 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

1. Champ d'application

Activité/méthode concernée : *génotypage d'ADN*

Portée d'accréditation :

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

2. Intitulé de méthode

Nom de la méthode : *génotypage sur puces à ADN EuroG_MDv4_XT_FRA_GD*

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

3. Elaboration du développement

3.1. Type de validation

- ☐ Adoption d'une nouvelle méthode
- ☒ 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

Les puces à ADN qui constituent le support de génotypage Infinium XT Illumina utilisé par la plateforme de génotypage GDScan sont soumises à évolutions (variation du nombre de SNP, modification de la liste des SNP présents, ...).

L'objectif de ce dossier est de valider la nouvelle version de puces à ADN

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

EuroG_MDv4_XT_FRA_GD.

3.4. Sélection de la méthode

La méthode de génotypage se basant sur la technologie d'Illumina, est déjà en place depuis plusieurs années et a été validée GDB_FORM_53_Validation de méthode_Génotypage sur puces à ADN Infinium XT Illumina_230130_01_v1.0. Le support de génotypage étant soumis à évolution, et la version EuroG_MDv3_XT_FRA_GD étant obsolète, la version EuroG_MDv4_XT_FRA_GD s'impose comme nouveau support de cette méthode.

3.5. Planification - Responsabilités

Pilote de projet : *Ludivine Liétar*


Personnel concerné par la validation de méthode : *Christophe Audebert, Ludivine Liétar, Malika Merbah, Pierre Bouvelle*

Date d'ouverture de l'enregistrement (JJ/MM/AA) : *13/03/2023*

Responsabilité (Nom-Prénom - Fonction)	Tâche (liste non exhaustive)	Délai de réalisation	Attribuée à (Nom-Prénom - Fonction)
Christophe Audebert Directeur Recherche et Développement	Sélection de la méthode	31/03/2023	Christophe Audebert Directeur Recherche et Développement
Ludivine Liétar Responsable Plateforme de génotypage GD Scan	Développement, analyse et rédaction	31/03/2023	Ludivine Liétar Responsable Plateforme de génotypage GD Scan
Ludivine Liétar Responsable Plateforme de génotypage GD Scan	Réalisation des essais	31/03/2023	Malika Merbah Bio Technicienne Pierre Bouvelle Responsable SI
Christophe Audebert Directeur Recherche et Développement	Vérification et validation	31/03/2023	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

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

Liste non exhaustive, détailler les catégories concernées

[] Techniques :

[] Equipements :

[] Qualité des matrices/données :

[] Quantité de matrices/données :

[] Coût - investissement :

[X] Autre(s) : contrainte liée au stock d'EuroGMD v3 arrivant à épuisement

5. Caractéristiques de la méthode et performances attendues

5.1. Principe de la méthode


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 SNP et à la production de différents rapports.

5.2. Domaine d'application

La présente méthode s'applique à l'ensemble des échantillons d'ADN bovins extraits et reçus au sein de la plateforme de génotypage GD Scan.

5.3. Matrice(s)/Données

Matrice(s) / données concernée(s)	Nature	Conditionnement / emplacement	Conservation pré-traitement
•	sang total	tube EDTA	température ambiante
•	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	base de données / serveur	-

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

	données de génotypage		
•	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 :

[] quantitatifs (ex : concentration en ADN) : *à préciser*

[x] qualitatifs (ex : Call Rate) : *Call Rate*

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)	Pour au moins 90 % des échantillons : - [ADN] > 15 ng/μL - Call Rate > 0,95 - Médiane Call Rate > 0,975	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	Pour au moins 90 % des échantillons : - Call Rate > 0,95 pour au moins 90 % des échantillons - Médiane Call Rate > 0,975 - Prochain essai interlaboratoire validé (à posteriori)	Procédure de contrôle répétabilité GDB_PRO_05_Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN	Procédure de contrôle reproductibilité GDB_PRO_05_Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

Nouveau support de génotypage	2 charolais + 2 holstein déjà génotypés sur version N-1	- Présence 580 SNP ISO (GDB_FI_15_SNP ISO 580) - 99 % de similarité 580 SNP ISO N-1 et N (génotypes valides)	2 mêmes charolais + 2 mêmes holstein déjà génotypés sur version N-1	2 mêmes charolais + 2 mêmes holstein déjà génotypés sur version N-1
Autre : à préciser				

6. Essais (cette partie est à répliquer autant de fois qu'il y a d'essais)

6.1. Introduction

L'essai consiste en la validation de génotypes sur puce EuroG_MDv4_XT_FRA_GD d'échantillons d'ADN déjà réalisés sur la version EuroG_MDv3_XT_FRA_GD (2 de race charolaise 38 et 2 de race Holstein 66) par la vérification de la présence des 580 SNP ISO, et un taux de similarité de 99 % sur ces SNP entre les 2 versions.


