


Validation analytique de tests cliniques effectués par séquençage de type Sanger en génétique humaine

Recommandations de bonne pratique

Une production de l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS)

Direction des services de santé et de l'évaluation des technologies



Validation analytique de tests cliniques effectués par séquençage de type Sanger en génétique humaine

Recommandations de bonne pratique

Rapport rédigé par
Catherine Gravel

avec la collaboration de
Andrée Fortin

Coordination scientifique
Éric Potvin

sous la direction de
Michèle de Guise



Le contenu de la présente publication a été rédigé et édité par l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS).

Membres de l'équipe projet

Auteure principale

Catherine Gravel, M. Sc., DESS

Collaboratrice interne

Andrée Fortin, Ph. D.

Coordonnateur scientifique

Éric Potvin, Ph. D.

Directrice

Michèle de Guise, M.D., FRCPC

Repérage d'information scientifique

Renaud Lussier, M.S.I.

Flavie Jouandon

Soutien administratif

Annabelle Suire

Équipe de l'édition

Patricia Labelle

Denis Santerre

Hélène St-Hilaire

sous la coordination de

Renée Latulippe, M. A.

avec la collaboration de

Madeleine Fex, B. A., révision linguistique

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2019

Bibliothèque et Archives Canada, 2019

ISSN 1915-3104 INESSS (PDF) ISBN 978-2-550- 84764-9 (PDF)

© Gouvernement du Québec, 2019

La reproduction totale ou partielle de ce document est autorisée à condition que la source soit mentionnée.

Pour citer ce document : Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Validation analytique de tests cliniques effectués par séquençage de type Sanger en génétique humaine. Rapport rédigé par Catherine Gravel. Québec, Qc : INESSS; 2019. 52 p.

L'INESSS remercie les membres de son personnel qui ont contribué à l'élaboration de ce document.

Comité consultatif

Les membres du comité d'experts du présent rapport sont :

D^r François Rousseau, médecin biochimiste, Centre hospitalier universitaire (CHU) de Québec – Université Laval

D^r Lambert Busque, hématologue, Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux (CIUSSS) de l'Est-de-l'Île-de-Montréal

D^r David Rosenblatt, pédiatre, généticien, Centre universitaire de santé McGill (CUSM)

D^r Louis Gaboury, anatomopathologiste, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

Lecteurs externes

Les lecteurs externes de ce rapport sont :

D^r Jonatan Blais, médecin biochimiste, Centre intégré de santé et de services sociaux (CISSS) Chaudière-Appalaches

D^{re} Isabelle De Bie, généticienne, CUSM

D^{re} Marie-Christine Guiot, anatomopathologiste, CUSM

D^r Jean-François Soucy, généticien, CHU Sainte-Justine

Comité scientifique permanent des analyses de biologie médicale

Les membres du Comité scientifique permanent des analyses de biologie médicale sont :

D^r François Rousseau, médecin biochimiste, CHU de Québec – Université Laval

D^r Lambert Busque, hématologue, CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal

D^r David Rosenblatt, pédiatre, généticien, CUSM

D^r Guy Fink, biochimiste clinique, CIUSSS de l'Estrie – CHU de Sherbrooke (CHUS)

M^{me} Lorraine Caron, consultante en éthique

M^{me} Suzanne K. Bédard, citoyenne

TABLE DES MATIÈRES

1.	CONTEXTE.....	1
2.	MÉTHODE	2
3.	PRÉAMBULE.....	3
4.	OBJECTIF DE PERFORMANCE RECOMMANDÉ PAR LE GROUPE DE TRAVAIL.....	5
5.	UTILISATION CLINIQUE ET TYPE D'ANALYSE	5
5.1.	Utilisation clinique du séquençage de Sanger.....	5
5.2.	Type d'analyse	6
6.	PLANIFICATION PRÉANALYTIQUE	7
6.1.	Détermination de la séquence de référence	8
6.2.	Conception et choix des amorces	9
6.3.	Détermination du matériel de référence et des échantillons cliniques témoins.....	10
6.4.	Type d'échantillon clinique	11
7.	VALIDATION ANALYTIQUE	12
7.1.	Particularités du séquençage de Sanger	12
7.2.	Évaluation de la qualité des données obtenues par séquençage de Sanger	13
7.3.	Taux d'erreur du séquençage de Sanger	17
7.4.	Critères de performance à évaluer lors de la validation d'un test effectué par séquençage de Sanger	20
7.5.	Détermination du nombre d'échantillons cliniques requis pour l'évaluation de la validité analytique d'un test par séquençage de Sanger	22
7.6.	Estimation de la puissance statistique d'une étude de validation en fonction de la taille de l'échantillon.....	25
8.	ÉTAPE POSTANALYTIQUE.....	27
8.1.	Interprétation des variations nucléotidiques et communication des données de séquence	27
8.2.	Essais d'aptitude et assurance qualité.....	28
	RÉFÉRENCES	30
ANNEXE A	Description de la technologie de séquençage de Sanger et précisions techniques.....	33
ANNEXE B	Description des critères de performance nécessaires à la validation d'un test effectué par séquençage de Sanger	35
ANNEXE C	Recommandations d'organismes professionnels et réglementaires concernant les critères de performance à évaluer lors de la validation analytique d'un test clinique par séquençage de Sanger ou dans le contexte des analyses génétiques et moléculaires dans le domaine clinique.....	41
ANNEXE D	Synthèse des meilleures pratiques de validation analytique de tests cliniques effectués par séquençage de Sanger	42

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Tests conçus en laboratoire (TCL)	3
Tableau 2	Résultat et profil génétique pouvant être obtenus à la suite de l'analyse de l'ADN par séquençage de Sanger	6
Tableau 3	Considérations et recommandations du CLSI concernant le matériel de référence et les échantillons cliniques témoins utilisés lors de la validation d'un test de génétique moléculaire	11
Tableau 4	Correspondance entre la valeur de qualité obtenue et la probabilité d'erreur de l'appel de la base	14
Tableau 5	Recommandations d'organismes professionnels et réglementaires concernant l'évaluation de la séquence obtenue lors de la validation analytique et lors des contrôles de qualité de routine d'un test clinique effectué par séquençage de Sanger	15
Tableau 6	Type et taux d'erreurs de différentes polymérase	17
Tableau 7	Type et taux d'erreurs menant à une mauvaise interprétation des représentations alléliques	18
Tableau 8	Probabilité d'erreur (PE) globale, par rapport, par nombre de bases séquencées	19
Tableau 9	Définition des critères et des paramètres de performance à évaluer lors de la validation analytique d'un test clinique par séquençage de Sanger	20
Tableau 10	Recommandations d'organismes professionnels et réglementaires concernant le nombre d'échantillons minimal requis pour la validation analytique d'un test clinique par séquençage de Sanger (ou d'un autre type d'analyse en génétique moléculaire)	24
Tableau 11	Effet du nombre d'échantillons analysés sur la puissance statistique lors de la détermination de la sensibilité d'un test qualitatif	25

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Processus d'implantation d'un test de génétique moléculaire aux fins d'une utilisation en diagnostic médical	4
Figure 2	Incertitude de l'estimation d'une proportion de 100 % en fonction du nombre d'observations	26

1. CONTEXTE

L'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS) a élaboré, à la demande du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS) du Québec, un processus d'évaluation des analyses de biologie médicale dont le résultat final est la transmission d'un avis à la ministre de la Santé et des Services sociaux. Cette évaluation couvre différents volets, dont celui de la validité analytique. Ainsi, dans un premier temps, chaque laboratoire demandeur doit, lors de la demande initiale d'ajout d'un test au Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale, présenter un plan de validation analytique complet et détaillé, soit le devis expérimental. Lorsque la décision d'ajouter le test proposé au Répertoire est prise, le laboratoire désigné doit fournir, dans un deuxième temps, des données de validation analytique qui démontrent sa capacité à effectuer l'analyse, et ce, dans le but de garantir au médecin prescripteur et au patient la fiabilité des résultats. Toutefois, dans le contexte du mécanisme d'évaluation scientifique des nouvelles analyses de biologie médicale, une grande disparité a été observée dans les données présentées à l'INESSS par les laboratoires demandeurs. La méconnaissance des meilleures pratiques et, possiblement, l'absence de recommandations canadiennes ou québécoises concernant les données de validation analytique à produire ainsi que le devis expérimental pour les produire, expliquent en grande partie cette situation. Il a donc été convenu de produire un document destiné à guider les laboratoires demandeurs.

Plus précisément, le présent rapport :

- 1) contient des recommandations de bonne pratique, par opposition à une norme;
- 2) résume les éléments à documenter lors de la validation analytique d'une analyse de séquençage par la méthode de Sanger (« séquençage de Sanger » dans la suite du document) élaborée localement ou provenant d'une trousse non homologuée (voir le tableau 1 concernant la définition des tests conçus en laboratoire);
- 3) vise les applications du séquençage de Sanger spécifiques à un ou plusieurs gènes ou régions de gènes pour lesquels il est nécessaire de procéder à une validation analytique complète;
- 4) s'applique à la recherche de variations pathogéniques constitutives, par exemple dans les cas de maladie héréditaire, ou de variations pathogéniques acquises, par exemple en oncologie. Les situations suivantes sont abordées :
 - confirmation ou exclusion d'une variation nucléotidique de séquence,
 - caractérisation d'une ou de plusieurs régions définies du génome;
- 5) propose, lorsque cela est pertinent, un devis expérimental permettant de quantifier chaque élément avec une exactitude statistiquement satisfaisante selon le Comité scientifique des analyses de biologie médicale (CSABM) de l'INESSS.

Par contre, ce rapport ne concerne pas :

- 1) la validation analytique générique du séquençage de Sanger pour le compte d'un laboratoire souhaitant offrir des tests de séquençage de type « séquençage de variations pathogéniques familiales », c'est-à-dire le séquençage ponctuel ciblant, pour chaque famille, des variations pathogéniques différentes et ne pouvant pas faire, chaque fois, l'objet d'une validation analytique complète;
- 2) la vérification analytique de tests dont la performance analytique est établie et disponible, c'est-à-dire les troussees commerciales homologuées par Santé Canada;
- 3) d'autres techniques moléculaires, dont le séquençage de nouvelle génération (SNG), lequel est abordé dans un autre document de l'INESSS.

Enfin, les recommandations contenues dans ce rapport ne doivent pas être considérées comme :

- 1) des normes ou des exigences minimales servant à accepter ou à refuser un dossier de validation analytique pour une analyse, parce que les recommandations qui y sont faites ne sont pas nécessairement applicables à toutes les situations. Différents types de contraintes sont susceptibles d'empêcher un laboratoire, pour une analyse donnée, de réaliser toutes les mesures proposées ici, par exemple le nombre d'échantillons cliniques reconnu comme étant une bonne pratique.

2. MÉTHODE

L'INESSS a mis sur pied un groupe de travail dont le mandat a consisté à proposer au CSABM un cadre de référence sur la validation analytique des techniques de diagnostic moléculaire, dont le séquençage de Sanger. Plus précisément, le groupe de travail a réalisé une revue de la littérature sur le sujet, soit les recommandations existantes, il a élaboré la liste des éléments devant faire partie de la validation analytique et a défini, concernant chaque élément, les critères, les paramètres et les informations requises en matière de validation analytique dans un contexte d'analyse de diagnostic moléculaire.

3. PRÉAMBULE

La validation analytique d'un test de laboratoire exige de fournir les preuves procurant un degré élevé d'assurance que ce dernier performera toujours comme attendu selon son utilisation prévue [CAP, 2015; CLSI, 2012a].

Une « validation analytique » exhaustive doit être effectuée relativement à tout nouveau test conçu localement en laboratoire ou TCL (en anglais *Laboratory Developed Test* ou LDT) avant d'être utilisé en contexte diagnostique ou clinique [CSA, 2018; ISO, 2014].

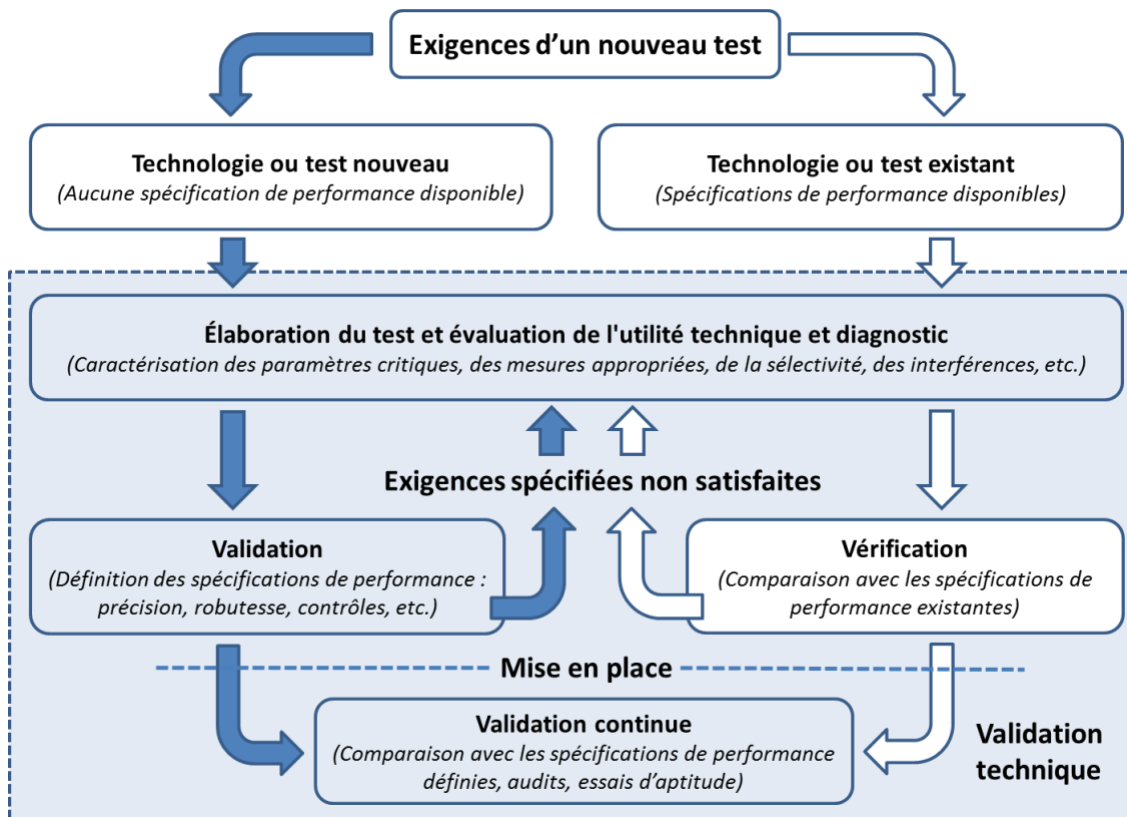
Tableau 1 Tests conçus en laboratoire (TCL)

Situations d'application	Précisions
Test élaboré à partir des principes premiers (de novo)	Le laboratoire ou le réseau de laboratoires est responsable de la conception et de la réalisation de l'essai.
Test conçu ou modifié à partir d'une source publiée ou d'une autre source :	i) conformément à la littérature scientifique ii) à partir des spécifications de conception; un TCL produit par un autre laboratoire iii) à partir des spécifications de conception de toute autre source
Test constitué d'un assemblage de composantes disponibles sur le marché ou de réactifs spécifiques à l'analyte	Sans objet
Test utilisé à une autre fin que celle prévue par le fabricant	Les dispositifs de diagnostic in vitro (DDIV) doivent être considérés comme un TCL si : i) l'utilisation prévue est différente de celle déclarée par le fabricant; ii) un composant physique du DDIV commercial est modifié, remplacé ou enlevé; iii) l'essai n'est pas utilisé conformément aux directives du fabricant.

Source : CSA-2018 (Exigences relatives à la conception, au développement et à la validation des tests conçus en laboratoire et utilisés pour le dépistage, le diagnostic et la prise en charge des affections cliniques).

Dans le cas d'une analyse ayant déjà fait l'objet d'une validation analytique et dont la performance analytique a été établie (trousse commerciale homologuée, analyse déjà validée localement à laquelle des modifications mineures ont été apportées), on ne parle pas de « validation analytique », mais plutôt de « vérification analytique » (voir la section 7.1). La figure 1 ci-dessous présente le processus de mise en place d'un nouveau test diagnostique, y compris les exigences concernant la validation ou la vérification du test en fonction de la disponibilité ou non des spécifications de performance appropriées [Mattocks *et al.*, 2010].

