Date de Création : ***19/08/2013***

Date de la remise à jour : ***21/01/2014***

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Nom** | **Hôpital** | **Date** |
| Rédacteur(s) | ***Marie-Pierre BUISINE******Groupe de travail ANPGM*** | CHRU Lille | 19/08/2013 |
| Approbateur(s) | **Conseil d’Administration** |  | 26/02/2014 |
|  |  |  |  |

**Groupe de travail** : Marie-Pierre Buisine (Lille), Bénédicte Gérard (Strasbourg), Etienne Rouleau (I. Curie, Paris ; groupe InterLOQT), Pascale Saugier-Veber (Rouen), Jérôme Bouligand (AP-HP Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre), Myriam Bronner (Nancy), Catherine Costa (AP-HP Cochin, Paris), Claire-Marie Dhaenens (Lille), Bruno Francou (AP-HP Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre), Mathilde Frétigny (Lyon), Tonio Lovecchio (Lille), Michèle Misrahi (AP-HP Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre), Béatrice Parfait (AP-HP Cochin, Paris), Jean-Pierre Rabès (AP-HP Ambroise Paré, Boulogne), Cécile Saint-Martin (APHP Pitié-Salpêtrière, Paris), Aline Saunier (Nancy), Rosa Vargas-Poussou (AP-HP HEGP, Paris), Marie-Claire Vincent (Montpellier)

**Ce document a été présenté à l’AG de l’ANPGM, le 30 janvier 2014**

***Préambule***

*Les méthodes de détection de variation du nombre de copies sont nombreuses et variées : MLPA, QMPSF, MPLC, qPCR, CGH-array... Les documents qui suivent ont pour objectif d’aider à la constitution des dossiers de validation de ces méthodes. Ils décrivent les critères de qualité en vue d’une application dans le domaine de la génétique constitutionnelle. Ces critères ont été définis collégialement par un groupe de travail composé de membres de l’ANPGM et du groupe Unicancer-InterLOQT.*

*Le document qui suit fait la synthèse des éléments importants à prendre en considération pour la constitution d’un dossier de validation de méthode de détection de variation du nombre de copies. Il indique les paramètres à évaluer et donne des conseils quant à la démarche pour y parvenir.*

*Les documents annexes contiennent des propositions pour la constitution des dossiers de validation pour deux méthodes couramment utilisées pour la détection de variation du nombre de copie : MLPA (BP-ANPGM\_007 Annexe 1) et QMPSF (BP-ANPGM\_007 Annexe 2).*

*A noter que ces documents doivent être considérés comme une aide à la constitution des dossiers de validation, non comme une contrainte. Ils sont à adapter en fonction des consignes institutionnelles et de l’environnement propre à chaque laboratoire.*

**Documents de référence :**

- Norme NF EN ISO 15189

- Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale – SH GTA 04

- Mattocks et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. Eur J Hum Genet. 2010 Dec;18(12):1276-88.

- MLPA validation report. Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification (MLPA) – an interlaboratory collaborative validation study, Eurogentest, 2006.

**Recommandations générales pour la validation des méthodes de détection de variation de nombre de copies en génétique constitutionnelle**

***1. Type de validation***

*Les méthodes de détection de variation du nombre de copies doivent faire l’objet d’une* ***validation des performances*** *(****portée flexible étendue B****).*

*Ceci s’étend aux coffrets commerciaux (kits MLPA MRC Holland, PlexAmp® PrestaGen…) en l’absence de marquage CE-IVD et dans la mesure où ils font l’objet de modifications régulières.*

*Il s’agit de méthodes* ***qualitatives******basées sur des données quantitatives****.*

*Les données quantitatives de ces méthodes sont interprétées et les résultats obtenus placés dans une série limitée de catégories, typiquement : 2 copies (normal : 1;1), 1 copie (délétion hétérozygote : 1;0), 3 copies (duplication hétérozygote : 1;2), 0 copie (délétion homozygote : 0;0), 4 copies (duplication homozygote : 2;2, ou triplication : 1;3).*

