

**Comité technique**

Soixantième session

Genève, 21 et 22 octobre 2024

**SESSIONS/2024/6****Original** : anglais**Date** : 25 septembre 2024**Comité administratif et juridique**

Quatre-vingt-unième session

Genève, 23 octobre 2024

**TECHNIQUES MOLÉCULAIRES***Document préparé par le Bureau de l'Union**Avertissement : le présent document ne représente pas les principes ou les orientations de l'UPOV.**Ce document a été généré à l'aide d'une traduction automatique dont l'exactitude ne peut être garantie. Par conséquent, le texte dans la langue originale est la seule version authentique.***RESUMÉ**

1. Le présent document a pour objet de rendre compte au Comité technique (TC) et au Comité administratif et juridique (CAJ) de l'évolution des techniques moléculaires.

2. Le TC est invité à :

(a) demander aux groupes de travail techniques (TWP) d'examiner, lors de leurs sessions de 2025, la proposition de lignes directrices pour la validation d'un nouveau protocole de marqueurs moléculaires propres à un caractère pour l'examen DHS, telle qu'elle figure à l'annexe du présent document;

(b) prendre note de la demande des organisations d'obteneurs concernant l'élaboration d'orientations au sein de l'UPOV sur la confidentialité des données moléculaires et de l'offre de proposer un projet de modèle d'accord, qui sera présenté à la troisième session du Groupe de travail technique sur les méthodes et techniques d'essai (TWM); et

(c) prendre note des éléments d'information fournis dans le présent document.

3. Les abréviations suivantes sont utilisées dans ce document :

CAJ :	Comité administratif et juridique
ISTA :	Association internationale d'essais de semences
OCDE :	Organisation de coopération et de développement économiques
TC:	Comité technique
TWA:	Groupe de travail technique sur les plantes agricoles
TWF:	Groupe de travail technique sur les plantes fruitières
TWM:	Groupe de travail technique sur les méthodes et techniques d'essai
	Groupe de travail technique sur les plantes ornementales et les arbres forestiers
TWP:	Groupe(s) de travail technique(s)
TWV:	Groupe de travail technique sur les plantes potagères

4. La structure de ce document est la suivante :

LIGNES DIRECTRICES POUR LA VALIDATION D'UN NOUVEAU PROTOCOLE DE MARQUEUR MOLÉCULAIRE SPÉCIFIQUE À UN CARACTÈRE EN TANT QUE MÉTHODE ALTERNATIVE D'OBSERVATION.....	2
Contexte .....	3
Développements au sein des groupes de travail techniques lors de leurs sessions en 2024 .....	3
<i>Groupe de travail technique sur les méthodes et techniques d'essai (TWM)</i> .....	3
QUESTIONS POUR INFORMATION.....	4
Faits nouveaux survenus lors de la deuxième session du Groupe de travail technique sur les méthodes et techniques d'essai (TWM) .....	4
Développements dans les techniques moléculaires et la bioinformatique.....	4
<i>Derniers développements en matière de techniques moléculaires et de bioinformatique</i> .....	4
<i>Coopération entre les organisations internationales</i> .....	4
<i>Compte rendu des travaux sur les techniques moléculaires en relation avec l'examen DHS</i> .....	4
<i>L'utilisation de techniques moléculaires dans l'identification des variétés</i> .....	6
ANNEXE :Lignes directrices pour la validation d'un nouveau protocole de marqueur moléculaire spécifique à un caractère pour les études DHS en tant que méthode alternative d'observation.	

#### LIGNES DIRECTRICES POUR LA VALIDATION D'UN NOUVEAU PROTOCOLE DE MARQUEUR MOLÉCULAIRE SPÉCIFIQUE À UN CARACTÈRE EN TANT QUE MÉTHODE ALTERNATIVE D'OBSERVATION

5. Le TWM<sup>1</sup>, à sa deuxième session, a entendu un exposé de Mme Amandine LeVan (France) sur les "Lignes directrices pour la validation d'un nouveau protocole de marqueur moléculaire spécifique à un caractère pour les études d'examen DHS en tant que méthode alternative d'observation", dont une copie figure dans le document TWM/2/17. Le TWM a noté que les propositions formulées au cours de l'exposé seront examinées par le TWV et rapportées au TC, lors de leurs sessions en 2024.

6. Le TWV<sup>2</sup>, à sa cinquante-huitième session, a examiné le document TWV/58/9, présenté par un expert des Pays-Bas (Royaume des). Le document TWV/58/9 est reproduit à l'annexe du présent document.

7. Le TWV est convenu que les indications relatives à l'évaluation des caractères à l'aide des marqueurs moléculaires présentés dans les principes directeurs d'examen gagneraient à être harmonisées au niveau international.

8. Le TWV est convenu de proposer la suppression de la dernière phrase du paragraphe 5 et l'inclusion d'une référence aux orientations respectives de l'UPOV applicables aux normes ISO mentionnées.

