



NGS-Diag

SH FORM 43 NGS-DIAG-note technique		
Date de création : 29/01/2019	Date de révision :	Version : 1
Date de 1 ^{ère} application : 23/05/2019	N° document : NGSDIAG_002	
Approbation par le board du réseau le 23/05/2019		

Dossier de validation de méthode NGS : note technique

Composition du groupe de travail :

Sylvie Bannwarth (Biologiste, CHU Nice), Pierre Blanc (Biologiste, AURAGEN ; Expert Technique Cofrac), Agnès Bourillon (Ingénieure technique/qualité, APHP), Nadège Calmels (Biologiste, CHU Strasbourg), Laurent Castera (Biologiste, Centre François Baclesse), Florence Coulet (Biologiste, APHP), Marie De Tayrac (Biologiste, CHU Rennes), Claude Houdayer (Biologiste, CHU Rouen), Marie Karam (Ingénieur qualité, CHU Nantes), Eulalie Lasseaux (Biologiste, CHU bordeaux), Philippe Lochu (Biologiste, Genbio ; Evalueur Technique Cofrac), Delphine Mallet-Motak (Ingénieur technique, CHU Lyon), Jean Muller (Bioinformaticien, CHU Strasbourg), Jean-François Taly (Bioinformaticien, Eurofins), Nancy Uhrhammer (Biologiste, Centre Jean Perrin),

Correspondance : pierre.blanc2@chu-lyon.fr

Abréviations utilisées dans ce document :

CQI : Contrôle de la qualité interne

EEQ : Évaluation Externe de la Qualité

LBM : Laboratoire de Biologie Moléculaire

Sommaire :

Avertissements.....	2
Processus simple ou processus complexe ?.....	2
Dossier de validation de méthode « générique » ou par examen ?.....	3
Modalités de validation : méthode qualitative et/ou quantitative ?	3
Quels échantillons « étalon » pour la validation de méthode ?	4
Quels variants pour la validation de méthode ?	4
Comment aborder l'analyse des risques ?	5
Comment aborder le changement et la revalidation ?.....	5
Entre validation initiale et revalidation : quelle méthode adopter en routine pour le suivi continu des performances ?.....	6

Avertissements

La matrice de SH-FORM43 proposée (NGSdiag_004), le schéma expérimental (NGSdiag_003) qui l'accompagne, le dossier de qualification bioinformatique (NGSdiag_005) et la présente note technique (NGSdiag_002) ne constituent en aucun cas des recommandations. L'objectif du GT est de proposer des outils destinés à faciliter la validation de méthode et l'accréditation des examens de séquençage parallèle massif. Les laboratoires de biologie moléculaire (LBM) sont libres de les adopter, de les adapter à leurs besoins, ou de procéder différemment.

La validation de méthode en séquençage parallèle massif représente nécessairement un point d'équilibre entre les risques, les possibilités techniques et les coûts élevés de cette méthode analytique. Les technologies évoluant à un rythme soutenu, la validation de méthode ne doit pas constituer un obstacle au changement.

Le schéma expérimental proposé est donc conçu de sorte à impacter à minima l'activité de routine (conservation d'un maximum d'échantillons de routine dans chaque run).

Il est également conçu pour répondre à un besoin opérationnel immédiat (LBM ne disposant pas nécessairement de données antérieures ou ayant stabilisé sa méthode depuis peu).

En cas de recul supérieur, les données colligées sont naturellement exploitables (notamment pour la variabilité inter-opérateur, l'exactitude (EEQ), la comparaison de méthode, la contamination et la robustesse).

Le formalisme du SH-FORM43 est adapté aux spécificités techniques des examens de séquençage parallèle massif. Il est rédigé sous la forme d'une matrice dans laquelle les résultats expérimentaux peuvent être directement complétés.

Processus simple ou processus complexe ?

La méthode de séquençage parallèle massif repose sur un processus analytique modulaire incluant les étapes suivantes :

- extraction des acides nucléiques,
- préparation des librairies,
- enrichissement des librairies (le cas échéant),
- séquençage parallèle massif,
- traitement bioinformatique des données.

Le SH-FORM43 peut être donc naturellement être traité en processus complexe. Néanmoins, les performances de la méthode étant essentiellement évaluées en point final, il est également tout à fait possible de le traiter en processus simple. A l'usage, cette dernière option apparaît ergonomique et flexible, raison pour laquelle elle est utilisée dans la présente matrice de SH-FORM43.

Parce qu'elle constitue une étape transversale à plusieurs méthodes, l'extraction des acides nucléiques fait souvent l'objet d'une validation technique indépendante. La référence documentaire de cette validation doit alors être reportée dans les dossiers de validation de méthode concernés.

Les références documentaires des essais de qualifications des matériels utilisés (robots pipetteurs, séquenceurs, etc.) doivent également être reportées dans le dossier de validation de méthode.