*Dans ce contexte, la validation de la méthode peut être réalisée selon l’approche* ***qualitative****. Il est proposé néanmoins d’intégrer en supplément deux paramètres issus de l’approche**quantitative**jugés comme pertinents compte tenu du principe des méthodes : la* ***répétabilité*** *et la* ***fidélité intermédiaire****. L’utilisation de cette approche essentiellement qualitative suppose néanmoins de disposer d’échantillons témoins en nombre suffisant (n ≥ 30 avec et sans variation du nombre de copies) afin de pouvoir évaluer la* ***sensibilité*** *et la* ***spécificité*** *de la méthode.*

*Il est à noter que les méthodes de détection des variations de nombre de copies en mosaïque sont en dehors du champ d’application. En effet, les variations de nombre de copies en mosaïque pouvant donner des valeurs intermédiaires, les méthodes pour les détecter relèvent de méthodes* ***quantitatives****.*

***2. Paramètres à valider***

*Pour ce type de méthode qualitative basée sur des données quantitatives, les paramètres clés à valider sont les suivants :*

* *la* ***répétabilité*** *et la* ***fidélité intermédiaire****,*
* *la* ***sensibilité*** *et la* ***spécificité****,*
* *la* ***robustesse****,*
* *la* ***contamination entre échantillons****,*
* *la* ***stabilité des réactifs***
* *et la* ***comparaison avec une autre méthode*** *déjà utilisées au laboratoire (si existe).*

*Le dossier de validation doit s’appuyer sur une* ***revue de la bibliographie****, la* ***collection de données déjà produites par le laboratoire*** *et sur une* ***étude des risques****.*

*La validation de la méthode suppose que les* ***équipements*** *(séquenceur, dHPLC, appareil de PCR temps réel notamment, en fonction de la méthode) aient été préalablement évalués et sont maîtrisés et que les* ***logiciels d’analyse*** *(logiciel d’analyse de fragments…) et les* ***feuilles de calcul*** *associées aient été évalués et validés pour l’application.*

***3. Stratégie générale***

*Quelle que soit la méthode utilisée (MLPA, QMPSF, qPCR…), il est possible de constituer un* ***dossier de validation par test****. Ceci suppose néanmoins de disposer pour le test d’échantillons témoins porteurs d’anomalies en nombre suffisant (≥ 30 valeurs issues d’échantillons porteurs d’anomalies).*

*Aussi, si les applications sont multiples dans un laboratoire, et à partir du moment où les analyses sont réalisées* ***selon des******processus équivalents****, il est proposé de constituer plutôt* ***un dossier de validation initiale de la méthode*** *associé à* ***un dossier de validation par test*** *faisant référence au dossier de validation initiale.*

*Il est en effet à prendre en considération que la prévalence des variations de nombre de copies est généralement faible. De ce fait, l’étude de la sensibilité et de la spécificité**de la méthode**pour un gène donné peut s’avérer difficile, voire impossible, étant donné que le nombre d’échantillons témoins porteurs d’anomalies est souvent très limité. Dans ce contexte, une* ***validation initiale de la méthode*** *présente l’avantage de pouvoir cumuler des échantillons porteurs de variations du nombre de copies dans divers gènes et d’évaluer ainsi les critères de sensibilité et de spécificité de la méthode sur des effectifs acceptables.*

***Remarque :*** *un échantillon avec remaniement (délétion ou duplication) de n exons ou régions génomiques permet de disposer d’ores et déjà de* ***n données différentes*** *à analyser pour le type de remaniement en question.*

*Une* ***validation spécifique par test*** *(gène, groupe de gènes ou régions géniques) reste par ailleurs indispensable, la sensibilité et la spécificité des tests étant dépendantes du design de la méthode : le choix et le positionnement des amorces ou des sondes sont essentiels pour avoir une bonne interprétation des données. Une analyse préalable et documentée de ces données est indispensable avant l’utilisation en routine diagnostique :*