Figure 1 Processus de mise en place d'un test de génétique moléculaire aux fins d'une utilisation en diagnostic médical



Source : Schéma adapté de celui publié par Mattocks et ses collaborateurs [2010].

Bien que les différents organismes règlementaires et professionnels s'entendent sur la nécessité d'effectuer la validation ou la vérification analytique des tests par séquençage, les critères, les paramètres et les exigences minimales requises diffèrent d'un organisme à un autre.

Les différentes étapes et les principaux critères et paramètres nécessaires à la validation des essais effectués par séquençage de Sanger abordés dans le présent document réfèrent notamment aux publications suivantes :

Organisme ayant des comités de rédaction internationaux et une reconnaissance internationale :

- Documents publiés par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [CSA, 2018; CLSI, 2014; CLSI, 2012a; CLSI, 2012b; CLSI, 2008]

Associations professionnelles (ou de chercheurs) :

- Document publié par l'Association for Clinical Genetic Science (ACGS)¹ [Ellard et al., 2016]
- Article de l'EuroGentest Validation Group, publié par Mattocks et ses collaborateurs [2010]

¹ Anciennement la Clinical Molecular Genetics Society (CMGS) au Royaume-Uni.

- Article du Biochemical and Molecular Genetic Resource Committee du College of American Pathologists (CAP), publié par Pont-Kingdon et ses collaborateurs [2012]
- Article du groupe de travail Nex-StoCT, publié par Gargis et ses collaborateurs [2012]

Ce document présente aussi certaines recommandations concernant le nombre d'échantillons requis pour effectuer la validation analytique et relatives aux différentes étapes de la planification préanalytique et postanalytique.

4. OBJECTIF DE PERFORMANCE RECOMMANDÉ PAR LE GROUPE DE TRAVAIL

Le groupe de travail a établi, dès le début de ses travaux, que l'objectif de performance d'un test de séquençage d'ADN devrait être de produire une erreur dans la séquence rapportée moins de 1 fois pour 100 rapports-patients (< 1 % des rapports). Cela signifie que pour obtenir un taux d'erreur de moins de 1 % des rapports, le taux d'erreur à chaque position de la séquence doit être inférieur à 1 % divisé par la longueur totale de la séquence [Rousseau *et al.*, 2009]. Des informations détaillées sont fournies dans la section 7.3 du présent document.

5. UTILISATION CLINIQUE ET TYPE D'ANALYSE

5.1. Utilisation clinique du séquençage de Sanger

Le séquençage de Sanger est considéré comme la méthode de référence (*gold standard*) pour la détection de petites variations de séquence dans l'ADN [Pont-Kingdon *et al.*, 2012; Mattocks *et al.*, 2010]. Le séquençage est souvent utilisé pour l'analyse de gènes reconnus comme étant la cible d'un grand nombre de variations pathogéniques individuelles spécifiques à une famille, à un syndrome ou à une maladie (hétérogénéité génétique). Il est généralement utilisé en génétique héréditaire et somatique. Une description de la technique de séquençage de Sanger est présentée dans l'annexe A.

Les variations nucléotidiques détectées par séquençage de Sanger sont des substitutions de nucléotides ou de courts indels² [ACMG, 2008]. La détection de grandes délétions, insertions, duplications ou inversions nécessite l'emploi d'autres techniques moléculaires telles que l'amplification multiplexe de sonde dépendante d'une ligature (en anglais *multiplex ligation-dependent probe amplification* ou MLPA), l'hybridation génomique comparative (en anglais *comparative genomic hybridization* ou CGH) ou des techniques de séquençage de nouvelle génération ou SNG (en anglais *next generation sequencing* ou NGS) [INCa, 2014; ACMG, 2008].

² Indel, ou insertion-délétion, est un type de variation génétique dans laquelle une séquence nucléotidique spécifique est présente (insertion) ou absente (délétion).

5.2. Type d'analyse

La recherche d'une variation pathogénique par séquençage de Sanger est considérée comme une méthode qualitative, à savoir que, à chaque position de la séquence analysée, seules quatre catégories de résultat sont possibles, soit les quatre bases nucléotidiques de l'ADN (A, C, G et T). Il s'agit de détecter la présence d'une variation qualitative de séquence nucléotidique par rapport à une séquence de référence [INCa, 2014; Mattocks *et al.*, 2010]. Ainsi, en règle générale, un nucléotide concordant à la séquence de référence humaine est considéré comme « normal » et les trois autres nucléotides possibles à une position sont considérés comme des « variations nucléotidiques ». Étant donné la nature diploïde du génome humain, trois profils différents peuvent être déterminés pour toute variation constitutionnelle de séquence, soit l'homozygote normal (séquence de référence), la variation nucléotidique hétérozygote et l'homozygote. La détermination du profil homozygote, hémizyote (présence d'un seul allèle au lieu de deux) ou hétérozygote d'une variation nucléotidique se fait en fonction de la détection ou non de l'allèle normal et de l'allèle pathologique, et ce, en considérant le mode de transmission. Le tableau 2 ci-dessous présente les différents résultats et profils génétiques associés, pouvant être obtenus par séquençage de Sanger.

Tableau 2 Résultat et profil génétique pouvant être obtenus à la suite de l'analyse de l'ADN par séquençage de Sanger

Nucléotide de référence	Variation nucléotidique	Résultat (profil)
Présent (+)	Absente (-)	Négatif (homozygote normal ou hémizyote normal)
Présent (+)	Présente (+)	Positif (hétérozygote)
Absent (-)	Présente (+)	Positif (homozygote muté ou hémizyote)

Source : Tableau inspiré de celui publié par l'Association nationale des praticiens de génétique moléculaire [ANPGM, 2012].

En séquençage, les deux types suivants d'investigation peuvent être considérés [Ellard *et al.*, 2016] :

- 1) la confirmation ou l'exclusion d'une variation nucléotidique connue (génotypage);
- 2) la caractérisation d'une région définie de l'ADN (dépistage de variations pathogéniques).

Selon l'ACGS, ces deux méthodes ne sont pas équivalentes en ce qui concerne les exigences et les normes de qualité : alors que le génotypage concerne uniquement l'analyse de variations nucléotidiques précédemment détectées, la caractérisation complète d'une région de l'ADN implique que chaque base soit déterminée à un degré de confiance élevé [Ellard *et al.*, 2016]. À cette fin, une estimation de la probabilité d'erreur de l'appel de chaque base de la séquence obtenue doit être effectuée lors de la validation du test, et comme contrôle de qualité lors de chaque essai. Cette probabilité est définie par une valeur de qualité et sera abordée plus longuement dans la section 7.2 du présent document.

6. PLANIFICATION PRÉANALYTIQUE

Selon les normes ISO 15189 et CSA-2018, toute validation analytique d'un test nécessite une planification préanalytique. Cette dernière comporte les étapes suivantes :

1. Devis et conception du test
 - Définir ce que la méthode doit réaliser.
 - Spécifier les éléments de la méthode, soit :
 - la validité scientifique du test (validité et utilité clinique)
 - l'usage prévu du test (critères, population)
 - les méthodes de comparaison (ex. : méthode de référence)
2. Élaboration du plan directeur de validation (*master validation plan*)

Le plan directeur de validation doit définir, préalablement à l'étape de la validation de la méthode, les objectifs de la méthode et les critères de validation analytique.

3. Données sur la qualité (quatre éléments essentiels à réaliser) :
 - qualification des instruments analytiques;
 - validation des méthodes analytiques;
 - tests de conformité des systèmes;
 - vérifications de contrôle de qualité (qualité des réactifs, certificats d'analyse);
 - évaluation de risque à chaque étape de la validation analytique.

En particulier, pour une analyse de type séquençage de Sanger, les éléments suivants sont également essentiels :

- détermination de la séquence de référence;
- conception et choix des amorces;
- détermination du matériel de référence et des échantillons cliniques témoins.

Ces différentes étapes sont résumées dans les sections suivantes.

6.1. Détermination de la séquence de référence

La séquence de référence doit être la plus récente et devrait être obtenue du National Center for Biotechnology Information (NCBI)³ ou du répertoire Ensembl⁴, et idéalement provenir du Locus Reference Genomic (LRG)⁵ [Ellard *et al.*, 2016]. Si aucune séquence du LRG n'est disponible, l'ACGS recommande d'utiliser les séquences RefSeq⁶, parce qu'elles seraient plus complètes et mieux annotées que d'autres séquences GenBank^{MC}, en plus de ne pas être redondantes (une seule séquence par gène ou isoforme) [Ellard *et al.*, 2016]. La possibilité que d'autres transcrits pertinents, sur le plan biologique, et de pseudogènes existent doit être prise en considération [Ellard *et al.*, 2016; Pont-Kingdon *et al.*, 2012].

Dans un deuxième temps, les régions du gène à analyser doivent être déterminées. La description de ces régions, y compris les variations pathogéniques connues, ou l'analyse des régions plus susceptibles de comporter une variation nucléotidique, soit des points chauds (*hot spot*), peuvent permettre de définir les intervalles de référence (*reference range*) et de mesure (*reportable range*) de l'analyse moléculaire [Pont-Kingdon *et al.*, 2012].

Lorsque des données concernant la distribution des variations pathogéniques ne sont pas disponibles, le College of American Pathologists (CAP) recommande que tous les exons incluant 20 à 50 nucléotides des séquences introniques flanquantes soient analysés [Pont-Kingdon *et al.*, 2012]. Pour sa part, l'ACGS indique que la couverture minimale inclut les régions codantes du gène (exons), les sites d'épissage conservés ainsi que les 10 premiers nucléotides des séquences introniques situées en amont et en aval de chacun des exons [Ellard *et al.*, 2016; Ellard *et al.*, 2009]. Le séquençage des régions promotrices, des régions non traduites en 3' telles que les sites de polyadénylation et les régions introniques peuvent présenter un intérêt si les variations pathogéniques contenues dans ces régions sont bien caractérisées [Ellard *et al.*, 2016; Pont-Kingdon *et al.*, 2012]. Précisons que l'assignation d'une probabilité de pathogénicité aux variations introniques éloignées de la frontière intron-exon est difficile et incertaine. Les variations plus éloignées que 10 nucléotides en amont et en aval des exons ne sont généralement pas rapportées⁷.

³ National Center for Biotechnology Information (NCBI) [site Web], disponible à : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (consulté le 13 septembre 2018).

⁴ Ensembl. GRCh37 [site Web], disponible à : https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index (information fournie par le Dr Jean-François Soucy, 6 mars 2019).

⁵ Les séquences du RefSeq (*Reference Sequence*) sont des copies de génomes, disponibles sur GeneBank^{MC}, qui sont sélectionnées et assemblées. Les transcrits et les protéines RefSeq sont générés par des méthodes qui comprennent des calculs informatiques, une édition manuelle de contenu et la propagation de génomes annotés soumis aux membres de l'International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC). Locus Reference Genomic (LRG) [site Web], disponible à : <http://www.lrg-sequence.org/> (consulté le 13 septembre 2018).

⁶ RefSeq: NCBI Reference Sequence Database [site Web], disponible à : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/> (consulté le 13 septembre 2018).

⁷ Information fournie par le Dr Jean-François Soucy (6 mars 2019).

6.2. Conception et choix des amorces

Le choix et la conception des amorces peuvent se faire en utilisant des logiciels conçus à ces fins. Il est nécessaire de s'assurer de la spécificité des amorces à la séquence d'intérêt. La spécificité peut être vérifiée à l'aide d'un outil de comparaison de séquence d'ADN, notamment le programme BLAST du NCBI⁸. Les amorces comportant une homologie avec d'autres gènes ou pseudogènes doivent être évitées, parce qu'elles pourraient être à l'origine de faux positifs [Ellard *et al.*, 2016; Pont-Kingdon *et al.*, 2012]. Le produit de l'amplification en chaîne par polymérase ou PCR⁹ obtenu à l'aide des amorces devrait être examiné par électrophorèse sur gel, par ou une autre méthode, pour détecter les amplifications non spécifiques qui peuvent affecter la qualité de la réaction de séquençage [Ellard *et al.*, 2016; Pont-Kingdon *et al.*, 2012].

La séquence des amorces doit être comparée à celles présentes dans des bases de données de polymorphisme nucléotidique (PN), plus précisément le polymorphisme d'un seul nucléotide ou PSN (en anglais *single nucleotide polymorphism* ou SNP), telles que dbSNP¹⁰ du NCBI et SNPCheck¹¹, pour éviter les régions polymorphes connues [Ellard *et al.*, 2016; Pont-Kingdon *et al.*, 2012; Mattocks *et al.*, 2010]. La présence de PSN au site d'appariement d'une amorce pourrait être à l'origine de faux négatifs attribuables à l'amplification préférentielle d'un allèle par rapport à un autre (en anglais *allele dropout* ou ADO) [Pont-Kingdon *et al.*, 2012]. Par exemple, une insertion, une délétion ou une substitution de base située dans les 5 dernières paires de bases (pb) de l'extrémité 3' du site de liaison de l'amorce risque d'empêcher l'amplification et doit être évitée [Ellard *et al.*, 2016].

Selon l'étude de Blais et ses collaborateurs, 94 % des amplifications préférentielles d'allèles sont dues à des causes stochastiques et ne se reproduisent pas lors de la réalisation d'une réplique de la réaction d'amplification [Blais *et al.*, 2015]. Cette étude a également montré que le taux d'amplification allélique préférentielle varie considérablement d'un locus à un autre dans le génome et ne peut être prédit à partir des séquences des amorces utilisées. Il est donc important que la conception de l'analyse vise à réduire au minimum ce phénomène, à défaut de le mesurer pour chaque amplicon. Des amplicons utilisant deux paires d'amorces complètement différentes, la réalisation des PCR en double et le séquençage bidirectionnel concordant en s'assurant de la détection d'au moins une position hétérozygote sont tous des moyens qui permettent de réduire le risque de perte allélique [Blais *et al.*, 2015].

⁸ Un outil, de la série Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) du NCBI, qui permet de concevoir les amorces. Primer-BLAST – A tool for finding specific primers [site Web], disponible à : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (consulté le 13 septembre 2018).

⁹ L'abréviation anglaise *PCR* est la façon la plus courante de désigner ce concept, tant en anglais qu'en français.

¹⁰ NCBI. dbSNP [site Web], disponible à : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> (consulté le 6 octobre 2018).

¹¹ GeneTools. SNPCheck [site Web], disponible à : <https://secure.ngri.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm> (consulté le 13 octobre 2018).

6.3. Détermination du matériel de référence et des échantillons cliniques témoins

Selon le CLSI, la validation analytique est effectuée à l'aide de matériel de référence et d'échantillons cliniques témoins [CLSI, 2012a].

Le matériel de référence peut être constitué d'échantillons issus d'une population dite « normale » et d'une population qui présente les variations nucléotidiques pertinentes. Concernant cette dernière, le matériel de référence devrait contenir les variations nucléotidiques de la population d'intérêt ou qui sont observées dans un contexte similaire à celui de la population d'intérêt [CLSI, 2014].

Les échantillons cliniques témoins doivent être inclus à titre de témoins internes positif et négatif lors de la validation analytique du test et dans chaque analyse de routine pour détecter les erreurs possibles de préparation des échantillons ainsi que les échecs de réaction d'amplification ou de séquençage. Les échantillons utilisés comme témoins doivent être du même type que ceux qui seront analysés dans le cadre clinique, et la méthode d'extraction de l'ADN doit, dans la mesure du possible, être la même que celle utilisée par le laboratoire clinique qui effectuera le test [Pont-Kingdon *et al.*, 2012].

Le nombre, le type et la variété des échantillons cliniques utilisés lors de la validation doivent être adéquats, de manière à s'assurer que les résultats pourront être interprétés selon les caractéristiques de la population ciblée par le test et que les limites de ce dernier sont connues (le nombre d'échantillons est abordé dans la section 7.5 du présent document). Le tableau 3 qui suit présente quelques considérations et recommandations du CLSI concernant le matériel de référence et les échantillons cliniques témoins utilisés lors de la validation d'un test de génétique moléculaire [CLSI, 2012a].

