 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Etude de la conservation des extractions ADN au cours du temps	Version 1.0
GDB/ENR/06	SMQ	08/12/2021
Rédaction : C. AUDEBERT	Vérification : L. LIETAR	Approbation : K. LE ROUX

1) Design de l'expérimentation

Sans autre à priori que la date de réalisation de l'extraction et du dosage relatifs aux échantillons d'ADN présents sur chacune des plaques, ont été choisies 5 plaques comme suit : une plaque stockée depuis au moins 1 an, au moins 2 ans, 3 ans, 4 ans et une ultime plaque associée au plus vieux stock ADN à la date de l'étude. Conformément aux pratiques de la plateforme de géotypage haut-débit, les ADN extraits et purifiés sont conservés à - 20 °C.

Les plaques ont été décongelées simultanément pour procéder à un dosage ADN par la méthode de référence au picogreen. Le graphique ci-dessous (Fig. 1) représente la courbe étalon (droite de régression satisfaisant les conditions de validité $r^2 > 0,99$).

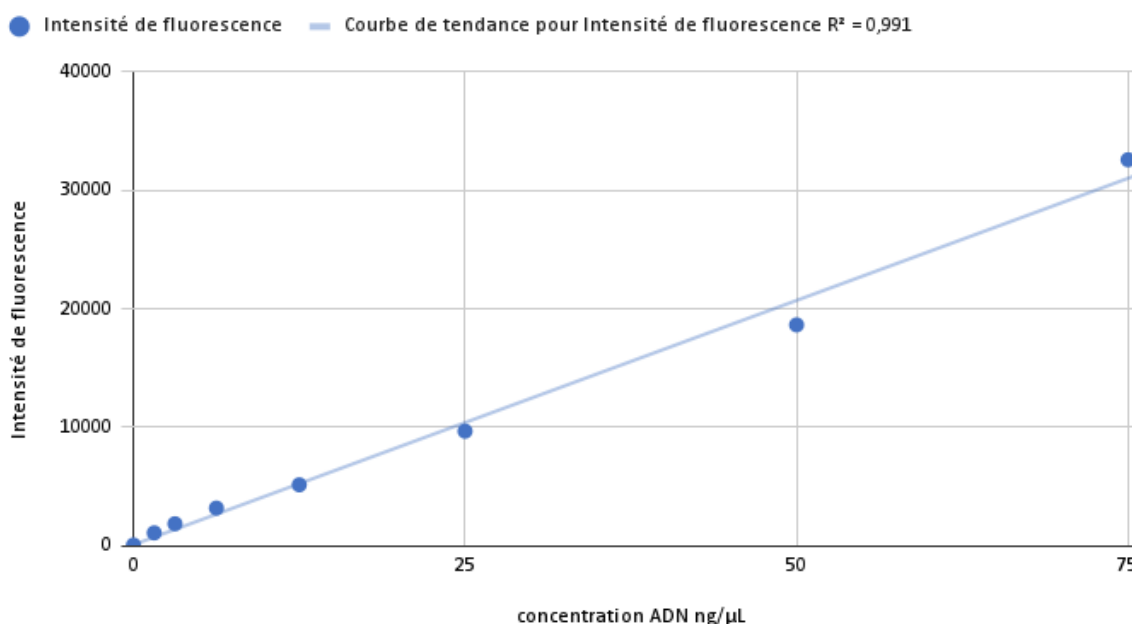



Fig. 1: intensité de fluorescence en fonction de la concentration en ADN de la gamme étalon

2) Exploitation des données brutes

Les moyennes des délais de stockages sont conformes au plan d'analyse. Il est intéressant de constater que s'il existe une faible dépendance entre la moyenne des écarts en concentrations d'ADN extraits, assez logiquement systématiquement négatifs (il apparaît logique que de l'ADN soit "perdu" au cours du stockage - et des cycles de