* *vérification de la position des amorces ou/et des sondes par rapport à la région d’intérêt, à des SNP fréquents, à la présence ou non de pseudogène(s) pouvant rendre l’analyse difficile*
* *vérification de l’efficacité de PCR pour la qPCR*

*En revanche, il n'est pas nécessaire de refaire l’étude de la répétabilité et la fidélité intermédiaire de façon systématique, la sensibilité et la spécificité, la robustesse, la contamination entre échantillons, la stabilité des réactifs et la comparaison avec une autre méthode qui auront été préalablement évalués dans le dossier de validation initiale de la méthode. Cela permet, en particulier, de s'affranchir de la nécessité de disposer d’échantillons en nombre suffisant pour disposer d'au moins 30 anomalies pour un test donné.*

*De plus, il est indispensable de vérifier pour chaque test sa performance analytique et de revalider la feuille de calculs qui lui est propre.*

***4. Evaluation des performances de la méthode***

*Remarques générales :*

* *La validation de méthode nécessite de disposer d’****échantillons témoins****, c'est-à-dire d’échantillons avec et sans variation du nombre de copies caractérisés préalablement, soit par un autre laboratoire (échantillon reçu dans le cadre d’une évaluation externe de la qualité (EEQ) ou par échange inter-laboratoires (contrôle interne externalisé)), soit par une autre méthode dans le laboratoire.*
* *La validation initiale de la méthode peut être réalisée sur une ou plusieurs applications en fonction des échantillons témoins disponibles au laboratoire.*
* *Remarque : même si le nombre d’échantillons testés est relativement réduit, les études génèrent un nombre élevé de données exploitables (nombreuses sondes testées en général).*
* *Le laboratoire qui a déjà l’expérience de la méthode peut simplement apporter les* ***éléments de preuve*** *collectés à partir d’analyses déjà réalisées, ou de publications du laboratoire, et apprécier au mieux la spécificité et sensibilité. Le dossier de validation doit contenir ou faire référence à ces éléments de preuve.*
* *Quelle que soit l’approche envisagée (éléments de preuve récoltés sur des données antérieures, publications antérieures, réalisation d’analyses), le laboratoire doit décrire le plan d’expérience choisi (nombre et type d’échantillons testés et les modalités d’analyse).*
* *Le dossier de validation doit s’appuyer sur une* ***revue de la bibliographie****.*
* *La performance du test est assurée par une maîtrise de l’étape analytique de la méthode proprement dite. Néanmoins, cette performance est par ailleurs très dépendante d’éléments en amont de la méthode, qui doivent être également maîtrisés. Ces éléments (choix des amorces/sondes, contrôle de la qualité des produits réactionnels) peuvent être détaillés dans le paragraphe "Maîtrise des risques".*
* *La sensibilité diagnostique, qui correspond globalement au taux de détection des remaniements, doit être évaluée pour chaque application clinique et ne fait pas partie du dossier de validation générale de la méthode.*
* *La qualité de la réaction doit être vérifiée avant analyse des données, le mode de vérification variant en fonction de la méthode. Par exemple, la qualité de la réaction peut être vérifiée par l’analyse des intensités de fluorescence pour la MLPA ou la QMPSF, l’analyse des contrôles internes éventuels, tels que ceux prévus dans les coffrets MLPA MRC Holland (fragments contrôles permettant d’évaluer les étapes de dénaturation, de ligation et la quantité d’ADN matrice), l’analyse des Ct pour la qPCR.*
* *La qualité de l’analyse peut être vérifiée à divers niveaux :*
* *par le calcul de l’****écart-type*** *(ET) ou du* ***CV*** *des* ***ratios intra-normalisés*** *(IN) pour les sondes des échantillons contrôles utilisés comme références*

*et/ou, selon les méthodes,*

* *par l’analyse des valeurs de ratios inter-normalisés obtenus par comparaison aux échantillons de référence, ou* ***quotient de dosage*** *(DQ) pour les sondes des échantillons testés*

*Les critères d’acceptabilité proposés pour les****valeurs de qualité*** *(QV) sont les suivants :*

