



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option « Génétique et Physiologie »

**Optimisation de protocole d'établissement de profils génétiques
obtenus à partir d'ADN extrait du prélèvement du sang sur cartes
FTA®**

Présenté par

SOUIDI Anissa

Soutenu le : 15/06/2015

Nom	Grade	Lieu	Qualité
-Melle BENCHABANE	MAB	FSNV	Presidente
-Mr. MOHAMED SAID	MAA	FSNV	Promoteur
-Mr.DAHO	MAA	INCC-GN	Co-promoteur
- Mme GUESSAIBIA	MCB	FSNV	Examinatrice
- Mr. BRAHIM ERRAHAMANI	MAA	FSNV	Invité
- Mr. LAZREG	MAA	INCC-GN	Invité

Promotion 2014-2015

Remerciements

Avant toute chose, je remercie ALLAH le tout puissant, de m'avoir donné la force et la patience pour mener à terme ce travail.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire d'identification génétique de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie de la gendarmerie nationale, Bouchaoui, donc je tiens à exprimer toute ma gratitude au chef du laboratoire, commandant B.Ahmed de m'avoir accueilli avec gentillesse dans son laboratoire et de m'avoir offert son aide avec simplicité et ouverture d'esprit.

Je tiens à exprimer mes reconnaissances à mon promoteur, Monsieur Ramdane MOHAMED SAID, ce travail n'aurait pu être réalisé sans sa confiance, son soutien permanent malgré ses occupations et ses conseils avisés. Je tiens à le remercier d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions et d'avoir été disponible à tout moment. Je le remercie également pour ses lectures et relectures pour chaque partie de mon mémoire.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au capitaine DAHO Kadour, pour le temps qu'il m'a consacré et pour ses remarques instructives. Je le remercie aussi de m'avoir fait partager ses grandes connaissances scientifiques et sa vision de la recherche lors de la rédaction de mon mémoire. Travailler avec vous fut très enrichissant capitaine.

Je remercie vivement, la présidente du jury Melle BENCHABANE et l'examinatrice Mme GUESSAIBIA qui ont accepté de consacrer une partie de leur temps précieux à l'évaluation de ce travail. C'est un grand honneur pour moi d'avoir pu soumettre ce travail à leur regard scientifique.

Mes plus sincères remerciements vont au commandant LAZREG Samir pour sa présence quotidienne à mes côtés jusqu'à la dernière minute de la réalisation de ce travail, sa patience, ses précieux conseils, ses encouragements et son soutien. Je lui en suis extrêmement reconnaissante. Je lui dis merci pour toutes les heures de discussion sur la stratégie de réalisation de ce projet ainsi que pour l'intérêt marqué avec lequel il a dirigé et suivi le déroulement de ce travail. Une grande partie de ce mémoire a été réalisée grâce à vous commandant.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance au capitaine Adel pour sa disponibilité et son aide et sa gentillesse.

Je remercie également le capitaine AGOUN pour tout type de documentation et conseils, ainsi que pour la formation d'hygiène dans laquelle j'ai découvert plusieurs mesures de protection en laboratoire, tous cela a été utile pour moi.

Je dois ajouter que ce travail n'a pu être possible que grâce à la contribution de toutes les personnes travaillant au laboratoire d'identification génétique de INCC, je les remercie chaleureusement de m'avoir permis de réaliser ce projet et pour l'intérêt qu'elles ont toujours porté à mon travail. Merci aussi pour la gentillesse qu'elles m'ont témoigné tout au long de mon stage de PFE et pour leur aimable assistance et collaboration. Vous étiez pour moi une très belle expérience aussi bien du point de vue scientifique qu'humain.

C'est également avec plaisir que je remercie Monsieur Brahim Errahmani, pour ses nombreux conseils et sa gentillesse pour l'aide qu'il m'a apporté lors des analyses statistiques. Et aussi pour m'avoir fait l'honneur de sa présence à ma soutenance. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance et de ma considération respectueuse.

Je tiens à remercier aussi tous mes enseignants qui ont participé à ma formation tout au long de mon cursus. Un grand merci pour madame AISSANI Radia pour toutes les remarques et les discussions enrichissantes qu'elle m'a partagé concernant mon PFE.

Merci à mes amies, Soumia et Manel, que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés et qui m'ont toujours soutenu et encouragé depuis de nombreuses années : ce sont des amies en or.

Je tiens à remercier toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail et que je n'ai pas cité explicitement.

Mes derniers remerciements et non les moindres, s'adressent chaleureusement à Mohamed, où qu'il soit, il m'apporte la force qui me manque dans mes moments de faiblesse. Je résume mes sentiments dans cette simple phrase : Tout ce travail n'aurait jamais été possible sans toi...

Dédicace

C'est avec profonde gratitude que je dédie ce mémoire à mon très cher papa, prunelles de mes yeux

Papa ; tu as sacrifié ta vie pour ma réussite, j'espère qu'un jour je pourrais te rendre un peu de ce que tu as fait pour nous faire grandir. Que dieu te prête bonheur et longue vie afin que je puisse à mon tour te combler.