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Etude de la conservation des extractions ADN au cours du temps	Version 1.0
GDB/ENR/06	SMQ	08/12/2021
Rédaction : C. AUDEBERT	Vérification : L. LIETAR	Approbation : K. LE ROUX

congélation/décongélation). L'ADN est élué en TE 1X (pH 8.0). Le TE 1X est un tampon composé de 10 mM Tris-HCl contenant 1 mM EDTA- Na_2 qui permet de limiter les phénomènes d'autolyse de l'ADN. En revanche, une tendance apparaît au niveau de l'écart-type et l'écart moyen qui, tous deux, ont tendance à croître en fonction du délai de stockage. En outre, concernant le seuil visé de 95 % d'extractions ADN satisfaisant le seuil de 15 ng/ μL , seuil en deçà duquel nous considérons que l'utilisation de cet ADN peut être critique au niveau des opérations de génotypage, une seule mesure (Fig. 2) apparaît non conforme : celle associée à la plaque stockée pendant 3 ans (ceci s'explique notamment par le fait qu'initialement sur cette plaque 1 échantillon disposait d'une concentration inférieure à 15 ng/ μL).

année	moyenne des différences (ng/ μL)	écart-type (ng/ μL)	% ADN > 15 ng/ μL avant	% ADN > 15 ng/ μL après	écart moyen (ng/ μL)
1,02	-16,38	13,12	100,00	100,00	9,22
2,03	-12,06	19,75	100,00	98,96	14,46
3,05	-5,50	13,29	98,96	93,75	10,21
4,01	-4,41	25,68	98,96	100,00	20,76
5,75	-19,65	22,16	100,00	100,00	18,14

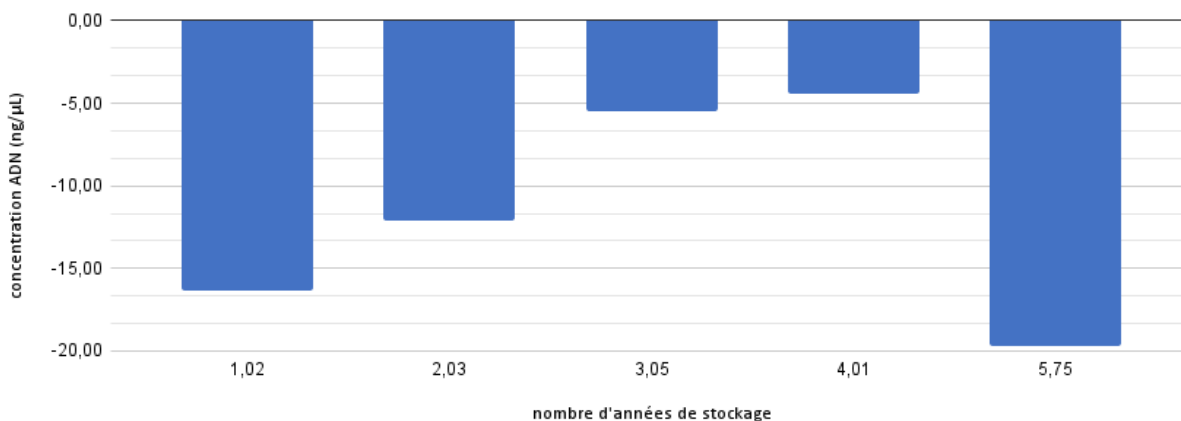



Fig. 2 : moyenne des écarts en concentration d'ADN en fonction de la durée de stockage (toutes matrices biologiques confondues)

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Etude de la conservation des extractions ADN au cours du temps	Version 1.0
GDB/ENR/06	SMQ	08/12/2021
Rédaction : C. AUDEBERT	Vérification : L. LIETAR	Approbation : K. LE ROUX

3) Analyse tenant compte du type de matrice biologique initiale

a) matrice sang

année	moyenne des différences (ng/μL)	écart-type (ng/μL)	% ADN > 15 ng/μL avant	% ADN > 15 ng/μL après	écart moyen (ng/μL)
5,75	-19,65	22,16	100,00	100,00	18,14
4,01	-4,41	25,68	98,96	100,00	25,68
3,01	-7,06	11,34	100,00	96,43	11,34
2,03	-12,06	16,86	100,00	98,96	19,75

