

SEPTEMBRE 2014

# Validation de méthodes pour la recherche de mutations en génétique somatique

DOCUMENT DESTINÉ AUX LABORATOIRES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE POUR  
ACCOMPAGNER LA DÉMARCHE DE VALIDATION DES TECHNIQUES D'ANALYSE

Dans le cadre de la réforme de la biologie médicale, tous les laboratoires des plateformes de biologie moléculaire devront être partiellement accrédités par le Comité français d'accréditation (COFRAC) d'ici 2016. L'objectif de cette démarche est de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale réalisés et la qualité de la prestation médicale offerte par un laboratoire de biologie médicale. Ce processus impose notamment la constitution de dossiers de validation de méthode pour chaque analyse réalisée par les laboratoires.

Aussi, afin d'accompagner les laboratoires dans leur démarche, des groupes de travail ont été constitués pour les techniques d'analyse les plus courantes sous l'égide de l'INCa à partir du printemps 2013. Chaque groupe de travail était constitué de représentants des laboratoires utilisant la technique concernée en routine diagnostique et disposant d'une expertise dans le domaine. Les personnes participantes ont un profil de médecins biologistes, ingénieurs ou qualitatifs.

Ces groupes ont permis de favoriser le partage d'expérience entre laboratoires et d'identifier les éléments essentiels à prendre en compte lors de la constitution des dossiers de validation de méthode. Ce document a été élaboré à partir des propositions de ces groupes de travail et a été soumis à la relecture de l'ensemble des personnes impliquées.

Ce document est mis à la disposition des professionnels des laboratoires de biologie moléculaire pour les guider dans l'établissement du dossier de validation de méthodes pour la recherche de mutations somatiques dans le cadre de l'accréditation COFRAC des laboratoires de biologie médicale. Selon la classification du COFRAC (SH-INF 50), ces analyses constituent une sous-famille de tests au sein de la portée d'accréditation pour les analyses génétiques. Ce document met en exergue les points critiques à maîtriser pour le recours à ces techniques, tout en prenant en considération les spécificités liées au domaine de la génétique somatique.

Le document se focalise sur cinq méthodes parmi les plus répandues pour les analyses de génétique moléculaire et reconnues pour leur qualité. Cette sélection n'est cependant pas exhaustive et d'autres méthodes pourront faire l'objet d'un travail similaire à l'avenir en fonction des besoins et de l'évolution des techniques utilisées par les laboratoires.

**REMARQUE.** À partir des travaux de chaque groupe, un document général présentant les points de validation communs aux différentes techniques a été élaboré. Ainsi, le document s'articule autour de deux parties, la première est consacrée à la présentation des points de validation communs à toutes les techniques de génétique somatique, et la deuxième partie est focalisée sur les spécificités de chacune des cinq techniques retenues.

# SOMMAIRE

LEXIQUE .....	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	6
<b>PREMIÈRE PARTIE.</b>	
<b>LES POINTS VALIDATION COMMUNS À TOUTES LES TECHNIQUES DE GÉNÉTIQUE SOMATIQUE .....</b>	<b>7</b>
TYPE DE MÉTHODE .....	8
PORTÉE D'ACCREDITATION .....	8
DESCRIPTION DE LA MÉTHODE (SH-FORM 43 OU 44) .....	9
MAÎTRISE DES RISQUES .....	9
MATÉRIEL DE RÉFÉRENCE .....	10
QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS.....	10
VÉRIFICATION DES AMORCES.....	11
PARAMÈTRES À VALIDER .....	11
ANALYSE DES RÉSULTATS .....	14
AMÉLIORATION EN CONTINU/CONFIRMATION DES PERFORMANCES EN ROUTINE .....	15
<b>DEUXIÈME PARTIE.</b>	
<b>SPÉCIFICITÉS DES CINQ TECHNIQUES LES PLUS RÉPANDUES.....</b>	<b>17</b>
<b>PARTICULARITÉS DE LA TECHNIQUE HRM (HIGH RESOLUTION MELTING) .....</b>	<b>19</b>
TYPE DE MÉTHODE .....	19
PORTÉE D'ACCREDITATION .....	19
DESCRIPTION DE LA MÉTHODE (SH-FORM 43) .....	19
MAÎTRISE DES RISQUES .....	20
QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS.....	20
VÉRIFICATION DES AMORCES.....	20
ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE.....	20
ANALYSE DES RÉSULTATS .....	21
<b>PARTICULARITÉS DU PYROSÉQUENÇAGE POUR LA DÉTECTION DE VARIATIONS DE SÉQUENCE.....</b>	<b>23</b>
TYPE DE MÉTHODE .....	23
PORTÉE D'ACCREDITATION .....	23
DESCRIPTION DE LA MÉTHODE (SH-FORM 43) .....	23
MAÎTRISE DES RISQUES .....	24
QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS.....	24
VÉRIFICATION DES AMORCES.....	24
ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE POUR LA DÉTECTION DE SNP .....	24
VALIDATION DU PYROGRAMME/ANALYSE DES RÉSULTATS.....	26
AMÉLIORATION EN CONTINU/CONFIRMATION DES PERFORMANCES EN ROUTINE .....	26
<b>PARTICULARITÉS DU SÉQUENÇAGE DE SANGER.....</b>	<b>30</b>
TYPE DE MÉTHODE .....	30
PORTÉE D'ACCREDITATION .....	30
DESCRIPTION DE LA MÉTHODE.....	30
MAÎTRISE DES RISQUES (SH-FORM 44) .....	31
QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS.....	31
VÉRIFICATION DES AMORCES.....	31
ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE.....	31
ANALYSE DES RÉSULTATS/VALIDATION DU SÉQUENÇAGE .....	32
AMÉLIORATION EN CONTINU/CONFIRMATION DES PERFORMANCES EN ROUTINE .....	33
<b>PARTICULARITÉS DU SNAPSHOT® .....</b>	<b>36</b>
PORTÉE D'ACCREDITATION .....	36
DESCRIPTION DE LA MÉTHODE (SH-FORM 44) .....	36
MAÎTRISE DES RISQUES (SH-FORM 44).....	36
QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS.....	36
VÉRIFICATION DES AMORCES.....	37
ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE.....	37
ANALYSE DES RÉSULTATS .....	38
AMÉLIORATION EN CONTINU/CONFIRMATION DES PERFORMANCES EN ROUTINE .....	39

<b>TECHNIQUE DE DISCRIMINATION ALLÉLIQUE UTILISANT DES SONDAS FLUORESCENTES TAQMAN® .....</b>	<b>40</b>
PORTÉE D'ACCREDITATION .....	40
DESCRIPTION DE LA MÉTHODE (SH-FORM 44) .....	40
MAÎTRISE DES RISQUES (SH-FORM 44) .....	40
QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS .....	40
VÉRIFICATION DES AMORCES .....	40
ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE .....	40
ANALYSE DES RÉSULTATS .....	42
AMÉLIORATION EN CONTINU .....	42

# LEXIQUE

Limite de détection (LOD) :

- **Techniques quantitatives** : la limite de détection correspond au plus petit signal qui peut être distingué d'un blanc de réaction réalisé dans les mêmes conditions.
- **Techniques qualitatives** : la limite de détection correspond au **seuil de détection** du test qui permet de définir la sensibilité analytique du test. En pratique, en biologie moléculaire, elle correspond à la plus faible valeur limite (% de mutants) permettant de distinguer un signal muté d'un signal non muté.

**Robustesse** : capacité d'une technique à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées des paramètres de la méthode. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité des mesures dans les conditions normales d'utilisation d'un test.

**Quantité d'ADN limite** : il s'agit de la plus faible quantité d'ADN pour laquelle l'analyse est réalisable pour un échantillon présentant un pourcentage d'ADN muté à la limite de détection. Cette indication reflète la robustesse de la technique en fonction de la quantité d'ADN analysée.

**Sensibilité diagnostique** : probabilité qu'un dispositif donne un résultat positif en présence du marqueur cible. Elle se calcule selon la formule suivante :

$$\text{sensibilité diagnostique} = \frac{\text{nb}_{\text{vrais positifs}}}{\text{nb}_{\text{vrais positifs}} + \text{nb}_{\text{faux négatifs}}}$$

**Spécificité diagnostique** : probabilité qu'un dispositif rende un résultat négatif en l'absence d'un marqueur cible. Elle se calcule selon la formule suivante :

$$\text{spécificité diagnostique} = \frac{\text{nb}_{\text{vrais négatifs}}}{\text{nb}_{\text{vrais négatifs}} + \text{nb}_{\text{faux positifs}}}$$

**Blanc d'essai** : il s'agit d'une analyse comprenant l'ensemble des réactifs sans ADN. L'ADN est remplacé par de l'eau.

**Blanc d'extraction** : il s'agit du produit d'extraction obtenu avec les seuls réactifs sans échantillon tumoral.

**Matériaux de référence** : il s'agit d'échantillon pouvant être utilisé soit au cours de la validation de méthode, soit pour assurer le suivi de la qualité. Ils doivent avoir une stabilité dans le temps pour permettre des comparaisons. Il peut servir de contrôle interne de qualité.

**Contrôle interne de qualité (CIQ)** : le CIQ est réalisé au sein du laboratoire à l'aide d'échantillons contrôles qui seront analysés simultanément à la mesure d'échantillons biologiques de patients pour vérifier la maîtrise du processus analytique. L'interprétation se fera en fonction de limites de tolérance préétablies.

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ANPGM</b>	Association nationale des praticiens de génétique moléculaire
<b>CQI</b>	Contrôle de qualité interne
<b>COFRAC</b>	Comité Français d'Accréditation
<b>CV</b>	Coefficient de variation
<b>FFPE</b>	Formalin fixed and paraffin embedded / fixé au formol et inclus en paraffine
<b>HES</b>	Hématoxyline éosine
<b>HRM</b>	High Resolution Melting / Courbe de fusion à haute résolution
<b>LOB</b>	Limit of blank / Limite des blancs
<b>LOD</b>	Limit of detection / Limite de détection
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction / Réaction en chaîne par polymérase
<b>SNP</b>	Single nucléotide polymorphisme / mutation ponctuelle
<b>WT</b>	Wild type / non muté

## **PREMIÈRE PARTIE.**

### **LES POINTS VALIDATION COMMUNS À TOUTES LES TECHNIQUES DE GÉNÉTIQUE SOMATIQUE**

## TYPE DE MÉTHODE

La plupart des méthodes utilisées en génétique somatique vont donner une information sur la présence ou non d'une mutation. En ce sens, elles peuvent être considérées comme qualitatives. Néanmoins, étant donné que dans certains cas la détermination du statut mutationnel est dépendante de valeurs quantitatives, il apparaît nécessaire d'inclure la validation des critères de répétabilité, de reproductibilité et de limite de détection au dossier, afin d'estimer la sensibilité analytique de la méthode, quel que soit le type de méthode choisi.