À la mémoire de ma mère...

Maman ; le bon Dieu t'a arraché de nous trop tôt, J'aurais tant voulu que tu assistes à cette cérémonie et que tu me partage ma joie. Tu as été pour moi un excellent exemple de courage, d'honnêteté, de dignité, de sagesse, et des valeurs humaines. Tu as consacré le meilleur de toi-même à notre éducation pour faire de nous ce que nous sommes. Que ton âme repose en paix,

Maman.

Résumé

Actuellement l’empreinte génétique est le moyen clé d’identification en service judiciaire, cette dernière est établie par la PCR multiplex des STRs en utilisant différents kits commerciaux. Le kit PowerPlex® ESI 16 system est prévu pour l’établissement des profils génétiques par la co-amplification de seize locus marqués différemment. Les protocoles décrits dans ces propres manuels ont été testés selon des spécifications prédéterminées par le fabricant afin de garantir une qualité constante du produit. Cependant, pour des raisons d’assurance qualité, chaque laboratoire doit déterminer la pertinence du produit pour son usage particulier. En fait, le protocole standard utilisé par les analystes du laboratoire d’identification génétique de l’INCC pour l’établissement des profils génétiques à partir d’ADN extrait du prélèvement du sang (prélèvement de référence) par la technologie des cartes FTA® présentent une forte saturation qui s’exprime par des hauteurs de pics très élevées puis l’abondance des artéfacts. La présente étude avait pour objectif d’obtenir des profils génétiques exploitables. Pour cela, nous avons optimisé le protocole standard en se basant sur deux paramètres : d’abord, le nombre de lavages du punch imprégné du sang a été augmenté de 3 lavages (défini par le fabricant) à 4 lavages au tampon TE afin de tester l’effet du lavage sur le taux d’inhibition posée par l’hémoglobine et sur l’élimination de l’ADN immobilisé sur la carte FTA®. Par ailleurs, le nombre de cycles de PCR multiplex a été diminué de façon décroissante de 29 cycles (défini par le fournisseur) jusqu’à 24 cycles dans le but de déterminer le nombre de cycle adéquat pour donner un profil ADN complet et interprétable.

Les résultats obtenus ont montré que le lavage n’a pas un effet significatif sur la quantité d’ADN immobilisée sur la carte FTA ($p > 0,05$) et l’effet sur le taux d’inhibition n’a pas également été observé. Les hauteurs de pics optimales ont été obtenues par les groupes d’échantillons amplifiés à 25 cycles de PCR.

En conclusion, l’avancée majeure de ce travail est la mise en évidence d’un nouveau protocole optimisé. Le nombre de lavages retenu a été celui défini par le fabricant (3 lavages) et le nombre de cycles d’amplification requis a été 25 cycles.

Mots-clés : Kit PowerPlex® ESI 16 system, profils génétiques, protocole standard, ADN, cartes FTA®, saturation, lavages, PCR, optimisation

Abstract

Currently the genetic fingerprint identification is the key way in judicial services; the latter is established by PCR multiplex of STRs using different commercial kits. The PowerPlex® ESI 16 System allows co-amplification and detection of sixteen loci. The protocols described in these own manuals were tested according to predetermined specifications to ensure consistent product quality. However, for quality assurance purposes, each laboratory should determine the suitability of the product for its particular use.

the standard protocol used by analysts on laboratory on DNA analysis (INCC) to establish genetic profiles from DNA extracted from the blood sample (reference sample) by FTA® cards have a high saturation which is expressed by very high peak and the abundance of artifacts. That poses a true problem during the interpretation of the results. This study aimed to obtain usable DNA profiles. For this, we have optimized the protocol based on two parameters: First, the washing of punch was increased for 3 washes (defined by the manufacturer) to 4 washes with TE buffer to test the effect of washing on the inhibition rate raised by hemoglobin and on the elimination of immobilized DNA on FTA® card. In addition, the number of PCR cycles was reduced decreasingly for 29 cycles (defined by the supplier) to 24 cycles in order to determine the appropriate number of ring to give a complete and interpretable DNA profile.

The results showed that washing does not have a significant effect on eliminating DNA fragments immobilized on the FTA® card ($p > 0.05$); and the effect on the inhibition rate was not also observed. However, peak heights and artefacts have cleared in parallel with the decreasing number of cycles of PCR, and then the groups of samples amplified at 25 cycles of PCR obtained the optimal peak heights.

In conclusion, the major breakthrough of this work is the demonstration of a new optimized protocol. The number of washing retained wash was that defined by the manufacturer (3 washes) and the required number of amplification cycles was 25 cycles.

Keywords: Kit PowerPlex® 16 ESI system, genetic profiles, standard protocol, DNA, FTA® cards, saturation, washes, PCR, optimization

ملخص

حاليا البصمة الوراثية هي الوسيلة الأكثر استعمالا في مجال التعريف عن طريق تحليل الحمض النووي ، هذه الأخيرة يتم التوصل إليها عن طريق التضخيم للحمض النووي بواسطة عدة منتجات تجارية . المنتج التجاري من نوع PowerPlex® ESI 16 System يستعمل لإنشاء البصمة الوراثية بواسطة تضخيم ستة عشر واسمات من نوع ميكروساتيليت موسومة بألوان مختلفة .

