 GD Biotech <small>AGRI-AGRO SOLUTIONS</small>	Synthèse de la validation de méthode extraction	Version 1.0
GDB_ENR_58	SMQ	26/11/2021
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

1. **OBJECTIFS ET CHAMP D'APPLICATION**

L'objectif du projet vise à rédiger un dossier de validation de méthode dans le cadre d'une demande d'accréditation par la plateforme de génotypages de GD Biotech (société GÈNES DIFFUSION) selon la norme ISO 17025 des laboratoires d'analyse et d'essai. Ce dossier concerne plus particulièrement la méthode d'extraction d'ADN sur colonne de silice par méthode manuelle. Il s'agit d'une méthode non reconnue pour laquelle aucun référentiel n'est disponible. C'est pourquoi le présent dossier rassemble les éléments en permettant sa validation en portée FLEX 3.

2. **DEFINITIONS / ABREVIATIONS**

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

3. **TEXTE DE RÉFÉRENCE**

La présente procédure tient compte des exigences de la norme NF EN ISO/IEC 17025.

4. **PERSONNEL CONCERNÉ**

Pilote du projet : Christophe AUDEBERT, Directeur Recherche & Développement.
L'ensemble du personnel de la plateforme de génotypage haut-débit.

5. **DESCRIPTION ET DÉROULEMENT DES OPÉRATIONS**

5.1 Intitulé de méthode

Extraction d'ADN manuelle sur colonne de silice _ méthode interne


5.2 Elaboration du développement

5.2.1 Type de validation

Adoption : oui ☒ non ☐
Adaptation : oui ☒ non ☐
Développement : oui ☒ non ☐

5.2.2 Revue de méthodes

Référentiel(s) : oui ☐ non ☒

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Synthèse de la validation de méthode extraction	Version 1.0
GDB_ENR_58	SMQ	26/11/2021
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

5.3 Contraintes du projet

La qualité et la quantité de prélèvement à extraire. La méthode d'extraction est destructive pour certaines catégories de prélèvements, les tests de répétabilité et de reproductibilité sont limités pour un même échantillon.

5.4 Caractéristiques de la méthode et performances attendues

5.4.1 Matrices

Les extractions sont réalisées à partir de 4 types de prélèvements bovin (au choix du client) :

Nature du prélèvement	Conditionnement	Conservation pré-traitement
sang total	tube EDTA	température ambiante
bulbes de poils	pochette Kit GDScan	température ambiante
biopsie auriculaire = cartilage	tube humide	température ambiante
semence	paillette de conservation de sperme dilué	température ambiante

5.4.2 Paramètres


Le paramètre analysé est la concentration d'ADN. La qualité de l'ADN n'est pas un paramètre mesuré dans le présent dossier, la méthode de génotypage Illumina n'y faisant pas référence.

5.4.3 Principe de l'analyse

Les prélèvements et leur conservation préalable à l'envoi pour génotypage sont sous la responsabilité du client du laboratoire. Les échantillons sont réceptionnés au laboratoire avec un code à barres (CAB) unique (composé des lettres GD suivies de 6 chiffres), identifiant clé du prélèvement jusqu'au rendu de résultat.

L'ensemble des informations liées aux prélèvements (enregistrement et traçabilité) tout au long de la méthode d'extraction d'ADN est enregistré au niveau du serveur commun partage_labo, en base de données et dans Google Drive.

Les prélèvements sont traités, lysés puis déposés sur colonne de silice. Des étapes successives de précipitation, adsorption sur colonne de silice, de lavage puis d'élution sont réalisées manuellement pour purifier l'ADN. La quantité d'ADN obtenue suite à l'extraction est dosée par mesure de fluorescence au PicoGreen. Une gamme étalon est réalisée à chaque série de quantification et sert de référence pour déterminer la concentration en ADN

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Synthèse de la validation de méthode extraction	Version 1.0
GDB_ENR_58	SMQ	26/11/2021
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

des échantillons.

Remarque : Pour certains projets, notamment de recherche, il existe des conditions spécifiques de traitement (ex : stockage du prélèvement brut dans un premier temps, puis déstockage d'une sélection d'entre eux ultérieurement pour extraction/génotypage). Ainsi, chaque fois qu'un nouveau projet est créé, une fiche projet doit être complétée par le référent du projet, qui la diffuse par mail à l'ensemble de l'équipe de la plateforme de génotypage haut-débit ([GDB/FORM/11/Fiche projet_v1.0](#)).

5.4.4 Domaine d'application

Le domaine d'application de la présente méthode s'applique à l'ensemble des prélèvements reçus au laboratoire de génotypage haut débit.

5.4.5 Critères de performance attendus

Le critère de performance concernant la phase d'extraction de l'ADN est la quantité d'ADN extraite, l'objectif étant l'obtention d'une quantité supérieure à 15 ng/μL, pour envoi de l'échantillon d'ADN en phase de génotypage.