## PORTÉE D'ACCREDITATION

Le dossier de validation des méthodes doit contenir les paramètres de la validation quantitative en particulier les critères de répétabilité, de reproductibilité et de limite de détection au dossier. Il est possible de proposer :

- une approche de validation globale de la technique ;
- des dossiers de validations complémentaires pour valider spécifiquement les différents marqueurs à étudier.

### ❖ EN PORTÉE FLEXIBLE STANDARD (A)

En cas de méthodes CE-IVD, seule une vérification de la méthode est nécessaire. Le dossier de vérification doit comprendre l'ensemble des analyses à vérifier, ce qui peut être réalisé sur un marqueur (ex : KRAS). En portée A, seuls les paramètres suivants sont à vérifier :

- répétabilité
- reproductibilité
- contaminations

**REMARQUE.** Une accréditation en portée A implique de respecter scrupuleusement le mode opératoire défini par le fabricant. Lors de sa démarche d'accréditation, un laboratoire a ainsi été redirigé vers la portée flexible étendue (B), car il ne pouvait démontrer que l'épaisseur des coupes utilisées respectait le protocole du fabricant (coupes de 3 µm).

### ❖ EN PORTÉE FLEXIBLE ÉTENDUE (B)

Dans le cas où le laboratoire opte pour une validation de méthode en portée flexible étendue (B), il est possible de faire **un dossier général** pour valider la méthode dans son ensemble. Ce dossier pourra être réalisé à partir d'un ou plusieurs paramètres (gène). Des **dossiers spécifiques** à chaque paramètre étudié (gène) devront également être réalisés. Dans ces dossiers spécifiques, il sera nécessaire de vérifier des paramètres tels que la spécificité des amorces. Les paramètres devront être validés soit selon les formulaires SH-FORM 43 ou 44 en vigueur actuellement (méthode quantitative ou qualitative), soit selon le nouveau dossier modulable en cours d'élaboration au COFRAC.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE (SH-FORM 43 OU 44)

Ce critère étant spécifique à chaque méthode, il sera abordé dans les fiches générales pour chaque technique.

## MAÎTRISE DES RISQUES

Tous les éléments dont la variation peut influencer sur le résultat rendu au patient doivent être considérés comme critiques si aucun moyen de contrôle n'existe. Les témoins peuvent permettre cette vérification.

**TOUT ÉLÉMENT CRITIQUE DOIT FAIRE L'OBJET D'UNE TRAÇABILITÉ PERMETTANT D'IDENTIFIER A POSTERIORI TOUTE ANALYSE RÉALISÉE AVEC CET ÉLÉMENT AFIN DE PERMETTRE DE REVENIR VERS LES PATIENTS CONCERNÉS SI UNE ANOMALIE EST DÉTECTÉE.**

Une attention particulière doit être apportée aux points suivants :

- Congélateurs : la stabilité des réactifs considérés comme critiques étant fonction des bonnes conditions de stockage, la vérification et le suivi des congélateurs utilisés pour leur conservation à l'aide de sondes certifiées sont indispensables. Les autres congélateurs ne sont pas aussi sensibles et ne sont pas obligatoirement à considérer comme critiques.
- Thermocycleurs : les thermocycleurs sont un élément essentiel des analyses de biologie moléculaire. La présence d'un témoin positif sur chaque plaque peut permettre de valider son bon fonctionnement. Toutefois, le témoin positif ne garantit pas l'homogénéité de la température sur l'ensemble de la plaque. Aussi, une validation et un suivi régulier de l'homogénéité sont recommandés au moyen d'une vérification annuelle.
- Pipettes : les résultats d'analyse étant qualitatifs, la précision des prélèvements n'est pas systématiquement critique. Une vérification de la robustesse du test vis-à-vis d'une variation du volume des prélèvements peut permettre de vérifier si un écart dans le prélèvement est critique ou non. Dans tous les cas, un étalonnage régulier des pipettes du laboratoire est recommandé.
- Séquenceurs automatiques : ils doivent faire l'objet d'une maintenance préventive comme indiqué par le fournisseur. Tout dysfonctionnement doit être tracé.

### Exemple de dossier de maîtrise des risques (cf. SH-FORM 44)

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang...) Type de récipient (tubes...)	Contamination de l'échantillon par des amplicons : - risque de faux négatifs si contamination par amplicons non mutés - risque de faux positifs si contamination par amplicons mutés	1-plateforme de biologie moléculaire sectorisée pré-post PCR à accès réglementé (Charte de plateforme) 2- Postes techniques sécurisés sous hôtes équipées de rampes UV 3-Pointes de prélèvements à filtre à toutes les étapes de la recherche 4-choix d'une technologie de typage en une étape (exemple qPCR) qui minimise les risques de contamination (jamais d'ouverture des tubes contenant du produit amplifié)
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution...)	Erreur de dilution	1-Fiches de calcul des dilutions préformatées sécurisées. 2- Robustesse du test : test peu sensible à des variations de concentrations ADN (Tests de dilution des ADNs des lignées cellulaires mutées)
Main-d'œuvre (habilitation du personnel) : préciser les références des procédures et enregistrements.	Manque de formation spécifique théorique et pratique des techniciens de laboratoires réalisant les analyses	1-Formation théorique : assurée par le biologiste responsable. 2-Formation pratique : assurée par les techniciens 3-Traçabilité précise de la formation (premières manipulations réalisées sous contrôle d'un formateur et tests réalisés en autonomie doivent être tracés)
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage...)	1- Contamination des zones de travail 2- Climatisation 3- Respect des conditions de stockage	1- Entretien des locaux et respect de la charte d'utilisation de la plateforme de biologie moléculaire 2- Entretien de la climatisation 3- surveillance des températures par sondes certifiées 4- cartographie des enceintes +4°C et -20°C

<b>Référence du réactif (référence fournisseur, version) :</b>	Condition de stockage et validation des lots de sondes	1- Congélateur (-20°C), aliquotage et conservation selon procédure ad hoc 2- Réfrigérateur (+4°C) aliquotage et conservation selon procédure ad hoc Validation des sondes selon procédure ad hoc
<b>Matériau de référence (témoins) :</b>	1-Lignées cellulaires 2-ADN commerciaux 3-Échantillons mutés	1-2 Matériel constant, gold standard Mutationnel 3 Validation du typage sur 2 amplifications indépendantes (+/- séquençage)
<b>Équipements :</b> <b>Exigences métrologiques (définir les paramètres critiques)</b> <b>Exigences informatiques spécifiques</b>	1-Métrologie 2-Fichiers informatiques	1- Vérification par fournisseur Procédure de vérification générale - Stockage sécurisé des données brutes et des données analysées. 2- Accès tracé par code d'identification du personnel. - Procédure de gestion et stockage des données - Validation des logiciels d'analyse - Vérification des données d'export automatique de résultats avec la lecture visuelle des tracés pour les techniques utilisant la qPCR

## MATÉRIEL DE RÉFÉRENCE

Il est recommandé que la validation de la méthode soit réalisée avec du matériel dont la qualité se rapproche si possible des conditions d'application (comme de l'ADN issu de tissu FFPE). Néanmoins, pour vérifier certains critères de performance, il est recommandé d'utiliser un matériel de référence.

Les échantillons utilisés dans ces évaluations peuvent provenir de plusieurs origines. Il est recommandé qu'ils aient été qualifiés de manière indépendante :

- ADN de patient si le statut mutant/sauvage des nucléotides a au préalable été vérifié au préalable par une autre technique ;
- ADN extrait de lignées cellulaires mutantes/sauvages au niveau des nucléotides évalués ;
- contrôles commercialisés et calibrés mutants/sauvages au niveau des nucléotides évalués.

Les matériaux issus de lignée cellulaire ou d'ADN commerciaux sont préférables, car l'ADN est de qualité constante et la présence de la mutation a été validée de manière externe. L'utilisation d'un échantillon tumoral d'un patient doit être si possible limitée et il est nécessaire d'avoir une validation sur deux amplifications indépendantes.

Le matériel de référence peut être utilisé comme contrôle interne.

## QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS

La qualification des échantillons est effectuée par le pathologiste : vérification des spécificités préanalytiques (fixation, conservation) et estimation du pourcentage de cellules tumorales sur lame HES réalisée avant/après la coupe des copeaux pour extraction. Les prélèvements sont considérés potentiellement analysables si le pourcentage de cellules tumorales est supérieur au seuil de détection de la technique utilisée.

L'échantillon analysé est de l'ADN tumoral extrait à partir de prélèvements dont la teneur en cellules tumorales devrait être supérieure à la limite de détection du test.

Le laboratoire peut quantifier l'ADN extrait par des techniques de spectrophotomètre ou fluorimétrie (Nanodrop, Qubit...). Le résultat des tests étant peu dépendant de la quantité d'ADN utilisée, cette mesure ne doit pas être utilisée comme critère de rejet des échantillons.

Le laboratoire doit définir des critères de qualification pour les échantillons analysés (cellularité inférieure à la limite de détection de la méthode, faible quantité d'ADN, faible niveau d'amplification). Ces critères seront utilisés dans la rédaction du compte rendu. Il est recommandé de considérer un résultat « sauvage » comme non contributif en cas de négativité de ces critères.

**REMARQUE.** D'une manière générale, en raison de la rareté des échantillons et de la difficulté à re-prélever un patient, il est recommandé d'accepter les échantillons ne remplissant pas les critères de qualification. Dans ce cas, le compte rendu final doit indiquer la nature du problème et les réserves qui en résultent sur l'interprétation des résultats. Ainsi, en cas de négativité de la recherche, le résultat sera considéré étant non contributif.

## VÉRIFICATION DES AMORCES

La vérification des amorces doit être réalisée pour chaque dossier spécifique à un paramètre. Elle est effectuée :

- par comparaison avec les bases de données de référence (analyse de BLAST). Il est recommandé d'éviter tout SNP sur les amorces et dans tous les cas il ne doit pas y avoir de SNP dans les 3 derniers nucléotides.
- par PCR à partir de matériel dont la qualité se rapproche si possible des conditions d'application (comme de l'ADN issu de tissu FFPE) et dépôt sur gel d'agarose. (optionnel)

## PARAMÈTRES À VALIDER

Les paramètres suivants doivent être validés :

- la spécificité diagnostique ;
- la sensibilité diagnostique ;
- les contaminations ;
- la stabilité des réactifs ;
- la robustesse ;
- une comparaison avec une méthode de référence et/ou avec une méthode déjà utilisée au laboratoire.

Par ailleurs, compte tenu des spécificités des méthodes existantes pour la recherche de mutations (utilisation de mesures quantitatives), les **limites de détection (allèle sauvage/allèle muté)**, la **répétabilité** et la **reproductibilité** devraient également être évaluées.

Les paramètres de **justesse** et d'**exactitude** ne peuvent pas être évalués compte tenu de l'absence d'étalon.

Il existe des **interférences** connues pouvant impacter le résultat pour certaines méthodes. Celles-ci doivent être prises en considération, notamment pour la définition des critères d'acceptation des résultats. Les données bibliographiques disponibles doivent permettre d'identifier les interférences possibles pour les techniques utilisées.

**REMARQUE.** Les résultats des campagnes d'évaluation externe de la qualité peuvent également être utilisés pour estimer la spécificité et la sensibilité diagnostiques.

