	<b>Validation de méthode</b>	Version 3.0
GDB_PRO_23	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

## 1. **OBJECTIFS ET CHAMP D'APPLICATION**

L'objectif du projet vise à encadrer, tracer, rédiger un dossier de validation de méthode dans le cadre d'une demande d'accréditation par la plateforme de génotypages GD Scan de GD Biotech selon la norme ISO 17025 des laboratoires d'analyse et d'essai.

Il convient de préciser l'activité ou la méthode faisant l'objet d'une procédure de validation, et de déterminer sa portée d'accréditation (Fixe, FLEX1, FLEX2, FLEX3).

## 2. **DEFINITIONS / ABREVIATIONS**

Adopter une méthode : mettre en oeuvre une méthode reconnue sans modification

Adapter une méthode : modifier une méthode pour l'ajuster aux besoins du laboratoire ou du client

Développer une méthode : adapter une méthode et / ou concevoir une méthode

Call Rate : taux de marqueurs (issus de typages SNPs) renvoyant une information de génotype non manquante

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

TSU : Tissue Sampling Unit

TST : Tissue Sampling Tags

CAB : Codes À Barres

ENP : Espace Numérique Partagé

SNP : Single Nucleotide Polymorphism


## 3. **TEXTE DE RÉFÉRENCE**

La présente procédure tient compte des exigences de la norme NF EN ISO/IEC 17025 et du référentiel COFRAC LAB REF 08 - Révision 05 Expression et évaluation des portées d'accréditation.

## 4. **PERSONNEL CONCERNÉ**

L'ensemble du personnel intervenant dans la production de génotypage GD Scan.

## 5. **DESCRIPTION ET DÉROULEMENT DES OPÉRATIONS**

	<b>Validation de méthode</b>	Version 3.0
GDB_PRO_23	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Toute adoption de méthode reconnue, développement de nouvelle méthode, adaptation ou optimisation d'une méthode existante, ou développement d'une méthode alternative à la méthode existante doit être rigoureusement documentée. Pour ce faire, le formulaire de validation de méthode [GDB\\_FORM\\_53\\_Validation de méthode](#) est à compléter avec les points détaillés ci-dessous.

## 5.1 Intitulé de la méthode

Définir le nom de la méthode, et préciser le type de méthode :

- manuelle,
- semi-automatisée,
- automatisée,
- autre type (à préciser).

## 5.2 Elaboration du développement

### 5.2.1 Type de validation

Une validation de méthode est à effectuer en cas de :

- développement d'une nouvelle méthode
- adoption d'une nouvelle méthode reconnue,
- adaptation d'une méthode existante (contrainte technique, évolution technique,...),
- optimisation d'une méthode existante (temps, coût, ...),
- alternative à une méthode existante,
- traitement d'une matrice biologique non validée précédemment.

### 5.2.2 Revue de méthode

Préciser si la revue de la méthode s'appuie sur un référentiel ou non, le citer le cas échéant.

### 5.2.3 Contexte et objectifs du développement


Il convient de décrire le contexte pour lequel la méthode est revue ainsi que le(s) objectif(s).

### 5.2.4 Sélection de la méthode

La sélection d'une nouvelle méthode doit être argumentée et devra être en accord avec les différents points développés dans la section 5.4 du présent document.

### 5.2.5 Planification - Responsabilités

La validation de méthode est à l'initiative du Directeur Recherche et Développement ou du Responsable Plateforme de génotypage GD Scan. Ils définissent un pilote de projet et les

	<b>Validation de méthode</b>	Version 3.0
GDB_PRO_23	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

responsabilités de l'ensemble du personnel concerné. La date d'ouverture du formulaire [GDB\\_FORM\\_53\\_Validation de méthode](#), et les délais de réalisation doivent être indiqués. Les tâches, et les personnes à qui elles sont attribuées sont à préciser.

### 5.3 Contraintes du projet

Il s'agit d'évoquer ici les différentes contraintes du projet (techniques, équipement, etc...).

*Remarque : d'office, la qualité et la quantité des prélèvements/échantillons peut en être une. Par ailleurs, certaines méthodes sont destructrices pour certains types de prélèvements, les tests de répétabilité et de reproductibilité peuvent donc être limités pour un même échantillon.*

### 5.4 Caractéristiques de la méthode et performances attendues

#### 5.4.1 Principe de la méthode

Le principe de la méthode doit être explicité.

#### 5.4.2 Domaine d'application

Le domaine d'application peut être variable, il peut s'appliquer à toutes les matrices/données comme à un type d'entre eux, dans certaines conditions, etc... et doit être défini lors de sa validation.