Il comprend également des contrôles de répétabilité (échantillons génotypés en doublon, même puce, même opérateur, mêmes lots) et de reproductibilité (échantillons génotypés à nouveau sur une autre puce EuroG_MDv4_XT_FRA_GD, dans les mêmes conditions de réalisation, mais par un opérateur différent, et avec des lots différents).

6.2. Mode Opérateur

Le mode opératoire est celui en application actuellement GDB_MOP_09_Génotypage_v1.1.

6.3. Points à développer (liste non exhaustive)

- Matériel (type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...) :
 - Centrifugeuse Hettich GDD-CENTRI-003
 - Four Illumina GDD-FOUR-002 (WG7053886-MSA7)
 - Four Illumina GDD-FOUR-003 (WG7006677-MSA7, WG7006678-MSA7, WG7022029-MSA7)
 - Incubateur microplaque SciGene GDD-INCUI-002 (WG7053886-MSA7)
 - Incubateur microplaque SciGene GDD-INCUI-003 (WG7006677-MSA7)
 - Incubateur microplaque SciGene GDD-INCUI-004 (WG7006678-MSA7)
 - Incubateur microplaque SciGene GDD-INCUI-005 (WG7022029-MSA7)
 - Four Illumina GDD-FOUR-001
 - Robot pipeteur Tecan GDD-TECA-001


 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

- Lecteur de puces à ADN Illumina GDD-SCAN-001

➤ Kits et réactifs : compléter le tableau ci-dessous

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
MA1	voir suivi des n° de lot GDB_ENR_20_Génotypage Infinium Illumina - Tracking form - Réponses_v1.0 pour les runs : - 01/03/2023 / 02/03/2023 (EuroG_MDv3_XT_FRA_GD) - 13/03/2023 / 14/03/2023 (EuroG_MDv4_XT_FRA_GD dont répétabilité) - 14/03/2023 / 15/03/2023 (EuroG_MDv4_XT_FRA_GD reproductibilité)	-	-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
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...) : à compléter

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

ID	CODE BARRE	SEXE	RACE	TYPE MAT BIOLO	Date réception Labo Douai	Plaque ADN	Position ADN	Date extraction
FR7937371962	GD450433	2	38	Poil	27/02/2023	SAM230276	A01	27/02/2023
FR7937371966	GD450434	2	38	Poil	27/02/2023	SAM230276	B01	27/02/2023
FR8528873239	GD490271	2	66	Poil	27/02/2023	SAM230277	G12	27/02/2023
FR8528873261	GD490272	2	66	Poil	27/02/2023	SAM230277	H12	27/02/2023

Illumina recommande d'utiliser des échantillons d'ADN à une concentration en ADN initiale de 50 ng/μL.


Hors il n'y a pas de précisions quant à la nature du prélèvement, ni quant à la méthode d'extraction à employer. De plus, nous savons que le génotypage permet finalement de mettre en évidence les éventuels échecs d'extraction grâce au Call Rate. Ainsi, une concentration en ADN insuffisante renvoie un Call Rate non satisfaisant < 0,95 avec des intensités de signal faibles, alors qu'une concentration en ADN suffisante renvoie un Call Rate satisfaisant > 0,95 avec des intensités de signal correctes, ce qui permet de valider les étapes précédentes dont celle d'extraction d'ADN (Cf. GDB_ENR_57_Etude relative à la suppression du dosage post-extraction_230110_01_v1.0).

Nous avons donc fait le choix de faire abstraction d'une quantité d'ADN minimale requise pour les essais.

De même, il n'y a pas de recommandations Illumina concernant la qualité des échantillons d'ADN requise, et nous savons que le génotypage permet finalement de mettre en évidence les éventuels échantillons d'ADN de mauvaise qualité grâce au Call Rate, de la même façon qu'évoqué ci-dessus.

Nous avons donc fait le choix de faire abstraction de la notion de qualité des échantillons d'ADN extraits pour les essais.