* *ET(IN) ≤ 0,1 ou CV(IN) ≤ 10%*
* *DQ(sondes contrôles) : 0,8-1,2*

***4.1 Dossier de validation initiale de la méthode***

**4.1.1 Répétabilité et fidélité intermédiaires**

*La* ***répétabilité*** *évalue la reproductibilité intra-laboratoire, par l’analyse répétée d’un même échantillon dans des les mêmes conditions (lors d’un même « run »). Elle peut être évaluée sur des échantillons contrôles ne comportant pas de variation du nombre de copie.*

*La* ***fidélité intermédiaire*** *évalue la reproductibilité intra-laboratoire, par l’analyse répétée d’un même échantillon dans des conditions différentes faisant varier au moins un facteur (opérateur, temps, thermocycleur, lot de réactif…). Ce paramètre permet de s’assurer de la reproductibilité intra-laboratoire de la qualité de la méthode qui est fondée sur des valeurs quantifiables. Elle peut être évaluée sur des échantillons contrôles ne comportant pas de variation du nombre de copie ; cependant, dans l’idéal, la fidélité intermédiaire devrait aussi être évaluée sur des échantillons contrôles porteurs de remaniements génomiques.*

*Les résultats des tests sont exprimés par le calcul du coefficient de variation (CV) des valeurs de DQ.*

***Description et nombres d’échantillons :***

*Il est recommandé que l’analyse statistique des valeurs de DQ soit réalisée sur un minimum de :*

* + *1 échantillon contrôle normal (sans remaniement génomique) analysé au minimum 3 fois dans une même expérience pour évaluer la* ***répétabilité,*** *avec un nombre de valeurs ≥ 30 ;*
	+ *3 échantillons contrôles normaux et, si possible, 1 échantillon contrôle porteur d’un remaniement génomique (dans l’idéal, d’une délétion complète de gène), analysés au minimum 3 fois dans des expériences différentes pour évaluer la* ***fidélité intermédiaire****, avec un nombre de valeurs ≥ 30 (au moins pour les échantillons normaux).*

*Rappel : un échantillon analysé pour n exons ou régions génomiques permet de disposer de n valeurs.*

***Critères d’acceptabilité :***

*Il est proposé les critères suivants pour que le paramètre soit validé :*

*Valeurs de DQ : CV ≤ 10% pour l’ensemble des sondes d’intérêt.*

*Si une sonde sort des critères d’acceptabilité définis, celle-ci doit faire l’objet d’une étude permettant de déterminer des critères d’acceptabilité spécifiques à celle-ci. A défaut, elle devra être exclue de l’analyse.*

**4.1.2 Intervalles de référence**

*Les* ***intervalles de référence*** *déterminent les valeurs de ratios normalisés ou DQ correspondant à un nombre normal de copies, à une délétion hétérozygote, à une duplication hétérozygote…*

*Les intervalles retenus usuellement sont les suivants :*

*Normal : DQ 0,80-1,20*

*Délétion hétérozygote : DQ 0,30-0,70*

*Duplication hétérozygote : DQ 1,30-1,70*

*Délétion homozygote : DQ 0*

*Duplication homozygote : DQ 1,80-2,20*

*Zones « grises » : toutes les autres valeurs de DQ*

*A noter que pour la MLPA, des intervalles de référence plus stringents ont été proposés à* ***titre indicatif*** *par MRC Holland (MLPA General Protocol – Instruction for use, MRC-Holland) :*

*Normal : DQ 0,85-1,15*

*Délétion hétérozygote : DQ 0,35-0,65*

*Duplication hétérozygote : DQ 1,35-1,55*

*Délétion homozygote : DQ 0*

*Duplication homozygote : DQ 1,70-2,20*

*Zones « grises » : toutes les autres valeurs de DQ*

*Après définition des intervalles de référence, il est proposé de les vérifier  à partir d’une population d’échantillons normaux (sans remaniement génomique) et d’une population de sujets avec remaniements génomiques (tous gènes confondus). Il est proposé pour cela d’utiliser les données des expériences de répétabilité et fidélité intermédiaire.*