## ❖ SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ DIAGNOSTIQUES

Selon le SH-GTA 04, la spécificité et la sensibilité analytiques doivent être calculées pour au moins 15 échantillons non mutés et 15 échantillons mutés. Ces paramètres peuvent être déterminés à partir des résultats de contrôle qualité externes.

Pour le dossier global, il est recommandé d'utiliser des échantillons mutés sur les régions cibles représentatives des différentes régions étudiées au laboratoire (notamment codons 12 et 13 de *KRAS*/codon V600 de *BRAF*/mutations fréquentes d'*EGFR*).

$$\text{sensibilité diagnostique} = \frac{\text{nb}_{\text{vrais positifs}}}{\text{nb}_{\text{vrais positifs}} + \text{nb}_{\text{faux négatifs}}}$$

$$\text{spécificité diagnostique} = \frac{\text{nb}_{\text{vrais négatifs}}}{\text{nb}_{\text{vrais négatifs}} + \text{nb}_{\text{faux positifs}}}$$

## ❖ Contaminations inter-échantillons et inter-réactifs

Un essai de contamination doit être réalisé pour toute accréditation en portée B afin de s'assurer qu'aucune contamination inter-échantillon ou inter-réactif ne peut avoir lieu dans les conditions normales de réalisation des analyses. Toutefois, cet essai ne garantit pas l'absence de contaminations externes qui ne peuvent être contrôlées que par une bonne traçabilité des analyses réalisées en routine.

Suivi des contaminations :

- placement des témoins « sauvage » et muté côte-à-côte sur toutes les plaques pour vérifier la contamination inter-échantillons. Les comparaisons peuvent être réalisées rétrospectivement pour la validation de ce paramètre ;
- en cas d'utilisation d'automates, il est recommandé de réaliser ponctuellement une plaque test alternant des témoins mutés et sauvages en tenant compte de l'ordre d'injection des puits.

## ❖ Stabilité des réactifs

Des recommandations générales doivent être mises en place dans le laboratoire pour éviter une dégradation de la qualité des résultats obtenus liée à un problème de stabilité des réactifs ou des produits de PCR (kit de séquence, dilution des amorces, qualité de la matrice utilisée...) :

- les réactifs doivent être stockés selon les recommandations du fournisseur ;
- les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption ;
- 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.

Quand les réactifs ne sont pas marqués CE-IVD, le laboratoire doit vérifier la stabilité des réactifs dans le temps et définir une durée maximale d'utilisation en fonction des résultats.

## ❖ Robustesse

**REMARQUE.** Il est conseillé d'évaluer la robustesse de manière rétrospective par comparaison de la stabilité des résultats dans le temps via une comparaison rétrospective des résultats des contrôles qualité internes. Des essais spécifiques peuvent être réalisés dans un deuxième temps si l'on détecte un risque particulier.

À titre d'exemple, en cas de défaut de robustesse, on peut vérifier les paramètres suivants :

- le lot de réactifs ;
- le jeu de pipettes utilisé ;
- le personnel réalisant les analyses ;
- le thermocycleur utilisé (s'il y en a plusieurs dans le laboratoire).

Une comparaison des résultats des CQI peut être utilisée pour vérifier la robustesse à condition de pouvoir suivre tous les paramètres à évaluer lors de la réalisation des tests (traçabilité des paramètres vérifiés, pipettes, lots, thermocycleurs...). Des données de la littérature peuvent appuyer ces données.

### Quantité d'ADN limite

Il s'agit de la plus faible quantité d'ADN pour laquelle l'analyse est réalisable pour un échantillon présentant un pourcentage de cellules tumorales à la limite de détection. Cette indication reflète la robustesse de la technique vis-à-vis de la quantité d'ADN analysée.

Il est recommandé de définir la quantité minimale d'ADN pour laquelle il est possible de rendre un résultat. Pour cela, on peut utiliser un échantillon calibré (lignée ou commercial) comprenant une mutation au seuil de détection cible (de 10 à 20 % de cellules tumorales) et évaluer cette limite en faisant varier la quantité d'ADN analysée. Les résultats doivent être validés pour un nombre de cycles de PCR à la limite fixée pour rendre un résultat (le plus souvent 35 cycles).

Pour valider ce paramètre, on peut préparer une dilution allant par exemple de 20 ng à 0,02 ng de cet échantillon.

## ❖ Comparaison de méthodes

La technique de référence est le séquençage de Sanger mais une comparaison avec une autre méthode utilisée dans le laboratoire peut être utilisée. Des données antérieures peuvent être reprises. Les données des contrôles de qualité externes peuvent consolider la comparaison de méthode.

Cette étude comparative sera réalisée sur 30 échantillons minimum.

Idéalement, la distribution des échantillons mutés vs sauvages devrait être représentative de la fréquence des mutations retrouvées dans les tumeurs analysées par le laboratoire, en tenant compte des données de la littérature. Si la fréquence des mutations recherchées est faible, il est souhaitable d'introduire dans l'étude de comparaison un minimum de 3 échantillons mutants.

## ❖ Intervalle de mesure

### Limite de détection pour des mesures quantitatives

La limite de détection est ici la quantité d'ADN amplifiable requise pour atteindre un signal supérieur au témoin de PCR (blanc). De manière usuelle, la limite de détection du signal correspond à un nombre de cycles de PCR inférieur ou égal à la limite fixée pour rendre un résultat contributif (le plus souvent le seuil de 35 cycles est considéré comme un seuil limite pour qualifier les ADN).

### Limite de détection pour une technique qualitative (= seuil de positivité)

Le seuil minimal recommandé pour une application diagnostique est de 20 % de cellules tumorales<sup>1</sup>. Afin de déterminer la limite de détection, il est recommandé de réaliser une gamme comprenant, par exemple, une quantité allélique de mutants de 50 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %. Dans tous les cas il est important d'encadrer la valeur seuil attendue et de réaliser des triplicatas.

**DOSSIERS SPÉCIFIQUES PAR TEST.** Une vérification expérimentale de la limite de détection devra être effectuée pour chaque jeu d'amorces. Les éléments de preuves correspondant à cette vérification seront versés dans le dossier spécifique de chaque test.

### Limite de linéarité

Les résultats de recherches de mutations étant rendus sous forme de données qualitatives (mutées/non mutées), l'étude de la linéarité n'est pas pertinente.

## ❖ Répétabilité

Ce paramètre n'est pas obligatoire en cas de validation d'une technique qualitative. Il pourra cependant être évalué sur un mode qualitatif (muté/non muté).

Pour la répétabilité, un essai peut être réalisé en comparant les résultats à minima sur 3 échantillons en triplicat (1 WT et 2 mutés) en raison du coût des analyses. L'évaluation de la répétabilité se fait sur les paramètres de qualité identifiés pour chaque méthode (valeur quantifiable ou mutée/non mutée).

## ❖ Reproductibilité

L'évaluation de la reproductibilité consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes au cours du temps (opérateur, lot de réactif...). D'après les documents COFRAC, elle est établie sur au moins 15 jours avec 30 déterminations et deux niveaux minimum (cf. SH-GTA4). Pour des raisons de coût de réactifs, le nombre d'essais peut être limité. Les échantillons utilisés pour la répétabilité peuvent être utilisés pour la reproductibilité à deux niveaux minimum de mutations (un échantillon avec un faible pourcentage d'allèle muté et un échantillon fortement muté). Ces données peuvent aussi être obtenues à partir des contrôles de qualité interne (CQI).

---

<sup>1</sup> Bonnes pratiques pour la recherche de mutations à visée théranostique dans les tumeurs solides. INCa, 2010

## ❖ Interférences

Des interférences peuvent en revanche exister au niveau de la PCR (Wilson et al, 1997) Les interférences fréquentes pour les échantillons étudiés doivent être listées et les mesures prises pour prévenir l'inhibition de la PCR doivent être précisées dans le dossier. Les interférences les plus courantes pour les analyses sont les suivantes :

- surfixation ;
- fixation au liquide de Bouin ou d'autres fixateurs inadaptés ;
- nécroses ;
- présence de mucine, de mélanine ;
- faible cellularité (< 10 %).

Ces interférences ont un impact sur la qualité de l'ADN et la capacité à être amplifiable. La présence de ces facteurs ne doit pas empêcher la réalisation de ces analyses. Le rendu de résultat devra prendre en compte ces facteurs en particulier pour les situations sans mutation détectée.

## ANALYSE DES RÉSULTATS

L'analyse des résultats est très dépendante de la technique utilisée et sera détaillée dans les dossiers spécifiques.

### ❖ Seuil de décision des contributifs

Il est nécessaire de déterminer un critère pour classer les échantillons comme « contributifs » ou « non contributifs ».

### ❖ Seuil de décision des mutés/non mutés

Il est nécessaire de déterminer un critère pour classer les échantillons comme « sauvages » ou « mutés ».

### ❖ Choix des contrôles qualité internes (CQI)

Les CQI suivis pourront comprendre au minimum :

- un ou des blancs (blancs d'extraction ou blancs de PCR)
- un échantillon sauvage
- un échantillon faiblement muté, proche de la limite de détection, par nucléotide détecté.

Il est recommandé de définir une stratégie de validation en cas de positivité des blancs. La stratégie de choix des mutations sélectionnées comme contrôle interne doit être définie en fonction des analyses. Il peut s'agir d'une mutation plus difficile à mettre en évidence.

Pour les études couvrant plusieurs amplicons (exemple des gènes *KIT* ou *PDGFRA*), il est proposé d'utiliser un unique contrôle positif par essai.

Le laboratoire doit définir une règle d'acceptation du CQI.

### ❖ Logiciels/systèmes d'analyse automatique des données

Tout logiciel utilisé pour l'analyse des données doit également faire l'objet d'une validation. Il s'agit notamment de :

- s'assurer de la justesse des résultats rendus ;
- garantir la sécurité des solutions : protection des formules ou macros utilisées contre des modifications inopinées.

Les macros ou systèmes automatisés de calcul doivent être protégés afin que nul ne puisse modifier le contenu des cellules.

## AMÉLIORATION EN CONTINU/CONFIRMATION DES PERFORMANCES EN ROUTINE

Il faut prévoir dans la validation de méthode une série d'indicateurs permettant de suivre l'évolution de la méthode dans le temps.

Il peut s'agir par exemple du suivi des CQI positifs ou négatifs, des blancs d'extraction ou d'essai, des résultats des évaluations externes de la qualité, du nombre de série en échec...

---

## CONTRIBUTEURS

Nom	Établissement
BLONS Hélène	AP-HP
ESCANDE Fabienne	CHRU de Lille
LAMY Aude	CHU de Rouen
ROULEAU Étienne	Institut Curie

---

## RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Wilson IG, Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Applied and Env Microbio, 1997, 3741-3751.