9. Le TWV a accepté de proposer de modifier les informations fournies dans le tableau du protocole, point 8, afin de préciser que "si le résultat du test du marqueur d'ADN ne confirme pas la déclaration figurant dans le questionnaire technique, un essai en plein champ ou un essai biologique doit être effectué pour évaluer l'exactitude de la déclaration figurant dans le questionnaire technique".

10. Le TWV a noté que des marqueurs moléculaires spécifiques à un caractère peuvent être utilisés par les obtenteurs et est convenu qu'ils ont le droit d'informer l'examineur de la méthode d'évaluation utilisée pour évaluer les caractères dans le questionnaire technique, dans les cas où un marqueur moléculaire est disponible en lieu et place de celui indiqué dans le questionnaire technique.

*11. Le TC est invité à demander aux TWP, lors de leurs sessions en 2025, d'examiner la proposition de lignes directrices pour la validation du protocole de nouveaux marqueurs moléculaires spécifiques de caractéristiques pour l'examen DHS, telle qu'elle figure à l'annexe du présent document.*

<sup>1</sup> TWM, deuxième session, tenue par voie électronique, du 8 au 11 avril 2024. Voir le document TWM/2/21 "Compte rendu", paragraphes 57 à 61.

<sup>2</sup> TWV, cinquante-huitième session, tenue par voie électronique, du 22 au 25 avril 2024. Voir le document TWV//58/11 "Compte rendu", paragraphes 54 à 58.

## CONFIDENTIALITÉ ET PROPRIÉTÉ DES INFORMATIONS MOLÉCULAIRES

Contexte

12. Le TC, à sa cinquante-huitième session<sup>3</sup>, a pris note des discussions tenues aux TWP, lors de leurs sessions de 2022, sur la "confidentialité et la propriété des informations moléculaires". Le TC a pris note des préoccupations exprimées par les organisations d'obteneurs lors du TWM, à savoir que les informations moléculaires utilisées lors de l'examen d'une variété ne devraient pas être partagées par le service qui a reçu la demande sans l'autorisation de l'obteneur. Le TC est convenu d'inviter les membres et les observateurs à rendre compte des politiques existantes en matière de confidentialité des informations moléculaires aux TWP, lors de leurs sessions en 2023 (voir le document TC/58/31 "Compte rendu", paragraphes 48 à 50).

13. Le TC, à sa cinquante-neuvième session<sup>4</sup>, a pris note des politiques rapportées et des discussions sur la confidentialité des informations moléculaires lors des sessions des TWP en 2023. Le TC est convenu de renouveler l'invitation faite aux membres et aux observateurs de rendre compte des politiques existantes en matière de confidentialité des informations moléculaires aux TWP, lors de leurs sessions en 2024.

14. Le document SESSIONS/2023/5 "Techniques moléculaires" fournit de plus amples informations sur cette question.

Développements au sein des groupes de travail techniques lors de leurs sessions en 2024

15. Lors de leurs sessions en 2024, les TWP ont été invités à faire des présentations et à rendre compte d'exemples de politiques en matière de confidentialité et d'accès aux données moléculaires. Aucun compte rendu sur les politiques existantes en matière de confidentialité n'a été signalé au TWA, au TWF, au TWO et au TWV.

*Groupe de travail technique sur les méthodes et techniques d'essai (TWM)*

16. Le TWM<sup>5</sup> a entendu un exposé sur la confidentialité de l'information moléculaire présenté par M. Marcel Bruins, de CropLife International, au nom de l'Association africaine du commerce des semences (AFSTA), de l'Association des semences de l'Asie et du Pacifique (APSA), de la Communauté internationale des obtenteurs de plantes horticoles à reproduction asexuée (CIOPORA), de CropLife International, d'Euroseeds, de l'International Seed Federation (ISF) et de la Seed Association of the Americas (SAA) (les "organisations d'obteneurs"). Un exemplaire de l'exposé figure dans le document TWM/2/7.

17. Le TWM a pris note de la demande des organisations d'obteneurs concernant l'élaboration d'orientations au sein de l'UPOV sur la confidentialité des données moléculaires et de l'offre de proposer un projet de modèle d'accord, qui sera présenté à sa troisième session.

Exemples de politiques relatives à la confidentialité et à l'accès aux données d'information moléculaire

18. Le TWM a noté que l'Union européenne devrait adopter une politique sur l'accès aux échantillons de variétés végétales, y compris les échantillons d'ADN, dont il sera rendu compte lors des TWP en 2024.

19. Le TWM est convenu d'inviter les membres de l'UPOV à rendre compte, lors de sa troisième session, des politiques existantes en matière de confidentialité des informations moléculaires.

*20. Le TC est invité à prendre note de la demande des organisations d'obteneurs concernant l'élaboration d'orientations au sein de l'UPOV sur la confidentialité des données moléculaires et de l'offre de proposer un projet de modèle d'accord, qui sera présenté à la troisième session du TWM.*

---

<sup>3</sup> TC, cinquante-huitième session, tenue à Genève, les 24 et 25 octobre 2022.

<sup>4</sup> TC, cinquante-neuvième session, tenue à Genève, les 23 et 24 octobre 2023.