البروتوكولات الموصوفة في الأدلة الخاصة بالمنتج تم اختبارها وفقا لمواصفات محددة و ذلك لضمان جودة المنتج، و لكن رغم ذلك و لضمان دقة أكثر و جب على كل مختبر أن يقوم بتحديد صلاحية هذا المنتج حسب حاجياته الخاصة.

في الواقع إن البروتوكول المعتمد من طرف فريق خبراء مخبر تحليل الحمض النووي للمعهد الوطني للأدلة الجنائية و الإجراء المستخدم لرسم البصمة الوراثية انطلاقا من الحمض النووي المستخلص من العينات المرجعية (الدم) عن طريق تقنية البطاقات المدعوة FTA® يعطي بصمة جينات وراثية منتشعبة ، حيث تظهر على شكل خطوط متداكسة مما قد يعرقل تحليلها و قراتتها .

في هذا الإطار تهدف هذه الدراسة الى الحصول على بصمات جينات وراثية قابلة للاستخدام ، لهذا قمنا بتعديل البروتوكول الأصلي على أساس معلمتين :

أولا : قمنا بزيادة عدد غسل القرص المثبت لشظايا الحمض النووي من 3 غسلات (محددة من طرف الشركة المصنعة) إلى 4 غسلات بواسطة المخفف TE و ذلك لاختبار تأثير الغسيل على مدى تثبيط خضاب الدم من جهة و على شظايا الحمض النووي المثبتة على البطاقة FTA® من جهة أخرى . ثانيا : قمنا بتخفيض عدد دورات تضخيم الحمض النووي بواسطة PCR من 29 دورة (محددة من طرف المورد) إلى 24 دورة و ذلك من أجل تحديد عدد الدورات المناسبة لإعطاء بصمة جينات وراثية كاملة مقروءة و قابلة للتحليل .

أظهرت النتائج أن الغسيل ليس له أي أثر على شظايا الحمض النووي المثبتة على بطاقة FTA® حيث $P > 0,05$ و التأثير على تثبيط خضاب الدم أيضا لم يلاحظ ولكن طول خطوط بصمة الجينات الوراثية كان في تناقص مستمر بصفة طردية مع تناقص عدد دورات التضخيم المستعملة . .

في الختام ، توصلنا إلى وضع بروتوكول معتدل حيث أن عدد الغسلات المعتمد هو نفسه المنصوص عليه من طرف شركة الصنع ، و عدد دورات التضخيم المناسب هو 25 دورة .

الكلمات المفتاحية :

المنتج PowerPlex® ESI 16 System ، بصمة الجينات الوراثية ، بروتوكول أصلي ، الحمض النووي ، بطاقة FTA® ، تشبع ، غسل ، تضخيم ، تعديل .

Sommaire

Résumé

Abstract

ملخص

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations et des acronymes

Liste des annexes

Introduction 1

Chapitre I : Étude bibliographique 3

I.1. Empreinte Génétique 3

I.2. L'ADN Humain : Rappels essentiels 3

I.2.1. L'ADN nucléaire 4

I.2.2. L'ADN mitochondrial 4

I.3. Polymorphisme Génétique 5

I.3.1. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction 5

I.3.2. Polymorphismes de répétition 5

I.3.3. Polymorphismes d'un seul nucléotide (*Single Nucleotide Polymorphisms*) 7

I.4. L'établissement d'un profil génétique 8

I.4.1. Source d'ADN 8

I.4.2. Extraction d'ADN 8

I.4.3. Amplification par PCR 10

I.4.4. Séparation et détection 15

I.4.5. Traitement des données et validation des résultats 16

I.5. Limites de la génétique médico-légale 19

I.5.1. Les inhibiteurs de la PCR 19

I.5.2. Les artéfacts liés aux erreurs d'amplification 19

Chapitre II : Matériel et méthodes 21

II.1. Echantillon d'ADN humain 21

II.2.Méthodes de travail	21
II.2.1.Extraction d'ADN par la technique FTA	21
II.2.2.Amplification par PCR	25
II.3.Électrophorèse capillaire	31
II.3.1. Protocole expérimental de la post-amplification	31
II.3.2. Séparation et détection des fragments d'ADN amplifiés	32
II.4.Traitement des données et validation des résultats.....	33
II.4.1.Traitement des données	33
II.4.2.Validation des résultats.....	34
II.5.Analyses statistiques.....	34
II.5.1.Comparaison intra-groupe	34
II.5.2.Comparaison inter-groupes	35