**DEUXIÈME PARTIE.**  
**SPÉCIFICITÉS DES CINQ TECHNIQUES**  
**LES PLUS RÉPANDUES**



# PARTICULARITÉS DE LA TECHNIQUE HRM (HIGH RESOLUTION MELTING)

## TYPE DE MÉTHODE

Le principe de l'HRM est de créer des groupes entre des profils normaux et des profils mutés. Les paramètres clefs sont :

- la valeur du nombre de cycles (Cp) ;
- le seuil du « différentiel plot » ou l'allure visuelle de la courbe.

Cette technique conduit ainsi à rendre un résultat sous forme qualitative (présence/absence d'une mutation) basée sur des valeurs numériques.

## PORTÉE D'ACCRÉDITATION

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique HRM.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE (SH-FORM 43)

Le principe de la HRM est d'observer la fusion de l'ADN en temps réel en chauffant progressivement un échantillon d'ADN double brin d'intérêt. Pour cela, on utilise des colorants fluorescents intercalant de l'ADN double brin. Ainsi, au fur et à mesure que la température de l'échantillon augmente, les brins se séparent et la fluorescence du colorant diminue, permettant d'établir la courbe de fusion.

Un changement de la séquence d'ADN induit une modification de la cinétique de fusion de l'ADN comparé à l'ADN normal qui pourra être détectée. La technique d'HRM ne permettant pas d'identifier précisément la nature des modifications de séquence d'ADN détectées, une confirmation des résultats mutés par une autre technique est nécessaire.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE	
Analyte/Mesurande	Liste des gènes analysés
Principe de la Mesure	Comparaison des courbes de fusion
Méthode de mesure	Fluorescence dynamique
Type d'échantillon primaire (urine, sang...)	- copeaux de tissu tumoral inclus en paraffine/lame blanche - tissu congelé - sang
Type de récipient, Additifs (tubes...)	Tubes
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution...)	Extraction d'ADN Concentration des ADN Quantité minimum en fonction de la robustesse
Unités	Absence/présence de mutation
Intervalles de référence	Non applicable (NA)
Marquage CE (Oui/Non)	
Codage C.N.Q. (s'il existe)	NA
Instrument (analyseur automatique, etc.)	
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice)	
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique	NA
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs	NA

## MAÎTRISE DES RISQUES

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique HRM.

## QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique HRM.

## VÉRIFICATION DES AMORCES

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique HRM.

## ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE

Les paramètres clefs pour l'analyse d'un résultat d'HRM sont :

- la valeur du nombre de cycles (Cp)
- le seuil du « différentiel plot » ou l'allure visuelle de la courbe.

Le séquençage de Sanger reste l'approche de référence pour valider cette méthode par le génotype. Par ailleurs, la méthode d'HRM ne doit pas donner de faux-négatifs. La sensibilité analytique attendue est de 100 % et est au moins comparable au séquençage Sanger. Il n'y a pas de limite de spécificité car tous les profils anormaux trouvés par HRM doivent impérativement être vérifiés par une autre méthode (généralement par séquençage de Sanger). Le nombre de faux-positifs peut toutefois être pris en compte pour des raisons économiques.

**REMARQUE.** La vérification des profils anormaux par séquençage se fait généralement directement sur le produit de PCR de l'HRM. Toutefois, le séquençage d'une seconde PCR est recommandé (réplicat ou nouvelle PCR du tube mère) pour éviter de rapporter des mutations artefactuelles liées à la fixation. Ces mutations sont aléatoires lors des amplifications et ne sont pas donc reproductibles.

Nombre total de cycles de PCR : il est recommandé d'avoir plus de 40 cycles pour avoir des amplifications atteignant le plateau.

**REMARQUE.** En pratique, la plupart des laboratoires atteignent 50 cycles de PCR. La majorité des laboratoires considèrent qu'au-delà de 35 cycles, le résultat doit être considéré comme « non contributif ».

### ❖ SPÉCIFICITÉ DIAGNOSTIQUE ET SENSIBILITÉ DIAGNOSTIQUE

Selon le SH-GTA 04, la spécificité et la sensibilité diagnostique doivent être calculées pour 15 échantillons mutés et 15 échantillons sauvages. Il est cependant possible et recommandé de réaliser des simulations de courbe de fusion sur les sites ciblés en l'absence de contrôles positifs (notamment codons 12 et 13 de *KRAS*/codon V600 de *BRAF*).

**REMARQUE.** Les profils anormaux identifiés par HRM étant systématiquement vérifiés par une technique indépendante, il n'est pas nécessaire de vérifier la spécificité diagnostique, car les résultats positifs font l'objet d'une vérification par une technique indépendante.

### ❖ Contamination inter-échantillons et inter-réactifs

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique HRM.

### ❖ Stabilité des réactifs

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique HRM.

### ❖ Robustesse

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique HRM.

## ❖ Comparaison de méthodes

Le but principal de cette technique est d'augmenter la sensibilité et de réduire le nombre de séquençages Sanger. Compte tenu des spécificités de cette approche (pré-criblage par HRM puis vérification des profils anormaux), elle doit donner des résultats comparables à l'approche de séquençage tout en apportant un gain avec une meilleure limite de détection. Cette étude permet de répondre à la question de la sensibilité et de la spécificité diagnostiques. Il est nécessaire de n'avoir aucun faux négatif sur les mutations les plus fréquentes.

Le principal objectif est de vérifier au moins l'équivalence entre la technique HRM et le séquençage Sanger direct.

## ❖ Intervalle de Mesure

### Limite de détection

Concernant la technique d'HRM, le seuil de détection généralement mentionné dans la littérature est de l'ordre de 5 % d'allèle muté, permettant d'envisager un seuil inférieur aux recommandations.

### Limite de quantification

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique HRM.

## ❖ Répétabilité et reproductibilité

Les critères de validation de la répétabilité peuvent être le nombre de Cp et le profil de la courbe HRM. Il faut que le profil HRM et les Cp soient identiques pour un même échantillon en réplicat. Il est vérifié la stabilité de la courbe HRM.

## ❖ Interférences

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique HRM.

## ANALYSE DES RÉSULTATS

### ❖ Seuil de décision des contributifs

- Nombre de cycles totaux : il est recommandé d'avoir plus de 40 cycles pour avoir des amplifications atteignant le plateau.
- Le seuil d'amplification de la zone grise peut être soit déterminé de manière identique pour tous les amplicons (35 cycles est consensuel), soit déterminé en fonction des statistiques des blancs (différence d'au moins 2 Cp). Le laboratoire doit déterminer ces seuils : zone grise et limite d'acceptation des résultats. Si le résultat de Cp est supérieur au seuil d'amplification, le résultat doit être rendu comme « non contributif ».
- Dans cette zone grise, il est recommandé de ne pas rendre les cas sauvages. Ils seront rendus comme « non contributifs » ou avec une réserve « la qualité de l'amplification est insuffisante ». En cas de mutation, il est nécessaire d'avoir une concordance des Cp et des courbes HRM pour **tous les réplicats**.
- Dans tous les cas, les témoins blancs ne doivent pas sortir amplifiés pour un nombre de cycles inférieur au seuil déterminé par le laboratoire.

### ❖ Validation du profil anormal

- Le paramètre étudié correspond au calcul du « différentiel plot » par rapport à la courbe HRM de contrôle normal.
- Il est recommandé de déterminer des seuils de vérification des profils anormaux. Le seuil généralement conseillé est de +/- 3 SD par rapport à la distribution des profils normaux. Il est recommandé de déterminer ces seuils à partir d'un panel d'essais comprenant des échantillons normaux et mutés.
- Il est recommandé d'avoir une double analyse, à la fois du « différentiel plot » et du « Tm calling » pour détecter les éventuelles mutations homozygotes.

- Au cas où il est noté une différence significative par rapport à la valeur seuil, un séquençage direct est réalisé.
- Il est recommandé de réduire le nombre de polymorphismes constitutionnels présents dans l'amplicon lors du choix des amorces. En présence d'un polymorphisme, il est recommandé de séquencer systématiquement tout profil différentiel du profil sauvage. Il est également recommandé de montrer que l'analyse HRM permet de distinguer la présence d'une mutation pour les hotspots quel que soit le statut du polymorphisme.
- Dans le cas de l'utilisation du « differential plot », la fenêtre de normalisation a été déterminée sur un panel de mutations et est fixe par amplicon.

#### ❖ Choix des contrôles internes

- Le contrôle interne et le standard doivent être bien différenciés. Il est recommandé au minimum d'avoir un contrôle interne sans mutation sur le locus et un contrôle interne muté. Il est recommandé de suivre les profils HRM des mutations rares confirmées en séquence pour les distinguer des profils anormaux artéfactuels afin de faire évoluer de système.
- Il est accepté deux approches d'analyse possible des résultats : quantitative (écart à la normalité exprimé par la courbe de « differential plot ») et qualitative (profil différent du profil normal).
- Dans une **approche quantitative**, il est nécessaire d'avoir un standard positif au seuil de détection (par exemple 20 %) et un standard négatif. Le standard sert à réaliser la classification des profils en deux groupes : muté (à séquencer) et sauvage (rendu négatif sans séquençage). Le contrôle interne sert à valider l'essai. Le CQI est considéré comme valide si la présence des mutations se situe à +/-2,8 écart-type de la moyenne des 30 derniers CQI.
- Dans une **approche qualitative**, il est proposé au minimum d'avoir un standard sauvage et un contrôle interne muté. Les contrôles mutés utilisés doivent être soit hétérozygotes, soit à la limite de détection de la technique (20 % ou 10 %).
- Il est recommandé d'avoir des standards les plus reproductibles possible (lignées / commerciaux).

## CONTRIBUTEURS

Nom	Établissement
BERHOUET Sabine	CHU de Bordeaux
BOSELUT Nelly	AP-HP
CARRERE Nathalie	CHU de Bordeaux
COLLIN Christine	CHU de Tours
COULET Florence	AP-HP
FINA Frédéric	AP-HM
GRAND David	CHU de Toulouse
KESTEMONT Anulka	CHU de Bordeaux
LARRIEUX Marion	CHU de Montpellier
LEROY Karen	AP-HP
NICAISE Yvan	CHU de Toulouse
ROULEAU Étienne	Institut Curie
ROUQUETTE Isabelle	CHU de Toulouse

# PARTICULARITÉS DU PYROSÉQUENÇAGE POUR LA DÉTECTION DE VARIATIONS DE SÉQUENCE

## TYPE DE MÉTHODE

Nous n'aborderons ici que les aspects sur la détection de variations de séquence.

La recherche d'une mutation inconnue par pyroséquencage est considérée comme relevant d'une méthode qualitative : il s'agit de détecter la présence d'une variation qualitative de séquence par rapport à une séquence de référence. Cette méthode repose toutefois sur des éléments quantifiables rendant nécessaire d'inclure dans le dossier de validation des critères de répétabilité, de reproductibilité et de limite de détection.

Les paramètres clés du pyroséquencage sont :

- l'aspect visuel du profil de la séquence ;
- le niveau de luminescence ou le niveau de mutation.

Cette technique conduit ainsi à rendre un résultat sous forme qualitative (présence/absence d'une mutation) basée sur des valeurs numériques.