5.5 Analyse


5.5.1 Modes opératoires

Les modes opératoires d'extraction d'ADN des différents types de prélèvements sont listés au niveau du point 6.DOCUMENTS ASSOCIÉS du présent document.

5.5.2 Points à développer


➤ **Matériel**

Description	Raccordement Métrologique	Commentaires
Micropipettes		
P1200 Multi électronique	Oui	Métrologie sous-traitée
P200 Multi	Oui	Métrologie sous-traitée
P100 Multi	Oui	Métrologie sous-traitée
P10 Multi	Oui	Métrologie sous-traitée
P1000 mono	Oui	Métrologie sous-traitée

	Synthèse de la validation de méthode extraction	Version 1.0
GDB_ENR_58	SMQ	26/11/2021
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

P200 mono	Oui	Métrologie sous-traitée
P10 mono	Oui	Métrologie sous-traitée
Centrifugeuses		
Centrifugeuse rotor 2 plaques	Oui	Métrologie sous-traitée
Centrifugeuse de paillasse 12 tubes	Oui	Métrologie réalisée en interne
Incubateurs		
Agitateurs chauffants (tubes/2 plaques)	Oui	Métrologie réalisée en interne
Agitateurs		
Vortex (1 tube)	Non	Vortex de paillasse pour tube sang total
Enceintes de stockage froid		
Description	Raccordement Métrologique	Commentaires
Réfrigérateur (+ 4°C)	Oui	Métrologie réalisée en interne + cartographie 1 x tous les 2 ans
Fluorimètre		
Lecteur de plaques SPARK	Oui	Métrologie réalisée en interne
PC SPARK	Non	
Bureautique - Informatique		
PC	Non	
Scanner (lecteur CAB)	Non	
Imprimante	Non	

Le type de raccordement et la fréquence métrologique de l'ensemble du matériel est consultable dans le document [GDB/PRO/13/Métrologie_v1.0](#).


 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Synthèse de la validation de méthode extraction	Version 1.0
GDB_ENR_58	SMQ	26/11/2021
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

➤ **Kits et réactifs**

Kits d'extraction et autres réactifs		
Produits / Consommables	Spécifications attendues	Stockages
Kit Blood Macherey Nagel (core)	Réception à température ambiante, pas de spécification particulière	Protéinase K diluée -21°C +/- 3°C Colonnes à 5°C +/- 3°C Autres réactifs à 21°C +/- 3°C
Kit Blood tubes		
Kit Tissue Macherey Nagel		Protéinase K diluée -21°C +/- 3°C Réactifs à 21°C +/- 3°C
MiniKit Qiagen		20°C +/- 5°C
Protéinase K Qiagen additionnelle		20°C +/- 5°C
TE 1X		Température ambiante
TE 100X		Température ambiante
DTT		Flacon source à 5°C +/- 3°C Aliquots de 100µl à -21°C +/- 3°C
Ethanol absolu		Température ambiante
Picogreen	A l'obscurité	5°C +/- 3°C, à l'obscurité
ADN témoin	100 ng/µL	à 5°C +/- 3°C

➤ **Matrices**

Type de matrice	Spécifications attendues	Stockages
Sang	quantité minimale 200µl non coagulé	5°C +/- 3°C pendant minimum 21 jours après extraction
Poil	quantité > 30 bulbes	Température ambiante pendant 21 jours après extraction
Biopsie auriculaire = cartilage	tube Allflex avec liquide conservation	Température ambiante

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Synthèse de la validation de méthode extraction	Version 1.0
GDB_ENR_58	SMQ	26/11/2021
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Semence	2 paillettes décongelées	Température ambiante
Semence sexée	4 paillettes décongelées	Température ambiante
ADN		5°C +/- 3°C jusqu'au génotypage, puis -21°C +/- 3°C pendant 2 ans

➤ **Milieu**

Pas de spécification


5.5.3 Main d'oeuvre

Les fonctions concernées par ce poste sont les Techniciens scientifiques et Responsable activité de génotypage haut-débit. La description des fonctions et de la (ou des) formation(s) est définie dans la fiche de poste et fiches de fonctions relatives. Les critères d'habilitation et de maintien de compétences sont définis dans ces mêmes fiches.

Poste Extraction d'ADN	Critères d'habilitation	Critères de maintien de compétence
Responsable activité de génotypage haut-débit	ANALYSE : - seuil > 3 ans d'ancienneté en réalisation d'extractions d'ADN ou - Réaliser en autonomie : 32 extractions ADN de matrice sang, 32 extractions ADN de matrice poils, 10 extractions ADN de matrice semence Objectifs : [ADN] > 15 ng/μL	Être en poste au moins une fois tous les 6 mois.
Technicien scientifique		

➤ **Fiche de poste - Fiche de fonction**

La fiche de poste correspondante est consultable via le [GDB/FI/08/Fiche de poste Extraction ADN_v1.0](#). La fiche de fonction correspondante est consultable via [GDB/FI/12/Fiche de fonction Responsable activité génotypage haut-débit_v1.0](#).