Chapitre III : Résultats et discussion 36

III.1.Résultats d'analyses génétiques	36
III.2. Résultats d'analyses statistiques.....	46
III.2.1. Résultats de comparaison intra-groupe	46
III.2.2. Résultats de comparaison inter-groupes	60
III.2.3. Choix de nombre de cycle adéquat	62
III.3.Descussion.....	73
III.3.1. Étude de cas.....	75

Conclusion..... 79

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Vue en microscopie électronique d'une portion d'un dépôt de sang sur un support FTA® a - dépôt frais de sang (1500 X); b - dépôt de sang sur une carte FTA® après un lavage au réactif FTA (10000 X).	9
Figure 2 : Principe général de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	11
Figure 3 : Schéma de la PCR multiplex	13
Figure 4 : Les 13 loci communs analysés sur les autosomes plus l'amélogénine.....	14
Figure 5 : Schéma du locus mâle (a) et femelle (b) d'amelogenin sur les chromosomes X et Y, et au niveau d'électrophérogramme	15
Figure 6 : Représentation schématique d'un appareillage de l'électrophorèse capillaire	16
Figure 7 : Schéma de la séparation et la détection des STRs par le séquenceur ABI Prism...	17
Figure 8 : Exemple des pics tracés par GenneMapper en présence des pics hors échelles	18
Figure 9 : Exemple des allèles du marqueur vWA présentant des stutters.....	20
Figure 10 : Exemple d'un pul-up	20
Figure 11 : Processus d'établissement d'un profil génétique	21
Figure 12 : Mini-catre FTA. B. Pochette de stockage pour la protection des cartes FTA® contre les gaz ou les liquides. C. Tapis de coupe et micro-poinçonneuse.	22
Figure 13 : Configuration des locis analysés par le kit PowerPlex® ESI 16 system A* = Amelogenin. Source.....	25
Figure 14 : Répartition des tubes des échantillons dans la plaque de 96 puits de thermocycleur, (exemple n=29 cycles)	29
Figure 15 : Schéma général de dispositif expérimental de l'optimisation des lavages et de l'amplification	30
Figure 16 : Configuration de la plaque de 96 puits de séquenceur (exemple de répartition des échantillons amplifié avec 29 cycles).....	32

Figure 17 : Valeur minimale et valeurs de zone stochastique du kit PowerPlex® ESI 16 system selon la validation interne du laboratoire d'identification génétique de l' <i>INCC</i>	33
Figure 18 : Profil génétique complet obtenu à partir de la co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit PowerPlex® ESI 16 system.....	36
Figure 19 : Profil génétique d'allelic ladder du kit PowerPlex® ESI 16 system.....	38
Figure 20 : Profil génétique partiel obtenu à partir de l'échantillon C3 après la co-amplification des 16 marqueurs inclus dans le kit PowerPlex® ESI 16 system	39
Figure 21 : Profil génétique complet de contrôle positif (0,5ng) obtenu après la co-amplification à 29 cycles des 16 marqueurs inclus dans le kit PowerPlex® ESI 16 system. ..	40
Figure 22 : Profil génétique nul de contrôle négatif obtenu après la co-amplification à 29 cycles des 16 marqueurs inclus dans le kit PowerPlex® ESI 16 system.	41
Figure 23 : Exemples de la première ligne des profils génétique obtenus après 3 lavages.....	43
Figure 24 : Exemples de la première ligne des profils génétique obtenus après 4 lavages.....	45
Figure 25 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois, amplifiés avec 29 cycles de PCR	46
Figure 26 : Graphe de nuage de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 3 fois et amplifiés à 29 cycles de PCR	48
Figure 27 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 4 fois, amplifiés avec 29 cycles de PCR	49
Figure 28 : Graphe de nuage de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés à 29 cycles de PCR	49
Figure 29 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois, amplifiés avec 28 cycles de PCR	50
Figure 30 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 3 fois et amplifiés à 28 cycles de PCR	50
Figure 31 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 4 fois, amplifiés avec 28 cycles de PCR	51

Figure 32 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés à 28 cycles de PCR	51
Figure 33 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois, amplifiés avec 27 cycles de PCR	52
Figure 34 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 3 fois et amplifiés à 27 cycles de PCR	52
Figure 35 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 4 fois, amplifiés avec 27 cycles de PCR	53
Figure 36 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés à 27 cycles de PCR	53
Figure 37 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois, amplifiés avec 26 cycles de PCR	54
Figure 38 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 3 fois et amplifiés à 26 cycles de PCR.....	54
Figure 39 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 4 fois, amplifiés avec 26 cycles de PCR	55
Figure 40 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés à 26 cycles de PCR	55
Figure 41 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois, amplifiés avec 25 cycles de PCR	56
Figure 42 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 3 fois et amplifiés à 25 cycles de PCR.....	56
Figure 43 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 4 fois, amplifiés avec 25 cycles de PCR	57
Figure 44 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés à 25 cycles de PCR.....	57
Figure 45 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois, amplifiés avec 24 cycles de PCR	58