## PORTÉE D'ACCRÉDITATION

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique pyroséquencage.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE (SH-FORM 43)

Le **pyroséquencage** est une technique qui permet d'effectuer un séquençage par quantification d'un signal lumineux émis lors de l'incorporation d'un nucléotide. Contrairement à la technique de séquençage de type Sanger, les nucléotides sont ajoutés l'un après l'autre. Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse et libère un Pyrophosphate. Une ATPsulfurylase vient alors transformer ce Pyrophosphate en ATP qui est alors utilisé, couplé à une Luciférine, par une Luciférase. On a alors production d'Oxyluciférine et d'un signal lumineux. Le signal est détecté par un capteur CCD (Charge-Coupled Device) qui va le traduire sous forme d'un pic sur le *Pyrogramme*. La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps. On peut donc déduire la séquence à partir de la taille des pics obtenus. Par ailleurs, en cas de mélange de nucléotides à une même position (polymorphisme de séquence), la taille des pics permet d'avoir une quantification de la proportion de brins porteurs de l'un ou l'autre des nucléotides.

### DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande	Liste des gènes analysés
Principe de la Mesure	Pyroséquencage
Méthode de mesure	Taux de mutation
Type d'échantillon primaire (urine, sang...)	- copeaux de tissu tumoral inclus en paraffine/lame blanche - tissu congelé - sang
Type de récipient, Additifs (tubes...)	tubes
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution...)	Extraction d'ADN Concentration des ADN Quantité minimum en fonction de la robustesse
Unités	Absence/présence de mutation
Intervalles de référence	Non applicable
Marquage CE (Oui/Non)	
Codage C.N.Q. (s'il existe)	NA
Instrument (analyseur automatique, etc.)	
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	

Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique	NA
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs	NA

## MAÎTRISE DES RISQUES

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique pyroséquençage.

## QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique pyroséquençage.

## VÉRIFICATION DES AMORCES

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique pyroséquençage.

## ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE POUR LA DÉTECTION DE SNP

Sachant que dans la grande majorité des applications, le résultat du pyroséquençage est rendu sous forme mutée/non mutée et que nous ne disposons pas d'étalon, certains paramètres du dossier quantitatif ne peuvent être évalués.

### ❖ Spécificité et sensibilité diagnostique

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique de pyroséquençage.

### ❖ Contamination inter-échantillons et inter-réactifs

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique pyroséquençage.

### ❖ Stabilité des réactifs

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique pyroséquençage.

**REMARQUE.** Il est recommandé de commander les amorces de pyroséquençage sous forme purifiées HPLC.

### ❖ Robustesse

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique pyroséquençage.

### ❖ Comparaison de méthodes

La méthode de référence en biologie moléculaire est le séquençage Sanger (cf. liste des références bibliographiques). De nombreuses références bibliographiques démontrent la concordance des génotypes identifiés entre ces deux techniques. Il serait néanmoins préférable de réaliser une comparaison sur site. La technique de pyroséquençage étant une technique plus sensible que le séquençage de Sanger, il est nécessaire de n'avoir aucun faux négatif sur les mutations identifiées en Sanger.

### ❖ Intervalles de la mesure

Concernant la technique de pyroséquençage pour la détection de SNP, le seuil de détection généralement mentionné dans la littérature est de l'ordre de 5-10 % d'allèles mutés. Cette valeur est inférieure aux recommandations de l'INCa<sup>2</sup>, ce qui rend cette technique applicable à la détection de mutations en génétique somatique.

Les limites de blanc (LOB) et de détection (LOD) dépendent néanmoins des amorces utilisées. Celles-ci doivent donc être établies spécifiquement pour chaque paramètre par le laboratoire. Ces valeurs peuvent être calculées ou déterminées par expérimentations.

<sup>2</sup> Bonnes pratiques pour la recherche de mutations à visée théranostique dans les tumeurs solides. INCa, 2010

### Limite de détection

La limite de détection peut être établie :

- à partir d'une gamme de dilution d'ADN muté. Il est judicieux d'encadrer la limite de détection attendue ;
- ou calculée.

### Calcul de la limite de détection (SH-GTA 04)

Le document du COFRAC SH-GTA 04 recommande de réaliser les calculs de la LOD à partir de 30 mesures d'échantillons non mutés. La formule usuelle pour le calcul de la limite de détection est la suivante :

$$\text{LOD} = \mu_{\text{wt}} + 3 \times \text{SD}_{\text{wt}}$$

$\mu$  = moyenne obtenue avec un échantillon WT

SD = écart type

**REMARQUE** Dans le cas où la mesure des blancs est proche de zéro, les valeurs obtenues sur les échantillons ne suivent pas une loi normale et le calcul ci-dessus n'est plus applicable. Pour ces applications, un seuil minimal de 2% est généralement utilisé, même si le calcul donne une valeur inférieure.

### Limite de blanc (bruit de fond)

La limite de blanc (LOB), définie par la formule ci-dessous pour un intervalle de confiance de 95 %, indique la valeur maximale que ne doivent pas dépasser les échantillons blancs dans les résultats d'analyse.

$$\text{LOB} = \mu_{\text{wt}} + 1,645 \times \text{SD}$$

**DOSSIERS "SPÉCIFIQUES" PAR TEST** Une vérification expérimentale de cette sensibilité devra être effectuée pour chaque jeu d'amorces. Les éléments de preuves correspondant à cette vérification seront versés dans le dossier "spécifique" de chaque test.

### Limite de linéarité

Non applicable car le résultat est rendu sous forme qualitative et ne donne lieu à aucune donnée quantifiée

### ❖ **Répétabilité**

La répétabilité peut être évaluée en réalisant **une étude de trois échantillons en triplicata** : un échantillon sauvage, deux échantillons mutés avec des proportions de cellules tumorales significatives des applications cliniques (par exemple : 50 % et 10 %). On peut alors calculer le coefficient de variation (CV) des résultats pour chaque échantillon correspondant à la répétabilité.

Ces essais peuvent être réalisés avec du matériel de référence (ADN de lignée, ADN FFPE, ou matériel artificiel).

Pour établir des recommandations, les CV de ces essais vont être mis en commun. Les fournisseurs préconisent un CV de 3 % d'unité de mutation.

### ❖ **Reproductibilité**

Au vu de la configuration des méthodes de pyroséquençage, on propose de réaliser cette étude au minimum sur **8 points sur au moins 15 jours avec au minimum le suivi de deux niveaux**. Le niveau de mutations est défini par un ratio d'intensité entre les pics de la zone variable étudié où se situent la mutation et les pics de référence (cf. Validation du pyrogramme/analyse des résultats).

La reproductibilité peut être évaluée à partir des CQI passés par le laboratoire en vérifiant le CV obtenu entre différents essais.

## ❖ Interférences

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique pyroséquençage.

## VALIDATION DU PYROGRAMME/ANALYSE DES RÉSULTATS

### ❖ Les critères de validation du profil de pyroséquençage sont :

- **Vérification de la séquence obtenue** par rapport à celle attendue. Sur l'échantillon témoin non muté, s'assurer visuellement des hauteurs de pics (pics dinucléotides = 2 pics mononucléotides).
- **Intensité minimale** des signaux : ce critère peut varier d'un laboratoire à un autre et en fonction des appareils utilisés. Il doit donc être défini par des essais sur site. Un essai doit être réalisé sur site au seuil de sensibilité défini pour le test (généralement 5 % à 10 % d'allèles mutés). La mesure de l'intensité du signal d'un pyrogramme peut être obtenue en mesurant soit un pic de référence (de préférence hors le nucléotide A), soit une moyenne de pic de référence.
- La **hauteur d'un pic dinucléotidique** doit correspondre à environ la moitié d'un pic mononucléotique.
- **Bruit de fond** : à définir en fonction des appareils (cf. tableau 2). Ce critère peut varier d'un laboratoire à un autre et doit être défini par des essais sur site. L'objectif est d'identifier l'intensité minimale sans bruit de fond et permettant d'avoir une lecture de la séquence sans ambiguïté (présence des pics attendus et proportion des pics).

### Analyse des CQI

Ces CQI seront passés à chaque analyse et les valeurs qualités qui leur sont associées seront collectées et analysées. L'intensité du signal peut varier d'un essai à l'autre. Il est donc plus facile de suivre un **niveau de mutation**. Celui-ci est défini par un ratio d'intensité entre les pics de la zone variable étudié où se situe la mutation et les pics de référence. Le laboratoire doit définir une règle d'acceptation du CQI. Selon la loi de Westgard, le CQI est considéré comme valide si la présence des mutations se situe à  $\pm 2,8$  écart-type de la moyenne des 30 derniers CQI.

### Seuil de décision

Les seuils de positivité ou de non contributifs doivent être définis. Dans la zone grise, il est recommandé de ne pas rendre les cas sauvages. Ils seront rendus comme « non contributifs ».

## AMÉLIORATION EN CONTINU/CONFIRMATION DES PERFORMANCES EN ROUTINE

Il ne semble pas y avoir de spécificité pour la technique de pyroséquençage.

# CONTRIBUTEURS

Nom	Établissement
CERVERA Pascale	AP-HP
COLLIN Christine	CHU de Tours
CORTES Ulrich	CHU de Poitiers
DE FRAIPONT Françoise	CHU de Grenoble
DEROUET Chloé	Institut Curie
DESCARPENTRIES Clotilde	CHU de Lille
DURANTON-TANNEUR Valérie	CHU de Nice
EBRAN Nathalie	Centre Lacassagne
ESCANDE Fabienne	CHU de Lille
FEY Luc	Institut de Cancérologie de l'Ouest
Grand David	CHU de Toulouse
GUBLER Brigitte	CHU d'Amiens
HARATYK Cécile	CHU de Dijon
HELIAS Zofia	AP-HP
HOFMAN Paul	CHU de Nice
JACOBS Michèle	CHU de Strasbourg
JOLY Marie-Odile	CHU de Lyon
KARAYAN-TAPON Lucie	CHU de Poitiers
LACORRE Sylvain	CHU de Limoges
LAMY Aude	CHU de Rouen
LESPAGNOL Alexandra	CHU de Rennes
LETOURNEAU Marion	CHU de Dijon
MAGNIN Sandrine	CHU de Besançon
MOREL Alain	Institut de Cancérologie de l'Ouest
MOSSER Annick	CHU de Rennes
PRETET Jean-Luc	CHU de Besançon
ROULEAU Étienne	Institut Curie
ROUQUETTE Isabelle	CHU de Toulouse
VILLALVA Claire	CHU de Poitier

---

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### Test KRAS :

Dufort S, Richard MJ, de Fraipont F: Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues. *Anal Biochem* 2009, 391:166-168.

Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Loda M, Fuchs CS: Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005, 7:413-421.

Packham D, Ward RL, Ap Lin V, Hawkins NJ, Hitchins MP: Implementation of novel pyrosequencing assays to screen for common mutations of BRAF and KRAS in a cohort of sporadic colorectal cancers. *Diagn Mol Pathol* 2009, 18:62-71

Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, Roessner A, Schneider-Stock R: K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathol Res Pract* 2007, 203:489-497.

Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, Murphy KM: Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn*, 12:425-432.

Whitehall V, Tran K, Umapathy A, Grieu F, Hewitt C, Evans TJ, Ismail T, Li WQ, Collins P, Ravetto P, Leggett B, Salto-Tellez M, Soong R, Fox S, Scott RJ, Dobrovic A, Iacopetta B: A multicenter blinded study to evaluate KRAS mutation testing methodologies in the clinical setting. *J Mol Diagn* 2009, 11:543-552.

#### **Test BRAF :**

Packham D, Ward RL, Ap Lin V, Hawkins NJ, Hitchins MP: Implementation of novel pyrosequencing assays to screen for common mutations of BRAF and KRAS in a cohort of sporadic colorectal cancers. *Diagn Mol Pathol* 2009, 18:62-71

Colomba E, Helias-Rodzewicz Z, Von Deimling A, Marin C, Terrones N, Pechaud D, Sured S, Cote JF, Peschard F, Capper D, Blons H, Zimmermann U, Clerici T, Saiag P, Emile JF: Detection of BRAF p.V600E Mutations in Melanomas: Comparison of Four Methods Argues for Sequential Use of Immunohistochemistry and Pyrosequencing. *J Mol Diagn*, 15:94-100.

Tan YH, Liu Y, Eu KW, Ang PW, Li WQ, Salto-Tellez M, Iacopetta B, Soong R: Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. *Pathology* 2008, 40:295-298.

#### **Test NRAS :**

Volante M, Rapa I, Gandhi M, Bussolati G, Giachino D, Papotti M, Nikiforov YE: RAS mutations are the predominant molecular alteration in poorly differentiated thyroid carcinomas and bear prognostic impact. *J Clin Endocrinol Metab* 2009,94:4735-4741.

#### **Test PI3KCA :**

Baker CL, Vaughn CP, Samowitz WS: A PIK3CA pyrosequencing-based assay that excludes pseudogene interference. *J Mol Diagn*, 14:56-60.17. Noshio K, Kawasaki T, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Zepf D, Yan L, Longtine JA, Fuchs CS, Ogino S: PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia* 2008, 10:534-541.

Ogino S, Noshio K, Kirkner GJ, Shima K, Irahara N, Kure S, Chan AT, Engelman JA, Kraft P, Cantley LC, Giovannucci EL, Fuchs CS: PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol* 2009, 27:1477-1484.

Noshio K, Kawasaki T, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Zepf D, Yan L, Longtine JA, Fuchs CS, Ogino S: PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia* 2008, 10:534-541

#### **Tests IDH1 et IDH2 :**

Felsberg J, Wolter M, Seul H, Friedensdorf B, Goppert M, Sabel MC, Reifenberger G: Rapid and sensitive assessment of the IDH1 and IDH2 mutation status in cerebral gliomas based on DNA pyrosequencing. *Acta Neuropathol*, 119:501-507.

Setty P, Hammes J, Rothamel T, Vladimirova V, Kramm CM, Pietsch T, Waha A: A pyrosequencing-based assay for the rapid detection of IDH1 mutations in clinical samples. *J Mol Diagn*, 12:750-756.

#### **Test EGFR :**

Dufort S, Richard MJ, Lantuejoul S, de Fraipont F: Pyrosequencing, a method approved to detect the two major EGFR mutations for anti EGFR therapy in NSCLC. *J Exp Clin Cancer Res*, 30:57.

Kim HJ, Oh SY, Kim WS, Kim SJ, Yoo GH, Kim WD, Lee KY: Clinical investigation of EGFR mutation detection by pyrosequencing in lung cancer patients. *Oncol Lett*, 5:271-276.



# Particularités du Séquençage de Sanger

## TYPE DE MÉTHODE

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

Document de référence : INTERLOQT – ANPGM

## PORTÉE D'ACCRÉDITATION

Compte tenu des réactifs actuellement disponibles sur le marché et des résultats obtenus nous proposons de valider le séquençage Sanger comme une méthode qualitative en portée flexible B.

Il est possible de proposer une approche de validation globale de la technique complétée par des dossiers de validation complémentaires pour valider spécifiquement les différents marqueurs à étudier.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

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 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 hémizyote selon le mode de transmission de la maladie considérée) ou hétérozygote.

### Description de la méthode selon le SH-FORM 44

Analyte/Mesurande	Détailler la liste des gènes/codons analysés
Principe de la Mesure	Séquençage selon la méthode de Sanger
Méthode de mesure	Taux de mutations
Marquage CE (Oui/Non)	

## MAÎTRISE DES RISQUES (SH-FORM 44)

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique séquençage.

## QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique séquençage.

## VÉRIFICATION DES AMORCES

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique séquençage.

## ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE

### ❖ SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ DIAGNOSTIQUES

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 cause d'un bruit de fond trop important). En pratique, la sensibilité et la spécificité diagnostiques, difficiles à déterminer de façon rigoureuse (analyse nécessaire d'un très grand nombre d'échantillons, 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 et indiquée par un logiciel d'analyse adapté.

#### Détermination de la spécificité diagnostique

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

- Valeur qualité (Phred ou autre QV)  $\geq 20$  pour l'ensemble des bases lues sur les deux sens de la région d'intérêt ;
- Valeur qualité (Phred ou autre QV)  $\geq 30$  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).

**REMARQUES.** La valeur qualité, type Phred, indique la probabilité que le résultat soit juste. Il est exprimé 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)
- >Phred 40 : 0,01% de risque d'erreur (99,99% de confiance que la base soit correctement identifiée)

#### Détermination de la sensibilité diagnostique

Concernant la sensibilité analytique, une concordance de 100 % doit être observée avec le génotype connu antérieurement et identifié selon une autre méthode ou dans un autre laboratoire.

### ❖ Contaminations

Il ne semble pas y avoir de spécificité pour la technique de séquençage Sanger.

### ❖ Stabilité des réactifs

Il ne semble pas y avoir de spécificité pour la technique de séquençage Sanger.

### ❖ Robustesse

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 à évaluer doit se faire en fonction de l'étude préalable des risques et des résultats de répétabilité et de reproductibilité. **Ces analyses devront être réalisées sur tous les séquenceurs potentiellement utilisés.**

Une comparaison des résultats des CQI peut être utilisée pour vérifier la robustesse à condition de suivre tous les paramètres à évaluer lors de la réalisation des tests. Des données de la littérature peuvent appuyer ces données.

#### **Quantité d'ADN limite**

Il est recommandé d'utiliser un échantillon calibré (lignée ou commercial) comprenant une mutation au seuil de détection cible (de 10 à 20 % de cellules tumorales) et d'évaluer la limite de quantification en faisant varier la quantité d'ADN. Les résultats doivent être validés pour un nombre de cycles de PCR à la limite fixée pour rendre un résultat (le plus souvent 35 cycles).

Pour valider ce paramètre, on peut préparer une dilution de concentration décroissante d'ADN de cet échantillon pour déterminer le seuil en séquençage. Lorsque ce seuil est déterminé, il est nécessaire de vérifier la répétabilité du signal muté.

#### **❖ Comparaison de méthodes**

Le séquençage de Sanger est généralement considéré comme étant la méthode de référence en biologie moléculaire. Par défaut, une comparaison avec une autre méthode utilisée dans le laboratoire ou avec un autre laboratoire utilisant cette même méthode peut être réalisée. Des données antérieures peuvent être reprises.

#### **❖ Intervalle de mesure/Limite de détection**

Le seuil minimal recommandé pour une application diagnostique est de 20 % de cellules tumorales<sup>3</sup> (recommandations INCa). Il s'agit de la limite de détection acceptable pour le séquençage.

Il ne semble pas y avoir de spécificité pour la technique de séquençage Sanger, à part une limite de détection élevée. La limite de détection devra être prise en compte lors de l'interprétation des résultats.

#### **❖ Répétabilité**

La répétabilité peut être évaluée en réalisant une étude sur au moins trois échantillons en triplicata : un échantillon sauvage, deux échantillons mutés dans des proportions significatives des applications (par exemple : 50 % et 10 %).

Le niveau de qualité, mesuré par exemple par le Phred, doit être maintenu pour les trois réplicats.

#### **❖ Reproductibilité**

Le niveau de qualité, mesuré par exemple par le Phred, doit être maintenu dans le temps entre les différentes séquences du panel.

#### **❖ Interférences**

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique pyroséquençage.

## **ANALYSE DES RÉSULTATS/VALIDATION DU SÉQUENÇAGE**

#### **❖ Validation des CQI**

Ces CQI seront passés à chaque analyse et les valeurs qualité qui leurs sont associées seront collectées et analysées (intensité de fluorescence des pics correspondant à la détection des nucléotides sauvages, ratio intensité de fluorescence des pics correspondant à la détection de l'allèle mutant/intensité de fluorescence des pics correspondant à la détection de l'allèle sauvage).

#### **❖ Validation du logiciel d'analyse**

L'utilisation d'au moins un logiciel d'analyse permettant l'alignement sur une séquence de référence et le calcul de valeurs qualité sont recommandées. La validation de la méthode de séquençage nécessite que le ou les logiciels utilisés aient été préalablement évalués et validés pour les applications prévues :

<sup>3</sup> Bonnes pratiques pour la recherche de mutations à visée théranostique dans les tumeurs solides. INCa, 2010

- 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).

Le personnel doit être habilité à utiliser ces logiciels. La méthode d'analyse utilisée par le laboratoire doit être adaptée au seuil de détection fixé (analyse manuelle des séquences ou paramétrage spécifique du logiciel d'analyse).

**REMARQUE.** Il existe des logiciels gratuits fournissant des valeurs qualités (type FinchTV ou Sequence Scanner).

#### ❖ Validation des séquences obtenues

- Nombre de cycles de PCR : le laboratoire doit déterminer le nombre de cycles de PCR maximum à réaliser pour éviter toute erreur d'interprétation. Une limite à 35 cycles est généralement admise.
- Estimation de la qualité des séquences. Elle peut être réalisée sur :
  - la valeur Phred : elle doit être supérieure à 20 sur la région d'intérêt ou le hotspot d'intérêt si la lecture est faite dans les deux sens ou elle doit être supérieure à 30 si la lecture est faite dans un seul sens ;
  - l'intensité du signal (rfu >200 et <4 000) : un seuil doit être déterminé par le laboratoire. L'expérience a montré que ce seuil peut fortement varier en fonction des laboratoires, de la qualité de la séquence... Dans certains cas, il a été montré une capacité de détecter des mutations en dessous d'un signal de 20 (Noguchi et al, 2014). L'intensité peut être utilisée pour valider la qualité de l'amplification ;
  - le bruit de fond doit être reproductible entre deux séquences normales.
- La prise en compte du risque lié à l'existence de mutations homozygotes. Des logiciels (ex : SeqScape) peuvent être utilisés à cet effet.
- Une analyse de risque doit être menée pour réduire les erreurs d'identification et de génotypage (utilisation de logiciels d'annotation type Alamut).