<sup>5</sup> TWM, deuxième session, tenue par voie électronique, du 8 au 11 avril 2024. Voir le document TWM/2/21 "Compte rendu", paragraphes 57 à 61.

## QUESTIONS POUR INFORMATION

Faits nouveaux survenus lors de la deuxième session du Groupe de travail technique sur les méthodes et techniques d'essai (TWM)

21. Le TWM a tenu sa deuxième session par voie électronique du 8 au 11 avril 2024. Les sections suivantes rendent compte des développements sur les techniques moléculaires.

Développements dans les techniques moléculaires et la bioinformatique*Derniers développements en matière de techniques moléculaires et de bioinformatique*Norme OMPI ST.26 - Séquence OMPI

22. Le TWM a entendu un exposé de Mme Emma Francis, de l'Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI), sur la "Norme ST.26 de l'OMPI - Séquence OMPI", dont une copie figure dans le document TWM/2/15.

23. Le TWM a noté que des algorithmes de recherche pourraient être mis au point pour les bases de données contenant des informations sur les nucléotides ou les acides aminés en utilisant le format de données ST.26 de l'OMPI, y compris les données sur les variétés végétales.

*Coopération entre les organisations internationales*OCDE

24. Le TWM a entendu un exposé de M. Csaba Gaspar, de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), sur les "Derniers développements dans l'application de BMT dans le cadre des systèmes de semences de l'OCDE", dont une copie figure dans le document TWM/2/19.

25. Le TWM a pris note de l'utilisation des techniques moléculaires dans les systèmes de semences de l'OCDE en tant que procédure supplémentaire pour l'identification des variétés dans les essais en plein champ.

26. Le TWM a noté que l'OCDE envisageait d'évaluer les caractéristiques à l'aide de l'analyse d'images et que l'utilisation d'algorithmes d'intelligence artificielle devrait être envisagée à l'avenir.

ISTA

27. Le TWM a entendu un exposé de Mme Ana Laura Vicario, de l'Association internationale d'essais de semences (ISTA), sur le "Compte rendu de l'ISTA sur l'utilisation des techniques moléculaires", dont une copie figure dans le document TWM/2/18.

28. Le TWM a pris note de l'invitation faite aux experts intéressés de participer aux activités du Comité des variétés de l'ISTA.

29. Le TWM a remercié l'OCDE et l'ISTA d'avoir rendu compte de l'évolution de l'utilisation des techniques moléculaires dans leurs organisations respectives.

30. Le TWM a pris note de l'invitation de l'UPOV à organiser conjointement un atelier de l'OCDE, de l'ISTA et de l'UPOV à l'avenir afin d'examiner l'utilisation des techniques moléculaires dans chaque organisation et d'étudier la possibilité d'une collaboration plus poussée dans ce domaine.

*Compte rendu des travaux sur les techniques moléculaires en relation avec l'examen DHS*Gestion des collections de référence à l'aide de marqueurs moléculaires : une nouvelle approche basée sur la prédiction génomique

31. Le TWM a examiné le document TWM/2/4 et a entendu un exposé de M. Adrian Roberts (Royaume-Uni) sur la prédiction génomique pour la gestion des collections de référence, dont une copie est reproduite dans le document TWM/2/4 Add.

32. Le TWM a noté que la méthode de prédiction génomique vise à établir des liens entre les marqueurs moléculaires et l'expression phénotypique des caractères dans les variétés de ray-grass, et qu'elle pourrait éventuellement contribuer à la gestion des collections de variétés.

33. Le TWM a noté que la méthode de prédiction génomique a été mise au point à l'aide de données provenant d'un seul site d'essai et qu'elle sera évaluée de manière plus approfondie sur d'autres cultures pour lesquelles on dispose de données provenant de différents sites.

#### Évaluation de l'uniformité à l'aide de marqueurs moléculaires

34. Le TWM a examiné le document TWM/2/5 et a entendu un exposé de M. Adrian Roberts (Royaume-Uni) sur l'évaluation de l'homogénéité à l'aide de marqueurs moléculaires, dont une copie est reproduite dans le document TWM/2/5 Add.

35. Le TWM a noté que la recherche avait été menée pour évaluer la variabilité génétique d'une culture allogame (ray-grass) avec des caractères mesurés et non testés sur des caractères pseudo-qualitatifs.

36. Le TWM a noté que les prochaines étapes de la recherche pourraient permettre d'étudier l'erreur de mesure associée à la méthodologie de séquençage par le biais d'essais indépendants avec le même échantillon groupé.

#### Approches moléculaires à l'appui de l'examen DHS

37. Le TWM a examiné le document TWM/2/6 et a entendu un exposé de Mme Vanessa McMillan (Royaume-Uni) sur les approches moléculaires à l'appui de l'examen DHS, dont une copie est reproduite dans le document TWM/2/6 Add.