Figure 46 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 3 fois et amplifiés à 24 cycles de PCR.....	58
Figure 47 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 4 fois, amplifiés avec 24 cycles de PCR	59
Figure 48 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés à 24 cycles de PCR.....	59
Figure 49 : Graphique des moyennes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN amplifiés avec 29 cycles de PCR.....	60
Figure 50 : Graphique des moyennes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN amplifiés avec 28 cycles de PCR.....	60
Figure 51 : Graphique des moyennes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN amplifiés avec 27 cycles de PCR	61
Figure 52 : Graphique des moyennes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN amplifiés avec 26 cycles de PCR	61
Figure 53 : Graphique des moyennes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN amplifiés avec 25 cycles de PCR	61
Figure 54 : Graphique des moyennes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN amplifiés avec 24 cycles de PCR.....	62
Figure 55 : Graphe de nuage de points sur le plan factoriel (1,2) : série d'échantillons lavés 3 fois au tampon TE	63
Figure 56 : Graphiques des moyennes des hauteurs de pics pour chaque marqueur amplifiés à différents cycles (échantillons à 3 lavages).....	66
Figure 57 : Graphe de nuage de points sur le plan factoriel (1,2) : série d'échantillons lavés 4 fois au tampon TE	68
Figure 58 : Graphiques des moyennes des hauteurs de pics pour chaque marqueur amplifiés à différents cycles (échantillons 4 lavages)	71
Figure 59 : Exemple de la première ligne de profils génétique, du père présumé, obtenu en utilisant le protocole standard (3 lavages/ 29 cycles).....	76

Figure 60 : Exemple de la première ligne de profils génétique, de la mère, obtenu en utilisant le protocole standard (3 lavages/ 29 cycles)..... 76

Figure 61 : Exemple de comparaison entre les marqueurs de la première ligne de l'électrophorégramme (enfant, mère et père présumé) 77

Liste des tableaux

Tableau I : Les rendements typiques de l'ADN extrait de divers matériaux biologiques	8
Tableau II: Répartition des tubes identifiés pour les 60 ADN.	22
Tableau III: Les étapes des lavages effectués pour les 60 échantillons d'ADN	24
Tableau IV: Réactifs de kit PowerPlex® ESI 16 system	26
Tableau V: Composition du milieu réactionnel et volume des différents réactifs utilisés (pour un volume PCR final de 25 µl).....	27
Tableau VI: Tableau des valeurs propres	57
Tableau VII: Tableau de comparaison entre les allèles du père présumé, la mère et l'enfant dans le cadre d'un test de paternité.	88

Liste des abréviations et des acronymes

A :	Adénosine
ABI :	Applied Biosystems
ABO :	Groupe sanguin ABO
ACP :	Analyse en Composantes Principales
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNmt :	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADNnu :	Acide désoxyribonucléique nucléaire
AMEL :	Amélogénine
ANOVA :	Analysis of variance
ARN :	Acide ribonucléique
C :	Cytosine
C° :	<i>degré Celsius</i>
Ca²⁺ :	Calcium
CCD :	Charge Coupled Device
cm :	Centimètre
dATP :	desoxy-adénosine triphosphate
dCTP :	desoxy- cytosine triphosphate
dGTP :	desoxy- guanosine triphosphate
dNTP :	desoxynucleoside triphosphate
dTTP :	desoxy- timine triphosphate
EC :	Électrophorèse Capillaire
éch :	Échantillon
EDNAP :	« European DNA Profiling group »
EDTA :	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ENFSI :	« European Network of Forensic Science Institutes »
ESI :	« European Standard Investigator »
F :	Facteur
FBI :	« <i>Federal Bureau of Investigation</i> »
FTA :	Fitzco/Flinder Technology Agreement
G :	Guanine

HV1 :	Hyper-variable regions 1
HV2 :	Hyper-variable regions 2
ID:	Identifiant
INCC:	« Institut National de Criminalistique et de Criminologie »
KV :	kilo volt
LINE	Long Interspersed Element
mg :	milligramme
ml :	millilitre
mm :	<i>millimètre</i>
mn :	minute
n :	nombre
ng:	nano-gramme
OL :	Off Ladder
pb :	paire de bases
PCR :	Polymerase Chain Reaction
pg :	<i>picogramme</i>
pH :	<i>potentiel Hydrogène</i>
POP :	Performance Optimized Polymere
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
RFU :	Relativ Fluorescent Unit
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
sec :	seconde
SINE	Short Interspersed Elements
SNP :	Single Nucleotide Polymorphisms
STR :	Short Tandem Repeats
T :	Thymine
Taq :	<i>Thermus aquaticus</i>
TE :	Tris EDTA
UV :	<i>Ultraviolet</i>
V :	Variable
v3.0 :	Version 3
VNTR :	Variable Number Of Tandem Repeats
µm:	micro- mètre

Liste des annexes

Annexe 1 : Tableau des marqueurs co-amplifiés et leurs fluorochromes associé du kit PowerPlex® ESI 16 system

Annexe 2 : Tableau des hauteurs de pics de différents marqueurs amplifié à différents cycles par la PCR

Annexe 3 : Exemples de profils génétiques de la série 1 à 3 lavages et de la série 2 à 4 lavages