#### **AMÉLIORATION EN CONTINU/CONFIRMATION DES PERFORMANCES EN ROUTINE**

Il ne semble pas y avoir de spécificité pour la technique de séquençage Sanger.

# CONTRIBUTEURS

Nom	Établissement
Blons Hélène	AP-HP
Bourdon Violaine	CLCC de Marseille
Carrere Nathalie	CHU de Bordeaux
Collin Christine	CHRU de Tours
Derouet Chloé	Institut Curie, Paris
Escande Fabienne	CHRU de Lille
Ferraro-Peyret Carole	HCL
Fina Frédéric	AP-HM
Grand David	CHU de Toulouse
Helias Zofia	AP-HP
Hostein Isabelle	CLCC de Bordeaux
Kestemont Anulka	CHU de Bordeaux
Lacroix Ludovic	Institut Gustave Roussy
Lamy Aude	CHU de Rouen
Lizard Sarab	CLCC de Dijon
Rouleau Étienne	Institut Curie, Paris
Soubeyran Isabelle	CLCC de Bordeaux
Vallée Audrey	CHU de Nantes

Le document « Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations » rédigé collégialement par un groupe de travail composé de membres de l'ANPGM (Association nationale des praticiens de génétique moléculaire) et du groupe Interloqt d'Unicancer a également servi de base à l'élaboration du présent document

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Noguchi T, Bourdon V, Sobol H. About sequence quality : Impact on clinical applications. 2014 ;15(5):299-305

### **Documents relatifs au séquençage de Sanger pour la génétique constitutionnelle :**

Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations. ANPGM, 2012.

Mattocks CJ, Watkins G, Ward D, Janssens T, Bosgoed EA, van der Donk K, Ligtenberg MJ, Pot B, Theelen J, Cross NC, Scheffer H, Matthijs G. Interlaboratory diagnostic validation 56(4):593-602



# Particularités du SNaPshot®

## PORTÉE D'ACCRÉDITATION

Compte tenu des réactifs actuellement disponibles sur le marché et des résultats obtenus, nous proposons de valider le SNaPshot® comme une **méthode qualitative en portée flexible B**.

Il est proposé de constituer deux types de dossier :

- un dossier général correspondant à une validation initiale de la méthode, quelle que soit la mutation recherchée. Ce dossier est élaboré à partir des données issues d'applications représentatives du laboratoire ;
- des dossiers de validation pour chacune des analyses réalisées par SNaPshot®.

Les différents dossiers devront être validés selon le SH-FORM 44 (portée qualitative).

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE (SH-FORM 44)

La réaction d'extension d'amorce par technologie SNaPshot® est basée sur une polymérisation *in vitro* d'un didéoxynucléotide triphosphate (ddNTP) complémentaire d'une matrice (produit de PCR purifié) à partir de l'extrémité 3' d'une amorce. Le ddNTP est polymérisé par formation d'une liaison ester entre le groupe 3'OH de l'amorce et le groupe 5'P du ddNTP. Suite à l'incorporation du ddNTP, le manque d'extrémité 3'OH libre empêche l'incorporation d'un nucléotide aval provoquant un arrêt de l'élongation. Ainsi, à partir de l'extrémité 3'OH d'une amorce, un seul nucléotide est incorporé.

Cette technique est utilisée pour détecter des mutations ponctuelles. Pour cela, la réaction d'extension d'amorce est réalisée à partir d'une amorce qui s'hybride par son extrémité 3' sur le nucléotide précédent le point de mutation, le ddNTP polymérisé à partir de l'amorce sera ainsi complémentaire du point de mutation. Les différents types de ddNTP sont marqués par des fluorochromes distincts qui permettront leur caractérisation.

Les produits de la réaction d'extension d'amorce sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire sur séquenceur automatique d'ADN : (i) un faisceau laser en regard des capillaires excite le fluorochrome des ddNTP, (ii) une caméra CCD capture l'émission de fluorescence amplifiée par un photomultiplicateur et (iii) un électrophérogramme est obtenu après analyse par un logiciel des données brutes restituées par la caméra CCD (raw data). L'électrophérogramme obtenu pour un patient est ensuite comparé à celui d'un sujet contrôle ou à une séquence de référence de manière à identifier toute modification du profil. La technologie SNaPshot® permet de caractériser jusqu'à 10 points de mutations dans une même réaction. Pour être visualisée sur un même profil d'électrophorèse capillaire, chaque amorce étendue doit avoir un poids moléculaire qui la caractérise. Ce sont des queues oligonucléotidiques non complémentaires du génome humain de taille variable fixées à l'extrémité 5' des amorces qui vont conférer aux amorces ces poids moléculaires caractéristiques.

<b>Analyte/Mesurande</b>	Détailler la liste des gènes/nucléotides analysés
<b>Principe de la Mesure</b>	Genotypage par extension à partir de l'extrémité 3' d'une amorce par un didéoxynucléotide complémentaire du point de mutation évalué (technologie SNaPshot®)
<b>Méthode de mesure</b>	Détection de fluorescence associée à l'amorce étendue.
<b>Marquage CE (Oui/Non)</b>	

## MAÎTRISE DES RISQUES (SH-FORM 44)

Aucune particularité de ce paramètre pour le SNaPshot®.

## QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS

Aucune particularité de ce paramètre pour le SNaPshot®.

## VÉRIFICATION DES AMORCES

Aucune particularité de ce paramètre pour le SNaPshot®.

## ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE

Les résultats d'analyses par la technique de SNaPshot® étant rendus sous forme qualitative, il s'agit de vérifier les paramètres d'une méthode d'analyse qualitative.

Afin d'évaluer les performances du SNaPshot® il est proposé d'utiliser comme valeur de « référence qualité » l'intensité maximale de fluorescence des pics de l'électrophérogramme (hauteur du pic).

Cette valeur sera exploitée de deux façons :

- Calcul des ratios : (Intensité max de fluorescence du pic de détection du ddNTP mutant)/ (Intensité max de fluorescence du pic de détection du ddNTP sauvage)
- Détermination d'une limite de quantification des résultats.

### ❖ Spécificité et sensibilité diagnostiques

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique SNaPshot®.

### ❖ Contamination inter-échantillons et inter-réactifs

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique SNaPshot®.

### ❖ Stabilité des réactifs

#### Stabilité des produits de PCR et de SNaPshot® purifiés

Selon l'organisation des laboratoires, les produits de PCR peuvent être conservés à + 4°C ou -20°C avant leur analyse par SNaPshot®. De même les produits de SNaPshot® purifiés peuvent être conservés à -20°C avant leur séparation par électrophorèse capillaire. Ces temps de conservation sont variables d'un laboratoire à l'autre.

La preuve que le stockage des produits de PCR et de SNaPshot® purifiés n'influence pas le résultat de l'analyse sera apportée par :

- la comparaison des résultats de SNaPshot® obtenus à partir de 4 produits de PCR purifiés avant et après leur conservation à + 4°C ou -20°C sur une durée représentative de la pratique du laboratoire ;
- la comparaison des résultats de SNaPshot® obtenus à partir de 4 produits de SNaPshot® purifiés avant et après conservation à -20°C sur une durée représentative de la pratique du laboratoire.

La comparaison portera sur le suivi des valeurs qualité (intensité de fluorescence des pics correspondant à la détection des nucléotides sauvages, ratio intensité de fluorescence des pics correspondant à la détection de l'allèle mutant/intensité de fluorescence des pics correspondant à la détection de l'allèle sauvage). La durée maximale de conservation des produits de PCR et de SNaPshot® purifiés devra être mentionnée dans les modes opératoires des analyses correspondantes.

Stabilité des réactifs Aucune particularité de ce paramètre pour le SNaPshot®.

### ❖ Robustesse

Les preuves de la robustesse pourront être apportées par le suivi d'échantillons porteurs d'une mutation : CQI ou échantillons patients pour lesquels la détection d'une mutation par SNaPshot® a fait l'objet d'une vérification sur une seconde analyse indépendante.

Les paramètres ayant varié d'une analyse à l'autre devront être listés (exemple : manipulateur, pipette, appareil PCR, lots de réactifs). Pour chaque CQI et/ou échantillon patient la preuve que ces variations n'ont pas affecté le résultat de l'analyse devra être apportée par le suivi de la valeur qualité « intensité de fluorescence des pics correspondant à la détection de l'allèle mutant/intensité de fluorescence des pics correspondant à la détection de l'allèle sauvage ». Des données de la littérature peuvent appuyer ces données.

### ❖ Comparaison de méthodes

Aucune particularité de ce paramètre pour le SNaPshot<sup>®</sup>.

### ❖ Intervalle de la mesure

**Détermination du niveau des échantillons non mutés** Ce paramètre n'est pas nécessaire dans le cadre d'une validation de méthode qualitative.

Le document du COFRAC SH-GTA 04 recommande de réaliser les calculs de la LOD à partir de 30 mesures d'échantillons non mutés. Il est préférable de passer ces échantillons en réplicats.

**Limite de détection** Compte tenu des données bibliographiques (cf. annexe 2), la **sensibilité diagnostique** du SNaPshot<sup>®</sup> peut être fixée à 10 % de cellules mutées (5 % d'allèle muté). En tout état de cause, le seuil minimal recommandé pour une application diagnostique est de 20 % de cellules tumorales<sup>4</sup> (recommandations INCa).

$LOD = \frac{\text{Intensité max de fluorescence du pic de détection du ddNTP mutant}}{\text{Intensité max de fluorescence du pic de détection du ddNTP sauvage}} \text{ blancs} + 3 \times SD_{\text{blanc}}$

**Limite de quantification** Chaque laboratoire devra établir pour chaque combinaison « type de ddNTP sauvage vs type de ddNTP mutant » l'intensité maximale de fluorescence du pic sauvage au-dessous de laquelle l'interprétation du résultat entraînera un risque de faux négatif. Par exemple pour un SNaPshot<sup>®</sup> qui évalue les nucléotides KRAS c.34G, KRAS c.35G, KRAS c.37G et KRAS c.38G, les combinaisons à tester seront ddGTPvsddATP, ddGTPvsddTTP et ddGTPvsddCTP.

Chaque combinaison sera passée dans une même série de SNaPshot<sup>®</sup>. Cette valeur de qualité sera établie pour toutes les mutations pour lesquelles un ADN de référence (lignée cellulaire ou contrôles commercialisés calibrés) comportant la mutation d'intérêt est disponible. Elle sera établie à partir d'échantillons pour lesquels la proportion d'allèles mutants est proche de la limite de détection (5 % d'allèle mutant).

**REMARQUES.** Pour l'ensemble des éléments de preuve versés au dossier de validation des méthodes, et pour chacune des positions évaluées, les intensités maximales de fluorescence correspondant au pic sauvage doivent être  $\geq$  à la limite de quantification déterminée expérimentalement.

### ❖ Répétabilité

Ce paramètre n'est pas obligatoire dans le cadre d'une validation de méthode qualitative.

Aucune particularité de ce paramètre pour le SNaPshot<sup>®</sup>.

### ❖ Reproductibilité

Ce paramètre n'est pas obligatoire dans le cadre d'une validation de méthode qualitative.