38. Le TWM a noté que jusqu'à 75% de la corrélation marqueur-trait a été obtenue dans les variétés d'orge, mais pas en ce qui concerne les caractères DHS. Le TWM a pris note de l'intention de publier les marqueurs moléculaires identifiés dans le cadre du projet, qui pourraient également être utilisés pour authentifier les nouveaux stocks de semences des variétés. Le TWM est convenu d'inviter l'expert du Royaume-Uni à rendre compte de l'état d'avancement du projet à sa troisième session.

#### Activités de R&D de l'OCVV

39. Le TWM a entendu un exposé de Mme Cécile Collonnier (Union européenne) sur les activités de recherche-développement de l'OCVV, dont une copie figure dans le document TWM/2/12.

40. Le TWM a noté les contributions des différents projets présentés, en particulier le projet INVITE, qui se terminera en 2024.

#### Maize6H-60K : Un réseau de polymorphismes de nucléotides simples à l'échelle du génome et son application

41. Le TWM a entendu un exposé de Mme Hongli Tian (Chine) sur "Maize6H-60K : Un réseau de polymorphisme nucléotidique unique à l'échelle du génome et son application", dont une copie figure dans le document TWM/2/16.

42. Le TWM a noté que 21 % des SNP du réseau étaient situés dans des régions codantes du génome, bien que leur lien avec l'expression des caractères n'ait pas encore été identifié.

#### Lignes directrices pour la validation d'un nouveau protocole de marqueur moléculaire spécifique à un caractère pour les études DHS en tant que méthode alternative d'observation

43. Le TWM a entendu un exposé de Mme Amandine LeVan (France) sur les "Directives pour la validation d'un nouveau protocole de marqueur moléculaire spécifique à un caractère pour les études d'examen DHS en tant que méthode de substitution pour l'observation", dont une copie figure dans le document TWM/2/17.

44. Le TWM a noté que la proposition serait examinée par le TWV et rapportée au TC, lors de leurs sessions en 2024.

*L'utilisation de techniques moléculaires dans l'identification des variétés*

Utilisation de marqueurs basés sur l'intelligence artificielle pour la traçabilité des variétés

45. Le TWM a entendu un exposé de Mme Ana Laura Vicario (Argentine) sur l'utilisation de marqueurs basés sur l'intelligence artificielle pour la traçabilité des variétés, dont le texte figure dans le document TWM/2/9.

46. Le TWM a noté que la technologie est utilisée dans les procédures de routine pour le contrôle du marché et la traçabilité des variétés d'orge et de blé en Argentine. Le TWM note que cette technologie est en cours de développement pour les variétés de soja.

47. Le TWM a noté que l'algorithme utilisé établit des schémas uniques pour chaque variété sur la base de la morphologie des semences. Le TWM a noté que les seuils de prise de décision et d'erreur acceptée pourraient être ajustés pour permettre l'analyse de la pureté variétale.

LociScan, un outil de sélection des combinaisons de marqueurs génétiques pour la discrimination des variétés végétales

48. Le TWM a entendu un exposé de M. Yang Yang (Chine) sur "LociScan, un outil de sélection de combinaisons de marqueurs génétiques pour la discrimination des variétés végétales", dont une copie figure dans le document TWM/2/14.

49. Le TWM a noté que l'outil logiciel LociScan identifie les combinaisons de jeux de marqueurs afin d'optimiser le nombre de marqueurs nécessaires pour distinguer les variétés. Le TWM a noté que le temps d'analyse requis par l'outil serait influencé par le nombre d'échantillons traités et non par le nombre de marqueurs utilisés.

50. Le TWM a noté que l'outil logiciel LociScan était disponible pour être testé et a accepté d'inviter les experts intéressés à tester l'outil et à communiquer les résultats à l'expert de la Chine.

*51. Le TC et le CAJ sont invités à prendre note des éléments d'information fournis dans ce document.*

[L'annexe suit]

## EXTRAIT DU DOCUMENT TWV/58/9

LIGNES DIRECTRICES POUR LA VALIDATION D'UN NOUVEAU PROTOCOLE DE MARQUEUR  
MOLÉCULAIRE SPÉCIFIQUE À UN CARACTÈRE EN TANT QUE MÉTHODE ALTERNATIVE  
D'OBSERVATION

*Document préparé par des experts de la France, l'Italie et le Royaume des Pays-Bas*

*Avertissement : le présent document ne représente pas les principes ou les orientations de l'UPOV.*

DOCUMENTS ASSOCIÉS.....	1
I. OBJECTIFS DES PRÉSENTES LIGNES DIRECTRICES.....	2
II. CHAMP D'APPLICATION DES PRÉSENTES LIGNES DIRECTRICES.....	2
III. CRITÈRES DE PERFORMANCE POUR UN NOUVEAU PROTOCOLE BASÉ SUR LES MARQUEURS MOLÉCULAIRES.....	2
Spécificité.....	2
<i>Définition</i> .....	2
<i>Exigence</i> .....	2
Comment l'évaluer.....	2
Sensibilité et limite de détection.....	2
<i>Définition</i> .....	2
<i>Exigence</i> .....	3
Répétabilité.....	3
<i>Définition (basée sur ISO 16 577:2016)</i> .....	3
<i>Exigence</i> .....	3
<i>Comment l'évaluer ?</i> .....	3
Reproductibilité.....	3
<i>Définition (basée sur ISO 16 577:2016)</i> .....	3
<i>Exigence</i> .....	3
<i>Comment l'évaluer ?</i> .....	3
Robustesse.....	4
<i>Définition</i> .....	4
<i>Exigence</i> .....	4
<i>Comment l'évaluer ?</i> .....	4
IV. RAPPORT DE VALIDATION.....	4
Contenu du rapport de validation.....	4
Publicité.....	4
V. PROTOCOLE STANDARD POUR LE PROTOCOLE DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES SPÉCIFIQUES AUX CARACTÉRISTIQUES.....	5
VI. ENQUÊTE DE SUIVI APRÈS L'APPROBATION.....	8