Tableau 3 Considérations et recommandations du CLSI concernant le matériel de référence et les échantillons cliniques témoins utilisés lors de la validation d'un test de génétique moléculaire

Échantillons	Considérations et recommandations
Matériel de référence	<p>Le CLSI recommande de considérer la provenance du matériel de référence selon l'ordre d'importance décroissant suivant :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. matériel de référence certifié, lorsque celui-ci est disponible; 2. échantillons testés par un laboratoire de référence accrédité; 3. échantillons testés par un laboratoire sous-traitant accrédité; 4. échantillons testés par une méthode reconnue et fiable.
Échantillons cliniques témoins	<ul style="list-style-type: none"> • Nombre adéquat • Type représentatif des échantillons qui seront analysés (sang, frottis buccal, tissu frais ou congelé, tissu enrobé de paraffine, etc.) • Variété représentative de la population ciblée (sexe, âge, ethnicité, état de santé et autres caractéristiques pertinentes) • Variété représentative de tous les résultats possibles (variations nucléotidiques, variations pathogéniques faux sens ou non-sens, indel, site d'épissage, variation du nombre de copies, etc.)

Source : CLSI, 2012a.

Précisons qu'en raison de la réticulation de l'ADN causée par le formaldéhyde, le séquençage effectué à partir d'ADN extrait de tissus fixés au formol et enrobés de paraffine est plus sensible aux artéfacts susceptibles d'être la cause de faux positifs. Ce type d'échantillon est souvent utilisé dans le domaine de l'oncologie. Le séquençage bidirectionnel est essentiel lorsque ce type de tissu est analysé par séquençage de Sanger [Ellard *et al.*, 2016; CAP, 2015].

6.4. Type d'échantillon clinique

Le choix de l'échantillon clinique utilisé pour le séquençage doit être guidé par le type de variation nucléotidique recherché, soit les variations constitutives (germinales) ou somatiques. Comme le séquençage de Sanger présente des limites techniques quant à la détection de variations en mosaïque ou clonales, la sélection et le traitement approprié de la source d'ADN sont essentiels à la validité de l'analyse et à son interprétation. L'échantillon de sang comme source de cellules leucocytaires constitue le matériel biologique généralement utilisé pour la recherche de variations nucléotidiques constitutives [CLSI, 2014]. Toutefois, dans la recherche de variations nucléotidiques somatiques ou en mosaïque, d'autres types de matériel biologique doivent être utilisés, tels qu'un échantillon de tissu tumoral ou de moelle osseuse [CLSI, 2012b].

Lors de l'analyse de tissu tumoral par séquençage de Sanger, le laboratoire doit préalablement déterminer la limite minimale de détection (LOD, de l'anglais *limit of detection*) [CLSI, 2012b] pour garantir une sensibilité adéquate et réduire les risques de

faux négatif. Le pourcentage de cellules tumorales présentes dans l'échantillon analysé doit également être documenté¹².

7. VALIDATION ANALYTIQUE

La validation analytique peut être divisée en trois grandes étapes [CSA, 2018], comme suit :

1. Essais préliminaires

Ces essais devraient permettre d'acquérir l'expérience technique nécessaire pour réaliser le test, permettre de déterminer les éléments critiques pouvant affecter la performance du test ainsi que les limites et les mesures de contrôle nécessaires à considérer.

2. Analyse des performances

La performance de la méthode doit être évaluée selon tous les critères mentionnés dans l'annexe B du présent document.

3. Vérification ou validation des logiciels

Si un ou des logiciels sont utilisés à quelque moment au cours de la validation (étapes préanalytique, analytique et postanalytique), ils doivent faire l'objet d'une **vérification** (dans le cadre de la validation du test) s'ils sont déjà homologués par Santé Canada. Les logiciels commercialisés portant la désignation « Recherche uniquement » ou les logiciels autorisés, utilisés pour un usage différent de celui indiqué par le fabricant, devraient faire l'objet d'une **validation** par le laboratoire.

7.1. Particularités du séquençage de Sanger

En séquençage, les données de validation peuvent être utilisées pour évaluer l'exactitude de la technologie (ex. : méthode de séquençage pour la détection de variations pathogéniques) ou d'un test en particulier (ex. : séquençage pour la détection de variations pathogéniques dans le gène *BRCA1*) [Mattocks *et al.*, 2010]. Selon le CLSI, la validation de la méthode ne suffit pas à démontrer que le séquençage est capable de détecter toutes les variations nucléotidiques associées à une maladie en particulier. Une validation adaptée à l'application pour laquelle le séquençage sera utilisé doit être également entreprise. Dans le cas du séquençage de Sanger, cela nécessite généralement une démonstration que les variations nucléotidiques qui sont pertinentes sur le plan clinique peuvent être détectées à l'aide du nouveau test [CLSI, 2014]. Toutefois, il a été proposé d'utiliser une approche de validation globale approfondie de la méthode, complétée par des expériences de validation additionnelles moins exhaustives, spécifiques aux différents gènes, exons ou marqueurs à étudier, et de s'assurer que les critères de qualité, concernant notamment la qualité de la séquence produite, sont satisfaits [CLSI, 2014; INCa, 2014; Mattocks *et al.*, 2010].

¹² Information fournie par la Dre Isabelle De Bie (28 février 2019).

Cette façon de faire, proposée notamment par Mattocks et ses collaborateurs [2010], s'appuie sur le fait qu'en général, la méthode de validation implique d'évaluer la performance du test en comparaison à une méthode de référence capable de déterminer, hors de tous doutes, le statut positif ou négatif de l'échantillon. Comme le séquençage de Sanger est la méthode de référence pour la détection et la caractérisation de variations nucléotidiques dans l'ADN, il est souvent impossible d'élaborer une référence appropriée pour la validation comparative de nouveaux tests de séquençage. Aussi, le séquençage diffère de la plupart des autres types d'analyses moléculaires du fait qu'il cible et investigate une multitude d'analytes, soit des centaines de nucléotides individuels lors d'un même essai [CAP, 2015]. De ce fait, la sensibilité et la spécificité analytiques d'un test de séquençage sont difficiles à déterminer de façon rigoureuse en raison de l'absence de témoins positifs pour chaque base potentiellement mutée [INCa, 2014]. De plus, l'accumulation de données statistiquement significatives n'est pas toujours possible, notamment dans le cas de l'analyse de maladies rares [Mattocks *et al.*, 2010; Jennings *et al.*, 2009; Maddalena *et al.*, 2005].

Pour ces raisons, Mattocks et ses collaborateurs [2010] recommandent que la validation soit plutôt abordée comme une vérification, c'est-à-dire s'assurer que le séquençage sera effectué selon les normes établies, dans le contexte du nouveau test. Selon les auteurs, les facteurs à considérer devraient inclure ce qui suit :

- la confirmation que le nouveau test cible spécifiquement la région d'intérêt (ex. : vérifier la spécificité des amorces pour la séquence d'intérêt, ainsi qu'elle est recommandée à l'étape de planification préanalytique);
- la confirmation que les deux allèles sont amplifiés de façon fiable (ex. : veiller à ce qu'aucun PSN ne soit situé dans les sites de liaison des amorces, également recommandée à l'étape de la planification préanalytique) et;
- la confirmation que les données de séquençage générées sont de bonne qualité sur l'ensemble de la région d'intérêt (ex. : en vérifiant la valeur Phred, qui sera abordée dans la section suivante).

Dans le cas particulier des maladies rares, où l'accessibilité des échantillons cliniques pertinents est difficile, l'accumulation de données dans le temps est un aspect important de la validation initiale d'un test, laquelle peut être utilisée pour l'amélioration continue de l'évaluation de l'exactitude et de la qualité du test [Mattocks *et al.*, 2010; Jennings *et al.*, 2009; Maddalena *et al.*, 2005].

7.2. Évaluation de la qualité des données obtenues par séquençage de Sanger

Dans une analyse impliquant le séquençage, les faux positifs (détection d'une variation pathogénique qui n'existe pas) et les faux négatifs (défaut de détection d'une variation pathogénique présente) peuvent être la conséquence de la qualité insuffisante des profils de séquençage [Mattocks *et al.*, 2010]. Il est donc nécessaire d'évaluer systématiquement la qualité de la séquence obtenue de toutes les réactions et de s'assurer qu'elle répond aux exigences. De plus, comme il a été mentionné précédemment, la sensibilité et la spécificité analytiques d'un test de séquençage sont difficiles à déterminer de façon

rigoureuse en raison de l'absence de témoins positifs pour chaque base potentiellement mutée. Ces paramètres peuvent cependant être évalués par la valeur de qualité ou VQ, score Phred ou autre, de chaque base déterminée [INCa, 2014].

La VQ, notamment le score Phred¹³, permet d'évaluer la probabilité que l'assignation de la base soit juste. Elle est exprimée en \log_{10} de probabilité d'erreur (voir le tableau 4 ci-dessous). Elle sert d'outil pour évaluer la spécificité et la sensibilité analytiques de la méthode ainsi que l'exactitude de l'appel de chacune des bases sur l'ensemble de la séquence investiguée lors d'un test de séquençage. Elle tient compte notamment de l'intensité du signal, du bruit de fond et du rapport entre le signal et le bruit de fond [Ellard *et al.*, 2016; CLSI, 2014].

Tableau 4 Correspondance entre la valeur de qualité obtenue et la probabilité d'erreur de l'appel de la base

Valeur de qualité*	Probabilité d'un appel de base erroné	Certitude de l'appel de la base
10	1 / 10 (10 %)	90 %
20	1 / 100 (1 %)	99 %
30	1 / 1 000 (0,1 %)	99,9 %
40	1 / 10 000 (0,01 %)	99,99 %
50	1 / 100 000 (0,001 %)	99,999 %

Source : Informations tirées et adaptées de celles publiées par le CLSI [2014].

* Les valeurs de qualité entre les différentes plateformes de séquençage de Sanger sont comparables. Toutefois, le score Phred est le plus utilisé; il est devenu la norme dans l'évaluation de l'appel des bases en séquençage de Sanger [Gargis *et al.*, 2012].

Outre le score Phred, l'intensité du signal, le rapport entre le signal et le bruit de fond ou rapport signal sur bruit ou RSB (en anglais *signal to noise ratio* ou SNR) ainsi que la proportion de bases au-dessus d'une certaine VQ sont quelques exemples de paramètres utilisés dans l'évaluation de la qualité des résultats de séquençage [Ellard *et al.*, 2016; INCa, 2014; Gargis *et al.*, 2012; Pont-Kingdon *et al.*, 2012]. Quelques recommandations d'organismes professionnels et règlementaires, concernant les critères de qualité de la séquence obtenue lors d'une analyse de séquençage de Sanger, sont présentées dans le tableau 5. Notamment, le bruit de fond ne devrait pas excéder 5 % de l'intensité du pic majeur, se traduisant par un RSB de 20. En règle générale, un score Phred, ou une autre VQ, supérieur à 20 dans le cas du séquençage bidirectionnel (exactitude de l'appel de la base individuelle de 99 %) et supérieur à 30 dans le cas du séquençage unidirectionnel¹⁴ (exactitude de 99,9 %) est considéré comme acceptable par la majorité des organismes. Pour sa part, le CLSI recommande un score Phred supérieur ou égal à 40 (exactitude de 99,99 %).

¹³ Programme d'appel des bases indépendant de la position du nucléotide dans la séquence, des conditions d'exécution de l'appareil ou de la chimie de séquençage, permettant d'évaluer les possibilités que l'appel de la base soit erroné [Ewing et Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998].

¹⁴ Le séquençage unidirectionnel ne constitue pas une pratique recommandée (précision apportée par le Dr Jean-François Soucy, 6 mars 2019).

Tableau 5 Recommandations d’organismes professionnels et réglementaires concernant l’évaluation de la séquence obtenue lors de la validation analytique et lors des contrôles de qualité de routine d’un test clinique effectué par séquençage de Sanger

Organisme [Référence]	Paramètres d’estimation de la qualité de la séquence			
	Score PHRED ou autre VQ		Intensité du signal (UFR)	RSB
	bidirectionnel	unidirectionnel *		
CLSI [2014]	≥ 40		n. d.	20 (Le bruit de fond ne devrait pas excéder 5 % du pic majeur)†
CAP [CAP, 2015; Pont-Kingdon <i>et al.</i> , 2012]	90 % VQ ≥ 20		1 000 à 10 000	20†
ACGS [Ellard <i>et al.</i> , 2016]	≥ 20	≥ 30	n. d.	Le bruit de fond moyen ne devrait pas excéder 5 % de l’intensité du pic majeur
INCa [2014]	≥ 20	≥ 30	> 200 > 4 000	Doit être reproductible entre les séquences

Abréviations : % VQ 20 + : pourcentage des bases ayant une valeur de qualité supérieure à 20; ACGS : Association for Clinical Genetic Science (Royaume-Uni); CAP : College of American Pathologists (États-Unis); CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute (États-Unis); INCa : Institut National du Cancer (France); n. d. : donnée non disponible; VQ : valeur de qualité; RSB : rapport du signal sur bruit; UFR : unité de fluorescence relative

* Le séquençage unidirectionnel ne constitue pas une pratique recommandée (précision apportée par le Dr Jean-François Soucy, 6 mars 2019).

† Rapporté par Pont-Kingdon et ses collaborateurs [2012] selon une version antérieure (2004) du document MM09 du CLSI.

En ce qui concerne l’utilisation du séquençage de Sanger relativement à la confirmation ou à l’exclusion d’une variation pathogénique connue (génotypage), ces critères de qualité doivent être satisfaits pour un minimum de 10 bases situées de chaque côté de la variation pathogénique recherchée, et pour un minimum de 10 bases situées en amont d’une insertion ou d’une délétion connue [Ellard *et al.*, 2016].

Pour ces raisons, le résultat produit par le séquençage direct doit être vérifié et contrôlé à plusieurs reprises, et ce, tant à l’étape du séquençage proprement dit, que lors de l’interprétation de l’information qui en découle [ACMG, 2008]. Dans le but d’augmenter la sensibilité de la détection d’une substitution hétérozygote, les substrats et les enzymes utilisés devraient être choisis et testés de manière à produire des pics de signaux de séquençage d’intensité uniforme. Le séquençage bidirectionnel de la matrice d’ADN est recommandé pour favoriser une sensibilité et une spécificité maximales [ACMG, 2008].

Les principales étapes de l'évaluation de l'appel des bases et de la qualité de la séquence sont les suivantes :

- Évaluation de la qualité globale de la réaction de séquençage : La qualité globale de la réaction de séquençage doit être surveillée. En effet, les électrophorogrammes de mauvaise qualité peuvent contenir des artéfacts (arrêts, compression des bases ou indétermination des bases) difficiles à analyser, ce qui peut entraîner une erreur d'interprétation des données de séquence. Tous les efforts devraient être mis en œuvre pour réduire au minimum ces artéfacts. Le séquençage bidirectionnel de routine est un moyen de réduire les risques de mauvaise interprétation des données de séquence résultant de la présence d'artéfacts [ACMG, 2008].
- Élimination des artéfacts : L'utilisation d'une méthode de séquençage différente ou d'une polymérase différente pourrait résoudre le problème des artéfacts sur des régions spécifiques, et ce, en supposant que les mêmes artéfacts ne peuvent se produire aux mêmes endroits dans des conditions expérimentales différentes. Les critères actuellement disponibles incluent ce qui suit :
 1. La détermination du nombre de positions où l'appel automatique des bases est impossible [ACMG, 2008]
 2. La comparaison de chaque analyse avec une séquence de référence (par exemple GenBank^{MC}, LGR ou RefSeq) est requise et inclut une évaluation subjective de la hauteur des pics. Toutefois, la prudence est de mise parce que toutes les séquences disponibles sur les bases de données ne sont pas nécessairement exactes [Ellard *et al.*, 2016; ACMG, 2008].
 3. Une mesure objective de la qualité de l'appel des bases par l'analyse statistique de certaines variables pour produire une valeur de qualité (score Phred ou autre valeur) devrait être réalisée et évaluée de manière à documenter la qualité générale du résultat de séquence [Ellard *et al.*, 2016; ACMG, 2008].
- Révision manuelle : Une révision manuelle attentive des régions où l'appel automatique des bases semble avoir été plus difficile devrait être faite. Les électrophorogrammes issus du séquençage bidirectionnel devraient être vérifiés et la séquence consensus obtenue, comparée à une séquence de référence [ACMG, 2008].
- Comparaison avec un échantillon de référence : La comparaison des données de séquence avec celles, de qualité élevée, obtenues par l'analyse simultanée d'un échantillon de référence est également essentielle à la détermination juste des différences nucléotidiques [ACMG, 2008].
- Réduction du risque de perte allélique : La vérification des données de séquence obtenues avec celles issues de l'analyse du brin opposé et/ou d'une deuxième réaction de séquence indépendante (PCR différente) est recommandée pour diminuer significativement le risque de perte allélique. Certaines variations pathogéniques pourraient passer inaperçues si la réaction de séquence est réalisée dans une seule direction. Concernant le séquençage direct, un deuxième amplicon PCR, différent du premier, devrait être généré pour chaque deuxième réaction [ACMG, 2008].