- Milieu : génotypages réalisés dans les salles Pré-PCR génotypage et Post-PCR génotypage dont la température est maîtrisée pour cette dernière (21°C +/- 3°C).
- Main d'oeuvre :
 - génotypage échantillons EuroG_MDv3_XT_FRA_GD : Ludivine Liétar les 01/03/2023 et 02/03/2023,
 - génotypage échantillons EuroG_MDv4_XT_FRA_GD dont répétabilité : Malika Merbah les 13/03/2023 et 14/03/2023,
 - génotypage échantillons EuroG_MDv4_XT_FRA_GD reproductibilité :

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

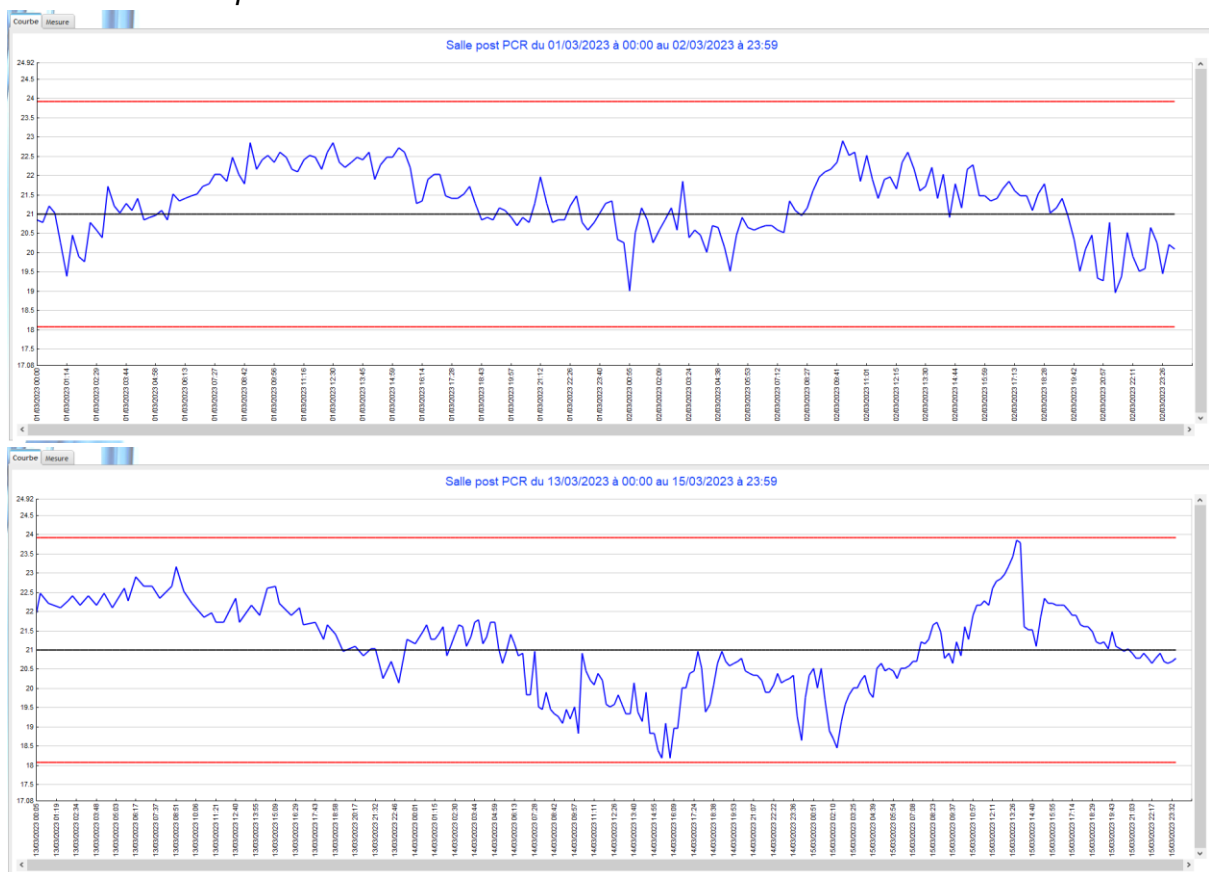
Ludivine Liétar les 14/03/2023 et 15/03/2023,

- *clustering SNP : Ludivine Liétar,*
- *analyses Genome Studio : Ludivine Liétar les 03/03/2023 et 17/03/2023,*
- *comparaisons SNP : Pierre Bouvelle le 03/05/2023*

