 GD Biotech <small>AGRI-AGRO SOLUTIONS</small>	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

1. Champ d'application

Activité/méthode concernée : *extraction d'ADN*

Portée d'accréditation :

- ☐ Fixe
- ☐ FLEX1
- ☐ FLEX2
- ☒ FLEX3

2. Intitulé de méthode

Nom de la méthode : *extraction d'ADN sur billes magnétiques à partir de poils*

- ☐ Méthode manuelle
- ☒ Méthode semi-automatisée
- ☐ Méthode automatisée
- ☐ Autre méthode : à préciser

3. Elaboration du développement

3.1. Type de validation

- ☒ Développement d'une nouvelle méthode
- ☐ Adoption d'une nouvelle méthode reconnue
- ☐ Adaptation d'une méthode existante (contrainte technique, évolution technique, ...)
référence de la méthode concernée (codification du MOP) : à compléter
- ☐ Optimisation d'une méthode existante (temps, coût, ...)
référence de la méthode concernée (codification du MOP) : à compléter
- ☐ Alternative d'une méthode existante
référence de la méthode concernée (codification du MOP) : à compléter
- ☐ Traitement d'une matrice biologique non validée précédemment : à préciser


3.2. Revue de méthode

La revue de méthode s'appuie sur un référentiel :

- ☒ non
- ☐ oui : à préciser

3.3. Contexte et objectifs

Développer et routiniser une méthode de purification ADN à l'aide de billes paramagnétiques, adaptée au type de prélèvements traités au sein de la plateforme de génotypage GDScan. L'objectif étant de remplacer la méthode actuelle sur colonne de silice, au profit d'une méthode

	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

sur billes paramagnétiques pour laquelle les leviers d'optimisation sont plus importants permettant de viser un meilleur rapport qualité/coût.

Objectifs :

- Parvenir à produire des extractions ADN sur matrice poils compatibles et adaptées à un traitement en génotypage haut-débit (Infinium, Illumina)
- Avoir accès à une méthode semi-automatisée afin de diminuer le risque d'erreurs humaines et de viser un possible gain de temps pour l'opérateur. La décision de l'acquisition de deux automates Magnetapure 96 sera conditionnée à l'atteinte des critères de performance de cette validation de méthode.
- Optimiser les coûts d'utilisation de cette méthode afin de réduire davantage les coûts d'extraction par la méthode actuelle sur colonne sans dégradation notable des performances à l'issue de l'opération de génotypage. Le levier principal permettant d'atteindre cet objectif consiste à diminuer le volume de billes paramagnétiques utilisé, une division par 3 de ce volume est visée ici.

3.4. Sélection de la méthode

L'actuelle méthode, sur colonne de silice induit, même avec un tarif négocié, représente un coût annuel élevé puisqu'actuellement, le consommable nécessaire à l'extraction a un coût unitaire de 1,73 € H.T. le point d'extraction/purification à partir de poils.


La technologie de purification par billes paramagnétiques peut apparaître de prime abord comme une technologie plus coûteuse puisqu'elle affiche un prix catalogue de l'ordre de 2,49 € H.T. le point d'extraction/purification à partir d'une matrice poils. Toutefois, cette technologie offre une souplesse d'utilisation qui nous permettrait d'optimiser ces coûts notamment en passant par réduction de la consommation de certains réactifs et, parallèlement, en négociant la tarification chez notre fournisseur.

Ainsi, nous prévoyons de réaliser un gain de 0,80 € H.T. \pm 25 % par point d'extraction en diluant ou réduisant les volumes d'utilisation de certains réactifs du kit et après négociation tarifaire.

Concernant la partie consommables plastiques annexes au kit d'extraction, nous sommes actuellement à un coût de 0,34 € H.T. par point avec la méthode d'extraction sur colonne de silice.

Avec la technologie d'extraction sur billes magnétiques nous atteindrions après négociations un coût consommables plastiques à 0,37 € H.T. par point.

Enfin, la mise en place d'une telle technologie permettrait de viser un gain de temps d'intervention du personnel puisque l'extraction de 96 échantillons serait semi-automatisée et

	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

libère donc le personnel le temps de la durée d'extraction.


3.5. Planification - Responsabilités

Pilote de projet : *C.Audebert*


Personnel concerné par la validation de méthode : *Assistentes Ingénieures, Personnels plateforme Genotypage*

Date d'ouverture de l'enregistrement (JJ/MM/AA) : *15/11/2022*

Responsabilité (Nom-Prénom - Fonction)	Tâche (liste non exhaustive)	Délai de réalisation	Attribuée à (Nom-Prénom - Fonction)
C.Audebert Directeur R&D	Prospection et sélection d'un achat matériel en adéquation avec la méthode visée	4 mois	S.Merlin Assistant Ingénieure Responsable achats
C.Audebert Directeur R&D	Développement d'une méthode d'extraction sur billes magnétiques à partir d'une matrice poils sur un support robotique	4 mois	S.Merlin Assistant Ingénieure Responsable achats
C.Audebert Directeur R&D	Produits d'extraction ADN compatibles avec la technologie de génotypage utilisé sur la plateforme	4 mois	S.Merlin Assistant Ingénieure Responsable achats
C.Audebert Directeur R&D	Réalisation de l'essai final en condition de routine visée	4 mois	Michèle Boutte Technicienne Ludivine Liétar Responsable Plateforme de génotypage GD Scan
C.Audebert Directeur R&D	Optimisation des coûts d'utilisation afin de les réduire autant que possible	4 mois	S.Merlin Assistant Ingénieure Responsable achats
C.Audebert Directeur R&D	Vérification et validation	4 mois	C.Audebert Directeur R&D
Ludivine Liétar	Développement, analyse et	31/07/2024	Ludivine Liétar

	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Responsable Plateforme de génotypage GD Scan	rédaction ➔ Version 221115_02 - ajout de la justification de dérogation aux critères de performance optimaux - ajout du contrôle répétabilité/reproductibilité (Essai 6) - ajout de la concordance des génotypages (Essai 7) - mise à jour du point 13. Analyse		Responsable Plateforme de génotypage GD Scan
Ludivine Liétar Responsable Plateforme de génotypage GD Scan	Réalisation des essais ➔ Version 221115_02	12/07/2024	Ludivine Liétar Responsable Plateforme de génotypage GD Scan Michèle Boutté Karine Le Roux Mélissandre Barbet Bio Techniciennes Pierre Bouvelle Responsable SI
Christophe Audebert Directeur Recherche et Développement	Vérification et validation ➔ Version 221115_02	31/07/2024	Christophe Audebert Directeur Recherche et Développement
Karine Le Roux Réfèrent qualité	Développement, analyse et rédaction ➔ Version 221115_03 - Ajout de la justification de vérification d'absence d'intercontamination, - Complétude des facteurs de risque identifiés et des moyens mis en place - Ajout des dates des essais inter-laboratoires	04/11/2024	Karine Le Roux Réfèrent qualité

	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Christophe Audebert Directeur Recherche et Développement	Vérification et validation Version 221115_03	04/11/2024	Christophe Audebert Directeur Recherche et Développement
--	---	------------	--

Exemples de tâches (non exhaustif) : Sélection de la méthode, Développement - définition des essais, Développement - réalisation des essais, Développement - édition et interprétation des résultats, Rédaction - gestion des enregistrements relatifs, Vérification/validation, etc...

4. Contraintes du projet

Liste non exhaustive, détailler les catégories concernées

[X] Techniques :

Modification des pratiques en place au laboratoire.

Prévoir une formation des personnels habilités à l'extraction.

[X] Équipements :

Cette technologie nécessite un investissement matériel permettant sa mise en œuvre.

Il conviendra de sélectionner la meilleure option afin de permettre une optimisation investissement - coût - rendement.

[] Qualité des matrices/données :

[] Quantité de matrices/données :

[X] Coût - investissement :

La technologie ciblée nécessitera d'investir dans 2 robots afin d'assurer un débit adapté au volume de prélèvements traités par la plateforme.


La technologie sur billes magnétiques est, de base, une technologie plus coûteuse que celle actuellement utilisée. Il s'agira donc d'effectuer une optimisation du processus afin de réduire les coûts dus à l'introduction de cette nouvelle méthode voir, si possible, de descendre à un coût inférieur aux coûts de traitement avec la méthode actuelle.

[] Autre(s) :

5. Caractéristiques de la méthode et performances attendues

5.1. Principe de la méthode

La technologie est basée sur l'adsorption réversible des acides nucléiques sur des billes paramagnétiques dans des conditions de tampon appropriées. Après la lyse du sang total, des billes paramagnétiques sont ajoutées et les conditions de liaison dans lesquelles l'ADN se lie aux billes magnétiques sont ajustées par l'ajout d'un tampon de liaison. Après séparation magnétique de leur milieu, les billes paramagnétiques sont lavées pour éliminer les contaminants et sels. Enfin, l'ADN hautement purifié est élué et peut être directement utilisé pour des applications en aval.

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

5.2. Domaine d'application

La présente méthode s'applique à l'ensemble des prélèvements de poils bovins reçus au sein de la plateforme de génotypage GDScan.

5.3. Matrice(s)/Données

Matrice(s) / données concernée(s)	Nature	Conditionnement / emplacement	Conservation pré-traitement
[]	sang total	tube EDTA	température ambiante
[x]	bulbes de poils	pochette Kit GDScan	température ambiante
[]	biopsie auriculaire = cartilage	tube avec conservateur (Allflex TSU ou TST)	température ambiante
[]	semence	paillette de conservation de sperme dilué	température ambiante
[]	ADN	plaques ADN (4x96 échantillons)	5°C +/- 3°C
[]	métadonnées et données de génotypage	base de données / serveur	-
[]	autre (à préciser) :	(à préciser)	(à préciser)

5.4. Traçabilité des échantillons


Pour chaque essai, l'ensemble des informations liées aux prélèvements (enregistrement et traçabilité) tout au long de la méthode d'extraction d'ADN doit être conservé et l'accès aux informations clairement identifié.

5.5. Paramètres

Le ou les paramètre(s) analysé(s) sont :


[X] quantitatifs (ex : concentration en ADN) : Concentration ADN > 15 ng/μl

[X] qualitatifs (ex : Call Rate) : Call Rate (intervient en fin de validation), *concordance génotypages*


 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

5.6. Critères de performance attendus

Méthode	Nombre d'échantillons	Critères de performance	Répétabilité	Reproductibilité
[] Extraction d'ADN	16 prélèvements (dont 8 satisfaisants au critère de concentration seront génotypés)	<p>Pour au moins 90 % des échantillons : - [ADN] > 15 ng/μL - Call Rate > 0,95</p> <p>Médiane Call Rate > 0,975</p> <p>Concordance génotypages : 99 % de similarité 580 SNP 8 échantillons issus des tests répétabilité/reproductibilité</p> <p>Vérification d'absence d'inter-contamination</p> <p>Essai inter-laboratoire validé</p>	16 mêmes prélèvements (dont 8 satisfaisants au critère de concentration seront génotypés)	16 mêmes prélèvements (dont 8 satisfaisants au critère de concentration seront génotypés)
[] Génotypage d'ADN	32 échantillons d'ADN	<p>Pour au moins 90 % des échantillons : - Call Rate > 0,95 pour au moins 90 % des échantillons</p> <p>Médiane Call Rate > 0,975</p> <p>Concordance génotypages : échantillon du test répétabilité/reproductibilité</p> <p>GDB_PRO_05_Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de</p>	<p>Contrôle répétabilité selon GDB_PRO_05_Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN</p>	<p>Contrôle reproductibilité selon GDB_PRO_05_Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN</p>

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

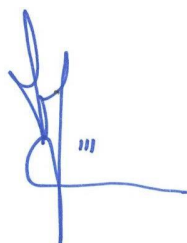
		<p>génométypage haut-débit par puces à ADN, auquel on applique un seuil de 99 % de similarité 580 SNP</p> <p>Vérification d'absence d'inter-contamination</p> <p>Essai inter-laboratoire validé</p>		
[] Nouveau support de génotypage	2 charolais + 2 holstein déjà génotypés sur version N-1	<p>Présence 580 SNP ISO (GDB_FI_15_SNP ISO 580)</p> <p>Concordance génotypages : 99 % de similarité 580 SNP ISO N-1 et N (génotypages valides)</p>	2 mêmes charolais + 2 mêmes holstein déjà génotypés sur version N-1	2 mêmes charolais + 2 mêmes holstein déjà génotypés sur version N-1
[x] Autre : <i>Extraction d'ADN</i>	96 prélèvements extraits et génotypés	<p>Pour au moins 90 % des échantillons : - [ADN] > 15 ng/μL - Call Rate > 0,95</p> <p>Médiane Call Rate > 0,975</p> <p>Concordance génotypages : 99 % de similarité 580 SNP (ou à défaut 576 SNP communs, voir justification ci-après) 2 échantillons issus des tests répétabilité/reproductibilité</p>	Prochain contrôle de répétabilité GDB_PRO_06_C contrôle de reproductibilité et répétabilité de la phase d'extraction	Prochain contrôle de reproductibilité GDB_PRO_06_C contrôle de reproductibilité et répétabilité de la phase d'extraction

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

		Vérification d'absence d'inter- contamination		
		Essai inter- laboratoire validé		

Justification de dérogation : ce présent dossier de validation ayant démarré en amont de la création de la procédure de validation de méthode GDB_PRO_23_Validation de méthode, et du formulaire correspondant GDB_FORM_53_Validation de méthode, des critères de performance d'extraction d'ADN optimaux n'avaient pas encore été définis. C'est pourquoi une dérogation est accordée pour valider la méthode sur les critères définis à l'époque de l'ouverture du dossier. A noter : dans cette version 221115_02 ces critères ont été amendés par l'ajout d'un test annuel de répétabilité/reproductibilité de la phase d'extraction afin de pouvoir valider la répétabilité/reproductibilité.


