 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
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 colonnes de silice en tube à partir de semence*

- ☒ 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

La plateforme GD Scan réalise des extractions d'ADN en plaque à partir de semence sur colonnes de silice de chez Qiagen depuis 2010. La méthode a quelque peu évolué au fil du temps pour aboutir à la méthode actuelle, approuvée en décembre 2021.

L'objectif de ce dossier est de valider cette méthode d'extraction.

	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

3.4. Sélection de la méthode

Il existe différents fournisseurs de kits d'extraction manuelle sur colonne de silice sur le marché. Qiagen offre une gamme un peu plus coûteuse que d'autres fournisseurs mais fournit un meilleur rendement en ADN, notamment compte tenu du fait que nous pouvons parfois recevoir de faibles quantités de semence.

Le kit adapté aux prélèvements de semence est QIAamp DNA mini kit. La méthode associée, déjà en place depuis plusieurs années, a prouvé son efficacité en termes de résultats et de par notre volume d'échantillons.


3.5. Planification - Responsabilités

Pilote de projet : *Ludivine Liétar*

Personnel concerné par la validation de méthode : *Christophe Audebert, Ludivine Liétar, Michèle Boutté, Malika Merbah, Méli ssandre Barbet, Pierre Bouvelle*

Date d'ouverture de l'enregistrement (JJ/MM/AA) : 30/01/2023

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	31/01/2023	Christophe Audebert Directeur Recherche et Développement
Ludivine Liétar Responsable Plateforme de génotypage GD Scan	Développement, analyse et rédaction	31/01/2023	Ludivine Liétar Responsable Plateforme de génotypage GD Scan
Ludivine Liétar Responsable Plateforme de génotypage GD Scan	Réalisation des essais	31/01/2023	Ludivine Liétar Responsable Plateforme de génotypage GD Scan Michèle Boutté Malika Merbah Bio Techniciennes
Christophe Audebert Directeur Recherche et Développement	Vérification et validation	31/01/2023	Christophe Audebert Directeur Recherche et Développement
Ludivine Liétar	Développement, analyse et	31/07/2024	Ludivine Liétar

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Responsable Plateforme de génotypage GD Scan	rédaction → Version 230130_02 - ajout de la justification de dérogation aux critères de performance optimaux - ajout du contrôle répétabilité/reproductibilité (Essai 2) - ajout de la concordance des génotypages (Essai 3) - mise à jour du point 7. Analyse		Responsable Plateforme de génotypage GD Scan
Ludivine Liétar Responsable Plateforme de génotypage GD Scan	Réalisation des essais → Version 230130_02	12/07/2024	Ludivine Liétar Responsable Plateforme de génotypage GD Scan Michèle Boutté Malika Merbah Mélissandre Barbet Bio Techniciennes Pierre Bouvelle Responsable SI
Christophe Audebert Directeur Recherche et Développement	Vérification et validation → Version 230130_02	31/07/2024	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 : traçabilité matériel et certains réactifs manquante (validation de méthode effectuée sur des résultats déjà existants).

[] Equipements :

[] Qualité des matrices/données :

[x] Quantité de matrices/données : faibles quantités de prélèvements par séries -> difficulté à trouver des séries importantes, manque de données pour valider la répétabilité/reproductibilité (validation de méthode effectuée sur des résultats déjà existants).

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

[] Coût - investissement :

[] Autre(s) :

5. Caractéristiques de la méthode et performances attendues

5.1. Principe de la méthode

Les prélèvements sont mis en tubes, 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 peut être dosée par mesure de fluorescence au PicoGreen si besoin. Une gamme étalon est alors réalisée à chaque série de quantification et sert de référence pour déterminer la concentration en ADN.


5.2. Domaine d'application

La présente méthode s'applique à l'ensemble des prélèvements de semence bovine 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
[]	bulbes de poils	pochette Kit GDScan	température ambiante
[]	biopsie auriculaire = cartilage	tube avec conservateur (Allflex TSU ou TST)	température ambiante
<input checked="" type="checkbox"/>	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

	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

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 en ADN (ng/μL)*

[x] qualitatifs (ex : Call Rate) : *Call Rate, concordance génotypages*


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 Concordance génotypages : 99 % de similarité 580 SNP 8 échantillons issus des tests répétabilité/reproductibilité	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) Concordance génotypages : échantillon du test	Contrôle répétabilité selon GDB_PRO_05_ Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN	Contrôle reproductibilité selon GDB_PRO_05_ Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN

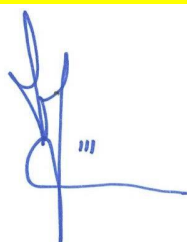
 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

		répétabilité/reproductibilité GDB_PRO_05_Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN, auquel on applique un seuil de 99 % de similarité 580 SNP		
[] 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 (génotypages 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
[x] Autre : Extraction d'ADN	12 prélèvements	Pour au moins 90 % des échantillons : - [ADN] > 15 ng/μL - Call Rate > 0,95 - Médiane Call Rate > 0,975 Concordance génotypages : 99 % de similarité 580 SNP 2 échantillons issus des tests répétabilité/reproductibilité	Contrôle de répétabilité selon GDB_PRO_06_Contrôle de reproductibilité et répétabilité de la phase d'extraction	- 12 autres prélèvements - Contrôle de reproductibilité selon GDB_PRO_06_Contrôle de reproductibilité et répétabilité de la phase d'extraction

Justification de dérogation : ce présent dossier de validation s'appuyant sur des résultats existants, du fait de l'utilisation de la méthode au sein de la plateforme de génotypage GD Scan depuis 2010, nous n'avons pas de données permettant de valider la répétabilité/reproductibilité, tel qu'énoncé dans les critères de performance d'extraction d'ADN optimaux. C'est pourquoi une dérogation est accordée pour valider la répétabilité/reproductibilité au travers d'un test annuel de répétabilité/reproductibilité de la

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

phase d'extraction.



