	Synthèse de la validation de méthode génomique	Version 1.0
GDB_ENR_59	SMQ	15/12/2021
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 de GÈNES DIFFUSION) selon la norme ISO 17025 des laboratoires d'analyse et d'essai. Ce dossier concerne plus particulièrement la méthode de génotypage haut-débit Illumina Infinium XT par méthode manuelle, incluant l'analyse des résultats de génotypage. Il s'agit d'une méthode non reconnue pour laquelle aucun référentiel global 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

Génotypage haut-débit _ 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 ☐

	Synthèse de la validation de méthode génotypage	Version 1.0
GDB_ENR_59	SMQ	15/12/2021
Rédaction : K.LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

5.3 Contraintes du projet

La quantité d'échantillons à génotyper : séries de 384 échantillons. La concentration des échantillons à génotyper en ADN : > 15 ng/μL.

5.4 Caractéristiques de la méthode et performances attendues

5.4.1 Matrices

Les génotypages sont réalisés à partir d'échantillons d'ADN bovins extraits et purifiés à partir de différentes matrices biologiques au sein de la plateforme.

Nature du prélèvement	Conditionnement	Conservation pré-échantillonnage
ADN bovin	Plaques ADN (4x96 échantillons)	5°C +/- 3°C

5.4.2 Paramètres

Le paramètre défini est la concentration d'ADN. La qualité de l'ADN n'est pas un paramètre mesuré dans le présent dossier, la méthode de génotypage Infinium d'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 Barre unique (composé des lettres GD suivies de 6 chiffres), identifiant clé du prélèvement au rendu de résultat.

L'ensemble des informations lié aux échantillons (enregistrement et traçabilité) tout au long de la méthode d'extraction d'ADN et de génotypage est enregistré au niveau des serveurs communs partage_lab0 et Labo, en base de données, et dans Google Drive.

Une gamme étalon est réalisée à chaque série de quantification de l'ADN et sert de référence pour déterminer la concentration en ADN des échantillons.

Des étapes successives d'amplification, fragmentation, précipitation, re-suspension, hybridation d'ADN, lavages, staining, rinçage et vernissage des lames contenant les puces et scan de celles-ci sont réalisées. S'ensuit une étape d'analyse des données brutes de scan, lesquelles amènent à l'alimentation de la base de données et à la production de différents rapports.

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,

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Synthèse de la validation de méthode génomique	Version 1.0
GDB_ENR_59	SMQ	15/12/2021
Rédaction : K.LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

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 génomique 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 dans le cadre de la plateforme de génomiques de GD Biotech.

5.4.5 Critères de performance attendus

Dans le présent dossier, répétabilité et reproductibilité sont traitées au niveau de la phase de génomique avec la méthodologie reprise dans le document [GDB/PRO/05/Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génomique haut-débit par puces à ADN_v1.0](#). Le critère de performance concernant la phase de génomique est l'obtention d'un Call Rate (taux de marqueurs (issus de type SNPs) renvoyant une information de génotype non manquante) supérieur à 0,95 pour au moins 85% des échantillons, d'une médiane Call Rate supérieure à 0,975, et la validation des contrôles qualité répétabilité et reproductibilité.

5.5 Analyse


5.5.1 Modes opératoires

Le mode opératoire lié au génomique est listé au niveau du point 6.DOCUMENTS ASSOCIÉS du présent document.


5.5.2 Points à développer

➤ Matériel

Description	Raccordement Métrologique	Commentaires
Micropipettes		
P200 Multi	Oui	Métrologie sous-traitée
P50 Multi	Oui	Métrologie sous-traitée
P20 Multi	Oui	Métrologie sous-traitée
P10 Multi	Oui	Métrologie sous-traitée
P1000 mono	Oui	Métrologie sous-traitée

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Synthèse de la validation de méthode génomique	Version 1.0
GDB_ENR_59	SMQ	15/12/2021
Rédaction : K.LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Robot pipeteur	Oui	Métrieologie réalisée en interne
Description	Raccorde- ment Métrieologie	Commentaires
Centrifugeuses		
Centrifugeuse réfrigérée (4 plaques)	Oui	Métrieologie sous-traitée
Agitateurs		
Plateformes d'agitation	Non	
Incubateurs		
Fours	Oui	Métrieologie réalisée en interne
Incubateurs microplaque	Oui	Métrieologie réalisée en interne
Enceintes de stockage froid		
Réfrigérateur (+ 4 °C)	Oui	Métrieologie réalisée en interne + cartographie 9 points sous-traitée 1 x tous les 2 ans
Congélateur (-20 °C)	Oui	Métrieologie externalisée
Bain circulant chauffant / réfrigérant	Oui	Métrieologie réalisée en interne
Scanner		
Lecteur de puces à ADN	Oui	Contrat iScan - Métrieologie externalisée
Scelleuses		
Thermoscelleuse	Non	
Hottes		
Hotte portative filtre à charbon	Non	
Filtration		
Station eau purifiée	Non	
Bureautique - Informatique		
Serveur iScan	Oui	Contrat iScan - Métrieologie externalisée