Par ailleurs, l'évaluation de la concordance des génotypes fait intervenir des génotypes réalisés sur la version de puce EuroG_MDv4_XT_GD (génotype échantillons reproductibilité), pour laquelle seuls 576 sur les 580 SNP ISO étaient présents (voir GDB_FORM_01_Fiche de non conformité_230131_01_v2.0), ainsi une dérogation est accordée pour évaluer la concordance des génotypes référence versus reproductibilité sur les 576 SNP ISO communs.



Christophe Audebert, Directeur R&D

Remarque introductive : Les 4 premiers essais permettent de préciser les conditions optimales opératoires, c'est pourquoi nous avons décidé de travailler à partir d'un plus faible nombre d'échantillons. En outre, pour ce qui concerne ces phases préliminaires, il s'agit de viser l'atteinte du seul critère de performance de la concentration permettant de valider les conditions testées pour pousser ensuite plus loin le processus de validation.

Enfin pour ces phases préliminaires, il est convenu d'employer la même technologie mais portée sur un modèle de robotiques plus adapté pour les petites séries (Magnetapure 32).

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

6. Essai

6.1. Essai n°1

6.1.1. Introduction

Ce premier essai a pour objectif de valider la possibilité de diminuer les volumes renseignés dans le mode opératoire du fournisseur de kit Macherey Nagel (GDB_EXT_MOP_Instruction-NucleoMag-Tissue _230121). Les réactifs concernés sont le T1 passant de 200 µL à 150 µL et la PK passant de 25 µL à 15 µL. Ces diminutions de volumes de réactifs font suite à l'objectif initial d'optimisation de coûts de la méthode portant sur la diminution (par un facteur 3) du volume de billes utilisées par rapport au mode opératoire du fournisseur Macherey Nagel (GDB_EXT_MOP_Instruction-NucleoMag-Tissue _230121).

6.1.2. Mode Opératoire

Les travaux sont réalisés via un kit Nucleomag Tissue Macherey Nagel ref. 744300 qui serait le type de kit utilisé sur la plateforme, en routine

Par rapport au mode opératoire du fournisseur Macherey Nagel (GDB_EXT_MOP_Instruction-NucleoMag-Tissue _230121):

- Pour l'ensemble de l'essai, les volumes de réactifs de lyse ont été modifiés:
PK 15 µL + T1 150 µL pour les deux conditions expérimentales de l'essai
- Modification des volumes de billes paramagnétiques :
Le volume de billes paramagnétiques (NucleoMag® B-Beads) passe à 8 µL pour la condition 2 par rapport à la condition 1 réalisée en suivant le mode opératoire fournisseur avec 24 µL de NucleoMag® B-Beads)

L'ensemble des purifications de cet essai est réalisé sur 2x4 prélèvements de poils, la lyse dure 3 h à 56 °C sous agitation à 700 rpm.

Condition 1 (control) - 4 prélèvements:


Les modifications apportées aux volumes de réactifs de lyse impliquent une modification en proportion du réactif de fixation (MB2).

En conséquence pour la partie BINDING:

- Récupération de 165 µL de lysat
- Ajout de 24 µL de B-Beads et 275 µL de MB2

La suite du protocole suit les conditions du mode opératoire fournisseur GDB_EXT_MOP_Instruction-NucleoMag-Tissue _230121

- Elution 50 µL avec MB6

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Condition 2 - 4 prélèvements :

- Récupération de 165 µL de lysat
- Ajout de 8 µL de B-Beads et 16 µL d'eau
- Ajout 275 µL de MB2

La suite du protocole se réfère aux recommandations fournisseur

- élution 50 µL avec MB6

6.1.3. Points à développer (*liste non exhaustive*)

➤ Matériel (*type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...*) :

Les purifications sont réalisées dans les conditions les plus proches de la réalité puisqu'effectuées sur un robot de type Magnetapure 32, or nous envisageons l'investissement robotique sur du Magnetapure 96.

Programmation Magnetapur 32:

AS154_S

NAME:NMTissuepoilsA

STEP:6

STATUS:11

TIME:2019-7-31 10:49:33

OPTION:1 1 1 1 1 1 1 1 0 5 1 1 1 0 1 5 1 2 0 0 5

Binding 1 5.0 120 0.0 465 5 0 0 80 0 2 0

WashMB3 2 2.0 60 0.0 600 5 0 0 80 0 5 0

WashMB4 3 2.0 60 0.0 600 5 0 0 80 0 5 0

WashMB5 4 0.0 45 0.0 900 1 0 0 80 0 2 0


ElutioMB6 6 5.0 60 0.0 50 3 56 0 80 0 5 0

release 2 1.0 0 0.0 600 10 0 0 80 0 3 0

AS154_E

➤ Kits et réactifs : *compléter le tableau ci-dessous*

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
Nucleomag Tissue Macherey Nagel ref. 744300	22026-001	Les tampons MB2, MB3 et MB4 contiennent du sel chaotrope ! Porter des gants	Tous les composants du kit NucleoMag® Tissue doivent être conservés à température ambiante (15 - 25 °C).

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

- Matrices (*quantité, traçabilité échantillon, traitement, spécificités, etc...*) : L'ensemble de l'essai est réalisé sur 8 prélèvements de poils (environ 30 bulbes):

Condition1_1	FR7923871621	GD078442
Condition1_2	FR7923871628	GD078451
Condition1_3	FR7923871630	GD078450
Condition1_4	FR7923871638	GD078449
Condition2_1	FR7923871639	GD078455
Condition2_2	FR7923871640	GD078454
Condition2_3	FR7923871672	GD078446
Condition2_4	FR7923871673	GD078453


- Milieu : L'essai a été réalisé au sein du laboratoire de Recherche et Développement. L'environnement est maintenu sous climatisation +21°C (+/- 2 °C).
- Main d'œuvre : Assistante ingénieure S. Merlin

6.1.4. Résultats de l'essai - Conclusion

Deux paramètres importants sont associés à une extraction ADN : la concentration et la présence de résidus de sels et/ou protéines indicateurs d'une purification de l'ADN sous-efficace. Ainsi deux méthodes de monitoring sont utilisées ici une méthode Qubit (Thermo Scientific) permettant un dosage la concentration par l'intermédiaire d'un fluorophore intercalant de l'ADN et une méthode par spectrophotométrie, Nanodrop (Thermo Scientific). Ces deux mesures ont été réalisées en suivant les modes opératoires du fournisseur respectivement GDB_EXT_MOP_ NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-FRENCH_230121, pour la méthode Nanodrop et GDB_EXT_MOP_ Qubit_dsDNA_HS_Assay_UG_230121 pour la méthode Qubit.

Résultats de dosage Qubit et profil nanodrop:

Un ratio A260/280 est considéré comme satisfaisant aux exigences de pureté (en protéines) lorsqu'il est compris entre [1,7-2,2]. Un ratio A260/230 est considéré pour des purifications à l'aide de billes paramagnétiques comme satisfaisant aux exigences de pureté (en sels) lorsque celui-ci est supérieur à 1. Ces deux métriques ne constituent pas de critères de performance de cette validation de méthode, elles sont produites à titre indicatif, à contrario de celui de la concentration en ADN.

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Condition 1	Qubit Dosage (ng/μl)	Nanodrop A260/280 (protéines) ~1.8	Nanodrop A260/230 (sels chao.) >1	Condition 2	Qubit Dosage (ng/μl)	Nanodrop A260/280 (protéines) ~1.8	Nanodrop A260/230 (sels chao.) >1
1	44.8	1.90	1.38	1	59.0	1.8	1.17
2	59.0	1.95	1.57	2	49.3	1.82	1.20
3	24.0	1.79	1.21	3	72.2	1.77	1.00
4	63.4	1.84	1.22	4	81.2	1.72	1.01

Interprétation : L'essai 1 permet de conclure quant à la possibilité, pour le critère de performance seul, de la concentration d'ADN de diminuer des volumes de billes par un facteur 3 et la réduction des volumes de réactifs nécessaires à la lyse. En effet, les moyennes de concentrations mesurées sont de 47,8 ng/μL contre 65,43 ng /μL respectivement pour les conditions 1 et 2.

Conclusion : Il apparaît que la diminution du volume de billes n'affecte pas la concentration d'ADN, et atteint le critère de performance défini, à savoir une concentration > 15ng/μl. Les essais peuvent être continués.

6.2. Essai n°2

6.2.1. Introduction


L'objectif de cet essai consiste à appréhender l'effet de la diminution des volumes de solutions de lavage sur les performances de l'extraction (condition 2 vs condition 1) ainsi que l'effet de la diminution, par rapport à l'essai précédent, du volume réactif de lyse (condition 3 vs condition 1).

6.2.2. Mode Opératoire

Condition 1 (control) - 4 prélèvements

Lyse: 15 μL PK + 150 μL T1

Récupération de 165 μL de lysat

	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Ajout de 8 µL de B-Beads et 16 µL d'eau

Ajout 275 µL de MB2

La suite du protocole est conforme au mode opératoire du fournisseur GDB_EXT_MOP_Instruction-NucleoMag-Tissue _230121

élution 50 µL avec MB6

Condition 2 – 4 prélèvements:

Lyse: 15 µL PK + 150 µL T1

Récupération de 165 µL de lysat

Ajout de 8 µL de B-Beads et 16 µL d'eau

Ajout 275 µL de MB2

Lavages MB3, MB4, MB5 volumes divisés par 2

élution 50 µL avec MB6

Condition 3 – 4 prélèvements:

Lyse: 10 µL PK + 100 µL T1

Récupération de 110 µL de lysat

Ajout de 8 µL de B-Beads et 16 µL d'eau

Ajout 195 µL de MB2

La suite du protocole est conforme au mode opératoire du fournisseur GDB_EXT_MOP_Instruction-NucleoMag-Tissue _230121

élution 50 µL avec MB6

6.2.3. Points à développer

➤ *Matériel (type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...) :*

Les purifications sont réalisées dans les conditions les plus proches de la réalité puisqu'effectuées sur un robot de type Magnetapure 32, or nous envisageons l'investissement robotique sur du Magnetapure 96.