6.4. Résultats de l'essai - Conclusion


➤ *Milieu :*

Variations de température :



➤ *Echantillons*

ID	CODE BARRE	ID GENOTYPAGE	Date debut genotypage	Date de Scan	Call Rate	Callrate 580 Iso
FR7937371962	GD450433	WG7006677-MSA7_A01	01/03/2023	02/03/2023	0,9982759	1

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

FR7937371966	GD450434	WG7006677-MSA7_B01	01/03/2023	02/03/2023	0,9990961	1
FR8528873239	GD490271	WG7006678-MSA7_G12	01/03/2023	02/03/2023	0,9995313	1
FR8528873261	GD490272	WG7006678-MSA7_H12	01/03/2023	02/03/2023	0,9995648	1
FR7937371962	GD450433	WG7022029-MSA7_A12	13/03/2023	14/03/2023	0,9994038	1
FR7937371966	GD450434	WG7022029-MSA7_B12	13/03/2023	14/03/2023	0,9995081	1
FR8528873239	GD490271	WG7022029-MSA7_C12	13/03/2023	14/03/2023	0,9993889	1
FR8528873261	GD490272	WG7022029-MSA7_D12	13/03/2023	14/03/2023	0,9994187	1
FR7937371962	GD450433	WG7022029-MSA7_E12	13/03/2023	14/03/2023	0,9994038	1
FR7937371966	GD450434	WG7022029-MSA7_F12	13/03/2023	14/03/2023	0,9994783	1
FR8528873239	GD490271	WG7022029-MSA7_G12	13/03/2023	14/03/2023	0,9993889	1
FR8528873261	GD490272	WG7022029-MSA7_H12	13/03/2023	14/03/2023	0,999374	1
FR7937371962	GD450433	WG7053886-MSA7_E12	14/03/2023	15/03/2023	0,9993442	1
FR7937371966	GD450434	WG7053886-MSA7_F12	14/03/2023	15/03/2023	0,9994485	1
FR8528873239	GD490271	WG7053886-MSA7_G12	14/03/2023	15/03/2023	0,9992101	1
FR8528873261	GD490272	WG7053886-MSA7_H12	14/03/2023	15/03/2023	0,999225	1

Version de puce : EuroG_MDv3_XT_GD

Projet Génome Studio : indexation_050323

Fichier de clustering utilisé : MDv3_XT_bovin_230123.egt

*Chemin d'accès du projet Génome Studio : serveur gna2gdlabo
\\gna2gdlabo.genesdiffusion.com\Labo\genotypages\Genotypages_SAM\SAM_MD_v3\Indexations\2023\indexations_mars_2023\indexation_050323*

Référence historique Galaxy : Genotypages_sem09_2023

Informations retranscrites dans le [Fichier suivi échantillons 2023 - Gènes Diffusion](#)

Version de puce : EuroG_MDv4_XT_FRA_GD


Version de puce :EuroG_MDv4_XT_FRA_GD (répétabilité)

Version de puce :EuroG_MDv4_XT_FRA_GD (reproductibilité)

Projet Génome Studio : indexation_170323

Fichier de clustering utilisé : MDv3_XT_bovin_170323.egt

*Chemin d'accès du projet Génome Studio : serveur gna2gdlabo
\\gna2gdlabo.genesdiffusion.com\Labo\genotypages\Genotypages_SAM\SAM_MD_v3\Indexations\2023\indexations_mars_2023\indexation_170323*

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

Référence historique Galaxy : Genotypages_sem11_2023

Informations retranscrites dans le [Fichier suivi échantillons 2023 - Gènes Diffusion](#)

➤ *Interprétation :*

- *Spécifications relatives au milieu validées.*
- *Présence de 576 des 580 SNP ISO (GDB_FI_15_SNP ISO 580) : lors des phases de validation de la nouvelle version de puce EuroG_MDv4_XT_FRA_GD, nous avons constaté que certains marqueurs étaient manquants :*
Hapmap42104-BTA-121232
Hapmap48543-BTA-98093
ARS-USMARC-Parent-AY863214-rs17871744
UMPS
Une fiche de non conformité a été ouverte (GDB_FORM_01_Fiche de non conformité_230131_01_v2.0).
Ainsi, le calcul de CallRate sur le panel des 580 SNP ISO n'intègre pas, pour la version de puce concernée, les marqueurs manquants.
- *Génotypages valides, 100 % de similarité sur les 576 SNP ISO communs > 99 % de similarité N-1 et N ([Comparaison MD v3 MD v4 Panel SNP 580 ISO](#)).*
- *Contrôles répétabilité et reproductibilité validés ([Comparaison MD v3 MD v4 Panel SNP 580 ISO](#)).*