Christophe Audebert, Directeur R&D

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

Remarque : différentes versions du mode opératoire GDB_MOP_04_Extraction d'ADN en tube à partir de semence ont été utilisées depuis la mise en place de la méthode en décembre 2021, et notamment pour les essais, cependant seules quelques modifications, ne remettant pas en cause le mode opératoire et ne pouvant pas impacter les critères de performance (suppression étape dosage + modifications mineures), ont été apportées.

Essai n°1

6.1. Introduction


L'essai consiste en la validation de l'extraction d'ADN de 12 prélèvements de semence déjà réalisée dans les conditions actuelles d'extraction, plus 12 autres prélèvements extraits dans les mêmes conditions mais par un opérateur différent, seule part de reproductibilité pouvant être évaluée. La validation d'une procédure de contrôle répétabilité/reproductibilité extraction associée sera réalisée à posteriori lors du prochain test et permettra de confirmer la validation de méthode.

6.2. Mode Opératoire

Le mode opératoire est celui en application au moment de l'essai GDB_MOP_04_Extraction d'ADN en tube à partir de semence_v2.0.

6.3. Points à développer (liste non exhaustive)

- Matériel (type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...) : s'agissant d'une validation de méthode éditée à posteriori du développement (méthode en place depuis décembre 2021 -> plus de 150 extractions de semence réalisées), un mode opératoire est déjà en application et reprend la liste du matériel nécessaire : GDB_MOP_04_Extraction d'ADN en tube à partir de semence_v2.0 au moment de l'essai. Par ailleurs, pour la même raison le suivi du matériel utilisé ne peut être documenté car

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT


non relevé lors de l'essai.

- Kits et réactifs : *s'agissant d'une validation de méthode éditée à postériori du développement (méthode en place depuis décembre 2021 -> plus de 150 extractions de semence réalisées), un mode opératoire est déjà en application et reprend la liste des kits et réactifs nécessaires : GDB_MOP_04_Extraction d'ADN en tube à partir de semence_v2.0 au moment de l'essai. Par ailleurs, pour la même raison le suivi de certains lots ne peut être documenté car non relevé lors de l'essai.*

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
QIAamp DNA mini kit Réf. 51306	non relevé	-	20°C +/- 5°C

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

ID	CODE BARRE	SEXE	RACE	TYPE MAT BIOLO	date reception Labo Douai	Plaque ADN	Position ADN	Date extraction
CA000013942572	GD414861	1	66	Semence	14/03/2022	SAM220330	D10	14/03/2022
CA000014073839	GD414862	1	66	Semence	14/03/2022	SAM220330	E10	14/03/2022
CA000110739145	GD414863	1	66	Semence	14/03/2022	SAM220330	F10	14/03/2022
CA000120096651	GD414864	1	66	Semence	14/03/2022	SAM220330	G10	14/03/2022
CA000120345208	GD414865	1	66	Semence	14/03/2022	SAM220330	H10	14/03/2022
CA000120345247	GD414866	1	66	Semence	14/03/2022	SAM220330	A11	14/03/2022
CA000120345248	GD414867	1	66	Semence	14/03/2022	SAM220330	B11	14/03/2022
CA000120345264	GD414868	1	66	Semence	14/03/2022	SAM220330	C11	14/03/2022
CA000120617207	GD414870	1	66	Semence	14/03/2022	SAM220330	E11	14/03/2022
CA000120617212	GD414871	1	66	Semence	14/03/2022	SAM220330	F11	14/03/2022
US003224437460	GD414872	1	66	Semence	14/03/2022	SAM220330	G11	14/03/2022
US003224437469	GD414873	1	66	Semence	14/03/2022	SAM220330	H11	14/03/2022
IT019991894420	GD428867	1	66	Semence	07/04/2022	SAM220426	E11	07/04/2022

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT


IT004992104349	GD428868	1	66	Semence	07/04/2022	SAM220426	F11	07/04/2022
IT028990476845	GD428869	1	66	Semence	07/04/2022	SAM220426	G11	07/04/2022
IT034991196866	GD428870	1	66	Semence	07/04/2022	SAM220426	H11	07/04/2022
IT001991322672	GD428871	1	66	Semence	07/04/2022	SAM220426	A12	07/04/2022
IT034991216341	GD428872	1	66	Semence	07/04/2022	SAM220426	B12	07/04/2022
IT001991277781	GD428873	1	66	Semence	07/04/2022	SAM220426	C12	07/04/2022
IT004992042022	GD428874	1	66	Semence	07/04/2022	SAM220426	D12	07/04/2022
IT018990253937	GD428875	1	66	Semence	07/04/2022	SAM220426	E12	07/04/2022
IT034991251191	GD428876	1	66	Semence	07/04/2022	SAM220426	F12	07/04/2022
IT024990682547	GD428877	1	66	Semence	07/04/2022	SAM220426	G12	07/04/2022
US003150307024	GD414419	1	66	Semence	07/04/2022	SAM220426	H12	07/04/2022