Programmation Magnetapure 32 de la condition 1

AS154_S

NAME:NMTissuepoilsA

STEP:6

STATUS:11

TIME:2019-7-31 10:49:33


OPTION:1 1 1 1 1 1 1 1 0 5 1 1 1 0 1 5 1 2 0 0 5

Binding 1 5.0 120 0.0 465 5 0 0 80 0 2 0

WashMB3 2 2.0 60 0.0 600 5 0 0 80 0 5 0

WashMB4 3 2.0 60 0.0 600 5 0 0 80 0 5 0

WashMB5 4 0.0 45 0.0 900 1 0 0 80 0 2 0

	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

ElutioMB6 6 5.0 60 0.0 50 3 56 0 80 0 5 0
release 2 1.0 0 0.0 600 10 0 0 80 0 3 0
AS154_E

Programmation Magnetapure 32 de la condition 2


AS154_S
NAME:NMTissuepoilsC
STEP:6
STATUS:11
TIME:2019-7-31 10:49:33
OPTION:1 1 1 1 1 1 1 1 0 5 1 1 1 0 1 5 1 2 0 0 5
Binding 1 5.0 120 0.0 465 5 0 0 80 0 2 0
WashMB3 2 2.0 60 0.0 300 5 0 0 80 0 5 0
WashMB4 3 2.0 60 0.0 300 5 0 0 80 0 5 0
WashMB5 4 0.0 45 0.0 450 1 0 0 80 0 2 0
ElutioMB6 6 5.0 60 0.0 50 3 56 0 80 0 5 0
release 2 1.0 0 0.0 600 10 0 0 80 0 3 0
AS154_E

Programmation Magnetapure 32 de la condition 3

AS154_S
NAME:NMTissuePoilsB
STEP:6
STATUS:11
TIME:2019-7-31 10:49:33
OPTION:1 1 1 1 1 1 1 1 0 5 1 1 1 0 1 5 1 2 0 0 5
Binding 1 5.0 120 0.0 330 5 0 0 80 0 2 0
WashMB3 2 2.0 60 0.0 600 5 0 0 80 0 5 0
WashMB4 3 2.0 60 0.0 600 5 0 0 80 0 5 0
WashMB5 4 0.0 45 0.0 900 1 0 0 80 0 2 0
ElutioMB6 6 5.0 60 0.0 50 3 56 0 80 0 5 0
release 2 1.0 0 0.0 600 10 0 0 80 0 3 0
AS154_E

➤ Kits et réactifs : compléter le tableau ci-dessous

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
Nucleomag Tissue	22026-001	Les tampons MB2,	Tous les composants du

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Macherey Nagel ref. 744300		<i>MB3 et MB4 contiennent du sel chaotropique ! Porter des gants</i>	<i>kit NucleoMag® Tissue doivent être conservés à température ambiante (15 - 25 °C) .</i>
-------------------------------	--	--	---

- Matrices (*quantité, traçabilité échantillon, traitement, spécificités, etc...*) : L'ensemble de l'essai est réalisé sur 12 prélèvements de poils (environ 30 bulbes)


Condition1_1	FR7923871621	GD078442
Condition1_2	FR7923871628	GD078451
Condition1_3	FR7923871630	GD078450
Condition1_4	FR7923871638	GD078449
Condition2_1	FR7923871639	GD078455
Condition2_2	FR7923871640	GD078454
Condition2_3	FR7923871672	GD078446
Condition2_4	FR7923871673	GD078453
Condition3_1	FR7923871678	GD078443
Condition3_2	FR7923871690	GD078447
Condition3_3	FR7923871698	GD078448
Condition3_4	FR7923871709	GD078441

- Milieu : L'essai à été réalisé au sein du laboratoire de Recherche et Développement.
L'environnement est maintenu sous climatisation +21°C (+/- 2 °C).
- Main d'œuvre : Assistante ingénieure S. Merlin

6.2.4. Résultats de l'essai - Conclusion

Dosage Qubit et profil nanodrop (voir section 6.4):

Condition 1	Qubit Dosage (ng/µl)	Nanodrop A260/280 (protéines) ~1.8	Nanodrop A260/230 (sels chao.) >1	Condition 2	Qubit Dosage (ng/µl)	Nanodrop A260/280 (protéines) ~1.8	Nanodrop A260/230 (sels chao.) >1	Condition 3	Qubit Dosage (ng/µl)	Nanodrop A260/280 (protéines) ~1.8	Nanodrop A260/230 (sels chao.) >1
1	11.8	1.77	1.29	1	42.7	1.81	1.06	1	14.3	1.78	1.23

	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

2	28.5	1.71	0.94	2	30.9	1.71	1.02	2	13.5	1.67	1.03
3	28	1.77	1.09	3	37.9	1.81	1.16	3	21.5	1.82	1.12
4	13.6	1.73	1.03	4	26.3	1.89	1.35	4	35.4	1.80	1.10

Interprétation : Pour cet essai, seule la condition 2 satisfait au seul critère de performance visé par l'essai, à savoir pour un lot d'échantillon 90 % de ceux-ci montrent une concentration d'ADN > 15 ng/μL. La diminution du volumes de solutions de lavages de moitié peut être envisagée à contrario de la diminution des volumes des tampons de lyse.

Conclusion : Les précédents essais ont permis de nous positionner sur l'optimisation des coûts liés à l'usage des réactifs du kit Nucleomag Tissue Macherey Nagel ref. 744300. Ces essais préliminaires ont permis de déclencher l'achat d'automate Magnetapure 96. Ainsi la suite des essais itératifs seront réalisés sur cette plateforme d'extraction/purification.

6.3. Essai n°3

6.3.1. Introduction

Cet essai bénéficie des mêmes conditions que le précédent hormis le fait qu'ici l'automate employé est identique à celui ciblé par la validation de méthode : Magnetapure 96.

A partir des conditions opératoires déterminées dans l'essai précédent (en augmentant le volume d'élution passant de 50 μL à 60 μL pour améliorer les ratio A260/280), l'objectif de l'essai vise à appréhender le portage de la méthode sur l'automate Magnetapure 96.

6.3.2. Mode Opérateur


L'ensemble des purifications de cet essai est réalisé sur 8 prélèvements de poils

Conditions :

Modifications apportées au mode opératoire du fournisseur GDB_EXT_MOP_ Instruction-NucleoMag-Tissue _230121:

Lyse: PK 15 μL + Prise d'essai poils: fine mèche + T1 150 μL

Ajout de 8 μL de B-Beads et 16 μL d'eau

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Apport de MBL2 de **275** µL

Apport de MB3, MB4 de **300** µL

Apport de MB5 de **450** µL

Elution dans **60** µL de MB6

6.3.3. Points à développer

- Matériel (*type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...*) : MagnetaPure 96 (machine prêtée par le distributeur Dominique Dutscher, en tout point identique au modèle envisagé pour un futur achat)

Programme Magnetapure 96:

AS180_S

NAME:NMPoilsC

STEP:8

STATUS:11

TIME:2022-11-18

15:31:4


```

OPTION:1  1  1  1  1  1  1  1  0  5  0  1  1  0  1  5  0  2
-Load-    1  0  1  0  5  1  0  1  0  1  0  0  0  0  0  0  0
binding   2  50  80  0  464  5  0  1  1  1  2  3  10  8  8  8  1
MB3       3  50  80  0  300  5  0  1  1  2  2  3  5  1  1  1  1
MB4       4  50  80  0  300  5  0  1  1  2  2  3  5  10  10  10  1
MB5       5  0  80  0  450  1  0  1  1  2  2  3  1  1  1  1  1
elution   8  50  80  0  60  3  56  1  1  1  2  3  60  18  1  1  1
relargage  4  5  80  0  300  10  0  0  1  1  2  3  1  1  1  1  1
-Unload-   1  0  1  0  5  1  0  1  1  1  0  0  1  1  1  1  1
AS180_E

```

- Kits et réactifs : *compléter le tableau ci-dessous*

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
Nucleomag Tissue Macherey Nagel ref. 744300	22026-001	Les tampons MB2, MB3 et MB4 contiennent du sel chaotropique !	Tous les composants du kit NucleoMag® Tissue doivent être conservés à température ambiante (15

	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

		Porter des gants	- 25 °C)
--	--	------------------	----------

- Matrices (*quantité, traçabilité échantillon, traitement, spécificités, etc...*) : L'ensemble de l'essai est réalisé sur 8 prélèvements de poils (environ 30 bulbes)


Condition1_1	FR7923871678	GD078443
Condition1_2	FR7923871690	GD078447
Condition1_3	FR7923871698	GD078448
Condition1_4	FR7923871709	GD078441
Condition1_5	FR7923871712	GD078445
Condition1_6	FR7923871713	GD078444
Condition1_7	FR7950301349	GD078452
Condition1_8	FR7947451379	GD078550

- Milieu : L'essai à été réalisé au sein du laboratoire de Recherche et Développement. L'environnement est maintenu sous climatisation +21°C (+/- 2 °C).
- Main d'œuvre : Assistante ingénieure S. Merlin

6.3.4. Résultats de l'essai - Conclusion

Dosage Qubit et profil nanodrop:

Condition 1	Qubit Dosage (ng/μl)	Nanodrop A260/280 (protéines) ~1.8	Nanodrop A260/230 (sels chao.) >1
1	44.68	1.98	1.57
2	49.16	1.94	1.56
3	54.14	1.95	1.36

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

4	45.34	1.95	1.54
5	46.62	2.00	1.57
6	49.94	1.94	1.57
7	40.43	1.89	1.25
8	84.27	1.97	1.60

Interprétation : 100 % des échantillons (8/8) dosés montrent une concentration supérieure à 15 ng/μL.

Conclusion : Le critère de performance visé par l'essai 3 (90 % d'échantillons d'ADN avec une concentration > 15 ng/μL) est atteint.


En sortie, considérant les conditions de cet essai, voici les reliquats théoriques que nous obtiendrions pour un kit 24x96:

PK → 44,6% (achat ponctuel à prévoir)
T1 → 65,4%
MB2 → 36,6% (achat ponctuel à prévoir #ref. 744851.80)
MB3 → 61,6%
MBL4 → 65,4%
MBL5 → 86,2% (élution 60μl)

6.4. Essai n°4

6.4.1. Introduction

Cet essai présente un double objectif : augmenter significativement le nombre d'échantillons intégrés à l'essai (passant de 8 à 22) pour éprouver plus avant le critère de performance visé (plus de 90 % d'échantillons > 15 ng/μL) et d'éprouver pour 4 échantillons bénéficiant de cette modalité d'extraction ADN, la phase de génotypage.

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

6.4.2. Mode Opérateur

Conditions :

Modifications apportées au protocole fournisseur GDB_EXT_MOP_ Instruction-NucleoMag-Tissue _230121

Lyse: PK 15 µL + Prise d'essai poils: fine mèche + T1 150 µL

Ajout de 8 µL de B-Beads et 16 µL d'eau

Apport de MBL2 de 275 µL

Apport de MB3, MB4 de 300 µL

Apport de MB5 de 450 µL

Elution dans 60 µL de MB6

6.4.3. Points à développer (liste non exhaustive)

➤ Matériel (type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...) :

Les purifications sont réalisées sur Magnetapure 96 (machine prêtée par le distributeur Dominique Dutscher, en tout point identique au modèle envisagé pour un futur achat).

Programme Magnetapur 96:

AS180_S

NAME:NMPoilsC

STEP:8

STATUS:11

TIME:2022-11-18 15:31:4

OPTION:1 1 1 1 1 1 1 1 0 5 0 1 1 0 1 5 0 2

-Load- 1 0 1 0 5 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0

binding 2 50 80 0 464 5 0 1 1 1 2 3 10 8 8 8 1

MB3 3 50 80 0 300 5 0 1 1 2 2 3 5 1 1 1 1

MB4 4 50 80 0 300 5 0 1 1 2 2 3 5 10 10 10 1

MB5 5 0 80 0 450 1 0 1 1 2 2 3 1 1 1 1 1

elution 8 50 80 0 60 3 56 1 1 1 2 3 60 18 1 1 1


relargage 4 5 80 0 300 10 0 0 1 1 2 3 1 1 1 1 1

-Unload- 1 0 1 0 5 1 0 1 1 1 0 0 1 1 1 1 1

AS180_E

➤ Kits et réactifs : compléter le tableau ci-dessous

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

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Nucleomag Tissue Macherey Nagel ref. 744300	22026-001	<i>Les tampons MB2, MB3 et MB4 contiennent du sel chaotropique ! Porter des gants</i>	<i>Tous les composants du kit NucleoMag® Tissue doivent être conservés à température ambiante (15 - 25 °C)</i>
---	-----------	---	--


- **Matrices (quantité, traçabilité échantillon, traitement, spécificités, etc...) :** L'ensemble de l'essai est réalisé sur 22 prélèvements de poils (environ 30 bulbes).