*En cas d’absence d’échantillons témoins avec remaniements génomiques (de duplications en particulier), il est possible de définir par extrapolation la distribution des valeurs pour une délétion hétérozygote (n copies), une duplication hétérozygote (3n copies), une délétion homozygote (0 copie), une triplication ou duplication homozygote (4n copies), en prenant comme valeurs cibles théoriques 0.5, 1.5, 0, 2, respectivement, auxquelles on attribue une variabilité équivalente à celle observée pour la population normale (valeur cible +/- 3 écarts-types).*

***Critères d’acceptabilité :***

*Il est proposé les critères suivants pour valider les intervalles de référence :*

* *les intervalles de confiance calculés (moyennes des valeurs +/- 3 écarts types), ou à défaut définis par extrapolation, pour les différentes populations testées ne doivent pas être chevauchants dans les conditions analytiques du laboratoire.*
* *les intervalles de confiance observés doivent être compris dans les intervalles de référence définis précédemment*

**4.1.3 Sensibilité et spécificité analytiques : reflet de l’exactitude**

###### **Spécificité**= vrais négatifs / (vrais négatifs + faux positifs)

###### **Sensibilité** =vrais positifs / (vrais positifs + faux négatifs)

***Description et nombres d’échantillons :***

*La sensibilité et la spécificité de la méthode peuvent être évaluées sur un groupe de sujets témoins normaux (sans remaniement génomique) et sur un groupe de sujets témoins porteurs de remaniements connus.*

*L’étude peut être effectuée sur les données issues d’une application pour laquelle le laboratoire dispose de suffisamment de témoins de génotype connus ou sur les données issues de diverses applications afin de disposer d’un effectif de témoins suffisant.*

*La règle de 3 permet d’avoir une bonne estimation de la puissance en fonction de l’effectif (cf. Mattocks et al, 2010) : si n/n mutations ont été détectées lors de l’évaluation, pour une confiance de 95%, la probabilité d’un faux négatif = 3/n. Cette règle est applicable à la détermination de la sensibilité et de la spécificité.*

*Il est proposé que l’analyse statistique soit réalisée sur un échantillonnage comprenant comme témoins positifs au minimum :*

* *soit 1 échantillon avec une délétion complète de tous les amplicons correspondant à la région d’intérêt,*
* *soit 3 contrôles délétés ou dupliqués pour des réarrangements impliquant plusieurs amplicons*

***Critères d’acceptabilité :***

*Il est proposé le critère suivant pour que le paramètre soit validé :*

*Détection par la méthode de tous les remaniements génomiques identifiés préalablement dans les échantillons testés (100 % de concordance avec le génotype connu antérieurement, dans la limite de la méthode.*

*Limites de la méthode : Les remaniements génomiques ne concernant qu’un amplicon peuvent être à l’origine de faux négatifs (cas des remaniements de petite taille situés en dehors de la région réellement couverte par les amorces/sondes) ; ils peuvent également être à l’origine de faux positifs (cas des mutations ou polymorphismes rares situés sous une amorce/sonde).*

**4.1.4 Robustesse**

*La* ***robustesse*** *évalue la capacité de la méthode à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode.*

***Paramètres à faire varier :***

*Pour ce type de méthode, les paramètres à faire varier en priorité sont les suivants :*

* + *Echantillons primaires (sang, échantillons fœtaux…), si pertinent*
	+ *Type d’extraction, si analyse d’ADN extraits à l’extérieur*
	+ *Concentration d’ADN (valeurs basses et valeurs hautes).*

*Les autres paramètres à faire varier peuvent être les suivants : opérateurs, thermocycleurs, séquenceurs.*

***Critères d’acceptabilité :***

*Les variations de ces différents paramètres ne doivent pas altérer de façon significative les valeurs de qualité définies préalablement (CV(IN), DQ).*

