

N°: 20200619_RT06 Version : 01 Date : 29/06/2020	Recommandation Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Valeur seuil du DIN	
Demandeur	AURAGEN	
		Page 1/5

1 OBJET

Détermination d'une métrique qualité objectivable optimisée pour définir l'intégrité d'un ADN génomique extrait d'un échantillon biologique maximisant la garantie d'obtention d'un résultat de séquençage répondant aux critères de qualité de la communauté internationale.

Réponse à la demande émanant de la plateforme AURAGEN en date du 11/06/2020.

2 DOMAINE D'APPLICATION

- Cette recommandation s'applique aux échantillons d'ADN issus de prélèvements sanguins ou tissulaires non tumoraux et utilisés dans le cadre du diagnostic par séquençage de lectures courtes.
- Cette recommandation ne s'applique pas à la technologie de séquençage longs fragments.
- Cette recommandation ne s'applique pas aux échantillons extraits à partir de tissu fixé (ex : FFPE).

3 LES METRIQUES EXISTANTES

Les fournisseurs d'appareils d'analyse d'ADN ont défini des métriques propres à leurs technologies parmi lesquelles on peut trouver :

- Le GQN (Genomic Quality Number - Fragment analyzer; Agilent) ;
- Le DQN (DNA Quality Number - Fragment analyzer; Agilent) ;
- Le GQS (Genomic DNA Quality Score - Labchip GX; Perkin Elmer) ;
- Le DIN (DNA Integrated Number - TapeStation; Agilent).

La plateforme AURAGEN étant équipée de la « TapeStation », la recommandation se concentrera donc sur le DIN.

4 DÉFINITION DU DIN

Le DIN est une métrique proposée par le fournisseur Agilent, basée sur l'utilisation de cassette de migration électrophorétique appelée « ScreenTape » utilisée dans l'appareil « TapeStation ». Il est préconisé par Agilent, afin de standardiser et de faciliter le contrôle de l'intégrité des échantillons d'ADN intra et inter laboratoires.

Il est obtenu à partir d'un algorithme basé sur plusieurs paramètres de migration électrophorétique. Il détermine la fragmentation d'un ADN génomique en estimant la distribution du signal sur toute une plage de taille et applique automatiquement un nombre calculé. Le DIN a été généré à partir d'environ 7 000 échantillons provenant d'une grande variété de sources d'ADN génomique.

N°: 20200619_RT06 Version : 01 Date : 29/06/2020	Recommandation Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Valeur seuil du DIN	
Demandeur	AURAGEN	
		Page 2/5

L'échelle de valeurs est comprise entre 1 et 10.

Une valeur seuil de DIN supérieure 7 est considérée comme acceptable par Agilent pour l'engagement de l'ADN en séquençage. En dessous, d'autres recommandations sont à appliquées :

Valeur	Recommandation
DIN >7	Recommandé
6 <DIN ≤7	Possible mais avec restriction
DIN ≤ 6	Non recommandé, nouveau prélèvement à demander dans la limite du possible

5 RECOMMANDATIONS DU CREFIX

5.1 Préambule et limites

Un échantillon qui a été prélevé, conservé et extrait selon les procédures standardisées et les recommandations des instances de santé (ex : HAS) devrait toujours donner une valeur de DIN élevée (i.e > 7).

La plupart des fournisseurs de kit de préparation de librairie pour du WGS, indique que l'ADN génomique doit être de bonne qualité (c'est-à-dire le moins dégradé possible et le plus propre). Mais, ils ne donnent aucune métrique pour qualifier l'ADN (pas de valeur seuil, pas de technique d'analyse particulière).

La dégradation d'un ADN génomique se visualise par la présence d'un « smear » (présence de fragment d'ADN de tailles variables). Quand un ADN est dégradé, l'information sur l'homogénéité de sa dégradation est inconnue. **Or, celle-ci a un impact sur la taille des inserts et sur la représentativité de l'information génétique** et *in fine* sur l'interprétation du séquençage.

Il est à noter que l'utilisation de l'appareil « TapeStation » avec la « Genomic DNA ScreenTape Analysis » permet seulement de visualiser le profil de migration compris entre 200 et 60 000 paires de bases. La plupart des extractions réalisées sur colonne ou billes magnétiques provoquent une cassure de l'ADN génomique à une taille moyenne de 50 kb. Il est donc nécessaire de connaître avant l'emploi de la « TapeStation », le type d'extraction utilisé (i.e avec une cassure < 60kb).

N°: 20200619_RT06 Version : 01 Date : 29/06/2020	Recommandation Technique PFMG 2025	
Sujet	Valeur seuil du DIN	
Demandeur	AURAGEN	
		Page 3/5

Le DIN n'est pas le seul critère à prendre en considération pour qualifier un ADN extrait.

Pour rappel :

- Les ratios de dosage optique 260/280 et 260/230 doivent être compris entre 1.8 et 2 ce qui permet de donner une information sur la présence d'inhibiteur de réaction d'amplification ou sur la présence de traces de solvants.
- Le profil de migration doit être homogène (absence de smear) et doit présenter un pic majoritaire supérieur à 10 kb.
- Il est nécessaire de traiter les échantillons à la RNase afin d'éviter les artéfacts de dosage et de purifier par passage sur colonne les échantillons après traitement.