Condition1_1	GD078455	FR7923871639
Condition1_2	GD078447	FR7923871690
Condition1_3	GD078454	FR7923871640
Condition1_4	GD078446	FR7923871672
Condition1_5	GD078453	FR7923871673
Condition1_6	GD078451	FR7923871628
Condition1_7	GD078452	FR7950301349
Condition1_8	GD078450	FR7923871630
Condition1_9	GD078537	FR8571588467
Condition1_10	GD078449	FR7923871638
Condition1_11	GD078448	FR7923871698
Condition1_12	GD078445	FR7923871712
Condition1_13	GD078444	FR7923871713
Condition1_14	GD078538	FR7923871898
Condition1_15	GD078443	FR7923871678
Condition1_16	GD078442	FR7923871621
Condition1_17	GD078441	FR7923871709
Condition1_18	GD078426	FR8571588619
Condition1_19	GD078539	FR7923871870
Condition1_20	GD078540	FR7923871838
Condition1_21	GD078542	FR7947451493
Condition1_22	GD078544	FR7947451490


- **Milieu :** L'essai a été réalisé au sein du laboratoire de Recherche et Développement
L'environnement est maintenu sous climatisation +21°C (+/- 2 °C).
- **Main d'œuvre :** Assistante ingénieure S. Merlin

6.4.4. Résultats de l'essai - Conclusion

Profil nanodrop:

	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

N° échantillon	Nanodrop A260/280 (protéines)) ~1.8	Nanodrop A260/230 (sels chao.) >1	N° échantillon	Nanodrop A260/280 (protéines) ~1.8	Nanodrop A260/230 (sels chao.) >1
1	1.92	1.43	12	1.85	1.34
2	1.94	1.50	13	1.90	1.30
3	1.9	1.33	14	1.95	1.42
4	1.91	1.34	15	1.93	1.41
5	1.94	1.42	16	1.89	1.35
6	1.64	1.45	17	1.92	1.40
7	1.97	1.52	18	1.96	1.54
8	1.98	1.54	19	1.93	1.44
9	1.95	1.48	20	1.96	1.49
10	1.91	1.33	21	1.87	1.30

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT


11	1.96	1.51	22	1.95	1.44
----	------	------	----	------	------

Interprétation : les deux ratios A260/280 et A260/230 sont satisfaisants pour l'intégralité des échantillons analysés. Même si ces métriques ne constituent pas un critère de performances associé à cette validation de méthode, elles permettent d'évaluer l'efficacité de la phase de purification de l'ADN extrait.

Compte tenu du plus important nombre d'échantillons, les dosages par agent intercalent seront réalisées par la méthode Picogreen (le Qubit n'autorisant que des dosages individuels).

Dosage Picogreen:

n° échantillon essai	ID échantillon	Dosage (ng/μl) [ADN]
1	Condition1_1	47.22
2	Condition1_2	55.72
3	Condition1_3	47.60
4	Condition1_4	39.10
5	Condition1_5	30.26
6	Condition1_6	56.57
7	Condition1_7	49.37
8	Condition1_8	47.06
9	Condition1_9	51.26
10	Condition1_10	43.91
11	Condition1_11	55.63
12	Condition1_12	25.51
13	Condition1_13	38.08
14	Condition1_14	47.24
15	Condition1_15	46.04
16	Condition1_16	51.02
17	Condition1_17	57.60

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

18	Condition1_18	59.34
19	Condition1_19	46.41
20	Condition1_20	58.56
21	Condition1_21	53.56
22	Condition1_22	47.32

Interprétation : Tous les échantillons (100 %) montrent une concentration ADN > 15 ng / μ L. Ce critère satisfait au seul critère de performance visé par cet essai (plus de 90 % d'échantillons montrant une concentration ADN > 15 ng/ μ L).


Génotypage sur 4 extractions:

Génotypages réalisés sur les échantillons suivants:

Individu	Call Rate
GD078537	0,9992635
GD078449	0,999297
GD078448	0,9993472
GD078445	0,9984266

Interprétation : 100 % des échantillons extraits selon la modalité définie dans cet essai 4, obtiennent un Callrate > 0,95.

Conclusion : En conclusion de cet essai 4, il apparaît que les conditions optimisées permettent d'atteindre le critère de performance visé concernant la concentration en ADN. Les échantillons génotypés montrent aussi un respect du critère de performance concernant le CallRate puisque 100 % des échantillons génotypés sont > 0,95 et la médiane CallRate de ces mêmes échantillons qui est supérieure à > 0,975. Cependant cet essai a été réalisé sur un nombre restreint d'échantillons, et il convient de poursuivre cette validation de méthode dans un ultime essai sur une plaque de 96 échantillons.

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

6.5. Essai n°5

6.5.1. Introduction

Cet essai intègre les conditions déterminées lors des approches itératives sus-développées. Cet essai est réalisé en condition cible, au niveau du laboratoire GD Scan et sur les plateformes Magnetapure 96 acquises entre temps.

6.5.2. Mode Opérateur

Conditions :

Modifications apportées au protocole fournisseur GDB_EXT_MOP_ Instruction-NucleoMag-Tissue _230121:

Lyse: PK 15 µL + Prise d'essai poils: fine mèche + T1 150 µL

Ajout de 8 µL de B-Beads et 16 µL d'eau

Apport de MBL2 de 275 µL

Apport de MB3, MB4 de 30 µL

Apport de MB5 de 450 µL

Elution dans 60 µL de MB6

6.5.3. Points à développer

➤ Matériel (*type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...*) :

Les purifications sont réalisées sur Magnetapure 96.

Programme Magnetapur 96:

AS180_S

NAME:NMPoilsC

STEP:8

STATUS:11

TIME:2022-11-18 15:31:4

OPTION:1 1 1 1 1 1 1 1 0 5 0 1 1 0 1 5 0 2

-Load- 1 0 1 0 5 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0

binding 2 50 80 0 464 5 0 1 1 1 2 3 10 8 8 8 1

MB3 3 50 80 0 300 5 0 1 1 2 2 3 5 1 1 1 1

MB4 4 50 80 0 300 5 0 1 1 2 2 3 5 10 10 10 1


MB5 5 0 80 0 450 1 0 1 1 2 2 3 1 1 1 1 1

elution 8 50 80 0 60 3 56 1 1 1 2 3 60 18 1 1 1

relargage 4 5 80 0 300 10 0 0 1 1 2 3 1 1 1 1 1

-Unload- 1 0 1 0 5 1 0 1 1 1 0 0 1 1 1 1 1

AS180_E


 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

➤ Kits et réactifs : *compléter le tableau ci-dessous*


Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
Nucleomag Tissue Macherey Nagel ref. 744300		<i>Les tampons MB2, MB3 et MB4 contiennent du sel chaotropique ! Porter des gants</i>	<i>Tous les composants du kit NucleoMag® Tissue doivent être conservés à température ambiante (15 - 25 °C).</i>

➤ Matrices (*quantité, traçabilité échantillon, traitement, spécificités, etc...*) : L'ensemble des purifications de cet essai est réalisé sur 96 prélèvements de poils (environ 30 bulbes)


ID	CODE BARRE	SEXE	RACE	TYPE MAT BIOLO	date reception Labo Douai	Plaque ADN	Position ADN	Date extraction
FR8531190924	GD475781	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	A01	17/01/2023
FR8531190925	GD475782	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	B01	17/01/2023
FR8531190926	GD475783	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	C01	17/01/2023
FR8531190927	GD475784	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	D01	17/01/2023
FR8531190928	GD475785	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	E01	17/01/2023
FR8531190930	GD475786	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	F01	17/01/2023
FR8531190932	GD475787	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	G01	17/01/2023
FR8531190933	GD475788	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	H01	17/01/2023
FR8529672359	GD475745	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	A02	17/01/2023
FR8557624131	GD475730	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	B02	17/01/2023
FR8557624132	GD475731	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	C02	17/01/2023
FR8557624133	GD475732	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	D02	17/01/2023
FR8557624134	GD475733	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	E02	17/01/2023
FR8557624135	GD475734	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	F02	17/01/2023

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

FR8557624136	GD475735	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	G02	17/01/2023
FR8557624137	GD475736	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	H02	17/01/2023
FR8557624138	GD475737	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	A03	17/01/2023
FR8557624139	GD475738	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	B03	17/01/2023
FR8557624140	GD475739	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	C03	17/01/2023
FR8557624141	GD475740	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	D03	17/01/2023
FR8546135626	GD437276	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	E03	17/01/2023
FR8546135631	GD437277	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	F03	17/01/2023
FR8557624142	GD475741	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	G03	17/01/2023
FR8557624143	GD475742	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	H03	17/01/2023
FR8557624121	GD475720	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	A04	17/01/2023
FR8557624122	GD475721	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	B04	17/01/2023
FR8557624123	GD475722	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	C04	17/01/2023
FR8557624124	GD475723	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	D04	17/01/2023
FR8557624125	GD475724	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	E04	17/01/2023
FR8557624126	GD475725	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	F04	17/01/2023
FR8557624127	GD475726	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	G04	17/01/2023
FR8531190909	GD475772	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	H04	17/01/2023
FR8531190910	GD475773	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	A05	17/01/2023
FR8531190913	GD475774	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	B05	17/01/2023
FR8531190914	GD475775	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	C05	17/01/2023
FR8531190915	GD475776	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	D05	17/01/2023
FR8531190916	GD475777	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	E05	17/01/2023
FR8531190920	GD475778	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	F05	17/01/2023
FR8531190921	GD475779	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	G05	17/01/2023
FR8531190922	GD475780	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	H05	17/01/2023
FR8546135635	GD437280	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	A06	17/01/2023
FR8546135636	GD437281	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	B06	17/01/2023


 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

FR8546135641	GD437282	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	C06	17/01/2023
FR8546135643	GD437283	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	D06	17/01/2023
FR8546135647	GD437284	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	E06	17/01/2023
FR8546135648	GD437285	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	F06	17/01/2023
FR8546135649	GD437286	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	G06	17/01/2023
FR8546135650	GD437287	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	H06	17/01/2023
FR8546135651	GD437288	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	A07	17/01/2023
FR8546135657	GD437289	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	B07	17/01/2023
FR8546135659	GD437290	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	C07	17/01/2023
FR8546135660	GD437291	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	D07	17/01/2023
FR8546135661	GD437292	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	E07	17/01/2023
FR8546135662	GD437293	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	F07	17/01/2023
FR8546135668	GD437294	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	G07	17/01/2023
FR8546135670	GD437295	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	H07	17/01/2023
FR8522234554	GD475842	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	A08	17/01/2023
FR8557624128	GD475727	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	B08	17/01/2023
FR8557624129	GD475728	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	C08	17/01/2023
FR8557624130	GD475729	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	D08	17/01/2023
FR8546135634	GD437279	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	E08	17/01/2023
FR8546135633	GD437278	2	38	Poil	16/01/2023	SAM230149	F08	17/01/2023
FR8537685576	GD475834	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	G08	17/01/2023
FR8537685577	GD475835	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	H08	17/01/2023
FR8537685578	GD475836	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	A09	17/01/2023
FR8537685579	GD475837	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	B09	17/01/2023
FR8537685580	GD475838	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	C09	17/01/2023
FR8537685582	GD475839	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	D09	17/01/2023
FR8537685583	GD475840	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	E09	17/01/2023
FR8537685584	GD475841	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	F09	17/01/2023

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

FR8537685566	GD475825	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	G09	17/01/2023
FR8537685567	GD475826	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	H09	17/01/2023
FR8537685568	GD475827	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	A10	17/01/2023
FR8537685572	GD475830	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	B10	17/01/2023
FR8537685573	GD475831	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	C10	17/01/2023
FR8537685556	GD475816	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	D10	17/01/2023
FR8537685557	GD475817	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	E10	17/01/2023
FR8537685558	GD475818	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	F10	17/01/2023
FR8537685559	GD475819	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	G10	17/01/2023
FR8537685571	GD475829	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	H10	17/01/2023
FR8537685574	GD475832	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	A11	17/01/2023
FR8537685575	GD475833	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	B11	17/01/2023
FR8537685565	GD475824	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	C11	17/01/2023
FR8537685563	GD475823	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	D11	17/01/2023
FR8537685562	GD475822	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	E11	17/01/2023
FR8537685561	GD475821	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	F11	17/01/2023
FR8537685570	GD475828	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	G11	17/01/2023
FR8537685560	GD475820	2	66	Poil	16/01/2023	SAM230149	H11	17/01/2023
LV018545415978	GD238074	2	38	Poil	17/01/2023	SAM230149	A12	17/01/2023
LV018545415981	GD238078	2	38	Poil	17/01/2023	SAM230149	B12	17/01/2023
LV018545415983	GD238069	2	38	Poil	17/01/2023	SAM230149	C12	17/01/2023
LV018545415995	GD238079	2	38	Poil	17/01/2023	SAM230149	D12	17/01/2023
LV018545415998	GD238073	2	38	Poil	17/01/2023	SAM230149	E12	17/01/2023
LV018545416000	GD238070	2	38	Poil	17/01/2023	SAM230149	F12	17/01/2023
LV018545416005	GD238075	2	38	Poil	17/01/2023	SAM230149	G12	17/01/2023
FR8553511417	GD475761	2	66	Poil	17/01/2023	SAM230149	H12	17/01/2023

➤ Milieu : extractions réalisées dans la salle Extraction, dont la température est maîtrisée

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

(21°C +/- 3°C), et géotypages réalisés dans les salles Pré-PCR géotypage et Post-PCR géotypage, dont la température est maîtrisée pour cette dernière (21°C +/- 3°C).