## DOCUMENTS ASSOCIÉS

1. Veuillez noter que les parties surlignées sont des citations des documents ci-dessous :
  - TG/1/3: Introduction générale à l'examen de la distinction, de l'homogénéité et de la stabilité et à l'élaboration de descriptions harmonisées des obtentions végétales
  - TG/44: Directives pour la conduite des tests de distinction, d'homogénéité et de stabilité pour la tomate
  - TGP/12: Conseils en ce qui concerne certains caractères physiologiques
  - TGP/15: Conseils en ce qui concerne l'utilisation des marqueurs biochimiques et moléculaires dans l'examen de la distinction, de l'homogénéité et de la stabilité (DHS)
  - UPOV/INF/17 Directives concernant les profils d'ADN : choix des marqueurs moléculaires et construction d'une base de données y relative
  - UPOV/INF/18 Utilisation possible des marqueurs moléculaires dans l'examen de la distinction, de l'homogénéité et de la stabilité (DHS)
  - TWV/54/7 + Add Utilisation de techniques moléculaires dans l'examen DHS

## I. OBJECTIFS DES PRÉSENTES LIGNES DIRECTRICES

2. L'objectif de ces directives est de développer les principes contenus dans l'introduction générale (document TG/1/3), et les documents TGP associés, en directives pratiques détaillées pour la validation harmonisée d'une nouvelle méthode fondée sur un marqueur moléculaire avant son utilisation en tant qu'essai alternatif. Les critères de performance requis pour la validation sont décrits et des orientations sur leur évaluation sont données. Ces lignes directrices décrivent également un protocole standard avec des chapitres obligatoires et facultatifs. L'enquête après acceptation est également décrite.

3. Si une technique différente est utilisée, le laboratoire doit valider sa méthode par rapport à la méthode de référence (pour montrer que la technique alternative donne les mêmes résultats).

## II. CHAMP D'APPLICATION DES PRÉSENTES LIGNES DIRECTRICES

Toutes les cultures

Marqueurs moléculaires spécifiques aux caractéristiques

Pour l'examen de la distinction, de l'uniformité et de la stabilité (DHS).

## III. CRITÈRES DE PERFORMANCE POUR UN NOUVEAU PROTOCOLE BASÉ SUR LES MARQUEURS MOLÉCULAIRES

### Spécificité

#### *Définition*

4. Corrélation entre le génotype et le phénotype, *c'est-à-dire* fiabilité du lien entre le marqueur et le caractère.

#### *Exigence*

5. En principe, la corrélation entre le génotype et le phénotype est de 100 %. Si la corrélation est inférieure à 100 %, un ou plusieurs tests de suivi doivent être effectués pour garantir la fiabilité des résultats. Une règle de décision peut être utilisée dans ce cas. Une corrélation inférieure à 100 % peut être due à d'autres facteurs génétiques. Elle peut également suggérer que la non-corrélation n'est pas due au marqueur mais à des facteurs externes dans les observations phénotypiques (*par exemple, un biotest pour la résistance à une maladie*).

### Comment l'évaluer

6. Nombre de variétés : "*Pour entamer le processus de sélection des marqueurs, un nombre approprié de variétés (ensemble de développement) est nécessaire pour refléter au maximum la diversité observée au sein du groupe/culture/espèce/type pour lequel les marqueurs sont censés être discriminants.*"

7. Les variétés doivent représenter les différents niveaux d'expression (si les variétés connues sont hétérozygotes et homozygotes), provenir de différentes sociétés de semences, avec différents fonds génétiques du caractère et différents types. Des variétés bien caractérisées sur le plan phénotypique pour le caractère considéré doivent être utilisées lorsqu'elles sont disponibles.

8. Nombre de plantes par variété végétale : Au moins une plante par variété s'il existe des variétés bien caractérisées sur le plan phénotypique. Dans le cas contraire, le nombre de plantes doit être le même que pour l'observation morphologique décrite dans la directive de l'UPOV.

9. La spécificité peut être évaluée au sein d'un seul laboratoire.

### Sensibilité et limite de détection

#### *Définition*

10. La limite de détection est définie comme la quantité minimale de la cible qui peut être détectée de manière fiable.

11. Dans le cas d'analyses effectuées sur des échantillons en vrac (*par exemple*, un ensemble de différentes plantes de la même variété), la sensibilité est critique et doit être évaluée. Pour l'utilisation sur des plantes individuelles, la quantité de la cible n'est pas critique et ce critère de performance est facultatif.