#### 5.4.3 Matrices/Données

Définir la ou les matrice(s)/donnée(s) concernée(s) par la validation de méthode, leur conditionnement/emplacement et les modalités de conservation préalables à leur traitement.

#### 5.4.4 Traçabilité

Les échantillons sont identifiés avec un code à barres (CAB) unique (composé des lettres GD suivies de 6 chiffres), identifiant clé du prélèvement jusqu'au rendu de résultat.


L'ensemble des informations liées aux prélèvements (enregistrement et traçabilité) doit être conservé et l'accès aux informations clairement identifié (ENP, [GDB\\_FORM\\_53\\_Validation de méthode](#), cahier de laboratoire numérisé wiki, ...).

#### 5.4.5 Paramètres

Définir les paramètres analysés, ils peuvent être quantitatifs ou qualitatifs.

Par exemple :


- en extraction d'ADN, le paramètre analysé est la concentration d'ADN, mesurée en ng/μL (quantitatif),
- en géotypage d'ADN, les paramètres analysés sont le Call Rate (qualitatif) et la concordance géotypages.

	<b>Validation de méthode</b>	Version 3.0
GDB_PRO_23	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

#### 5.4.6 Critères de performance attendus

Les critères de performance spécifiques à la méthode à valider sont à définir. Des prérogatives optimales sont décrites ci-dessous. Elles sont à respecter si possible, toute dérogation doit être justifiée et est soumise à l'accord du Directeur Recherche et Développement.

- Les critères de performance concernant la phase d'extraction de l'ADN sont :
  - l'obtention d'une concentration d'ADN extrait supérieure à 15 ng/μL pour 90 % des échantillons sur un minimum de 16 échantillons extraits en doublon (répétabilité), soit 32 au total, puis, dans un second temps, sur ces mêmes 16 échantillons extraits dans les mêmes conditions mais par un opérateur différent (reproductibilité),  
*Remarque : pour les prélèvements de cartilage, compte tenu du fait que la méthode d'extraction est destructrice, il s'agira de considérer 32 prélèvements à extraire dans un premier temps, puis 16 autres à extraire dans les mêmes conditions mais par un opérateur différent.*
  - la validation du génotypage d'un minimum de 24 échantillons d'ADN : 8 échantillons + 8 échantillons répétabilité + 8 échantillons reproductibilité, si possible les mêmes 8 références échantillons, parmi ceux remplissant le critère évoqué ci-dessus, avec l'obtention d'un Call Rate supérieur à 0,95 pour au moins 90 % des échantillons, et d'une médiane Call Rate supérieure à 0,975.
  - L'obtention de 99% de similarité 580 SNP sur 8 échantillons issus des tests répétabilité/reproductibilité (concordance).
  - La vérification d'absence d'intercontamination (définie comme le mélange d'ADN provenant de plus d'un échantillon associé à plusieurs individus (mélange d'ADN, mélange de matrices biologiques etc...)) : l'intercontamination a un impact drastique au niveau du CallRate l'amenant à niveau nettement inférieur à 0,95 de CallRate. Ainsi, par essence, un CallRate > 0,95 assure du fait qu'il n'y ait pas d'intercontamination pour toute analyse réalisée satisfaisant à ce critère de performance. L'intercontamination doit être prise en compte dans les facteurs de risques liés à la méthode et les moyens mis en place pour les maîtriser.
  - La réalisation d'un essai inter-laboratoire validé : un essai inter-laboratoire est nécessaire pour toute autorisation d'utilisation d'une nouvelle méthode (sur toutes les matrices concernées).
- Les critères de performance concernant la phase de génotypage sont :
  - l'obtention d'un Call Rate supérieur à 0,95 pour au moins 90 % des échantillons sur un minimum de 32 échantillons génotypés, d'une médiane Call Rate

	<b>Validation de méthode</b>	Version 3.0
GDB_PRO_23	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

supérieur à 0,975, et la validation des contrôles qualité répétabilité et reproductibilité selon la méthodologie reprise dans le document [GDB\\_PRO\\_05\\_Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de géotypage haut-débit par puces à ADN](#).