7.3. Taux d'erreur du séquençage de Sanger

Le taux d'erreur associé au séquençage de Sanger est généralement de 0,001 % à 1 % à chaque nucléotide séquencé. Celui-ci peut être attribuable à une faible qualité des données de séquence (comme il est mentionné dans la section 7.2) ou aux erreurs introduites lors de l'amplification initiale de la région d'intérêt. Les erreurs produites lors de la PCR apparaissent dans les données de séquençage et constituent de fausses variations nucléotidiques qui peuvent brouiller l'analyse génétique et ainsi mener à un diagnostic erroné¹⁵. Des différences dans la méthodologie d'analyse, les conditions de réaction, les séquences utilisées comme matrices et les unités d'erreurs utilisées peuvent être à l'origine de différentes valeurs absolues de taux d'erreur [Potapov et Ong, 2017a; Potapov et Ong, 2017b]. En vue de réduire l'introduction de variations nucléotidiques *de novo* qui ne sont pas présentes dans l'ADN génomique, l'utilisation d'une polymérase fiable et de réactifs permettant l'amplification de longs fragments doit être priorisée [Rousseau *et al.*, 2009]. Ainsi, dans le choix d'une polymérase, il faut prendre en compte, entre autres, les éléments suivants : fiabilité, spécificité, stabilité et « processivité »¹⁶. Le tableau 6 présente le taux et les types d'erreurs produites par quelques polymérases disponibles sur le marché.

Tableau 6 Type et taux d'erreurs de différentes polymérases

Polymérase	Clones séquencés (nombre)	Paires de bases séquencées	Taux d'erreur (%)	Erreur, n (%)		
				Transition	Trans-version	Indels
Taq	65	$8,8 \times 10^4$	$3,0 \times 10^{-5}$	95 (95,96)	3 (3,03)	1 (1,01)
AccuPrime-Taq	75	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-5}$	17 (94,44)	1 (5,56)	0
KOD	70	$1,0 \times 10^5$	$7,6 \times 10^{-6}$	14 (87,50)	1 (6,25)	1 (6,25)
<i>Pfu</i> (cloné)	151	$2,0 \times 10^5$	$2,8 \times 10^{-6}$	11 (88,89)	2 (11,11)	0
Phusion	175	$2,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^{-6}$	11 (84,62)	0	2 (15,38)
<i>Pwo</i>	170	$2,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^{-6}$	10 (76,92)	0	3 (23,08)

Source : Informations tirées et adaptées de McInerney *et al.*, 2014.

D'autres événements, dont l'amplification préférentielle d'un allèle par rapport à un autre (en anglais *allelic drop-out* ou ADO) et l'amplification d'un allèle non présent (en anglais *allelic drop-in* ou ADI) peuvent être à l'origine de faux positifs ou de faux négatifs et ainsi fausser le diagnostic (voir le tableau 7).

¹⁵ Des mesures visant à éviter la contamination de l'environnement de travail devraient aussi être appliquées pour réduire le risque de production de résultats erronés [CLSI, 2014].

¹⁶ La « processivité » d'une polymérase réfère au nombre de nucléotides incorporés avant que celle-ci se dissocie du brin gabarit. Information adaptée du site Web de Biocompare, « Choosing the Right DNA Polymerase for PCR », disponible à : <https://www.biocompare.com/Bench-Tips/146243-Choosing-the-Right-DNA-Polymerase-for-PCR/> (consulté le 28 mars 2019).

Tableau 7 Type et taux d'erreurs menant à une mauvaise interprétation des représentations alléliques

Type d'erreur	Définition	Taux %
ADO	Absence de détection d'un allèle présent	0,302 (93/30 769)
ADI	Détection d'un allèle non présent	0,136 (42/30 769)
Échec de la PCR	Absence de détection des allèles	0,21 (263/123 076)

Source : Blais *et al.*, 2015.

Selon la division scientifique de l'International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), il est impératif que la méthode de séquençage soit bien caractérisée et robuste et que le taux moyen d'erreur par base soit connu (degré de certitude élevé). Lors d'un séquençage ciblé d'une position dans la séquence, le taux d'erreur ne devrait pas excéder 1 erreur toutes les 100 bases (ou 1 %) pour une même réaction d'amplification et de séquençage [Rousseau *et al.*, 2009]. Cependant, pour garantir un taux global d'erreur inférieur à 1 % dans une séquence de 1000 paires de bases (pb) en une seule lecture de séquence, le taux d'erreur pour chaque nucléotide devrait être inférieur à 1 pour 100 000 bases (= 0,00001). Lors d'un séquençage bidirectionnel, on obtient la même probabilité globale d'erreur (< 1 %) pour 1000 pb et un taux d'erreur par nucléotide de 0,1 % (VQ = 30; voir le tableau 8 ci-dessous).

Ainsi, la cible de 1 % d'erreur par rapport-patient se traduit différemment en ce qui concerne le taux d'erreur à une position donnée dans la séquence d'ADN, selon que l'on effectue un génotypage, soit la confirmation ou l'exclusion d'une variation nucléotidique connue, ou un dépistage de variations pathogéniques à détecter dans un locus donné, soit la caractérisation d'une région définie de l'ADN.

Tableau 8 Probabilité d'erreur (PE) globale, par rapport, par nombre de bases séquencées

Séquençage unidirectionnel* une fois (PE dans la séquence complète)						
PE (BASE INDIVIDUELLE)	NOMBRE DE BASES SÉQUENCÉES (GÉNOME DIPLOÏDE HUMAIN)					
PE moyenne	1 pb	100 pb	1 000 pb	1 Mb	Exome (2 x 30 Mb)	Génome (2 x 3 Gb)
0,01 (VQ : 20)	0,01	1	10	10 000	600 000	60 000 000
0,001 (VQ : 30)	0,001	0,1	1	1 000	60 000	6 000 000
0,0001 (VQ : 40)	0,0001	0,01	0,1	100	6 000	600 000
0,00001 (VQ : 50)	0,00001	0,001	0,01	10	600	60 000
Séquençage bidirectionnel concordant à 100 % (PE dans la séquence complète)						
PE (BASE INDIVIDUELLE)	NOMBRE DE BASES SÉQUENCÉES (GÉNOME DIPLOÏDE HUMAIN)					
PE moyenne	1 pb	100 pb	1 000 pb	1 Mb	Exome diploïde (2 x 30 Mb)	Génome diploïde (2 x 3 Gb)
0,01 (VQ : 20)	3,3E-05	3,3E-03	3,3E-02	3,3E+01	2 000	200 000
0,001 (VQ : 30)	3,3E-07	3,3E-05	3,3E-04	3,3E-01	20	2 000
0,0001 (VQ : 40)	3,3E-09	3,3E-07	3,3E-06	3,3E-03	0,2	20

Source : Rousseau *et al.* CCLM 2009 – IFCC Expert Committee on Molecular Diagnostics

Abréviations : Gb : gigabase, Mb : mégabase; pb : paire de bases; PE : probabilité d'erreur; VQ : valeur de qualité

* Le séquençage unidirectionnel ne constitue pas une pratique recommandée (précision apportée par le Dr Jean-François Soucy, 6 mars 2019).

Ainsi, le calcul de la probabilité d'un rapport erroné de séquençage, à savoir une erreur où que ce soit dans une séquence, est relativement simple et consiste à multiplier le taux d'erreur à chaque position de la séquence par le nombre total de nucléotides séquencés et faisant l'objet du rapport d'analyse [Rousseau *et al.*, 2009]. Les calculs présentés dans l'article cité concernent une séquence haploïde. Cependant, ils peuvent servir de base aux séquences réalisées sur un génome diploïde, où l'on doit séquencer les deux allèles de chaque région, donc deux fois plus d'ADN relativement à la longueur, et où l'on peut considérer chacun des deux allèles comme des régions différentes du génome. On doit de plus s'assurer que le risque de perte allélique est minimal et, lorsque cela est possible, en faire une estimation empirique.

7.4. Critères de performance à évaluer lors de la validation d'un test effectué par séquençage de Sanger

La validation analytique d'un test clinique comporte différents critères et varie en fonction du type d'analyse (quantitative, qualitative ou semi-quantitative), de la technologie utilisée, de la nature de l'atteinte ou de la maladie (héréditaire, acquise, rare, etc.) et de l'objectif visé par le test (dépistage, diagnostic ou confirmation) [CLSI, 2012a; Mattocks *et al.*, 2010]. Le tableau 9 ci-dessous présente les différents critères et paramètres de performance à évaluer lors de la validation analytique d'un test clinique par séquençage de Sanger, ainsi que leur définition adaptée au séquençage. Une description plus exhaustive de chacun des termes est également fournie dans l'annexe B du présent document.

Tableau 9 Définition des critères et des paramètres de performance à évaluer lors de la validation analytique d'un test clinique par séquençage de Sanger

Critère de performance	Définition*	Paramètres et considérations
Exactitude	Degré de concordance entre la séquence nucléotidique déterminée par le test et la séquence de référence	$VP + VN / (VP + FP + VN + FN)$
		Redondance : Les laboratoires font généralement un séquençage bidirectionnel ou une répétition indépendante du séquençage unidirectionnel† pour confirmer les résultats [Gargis <i>et al.</i> , 2012].
		Valeur de qualité de l'appel des bases (score Phred ou autre valeur) ‡ : représente l'exactitude de l'appel relativement à chacune des bases analysées.
Sensibilité analytique	Probabilité qu'un test détecte une variation de séquence lorsque celle-ci est présente	$VP / (VP + FN)$
		Valeur de qualité de l'appel des bases (score Phred ou autre valeur) ‡
Spécificité analytique	Probabilité qu'un test ne détecte pas une variation de séquence lorsqu'aucune n'est présente	$VN / (VN + FP)$
		Valeur de qualité de l'appel des bases (score Phred ou autre valeur) ‡
		Le taux de faux positif serait une meilleure mesure pour les essais de séquençage [Gargis <i>et al.</i> , 2012].
Précision	Degré auquel des analyses répétées d'un même échantillon donnent le même résultat Répétabilité (précision intra-essai) : degré auquel il est possible que la même séquence soit obtenue lorsqu'un échantillon de référence est séquençé à de multiples reprises dans les mêmes conditions. Reproductibilité (précision inter-essais) : degré auquel il est possible que la même séquence soit obtenue lorsque le séquençage est effectué par de multiples opérateurs, utilisant différents lots de réactifs et sur plus d'un instrument.	Valeur de qualité de l'appel des bases (score Phred ou autre valeur) ‡ : celle-ci doit être constante et respecter les critères de qualité minimaux.

Critère de performance	Définition*	Paramètres et considérations
Limite de détection	La fraction allélique minimale détectable dans un échantillon donné La plus faible valeur limite (pourcentage de mutants) permettant de distinguer un signal muté d'un signal non muté [§]	Applicable dans les cas de variations de séquences minoritaires tels que l'hétéroplasmie mitochondriale, le mosaïcisme, les échantillons tumoraux et l'ADN libre circulant foetal ou tumoral
Limite de quantification	La fraction allélique minimale mesurable avec une précision et une exactitude données dans un échantillon donné	Applicable dans les cas de variation de séquences minoritaires tels que l'hétéroplasmie mitochondriale, le mosaïcisme, les échantillons tumoraux et l'ADN libre circulant (foetal ou tumoral) ou des mesures quantitatives
Intervalle de mesure	Région du génome dans laquelle une séquence de qualité acceptable peut être obtenue par le test	Peut inclure la région interne d'un gène investigué, la région codante ou d'autres régions comportant un nombre limité de gènes, le profil (homozygote ou hétérozygote) d'une variation pathogénique.
Linéarité	Linéarité de l'estimation d'une fraction allélique ou d'une autre mesure quantitative	Applicable dans les cas de variation de séquences minoritaires tels que l'hétéroplasmie mitochondriale, le mosaïcisme, les échantillons tumoraux et l'ADN libre circulant (foetal ou tumoral) ou des mesures quantitatives
Biais	Erreur systématique dans l'estimation d'une fraction allélique ou d'une autre mesure quantitative	Applicable dans les cas de variation de séquences minoritaires tels que l'hétéroplasmie mitochondriale, le mosaïcisme, les échantillons tumoraux et l'ADN libre circulant (foetal ou tumoral) ou des mesures quantitatives
Recouvrement	Capacité de la méthode à détecter et à mesurer quantitativement une mesurande ajoutée dans une quantité connue à un échantillon	Applicable dans les cas de variations de séquences minoritaires tels l'hétéroplasmie mitochondriale, le mosaïcisme et les échantillons tumoraux
Intervalle de référence	Spectre de variations nucléotidiques détectées dans une population non affectée Les résultats qui se situent en dehors de cet intervalle pourraient être cliniquement significatifs.	Séquence bien caractérisée de la région du gène interrogé, y compris notamment la distribution des variations nucléotidiques et, le cas échéant, des variations pathogéniques connues

Abréviations : FN : faux négatif; FP : faux positif; VN : vrai négatif; VP : vrai positif

* Définitions tirées et/ou adaptées de celles publiées par le groupe de travail Nex-StoCT, formé par le Center for Disease Control and Prevention (CDC) aux États-Unis [Gargis *et al.*, 2012]. Ces définitions sont également reprises dans le document [CLSI, 2014].

† Le séquençage unidirectionnel ne constitue pas une pratique recommandée (précision apportée par le Dr Jean-François Soucy, 6 mars 2019).

‡ Précisons que si un artefact de PCR survient suffisamment tôt dans la réaction d'amplification, la population de fragments amplifiés pourrait, de façon stochastique, contenir en très grande majorité une erreur de PCR à une position donnée et le score Phred pourrait alors être bon à cette position, malgré cette erreur (précision apportée par le Dr Jonatan Blais).

§ Définition publiée par l'Institut National du Cancer (INCa) en France [INCa, 2014].

|| ADN libre circulant, foetal ou tumoral (information fournie par le Dr Jonatan Blais).

7.5. Détermination du nombre d'échantillons cliniques requis pour l'évaluation de la validité analytique d'un test par séquençage de Sanger

Divers organismes, tels que l'Organisation internationale de normalisation (ISO), le College of American Pathologists (CAP), le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), ainsi que certaines agences professionnelles américaines et européennes, requièrent ou recommandent que les laboratoires cliniques établissent de façon formelle la sensibilité analytique, la spécificité analytique, l'exactitude, la précision et, si nécessaire, d'autres critères de performance du test. L'annexe C du présent document indique les divers organismes s'étant prononcés sur les critères de performance à valider dans le contexte des tests de séquençage de Sanger ou, de façon plus générale, dans le contexte des analyses moléculaires à visée clinique.

Précisons que le nombre total d'échantillons cliniques requis pour la validation d'un test par séquençage de Sanger dépend de nombreux facteurs, y compris notamment :

- l'application clinique du test (dépistage, diagnostic, confirmation);
- les types d'échantillons acceptés pour le test (sang, salive, buvards, etc.);
- la rareté de la maladie, du biomarqueur ou encore de la ou des variations pathogéniques;
- la disponibilité des échantillons cliniques, particulièrement des échantillons anormaux;
- l'expérience acquise par le laboratoire relativement à la technique;
- le coût des analyses.

De ce fait, bien qu'ils insistent sur la nécessité de valider un test clinique, plusieurs organismes refusent de se prononcer sur un nombre minimal défini d'échantillons requis pour la validation d'un test clinique par séquençage. Le tableau 10 présente quelques organismes qui ont publié des recommandations de nombre d'échantillons requis pour la validation d'un test génétique par séquençage de Sanger ou par d'autres techniques moléculaires. Précisons que plusieurs organismes recommandent, en plus de la validation analytique d'un test, d'effectuer une étude de concordance au cours de laquelle les variations nucléotidiques détectées dans un gène, un exon ou une région ciblée par l'analyse soient comparées à celles détectées au moyen d'une méthode de référence. Précisons qu'une étude de concordance ne remplace pas une validation analytique, mais qu'elle lui est plutôt complémentaire.