#### *Exigence*

12. Dans le cas d'un ensemble, l'exigence serait de détecter au moins un type d'infraction dans l'ensemble.

#### *Comment l'évaluer ?*

13. Utiliser des échantillons artificiels en mélangeant un type différent à un ensemble pour vérifier la sensibilité de la détection.

#### Répétabilité

##### *Définition (basée sur ISO 16 577:2016)*

14. "Répétabilité : lorsque des résultats d'essai identiques sont obtenus avec la même méthode, sur des éléments d'essai identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur, à l'aide du même équipement, à de courts intervalles de temps.

15. Pour les méthodes qualitatives, la conformité est équivalente à la répétabilité des méthodes quantitatives (Langton *et al.*, 2002).

#### *Exigence*

16. Idéalement 100%, une performance  $\geq 90\%$  est généralement acceptée. Si la répétabilité de la méthode de référence est publiée, la répétabilité de la méthode alternative doit être au moins équivalente.

#### *Comment l'évaluer ?*

17. La répétabilité peut être évaluée au sein d'un même laboratoire.

18. Au moins trois réplicats techniques provenant d'une même plante (trois extractions d'ADN indépendantes). Inclure au moins tous les types de génotypes attendus.

#### Reproductibilité

##### *Définition (basée sur ISO 16 577:2016)*

19. "Reproductibilité : lorsque les résultats des essais sont obtenus avec la même méthode, sur des éléments d'essai identiques, dans le même laboratoire ou entre différents laboratoires, avec des opérateurs différents, en utilisant des équipements différents" à des moments différents.

20. Pour les méthodes qualitatives, la concordance est équivalente à la reproductibilité des méthodes quantitatives (Langton *et al.*, 2002).

#### *Exigence*

21. Idéalement 100%, une performance  $\geq 90\%$  est généralement acceptée. Si la reproductibilité de la méthode de référence est publiée, la reproductibilité de la méthode alternative doit être au moins équivalente.

#### *Comment l'évaluer ?*

22. La reproductibilité doit être évaluée entre différents laboratoires par une étude de validation interlaboratoire (Ring-test) avec des échantillons codés de génotypes connus. Tous les types de génotypes attendus doivent être inclus.

23. Le ring-test doit impliquer au moins trois laboratoires différents, dont au moins deux bureaux d'examen différents (*par exemple*, dans le projet INVITE, trois bureaux d'examen ont été impliqués dans le test de validation). Si possible, des laboratoires expérimentés connaissant l'espèce et la technique doivent être impliqués. Si ce n'est pas le cas, une formation peut être organisée avant le ring-test avec des échantillons non codés. Les laboratoires peuvent participer à un test circulaire sur une base volontaire. S'il n'y a pas de volontaires, la reproductibilité peut être déterminée au sein d'un seul laboratoire.

24. Tous les laboratoires doivent suivre le protocole pour être validés. Dans le protocole, les parties obligatoires et facultatives peuvent être définies par l'équipe de validation. Par exemple, voir le protocole CPVO/TP-044/4-Rev. où les étapes obligatoires et facultatives ont été définies.

25. Nombre de variétés : Inclure au moins tous les types de génotypes attendus.

26. Des lignes directrices/normes sur les études interlaboratoires peuvent être suivies : ISO 13495 *Denrées alimentaires - Principes de sélection et critères de validation pour les méthodes d'identification variétale utilisant un acide nucléique spécifique*, ISO 17043 *Évaluation de la conformité - Exigences générales pour les essais d'aptitude*, OEPP pm7-122-2 *Lignes directrices pour l'organisation de comparaisons interlaboratoires par les laboratoires de diagnostic des organismes nuisibles aux végétaux*, ISTA TCOM-P-10-*Validation des méthodes de santé des semences et organisation et analyse des essais comparatifs interlaboratoires (EC)*... L'équipe de validation peut citer les lignes directrices suivies dans son rapport.

### Robustesse

#### *Définition*

27. "Robustesse : mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des écarts faibles mais délibérés par rapport aux conditions expérimentales décrites dans les paramètres de la procédure et donne une indication de sa fiabilité lors d'une utilisation normale" (par exemple, changement de méthode d'extraction de l'ADN ou changement de machine en temps réel).

#### *Exigence*

28. Idéalement 100%, si c'est moins, cela signifie que la méthode n'est pas robuste à un changement d'un paramètre et cela devrait être indiqué dans le protocole comme une étape obligatoire (*par exemple*, un changement d'un mastermix qui serait critique).

#### *Comment l'évaluer ?*

29. L'évaluation est facultative et la robustesse est évaluée en partie lors de l'essai circulaire (reproductibilité) (différents laboratoires, équipements, machines, personnes, etc.)