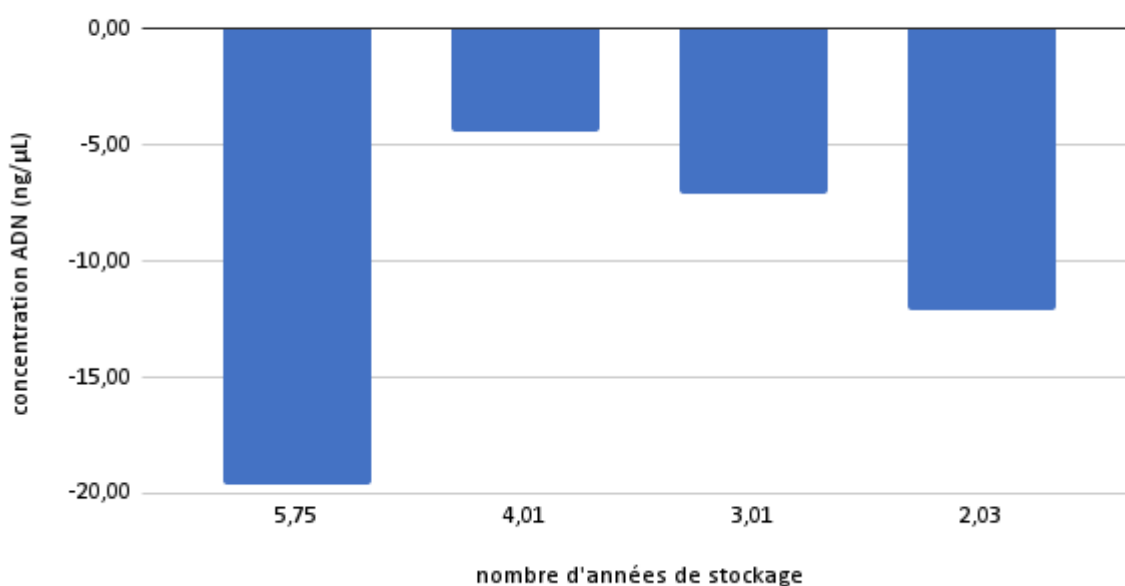



Fig. 3: moyenne des écarts en concentration d'ADN en fonction de la durée de stockage (matrice biologique : sang)

Le tableau ci-dessus montre une plutôt grande stabilité des extractions ADN obtenues à partir de matrice de sang. Pour toutes les années envisagées, chacune des plaques d'ADN extrait sont conformes au seuil de 95 % d'extraction ADN > 15 ng / μL (Fig. 3). Il n'apparaît pas une liaison évidente entre le délai de stockage et l'écart-moyen de concentration, ni même avec la moyenne des différences de concentration. Malgré cela il semble qu'il existe une tendance à l'accroissement de l'écart-type et donc un comportement tendant à plus d'hétérogénéité, particulièrement au-delà de 3 ans.

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Etude de la conservation des extractions ADN au cours du temps	Version 1.0
GDB/ENR/06	SMQ	08/12/2021
Rédaction : C. AUDEBERT	Vérification : L. LIETAR	Approbation : K. LE ROUX

b) matrice poils

année	moyenne des différences (ng/μL)	écart-type (ng/μL)	% ADN > 15 ng/μL avant	% ADN > 15 ng/μL après	écart moyen (ng/μL)
5,75	-24,44	8,87	100,00	100,00	6,90
3,02	-13,52	8,08	100,00	90,91	5,77
2,02	9,74	18,06	100,00	100,00	15,26
1,02	-16,53	13,11	100,00	100,00	9,13