 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Synthèse de la validation de méthode génomique	Version 1.0
GDB_ENR_59	SMQ	15/12/2021
Rédaction : K.LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

PC pilote robot TECAN EVO 100	Non	
-------------------------------	-----	--

Le type de raccordement et la fréquence métrologique de l'ensemble du matériel est consultable dans le document [GDB/PRO/13/Métrieologie_v1.0](#).

➤ **Kits et réactifs**

Kits pour génotypage et autres réactifs		
Produits / Consommables	Spécifications attendues	Stockages
Illumina : Inf XT iSelect-96 Kit (1152 smp)	Réception en carboglace pour Infinium XT Assay Kit Pre 1152 + Infinium XT Assay Kit Post1 1152 + Infinium XT Assay Kit Post2 1152 Réception à température ambiante pour Infinium XT Assay Kit Post3 1152 + BX,4PK,CSTM,EuroG_MDv2_XT_GD	Infinium XT Assay Kit Pre 1152 + Infinium XT Assay Kit Post1 1152 + Infinium XT Assay Kit Post2 1152 : -20°C +/- 5°C Infinium XT Assay Kit Post3 1152 -> PM1 + BX,4PK,CSTM,EuroG_MDv2_XT_GD : 5°C +/- 3°C Infinium XT Assay Kit Post3 1152 -> XC3, PB2, XC4 : entre 15°C et 30°C
Illumina : Infinium XT Assay PB20 Kit	Réception à température ambiante, pas de spécification particulière	entre 15°C et 30°C
Sodium hydroxide NaOH SIGMA	Réception à température ambiante, pas de spécification particulière	Format pastilles : température ambiante / format solution : 5°C +/- 3°C
Isopropanol SIGMA	Réception à température ambiante, pas de spécification particulière	Température ambiante
Formamide SIGMA	Réception à température ambiante, pas de spécification particulière	5°C +/- 3°C
Alconox	Réception à température ambiante, pas de spécification particulière	Température ambiante

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Synthèse de la validation de méthode génomique	Version 1.0
GDB_ENR_59	SMQ	15/12/2021
Rédaction : K.LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

➤ **Echantillons**

Echantillon d'ADN	Spécifications attendues	Stockages
ADN extrait	> 15 ng / µL	à 5°C +/- 3°C jusqu'au génomique, puis à -21°C +/- 3°C pendant 2 ans.

➤ **Milieu**

La lecture des puces via l'Iscon nécessite une température ambiante comprise entre 15°C et 30°C, et constante durant l'opération à +/- 2°C.

5.5.3 Main d'oeuvre


Les fonctions concernées par ce poste sont les Techniciens scientifiques, Assistants ingénieurs et Responsable activité de génomique 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 Génomique haut-débit	Critères d'habilitation	Critères de maintien de compétence
Responsable activité de génomique haut-débit	Seuil > 3 ans d'ancienneté en réalisation de génomique d'ADN ou Réaliser 1 run sous la supervision d'une personne habilitée puis 1 run en autonomie Objectifs : validation des contrôles qualité QC, échecs génomique < 15 %, médiane Call Rate > 0,975	Être en poste au moins une fois tous les 6 mois.
Technicien scientifiques		
Assistant ingénieur		

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

La fiche de poste correspondante est consultable via le [GDB/FI/09/Fiche de poste Génomique_v1.0](#).

La fiche de fonction correspondante est consultables via [GDB/FI/12/Fiche de fonction](#)

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Synthèse de la validation de méthode génomique	Version 1.0
GDB_ENR_59	SMQ	15/12/2021
Rédaction : K.LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Responsable activité génomique haut-débit_v1.0.

5.6 Critères de performance

5.6.1 Répétabilité

La procédure de répétabilité est consultable via le document [GDB/PRO/05/Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génomique haut-débit par puces à ADN_v1.0](#). Pour être considéré comme conforme, un test de répétabilité doit renvoyer à un minimum strict de 95 % de génotypes identiques.