➤ *Conclusion*

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

Seul le critère relatif au nombre de SNP n'est pas atteint, cependant nous faisons le choix de travailler sur les 576 SNP de la liste des 580 SNP ISO pour cette version de puce, dans l'attente de la prochaine version.

7. Analyse

7.1. Facteurs de risques


Matériel : RAS

Matière : RAS

Méthode : *clustering sous Genome Studio.*

Milieu : RAS

Main d'œuvre : *non respect des modes opératoires, mauvaise gestion/conservation de réactifs.*

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

7.2. Incertitudes

La méthode de génotypage étant qualitative, il n'y a pas d'incertitudes de mesures pouvant être déterminées.

7.3. Robustesse

Non vérifiée.

7.4. Conclusion

La méthode de génotypage sur puces à ADN EuroG_MDv4_XT_FRA_GD, telle que définie dans l'essai n°1 répond aux critères de performance attendus et met en évidence l'obtention de résultats qualitativement satisfaisants, hormis un nombre de SNP de 576 au lieu des 580 prévus.


En conséquence, le calcul de CallRate sur ce panel n'intégrera pas les marqueurs manquants pour cette version de puce.

Les marqueurs mentionnés seront absents du compte rendu d'analyses pour cette version de puce.

Une communication orale à destination du client a été réalisée le 13 mars 2023.

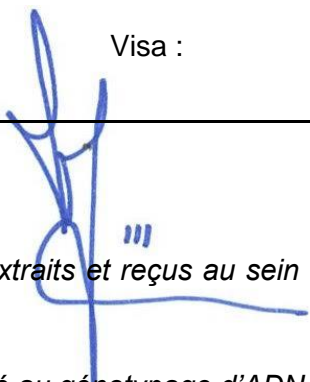
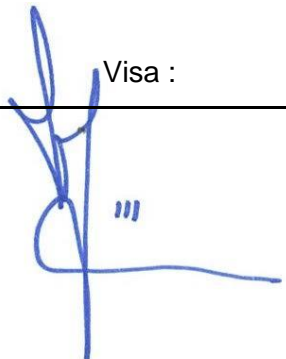
Malgré tout, cette méthode est répétable et reproductible, selon nos critères.

(Une version corrective MDv4.1 est déjà en cours de conception, pour livraison estimée en juin 2023)

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	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_Génotypage sur puces à ADN EuroG_MDv4_XT_FRA_GD_230313_01_v1.0		
Intitulé de la méthode : <i>Génotypage sur puces à ADN EuroG_MDv4_XT_FRA_GD</i> Référence de l'essai sélectionné : <i>Essai n°1</i>		
Vérification de la méthode : <input checked="" type="checkbox"/> approuvée (<i>enregistrements produits suffisants - critères de performance atteints et conformes aux exigences du client</i>) <input type="checkbox"/> non approuvée		
Signature Directeur Recherche et Développement : Nom : Christophe AUDEBERT Date : 17/03/2023 Visa :		
Validation de la méthode : <div style="text-align: right;">  </div>		
<u>Conditions</u> Domaine d'application : <i>l'ensemble des échantillons d'ADN bovins extraits et reçus au sein de la plateforme de génotypage GD Scan.</i> Ressources humaines : <ul style="list-style-type: none"> - <i>personnel autorisé : personnel de la plateforme GD Scan habilité au génotypage d'ADN</i> - <i>personnel formateur : personnel de la plateforme GD Scan habilité au génotypage d'ADN</i> - <i>personnel à former/habiller : RAS</i> - <i>autre : à préciser</i> Autres conditions : <i>Information au client</i>		
<u>Aptitude à l'emploi :</u> <input checked="" type="checkbox"/> accordée , mise en application à compter du : 17/03/2023 <input type="checkbox"/> non accordée , commentaires :		
Signature Directeur Recherche et Développement : Nom : Christophe AUDEBERT Date : 17/03/2023 Visa : <div style="text-align: right;">  </div>		