Les solutions bioinformatiques font partie intégrante du processus analytique. Elles doivent, à la manière d'un matériel de laboratoire, faire l'objet d'une qualification (c'est à dire de la vérification des performances attendues, dans l'environnement de production du laboratoire). Un dossier type de qualification des solutions bioinformatiques est proposé par ce même groupe de travail. La référence documentaire du dossier de qualification bioinformatique doit apparaître dans le dossier de validation de méthode.

Dossier de validation de méthode « générique » ou par examen ?

Dans le cas d'un LBM utilisant une méthode (préparation de bibliothèques, enrichissement, séquenceur, analyse bioinformatique) commune à plusieurs examens, il apparaît rationnel d'exploiter un dossier de validation de méthode générique pour les examens concernés. Ce dossier est alors relié à des dossiers spécifiques de chaque examen abordant *a minima* : modalités de design, définition de la cible diagnostique, épidémiologie mutationnelle de la cible, couverture de la cible dans les conditions de production (multiplexage & capacité de séquençage définis) et performances de détection des classes de variants retenues.

Hors cette configuration, il peut s'avérer rapidement nécessaire de réaliser plusieurs dossiers de validation de méthode.

Ce peut être le cas, par exemple, lorsqu'une méthode initialement commune aura fait l'objet d'adaptations différentielles au fil du temps selon les secteurs/UF/services, ou bien encore lorsque plusieurs méthodes partiellement divergentes (ex : solutions bioinformatiques distinctes) ou totalement différentes coexistent au sein d'un même LBM/LBMMS, etc.

La matrice de SH-FORM43 proposée permet de répondre à ce second cas d'espèce - plus délicat à gérer - sans prendre le risque d'une discordance entre les différents dossiers de validation de méthode au sein du laboratoire.

Cette option ne dispense pas d'une description du panel, dans le corps du document ou dans un document référencé, équivalente à celle mentionnée supra (modalité de design, définition de la cible diagnostique, etc.)

Modalités de validation : méthode qualitative et/ou quantitative ?

Le SH-FORM43 et le SH-GTA04 guident le rédacteur quant à la nature des validations à effectuer en méthode quantitative et qualitative.

Le résultat analytique terminal étant de nature qualitative (présence d'un variant, zygotie), les items correspondants sont habituellement renseignés.

Toutefois, il convient de relever que :

- ces items ne sont pas conçus comme limitatifs
- bien que qualitatif, le résultat analytique est basé sur des données quantitatives

La matrice de SH-FORM43 propose donc aux LBM qui le souhaitent une stratégie pour aborder l'ensemble des items.

Quels échantillons « étalon » pour la validation de méthode ?

Lorsqu'un examen de biologie médicale (EBM) retourne un seul résultat (quantitatif ou qualitatif), la validation de méthode s'appuie sur un nombre minimal d'échantillons à tester.

Un seul examen de séquençage parallèle massif retourne plusieurs milliers à plusieurs millions de résultats (positions variantes et non variantes), ce pourquoi la validation peut être réalisée à partir d'un nombre restreint d'échantillons, voire *a minima* d'un seul échantillon.

Cette particularité permet de limiter considérablement l'impact de la validation initiale et de la revalidation sur l'activité de routine.

Par échantillon « étalon », il faut entendre tout échantillon biologique ou toute sortie bioinformatique contenant des positions génomiques vérifiées par une méthode orthogonale (Sanger, MLPA...) ou des positions génomiques jugées à « haute confiance ». Ces dernières correspondent en règle à des positions concordantes entre différentes plateformes de séquençage parallèle massif.

Plusieurs types d'échantillons « étalon » peuvent être exploités (avec fichiers de séquences et de variants correspondants) :

1. **Lignées cellulaires ou ADN commerciaux, par exemple :** *National Institute of Standards and Technology (NIST) reference material*
<https://www.corieil.org/1/NIGMS/Collections/NIST-Reference-Materials>
2. **Comparaisons interlaboratoires:** ADN partagés entre laboratoires partenaires, possédant des cibles diagnostiques communes ou chevauchantes et utilisant des méthodes identiques ou si possibles différentes
3. **EEQ, par exemple:** *EMQN's EAQ schemes, DNA Sequencing – NGS (vGermline)*
<https://www.emqn.org/schemes/dna-sequencing-ngs-vgermline/>
4. **Echantillons antérieurement analysés par une méthode orthogonale :** Sanger (l'intégralité de la séquence peut être exploitée), MLPA... .

Ces échantillons peuvent être utilisés respectivement pour l'estimation de la sensibilité analytique, de la justesse, de l'exactitude et la comparaison de méthode. Notons néanmoins qu'il s'agit plus de diversifier les sources de données par lesquelles les performances seront estimées que de répondre à de strictes exigences de formalisme.

Quels variants pour la validation de méthode ?