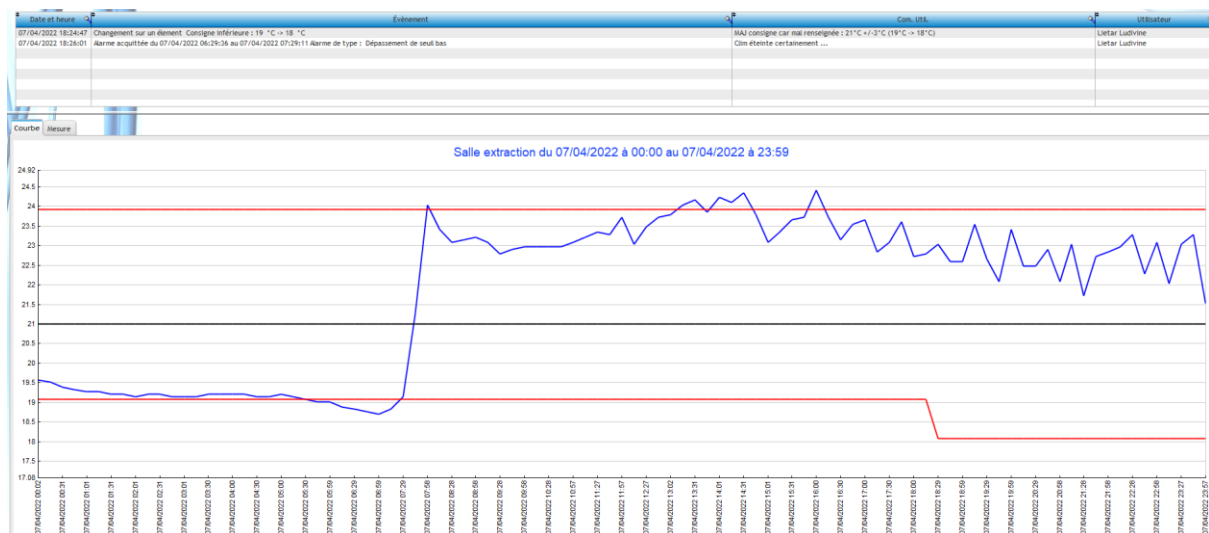
- Milieu : extractions réalisées dans la salle Extraction, dont la température est maîtrisée (21°C +/- 3°C) depuis le 05/04/2022, date d'installation du système de surveillance des températures, et génotypages réalisés dans les salles Pré-PCR génotypage et Post-PCR génotypage, dont la température est maîtrisée pour cette dernière (21°C +/- 3°C) depuis le 05/04/2022, date d'installation du système de surveillance des températures.
- Main d'oeuvre :
 - extractions SAM220330 : Malika Merbah le 14/03/2022,
 - extractions SAM220426 : Michèle Boutté le 07/04/2022,
 - génotypages SAM220330 : Malika Merbah les 15/03/2022 et 16/03/2022,
 - génotypages SAM220426 : Malika Merbah les 11/04/2022 et 12/04/2022,
 - dosage 24 échantillons : Ludivine Liétar le 08/02/2023.

6.4. Résultats de l'essai - Conclusion

- Milieu :

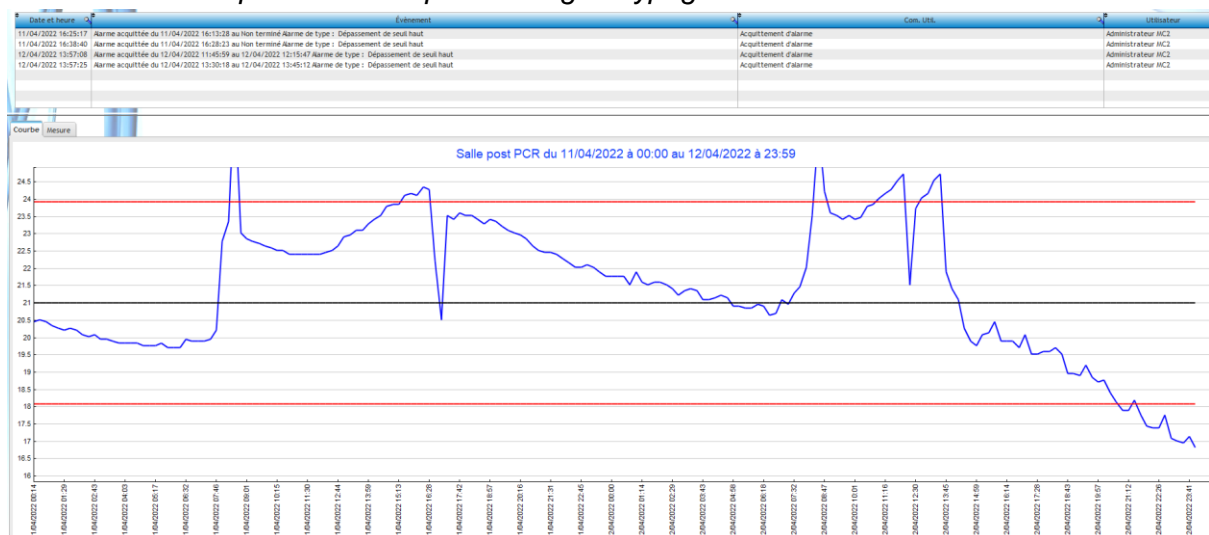
- Variation de température salle extraction 07/04/2022