Annexe 4 : Tableau des moyennes des hauteurs de pics de différents marqueurs de la série 1 (3 lavages) à différents cycles d'amplification par PCR (29, 28, 27, 26, 25, et 24 cycles)

Annexe 5 : Tableau des moyennes des hauteurs de pics de différents marqueurs de la série 2 (4 lavages) à différents cycles d'amplification par PCR (29, 28, 27, 26, 25, et 24 cycles)

Annexe 6 : Profils génétiques du père présumé, de la mère et de l'enfant pour le test de paternité

Annexe 7 : Profils génétique de témoin positif et de témoin négatif des échantillons du père présumé et de la mère pour le test de paternité

Introduction

Pendant longtemps, les empreintes digitales considérées comme caractéristique individuelle, a été le seul moyen clé qui permettait aux enquêteurs d'identifier les victimes et les criminels en affirmant leur présence où les empreintes avaient été relevées. Cependant ; les empreintes recueillies sur une scène de crime étant rarement complètes et interprétables, donc plusieurs marqueurs génétiques ont dû être développés. Il y a eu d'abord le typage par groupe sanguin ABO, découvert par Karl Landsteiner en 1901, permettant de déterminer la probabilité de retrouver des individus ayant les mêmes caractéristiques sanguines [Coquoz et Taroni, 2006]. Mais ce caractère n'était pas assez fiable. C'est pourquoi une analyse des enzymes de globules rouges et des protéines sériques a été rajoutée afin d'augmenter la valeur probante des expertises biologiques [Souiden et al., 2007]. Le principal désavantage de ces marqueurs était leur dégradation rapide. En fait, selon l'âge et la taille des taches du sang trouvées sur une scène de crime, peu ou pas d'informations peuvent être obtenues en raison de la grande sensibilité de ces marqueurs à la contamination bactérienne menant à des faux positifs. En outre ces méthodes ont un très faible pouvoir de discrimination [Taupin, 2013].

Depuis des quelques années, une technique encore plus révolutionnaire apparaît, la technique d'analyse d'ADN aussi appelée Empreinte génétique [Doutremepuich, 2012], qui permet à partir d'une quantité infime de matériel biologique de procéder à l'identification d'un individu. Donc la possibilité de « faire parler » un ADN inconnu, qui présente le support du patrimoine génétique spécifique à chaque individu [Furkel, 2004]. À l'exception des vrais jumeaux qui possèdent un patrimoine génétique identique [Griffiths et Sanlaville, 2001]. L'empreinte génétique a été décrite pour la première fois en 1985 par le généticien anglais Alec Jeffrey qui démontra que l'ADN contenait des séquences qui se répétaient, et surtout, ce nombre de répétitions variait d'une personne à l'autre en étant transmis par voie mendélienne aux enfants [Doutremepuich, 2012].

Une autre révolution a permis de donner un formidable essor au domaine de l'identification par ADN, et ce par la mise en place de la de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) qui permet l'amplification sélective d'un fragment-cible d'ADN en millions d'exemplaires. La contrainte quantitative devenant alors caduque puisque 1000 fois moins d'ADN que la méthode de Southern devenait nécessaire. La PCR fut alors utilisée pour amplifier des séquences microsatellites (STR pour *Short Tandem Repeats*), dont la variabilité du nombre de répétitions restait le support de l'identification et des tests de paternité [Butler, 2005].

Les analystes des laboratoires judiciaires procèdent aujourd'hui à l'amplification simultanée de plusieurs STRs en utilisant différents kits commerciaux. Le laboratoire d'identification génétique de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie *INCC* de la gendarmerie nationale procède par exemple à l'utilisation du kit PowerPlex® ESI 16 system. En outre, pour l'analyse des échantillons de référence (sang) provenant d'individus connus, plusieurs techniques sont actuellement mises en œuvre afin d'extraire l'ADN en toute sécurité qualitativement et quantitativement telle que la technologie des cartes FTA® qui permet la lyse des membranes des cellules déposées et de leurs organelles suivie du largage des acides nucléiques directement sur le papier traité. Toutefois la complexité de cette dernière s'introduit dans la quantité d'ADN présente dans le punch FTA® ainsi que de sa qualité qui est influencée par la présence de l'hémoglobine, un principal inhibiteur de la PCR [Butler, 2011]. En effet les profils génétiques obtenus en utilisant le protocole standard du kit PowerPlex ESI® 16 system pour le génotypage d'ADN extrait sur cartes FTA® à partir du prélèvement du sang présente une forte saturation qui s'exprime par l'abondance des artéfacts qui interfèrent avec l'analyse et rend l'interprétation des résultats difficile et même des fois impossible et souvent lente.

Le protocole d'amplification présenté dans le manuel propre au kit PowerPlex® ESI 16 system a été testé par le fabricant. Cependant, pour des raisons d'assurance qualité, chaque laboratoire doit à son tour testé et validé le protocole en fonction des équipements utilisés. Donc il est nécessaire d'optimiser ces protocoles, y compris le nombre de lavages pour l'étape d'extraction et le nombre de cycles d'amplification pour l'étape de la PCR. À l'issue, une validation interne basée sur des résultats d'expériences initiées au laboratoire concerné.