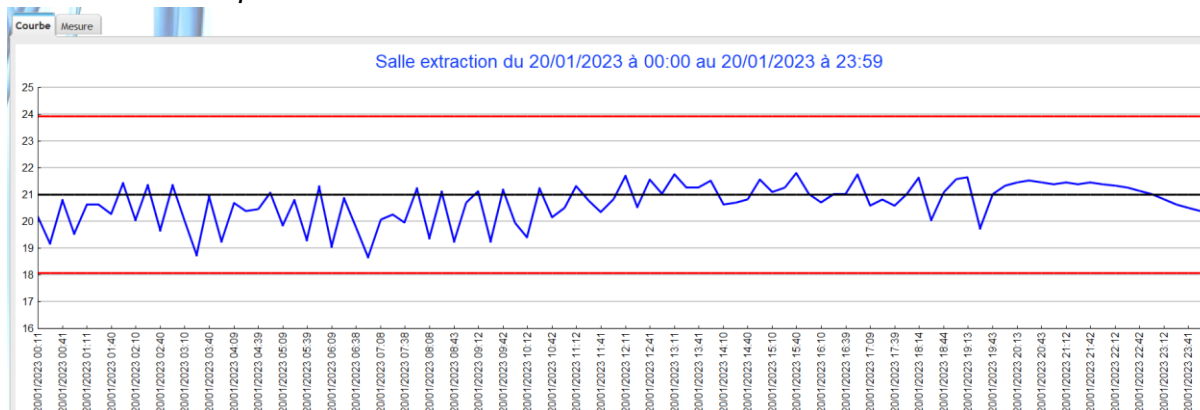
- Main d'œuvre : Personnels plateforme géotypage (Malika Merbah, Michèle Boutté, et Sophie Merlin)

TISSUE_230117-01			
	DATE	OPERATEUR	
Création plaque prélèvements	17/01/2023	MA	
Scan des CAB	17/01/2023	MA	
Check Galaxy	17/01/2023	MA	
Préparation des prélèvements	17/01/2023	MICH	N° lot / Référence
Extraction	20/01/2023	MICH	22008-001(M)
Création plaque SAM	20/01/2023	MICH	SAM230149


6.5.4. Résultats de l'essai – Conclusion

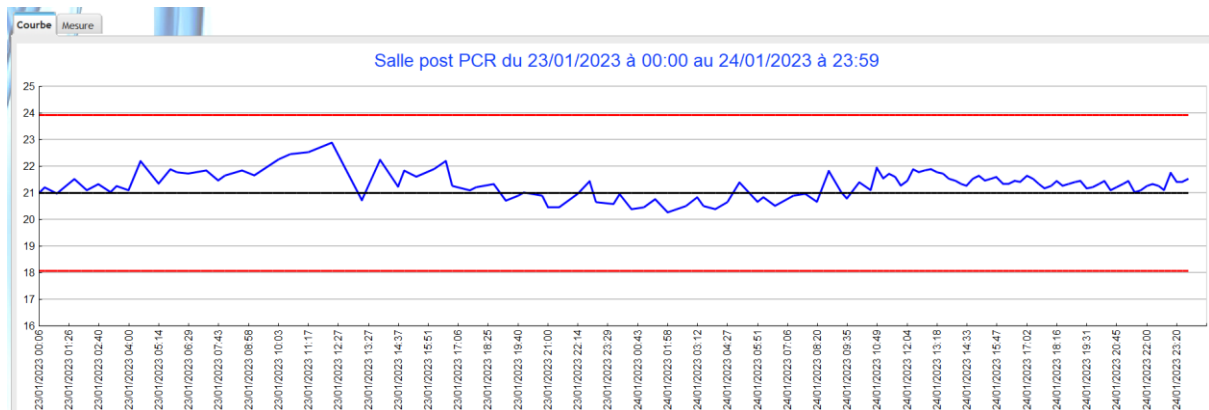
- Milieu :

- Variation de température salle extraction 20/01/2023



- Variation de température salle post-PCR géotypage

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT



➤ *Extraction échantillons :*

Dosage picogreen, réalisé selon le document [GDB_MOP_08_Dosage ADN](#) :


Concentration calculée (ng/μL)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20,78	23,74	20,45	12,65	15,94	17,03	44,48	27,99	31,48	21,09	26,35	34,90
B	13,54	39,29	33,90	30,25	15,46	19,62	26,79	14,11	27,41	27,21	22,61	45,12
C	34,42	28,03	26,79	30,17	35,33	17,07	18,23	20,25	27,65	19,19	30,86	19,84
D	30,26	15,07	9,25	21,28	26,52	14,80	16,60	17,28	12,97	19,82	17,57	9,67
E	16,07	33,20	20,02	31,76	34,98	15,07	31,07	34,01	22,36	28,57	25,42	34,04
F	29,15	21,48	22,78	17,55	21,04	27,19	23,31	14,89	16,89	18,46	52,57	16,32
G	27,52	33,62	22,07	18,42	17,44	15,98	28,53	16,09	35,24	27,77	33,77	26,10
H	21,77	35,00	17,61	25,79	17,31	35,83	33,27	36,11	20,79	29,91	16,32	52,07

-> référence fichier dosage : GDB_ENR_136_Dosage poils TISSUE MagnetaPure SAM230149_200123_v1.0


➤ *Génotypage échantillons :*

Call Rate:


ID	CODE BARRE	ID GENOTYPAGE	Date debut genotypage	Date de Scan	Call Rate	Callrate 580 Iso
FR8531190924	GD475781	WG6984824-MSA7_A01	23/01/2023	24/01/2023	0,9960497	0,998276
FR8531190925	GD475782	WG6984824-MSA7_B01	23/01/2023	24/01/2023	0,9968699	0,998276
FR8531190926	GD475783	WG6984824-MSA7_C01	23/01/2023	24/01/2023	0,9988115	0,998276
FR8531190927	GD475784	WG6984824-MSA7_D01	23/01/2023	24/01/2023	0,9990627	0,998276
FR8531190928	GD475785	WG6984824-MSA7_E01	23/01/2023	24/01/2023	0,9977235	0,998276
FR8531190930	GD475786	WG6984824-MSA7_F01	23/01/2023	24/01/2023	0,9991965	1
FR8531190932	GD475787	WG6984824-MSA7_G01	23/01/2023	24/01/2023	0,9991798	1

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT


FR8531190933	GD475788	WG6984824-MSA7_H01	23/01/2023	24/01/2023	0,9972883	0,998276
FR8529672359	GD475745	WG6984824-MSA7_A02	23/01/2023	24/01/2023	0,9840983	0,991379
FR8557624131	GD475730	WG6984824-MSA7_B02	23/01/2023	24/01/2023	0,9981588	0,996552
FR8557624132	GD475731	WG6984824-MSA7_C02	23/01/2023	24/01/2023	0,9978575	1
FR8557624133	GD475732	WG6984824-MSA7_D02	23/01/2023	24/01/2023	0,9958823	0,994828
FR8557624134	GD475733	WG6984824-MSA7_E02	23/01/2023	24/01/2023	0,9923002	0,994828
FR8557624135	GD475734	WG6984824-MSA7_F02	23/01/2023	24/01/2023	0,9976064	0,998276
FR8557624136	GD475735	WG6984824-MSA7_G02	23/01/2023	24/01/2023	0,9900907	0,993103
FR8557624137	GD475736	WG6984824-MSA7_H02	23/01/2023	24/01/2023	0,994878	0,996552
FR8557624138	GD475737	WG6984824-MSA7_A03	23/01/2023	24/01/2023	0,9854039	0,989655
FR8557624139	GD475738	WG6984824-MSA7_B03	23/01/2023	24/01/2023	0,9968029	0,996552
FR8557624140	GD475739	WG6984824-MSA7_C03	23/01/2023	24/01/2023	0,9964514	0,993103
FR8557624141	GD475740	WG6984824-MSA7_D03	23/01/2023	24/01/2023	0,9188008	0,937931
FR8546135626	GD437276	WG6984824-MSA7_E03	23/01/2023	24/01/2023	0,9957818	0,994828
FR8546135631	GD437277	WG6984824-MSA7_F03	23/01/2023	24/01/2023	0,9975394	1
FR8557624142	GD475741	WG6984824-MSA7_G03	23/01/2023	24/01/2023	0,9806501	0,982759
FR8557624143	GD475742	WG6984824-MSA7_H03	23/01/2023	24/01/2023	0,994426	0,994828
FR8557624121	GD475720	WG6984824-MSA7_A04	23/01/2023	24/01/2023	0,9023467	0,918966
FR8557624122	GD475721	WG6984824-MSA7_B04	23/01/2023	24/01/2023	0,988601	0,989655
FR8557624123	GD475722	WG6984824-MSA7_C04	23/01/2023	24/01/2023	0,9972047	0,996552
FR8557624124	GD475723	WG6984824-MSA7_D04	23/01/2023	24/01/2023	0,995196	0,987931
FR8557624125	GD475724	WG6984824-MSA7_E04	23/01/2023	24/01/2023	0,9967192	0,993103
FR8557624126	GD475725	WG6984824-MSA7_F04	23/01/2023	24/01/2023	0,9939406	0,996552
FR8557624127	GD475726	WG6984824-MSA7_G04	23/01/2023	24/01/2023	0,9885675	0,991379
FR8531190909	GD475772	WG6984824-MSA7_H04	23/01/2023	24/01/2023	0,9964012	0,996552
FR8531190910	GD475773	WG6984824-MSA7_A05	23/01/2023	24/01/2023	0,9950789	0,994828
FR8531190913	GD475774	WG6984824-MSA7_B05	23/01/2023	24/01/2023	0,9977403	1
FR8531190914	GD475775	WG6984824-MSA7_C05	23/01/2023	24/01/2023	0,9972716	0,998276

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

FR8531190915	GD475776	WG6984824-MSA7_D05	23/01/2023	24/01/2023	0,9985772	0,998276
FR8531190916	GD475777	WG6984824-MSA7_E05	23/01/2023	24/01/2023	0,9988115	1
FR8531190920	GD475778	WG6984824-MSA7_F05	23/01/2023	24/01/2023	0,9939238	0,998276
FR8531190921	GD475779	WG6984824-MSA7_G05	23/01/2023	24/01/2023	0,9814368	0,996552
FR8531190922	GD475780	WG6984824-MSA7_H05	23/01/2023	24/01/2023	0,9930869	0,996552
FR8546135635	GD437280	WG6984824-MSA7_A06	23/01/2023	24/01/2023	0,989689	0,991379
FR8546135636	GD437281	WG6984824-MSA7_B06	23/01/2023	24/01/2023	0,9946939	0,996552
FR8546135641	GD437282	WG6984824-MSA7_C06	23/01/2023	24/01/2023	0,9921161	0,994828
FR8546135643	GD437283	WG6984824-MSA7_D06	23/01/2023	24/01/2023	0,9928359	0,991379
FR8546135647	GD437284	WG6984824-MSA7_E06	23/01/2023	24/01/2023	0,9972381	0,996552
FR8546135648	GD437285	WG6984824-MSA7_F06	23/01/2023	24/01/2023	0,994493	0,994828
FR8546135649	GD437286	WG6984824-MSA7_G06	23/01/2023	24/01/2023	0,9949282	1
FR8546135650	GD437287	WG6984824-MSA7_H06	23/01/2023	24/01/2023	0,9979244	0,996552
FR8546135651	GD437288	WG6984824-MSA7_A07	23/01/2023	24/01/2023	0,9960497	0,993103
FR8546135657	GD437289	WG6984824-MSA7_B07	23/01/2023	24/01/2023	0,994811	0,996552
FR8546135659	GD437290	WG6984824-MSA7_C07	23/01/2023	24/01/2023	0,9938569	0,994828
FR8546135660	GD437291	WG6984824-MSA7_D07	23/01/2023	24/01/2023	0,992953	0,994828
FR8546135661	GD437292	WG6984824-MSA7_E07	23/01/2023	24/01/2023	0,9865254	0,986207
FR8546135662	GD437293	WG6984824-MSA7_F07	23/01/2023	24/01/2023	0,9921328	0,991379
FR8546135668	GD437294	WG6984824-MSA7_G07	23/01/2023	24/01/2023	0,9871113	0,994828
FR8546135670	GD437295	WG6984824-MSA7_H07	23/01/2023	24/01/2023	0,9970372	0,998276
FR8522234554	GD475842	WG6984824-MSA7_A08	23/01/2023	24/01/2023	0,9880654	0,987931
FR8557624128	GD475727	WG6984824-MSA7_B08	23/01/2023	24/01/2023	0,9968197	0,993103
FR8557624129	GD475728	WG6984824-MSA7_C08	23/01/2023	24/01/2023	0,9965351	0,994828
FR8557624130	GD475729	WG6984824-MSA7_D08	23/01/2023	24/01/2023	0,9762646	0,984483
FR8546135634	GD437279	WG6984824-MSA7_E08	23/01/2023	24/01/2023	0,9961668	0,994828
FR8546135633	GD437278	WG6984824-MSA7_F08	23/01/2023	24/01/2023	0,9952964	0,994828
FR8537685576	GD475834	WG6984824-MSA7_G08	23/01/2023	24/01/2023	0,996284	0,998276