Le séquençage parallèle massif permet d'analyser simultanément un très grand nombre de positions génomiques sur une gamme comprise entre quelques kilobases et quelques gigabases. La capacité de l'examen à détecter une variation quelconque, et plus encore inconnue, sur chacune des positions couvertes ne peut être évaluée de manière exhaustive. La fiabilité de l'évaluation repose donc sur la stratégie d'échantillonnage.

Nombre de variant: en l'absence de règle établie, le nombre de variant doit être, si possible, cohérent avec la taille de la cible diagnostique.

Types de variants :

- représentatifs des variants que doit détecter l'examen : SNVs, Indels, CNVs... La gamme de taille des Indels et CNV sélectionnés devra être précisée.
- Représentatifs de l'épidémiologie mutationnelle de la cible diagnostique,
- Selon le profil mutationnel du panel : inclusion d'un ou plusieurs échantillons contenant des variants pathogènes d'intérêt : récurrents ou complexes à détecter,
- Selon les points faibles de la méthode de séquençage: inclusion d'un ou plusieurs échantillons contenant des variants pathogènes à risque de non détection.

Les échantillons contenant des variants difficiles à détecter peuvent être exploités dans l'étude de la sensibilité ou alternativement dans l'étude de la robustesse.

Comment aborder l'analyse des risques ?

L'analyse des risques, incluse ou annexée au dossier de validation de méthode, en est sans aucun doute l'un des éléments les plus importants.

Elle restitue, de manière assez fidèle, la compréhension et la maîtrise qu'un LBM possède de la méthode qu'il utilise.

Surtout, compte-tenu de l'impossibilité matérielle ou technique de tester l'intégralité des risques du processus, elle permet de prioriser les éléments à analyser dans le dossier de validation de méthode.

Dans la pratique, l'analyse des risque reprend parfois des items très transversaux du LBM et intègre des risques pré et post analytique. S'il est pertinent de reprendre certains items transversaux, il est en revanche conseillé de se focaliser sur l'analytique et d'effectuer une revue approfondie des facteurs susceptibles d'altérer le résultat de l'examen.

L'étude des risques analytique est naturellement évolutive.

Comment aborder le changement et la revalidation ?

La norme NF EN ISO 15189 précise au 5.5.1.3 : « *Si des modifications sont apportées à une procédure analytique validée, l'influence de ces modifications doit être documentée et, le cas échéant, une nouvelle validation doit être réalisée.* »

Changement du nombre de gènes d'un panel, modification du protocole d'une préparation d'une librairie, changement de fournisseur de sonde de capture, changement de matériel...il appartient au laboratoire de faire évoluer son analyse de risque et de déterminer l'étendue de la revalidation de sa méthode.

L'usage d'un contrôle de qualité interne contenant de nombreux variants confirmés ou à haute confiance facilite la revalidation.

Dans l'éventualité où une revalidation complète s'avèrerait nécessaire, le schéma expérimental proposé est destiné à l'intégrer au mieux dans l'activité de routine.

Entre validation initiale et revalidation : quelle méthode adopter en routine pour le suivi continu des performances ?

Un contrôle interne de qualité (CQI) permet de monitorer les performances de la méthode et de vérifier les performances des nouveaux lots de réactifs (essais d'acceptation).

Le coût de la méthode et les conditions de multiplexage définies par le laboratoire peuvent soulever des réserves quant à l'ajout systématique, dans chaque run, d'un échantillon ayant fonction de CQI.

En constitutionnel d'autre part, le choix du CQI se porte généralement sur un échantillon comportant un variant pathogène d'intérêt (récurrent ou complexe). L'information obtenue à partir de ce seul variant est limitée. Elle ne donne que peu d'orientation sur les paramètres techniques de la méthode qui peuvent être amenés à dériver ou dysfonctionner.

Il est donc conseillé d'exploiter plus avant l'information contenue dans l'échantillon CQI (métriques d'alignement, métriques des positions variantes...), de définir des critères d'acceptation et si possible d'établir une correspondance entre les métriques choisies et les paramètres techniques qui sont susceptibles de les impacter.

La problématique du CQI peut alors être résolue selon différentes stratégies :

1. Passage systématique d'un échantillon CQI dans chaque run : cette option est généralement mieux acceptée lorsque les runs deviennent ≥ 24 -plex. Avantage : monitoring continu. Limite : selon la méthode, les étapes de regroupement des échantillons introduisent un peu de variabilité à chaque run, y compris dans les métriques du CQI, nécessitant un peu de recul pour définir les critères d'acceptation.
2. Passage ponctuel d'un échantillon CQI : aléatoire, ou lors des changements de lots selon analyse des risques, etc.
3. Pas d'échantillon CQI en tant que tel : Les métriques internes à chaque échantillon d'un run constituent un « équivalent-CQI ». Elles sont exploitées tant pour la validation technique de l'échantillon et du run, que pour le suivi continu des performances de la méthode et l'acceptation des réactifs.