	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT



(léger dépassement -> ok spécifications conservation réactifs extraction Qiagen entre 15°C et 25°C pour les réactifs stockés dans la pièce)


- Variation de température salle post-PCR génotypage 11/04/2022 et 12/04/2022

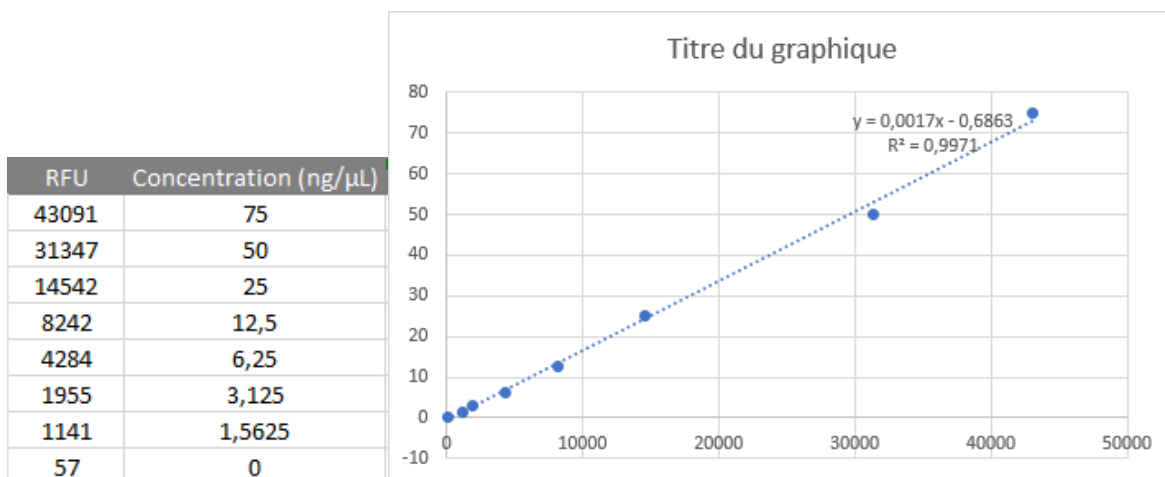


(léger dépassement -> ok spécifications conservation réactifs génotypage Illumina entre 15°C et 30°C pour les réactifs stockés dans la pièce)

➤ Extraction échantillons :
(fichier d'origine [Dosage validation methode extraction 080223.xlsx](#))

- Gamme étalon :

	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT



- *Echantillons :*

Semence SAM220426 E11-H12 (Michèle)

Semence SAM220330 D10-C11/E11-H11 (Malika)


Mesures RFU :

<>	7	8	9
A	28366	24558	38173
B	51016	33559	1523
C	46361	43373	13478
D	44731	46754	19678
E	49919	23211	41779
F	49108	21615	45309
G	41459	20641	29279
H	20861	14016	9329

Concentration (ng/μL) :


<>	7	8	9
A	47,5	41,1	64,2
B	86,0	56,4	1,9
C	78,1	73,0	22,2
D	75,4	78,8	32,8
E	84,2	38,8	70,3
F	82,8	36,1	76,3
G	69,8	34,4	49,1
H	34,8	23,1	15,2