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

FR8537685577	GD475835	WG6984824-MSA7_H08	23/01/2023	24/01/2023	0,9979077	1
FR8537685578	GD475836	WG6984824-MSA7_A09	23/01/2023	24/01/2023	0,9974223	0,996552
FR8537685579	GD475837	WG6984824-MSA7_B09	23/01/2023	24/01/2023	0,998845	0,998276
FR8537685580	GD475838	WG6984824-MSA7_C09	23/01/2023	24/01/2023	0,9952295	0,998276
FR8537685582	GD475839	WG6984824-MSA7_D09	23/01/2023	24/01/2023	0,9345854	0,924138
FR8537685583	GD475840	WG6984824-MSA7_E09	23/01/2023	24/01/2023	0,998527	0,998276
FR8537685584	GD475841	WG6984824-MSA7_F09	23/01/2023	24/01/2023	0,9963008	1
FR8537685566	GD475825	WG6984824-MSA7_G09	23/01/2023	24/01/2023	0,9676107	0,97931
FR8537685567	GD475826	WG6984824-MSA7_H09	23/01/2023	24/01/2023	0,996987	1
FR8537685568	GD475827	WG6984824-MSA7_A10	23/01/2023	24/01/2023	0,9963844	0,998276
FR8537685572	GD475830	WG6984824-MSA7_B10	23/01/2023	24/01/2023	0,997506	0,994828
FR8537685573	GD475831	WG6984824-MSA7_C10	23/01/2023	24/01/2023	0,9976064	0,998276
FR8537685556	GD475816	WG6984824-MSA7_D10	23/01/2023	24/01/2023	0,9674098	0,974138
FR8537685557	GD475817	WG6984824-MSA7_E10	23/01/2023	24/01/2023	0,9954805	0,998276
FR8537685558	GD475818	WG6984824-MSA7_F10	23/01/2023	24/01/2023	0,9974725	0,996552
FR8537685559	GD475819	WG6984824-MSA7_G10	23/01/2023	24/01/2023	0,9925513	0,994828
FR8537685571	GD475829	WG6984824-MSA7_H10	23/01/2023	24/01/2023	0,9753774	0,981034
FR8537685574	GD475832	WG6984824-MSA7_A11	23/01/2023	24/01/2023	0,9965686	0,998276
FR8537685575	GD475833	WG6984824-MSA7_B11	23/01/2023	24/01/2023	0,9981755	0,998276
FR8537685565	GD475824	WG6984824-MSA7_C11	23/01/2023	24/01/2023	0,9946436	0,993103
FR8537685563	GD475823	WG6984824-MSA7_D11	23/01/2023	24/01/2023	0,9911955	0,989655
FR8537685562	GD475822	WG6984824-MSA7_E11	23/01/2023	24/01/2023	0,9981253	0,996552
FR8537685561	GD475821	WG6984824-MSA7_F11	23/01/2023	24/01/2023	0,9990793	1
FR8537685570	GD475828	WG6984824-MSA7_G11	23/01/2023	24/01/2023	0,9866259	0,987931
FR8537685560	GD475820	WG6984824-MSA7_H11	23/01/2023	24/01/2023	0,9946771	1
LV018545415978	GD238074	WG6984824-MSA7_A12	23/01/2023	24/01/2023	0,9850357	0,991379
LV018545415981	GD238078	WG6984824-MSA7_B12	23/01/2023	24/01/2023	0,9975394	0,996552
LV018545415983	GD238069	WG6984824-MSA7_C12	23/01/2023	24/01/2023	0,9976231	0,998276

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

LV018545415995	GD238079	WG6984824-MSA7_D12	23/01/2023	24/01/2023	0,9962171	0,994828
LV018545415998	GD238073	WG6984824-MSA7_E12	23/01/2023	24/01/2023	0,9983261	0,998276
LV018545416000	GD238070	WG6984824-MSA7_F12	23/01/2023	24/01/2023	0,9979746	0,998276
LV018545416005	GD238075	WG6984824-MSA7_G12	23/01/2023	24/01/2023	0,9968699	1
FR8553511417	GD475761	WG6984824-MSA7_H12	23/01/2023	24/01/2023	0,9990961	1

Version de puce : EuroG_MDv3_XT_GD

Projets Génome Studio : indexation_270123

Fichier de clustering utilisé : MDv3_XT_bovin_230123

Chemin d'accès du projet Génome Studio : serveur gna2gdlabo

\\gna2gdlabo.genesdiffusion.com\archives_genot\genotypages_SAM\SAM_MD_v3\Indexations\2023\indexations_janvier_2023\indexation_270123

	Call Rate	Callrate 580 ISO
moyenne	0,99152728	0,99303171
médiane	0,99610825	0,996552
Taux d'échantillon > 0,95	96,875%	96,875%

➤ **Interprétation :**

Pour ce qui concerne la concentration d'ADN : **91,7 %** des échantillons montrent un **dosage supérieur à 15 ng/μL**. Ce critère satisfait au premier critère de performance visé de plus de 90 % d'échantillons avec une concentration ADN > 15 ng /μL.

A l'issue de l'opération de génotypage de 96 échantillons, une **médiane de CallRate égale à 0,9961** est calculée (0,9966 sur les 580 SNP ISO), celle-ci satisfait au deuxième critère de performance (Médiane CallRate > 0,975). En outre, **96,875 % des échantillons sont supérieurs à la valeur de 0,95 de CallRate** satisfaisant à l'ultime critère de performance (90 % d'échantillons > 0,95 de CallRate).


➤ **Conclusion**

L'essai répond aux critères de performance attendus et met en évidence l'obtention de résultats qualitativement très satisfaisants.

Un test de répétabilité et de reproductibilité reste à effectuer se basant sur un test annuel de répétabilité/reproductibilité extraction sur colonnes de silice en plaque, ainsi que la vérification de la concordance des génotypages.

Test répétabilité-reproductibilité

➔ Introduction

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

L'essai consiste en la validation d'un test annuel de répétabilité/reproductibilité extraction sur MagnétaPure en plaque à partir de poils, celui-ci ayant effectué en septembre 2023 par Karine Le Roux et Michèle Boutté, selon GDB_PRO_06_Contrôle de reproductibilité et répétabilité de la phase d'extraction_v1.1 au moment de l'essai.

➔ Mode Opératoire

Le mode opératoire est celui en application au moment de l'essai GDB_MOP_32_Extraction ADN sur Magnetapure 96_matrice poils_v1.0.

➔ Points à développer (liste non exhaustive)

- Matériel (type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...) :
 - MagnetaPure GDD-PURIF-002
 - Centrifugeuse Hettich GDD-CENTRI-001
 - Agitateur chauffant GDD-INCUB-007
 - Agitateur GDD-AGIT-007


➤ Kits et réactifs :

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
NucleoMag Tissue Macherey Nagel Réf. 744300.24	2306-001	-	Protéinase K solubilisée -21°C +/- 3°C Autres réactifs à 20°C +/- 5°C

➤ Matrices (quantité, traçabilité échantillon, traitement, spécificités, etc...) :

Dans l'ordre de traitement :

CODE BARRE	TYPE MAT BIOLO	date reception Labo Douai	Plaque ADN	Date extraction
GD532913	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532860	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532857	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532858	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023

	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

GD532853	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532862	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532861	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532920	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532906	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532895	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532894	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532893	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532911	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532900	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532899	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023
GD532898	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	13/09/2023

➤ Milieu : extractions réalisées dans la salle Extraction, dont la température est maîtrisée (21°C +/- 3°C).


➤ Main d'oeuvre :

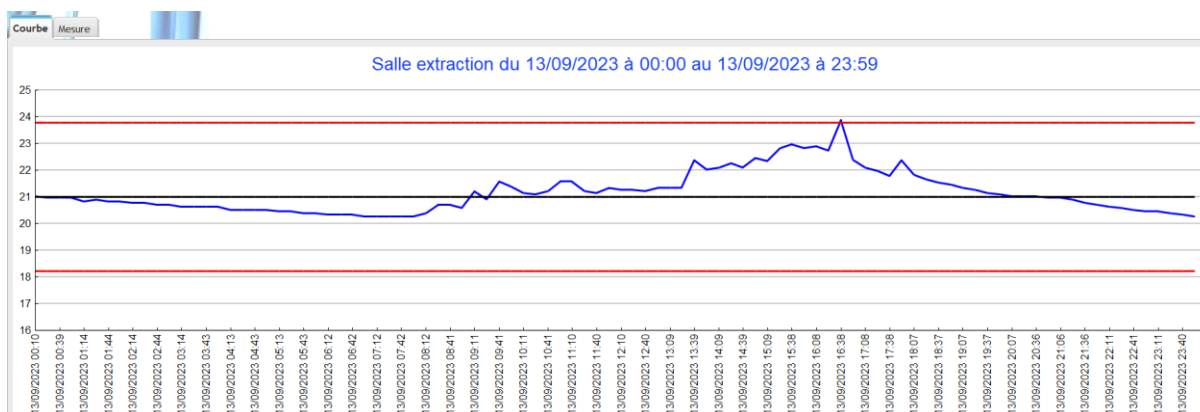
- extractions Test répéta/repro extraction poils 13/09/23 : Karine Le Roux A01-H02 + A03-H04 (répétabilité Karine), Michèle Boutté A05-H06 + A07-H08 (répétabilité Michèle),
- dosage 64 échantillons : Karine Le Roux le 13/09/23.

➔ Résultats de l'essai - Conclusion

➤ Milieu :

- Variation de température salle extraction le 13/09/2023

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT



➤ **Extraction échantillons :**

(fichier d'origine comprenant dosages et gammes étalon : GDB_ENR_130_Dosages répétabilité repro extractions sang-pois KLR-MB 130923_v1.0)

Les résultats de ce test annuel de répétabilité/reproductibilité extraction figurent dans le document GDB_FORM_02_Contrôle de reproductibilité et répétabilité de la phase d'extraction_230913_01_v2.0.

➤ **Interprétation :**

- Spécifications relatives au milieu validées
- Contrôle de répétabilité extraction validé (> 90 %) :
 - Karine Le Roux = 100,0 %
 - Michèle Boutté = 100,0 %
- Contrôle de reproductibilité extraction validé (> 90 %) :
 - Karine Le Roux / Michèle Boutté = 91,9 %

➤ **Conclusion**


Le test de répétabilité/reproductibilité extraction sur MagnetaPure en plaque à partir de poils est validé, l'essai répond aux critères de performance attendus.

Un essai permettant la vérification du pourcentage de similarité des génotypages de 2 échantillons issus de ce test reste à effectuer afin de pouvoir valider cette méthode.

Vérification de la concordance

➔ **Introduction**

L'essai consiste en la validation de la concordance des génotypages de 3 extraits de 2 échantillons issus des tests répétabilité/reproductibilité utilisés dans l'essai précédent. Ce

	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

critère est atteint pour un minimum de 99 % de similarité sur les 580 SNP ISO.

➔ Mode Opérateur


Le mode opératoire de génotypage est celui en application au moment de l'essai GDB_MOP_09_Génotypage_v2.1.