- L'obtention de 99% de similarité 580 SNP pour échantillon du test répétabilité/reproductibilité [GDB\\_PRO\\_05\\_Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de géotypage haut-débit par puces à ADN](#), auquel on applique un seuil de similarité plus exigeant (99% au lieu de 95%).
  - La vérification d'absence d'intercontamination (définie comme le mélange d'ADN provenant de plus d'un échantillon associé à plusieurs individus (mélange d'ADN, mélange de matrices biologiques etc...)) : l'intercontamination a un impact drastique au niveau du CallRate l'amenant à niveau nettement inférieur à 0,95 de CallRate. Ainsi, par essence, un CallRate > 0,95 assure du fait qu'il n'y ait pas d'intercontamination pour toute analyse réalisée satisfaisant à ce critère de performance. L'intercontamination doit être prise en compte dans les facteurs de risques liés à la méthode et les moyens mis en place pour les maîtriser.
  - La réalisation d'un essai interlaboratoire validé : : un essai interlaboratoire est nécessaire pour toute autorisation d'utilisation d'une nouvelle méthode (sur toutes les matrices concernées).
- Les critères de performance concernant l'évolution du support de géotypage sont la présence des 580 SNP soumis à accréditation ([GDB\\_FI\\_15\\_SNP ISO 580](#)) sur un minimum de 4 échantillons (2 charolais et 2 holstein déjà géotypés sur la version N-1) géotypés en doublon (répétabilité), soit 8 au total, puis dans un second temps sur ces mêmes 4 échantillons, géotypés dans les mêmes conditions mais par un opérateur différent (reproductibilité), et un taux de similarité (concordance) de 99 % minimum entre les géotypes des versions N et N-1 sur ces 580 SNP (pour les géotypages valides -> Call Rate > 0,95 sur l'ensemble des SNP).


## 5.5 Essais

### 5.5.1 Introduction

Chaque essai doit être présenté, explicité (conditions de l'essai, ...).

### 5.5.2 Modes opératoires

Les modes opératoires mis au point pour les essais de validation de méthode doivent être

	<b>Validation de méthode</b>	Version 3.0
GDB_PRO_23	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

rigoureusement explicités. S'ils s'appuient sur un mode opératoire existant, par exemple dans le cadre de l'optimisation d'une étape, celui-ci devra être cité.

### 5.5.3 Points à développer

#### ➤ **Matériel**

Tout le matériel utilisé lors de la validation de méthode doit être rigoureusement listé (type d'appareil, référence, etc...), ainsi que ses conditions d'utilisation lors des essais quand cela est possible (ex : consignes, réglages, etc...).

#### ➤ **Kits et réactifs**

Un tableau décrivant les produits et consommables, les numéros de lots, les spécifications particulières (ex : à conserver à l'obscurité, à manipuler sous hotte, ...) et les conditions de stockage (décrites précisément en fonction de ce qui est mentionné sur la fiche produit) des kits et réactifs doit être présent dans chaque formulaire de validation de méthode.

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage

#### ➤ **Matrices**


Il conviendra de donner un maximum de précisions concernant les matrices utilisées : nature, quantité, références (échantillon, traitement, etc...), conditions spécifiques, détails/informations complémentaires.

#### ➤ **Milieu**

Définir les spécifications liées à l'environnement de travail.

#### ➤ **Main d'oeuvre**

L'ensemble du personnel intervenant dans la production de génotypage haut-débit peut être amené à participer à la validation de méthode, selon la planification et les responsabilités définies au préalable et ses compétences avérées. La traçabilité au niveau main d'oeuvre (opérateur, date) doit être renseignée systématiquement.

	<b>Validation de méthode</b>	Version 3.0
GDB_PRO_23	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

#### 5.5.4 Résultats

Les résultats des essais doivent être clairement et complètement renseignés. Il est possible de faire référence à des documents, clairement identifiés/localisés (fichiers de données brutes, documents xwiki, ...).

Chaque essai doit faire l'objet d'une interprétation et d'une conclusion.

### 5.6 Analyse

#### 5.6.1 Facteurs de risques et moyens mis en place pour les maîtriser

Il conviendra de mener une réflexion pour toute validation de méthode et d'identifier et lister les éventuels facteurs de risques émanants pouvant influencer sur le résultat :

- matériel : concerne les causes d'origine technique,
- matière : concerne les causes liées à la nature du produit,
- méthode : concerne les causes liées à la façon de travailler,
- milieu : concerne les facteurs environnementaux lors du mesurage,
- main d'œuvre : concerne les causes liées à une erreur humaine.

Le risque d'intercontamination (définie comme le mélange d'ADN provenant de plus d'un échantillon associé à plusieurs individus (mélange d'ADN, mélange de matrices biologiques etc...)) est à prendre en compte pour chacun des points au regard du domaine d'application de la méthode (analyse de biologie moléculaire).