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Synthèse de la validation de méthode extraction	Version 1.0
GDB_ENR_58	SMQ	26/11/2021
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

5.6 Critères de performance

Dans le présent dossier, répétabilité et reproductibilité sont traitées au niveau de la phase d'extraction et de dosage de l'ADN, et la méthodologie reprise dans la procédure [GDB/PRO/06/Contrôle de répétabilité et de reproductibilité de la phase d'extraction_v1.0](#). Le contrôle de répétabilité, reproductibilité porte sur la méthode d'extraction d'ADN issus de plusieurs matrices biologiques : sang, semence, poils (concernant la matrice biologique "cartilage", le protocole d'extraction aboutit à la destruction de l'échantillon. Pour des principes évidents de bien-être animal il est inconcevable de posséder plusieurs prélèvements issus d'un même animal, et les tests de répétabilité et reproductibilité ne seront donc pas effectués à partir de cette matrice).

Les résultats reproductibilité consisteront à la comparaison inter-opérateur (taux d'échantillons conformes (concentration de l'ADN extrait est $> 15 \text{ ng/ } \mu\text{L}$) d'une part, et comparaison des dosages d'un même échantillon évalué par deux opérateurs différents d'autre part. Pour simplifier, les deux opérateurs pratiquent une extraction sur les mêmes matrices biologiques de départ.

Les résultats de ce contrôle répétabilité/reproductibilité et l'interprétation de l'analyse de ces échantillons contrôles sont rendus de manière annuelle à l'occasion du reporting de suivi de production. Seront privilégiées les métriques synthétiques :


- synthèse des métriques de répétabilité/reproductibilité
- dans le cas de non conformité il conviendra de commenter les mesures correctives mises en oeuvre

5.7 Facteurs de risques

L'ensemble des facteurs de risques identifiés sont analysés et consultables via le document [GDB/PRO/08/Actions à mettre en oeuvre suite à non conformités_v1.0](#).

5.8 Incertitudes

La notion d'incertitude ne s'applique qu'à la seule méthode de dosage de la concentration d'ADN. A l'issue de la mesure de concentration (dont l'incertitude de mesure dépend directement du coefficient directeur de la droite de régression linéaire associée à la réalisation de la gamme étalon), l'extraction est qualifiée ou non. Ainsi l'aboutissement de la phase d'extraction d'ADN n'est pas une concentration en tant que telle mais une qualification de l'extrait qui satisfera ou non un seuil minimal exigé.

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Synthèse de la validation de méthode extraction	Version 1.0
GDB_ENR_58	SMQ	26/11/2021
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

5.9. Surveillance de la qualité des résultats

Contrôle Qualité interne	Oui / non	Carte de contrôle	Commentaires
Gamme étalons à partir d'ADN témoin	Oui	Non	Gamme étalon réalisée pour chaque série de quantification $R^2 > 0,99$

5.10 Confirmation et vérification

5.10.1 Validation

Validation des critères de performance par Christophe AUDEBERT, Directeur Recherche et Développement.

Méthode validée dans son domaine d'application décrit en 5.4.4 du présent document.

Date : 26/11/2021

6. DOCUMENTS ASSOCIÉS

GDB/PRS/01/Schéma traçabilité échantillon_v1.0

GDB/PRS/02/Processus global de la matrice biologique au rendu analytique_v1.0

GDB/PRS/05/Extraction d'ADN_v1.0

GDB/PRO/06/Contrôle de répétabilité et de reproductibilité de la phase d'extraction_v1.0

GDB/PRO/08/Actions à mettre en oeuvre suite à non conformités_v1.0

GDB/PRO/13/Métrieologie_v1.0

GDB/MOP/01/Préparation des matrices pour extraction d'ADN à partir de prélèvements de sang_v1.0

GDB/MOP/02/Préparation des matrices pour extraction d'ADN à partir de prélèvements de poils et cartilage_v1.0

GDB/MOP/03/Extraction d'ADN en plaque à partir de cartilage/poils_v1.0

GDB/MOP/04/Extraction d'ADN en tube à partir de semence_v1.0

GDB/MOP/05/Extraction d'ADN en plaque à partir de sang_v1.0


GDB/MOP/06/Extraction d'ADN en tube à partir de sang_v1.0

GDB/MOP/07/Elaboration des fichiers d'extraction_v1.0

GDB/MOP/08/Dosage ADN_v1.0

GDB/FI/08/Fiche de poste Extraction ADN_v1.0

GDB/FI/12/Fiche de fonction Responsable activité génotypage haut-débit_v1.0

	Synthèse de la validation de méthode extraction	Version 1.0
GDB_ENR_58	SMQ	26/11/2021
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

GDB/FORM/02/Contrôle de répétabilité et de reproductibilité de la phase d'extraction_v1.0

GDB/FORM/03/Habilitation extraction ADN_v1.0

GDB/FORM/11/Fiche projet_v1.0

GDB/ENR/06/Etude de la conservation des extractions ADN au cours du temps_v1.0

7. **ANNEXE(S)**