**4.1.5 Contamination entre échantillons**

*Le laboratoire doit avoir mis en place des procédés garantissant l’absence de contamination inter-échantillons aux différentes étapes de l’analyse. En particulier, une absence de contamination inter-échantillons doit être démontrée lors de l’utilisation de plate-formes de pipetage ou au niveau du séquenceur automatique.*

***Critères d’acceptabilité :***

*une absence de contamination inter-échantillons aux différentes étapes de l’analyse doit être vérifiée par la mise en place d’une expérience, la collection de preuves, le suivi des CIQ.*

**4.1.6 Stabilité des réactifs**

*Un défaut de stabilité des réactifs peut avoir un impact sur la qualité des produits réactionnels. Il est donc nécessaire de démontrer que les conditions d’utilisation des réactifs et des produits réactionnels dans le laboratoire n’altèrent pas de façon significative les valeurs de qualité.*

*Ceci peut être fait par la mise en œuvre d’expériences, la collection de preuves ou au travers du suivi des CIQ (maîtrise des risques).*

*Des procédures doivent être mises en place dans le laboratoire concernant le stockage des réactifs (suivi des n° de lots, température de stockage) et des produits réactionnels (température de stockage, durée de conservation) afin de limiter les risques de dégradation de la qualité (maîtrise des risques).*

**4.1.7 Comparaison avec une méthode de référence ou avec une méthode déjà utilisée au laboratoire**

*Comparaison avec une méthode de référence : non applicable. Il n’existe pas de méthode de référence pour la détermination du nombre de copies.*

*Comparaison avec une autre méthode :*

*Pour les laboratoires utilisant plusieurs méthodes de détection des remaniements génomiques, il est possible de faire une comparaison de méthode avec des ADN présentant des remaniements détectés ou confirmés par une seconde méthode indépendante (CGH array, qPCR, Southern-blot, MLPA/QMPSF). Cette étude pourra contribuer à définir la sensibilité de la méthode.*

**Feuilles de calculs / logiciels d’analyse**

*Il est important de démontrer que les méthodes de calculs ou/et logiciels d’analyse utilisées pour l’analyse des données permettent d’atteindre les performances requises (à savoir détecter les variations de nombre de copies) et sont maîtrisées.*

*Pour cela, différentes possibilités sont envisageables :*

* *soit utilisation de données de démonstration (injection de données propres dans la table de calcul proposée et analyse des données proposées selon la méthode utilisée par le laboratoire).*

*Par exemple, pour la MLPA, des données de démonstration sont disponibles sur le site NGRL Manchester (www.ngrl.org.uk/Manchester/publications/MLPA%20Spreadsheets).*

* *soit utilisation de données d’autres laboratoires comprenant des témoins positifs et négatifs +/- création de données in silico afin de valider toutes les cibles.*

***4.2 Dossier par test***

* + 1. **Contrôle des amorces / sondes**
* *vérification de la position des amorces ou/et des sondes par rapport à la région d’intérêt, à des SNP fréquents, à la présence ou non de séquences similaires et notamment de pseudogène(s) pouvant rendre l’analyse difficile*
* *vérification de l’efficacité de PCR pour la qPCR*
	+ 1. **Vérification de la performance analytique du test**

*Vérifier les performances analytiques du test sur au moins 3 échantillons témoins normaux, et, dans la mesure du possible, au moins 1 témoin positif :*

* *Montrer que les QV répondent aux exigences définies précédemment dans le dossier initial.*
* *Vérifier que les feuilles de calculs/logiciels spécifiques au test permettent d’atteindre les performances attendues. NB : ne pas oublier de verrouiller les feuilles de calcul après validation*.

*Remarque : une vérification minimale de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire peut être à envisager dans certains cas (par exemple, gènes situés dans des régions riches en GC pouvant rendre l’analyse difficile) (3 répétitions avec le(s) même(s) contrôle(s) ; exploitation des CIQ).*

*Remarque : En cas de modification du protocole (changement d’amorces/sondes pour une application donnée, modification de procédure), il est préconisé de vérifier les performances analytiques du test en réalisant une série en double selon l’ancien et le nouveau protocole.*