Dans ce contexte, le présent travail tente d'optimiser l'extraction et réguler l'amplification d'ADN obtenu à partir des prélèvements du sang par la technologie FTA®. L'objectif final de ce travail est d'obtenir des profils génétiques exploitables en proposant d'une part un nombre adéquat pour l'étape de lavages du papier FTA® imprégné du sang. Et d'autre part, un nombre de cycles d'amplification convenable pour les STRs multiplex afin de donner des profils ADN complets et interprétables.

Chapitre I :

Étude bibliographique

I.1. EMPREINTE GÉNÉTIQUE

Empreinte génétique ou profil génétique sont des termes utilisés pour la dénomination de la technique d'identification par l'analyse d'ADN. Cependant, le terme « empreinte génétique » transmet de façon exagérée une impression de certitude absolue. Il renvoie inmanquablement à l'empreinte digitale dont il a été affirmé depuis le début du 20^e siècle qu'elle avait un caractère parfaitement individuel. Or que la valeur d'un résultat d'analyse d'ADN est forcément estimée en termes statistiques. Pour cela, le terme « profil génétique » est probablement le plus adéquat, il indique bien que cette analyse détermine le contour d'une personne, sans en donner une description complète [Coquoz et Taroni, 2006].

Le profil génétique d'une personne comprend les résultats d'analyse d'une série de segments d'ADN (appelés locis, ou dans le langage des experts, systèmes), situés à des endroits bien précis de la molécule [Van, 2002]. La probabilité que deux personnes partagent le même profil génétique, compte tenu des examens auxquels il est aujourd'hui procédé, semble largement inférieure à un sur un milliard [Furkel, 2004].

La principale application déduite par les profils génétiques est la criminalistique qui regroupe :

-L'identification des corps, consiste à la recherche de personnes disparues et l'identification des victimes suite à des catastrophes naturelles ou des catastrophes d'origine humaine majeures ;

-La filiation, consiste principalement la recherche en parentés [Butler, 2010].

Avant de procéder aux processus d'établissement d'un profil génétique, il faut tout d'abord connaître les propriétés et les fonctions de l'ADN humain.

I.2. L'ADN HUMAIN : RAPPELS ESSENTIELS

L'unité de base à laquelle s'intéresse la biologie moléculaire est la molécule d'acide désoxyribonucléique, l'ADN, support de l'information génétique. C'est un complexe chimique considéré comme un programme génétique qui détermine notre caractéristique chimique et physique [Coquoz et Taroni, 2006 ; Taupin, 2013].

I.2.1. L'ADN nucléaire

L'ADN nucléaire est localisé principalement dans le noyau des cellules répartis sur 46 chromosomes. Chaque cellule somatique nucléée d'un être humain contient 23 paires de chromosomes (22 paires d'autosomes et 1 paire de chromosomes sexuels, XX pour une femme et XY pour un homme) [Mader, 2010]. Chaque paire représente un double exemplaire de l'information génétique, un exemplaire provenant du spermatozoïde (donc du père) et un autre exemplaire provenant de l'ovule (donc de la mère), les cellules somatiques sont dites diploïdes. Toutes les cellules de notre corps sont identiques génétiquement [Coquoz et Taroni, 2006]. En revanche, à l'issue de la méiose, les gamètes humains ne possèdent qu'un seul exemplaire de chaque paire (soit 22 autosomes + le chromosome X dans l'ovule, soit 22 autosomes + le chromosome X ou Y dans le spermatozoïde), les cellules germinales sont dites haploïdes [Larsen, 2003].

Chacune de nos cellules, contient environ deux mètres d'ADN qui est encastré dans le noyau, mais sur ces deux mètres deux centimètres seulement sont consacrés aux gènes. Notons que les gènes ne codent pas seulement des protéines, mais aussi des ARN particuliers qui ne seront pas traduits (ARN ribosomique, ARN de transfert, micro ARN...). Près de 99% de notre génome est donc de l'ADN non codant [Raven et al., 2010 ; Merlin, 2014].

I.2.2. L'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial est localisé principalement dans la mitochondrie. Le génome mitochondrial ne s'hérite pas selon la loi de Mendel ; il ne se transmet que par la mère. Il est présent à de multiples exemplaires dans chaque cellule [Keyser et al., 2013]. Cette caractéristique est d'un grand intérêt dans le domaine de la criminalistique. En effet l'analyse de l'ADN mitochondrial pourrait bien être une solution de secours dans le cas où l'ADN nucléaire est en quantité insuffisante [Coquoz et Taroni, 2006].