➔ Points à développer (liste non exhaustive)

- Matériel (type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...) :
 - Centrifugeuse Hettich GDD-CENTRI-003
 - Four Illumina GDD-FOUR-003 (SAM2407008 échantillons répétabilité)
 - Four Illumina GDD-FOUR-002 (SAM230914 échantillons reproductibilité)
 - Incubateur microplaque SciGene GDD-INCUB-005 (SAM2407008 échantillons répétabilité)
 - Incubateur microplaque SciGene GDD-INCUB-003 (SAM230914 échantillons reproductibilité)
 - Four Illumina GDD-FOUR-004
 - Robot pipeteur Tecan GDD-TECA-001
 - Lecteur de puces à ADN Illumina GDD-SCAN-001

➤ Kits et réactifs :

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
MA1	voir suivi des n° de lot dans le fichier réponses du GDB_FORM_16_Génotypage Infinium Illumina - Tracking form	-	-20°C +/- 5°C
MA2		-	-20°C +/- 5°C
RAM		-	-20°C +/- 5°C
FMS		-	-20°C +/- 5°C
PM1		-	5°C +/- 3°C
Isopropanol		-	Température ambiante
RA1		-	-20°C +/- 5°C
PB2		-	Entre 15°C et 30°C
PB20		-	Entre 15°C et 30°C
XC3		-	Entre 15°C et 30°C


 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

LX1		-	-20°C +/- 5°C
LX2		-	-20°C +/- 5°C
EML		-	-20°C +/- 5°C
SML		-	-20°C +/- 5°C
ATM		-	-20°C +/- 5°C
XC4		-	Entre 15°C et 30°C
Ethanol		-	Température ambiante
BeadChip		-	5°C +/- 3°C

➤ Matrices (quantité, traçabilité échantillon, traitement, spécificités, etc...) :

Les échantillons utilisés dans le cadre des tests annuels de répétabilité/reproductibilité extraction sont, dans la mesure du possible, issus de surplus de prélèvements traités dans le cadre de la production de génotypage en routine. Concernant le génotypage de l'échantillon reproductibilité, nous avons donc utilisé le génotypage de l'échantillon traité en routine plutôt que de génotyper un échantillon reproductibilité de l'essai précédent afin de limiter le coût de génotypage du présent dossier.

CODE BARRE	TYPE MAT BIOLO	date reception Labo Douai	Plaque ADN	Position ADN	Date extraction
GD532899	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	G02 (référence)	13/09/2023
GD532899	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	G04 (répétabilité)	13/09/2023
GD532899	Poil	08/09/2023	SAM230914	C11 (reproductibilité)	12/09/2023
GD532898	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	H02 (référence)	13/09/2023
GD532898	Poil	08/09/2023	Test répéta/repro extraction poils 13/09/23	H04 (répétabilité)	13/09/2023
GD532898	Poil	08/09/2023	SAM230914	D11 (reproductibilité)	12/09/2023

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

➤ Milieu : *géotypages réalisés dans les salles Pré-PCR géotypage et Post-PCR géotypage, dont la température est maîtrisée pour cette dernière (21°C +/- 3°C).*

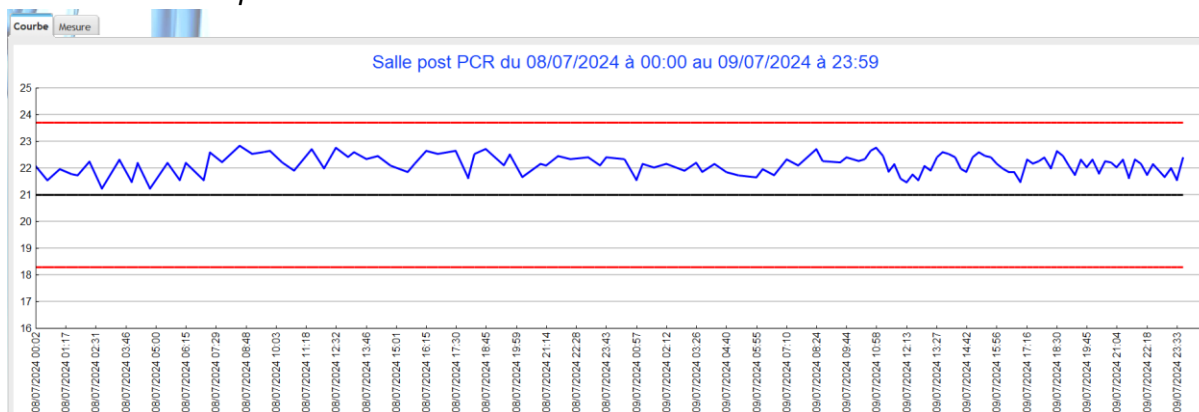
➤ Main d'oeuvre :

- Extraction échantillons GD532899 (G02/G04) et GD532898 (H02/H04) plaque Test répéta/repro extraction poils 13/09/23 : Karine Le Roux
- Extraction échantillons GD532899 (C11) et GD532898 (D11) plaque SAM230914 : Mélissandre Barbet
- Géotypage échantillons GD532899 (G02/G04) et GD532898 (H02/H04) plaque Test répéta/repro extraction poils 13/09/23 : Mélissandre Barbet les 08/07/2024 et 09/07/2024 (avec la SAM2407008, A12/B12 et C12/B12 respectivement)
- Géotypage échantillons GD532899 (C11) et GD532898 (D11) plaque SAM230914 : Mélissandre Barbet les 13/09/2023 et 14/09/2023
- analyses Genome Studio : Sophie Martel le 12/07/2024 (échantillons répétabilité) et Ludivine Liétar le 15/09/2023 (échantillons reproductibilité)
- comparaisons SNP : Pierre Bouvelle le 10/07/2024


➔ Résultats de l'essai – Conclusion

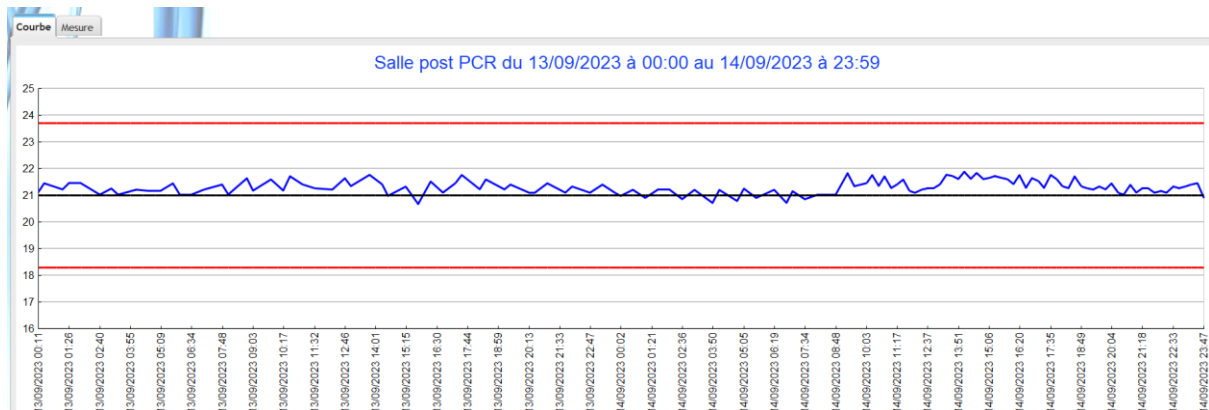
➤ Milieu :

- Variation de température salle POST-PCR les 08/07/2024 et 09/07/2024



- Variation de température salle POST-PCR les 13/09/2023 et 14/09/2023

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT



➤ **Génotypage échantillons :**

ID	CODE BARRE	ID GENOTYPAGE	Date debut genotypage	Date de Scan	Call Rate	Callrate 580 Iso
FR8534686777	GD532899	WG7176727-MSA7_A12	08/07/2024	09/07/2024	0.9983985	0.998276
FR8534686777	GD532899	WG7176727-MSA7_B12	08/07/2024	09/07/2024	0.9991844	1
FR8534686777	GD532899	WG7072875-MSA7_C11	13/09/2023	14/09/2023	0.9992839	0.998264
FR8534686770	GD532898	WG7176727-MSA7_C12	08/07/2024	09/07/2024	0.998695	1
FR8534686770	GD532898	WG7176727-MSA7_D12	08/07/2024	09/07/2024	0.9986654	0.998276
FR8534686770	GD532898	WG7072875-MSA7_D11	13/09/2023	14/09/2023	0.9990154	1

Version de puce : EuroG_MDv4-1_XT_FRA_GD

Projet Génome Studio : indexation_120724

Fichier de clustering utilisé : MDv4_1_XT_bovin_180424.egt

Chemin d'accès du projet Génome Studio : serveur gna2gdlabo

\\gna2gdlabo.genesdiffusion.com\Labo\genotypages\Genotypages_SAM\SAM_MD_v4_1\Indexations\2024\indexation_juillet_2024\indexation_120724

Référence groupe génotypages GDBoard : Genotypages_sem28_2024

Informations retranscrites dans le Fichier suivi échantillons 2024 – GD Biotech

Version de puce : EuroG_MDv4_XT_GD

Projet Génome Studio : indexation_150923


Fichier de clustering utilisé : MDv4_XT_bovin_030423.egt

Chemin d'accès du projet Génome Studio : serveur gna2gdlabo

\\gna2gdlabo.genesdiffusion.com\Labo\genotypages\Genotypages_SAM\SAM_MD_v4\Indexations\2023\indexation_septembre_2023\indexation_150923

Référence historique Galaxy : Genotypages_sem37_2023

Informations retranscrites dans le Fichier suivi échantillons 2023 – Gènes Diffusion

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

➤ *Interprétation :*

- *Spécifications relatives au milieu validées*
- *Sur la version de puce EuroG_MDv4_XT_GD, seuls 576 sur les 580 SNP ISO étaient présents (voir GDB_FORM_01_Fiche de non conformité_230131_01_v2.0), ainsi la concordance des génotypages référence versus reproductibilité est évaluée sur les 576 SNP ISO communs.*
 - *GD532899 :*
Échantillon répétabilité : 99,8 % de similarité 580 SNP ISO (1 SNP illisible génotypage référence).
Échantillon reproductibilité : 99,7 % de similarité 576 SNP ISO communs (1 SNP illisible sur chacun des génotypages).
 - *GD532898 :*
Échantillon répétabilité : 99,8 % de similarité 580 SNP ISO (1 SNP illisible génotypage référence).
Échantillon reproductibilité : 100 % de similarité 576 SNP ISO communs.

Concordance génotypages validée avec des pourcentages de similarité SNP ISO communs > 99 % pour les 2 échantillons issus des tests répétabilité/reproductibilité, entre l'extrait d'ADN référence avec l'extrait d'ADN répétabilité et avec l'extrait d'ADN reproductibilité (GDB_ENR_131_Comparaisons génotypages validation méthodes extraction_240710_v1.0).

➤ *Conclusion :*

La concordance des génotypages est validée, l'essai répond aux critères de performance attendus.

Essai inter-laboratoire

L'essai inter-laboratoire validé correspondant est en date du 30/09/2024 et correspond aux documents suivants :


GDB_FORM_19_Résultats bruts essai interlaboratoire - GD Biotech - 09-2024_v1.1

GDB_FORM_20_Essai interlaboratoire - GD Biotech - 09-2024_v1.1


7. Analyse

7.1. Facteurs de risques et moyens mis en place pour les maîtriser

Méthode	Catégorie 5 M (Matériel, Matière,	Facteur de risque d'influence de l'essai identifié	Risque	Moyens mis en place pour maîtriser le risque	Evaluation risque après
---------	---	--	--------	--	----------------------------

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

	<i>Méthode, Milieu, Main d'œuvre</i>				moyen mis en place <i>(Faible / Moyen / Fort)</i>
Extraction d'ADN sur Magnetapure 96 à partir de poils	Matériel	Panne ou casse de la tête aimantée d'un Magnétapure	Ne plus pouvoir utiliser cette méthode d'extraction	<ul style="list-style-type: none"> Achat de 2 robots, existence de méthode alternative (Extraction d'ADN sur colonnes de silice en plaque à partir de poils) accès du laboratoire soumis à autorisation 	Faible
	Matériel	Panne ou casse d'appareil	Ne plus pouvoir utiliser cette méthode d'extraction	<ul style="list-style-type: none"> Appareil de secours accès du laboratoire soumis à autorisation 	Faible
	Matériel	Intercontaminations liées aux équipements (réglage, dysfonctionnement, etc...)	Absence de résultat de génotypage	<ul style="list-style-type: none"> Utilisation consommables ADN free (pointes, plaques de lyse, etc...), stérilisation matériel, sensibilisation au nettoyage du matériel, ordre de lavage du laboratoire cycle UV du robot à la fin de chaque journée d'extraction pas de résultat de génotypage validé si callrate < 0,95 (reflet d'extraction de mauvaise qualité ou contaminée) accès du laboratoire soumis à autorisation 	Faible
	Matériel	Dysfonctionnement équipement critique (pipettes)	Dispense de volumes erronés	<ul style="list-style-type: none"> Suivi en métrologie externe (étalonnage COFRAC) Stock matériel suffisant pour dépannage urgent accès du laboratoire soumis à autorisation 	Faible
	Matériel	Variation de température d'équipement critique	Conservation des produits d'essais et réactifs non maîtrisée	<ul style="list-style-type: none"> Surveillance de température suivi en métrologie externe branchement sur prise ondulée (en cas de coupure de courant) accès du laboratoire soumis à autorisation 	Faible
	Matière	Prélèvement de mauvaise qualité	Absence de résultat de génotypage	<ul style="list-style-type: none"> Transmission des exigences relatives à la conservation et les critères d'acceptation des prélèvements via le contrat de prestation, possibilité de refus (retour) prélèvement au client si exigences non remplies conformément au contrat de prestation 	Faible
	Matière	Intercontamination	Absence de résultat de génotypage	<ul style="list-style-type: none"> Transmission des critères d'acceptation des prélèvements via le contrat de prestation possibilité de refus (retour) prélèvement au client si exigences non remplies conformément au contrat de prestation pas de résultat de génotypage validé si callrate < 0,95 (reflet d'extraction de mauvaise qualité ou contaminée) 	Faible
	Milieu	Intercontaminations liées à l'environnement	Absence de résultat de génotypage	<ul style="list-style-type: none"> Accès du laboratoire soumis à autorisation pièces de travail agencées selon les risques de contamination et identifiées 	Faible
	Milieu	Variances de température ambiante (climatisation non reliée au circuit ondulé)	Conservation des produits d'essais et réactifs non maîtrisée	<ul style="list-style-type: none"> Surveillance des températures des pièces où présence de réactifs 	Faible