5.2 DIN > 7

Tout échantillon avec une valeur de DIN supérieure à 7 et possédant les critères qualités cités ci-dessus (rapports de DO, pic) est qualifié pour le séquençage.

Cette valeur est recommandée par le retour d'expérience du CNRGH (Centre National de Recherche en Génomique Humaine), par la plateforme d'extraction et de qualification des ressources biologiques (CIT) et par l'application note d'Agilent.

5.3 6 < DIN ≤ 7

Tout échantillon avec une valeur de DIN comprise entre 6 et 7 et possédant les critères qualités cités ci-dessus (rapports de DO, pic) peut être considéré comme utilisable pour le séquençage moyennant des précautions supplémentaires.

En effet, ces valeurs indiquent une dégradation partielle des ADN. Selon le CNRGH, cette dégradation peut avoir un impact sur la qualité des résultats de séquençage (couverture non homogène, rendement de préparation des librairies plus faible, risque d'échec de la préparation de librairie plus important, etc.).

Il faudra vérifier :

Avant de préparer la librairie :

- Le profil de migration (Pic majoritaire au-dessus de 10kb, absence de smear,...) ;
- Les dosages ;
- Le type d'extraction utilisée.

Avant le dépôt sur séquenceur :

Le rendement et le profil des librairies selon les recommandations des fournisseurs.

N°: 20200619_RT06 Version : 01 Date : 29/06/2020	Recommandation Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Valeur seuil du DIN	
Demandeur	AURAGEN	
		Page 4/5

5.4 DIN ≤ 6

Dans le cas où l'échantillon a une valeur de DIN inférieure à 6, il est préférable de le remplacer dans la mesure du possible car le risque d'avoir un problème de séquençage devient plus élevé selon le retour d'expérience du CNRGH.

Si le ré-échantillonnage n'est pas possible et si l'échantillon est très précieux alors un avis en RCP devrait être demandé afin de déterminer la meilleure décision de diagnostic, soit en utilisant une technique alternative autre que le WGS, soit en tenant compte de la qualité du résultat lors du compte rendu de diagnostic.

De plus, selon le retour d'expérience d'Agilent, un ADN avec un DIN égal 6 avait donné une taille d'insert de 198 pb, ce qui est peu acceptable pour du WGS dont la taille d'insert doit être comprise entre 250 et 500 pb.

6 RÉFÉRENTIELS

- Common minimum technical standards and protocols biobanks dedicated to cancer research, IARC technical publication no. 44, 2017.
- ISO 20186-2:2019(fr) Analyses de diagnostic moléculaire in vitro - Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour le sang total veineux - Partie 2: ADN génomique extrait
- HAS : Règles de bonnes pratiques en génétique constitutionnelle à des fins médicales
- CIT/Plateforme d'extraction et de qualification des ressources biologiques (<https://cit.ligue-cancer.net/bioresources/index.php/la-qualification/qualification-des-adn/>)

7 DOCUMENTS

- M. Gassmann & B. McHoull, DNA Integrity Number (DIN) with the Agilent 2200 TapeStation System and the Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay, Agilent Technologies, publication number 5991-5258EN (2014).
- E. Schmidt, Genomic DNA Quantification and Integrity Analysis with the Agilent 2200 TapeStation System in Comparison to Two Other Electrophoresis Systems, Agilent Technologies, publication number 5991-5617EN (2015).
- K Nguyet et al., Integrating the DNA Integrity Number (DIN) to Assess Genomic DNA (gDNA) Quality Control Using the Agilent 2200 TapeStation System, Agilent Technologies, publication number 5991-5442EN (2016).
- S Kalghatgi et al., Monitoring Long-Term DNA Storage in the Biorepositories at Coriell Institut, Agilent Technologies, publication number 5994-1362EN (2019).

N°: 20200619_RT06 Version : 01 Date : 29/06/2020	Recommandation Technique PFMG 2025	 France Médecine Génomique 2025
Sujet	Valeur seuil du DIN	
Demandeur	AURAGEN	
		Page 5/5

8 LIMITES DE LA RECOMMANDATION

Cette recommandation est issue des différents fournisseurs, des « Application note » d'Agilent, de la littérature et de l'expertise du CNRGH.

9 HISTORIQUE DES MODIFICATIONS

<i>Version</i>	<i>Date</i>	<i>Nature de la modification</i>
V01	29/06/2020	Revue et correction
V00	19/06/2020	Création

10 VALIDATION DU DOCUMENT

RÉDACTEURS	RELECTEURS
Nom : Alice Moussy, Edouard Turlotte	Nom : Violette Turon, Jean-François Deleuze, Anne Boland, Robert Olasso
Fonction : Ingénieur Chercheur	Fonction :
Date : 29/06/2020	Date : 29/06/2020
Visa :	Visa :