Soulignons que le CLSI fournit un certain nombre de protocoles d'évaluation concernant la taille de l'échantillon exigée pour la validation de tests dans diverses situations, notamment dans les tests de type qualitatif [CLSI, 2008]. Toutefois, bien que ces outils permettent d'obtenir des estimations utiles du nombre d'échantillons requis, la disponibilité des échantillons appropriés est souvent un facteur limitant [Mattocks *et al.*, 2010; Jennings *et al.*, 2009; Maddalena *et al.*, 2005].

Selon le Comité français d'accréditation (COFRAC), en général, pour chacune des dimensions à évaluer, un nombre minimal de 30 échantillons serait requis pour une

interprétation statistique optimale [COFRAC, 2015]. Cette recommandation s'appuie sur celle de l'EuroGentest [Mattocks *et al.*, 2010]. Le recours à un nombre inférieur d'échantillons devrait être justifié en fonction de critères pertinents (rareté de la matrice, coûts des analyses, durée d'analyse, etc.). Le COFRAC souligne que la valeur statistique des résultats obtenus sera d'autant plus réduite que ces nombres seront faibles. Les calculs et les tests utilisés devront tenir compte de ces nombres [COFRAC, 2015].

Selon l'EuroGentest, la plupart des technologies d'analyse en génétique moléculaire sont très sensibles et la cible de validation, sur le plan de la sensibilité, se rapproche fréquemment de 100 %. En effet, un test qui n'atteint pas une sensibilité mesurée de 100 % est souvent jugé inapproprié pour un usage diagnostique [Mattocks *et al.*, 2010].

Tableau 10 Recommandations d'organismes professionnels et règlementaires concernant le nombre d'échantillons minimal requis pour la validation analytique d'un test clinique par séquençage de Sanger (ou d'un autre type d'analyse en génétique moléculaire)

Organisme (référence)	Sensibilité, spécificité et exactitude (référence)	Précision		Étude de concordance	Champs d'activité	Type d'analyse
		intra-essai (répétabilité)	inter-essais (reproductibilité)			
CLSI	30 (MM01-A3) 100 sur une période de 10 à 20 jours (EP12-A2) <ul style="list-style-type: none"> ▪ 50 sauvages ▪ 50 mutés 	n. d.	Plusieurs en 3 essais (jours, réactifs et/ou opérateurs différents) (MM01-A3)	30 (MM01-A3)	Laboratoires médicaux	Analyse génétique
CAP	n. d.	Plusieurs en 3 répétitions	Plusieurs en 3 essais (jours et réactifs différents)	n. d.	Laboratoires médicaux	Séquençage de Sanger
ASHI	n. d.	3 en 3 répétitions	3 en 3 essais	20, dont 10 à l'aveugle	Histocompatibilité immunogénétique	Analyse génétique
COFRAC (SH GTA-04)	30	15 à 30 [§]	15 à 30 [§] sur une période de 15 jours	40	Biologie médicale	Analyse de type qualitatif
INCa	30 ^{†‡} <ul style="list-style-type: none"> ▪ 15 sauvages ▪ 15 mutés 	3 en 3 répétitions [‡] <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1 sauvage ▪ 2 mutés 	30 sur une période de 15 jours [‡] (2 niveaux d'allèles mutés)	30 (en cas de variation rare, 3 mutés seront suffisants)	Génétique somatique	Séquençage de Sanger

Abréviations : ACMG : American College of Medical Genetics and Genomics (États-Unis); ASHI : American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (États-Unis); CAP : College of American Pathologists (États-Unis); CCMG : Canadian College of Medical Geneticists (Canada); COFRAC : Comité français d'accréditation (France); CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute (États-Unis); INCa : Institut National du Cancer (France); n.d. : donnée non disponible

† Concernant la sensibilité analytique, une concordance de 100 % doit être observée avec le génotype connu antérieurement et détecté selon une autre méthode ou dans un autre laboratoire [INCa, 2014].

‡ Les paramètres concernant la qualité de séquence (ex. : score Phred ou autre valeur) doivent être évalués et maintenus entre les différentes séquences obtenues [INCa, 2014].

§ En général, ce nombre devrait être de 30 échantillons pour que l'interprétation statistique soit optimale [COFRAC, 2015].

7.6. Estimation de la puissance statistique d'une étude de validation en fonction de la taille de l'échantillon

La détermination de la puissance statistique d'une étude de validation par des calculs précis peut être complexe. Pour des raisons pratiques, Mattocks et ses collaborateurs [2010] proposent une méthode simple pour estimer la puissance statistique d'une étude de validation en fonction de la taille de l'échantillon. Selon les auteurs, cette façon de faire permet d'obtenir une estimation suffisamment précise de la puissance statistique des tests de type qualitatif.

L'objectif de l'exercice est de déterminer le nombre de mesures qui permettra d'obtenir une puissance statistique suffisante pour déterminer la sensibilité et la spécificité, au degré de confiance désiré, pour une application particulière [Mattocks *et al.*, 2010].

Selon cette règle, pour un intervalle de confiance (IC) à 95 %, la probabilité qu'un événement passe inaperçu lors de l'étude de validation d'un nombre (n) de mesures est de $3/n$. Les auteurs illustrent ce principe à l'aide des exemples du tableau 11 ci-dessous. Comme la sensibilité des technologies utilisées en génétique moléculaire est bien souvent très élevée, les auteurs émettent l'hypothèse que le test offre une sensibilité expérimentale de 100 %.

Tableau 11 Effet du nombre d'échantillons analysés sur la puissance statistique lors de la détermination de la sensibilité d'un test qualitatif

Nombre	Sensibilité expérimentale (%)	$3/n$ (probabilité d'un FN)	Sensibilité maximale (%), IC à 95 %
30	100	0,1 (10 %)	≥ 90
300	100	0,01 (1 %)	≥ 99

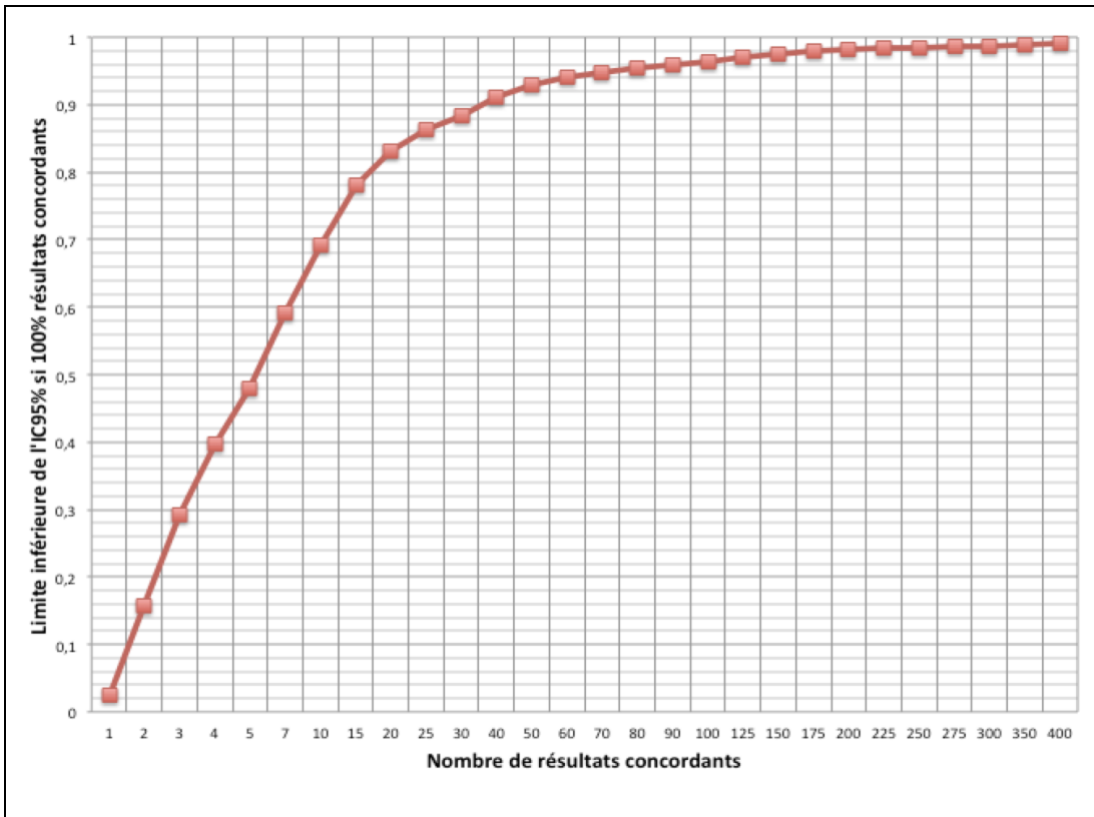
Source : Mattocks et ses collaborateurs [2010]

Abréviations : FN : faux négatif; IC : intervalle de confiance; n : nombre

Précisons que cette règle peut s'appliquer à tous les calculs de proportion et peut donc être utilisée pour déterminer la spécificité autant que la sensibilité. Le nombre de résultats positifs (mutés) déterminera la puissance de l'estimation de la sensibilité, alors que le nombre de résultats négatifs (sauvages ou normaux) déterminera celle de la spécificité [Mattocks *et al.*, 2010].

Les auteurs soulignent que cette méthode permettra d'obtenir une estimation précise dans les études comportant un minimum de 60 mesures [Mattocks *et al.*, 2010]. La figure 2 ci-dessous présente l'incertitude associée à la puissance de l'estimation d'une proportion (limite inférieure de l'IC à 95 %) lorsque 100 % des résultats sont concordants.

Figure 2 Incertitude de l'estimation d'une proportion de 100 % en fonction du nombre d'observations



Abréviation : IC : intervalle de confiance

Cet outil permet d'obtenir des estimations utiles du nombre d'échantillons requis pour obtenir une validation analytique dont la puissance statistique est satisfaisante.

Toutefois, la disponibilité des échantillons appropriés est souvent un facteur limitant [Mattocks *et al.*, 2010; Jennings *et al.*, 2009; Maddalena *et al.*, 2005]. Selon Jennings et ses collaborateurs, il n'y aurait pas toujours suffisamment d'échantillons cliniques, de temps ou de soutien financier, scientifique ou technologique pour permettre une telle collecte de données rigoureuses pour chaque test diagnostique [Jennings *et al.*, 2009]. Le CLSI (MM20) n'adhère cependant pas à cette vision de tirer vers le bas les normes de validation rigoureuse des tests diagnostics moléculaires, parce que ceux-ci ne seront souvent réalisés qu'une seule fois dans la vie d'un individu, dans les cas de maladie héréditaire, et conditionneront les soins de santé qu'il recevra le reste de sa vie, sans parler des risques de discrimination et de stigmatisation.

Pour faire augmenter la puissance statistique d'une étude de validation, les échantillons obtenus localement peuvent être complétés par ceux provenant d'un autre laboratoire et ceux disponibles commercialement [Peris-Vicente *et al.*, 2014; Pont-Kingdon *et al.*, 2012; Mattocks *et al.*, 2010]. Le matériel résiduel provenant d'échantillons reçus pour l'analyse clinique d'autres atteintes ou maladies peut parfois servir d'échantillons témoins négatifs. Ces échantillons doivent être anonymisés avant d'être utilisés [Ellard *et al.*, 2016; Pont-Kingdon *et al.*, 2012].

8. ÉTAPE POSTANALYTIQUE

8.1. Interprétation des variations nucléotidiques et communication des données de séquence

L'ACMG, l'AMP et le CAP ont conjointement publié des normes et des recommandations visant l'interprétation des variations nucléotidiques [Richards *et al.*, 2015]. Les principaux aspects de ces recommandations sont présentés ici, accompagnés de certaines recommandations de l'ACGS [Ellard *et al.*, 2016].

- La classification des variations pathogéniques des troubles héréditaires est effectuée en fonction de diverses données probantes (données populationnelles et démographiques, données informatiques, données fonctionnelles, données de ségrégation, etc.). Cette méthode permet de classer les variations nucléotidiques en 5 catégories correspondant aux terminologies suivantes [Richards *et al.*, 2015] :
- variation pathogénique;
- variation nucléotidique probablement pathogène (certitude à plus de 90 % que la variation nucléotidique est pathogène);
- variation nucléotidique de signification incertaine;
- variation nucléotidique probablement bénigne (certitude à plus de 90 % que la variation nucléotidique est bénigne);
- variation nucléotidique bénigne.
- Le rapport devrait contenir l'information exacte concernant la nature et la position de la variation nucléotidique en comparaison de la séquence de référence, de même que l'effet de ce changement sur la séquence protéique, et ce, en accord avec la terminologie uniformisée du Human Genome Variation Society (HGVS)¹⁷. Le logiciel Mutalyzer peut être utilisé dans la plupart des cas pour vérifier la terminologie des variations nucléotidiques¹⁸ [Ellard *et al.*, 2016; Richards *et al.*, 2015].
- Le rapport devrait inclure également, le nom du gène, de l'exon, de la maladie, les informations relatives à l'hérédité, le profil mutationnel et ce, toujours en accord avec la terminologie uniformisée. L'origine parentale peut également être incluse lorsqu'elle est connue. En outre, si des variations nucléotidiques spécifiques sont analysées dans un test de génotypage, le laboratoire doit spécifiquement documenter les variations investiguées ainsi que leur description complète, y compris la terminologie d'origine lorsqu'elle est disponible [Richards *et al.*, 2015].

¹⁷ Human Genome Variation Society (HGVS). Sequence Variant Nomenclature [site Web], disponible à : <http://varnomen.hgvs.org/> (consulté le 28 mars 2019).

¹⁸ Welcome to the Mutalyzer website [site Web], disponible à : <https://mutalyzer.nl/>.

- L'interprétation des résultats devrait contenir les éléments de preuve appuyant la classification des variations nucléotidiques, y compris leur effet prévu sur la protéine résultante et si les variations nucléotidiques détectées sont susceptibles d'expliquer, en tout ou en partie, l'indication du test pour le patient [Richards *et al.*, 2015].
- Le rapport devrait également inclure toutes les recommandations au clinicien au sujet des tests cliniques additionnels, tels que des tests enzymatiques et fonctionnels à partir des cellules du patient, ainsi que l'intérêt de tester les membres de la famille afin de permettre une interprétation plus approfondie des variations nucléotidiques [Richards *et al.*, 2015].
- Il convient de préciser si la variation nucléotidique a été rapportée précédemment dans la littérature ou dans des bases de données [Richards *et al.*, 2015]. Des bases de données locus spécifiques, de qualité clinique, peuvent être utilisées lorsque celles-ci sont disponibles.
- Les résultats négatifs ne doivent être déclarés que lorsque les nucléotides analysés ont produit des données de séquence de haute qualité. L'étendue de l'analyse, y compris notamment les limites du test et les risques potentiels de faux positifs, doit être définie dans le rapport [Ellard *et al.*, 2016].
- Concernant les tests de prédisposition au cours desquels aucune variation pathogénique familiale n'a été détectée, il est essentiel que, lorsque le résultat dépend d'une amplification sur une seule paire d'amorces, les sites de liaison des amorces soient vérifiés pour y détecter la présence de polymorphisme (PSN) [Ellard *et al.*, 2016].
- En l'absence d'un système de transfert de tubes robuste et fiable (ex. : balayage de code à barres, transferts avec témoin) assurant la désignation de l'échantillon à chaque étape, les variations pathogéniques détectées pour la première fois dans un pedigree particulier devraient être confirmées par un second test, à l'aide d'un nouvel échantillon [Ellard *et al.*, 2016].
- Le rapport devrait mentionner si une évaluation qualitative de l'échantillon clinique a été réalisée avant l'analyse [Richards *et al.*, 2015].
- L'ACMG recommande que les résultats soient interprétés par un spécialiste agréé en génétique moléculaire clinique, un anatomopathologiste en génétique moléculaire ou l'équivalent [Richards *et al.*, 2015].

8.2. Essais d'aptitude et assurance qualité

Les laboratoires qui utilisent des méthodes de séquençage pour le diagnostic clinique d'atteintes ou de maladies génétiques devraient participer à des essais d'aptitude (en anglais *proficiency testing* ou PT). Notamment, le CAP [2018] offre des tests spécialement conçus pour les laboratoires cliniques qui effectuent des analyses cliniques par séquençage de Sanger. Certains tests sont spécifiques à des atteintes ou à des maladies génétiques particulières (ex. : séquençage et interprétation des variations pathogéniques dans l'ADN des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (code de programme CAP : BRCA), alors que d'autres visent à éprouver la méthode globale d'analyse et sa capacité à détecter les différentes classes de variations nucléotidiques relativement auxquelles le

service est offert (séquençage de l'ADN et interprétation des variations nucléotidiques, codes de programme CAP : SEC et SEC1).