	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

	Méthode	Manque d'information ou information erronée	Mauvaise application de la méthode	<ul style="list-style-type: none"> Vérification et approbation du dossier de validation de méthode Vérification et approbation de mode opératoire associé 	Faible
	Méthode	Ecart de performance	Absence de résultat de génotypage Déviance de la qualité des résultats	<ul style="list-style-type: none"> Critères de validation des résultats définis : validation si et seulement si plus de 85% des résultats d'analyse d'un run ont un callrate < 0,95 Surveillance de la validité de méthode (exemples : contrôle de répétabilité et de reproductibilité méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN, reporting statistiques mensuels, essais interlaboratoires) 	Faible
	Main d'oeuvre	Non respect des modes opératoires	Ecart de performance	<ul style="list-style-type: none"> Validation de prise de connaissance des documents applicables Formation personnel Habilitation personnel Suivi de maintien de compétence personnel habilité Contrôle de répétabilité et reproductibilité de la phase d'extraction 	Faible
	Main d'oeuvre	Erreur humaine	Intercontamination Mauvaise conservation des produits d'essais et réactifs , utilisation d'un mauvais programme, etc...	<ul style="list-style-type: none"> pas de résultat de génotypage si callrate < 0,95 (reflet d'extraction de mauvaise qualité ou contaminée) personnel sensibilisé à la gestion des incidents et non-conformités 	Faible

Par essence, les méthodes d'extraction ADN si elles intègrent des facteurs de risques, ceux-ci ne peuvent pas engendrer des résultats de génotypages erronés en tant que tels mais peuvent aboutir à une absence de résultats de génotypages (CallRate < 0,95).

7.2. Incertitudes

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 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 validation de méthode permettent de vérifier l'absence d'intercontamination au cours du process analytique.


De plus, le laboratoire a mis en place des dispositions afin de répondre aux exigences relatives à : équipements, objets d'essai, installations, conditions ambiantes, formation, habilitation et suivi de maintien de compétence de son personnel, la validité des résultats, et ainsi minimiser voire supprimer l'impact des risques identifiés au sein de son process d'extraction d'ADN.

Liste des documents :

[GDB_PRO_29_Gestion des équipements](#)

[GDB_PRO_30_Manutention des objets d'essais](#)

[GDB_PRO_09_Consignes générales d'Hygiène et Sécurité appliquées à l'activité de la Plateforme de Génotypage haut-débit](#)

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

GDB_PRO_27_Gestion du personnel

GDB_PRO_06_Contrôle de reproductibilité et répétabilité de la phase d'extraction

GDB_PRO_05_Contrôle de répétabilité et de reproductibilité _ méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN

GDB_PRO_16_Contrôle des performances du génotypage réalisé par méthode des puces à ADN _ essai interlaboratoire

GDB_FORM_47_Contrat de prestation plateforme de génotypage haut-débit GD Biotech

Concernant la présente validation de méthode, la notion d'incertitude ne s'applique qu'à la seule méthode de dosage de la concentration d'ADN. A l'issue du dosage, l'incertitude de mesure, qui dépend directement du coefficient de détermination r^2 associé à la réalisation de la gamme étalon, est vérifiée. Nous avons fixé un seuil d'écart toléré à 0,99, ainsi r^2 doit être supérieur à 0,99 afin de valider la mesure, ce qui est le cas dans notre essai.

7.3. Robustesse

Non vérifiée

7.4. Conclusion

La méthode d'extraction d'ADN par billes paramagnétiques à partir de poils, répond aux critères de performance attendus et met en évidence l'obtention de résultats qualitativement satisfaisants.

Comme envisagé, nous parvenons à atteindre une réduction conséquente des coûts engendrés par rapport à la méthode d'extraction sur colonne de silice. En tenant compte:


- D'une primo négociation sur le tarif de billes magnétiques (remise consentie de 27 %)
- De la mise au point d'un protocole permettant une diminution significative de la consommation des réactifs.
- D'une charge portée par les réactifs actuels (membrane de silice) de 1,73 € H.T. par point contre : 0,88 € H.T. sur billes paramagnétiques (incluant l'achat de 2 réactifs complémentaires).

Estimation coût plastique:

Extraction sur colonne de silice: plaque de lyse 0,034 €, pointes 0,08 €, plaque élution/caps 0,23 € soit 0,34 € par point

Extraction par billes magnétiques: biotubes 0,08 €, deepwell 0,16 €, peigne 0,028 €, pointes 0,073 €, plaque élution 0,023 €, film autocollant 0,003 € soit 0,37 € par point

Au final, le gain financier apporté par ce changement de méthode d'extraction s'élève à 0,82 € H.T. par point d'extraction, ce gain est très légèrement supérieur à l'objectif fixé à 0,80 € H.T. ce qui valide l'opération.

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

8. Sélection, vérification et validation de méthode

Partie réservée au Directeur Recherche et Développement

Référence du présent enregistrement de validation de méthode :

GDB_FORM_53_Validation de méthode_Extraction d'ADN sur billes magnétiques à partir de poils_221115_01_v1.0

Intitulé de la méthode : *Extraction d'ADN sur billes magnétiques à partir de poils*

Référence de l'essai sélectionné : *Essai 5*

Vérification de la méthode :

☒ **approuvée** (enregistrements produits suffisants - critères de performance atteints et conformes aux exigences du client)

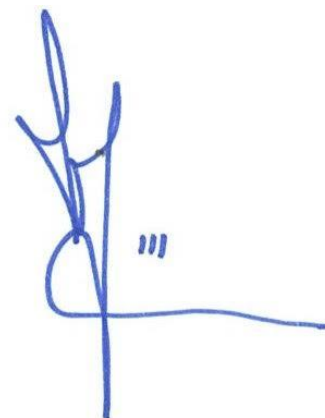
☐ **non approuvée**

Signature Directeur Recherche et Développement :

Nom : Christophe AUDEBERT

Date : 27/01/2023

Visa :




Validation de la méthode :

Conditions

Domaine d'application : *extraction d'ADN*

Ressources humaines :

- *personnel autorisé : personnel de la plateforme GD Scan habilité à l'extraction d'ADN sous condition de formation*
- *personnel formateur : Sophie Merlin*
- *personnel à former/habiller : personnel de la plateforme GD Scan habilité à l'extraction*

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

d'ADN

- autre : à préciser

Autres conditions : *Information au client*

Aptitude à l'emploi :

☒ **accordée**, mise en application à compter du : 27/01/2023

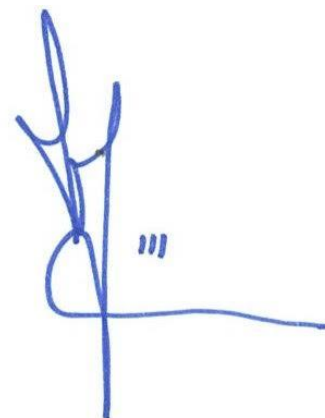
☐ **non accordée**, commentaires :


Signature Directeur Recherche et Développement :

Nom : Christophe AUDEBERT

Date : 27/01/2023

Visa :



	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Partie réservée au Directeur Recherche et Développement

Référence du présent enregistrement de validation de méthode :

GDB_FORM_53_Validation de méthode_Extraction d'ADN sur billes magnétiques à partir de poils_221115_02_v2.0

Intitulé de la méthode : *Extraction d'ADN sur billes magnétiques à partir de poils*

Référence de l'essai sélectionné : *Essai 5*

Vérification de la méthode :

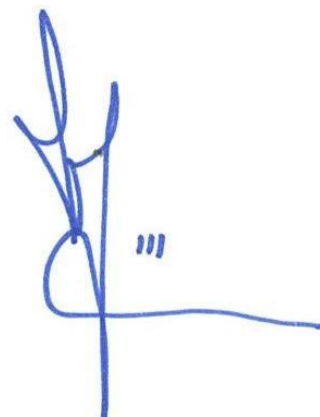
☒ **approuvée** (enregistrements produits suffisants - critères de performance atteints et conformes aux exigences du client)

☐ **non approuvée**

Signature Directeur Recherche et Développement :

Nom : Christophe AUDEBERT Date : 31/07/2024

Visa :



Validation de la méthode :


Conditions

Domaine d'application : *extraction d'ADN*

Ressources humaines :

- *personnel autorisé : personnel de la plateforme GD Scan habilité à l'extraction d'ADN sous condition de formation*
- *personnel formateur : Sophie Merlin*
- *personnel à former/habiller : personnel de la plateforme GD Scan habilité à l'extraction d'ADN*
- *autre : à préciser*

Autres conditions : *Information au client*

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Aptitude à l'emploi :

☒ **accordée**, mise en application à compter du : 27/01/2023

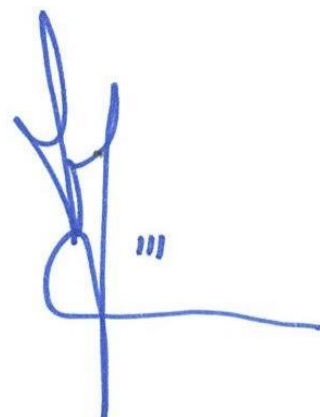
☐ **non accordée**, commentaires :


Signature Directeur Recherche et Développement :

Nom : Christophe AUDEBERT

Date : 31/07/2024

Visa :



	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Partie réservée au Directeur Recherche et Développement

Référence du présent enregistrement de validation de méthode :

GDB_FORM_53_Validation de méthode_Extraction d'ADN sur billes magnétiques à partir de poils_221115_03_v3.0

Intitulé de la méthode : *Extraction d'ADN sur billes magnétiques à partir de poils*

Référence de l'essai sélectionné : *Essai n°5*

Vérification de la méthode :

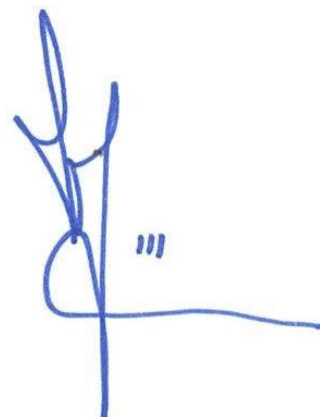
☒ **approuvée** (enregistrements produits suffisants - critères de performance atteints et conformes aux exigences du client)

☐ **non approuvée**

Signature Directeur Recherche et Développement :

Nom : Christophe AUDEBERT Date : 04/11/2024

Visa :



Validation de la méthode :


Conditions

Domaine d'application : *extraction d'ADN*

Ressources humaines :

- *personnel autorisé : personnel de la plateforme GD Scan habilité à l'extraction d'ADN sous condition de formation*
- *personnel formateur : Sophie Merlin*
- *personnel à former/habiller : personnel de la plateforme GD Scan habilité à l'extraction d'ADN*
- *autre : à préciser*

Autres conditions : *Information au client*

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 3.0
GDB_FORM_53	SMQ	04/11/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Aptitude à l'emploi :

☒ **accordée**, mise en application à compter du : 27/01/2023

☐ **non accordée**, commentaires :

Signature Directeur Recherche et Développement :

Nom : Christophe AUDEBERT

Date : 04/11/2024

Visa :