➤ *Génotypage échantillons :*

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

ID	CODE BARRE	ID GENOTYPAGE	Date debut genotypage	Date de Scan	Call Rate
CA000013942572	GD414861	WG6907524-MSA7_D10	15/03/2022	16/03/2022	0,9987043
CA000014073839	GD414862	WG6907524-MSA7_E10	15/03/2022	16/03/2022	0,998588
CA000110739145	GD414863	WG6907524-MSA7_F10	15/03/2022	16/03/2022	0,9989368
CA000120096651	GD414864	WG6907524-MSA7_G10	15/03/2022	16/03/2022	0,9984053
CA000120345208	GD414865	WG6907524-MSA7_H10	15/03/2022	16/03/2022	0,9988206
CA000120345247	GD414866	WG6907524-MSA7_A11	15/03/2022	16/03/2022	0,9745345
CA000120345248	GD414867	WG6907524-MSA7_B11	15/03/2022	16/03/2022	0,9986047
CA000120345264	GD414868	WG6907524-MSA7_C11	15/03/2022	16/03/2022	0,9990698
CA000120617207	GD414870	WG6907524-MSA7_E11	15/03/2022	16/03/2022	0,9988704
CA000120617212	GD414871	WG6907524-MSA7_F11	15/03/2022	16/03/2022	0,9990033
US003224437460	GD414872	WG6907524-MSA7_G11	15/03/2022	16/03/2022	0,9989203
US003224437469	GD414873	WG6907524-MSA7_H11	15/03/2022	16/03/2022	0,9921095
IT019991894420	GD428867	WG6920953-MSA7_E11	11/04/2022	12/04/2022	0,9992676
IT004992104349	GD428868	WG6920953-MSA7_F11	11/04/2022	12/04/2022	0,9991677
IT028990476845	GD428869	WG6920953-MSA7_G11	11/04/2022	12/04/2022	0,9988514
IT034991196866	GD428870	WG6920953-MSA7_H11	11/04/2022	12/04/2022	0,9989346
IT001991322672	GD428871	WG6920953-MSA7_A12	11/04/2022	12/04/2022	0,9989346
IT034991216341	GD428872	WG6920953-MSA7_B12	11/04/2022	12/04/2022	0,9988015
IT001991277781	GD428873	WG6920953-MSA7_C12	11/04/2022	12/04/2022	0,9991344
IT004992042022	GD428874	WG6920953-MSA7_D12	11/04/2022	12/04/2022	0,9989679
IT018990253937	GD428875	WG6920953-MSA7_E12	11/04/2022	12/04/2022	0,9993008
IT034991251191	GD428876	WG6920953-MSA7_F12	11/04/2022	12/04/2022	0,998918
IT024990682547	GD428877	WG6920953-MSA7_G12	11/04/2022	12/04/2022	0,9988514
US003150307024	GD414419	WG6920953-MSA7_H12	11/04/2022	12/04/2022	0,9987682

Version de puce : EuroG_MDv3_XT_GD

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Projets Génome Studio : *indexation_180322* et *indexation_140422*

Fichier de clustering utilisé : *non tracé à l'époque*

Chemin d'accès du projet Génome Studio : serveur gna2gdlabo
 \\gna2gdlabo.genesdiffusion.com\Labo\genotypages\Genotypages_SAM\SAM_MD_v3\Indexations\2022\indexations_mars_2022\indexation_180322 et
 ... \indexations_avril_2022\indexation_140422

Référence historique Galaxy : *Genotypages_sem11_2022* et *Genotypages_sem15_2022*

Informations retranscrites dans le [Fichier suivi échantillons 2022 - Gènes Diffusion](#)

➤ *Interprétation :*

- *Spécifications relatives au milieu validées*
- *Concentration en ADN : 23 échantillons sur 24 > 15 ng/μL, soit 95,8 %*
- *Call Rate > 0,95 pour l'ensemble des 24 échantillons*
- *Médiane Call Rate 48 échantillons = 0,9988942 > 0,975*

➤ *Conclusion*

L'essai répond aux critères de performance attendus et met en évidence l'obtention de résultats qualitativement 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 tube, ainsi que la vérification de la concordance des génotypages.

Essai n°2

1.1. Introduction


L'essai consiste en la validation d'un test annuel de répétabilité/reproductibilité extraction sur colonnes de silice en plaque à partir de sang, celui-ci ayant effectué en septembre 2022 par Malika Merbah et Michèle Boutté, selon GDB_PRO_06_Contrôle de reproductibilité et répétabilité de la phase d'extraction_v1.0 au moment de l'essai.

1.2. Mode Opérateur

Le mode opératoire est celui en application au moment de l'essai GDB_MOP_04_Extraction d'ADN en tube à partir de semence_v1.0.

1.3. Points à développer (liste non exhaustive)

- *Matériel (type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...) : s'agissant d'une validation de méthode éditée à posteriori du développement (méthode en place depuis décembre 2021 -> plus de 150 extractions de semence réalisées), un mode opératoire*

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

est déjà en application et reprend la liste du matériel nécessaire : GDB_MOP_04_Extraction d'ADN en tube à partir de semence_v1.0 au moment de l'essai. Par ailleurs, pour la même raison le suivi du matériel utilisé ne peut être documenté car non relevé lors de l'essai.


- Kits et réactifs : s'agissant d'une validation de méthode éditée à posteriori du développement (méthode en place depuis décembre 2021 -> plus de 150 extractions de semence réalisées), un mode opératoire est déjà en application et reprend la liste des kits et réactifs nécessaires : GDB_MOP_04_Extraction d'ADN en tube à partir de semence_v1.0 au moment de l'essai. Par ailleurs, pour la même raison le suivi de certains lots ne peut être documenté car non relevé lors de l'essai.