Le tableau suivant peut être complété autant que nécessaire :

Méthode	Catégorie 5 M ( <i>Matériel, Matière, Méthode, Milieu, Main d'œuvre</i> )	Facteur de risque d'influence de l'essai identifié	Risque	Moyens mis en place pour maîtriser le risque	Evaluation risque après moyens mis en place ( <i>Faible / Moyen / Fort</i> )
	Matériel				
	Matière				
	Méthode				
	Milieu				
	Main d'œuvre				

#### 5.6.2 Incertitudes

Évaluer les incertitudes de mesures de la méthode en considérant les différents types de facteurs pouvant influencer.

L'intercontamination définie comme le mélange d'ADN provenant de plus d'un échantillon associé à plusieurs individus (mélange d'ADN, mélange de matrices biologiques etc...) a un

	<b>Validation de méthode</b>	Version 3.0
GDB_PRO_23	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

impact drastique au niveau du CallRate l'amenant à niveau nettement inférieur à 0,95 de CallRate. Ainsi, par essence, un CallRate > 0,95 assure du fait qu'il n'y ait pas d'intercontamination pour toute analyse réalisée satisfaisant à ce critère de performance. En ce sens, les critères de performance définis dans la présente procédure permettent de vérifier l'absence d'intercontamination au cours du process analytique.

### 5.6.3 Robustesse

La mise à l'épreuve de la méthode par variation de paramètres maîtrisés (exemple : température d'incubation, volume distribué, etc...) doit être réalisée si possible.

### 5.6.4 Conclusion

Chaque validation de méthode doit faire l'objet d'une conclusion finale.

Évoquer les points positifs et négatifs, les conséquences (impacts sur l'organisation, coût, ...).

## 5.7 Sélection, vérification et validation de méthode

### 5.7.1 Sélection

La sélection du mode opératoire relatif à la méthode doit faire état de la prise en compte des différents facteurs définis dans le document [GDB\\_FORM\\_53\\_Validation de méthode](#) et être approuvée par le Directeur Recherche et Développement.

### 5.7.2 Vérification

La preuve que le laboratoire est capable d'atteindre les critères de performance requis pour la méthode conformément aux exigences du client doit être vérifiée. Les enregistrements produits doivent être suffisants.

La vérification doit être documentée, faire état de la prise en compte des différents facteurs définis dans le document [GDB\\_FORM\\_53\\_Validation de méthode](#) et être actée par visa du Directeur Recherche et Développement.


### 5.7.3 Validation

La méthode est validée selon des conditions définies par le Directeur Recherche et Développement.

L'autorisation d'emploi doit inclure :

- la référence du formulaire de validation de méthode [GDB\\_FORM\\_53\\_Validation de méthode intitulé de la méthode\\_AAMMJJ\\_NN\\_vN.N](#), faisant acte de son enregistrement,
- l'intitulé de la méthode, référence de l'essai sélectionné,



	<b>Validation de méthode</b>	Version 3.0
GDB_PRO_23	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

- la vérification de la méthode : approbation des enregistrements et des critères de performance atteints,
- la validation de la méthode :
  - le domaine d'application,
  - les prérogatives relatives aux ressources humaines par rapport à cette méthode,
  - l'autorisation d'emploi (peut être négative, dans ce cas un développement complémentaire peut être nécessaire),
  - la date de mise en application effective de la méthode,
  - l'identité du signataire (accordée par),
  - la date de signature.

### **5.8 Surveillance de la validité de la méthode – Suivi des méthodes**

Des moyens ont été mis en place afin de veiller au suivi des méthodes validées et utilisées par la plateforme de génotypage GD Scan.

Une méthode validée peut être surveillée (liste non exhaustive) :

- de façon hebdomadaire au travers des contrôles répétabilité et reproductibilité selon la méthodologie reprise dans le document [GDB\\_PRO\\_05\\_Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN](#) et des différents outils informatiques mis en place à cet effet,
- de façon mensuelle au travers du reporting statistique mensuel,
- au travers des essais interlaboratoires (au moins une fois par an pour méthode de génotypage)

Afin de garantir la traçabilité de chaque méthode et sa revue régulière, un suivi est réalisé et enregistré dans le document [GDB\\_ENR\\_68\\_Suivi de méthodes de la plateforme GD Scan](#).

## **6. DOCUMENTS ASSOCIÉS**

[GDB\\_MOP\\_08\\_Dosage ADN](#)

[GDB\\_FORM\\_53\\_Validation de méthode](#)

[GDB\\_FI\\_15\\_SNP ISO 580](#)

[GDB\\_ENR\\_68\\_Suivi de méthodes de la plateforme GD Scan](#)