## IV. RAPPORT DE VALIDATION

30. Le rapport de validation et les résultats doivent être revus par deux (de préférence trois si la reproductibilité a été effectuée dans un seul laboratoire) des bureaux d'examen. L'examen est facultatif, mais il est préférable qu'il soit effectué par un laboratoire connaissant bien l'espèce et la méthode.

31. Au cours du processus de révision, les réviseurs peuvent demander des données de validation supplémentaires en concertation avec l'équipe de validation.

### Contenu du rapport de validation

- Données brutes générées au cours des différentes étapes du processus de validation
- Protocole détaillé avec définition des étapes optionnelles et obligatoires
- Évaluation des critères de performance
- Conclusion

### Publicité

32. Le rapport de validation devrait être disponible sur demande. Dans le nouveau protocole, le processus de validation doit être mentionné avec l'office d'examen de contact. Dans certains cas particuliers, par exemple un "protocole de secret commercial" (stérilité mâle cytoplasmique chez le chou), le protocole et le rapport de validation ne peuvent être partagés en dehors des bureaux d'examen.

## V. PROTOCOLE STANDARD POUR LE PROTOCOLE DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES SPÉCIFIQUES AUX CARACTÉRISTIQUES

33. Les éléments obligatoires sont indiqués dans la colonne "informations essentielles", les autres éléments peuvent être utilisés en fonction du protocole d'essai caractéristique. Si un laboratoire souhaite adapter/modifier/changer un chapitre obligatoire ou un élément d'un chapitre obligatoire, il doit valider sa méthode par rapport à la méthode de référence (pour montrer qu'il obtient les mêmes résultats que la méthode publiée).

Tableau 1 : Protocole standard de marquage moléculaire en fonction des caractéristiques (voir le document TWV/54/7 "Use of molecular techniques in DUS examination"). Les modifications sont surlignées en gris

Chapitre	Éléments d'un protocole de marquage moléculaire spécifique à un caractère standard	Exemple	Informations essentielles pour l'harmonisation	Remarque
1	caractéristique	Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) <i>Voir TG/44/11/rev3 - Ad 51 : ii Test du marqueur ADN</i>	OUI	
2	Gènes et allèles	<i>Voir TG/44/11/rev3 - Ad 51 : ii Test du marqueur ADN add 2</i>	OUI	Il faut éviter les marqueurs dominants ou les marqueurs de présence/absence, sinon la robustesse doit être évaluée.
2.1	Gène(s) ciblé(s)	Gène de résistance Tm2  Arens, P. et al (2010)	OUI	a) le(s) fichier(s) contenant les informations sur la séquence de l'ADN (ordre des nucléotides) b) référence à des informations sur l'ADN dans des bases de données publiques (comme GeneBank) c) référence à des publications (scientifiques) dans lesquelles les informations relatives à la séquence d'ADN des niveaux d'expression du caractère sont révélées. d) référence à une position particulière sur la version publiée du génome de référence.
2.2	Allèle correspondant à l'état 1	Tm2 et Tm2 <sup>2</sup>  Arens, P. et al (2010)	OUI	a) le(s) fichier(s) contenant les informations sur la séquence de l'ADN (ordre des nucléotides) b) référence à des informations sur l'ADN dans des bases de données publiques (comme GeneBank) c) référence à des publications (scientifiques) dans lesquelles les informations relatives à la séquence d'ADN des niveaux d'expression du caractère sont révélées. d) référence à une position particulière sur la version publiée du génome de référence en combinaison avec le SNP ou l'INDEL responsable de l'état d'expression.

Chapitre	Éléments d'un protocole de marquage moléculaire spécifique à un caractère standard	Exemple	Informations essentielles pour l'harmonisation	Remarque
2.3	Allèle correspondant à l'état d'expression n	tm2  Arens, P. et al (2010)	OUI	a) le(s) fichier(s) contenant les informations sur la séquence de l'ADN (ordre des nucléotides) b) référence à des informations sur l'ADN dans des bases de données publiques (comme GeneBank) c) référence à des publications (scientifiques) dans lesquelles les informations relatives à la séquence d'ADN des niveaux d'expression du caractère sont révélées.  d) référence à une position particulière sur la version publiée du génome de référence en combinaison avec le SNP ou l'INDEL responsable de l'état d'expression.
3	Amorces (et sondes)	Voir TG/44/11/rev3 - Ad 51 : ii Test du marqueur ADN ajouter 3, 3.1 et 3.2	OUI	Séquences d'amorces et de sondes, référence aux accessions et aux séquences dans les bases de données publiques (numéros Genebank), littérature
3.1	Amorces (et sondes) pour la détection de l'allèle "9".		OUI	Séquences d'amorces correspondant à l'allèle ou aux allèles pour l'expression "9" (résistance)
3.2	Amorces (et sondes) pour la détection de l'allèle "1".		OUI	Séquences d'amorces correspondant à l'(aux) allèle(s) de l'expression "1" (susceptibilité)
3.3	Amorces (et sondes) pour détecter l'allèle "x".		OUI	Séquences d'amorces correspondant à l'(aux) allèle(s) de l'expression "x"
4	Format de l'épreuve			
4.1	Nombre de plantes par génotype	>=20	OUI	Un nombre minimal de plantes individuelles est requis (voir 5.2.1a) l'examen du marqueur est effectué sur le même nombre de plantes individuelles, avec les mêmes critères de distinction, d'homogénéité et de stabilité que pour l'examen du caractère au moyen d'un essai d'observation (TGP 15).
4.2	Variétés de contrôle	Voir TG/44/11/rev3 - Ad 51 : ii Test du marqueur ADN ajouter 4.2	OUI	Variétés de contrôle (les mêmes que dans l'essai d'observation) comme normes représentant toutes les combinaisons pertinentes d'allèles. Par exemple, homozygote pour l'allèle correspondant au niveau d'expression 9 (présent), homozygote pour l'allèle correspondant au niveau d'expression 1 (sensible) et hétérozygote (les deux allèles sont présents dans un diploïde) correspondant à un niveau d'expression résistant, sensible ou intermédiaire (selon la fonction du gène; dominant - récessif). Les contrôles ADN peuvent être utilisés directement.