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
QIAamp DNA mini kit Réf. 51306	non relevé	-	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
GD390218	Semence	13/04/2022	Test répéta/repro extraction sang/semence 15/09/22	Entre le 06/09/22 (date création liste échantillons) et le 15/09/22 (dosage échantillons)
GD390217	Semence	13/04/2022	Test répéta/repro extraction sang/semence 15/09/22	Entre le 06/09/22 (date création liste échantillons) et le 15/09/22 (dosage échantillons)
GD390216	Semence	13/04/2022	Test répéta/repro extraction sang/semence 15/09/22	Entre le 06/09/22 (date création liste échantillons) et le 15/09/22 (dosage échantillons)
GD390215	Semence	13/04/2022	Test répéta/repro extraction sang/semence 15/09/22	Entre le 06/09/22 (date création liste échantillons) et le 15/09/22 (dosage échantillons)
GD390214	Semence	13/04/2022	Test répéta/repro extraction sang/semence 15/09/22	Entre le 06/09/22 (date création liste échantillons) et le 15/09/22 (dosage échantillons)

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

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

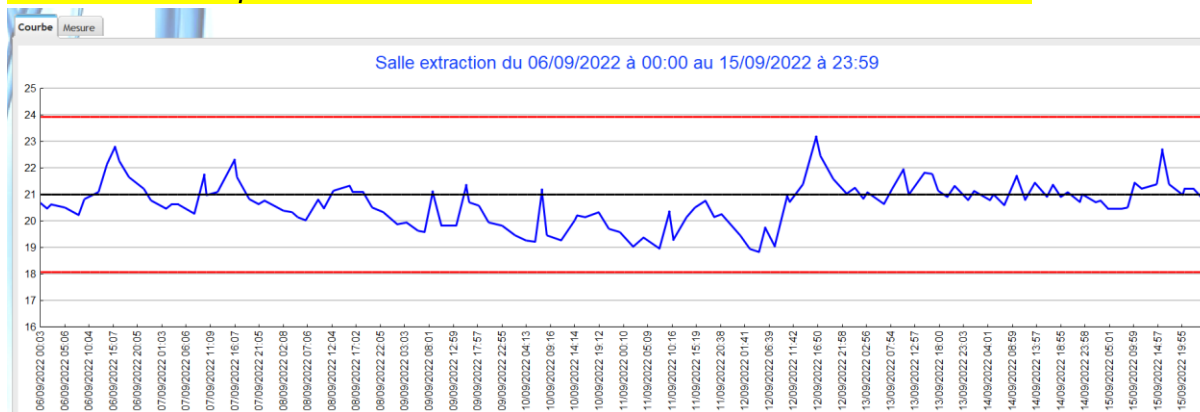
➤ Main d'oeuvre :

- extractions Test répéta/repro extraction sang/semence 15/09/22 : Malika Merbah A09-E09 + F09-B10 (répétabilité Malika), Michèle Boutté A11-E11 + F11-B12 (répétabilité Michèle),
- dosage 20 échantillons : Malika Merbah et Michèle Boutté (reproductibilité dosage) le 15/09/2022 + redosage Malika Merbah le 21/09/2022.

1.4. Résultats de l'essai - Conclusion

➤ Milieu :

- Variation de température salle extraction entre le 06/09/2022 et le 15/09/2022




➤ Extraction échantillons :

Remarque : un premier dosage (15/09/2022) a révélé une non-conformité au niveau de la reproductibilité sur le dosage des échantillons (testée au moment de l'essai, mais plus d'actualité à ce jour -> GDB_FORM_02_Contrôle de reproductibilité et répétabilité de la phase d'extraction_220915_01_v1.0), à priori provenant de l'opérateur B (Malika Merbah), c'est pourquoi une seconde session de dosages a été effectuée (21/09/2022). Ne seront pris en compte dans cet essai, que les résultats du second dosage.

(fichiers d'origine comprenant dosages et gammes étalon :

- GDB_ENR_120_Données brutes dosages Malika 150922_v1.0
- GDB_ENR_121_Dosages Malika extractions Malika 150922_v1.0

	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

- GDB_ENR_122_Dosages Malika extractions Mich 150922_v1.0
- GDB_ENR_123_Données brutes dosages bis Malika 210922_v1.0
- GDB_ENR_124_Dosages bis Malika extractions Malika 210922_v1.0
- GDB_ENR_125_Dosages bis Malika extractions Mich 210922_v1.0
- GDB_ENR_126_Données brutes dosages Mich 150922_v1.0
- GDB_ENR_127_Dosages Mich extractions Mich 150922_v1.0
- GDB_ENR_128_Dosages Mich extractions Malika 150922_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_220921_01_v1.0

➤ **Interprétation :**

- Spécifications relatives au milieu validées
- Contrôle de répétabilité extraction validé (> 95 %) :
 - Malika Merbah = 98,6 %
 - Michèle Boutté = 100,0 %
- Contrôle de reproductibilité extraction validé (> 90 %) :
 - Malika Merbah / Michèle Boutté = 98,6 %

➤ **Conclusion**

Le test de répétabilité/reproductibilité extraction sur colonnes de silice en plaque à partir de sang 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.