Des programmes peuvent également être mis en place de façon indépendante entre au moins deux laboratoires cliniques par un système d'échange d'échantillons en aveugle. Dans la situation où un autre laboratoire clinique ne serait pas disponible pour un système d'échange, un certain nombre d'échantillons pourraient aussi être envoyés dans un établissement central spécialisé dans le génotypage et/ou le séquençage. Cette approche permet de contrôler la reproductibilité des résultats avec une méthode et des amorces PCR différentes. Advenant que les seuls échantillons disponibles pour des essais d'aptitude soient internes, un certain nombre d'entre eux pourrait faire l'objet d'une nouvelle analyse en aveugle (personnel technique, appareils de séquençage et logiciels d'analyse différents) [ACMG, 2008].

Il convient, suivant les bonnes pratiques de laboratoire, d'utiliser un système de suivi des échantillons permettant de retrouver les données brutes relatives à chaque étape de l'analyse, de la production et de la divulgation des résultats [Ellard *et al.*, 2016].

RÉFÉRENCES

- American College of Medical Genetics (ACMG). Standards and guidelines for clinical genetics laboratories. Bethesda, MD : ACMG; 2008. Disponible à : <https://www.acmg.net/PDFLibrary/Standards-Guidelines-Clinical-Molecular-Genetics.pdf>.
- American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI). Accreditation Review Program: Operations Manual. Mount Laurel, NJ : ASHI; 2015. Disponible à : <https://c.ymcdn.com/sites/www.ashi-hla.org/resource/resmgr/Docs/Accreditation/2014ARBOperationsManual.pdf>.
- Association nationale des praticiens de génétique moléculaire (ANPGM). Recommandations et dossier type de validation de la méthode de séquençage par méthode de Sanger pour la recherche de mutations. BP-ANPGM_002. Paris, France : ANPGM; 2012. Disponible à : https://anpgm.fr/media/documents/BP-ANPGM_002_validation_initiale_Sanger.pdf.
- Blais J, Lavoie SB, Giroux S, Bussi eres J, Lindsay C, Dionne J, et al. Risk of misdiagnosis due to allele dropout and false-positive PCR artifacts in molecular diagnostics: Analysis of 30,769 genotypes. *J Mol Diagn* 2015;17(5):505-14.
- Bland JM et Altman DG. Measurement error. *BMJ* 1996;313(7059):744.
- Canadian College of Medical Geneticists (CCMG). CCMG Molecular Genetics Guidelines. Kingston, ON : CCMG; 2006. Disponible à : https://www.ccmg-ccgm.org/documents/Policies_etc/Pract_Guidelines/PractGuide_MOLEC_MolecGenTest_Sept2002.pdf.
- Canadian Standards Association (CSA). Z316.8-18: Requirements for the design, development, and validation of laboratory-developed tests used for the screening, diagnosis, and management of clinical conditions. Toronto, ON : CSA; 2018.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). MM09-A2 : Nucleic acid sequence methods in diagnostic laboratory medicine; Approved guideline—Second Edition. Wayne, PA : CLSI; 2014.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). MM20-A: Quality management for molecular genetic testing; Approved guideline. Wayne, PA : CLSI; 2012a.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). MM01-A3: Molecular methods for clinical genetics and oncology testing; Approved guideline—Third Edition. Wayne, PA : CLSI; 2012b.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). EP12-A2: User protocol for evaluation of qualitative test performance; Approved guideline—Second Edition. Wayne, PA : CLSI; 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). EP17-A: Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; Approved guideline. Wayne, PA : CLSI; 2004.
- College of American Pathologists (CAP). 2019 Surveys and anatomic pathology education programs. Northfield, IL : CAP; 2018. Disponible à : <https://documents.cap.org/documents/2019-surveys-catalog.pdf>.

- College of American Pathologists (CAP). Molecular Pathology Checklist. CAP Accreditation Program. Northfield, IL : CAP; 2015. Disponible à : <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=BAF04742CE945CDBA65F9BFBBFFAEA4C?doi=10.1.1.700.6931&rep=rep1&type=pdf>.
- Comité français d'accréditation (COFRAC). Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / Validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Document SH GTA 04. Révision 01. Section Santé humaine. Paris, France : COFRAC; 2015. Disponible à : <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>.
- Ellard S, Charlton R, Gokhale D, Taylor GR, Yau M, Wallace A, Ramsden SC. Practice guidelines for Sanger Sequencing Analysis and Interpretation. Londres, Angleterre : Clinical Molecular Genetics Society (CMGS); 2009. Disponible à : <https://web.archive.org/web/20180404010553/https://www.acgs.uk.com/media/774826/sequencingv2.pdf>.
- Ellard S, Charlton R, Yau S, Gokhale D, Taylor GR, Wallace A, et al. Practice guidelines for Sanger Sequencing Analysis and Interpretation. Londres, Angleterre : Association for Clinical Genetic Science (ACGS); 2016. Disponible à : https://web.archive.org/web/20180722002534/https://www.acgs.uk.com/media/1025065/acgs_sanger_sequencing_bpg_update_2016.pdf.
- Ewing B et Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 1998;8(3):186-94.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 1998;8(3):175-85.
- Forootan A, Sjoback R, Björkman J, Sjögren B, Linz L, Kubista M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol Detect Quantif* 2017;12:1-6.
- Gargis AS, Kalman L, Berry MW, Bick DP, Dimmock DP, Hambuch T, et al. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. *Nat Biotechnol* 2012;30(11):1033-6.
- Institut National du Cancer (INCa). 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. Boulogne-Billancourt, France : INCa; 2014. Disponible à : <https://www.e-cancer.fr/content/download/86001/874800/file/Validation-de-methode-en-genetique-Somatique.pdf>.
- Jennings L, Van Deerlin VM, Gulley ML. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133(5):743-55.
- Maddalena A, Bale S, Das S, Grody W, Richards S. Technical standards and guidelines: Molecular genetic testing for ultra-rare disorders. *Genet Med* 2005;7(8):571-83.
- Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet* 2010;18(12):1276-88.
- McInerney P, Adams P, Hadi MZ. Error rate comparison during polymerase chain reaction by DNA polymerase. *Mol Biol Int* 2014;2014:287430.

- Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). Lignes directrices de l'OCDE sur l'assurance qualité des tests de génétique moléculaire. Paris, France : Éditions OCDE; 2007. Disponible à : <http://www.oecd.org/fr/science/tech-emergentes/38839818.pdf>.
- Organisation internationale de normalisation (ISO). ISO 15189:2012. Laboratoires de biologie médicale — Exigences concernant la qualité et la compétence. Genève, Suisse : ISO; 2014.
- Peris-Vicente J, Ochoa-Aranda E, Carda-Broch S, Esteve-Romero J. Validation of human clinical genetic tests. *Mini Rev Med Chem* 2014;14(10):831-6.
- Pont-Kingdon G, Gedge F, Wooderchak-Donahue W, Schrijver I, Weck KE, Kant JA, et al. Design and analytical validation of clinical DNA sequencing assays. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136(1):41-6.
- Potapov V et Ong JL. Correction: Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. *PLoS One* 2017a;12(7):e0181128.
- Potapov V et Ong JL. Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. *PLoS One* 2017b;12(1):e0169774.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405-24.
- Rousseau F, Gancberg D, Schimmel H, Neumaier M, Bureau A, Mamotte C, et al. Considerations for the development of a reference method for sequencing of haploid DNA – an opinion paper on behalf of the IFCC Committee on Molecular Diagnostics, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(11):1343-50.
- Sanger F et Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975;94(3):441-8.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-7.

ANNEXE A

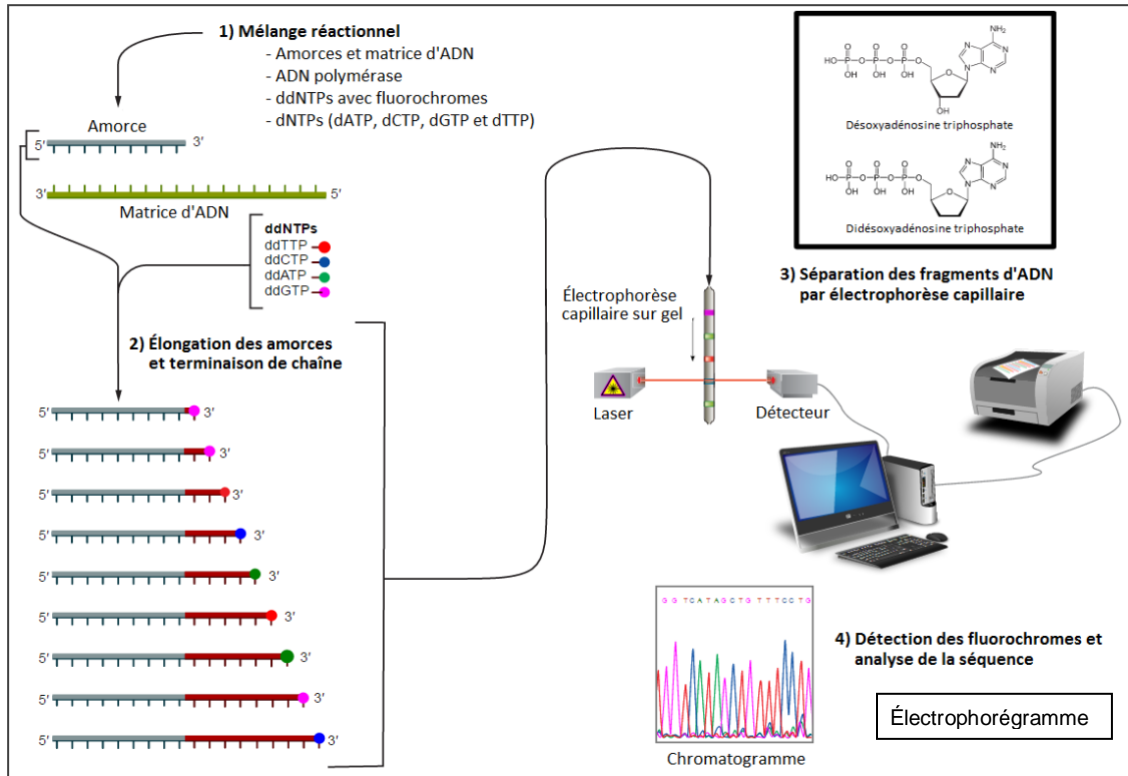
Description de la technologie de séquençage de Sanger et précisions techniques¹⁹

La méthode par terminaison de chaîne a été conçue par Frederick Sanger [Sanger *et al.*, 1977; Sanger et Coulson, 1975]. La réaction de séquençage proprement dite consiste en une synthèse *in vitro* d'ADN à partir d'une matrice par l'incorporation aléatoire de didésoynucléotides triphosphate (ddNTP). La matrice doit être présente en grande quantité, soit plus de 100 millions de copies dans le tube de réaction, d'où la nécessité d'une première étape d'amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Elle est ajoutée à un mélange réactionnel comprenant une ADN polymérase, une amorce s'hybridant en position 5' du fragment à séquencer, un tampon et un mélange de désoynucléotides triphosphate (dNTP) et de didésoxyribonucléotides triphosphate (ddNTP). Chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome spécifique [INCa, 2014].

Le ratio ddNTP/dNTP est de l'ordre de 1/100. La probabilité d'incorporer un dNTP est donc 100 fois plus élevée que la probabilité d'incorporer 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. Comme la réaction de séquençage est réalisée à partir d'un très grand nombre de copies de la matrice, l'incorporation aléatoire des ddNTP conduit à l'arrêt de l'élongation à toutes les positions possibles sur le segment d'ADN. Ainsi, pour 1 produit PCR de 400 paires de bases (pb), il y aura production de près de 400 types de fragments fluorescents ne différant en taille que de 1 base et par la nature du ddNTP incorporé à l'extrémité 3'. Ces fragments nouvellement synthétisés sont ensuite séparés par migration dans les capillaires du séquenceur automatique, puis un faisceau laser excite le fluorochrome des ddNTP. Une caméra à dispositif à transfert de charges (DTC) capte l'émission de fluorescence amplifiée par un photomultiplicateur. Un électrophorégramme est obtenu après l'analyse des données brutes par un logiciel (correction du bruit de fond, reconnaissance des bases, calcul d'une valeur de qualité (VQ) de l'appel des bases (score Phred ou autre VQ équivalente). La séquence d'ADN obtenue est ensuite comparée à une séquence de référence, de manière à détecter une variation à l'état homozygote (ou hémizygote, selon le mode de transmission de la maladie considérée) ou hétérozygote [INCa, 2014]. Les principales étapes du séquençage de Sanger sont résumées dans la figure A-1.

¹⁹ Les informations contenues dans la présente section sont principalement tirées de celles publiées par l'Institut National du Cancer [INCa, 2014], sauf lorsqu'une autre source est indiquée.

Figure A-1 Séquençage de Sanger (méthode « didéoxy » ou méthode de terminaison de chaîne)



Abréviations : ADN : acide désoxyribonucléique; dATP : désoxyadénosine triphosphate; dCTP : désoxycytidine triphosphate; dGTP : didésoxyguanosine triphosphate; dTTP : désoxythymidine triphosphate; dNTP : désoxyribonucléotide; ddATP : didésoxyadénosine triphosphate; ddCTP : didésoxycytidine triphosphate; ddGTP : didésoxyguanosine triphosphate; ddTTP : didésoxythymidine triphosphate; ddNTP : didésoxyribonucléotide

Source : Traduction libre d'une illustration présentée dans l'encyclopédie libre Wikipédia, disponible à : <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b2/Sanger-sequencing.svg> (consulté le 27 septembre 2018).

ANNEXE B

Description des critères de performance nécessaires à la validation d'un test effectué par séquençage de Sanger

Exactitude

L'objectif de déterminer l'exactitude d'une analyse est de fournir les preuves que le test produira les résultats escomptés. De façon générale, elle est évaluée par une étude de concordance entre les résultats obtenus à l'aide du nouveau test et ceux obtenus à l'aide d'une méthode de référence [Pont-Kingdon *et al.*, 2012]. Toutefois, en séquençage de Sanger, l'exactitude analytique est déterminée par la concordance entre la séquence de référence et la séquence produite à l'aide des données de haute qualité de chacune des bases analysées.

Plusieurs organismes recommandent tout de même d'effectuer une étude de concordance [Pont-Kingdon *et al.*, 2012]. Plusieurs techniques peuvent servir de méthode de comparaison pour valider l'exactitude d'un test par séquençage. Parmi celles-ci, figurent notamment [Pont-Kingdon *et al.*, 2012] :

- la PCR spécifique d'allèles;
- le clonage et le séquençage de clones multiples;
- le séquençage à l'aide d'un autre couple d'amorces;
- d'autres méthodes moléculaires;
- la comparaison des résultats avec ceux obtenus par un autre laboratoire clinique.

En général, les laboratoires vont effectuer un séquençage bidirectionnel ou des réplicats indépendants d'un séquençage unidirectionnel²⁰ pour vérifier la répétabilité des résultats obtenus [Gargis *et al.*, 2012].

Le tableau B-1 présente les différents résultats possibles, obtenus lors de la validation d'un test qualitatif par une étude de concordance.

Tableau B-1 Valeurs possibles obtenues lors d'une étude de validation pour déterminer la concordance entre un test de type qualitatif et un test de référence

RÉSULTAT DU TEST	RÉSULTATS DU TEST DE RÉFÉRENCE	
	POSITIF (+)	NÉGATIF (-)
POSITIF (+)	Vrai positif (+/+)	Faux positif (-/+)
NÉGATIF (-)	Faux négatif (+/-)	Vrai négatif (-/-)

²⁰ Le séquençage unidirectionnel ne constitue pas une pratique recommandée (précision apportée par le D^r Jean-François Soucy, 6 mars 2019).

L'exactitude, ou la concordance, correspond au rapport entre le nombre de résultats exacts obtenus (vrais positifs et vrais négatifs) et l'ensemble des résultats obtenus. La formule permettant de déterminer l'exactitude est présentée dans le tableau 9.

Pour ce faire, des échantillons de référence bien caractérisés, contenant ou non des variations nucléotidiques connues dans les séquences du génome investiguées par la méthode sont analysés en tant que témoins positifs ou de témoins négatifs (voir la section 6.3 du présent document qui présente en détail les types d'échantillons témoins) [Gargis *et al.*, 2012]. Dans le contexte du séquençage, un résultat est considéré comme positif s'il y a présence d'une variation nucléotidique alors qu'un résultat négatif correspond à l'absence de cette variation [Pont-Kingdon *et al.*, 2012].

