par exemple par une image des produits PCR.</i> Définir les critères retenus pour ce test. Le choix de ces critères peut s'appuyer sur les propositions de l'ANPGM |
| Résultats expérimentaux | Décrire si nécessaire les écarts observés par rapport aux critères définis |
| Conclusion / limites | <i>Par exemple : PCR de qualité suffisante sur les X exons testés</i> |

| | |
|---------------------------------------|---|
| spécificité et sensibilité (2) | Contrôle de la qualité des séquences obtenues |
| Echantillons | <i>Critères proposés par l'ANPGM et le groupe Interloqt Les valeurs qualité sont vérifiées pour toutes les PCR sur au moins 2 échantillons contrôle</i> Définir les échantillons testés |
| Méthodologie | <i>Critères proposés par l'ANPGM et le groupe interloqt Pour que le test soit validé en routine, il faut que les critères suivants soient obtenus La valeur qualité (QV) doit être au minimum de :</i> <ul style="list-style-type: none">- 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 <i>L'analyse des valeurs qualité doit être complétée par une inspection visuelle de la séquence.</i> <i>Ces critères sont adaptés des recommandations CMGS (Clinical Molecular Genetics Society). Il faut de plus que les paramètres conditionnant la sélectivité du gène aient été contrôlés (choix des amorces, choix des régions étudiées ...).</i> Plan d'analyse à détailler ou bien détailler la collection d'éléments de preuve pour des analyses déjà réalisées au laboratoire |



Recommandations et dossier type de validation de méthode lors de la mise en œuvre des analyses par séquençage par la méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Référence : **BP-ANPGM_003**

Page : 8/10

Numéro de version : 1

| | |
|--------------------------------|---|
| Résultats expérimentaux | Décrire les valeurs obtenues |
| Conclusion / limites | <i>Par exemple : Les valeurs qualité sont de qualité suffisante</i> |



Recommandations et dossier type de validation de méthode lors de la mise en œuvre des analyses par séquençage par la méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Page : 9/10

Référence : **BP-ANPGM_003**

Numéro de version : 1

Conclusions finales

| | |
|--|--|
| Conclusion finale du biologiste | <p><i>Par exemple :</i></p> <p><i>Ces résultats répondent aux critères d'exigence de la validation. Le séquençage peut être utilisé en routine au laboratoire pour la détection de mutations inconnues en génétique constitutionnelle :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - mutations ponctuelles ainsi que petites délétions, insertions ou duplications - à l'état hétérozygote, homozygote ou hémizygote (- pour le diagnostic postnatal et prénatal) |
|--|--|

Gestion des CIQ/EEQ :

- **CIQ**

Décrire les CIQ à intégrer lors de chaque analyse

Par exemple :

- Suivi des valeurs qualité obtenues à partir d'un échantillon contrôle (soit PGEM, soit un ADN de patient)
- Suivi des Blancs PCR (sans ADN)
- Taille et qualité des produits PCR sur gel, le cas échéant

- **EEQ**

Décrire les programmes d'EEQ contribuant à la validation continue du test

Par exemple :

- Participation annuelle au programme spécifique EMQN "séquençage"
- Participation annuelle aux programmes spécifiques de... (maladie et programme à citer) / ou échanges inter-laboratoires

| Autorisation | Nom | Signature | Date |
|-----------------------------------|-----|-----------|------|
| Personne effectuant la validation | | | |
| Biologiste/Ingénieur responsable | | | |

Annexe B: Checklist

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Validation approuvée | <input type="checkbox"/> Procédure de facturation |
| <input type="checkbox"/> Mode(s) opératoire(s) en place | <input type="checkbox"/> Formation du personnel technique |
| <input type="checkbox"/> Réactifs commandés | <input type="checkbox"/> Prise en compte dans le SGL |



Recommandations et dossier type de validation de méthode lors de la mise en œuvre des analyses par séquençage par la méthode de Sanger pour la recherche de mutations

Page : 10/10

Référence : **BP-ANPGM_003**

Numéro de version : **1**

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Hygiène et sécurité (personnel, réactifs) | <input type="checkbox"/> Feuilles de travail |
| <input type="checkbox"/> Equipement (réseau électrique, maintenance) | <input type="checkbox"/> Information des prescripteurs |
| <input type="checkbox"/> Souscription à une évaluation externe de la qualité | <input type="checkbox"/> Compte-rendu de résultats |
| <input type="checkbox"/> Mise à jour des feuilles de prescription | <input type="checkbox"/> Mise à jour du site internet et de la liste des prestations |