5.6.2 Reproductibilité

La procédure de répétabilité est consultable via le document [GDB/PRO/05/Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génomique haut-débit par puces à ADN_v1.0](#). Pour être considéré comme conforme, un test de reproductibilité doit renvoyer à un minimum strict de 95 % de génotypes identiques.


5.6.3 Synthèse

Items	Conclusion	Performance attendue	Performance retenue
Répétabilité		95 % de génotypes identiques	95 % de génotypes identiques
Reproductibilité		95 % de génotypes identiques	95 % de génotypes identiques

5.7 Essais Interlaboratoires

Dans l'optique d'harmoniser et de fiabiliser les résultats des laboratoires de génomique, des essais interlaboratoires sont organisés. Ils consistent à réaliser des essais sur des échantillons d'ADN semblables et à en comparer les résultats. Trois différents objectifs peuvent être recherchés :

- Valider une méthode d'essais et déterminer l'incertitude des résultats correspondants, par la détermination des écarts-types de répétabilité et de reproductibilité ;
- Déterminer les caractéristiques d'un produit pour son utilisation comme étalon de référence ;

	Synthèse de la validation de méthode génomique	Version 1.0
GDB_ENR_59	SMQ	15/12/2021
Rédaction : K.LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

- Évaluer la fiabilité des résultats des laboratoires participants.

En pratique, cela consiste à :

- Expédier des échantillons d'ADN aussi identiques que possibles à un nombre suffisant de laboratoires participants ;
- Réaliser une série d'essais par les laboratoires participants ;
- Déterminer la valeur de référence, qui doit être trouvée par les laboratoires ;
- Évaluer la différence entre les résultats de chacun des laboratoires et la valeur de référence

Et à conclure sur le niveau de confiance que l'on peut accorder au résultat. Dans notre contexte, il s'agit d'évaluer la fiabilité des résultats concernant les marqueurs communs entre les laboratoires participant à l'essai interlaboratoire.


La procédure relative à ces essais est consultable via le document [GDB/PRO/16/Contrôle des performances du génotypage réalisé par méthode des puces à ADN : essai interlaboratoire_v1.0](#).

5.8 Facteurs de risque

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](#).

5.9 Incertitudes

Le paramètre prédominant de GenomeStudio qui doit être optimisé pour obtenir la plus grande précision de génotypage est le seuil du score GenCall, ou seuil de non-appel. Le score GenCall est une mesure de qualité calculée pour chaque génotype (point de données), et varie de 0 à 1. La valeur du score GenCall diminue généralement à mesure qu'un échantillon s'éloigne du centre de la grappe (cluster) à laquelle le point de données est associé. Le seuil de non-appel est la limite inférieure de l'appel des génotypes par rapport à la grappe (cluster) qui lui est associée. Les questionnaires de projet de génotypage FastTrack d'Illumina utilisent généralement un seuil de non-appel de 0,15 avec les données Infinium. Cela signifie que les génotypes dont le score GenCall est inférieur à 0,15 ne se voient pas attribuer de génotypes, car ils sont considérés comme trop éloignés du centroïde de la grappe pour effectuer des appels de génotypes fiables. On leur attribue plutôt un "no call" pour ce locus. L'absence d'appel sur des ADN réussis à des loci contribue à réduire le taux d'appel (CallRate) pour l'ensemble du projet. Le seuil standard de 0,15 pour les données Infinium a été déterminé en utilisant des projets avec des informations sur le trio et la réplique. Une gamme de seuils de non-appel a été évaluée pour optimiser le taux d'appel sans compromettre la reproductibilité ou la cohérence mendélienne. Ce seuil ne doit pas

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Synthèse de la validation de méthode génomique	Version 1.0
GDB_ENR_59	SMQ	15/12/2021
Rédaction : K.LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

être modifié car il constitue le meilleur compromis entre exactitude de génotypage et taux de chute de génotypage.