Idéalement, l'évaluation de l'exactitude doit être effectuée à l'aveugle, c'est-à-dire sans que l'opérateur ne connaisse les résultats obtenus par l'approche de référence [Pont-Kingdon *et al.*, 2012; Mattocks *et al.*, 2010]. Précisons qu'en ce qui concerne les analyses qualitatives, l'exactitude, la sensibilité et la spécificité sont des critères interdépendants. Les données collectées pour évaluer l'exactitude sont également utilisées pour déterminer la spécificité et la sensibilité [Pont-Kingdon *et al.*, 2012; Mattocks *et al.*, 2010].

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique correspond au rapport entre le nombre de résultats correctement désignés comme étant positifs (vrais positifs concernant la variation nucléotidique recherchée) et l'ensemble des échantillons dont le génome est réellement porteur de la variation nucléotidique (vrais positifs et faux négatifs). La formule permettant de déterminer la sensibilité analytique est présentée dans le tableau 9.

Lors du séquençage, les faux négatifs peuvent résulter des situations suivantes [Ellard *et al.*, 2016; Pont-Kingdon *et al.*, 2012; ACMG, 2008] :

- présence d'un polymorphisme au site d'appariement des amorces de PCR ou de séquençage provoquant l'amplification préférentielle d'un allèle (en anglais *allele dropout* ou ADO);
- mosaïcisme tissulaire;
- amplification préférentielle de l'allèle le plus court dans une grande insertion;
- présence d'une grande délétion (ex. : gène ou exon complet) qui, comme il a été mentionné précédemment, n'est pas détectée par le séquençage de Sanger;
- effet potentiel d'un contenu riche en guanine-cytosine.

Les faux négatifs peuvent également résulter d'une qualité insuffisante des profils de fluorescence. Il est donc nécessaire de s'assurer que la VQ, soit le score Phred ou une autre VQ, de chaque base correspond aux exigences. L'analyse des VQ doit idéalement être complétée par l'inspection visuelle de la séquence.

Selon l'Institut National du Cancer (INCa), la sensibilité analytique d'un test par séquençage de Sanger, évaluée par une étude de concordance, devrait être de 100 %

par rapport au génotype connu antérieurement déterminé selon une autre méthode ou dans un autre laboratoire [INCa, 2014].

Spécificité analytique

La spécificité désigne le rapport entre le nombre de résultats correctement déterminés comme étant négatifs (vrais négatifs) et l'ensemble des échantillons dont le génome n'est réellement pas porteur d'une variation nucléotidique (vrais négatifs et faux positifs). La formule permettant de déterminer la spécificité est présentée dans le tableau 9.

Lors du séquençage, les faux positifs peuvent résulter des situations suivantes [Ellard *et al.*, 2016; Pont-Kingdon *et al.*, 2012] :

- présence et détection d'un pseudogène comportant une variation nucléotidique;
- présence de multiples copies d'un gène dont certains comportent une variation nucléotidique;
- présence d'une contamination.

Les faux positifs peuvent également résulter d'une qualité insuffisante des profils de fluorescence. Il est donc nécessaire de s'assurer que la VQ, soit le score Phred ou une autre VQ, de chaque base correspond aux exigences. L'analyse des VQ doit idéalement être complétée par l'inspection visuelle de la séquence.

La sensibilité et la spécificité analytiques d'une méthode basée sur le séquençage montrent des valeurs généralement supérieures à 99 %. Dans le cas contraire, le test doit être redéfini si de faux positifs ou de faux négatifs sont obtenus lors de l'étude de concordance [Pont-Kingdon *et al.*, 2012].

Précisons que, comme il a été mentionné précédemment, la spécificité des amorces de la région d'intérêt influence directement la spécificité du test et doit être soigneusement vérifiée lors de la planification préanalytique (voir la section 6.2 du présent document).

Précision

Dans les tests qualitatifs tels que le séquençage de l'ADN, la précision fait référence à la capacité du test à reproduire les mêmes résultats, lorsqu'il est effectué à répétition. Pour évaluer la robustesse et la fiabilité de l'analyse, une étude de précision intra-essai (répétabilité) et inter-essais (reproductibilité) est effectuée. Pour ce faire, des échantillons positifs et négatifs sont analysés à de multiples reprises. La taille d'échantillon nécessaire (nombre de patients et nombre de répétitions de chacun) pour estimer la répétabilité et la reproductibilité se calcule facilement lorsque le maximum d'erreur toléré est fixé sur l'estimation [Bland et Altman, 1996]. En plus du résultat final, la qualité de la séquence (score Phred) est également évaluée. Elle doit être constante et respecter les critères de qualité spécifiés dans le tableau 8 [Pont-Kingdon *et al.*, 2012].

Précision intra-essai (répétabilité)

La précision intra-essai est évaluée par l'analyse simultanée de quelques échantillons en trois exemplaires, au minimum, dans les mêmes conditions d'analyse, par exemple à l'aide du même appareillage, du même lot de réactifs et par le même opérateur. La qualité de l'amplification peut être évaluée en visualisant le produit PCR sur gel d'agarose ou à l'aide d'une autre méthode. Les critères de VQ (score Phred ou autre VQ) des séquences obtenues doivent être respectés [CLSI, 2014; Pont-Kingdon *et al.*, 2012].

Précision inter-essais (reproductibilité)

La précision inter-essais est évaluée à l'aide des mêmes échantillons testés lors d'essais indépendants effectués à des dates différentes en fonction de certains paramètres variables représentatifs de la réalité du laboratoire (lots de réactifs, opérateurs ou appareillages différents, concentration de l'ADN ou des produits de PCR, etc.) [CLSI, 2014; Pont-Kingdon *et al.*, 2012].

Lors de l'étude de précision inter-essais, l'évaluation de la qualité de la séquence produite (score Phred ou autre QV) est un paramètre essentiel à la définition de la reproductibilité et doit être évaluée pour définir les valeurs d'acceptabilité des résultats qui seront produits par le test [Pont-Kingdon *et al.*, 2012].

Le Biochemical and Molecular Genetic Resource Committee du College of American Pathologist (CAP) suggère d'utiliser les données de l'analyse ayant permis d'évaluer l'exactitude du test et celles ayant permis d'évaluer la précision intra-essai pour l'évaluation de la précision inter-essais, et ce, pour réduire les coûts associés à la validation. De cette façon, moins d'analyses additionnelles sont requises pour obtenir le nombre d'analyses indépendantes nécessaires à l'évaluation robuste de la précision inter-essais [Pont-Kingdon 2012]. Aussi, parce que l'évaluation de la précision exige des quantités importantes d'échantillons, surtout dans les cas de séquençage complet de longs gènes nécessitant plusieurs amplicons, ce même comité suggère d'avoir recours à un « patient artificiel », produit à l'aide d'un pool d'échantillons d'ADN de diverses sources. Cette façon de faire est acceptable, selon les auteurs, puisque chaque amplicon est comparé à son réplicat et non aux autres échantillons [CAP, 2015; Pont-Kingdon *et al.*, 2012]. Cependant, cette façon de faire n'évaluera pas la variabilité (imprécision) qui pourrait être due à la variabilité entre les patients, ce qui est un élément important à évaluer.

Limite de détection

Selon le CLSI, la limite de détection (en anglais *limit of detection* ou LOD) est la plus petite quantité d'un analyte (mesurande), dans un échantillon, qui puisse être détectée avec une probabilité prédéfinie, bien qu'elle ne puisse pas être nécessairement quantifiée comme une valeur exacte [CLSI, 2004]. La LOD correspond donc, dans une séquence, à la plus faible fraction allélique pouvant être détectée dans un échantillon.

La LOD ne s'applique généralement pas aux analyses de séquençage d'ADN utilisées pour la détection de variations pathogéniques germinales associées à un trouble héréditaire. Ce paramètre doit toutefois être déterminé dans les cas où l'analyse est utilisée pour détecter de faibles niveaux d'ADN muté dilué parmi de l'ADN normal. La LOD

est applicable notamment dans les cas de variation de séquence minoritaire, tels que l'hétéroplasmie mitochondriale, le mosaïcisme et les variations pathogéniques somatiques en oncologie [Ellard *et al.*, 2016; INCa, 2014; Pont-Kingdon *et al.*, 2012; Mattocks *et al.*, 2010].

La LOD correspond au seuil de positivité, c'est-à-dire au seuil au-delà duquel le séquençage est capable de détecter la présence d'une variation nucléotidique par rapport à la séquence de référence. Elle correspond à la proportion de variation nucléotidique la plus faible pouvant être distinguée du bruit de fond. La méthode de séquençage doit alors permettre la détection d'une variation nucléotidique présente en proportion supérieure au seuil établi par le laboratoire ou au seuil cliniquement significatif. Ce seuil peut être défini expérimentalement ou à partir d'une revue de la littérature. Il peut être différent en fonction des paramètres étudiés.

De façon générale, le séquençage de Sanger permet de mettre en évidence une variation pathogénique présente dans des proportions de 10 % à 20 % de l'ADN total. Une proportion de variation pathogénique inférieure à la LOD produira des résultats faux négatifs qui affecteront la sensibilité analytique du test [INCa, 2014; Pont-Kingdon *et al.*, 2012].

Lorsque cela est nécessaire, la LOD d'un test par séquençage de Sanger peut être déterminée par une étude de dilution décroissante. L'ADN d'un échantillon comportant une variation pathogénique (hétérozygote ou homozygote) connue peut être dilué à différentes concentrations dans un échantillon d'ADN normal [INCa, 2014; Pont-Kingdon *et al.*, 2012]. À cette fin, l'INCa recommande d'utiliser un échantillon calibré (lignée cellulaire ou échantillon commercial) comprenant une variation pathogénique 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. Lorsque ce seuil est déterminé, il est nécessaire de vérifier la répétabilité du signal muté [INCa, 2014].

La LOD peut être déterminée avec une précision de 95 % lorsque 95 % des résultats de l'analyse d'un échantillon dont la concentration d'analyte correspond à la LOD donneront un résultat positif. On peut donc évaluer la LOD à 95 % à l'aide d'une série de courbes de dilution d'échantillons différents. On estime qu'il faut 20 courbes de dilution pour obtenir une estimation fiable de la LOD [Frootan *et al.*, 2017].

Limite de quantification

Selon le CLSI, la limite de quantification (en anglais *limit of quantification* ou LOQ) est la plus petite quantité de mesurande, dans un échantillon, qui peut être déterminée quantitativement avec une précision et une exactitude acceptables et prédéfinies et dans des conditions expérimentales prédéfinies [CLSI, 2004].

Elle se mesure au cours du même devis expérimental que la LOD, en utilisant plusieurs courbes de dilution d'échantillons différents et en déterminant la variabilité de la mesure sur la courbe de dilution à différentes concentrations de mesurande.

Dans le cas d'une séquence, on parle donc ici de la plus petite fraction allélique à un ou plusieurs nucléotides donnés pouvant être mesurée avec une exactitude acceptable et prédéfinie, et ce, en fonction du besoin clinique.

La LOQ est déterminée par le laboratoire à l'aide d'un graphique du coefficient de variation de la méthode à différentes fractions alléliques. Aucun seuil prédéfini n'a été fixé concernant la LOQ, parce qu'elle dépend des besoins cliniques et du seuil d'erreur acceptable sur les quantités rapportées par l'analyse. On peut utiliser les 20 courbes de dilution réalisées pour déterminer la LOD pour calculer les pourcentages des coefficients de variation (CV) à différentes concentrations et produire le graphique qui servira à déterminer la LOQ [Frootan *et al.*, 2017].

Intervalle de mesure

En séquençage, l'intervalle de mesure correspond à la région du génome où une séquence de qualité prédéterminée et suffisamment élevée peut être obtenue.

Dans le séquençage de Sanger, ce paramètre peut comporter la définition de la région du gène investigué, les régions d'intérêt ou la distribution des variations pathogéniques si elles sont connues, le détail de tous les résultats envisageables pouvant être détectés par la méthode ou la technique, notamment le profil mutationnel, homozygote ou hétérozygote, ou toute autre information pertinente concernant la séquence du gène d'intérêt [CAP, 2015; CLSI, 2014; Pont-Kingdon *et al.*, 2012]. Dans le cas du séquençage de Sanger, ce paramètre est défini lors de la planification préanalytique (voir la section 6 du présent document) [Mattocks *et al.*, 2010], mais doit faire l'objet d'une expérimentation montrant que le niveau de qualité prédéfini est retrouvé à chacune des positions nucléotidiques ciblées par l'analyse et faisant l'objet d'un rapport versé au dossier du patient.

Intervalle de référence

Dans le séquençage, ce paramètre représente la séquence de référence utilisée pour l'interprétation des résultats [CLSI, 2014; Pont-Kingdon *et al.*, 2012]. Elle doit être bien caractérisée et permettre de déterminer les variations normales d'une séquence de celles qui sont anormales. Dans le cas du séquençage de Sanger, ce paramètre est également défini lors de la planification préanalytique (voir la section 6 du présent document) [Mattocks *et al.*, 2010].

ANNEXE C

Recommandations d'organismes professionnels et réglementaires concernant les critères de performance à évaluer lors de la validation analytique d'un test clinique par séquençage de Sanger ou dans le contexte des analyses génétiques et moléculaires dans le domaine clinique

ORGANISME	SENSIBILITÉ	SPÉCIFICITÉ	EXACTITUDE	PRÉCISION		LOD*	INTERVALLE DE RÉFÉRENCE	INTERVALLE DE MESURE	ÉTUDE DE CONCORDANCE	CHAMPS D'ACTIVITÉ	TYPE D'ANALYSE
				INTRA-ESSAI	INTER-ESSAIS						
ACMG ⁱ	++	++	++	n. d.	++	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	Analyse moléculaire en génétique héréditaire	Séquençage de Sanger
ASHI ⁱⁱ	++	++	++	++	++	n. d.	n. d.	++	++	Histocompatibilité immunogénétique	Analyse génétique
CAP ⁱⁱⁱ	++	++	++	++	++	++	++	++	++	Laboratoires médicaux	Séquençage de Sanger
CCMG ^{iv}	++	++	n. d.	++	++	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	Génétique moléculaire héréditaire	Analyse génétique
CLSI ^v	++	++	++	++	++	++	++	++	n. d.	Laboratoires médicaux	Séquençage
COFRAC ^{vi}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	Biologie médicale	Analyse de type qualitatif
EuroGentest [Mattocks <i>et al.</i> , 2010]	++	++	+	Pour établir les facteurs de correction et/ou les valeurs limites		++	++	++	n. d.	Génétique moléculaire	Analyse clinique moléculaire
INCa ^{vii}	++	++	++	++	++	++	n. d.	n. d.	++	Génétique somatique	Séquençage de Sanger
OCDE ^{viii}	++	++	++	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	Génétique moléculaire	Analyse moléculaire

Abréviations : ACMG : American College of Medical Genetics and Genomics (États-Unis); ASHI : American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (États-Unis); CAP : College of American Pathologists (États-Unis); CCMG : Canadian College of Medical Geneticists (Canada); CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute (États-Unis); CMGS : Clinical Molecular Genetics Society (Royaume-Uni); COFRAC : Comité français d'accréditation (France); INCa : Institut National du Cancer (France); LOD : sigle de l'anglais *limit of detection*, en français « limite de détection »; n. d. : donnée non disponible; OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

++ : critère recommandé + : critère suggéré

* Applicable dans les cas de variation de séquence minoritaire, tels que l'hétéroplasmie mitochondriale, le mosaïcisme et les échantillons tumoraux (oncologie) [Mattocks *et al.*, 2010].

ⁱ ACMG, 2008.

ⁱⁱ ASHI, 2015.

ⁱⁱⁱ CAP, 2015; Pont-Kingdon *et al.*, 2012.

^{iv} CCMG, 2006.

^v CLSI, 2014.

^{vi} COFRAC, 2015.

^{vii} INCa, 2014.

^{viii} OCDE, 2007.

ANNEXE D

Validation analytique d'un test clinique effectué par séquençage de type SANGER : Recommandations de bonnes pratiques

Informations générales	
Identification laboratoire	
Nom de la personne qui fait la validation	
Nom de l'analyse	

Rappel

Les éléments à définir ou à évaluer ne constituent pas des normes mais bien un consensus de bonnes pratiques. L'INESSS est conscient qu'il peut exister différents types de contraintes pouvant empêcher un laboratoire, pour une analyse donnée, de réaliser toutes les mesures proposées ici.