Essai n°3


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

6.10. Mode Opérateur

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

6.11. Points à développer (liste non exhaustive)


 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

➤ **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 (SAM220451 échantillons reproductibilité)
- Incubateur microplaque SciGene GDD-INCU-005
- Four Illumina GDD-FOUR-004 (SAM2407008 échantillons répétabilité)
- Four Illumina GDD-FOUR-001 (SAM220454 échantillons reproductibilité)
- 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 pour le run du 08/07/2024 et 09/07/2024 - dans le fichier GDB_ENR_20_Génotypage Infinium Illumina - Tracking form - Réponses_v1.0 pour le run du 19/04/2022 et 20/04/2022	-	-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

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT


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
GD3902 15	Semence	13/04/2022	Test répéta/repro extraction sang/semence 15/09/22	D11 (référence)	Entre le 06/09/22 (date création liste échantillons) et le 15/09/22 (dosage échantillons)
GD3902 15	Semence	13/04/2022	Test répéta/repro extraction sang/semence 15/09/22	A12 (répétabilité)	Entre le 06/09/22 (date création liste échantillons) et le 15/09/22 (dosage échantillons)
GD3902 15	Semence	13/04/2022	SAM220451	C12 (reproductibilité)	14/04/2022
GD3902 14	Semence	13/04/2022	Test répéta/repro extraction sang/semence 15/09/22	E11 (référence)	Entre le 06/09/22 (date création liste échantillons) et le 15/09/22 (dosage échantillons)
GD3902 14	Semence	13/04/2022	Test répéta/repro extraction sang/semence 15/09/22	B12 (répétabilité)	Entre le 06/09/22 (date création liste échantillons) et le 15/09/22 (dosage échantillons)
GD3902 14	Semence	13/04/2022	SAM220451	D12 (reproductibilité)	14/04/2022

➤ 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).

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

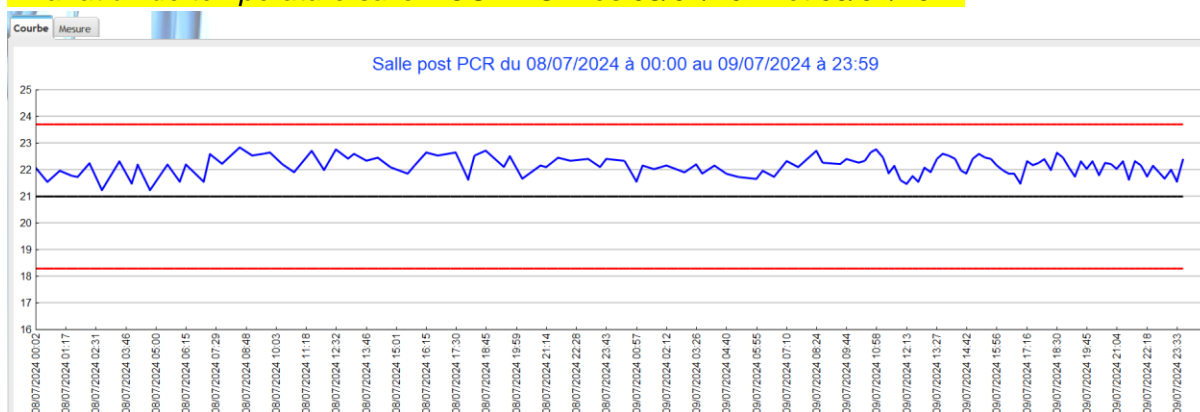
➤ Main d'oeuvre :

- Extraction échantillons GD390215 (D11/A12) et GD390214 (E11/B12) plaque Test répéta/repro extraction sang/semence 15/09/22 : Michèle Boutté
- Extraction échantillons GD390215 (C12) et GD390214 (D12) plaque SAM220451 : Malika Merbah
- Génotypage échantillons GD390215 (D11/A12) et GD390214 (E11/B12) plaque Test répéta/repro extraction poils 15/09/22 : Mélissandre Barbet les 08/07/2024 et 09/07/2024 (avec la SAM2407008, E11/F11 et G11/H11 respectivement)
- Génotypage échantillons GD390215 (C12) et GD390214 (D12) plaque SAM220451 : Malika Merbah les 19/04/2022 et 20/04/2022
- analyses Genome Studio : Sophie Martel le 12/07/2024 (échantillons répétabilité) et Ludivine Liétar le 22/04/2022 (échantillons reproductibilité)
- comparaisons SNP : Pierre Bouvelle le 10/07/2024


6.12. Résultats de l'essai – Conclusion

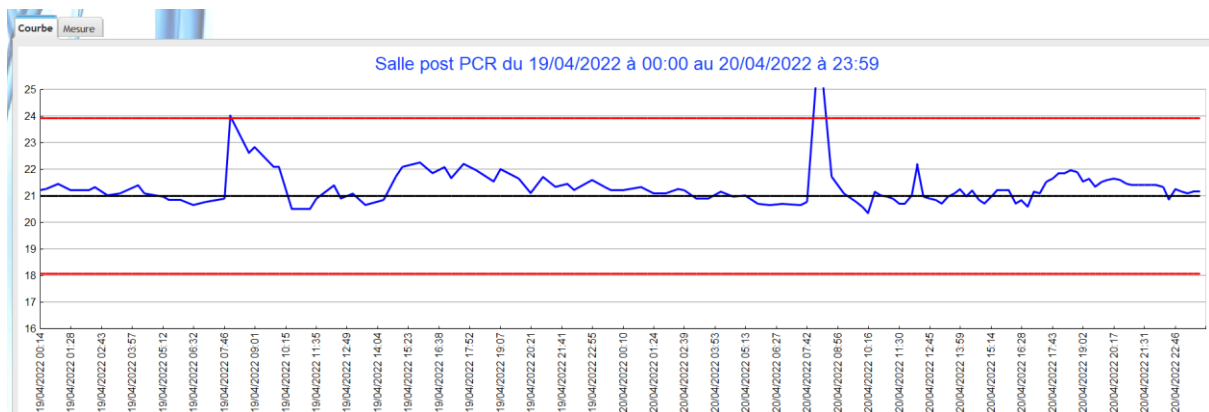
➤ Milieu :

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



- Variation de température salle POST-PCR les 19/04/2022 et 20/04/2022

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT



Deux légers décrochages, non critiques, dus au lever du soleil directement sur la sonde de température (mal placée).