Aucune particularité de ce paramètre pour le SNaPshot<sup>®</sup>.

### ❖ Interférences

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique pyroséquençage.

## ANALYSE DES RÉSULTATS

### ❖ Seuil de décision des contributifs

Il est nécessaire de déterminer un critère pour classer les échantillons comme « contributifs » ou « non contributifs ».

### ❖ Seuil de décision des mutés/non mutés

Il est nécessaire de déterminer un critère pour classer les échantillons comme « sauvages » ou « mutés ».

### ❖ Choix des contrôles internes

<sup>4</sup> Bonnes pratiques pour la recherche de mutations à visée théranostique dans les tumeurs solides. INCa, 2010

Ces CQI seront passés à chaque analyse et les valeurs qualité qui leur sont associées seront collectées et analysées (intensité de fluorescence des pics correspondant à la détection des nucléotides sauvages, ratio intensité de fluorescence des pics correspondant à la détection de l'allèle mutant/intensité de fluorescence des pics correspondant à la détection de l'allèle sauvage).

## AMÉLIORATION EN CONTINU/CONFIRMATION DES PERFORMANCES EN ROUTINE

Aucune particularité de ce paramètre pour le SNaPshot®.

## CONTRIBUTEURS

Nom	Établissement
ESCANDE Fabienne	CHU de Lille
FERRARO-PEYRET Carole	CHU de Lyon
GRAND David	CHU de Toulouse
LAMY Aude	CHU de Rouen
LAVERGNE Lionel	CHU de Toulouse
LE MARECHAL Cédric	CHU de Brest
MAGNIN Sandrine	CHU de Besançon
PRETET Jean-Luc	CHU de Besançon
STACHOWICZ Marie-Laure	CHU de St-Etienne

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Dias-Santagata D, Akhavanfard S, David SS, Vernovsky K, Kuhlmann G, Boisvert SL, Stubbs H, McDermott U, Settleman J, Kwak EL, Clark JW, Isakoff SJ, Sequist LV, Engelman JA, Lynch TJ, Haber DA, Louis DN, Ellisen LW, Borger DR, Iafrate AJ: Rapid targeted mutational analysis of human tumours: a clinical platform to guide personalized cancer medicine. *EMBO Mol Med.* 2010 May ;2(5):146-58.

Lurkin I, Stoehr R, Hurst CD, van Tilborg AA, Knowles MA, Hartmann A, Zwarthoff EC. Two multiplex assays that simultaneously identify 22 possible mutation sites in the KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA genes. *PLoS One.* 2010 Jan 21;5(1).

# Technique de discrimination allélique utilisant des sondes fluorescentes Taqman<sup>®</sup>

## PORTÉE D'ACCRÉDITATION

La technique de discrimination allélique utilisant des sondes fluorescentes Taqman<sup>®</sup> fait appel à l'utilisation de deux sondes fluorescentes qui diffèrent uniquement par un nucléotide et qui sont complémentaires soit de l'allèle sauvage, soit de l'allèle muté. Il s'agit d'une technique aboutissant à rendre un résultat sous forme qualitative (présence/absence d'une mutation). Il est donc proposé de valider cette technique comme une méthode qualitative en portée flexible B.

Le paramètre clef est la valeur du Ct ou Cp, nombre de cycles nécessaires pour considérer la présence de l'allèle dans l'échantillon. Il y a un essai par mutation.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE (SH-FORM 44)

La technique de PCR quantitative utilisant des sondes Taqman<sup>®</sup> repose sur la réalisation d'une PCR en temps réel en utilisant des sondes spécifiques oligonucléotidiques marquées par deux fluorophores dont l'un est quenché par l'autre dit « Reporter ». La dégradation de cette sonde par la « Taq polymérase » à chaque cycle de PCR sera accompagnée d'une augmentation de fluorescence du Reporter qui sera mesurée.

L'utilisation de cette technique pour la discrimination allélique consiste à hybrider deux sondes fluorescentes qui diffèrent uniquement par un nucléotide et qui sont complémentaires soit de l'allèle sauvage, soit de l'allèle muté recherché. Seules les sondes correctement hybridées seront dégradées par la Taq polymérase et émettront un signal fluorescent, permettant ainsi de mettre en évidence et de quantifier un allèle muté par rapport à l'allèle sauvage.

<b>Analyte/Mesurande</b>	Détailler la liste des gènes/codons analysés
<b>Principe de la Mesure</b>	PCR quantitative allèle spécifique
<b>Méthode de mesure</b>	Mesure d'une intensité de fluorescence
<b>Marquage CE (Oui/Non)</b>	

## MAÎTRISE DES RISQUES (SH-FORM 44)

Aucune particularité de ce paramètre pour les sondes Taqman<sup>®</sup>.

## QUALIFICATION DES ÉCHANTILLONS

Aucune particularité de ce paramètre pour les sondes Taqman<sup>®</sup>.

## VÉRIFICATION DES AMORCES

La spécificité des sondes Taqman<sup>®</sup> doit être évaluée en parallèle de celle des amorces (blast ou test si la séquence n'est pas connue comme dans le cas de certains systèmes commerciaux).

## ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE

### ❖ Spécificité et sensibilité diagnostiques

Aucune particularité de ce paramètre pour les sondes Taqman<sup>®</sup>.

La spécificité et la sensibilité diagnostiques doivent être calculées pour 15 échantillons mutés et 15 échantillons sauvages. La spécificité et la sensibilité doivent être étudiées individuellement pour chaque mutation testée (primers et sonde).

### ❖ Contamination inter-échantillons et inter-réactifs

Il ne semble pas y avoir de spécificité pour la technique de Taqman<sup>®</sup>.

### ❖ Stabilité des réactifs

Aucune particularité de ce paramètre pour les sondes Taqman<sup>®</sup>.

### ❖ Robustesse

#### Sensibilité en limite de détection (à Ct WT 30-35)

Il est recommandé d'utiliser un échantillon calibré (lignée ou commercial) comprenant une mutation et de tester la limite de détection en situation d'amplification limite correspondant à la valeur seuil de "qualification des ADN". Un seuil de Ct:35 peut être considéré comme la cible. On teste une combinaison de quantité d'ADN décroissante et de dilution allélique.

On pourra utiliser la LOD établie comme décrit précédemment ( $LOD = \mu_R - 3 \times SD_R$ )

### ❖ Comparaison de méthodes

Aucune particularité de ce paramètre pour les sondes Taqman<sup>®</sup>.

### ❖ Intervalles de la mesure

#### Limite de détection du signal, détermination des Ct seuils

Un seuil arbitraire de Ct à 35 (allèle sauvage) semble adéquat pour définir la limite de détection du signal et qualifier les ADN. Une estimation de ce seuil par comparaison au Ct obtenu sur les témoins de PCR peut être établie localement si nécessaire.

#### Limite de détection du signal muté, détermination des Ct seuils (sensibilité analytique)

Le document du COFRAC SH-GTA 04 recommande de réaliser les calculs de la LOD à partir de 30 mesures d'échantillons non mutés. Il est préférable de passer ces échantillons en répliqués.

Il est possible de calculer le rapport R sur 30 échantillons WT (duplicata):

$$R = \frac{Ct_{mut} - Ct_{WT}}{Ct_{WT}}$$

La limite de détection d'une mutation est alors :

$$LOD = \mu_R - 3 \times SD_R$$

Les échantillons seront considérés mutés si R échantillon < LOD

Le seuil minimal recommandé pour une application diagnostique est de 20 % de cellules tumorales (recommandations INCa). Concernant les sondes Taqman<sup>®</sup>, le seuil de détection généralement mentionné dans la littérature est de l'ordre de 5 % d'allèles mutés, ce qui est inférieur aux recommandations.

La limite de détection peut être établie à partir d'une gamme de dilution d'ADN muté. Il est judicieux d'encadrer la limite de détection attendue. À titre d'exemple, une gamme de 50 %, 20 %, 10 %, 5 %, 0 % allèle muté/allèle sauvage peut être testée.

On pourra utiliser la LOD établie comme décrit précédemment ( $LOD = \mu_R - 3 \times SD_R$ )

### ❖ Répétabilité

Aucune particularité de ce paramètre pour les sondes Taqman<sup>®</sup>.

### ❖ **Reproductibilité**

La fidélité intermédiaire est établie sur au moins 15 jours avec 15 déterminations et à deux niveaux minimum (cf. SH-GTA 04). Pour des raisons de coût de réactifs, le nombre d'essais peut être limité.

### ❖ **Interférences**

Aucune particularité de ce paramètre pour la technique pyroséquençage.

## **ANALYSE DES RÉSULTATS**

Vérification du système d'analyse des données :

- Les supports informatiques utilisés pour l'analyse des résultats doivent être validés.
- La réalisation de l'analyse en duplicata doit produire le même résultat.
- Il n'y a pas de modification des données lors des exports d'un dossier vers un système d'analyse.
- Il n'y a pas de modification au cours du temps (stabilité des systèmes d'analyse)
- Les macros ou systèmes automatisés de calcul, si utilisés (calcul des  $\Delta Ct$ ) doivent être validés. Une vérification manuelle des calculs peut être effectuée pour validation.

## **AMÉLIORATION EN CONTINU**

Aucune particularité de ce paramètre pour les sondes Taqman<sup>®</sup>.

## **CONTRIBUTEURS**

<b>Nom</b>	<b>Établissement</b>
Blons Hélène	AP-HP
Escande Fabienne	CHRU de Lille
Lamy Aude	CHU de Rouen
Laurent-Puig Pierre	AP-HP
Rouleau Étienne	Institut Curie

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Document INCa Bonnes pratiques pour la recherche à visée théranostique de mutations somatiques dans les tumeurs solides [www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr) (2010)

Suzanne Kamel-Reid et al. Validation of KRAS Testing for Anti-EGFR Therapeutic Decisions for Patients With Metastatic Colorectal Carcinoma (Arch Pathol Lab Med. 2012;136:26–32)

Jennings L, Van Deerlin VM, Gulley ML; College of American Pathologists Molecular Pathology Resource Committee. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. Arch Pathol Lab Med. 2009;133(5):743–755.

H Blons, P Laurent-Puig Aspect technique de la détermination du statut KRAS dans le cancer colorectal et mise en place en France. Point de vue du biologiste Bulletin du cancer Volume 96 • N° spécial • décembre 2009

Kotoula plosone Targeted KRAS Mutation Assessment on Patient Tumor Histologic Material in Real Time Diagnostics

Didelot et al Competitive allele specific TaqMan PCR for KRAS, BRAF and EGFR mutation detection in clinical formalin fixed paraffin embedded samples, Exp Mol Pathol 2012



Pour plus d'informations  
[e-cancer.fr](http://e-cancer.fr)

RÉF : VALMUTGENSOM14

Institut National du Cancer  
52, avenue André Morizet  
92100 Boulogne-Billancourt  
France

Tel. +33 (1) 41 10 50 00  
Fax +33 (1) 41 10 50 20  
[diffusion@institutcancer.fr](mailto:diffusion@institutcancer.fr)