Éléments à définir ou à évaluer	Devis expérimental proposé selon la nature des variations nucléotidiques		Informations et résultats de validation Des informations supplémentaires (p. ex. électrophorégramme) peuvent être fournies en annexe à ce formulaire
	Variations constitutives	Variations acquises	
Planification pré-analytique			
Identification de la séquence de référence (section 6.1)	Indiquer le numéro d'identification de la séquence de référence . <ul style="list-style-type: none"> Utiliser une référence reconnue (ex. LRG, Ensembl, RefSeq ou GeneBank^{MC}) ou la version du génome utilisée (p. ex. GRCh38.p9). Considérer l'existence de transcrits secondaires cliniquement pertinents et de pseudogènes. 	S.O.	
	Indiquer les : <ul style="list-style-type: none"> régions du gène qui seront analysées (localisation de séquence, exon complet ou partiel, incluant ou non des sections introniques, promotrices ou autres, etc.); les informations rapportées dans la littérature concernant les variations nucléotidiques pour les régions interrogées par le test, et ce, en lien avec la condition médicale à l'étude; variations pathogéniques connues; régions critiques (« hot spot »). 	S.O.	

Éléments à définir ou à évaluer		Devis expérimental proposé selon la nature des variations nucléotidiques		Informations et résultats de validation Des informations supplémentaires (p. ex. électrophorégramme) peuvent être fournies en annexe à ce formulaire
		Variations constitutives	Variations acquises	
	Justifier, le cas échéant, la raison de l'exclusion de régions particulières (ex. pseudogènes ou régions homologues, régions riches en CG, etc.).	s.o.		
Design et choix des amorces (section 6.2)	<p>Documenter les éléments suivants :</p> <p><u>À vérifier :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ spécificité des amorces (ex. outil BLAST); ▪ qualité du produit PCR (amplifications non-spécifiques, dimères d'amorces). <p><u>À éviter :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ homologie avec d'autres gènes ou pseudogènes (risque de résultats faux positifs); présence de SNP (risque de résultats faux négatifs ou de perte allélique). 	s.o.		
	Expliquer la stratégie adoptée pour minimiser la perte allélique (« allelic drop-out »).	Exemples de stratégie : - utilisation de 2 paires d'amorces différentes; - réaction en duplicata; - séquençage bidirectionnel concordant.		
	Indiquer le design et la séquence des amorces utilisées ainsi que la longueur de chacun des amplicons produits.	s.o.		et

Éléments à définir ou à évaluer		Devis expérimental proposé selon la nature des variations nucléotidiques		Informations et résultats de validation Des informations supplémentaires (p. ex. électrophorégramme) peuvent être fournies en annexe à ce formulaire
		Variations constitutives	Variations acquises	
Détermination du matériel de référence et des échantillons cliniques témoins (section 6.3)	Description matériel de référence utilisé (de préférence certifié) : <ul style="list-style-type: none"> provenance (population normale ou population présentant les variations nucléotidiques pertinentes); échantillons cliniques caractérisés (indiquer le nombre, le type et la localisation des variations nucléotidiques qu'ils contiennent) 	s.o.		
	Description des échantillons cliniques témoins utilisés : <ul style="list-style-type: none"> type représentatif des échantillons qui seront analysés; variété représentative de la population ciblée; variété représentative de tous les résultats possibles; méthode utilisée pour tester les variations pathogéniques d'intérêt. <p>Spécifier lesquels serviront de témoins lors des essais (contrôles de qualité interne).</p>	Nombre de témoin(s) négatif(s) : ≥ 1 par protocole Nombre de témoin(s) positif(s) : ≥ 1 hétérozygote et ≥ 1 homozygote (si applicable) pour chacune des variations pathogéniques s'il s'agit d'un test ciblant des variations pathogéniques spécifiques connues.		
Types de spécimens cliniques (section 6.4)	Fournir la liste des types d'échantillons cliniques qui pourront être soumis au laboratoire aux fins d'analyse.	Sang (cellules leucocytaires)	Tissu tumoral, tissus FFPE, moelle osseuse	

Éléments à définir ou à évaluer		Devis expérimental proposé selon la nature des variations nucléotidiques		Informations et résultats de validation Des informations supplémentaires (p. ex. électrophorégramme) peuvent être fournies en annexe à ce formulaire
		Variations constitutives	Variations acquises	
Validation analytique				
Évaluation de la qualité des données obtenues par séquençage Sanger (section 7.2)	<p>Documenter les indicateurs de qualité suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ qualité minimale pour l'appel des bases (score Phred ou autre QV représentant le taux d'erreur par position nucléotidique séquencée); <p>Rapport signal sur bruit (SNR) calculé comme le ratio du signal spécifique en présence d'un allèle/le signal des échantillons ne portant pas cet allèle.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Score Phred (ou autre QV) pour chacune des bases séquencées : ≥ 30 pour un séquençage unidirectionnel ≥ 20 pour un séquençage bidirectionnel ▪ SNR ≥ 20 <p><i>* Pour le génotypage, ces critères de qualité doivent être respectés pour un minimum de 10 bases de chaque côté de la variation pathogénique recherchée, et pour un minimum de 10 bases situées en amont d'une insertion ou délétion connue.</i></p>		
	<p>Faire la démonstration de la qualité globale de la réaction de séquençage.</p>	<p>Fournir au moins un électrophorégramme de haute qualité, comparant les données de séquence d'un échantillon de référence et celles provenant de l'analyse simultanée d'un échantillon clinique comportant une variation nucléotidique.</p>		

Éléments à définir ou à évaluer		Devis expérimental proposé selon la nature des variations nucléotidiques		Informations et résultats de validation Des informations supplémentaires (p. ex. électrophorégramme) peuvent être fournies en annexe à ce formulaire
		Variations constitutives	Variations acquises	
Taux d'erreur du séquençage Sanger (section 7.3)	Indiquer le taux d'erreur moyen par base (avec IC 95 %) obtenu pour une même réaction d'amplification et de séquençage.		<p>< 1 % erreur par base séquencée</p> <p>Confirmation avec X échantillons (nb de bases nécessaires à confirmation de taux d'erreur de 1% (= 400 bases concordantes a 100%) donc séquencer 400 bases pour 10 patients différents.</p> <p>≤ 0,1 % pour une même réaction d'amplification et de séquençage (à la condition que les deux brins soient séquencés pour chaque région et soient à 100% concordants).</p>	
Critères de performance nécessaires à la validation d'un test effectué par séquençage de type Sanger (section 7.4)	<p>EXACTITUDE (%)</p> <p>Degré de concordance entre la séquence nucléotidique déterminée par le test et la séquence de référence</p> <p>VP + VN / (VP + FP + VN + FN) X 100</p> <p>Indiquer le nombre d'échantillons utilisés. Si inférieur au nombre proposé, justifier.</p>	<p>Pour les analyses qualitatives comme le séquençage, l'exactitude, la sensibilité et la spécificité sont des critères interdépendants.</p> <p>Les données recueillies afin</p>	Utiliser des échantillons cliniques bien caractérisés contenant ou non des variations nucléotidiques connues dans les séquences interrogées par le test, qui seront analysés comme témoins positifs ou négatifs.	

Éléments à définir ou à évaluer		Devis expérimental proposé selon la nature des variations nucléotidiques		Informations et résultats de validation Des informations supplémentaires (p. ex. électrophorégramme) peuvent être fournies en annexe à ce formulaire
		Variations constitutives	Variations acquises	
<p>SENSIBILITÉ ANALYTIQUE (%) Probabilité qu'un test détecte une variation de séquence lorsqu'elle est présente</p> <p>$VP / (VP + FN) \times 100$</p> <p>Indiquer le nombre d'échantillons utilisés. Si inférieur au nombre proposé, justifier.</p>	<p>d'évaluer l'exactitude peuvent également être utilisées pour déterminer la sensibilité et la spécificité.</p>	<p>Sensibilité dans le cas de la recherche de :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ variation(s) pathogénique(s) unique(s) connue(s) : 30 échantillons positifs pour chaque variation pathogénique recherchée. 		
<p>SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE (%) Probabilité qu'un test ne détecte pas de variation nucléotidique lorsqu'aucune n'est vraiment présente</p> <p>$VN / (VN + FP) \times 100$</p> <p>Indiquer le nombre d'échantillons utilisés. Si inférieur au nombre proposé, justifier.</p>		<p>Spécificité dans le cas de la recherche de :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ variation(s) pathogénique(s) unique(s) connue(s) : 30 échantillons négatifs (sans mutation) pour les variations pathogéniques recherchées. 		

Éléments à définir ou à évaluer		Devis expérimental proposé selon la nature des variations nucléotidiques		Informations et résultats de validation Des informations supplémentaires (p. ex. électrophorégramme) peuvent être fournies en annexe à ce formulaire
		Variations constitutives	Variations acquises	
	<p>RÉPÉTABILITÉ (précision intra-essai)</p> <p>Degré avec lequel la même séquence est obtenue lorsqu'un échantillon de référence est séquencé à de multiples reprises sous de mêmes conditions.</p>	<p>Pour le Sanger en général, pas pour chaque variation individuelle.</p> <p>Nombre d'échantillons différents en triplicata ≥ 1</p>	<p>10 échantillons différents 6 fois chacun; ou 24 échantillons différents 3 fois chacun.</p> <p>Avec ce nombre l'estimé de la répétabilité sera à moins de 20 % de la valeur réelle de la répétabilité.</p>	
	<p>REPRODUCTIBILITÉ (précision inter-essai)</p> <p>Degré avec lequel la même séquence est obtenue lorsque le séquençage est effectué à des jours différents par différents opérateurs, utilisant différents lots de réactifs et sur plus d'un instrument.</p> <p>Indiquer les variables testées (ex. nombre de jours, lots de réactifs, opérateur, etc).</p>	<p>Pour le Sanger en général, pas pour chaque variation individuelle.</p> <p>Nombre d'échantillons répétés à des jours différents ≥ 1</p>	<p>10 échantillons différents 6 fois chacun; ou 24 échantillons différents 3 fois chacun.</p> <p>Avec ce nombre l'estimé de la répétabilité sera à moins de 20 % de la valeur réelle de la répétabilité.</p>	

Éléments à définir ou à évaluer		Devis expérimental proposé selon la nature des variations nucléotidiques		Informations et résultats de validation Des informations supplémentaires (p. ex. électrophorégramme) peuvent être fournies en annexe à ce formulaire
		Variations constitutives	Variations acquises	
	<p>LIMITE DE DÉTECTION (LOD)</p> <p>Fraction allélique minimum détectable dans un échantillon donné. La LOD correspond au seuil de positivité au-delà duquel le test de séquençage peut détecter la présence d'une variation nucléotidique comparativement à la séquence de référence.</p> <p><i>Applicable dans les cas de variations de séquences minoritaires tels l'hétéroplasmie mitochondriale, le mosaïcisme, les échantillons tumoraux et l'ADN libre circulant foetal ou tumoral.</i></p>	<p><u>NON</u></p> <p>Dans un contexte germinal, déterminer la LOD si jugé cliniquement pertinent selon l'application prévue du test.</p>	<p><u>OUI</u></p> <p>Dilution de 20 échantillons à fraction allélique connue avec un nombre suffisant de dilutions vs seuil cliniquement pertinent</p> <p>INCa 2014 et Pont-Kingdom 2012</p>	

Éléments à définir ou à évaluer		Devis expérimental proposé selon la nature des variations nucléotidiques		Informations et résultats de validation Des informations supplémentaires (p. ex. électrophorégramme) peuvent être fournies en annexe à ce formulaire
		Variations constitutives	Variations acquises	
	<p>LIMITE DE QUANTIFICATION (LOQ)</p> <p>Fraction allélique minimum mesurable avec une précision et une exactitude prédéfinies.</p> <p><i>Applicable dans les cas de variations de séquences minoritaires tels l'hétéroplasmie mitochondriale, le mosaïcisme, les échantillons tumoraux et l'ADN libre circulant foetal ou tumoral ou des mesures quantitatives.</i></p>	<p><u>NON</u></p> <p>Dans un contexte germinal, déterminer la LOQ si jugé cliniquement pertinent selon l'application prévue du test.</p>	<p><u>OUI</u></p> <p>Utiliser les mêmes courbes de dilution que celles utilisées pour la détermination de la LOD.</p> <p>Déterminer la variabilité de la mesure sur la courbe de dilution à différentes proportions de variations pathogéniques. (annexe B du document support). Forootan 2017</p>	
	<p>INTERVALLE DE MESURE</p> <p>Région du génome pour laquelle une séquence de qualité acceptable peut être obtenue par le test.</p>	<p><u>NON</u></p> <p>Dans un contexte germinal, déterminer l'intervalle de mesure si jugé cliniquement pertinent selon l'application prévue du test.</p>	<p><u>OUI</u></p> <p>Analyse d'échantillons différents pour déterminer l'intervalle de mesure.</p>	

Éléments à définir ou à évaluer		Devis expérimental proposé selon la nature des variations nucléotidiques		Informations et résultats de validation Des informations supplémentaires (p. ex. électrophorégramme) peuvent être fournies en annexe à ce formulaire
		Variations constitutives	Variations acquises	
Étapes post-analytiques				
Interprétation des variations nucléotidiques et communication des données de séquence (section 8.1)	Un rapport de séquençage devrait contenir minimalement les éléments suivants :	S.O.	S.O.	
	<ol style="list-style-type: none"> 1) Identification du spécimen-patient : nom, date de naissance, date de prélèvement, nature du spécimen, numéro assigné au spécimen ou au patient, numéro assigné au pedigree familial ou à d'autres membres de la famille. 2) Indication du test : maladie/marqueur testé, objectif de la demande (confirmation diagnostique, statut de porteur, etc.) et raison sous-jacente à la demande (retard de développement, histoire familiale, etc.) 3) Nom du prescripteur 4) Nom de l'analyse effectuée : variations pathogéniques/exons/gènes testés, description brève de la méthodologie et des limites du test. 5) Sensibilité estimée du test 6) Interprétation des résultats 7) Nom et l'adresse du laboratoire 8) Date et nombre de pages du rapport 9) Nom du professionnel certifié (médecin de laboratoire ou biochimiste clinique) ayant interprété et signé le rapport 10) Avis de non-responsabilité aux endroits appropriés mentionnant la possibilité d'erreurs hors du contrôle du laboratoire. <p>Fournir des références lorsque les données publiées peuvent influencer l'interprétation ou le calcul du risque ou lorsque celles-ci sont conflictuelles.</p>			

Éléments à définir ou à évaluer		Devis expérimental proposé selon la nature des variations nucléotidiques		Informations et résultats de validation Des informations supplémentaires (p. ex. électrophorégramme) peuvent être fournies en annexe à ce formulaire
		Variations constitutives	Variations acquises	
	Décrire le processus d'analyse des données, de l'interprétation et de la validation des résultats, incluant le rôle des différents intervenants.	s.o.	s.o.	
Épreuves de compétence et AQ (section 8.2)	Fournir la liste et les modalités des épreuves de compétence externes de séquençage auxquelles le laboratoire participe.	Épreuves de compétence offertes par des organismes indépendants (p. ex. CAP) et/ou échanges de spécimens 2 fois par année avec d'autres laboratoires.		

Abréviations : ADN : acide désoxyribonucléique; CAP : College of American Pathologists; CSABM : Comité scientifique des analyses de biologie médicale; FFPE : tissus fixés dans la formaldéhyde et enrobés de paraffine (de l'anglais *Formalin-fixed, paraffin-embedded*); FN : faux négatif; FP : faux positif; IC 95 % : intervalle de confiance à 95 %; LOD : limite de détection (de l'anglais *limit of detection*); LOQ : limite de quantification (de l'anglais *limit of quantification*); LRG : Locus Reference Genomic; RSB : rapport signal sur bruit (de l'anglais *signal to noise ratio*); SNP : polymorphisme mononucléotidique (de l'anglais, *single nucleotide polymorphism*); s.o. : sans objet; QV : valeur de qualité (de l'anglais *quality value*); VN : vrai négatif; VP : vrai positif.

*Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux*

Québec 

Siège social

2535, boulevard Laurier, 5^e étage
Québec (Québec) G1V 4M3
418 643-1339

Bureau de Montréal

2021, avenue Union, 12^e étage, bureau 1200
Montréal (Québec) H3A 2S9
514 873-2563

inesss.qc.ca