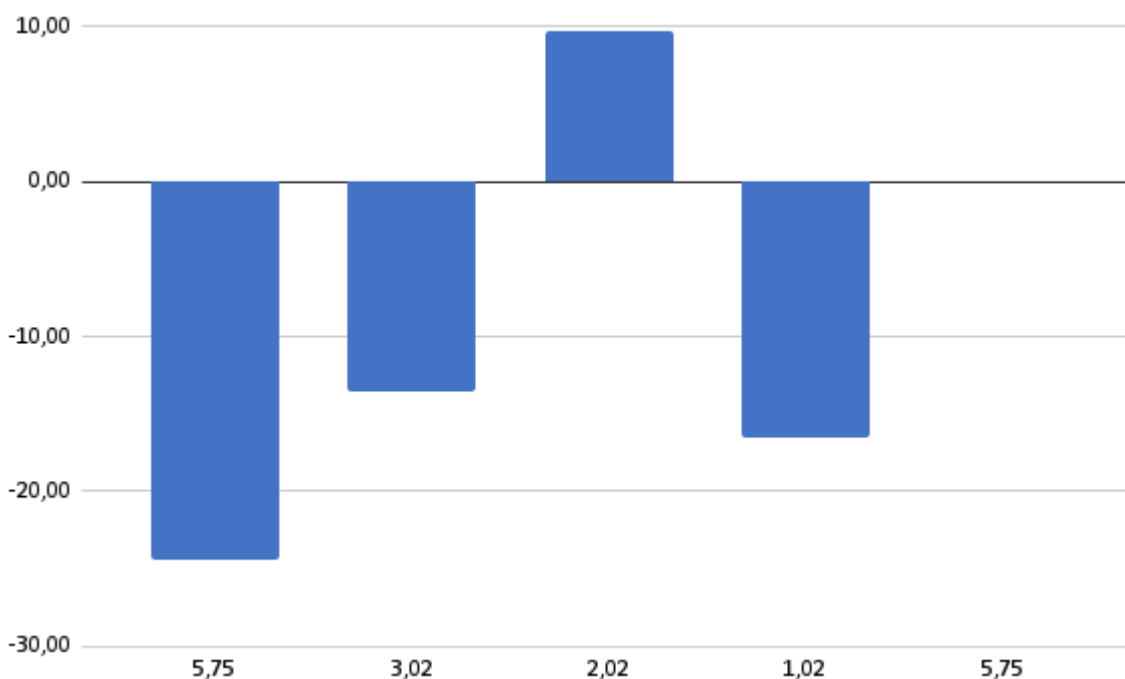



Fig. 4: moyenne des écarts en concentration d'ADN en fonction de la durée de stockage (matrice biologique : poils)

Le tableau ci-dessus montre une plutôt grande stabilité des extractions ADN obtenues à partir de matrice de poils. A l'année 3, il est observé une non conformité avec 90,91 % des concentrations ADN passant le seuil de 15 ng/ Il n'apparaît pas une liaison évidente entre le délai de stockage et l'écart-moyen de concentration, ni même avec la moyenne des différences de concentration. Malgré cela il semble qu'il existe une tendance à l'accroissement de l'écart-type et donc un comportement tendant à plus d'hétérogénéité, particulièrement au-delà de 3 ans (Fig. 4).

	Etude de la conservation des extractions ADN au cours du temps	Version 1.0
GDB/ENR/06	SMQ	08/12/2021
Rédaction : C. AUDEBERT	Vérification : L. LIETAR	Approbation : K. LE ROUX

4) Conclusions

Lors de la période 2016-2021, les matrices de type poils et de type sang représentent plus de 95 % du volume d'échantillons biologiques traités sur la plateforme. Suite à cette étude qui sera reconduite en fin d'année 2022, il apparaît qu'il semble exister une différence au niveau de la stabilité des ADN extraits en fonction du type de matrice biologique initiale et conservés à - 20 °C. Si l'intégralité des échantillons issus de matrice sang quelle que soit leur durée de stockage dans la limite de 5,75 années, apparaissent conformes au seuil de 95 % de dosages > 15 ng/μL, les ADN extraits à partir de matrices poils peuvent apparaître souffrir d'une moindre stabilité. Ainsi, un lot d'ADN issu de matrice poils stocké pendant 3 ans, apparaît ne pas satisfaire au seuil de conformité. **C'est pourquoi, la plateforme de génotypage haut-débit assure de pouvoir utiliser sans perte significative de qualité des ADN extraits, purifiés et conservés à - 20°C jusqu'à 2 ans après extraction ADN.** Pour toute demande de génotypage sur des ADN conservés au-delà de cette durée de stockage, il ne sera pas possible d'assurer la qualité du génotypage qui en serait issu. C'est ainsi que ce type d'opérations reste possible mais avec mention faite du risque inhérent à l'emploi de ce type d'échantillons. Cet usage est réservé à un usage de recherche seulement.