➤ **Génotypage échantillons :**

ID	CODE BARRE	ID GENOTYPAGE	Date debut genotypage	Date de Scan	Call Rate	Callrate 580 Iso
FR5347294819	GD390215	WG7176727-MSA7_E11	08/07/2024	09/07/2024	0.9993179	1
FR5347294819	GD390215	WG7176727-MSA7_F11	08/07/2024	09/07/2024	0.999481	1
FR5347294819	GD390215	WG6921086-MSA7_C12	19/04/2022	20/04/2022	0.9986184	non vérifié à l'époque
FR5350037587	GD390214	WG7176727-MSA7_G11	08/07/2024	09/07/2024	0.9989323	1
FR5350037587	GD390214	WG7176727-MSA7_H11	08/07/2024	09/07/2024	0.9989768	1
FR5350037587	GD390214	WG6921086-MSA7_D12	19/04/2022	20/04/2022	0.9984186	non vérifié à l'époque

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_MDv3_XT_GD

Projet Génome Studio : indexation_220422

Fichier de clustering utilisé : MDv3_XT_bovin_050422.egt

Chemin d'accès du projet Génome Studio : serveur gna2gdlabo

\\gna2gdlabo.genesdiffusion.com\archives_genom\genotypages_SAM\SAM_MD_v3\Indexation

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

ns\2022\indexation_avril_2022\indexation_220422

Référence historique Galaxy : Genotypages_sem16_2022

Informations retranscrites dans le Fichier suivi échantillons 2022 – Gènes Diffusion

➤ **Interprétation :**

- Spécifications relatives au milieu validées
- Concordance génotypages validée avec 100 % de similarité 580 SNP ISO 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.

7. Analyse

7.1. Facteurs de risques

Matériel : *intercontaminations liées au matériel (réglage, dysfonctionnement, etc...).*

Matière : RAS.

Méthode : RAS.

Milieu : *intercontaminations liées à l'environnement, coupure de courant pouvant influencer sur la température ambiante (climatisation non reliée au circuit ondulé).*


Main d'œuvre : *non respect des modes opératoires / erreur humaine (intercontaminations, oubli de réactif, etc...), mauvaise gestion/conservation de réactifs.*

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 :

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

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

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


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 sur colonnes de silice en tube à partir de semence, telle que définie dans l'essai n°1 répond aux critères de performance attendus et met en évidence l'obtention de résultats qualitativement satisfaisant

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
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 colonnes de silice en tube à partir de semence_230130_01_v1.0

Intitulé de la méthode : *extraction d'ADN sur colonnes de silice en tube à partir de semence*

Référence de l'essai sélectionné : *Essai n°1*

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 : 17/02/2023

Visa :

Validation de la méthode :

Conditions

Domaine d'application : *l'ensemble des prélèvements de semence bovine reçus au sein de la plateforme de génotypage GDScan.*

Ressources humaines :

- *personnel autorisé : personnel de la plateforme GD Scan habilité à l'extraction d'ADN*
- *personnel formateur : personnel de la plateforme GD Scan habilité à l'extraction d'ADN*
- *personnel à former/habiller : RAS*
- *autre : à préciser*

Autres conditions : *Information au client*

Aptitude à l'emploi :

☒ **accordée**, mise en application à compter du : 18/02/2023


☐ **non accordée**, commentaires :

Signature Directeur Recherche et Développement :

Nom : Christophe AUDEBERT Date : 17/02/2023

Visa :

Partie réservée au Directeur Recherche et Développement

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 2.0
GDB_FORM_53	SMQ	12/07/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : L. LIETAR	Approbation : C. AUDEBERT

Référence du présent enregistrement de validation de méthode :

GDB_FORM_53_Validation de méthode_Extraction d'ADN sur colonnes de silice en tube à partir de semence_230130_02_v2.0

Intitulé de la méthode : *extraction d'ADN sur colonnes de silice en tube à partir de semence*
Référence de l'essai sélectionné : *Essai n°1*

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 : *l'ensemble des prélèvements de semence bovine reçus au sein de la plateforme de génotypage GDScan.*

Ressources humaines :

- *personnel autorisé : personnel de la plateforme GD Scan habilité à l'extraction d'ADN*
- *personnel formateur : personnel de la plateforme GD Scan habilité à l'extraction d'ADN*
- *personnel à former/habiller : RAS*
- *autre : à préciser*

Autres conditions : *Information au client*

Aptitude à l'emploi :

☒ **accordée**, mise en application à compter du : 18/02/2023

☐ **non accordée**, commentaires :

Signature Directeur Recherche et Développement :

Nom : Christophe AUDEBERT Date : **31/07/2024**

Visa :