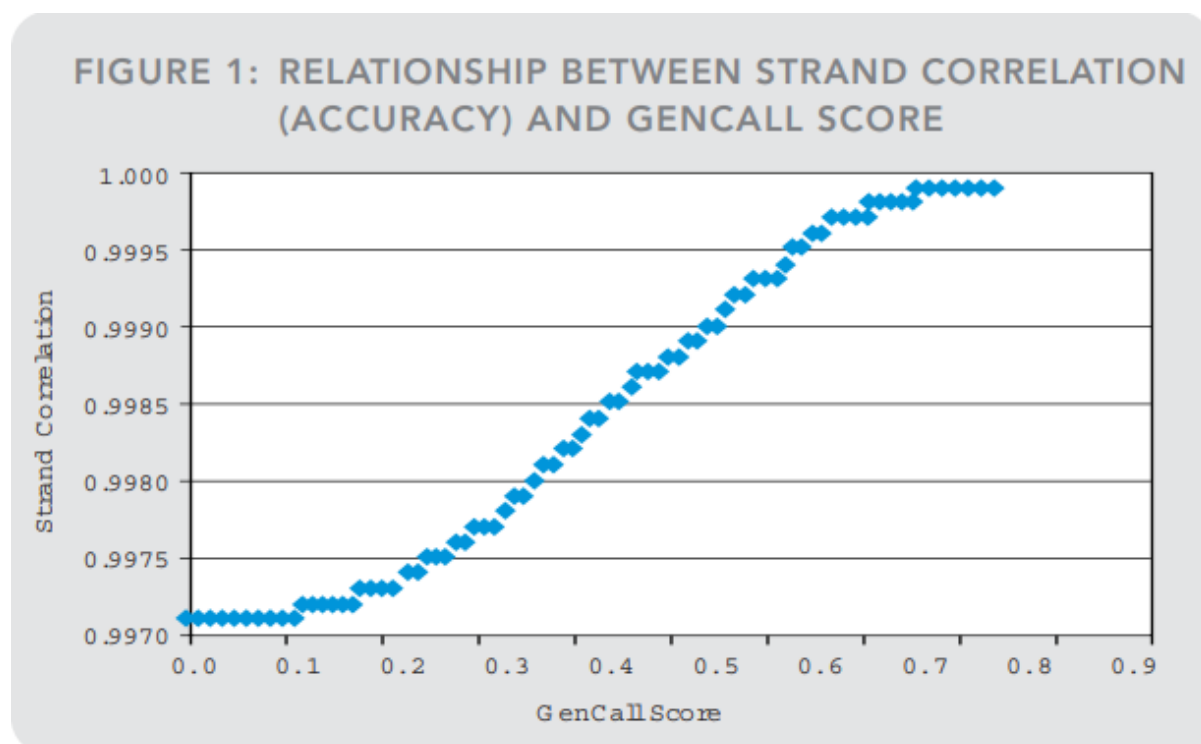


Figure 1 : Corrélation de la qualité de l'essai, telle qu'estimée par le score GenCall, avec la précision cumulative (corrélation des brins) des génotypes aux SNP considérés. Les données sont progressivement exclues par le score GenCall, en commençant par un score GenCall de zéro où toutes les données sont évaluées. Un total de 355 ADN ont été analysés sur les deux brins à 288 loci SNP (408 960 génotypes d'allèles au total). L'exactitude est mesurée par la corrélation des allèles déterminés sur les deux brins d'ADN.


5.10.Surveillance de la qualité des résultats

Les résultats du contrôle de performance sont rendus disponibles de façon hebdomadaire, le vendredi, via l'interface "DashBoard Génomique"¹

L'interprétation de l'analyse de ces échantillons contrôles est rendue de manière mensuelle par l'intermédiaire du reporting mensuel. Dans ce rapport, envoyé à l'occasion du reporting de suivi de production, seront privilégiées les métriques synthétiques :

- Synthèse des métriques de répétabilité/reproductibilité du mois

¹ L'interface DashBoard génomique (soumise à restriction d'utilisation : login/mdp) est disponible sur le lien suivant : <http://dashboardgenoprod.gspp2gdlab.genesdiffusion.com>

 GD Biotech <small>AGRI-AGRO SOLUTIONS</small>	Synthèse de la validation de méthode génomique	Version 1.0
GDB_ENR_59	SMQ	15/12/2021
Rédaction : K.LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT, L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

- Dans le cas de non conformité il conviendra de commenter les mesures correctives mises en oeuvre ou encore la quantité et qualité des échantillons n'ayant pas pu faire l'objet d'une restitution d'analyse pour cause de non conformité

5.11 Confirmation et vérification

5.11.1 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 : 15/12/21

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/05/Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN_v1.0

GDB/PRO/16/Contrôle des performances du génotypage réalisé par méthode des puces à ADN : essai interlaboratoire_v1.0

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

GDB/PRO/13/Métrie_v1.0

GDB/MOP/08/Dosage ADN_v1.0

GDB/MOP/09/Génotypage_v1.0

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

GDB/FI/09/Fiche de poste Génotypage_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)