Chapitre	Éléments d'un protocole de marquage moléculaire spécifique à un caractère standard	Exemple	Informations essentielles pour l'harmonisation	Remarque
4.3	Contrôles de processus	<i>par exemple, le tampon utilisé pour l'extraction; un marqueur ciblant le gène de la cytochrome oxydase comme marqueur d'amplification interne</i>	OUI	a) Contrôle(s) négatif(s) du processus b) Contrôle(s) positif(s) de l'ADN pouvant être les variétés de contrôle c) Contrôle interne d'amplification en cas de marqueur de présence/absence
5	Préparations	<i>Par exemple, échantillonnage de plantules âgées de 4 jours suivi d'une extraction d'ADN à l'aide de la méthode CTAB.</i>	NON	En fonction de la méthode utilisée. Ne figure pas dans la ligne directrice. Un ou plusieurs protocoles détaillés peuvent être fournis à titre d'exemple en annexe ou être disponibles sur demande auprès de l'institut qui a mis au point le marqueur.
6	Performance ou technique de la méthode	<i>par exemple, PCR conventionnelle, TETRA-ARMS, qPCR, KASP, séquençage d'amplicon Voir TG/44/11/rev3 - Ad 51 : ii Test du marqueur ADN ajouter 6</i>	OUI	.
6.1	Conditions particulières	<i>par exemple, protocole PCR décrivant les concentrations d'amorces, d'enzymes et de dNTP, le schéma du cycle PCR</i>	NON	En fonction de la méthode utilisée. Ne figure pas dans la ligne directrice. Un ou plusieurs protocoles détaillés peuvent être fournis à titre d'exemple en annexe ou être disponibles sur demande auprès de l'institut qui a mis au point le marqueur.
6.2	Matériel ou infrastructure spécifique	Machines, kits commerciaux, fabrication de composants, numéros de lots de produits chimiques, etc.	NON	En fonction de la méthode utilisée. Ne figure pas dans la ligne directrice. Un ou plusieurs protocoles détaillés peuvent être fournis à titre d'exemple en annexe ou être disponibles sur demande auprès de l'institut qui a mis au point le marqueur.
7	Observations	<i>Par exemple, bandes sur gel d'agarose (PCR conventionnelle), valeurs Ct (qPCR) Appel de variants basé sur des lectures de séquençage</i>	NON	En fonction de la méthode utilisée. Ne figure pas dans la ligne directrice. Un ou plusieurs protocoles détaillés peuvent être fournis à titre d'exemple en annexe ou être disponibles sur demande auprès de l'institut qui a mis au point le marqueur.
7.1	Validité des résultats	<i>Par exemple, pour la qPCR, vérifier les courbes d'amplification exponentielles typiques. Vérifier si les contrôles sont conformes aux attentes (contrôles négatifs = pas de signal; contrôles positifs = signaux attendus pour tous les fluorophores).</i>	OUI	Selon la méthode utilisée.
8	Interprétation des résultats des tests	<i>Voir TG/44/11/rev3 - Ad 51 : ii Test du marqueur ADN ajouter 8</i>	OUI	Relation entre les allèles et les expressions (avec ses notes)
9	Validation de la méthode,	Ce protocole a été validé par un ring-test avec différents laboratoires (e.g. Interlaboratory Comparative Test Compte rendu, INVITE 2024).	OUI	
9.1	Contacter le bureau des examens	ex. Naktuinbouw	OUI	Contact de l'institut qui a développé ce protocole, Nom du service.

## VI. ENQUÊTE DE SUIVI APRÈS L'APPROBATION

34. La validation du marqueur n'est pas figée, car de nouvelles variétés génétiques peuvent apparaître sur le marché. Il s'agit d'un processus d'évaluation continu. La spécificité doit être réévaluée après l'acceptation de la validation à l'aide d'un double test, au moins au cours de la première année avec la méthode d'observation.

35. Après la première année d'acceptation du protocole, des contrôles morphologiques doivent être effectués sur environ 10 % des nouvelles variétés.

[Fin de l'annexe et du document]