L'ADNmt est composé que des exons. Il contient seulement deux régions non codantes : la région de contrôle connue sous le nom de « D-loop » et la région V. Deux régions très polymorphes, contenant dans la région de contrôle non codante, sont particulièrement importantes pour l'analyse médico-légale : HV1 et HV2. L'analyse de ces deux régions se font par séquençage, les résultats sont obtenus par comparaison avec une séquence de référence ce

qui permet d'établir des différences entre les séquences analysées et la séquence de référence [Primorac et Schanfield, 2014 ; Doutremepuich, 2012].

I.3. POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE

Quelque soit leur localisation dans la cellule, les molécules d'ADN sont instables et accumulent des variations au cours du temps. Ces variations se regroupent sous le nom du polymorphisme (grec : *poly* pour plusieurs, *morfoma* pour forme) qui désigne l'ensemble des différences existant à un même locus entre individus d'une même population. Généralement, ces variations sont considérées comme des polymorphismes génétiques à partir du moment où elles sont représentées à une fréquence de plus de 1 % dans la population. Il est possible d'identifier des polymorphismes de l'ADN à différentes échelles, chacun révélant un niveau différent de variabilité [Farce, 2000].

I.3.1. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) résulte de variations individuelles de la localisation de sites de restriction pour une enzyme donnée. Il peut être dû à une création ou une suppression d'un site de restriction. Ces polymorphismes sont révélés par la méthode du Southern blot après digestion enzymatique de l'ADN extrait afin d'observer, grâce à leur reconnaissance par une sonde marquée, des fragments différents par leurs longueurs [Petkovski, 2006].

I.3.2. Polymorphismes de répétition

Environ 50% de notre génome est constitué de séquences répétitives. Elles sont de taille variable, constituées de répétitions d'un motif unitaire plus ou moins long [Merlin, 2014].

Ces dernières présentent une caractéristique précieuse dans le domaine de la criminalistique du fait qu'elles sont le siège d'un considérable polymorphisme. En effet, le nombre de répétitions de chaque motif en un locus donné varie d'une personne à l'autre [Coquoz et Taroni, 2006].

Pour chacun de ceux-ci, un individu possède deux allèles qu'ils sont transmis de façon stable selon la loi mendélienne aux enfants.

Selon le nombre plus ou moins élevé de bases dans chaque unité répétée, on distingue les satellites, les minisatellites et les microsatellites [Merlin, 2014].

a) Satellites

Les satellites sont composés de répétition à un très grand nombre de fois de motif de quelques centaines de nucléotides (de l'ordre de 500 000 à 1 000 000). Ils peuvent être trouvés autour des centromères des chromosomes. On distingue deux formes :

-Les séquences SINE (*Short interspersed elements*), contenant 100 à 300 nucléotides.

-Les séquences LINE (*Long interspersed element*), contenant 5 à 7 000 nucléotides [Merlin, 2014].

b) Minisatellites

Les minisatellites, également appelés VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) [Gilliquet, 2009] comportent 10 à 100 pb et forment des groupes assez volumineuses comprenant jusqu'à 3000 répétitions. Ils sont instables et le nombre d'exemplaires d'une séquence donnée change souvent d'une génération à l'autre suite à des recombinaisons méiotiques (*crossing-over*) inégales et des conversions génétiques [Karp, 2010].

c) Microsatellites

Les microsatellites, aussi nommées STR (*Short Tandem Repeats*) [Gilliquet, 2009] sont des séquences courtes d'une longueur de 1 à 5 paires de bases, forment typiquement des petits groupes d'environ 10 à 40 pb, dispersés assez uniformément dans le génome [Karp, 2010].

Le génome humain contient environ 50000 microsatellites dont chacun est localisé sur un locus précis et identifiable chez tous les individus. Les STRs sont hautement polymorphes dans la population en raison du brassage génétique qu'ils subissent, mais restent stables pour un même individu [Fernandez et al., 2006].

Selon leurs motifs, les STRs sont classés en trois catégories :

- **Les répétitions « simples »** : contiennent des unités de même séquence et longueur ;
(ex : motif [AATG] du locus TPOX)
- **Les répétitions « composées »** : comprennent au moins 2 unités "simples" adjacentes ;
(ex : [AGAT],[TCTA] du locus D3S1358).
- **Les répétitions « complexes »** : se composent d'unités répétitives différentes et de longueur variable avec diverses séquences intercalées entre les blocs ; (ex : [TTTC]³ TTTTTTCT [CTTT]ⁿ CTCC [TTCC]² pour le locus FGA) [El Ossmanil et al., 2007].

I.3.3. Polymorphismes d'un seul nucléotide (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

Les SNPs ou les polymorphismes d'un seul nucléotide (*single nucleotide polymorphisms*) sont la forme la plus fréquente de variation génétique chez l'homme. Ce sont des polymorphismes portant sur un seul nucléotide. Il s'agit de mutations germinales présentes aussi bien dans les régions codantes que dans les régions non codantes : séquences intergéniques, régions 3' ou 5' non traduites, régions introniques et aussi dans les sites de fixation des facteurs de transcription [Korzeniewski et al., 2013]. Elles sont présentes dans l'ADN nucléaire et aussi dans l'ADN mitochondrial [Keyser et al., 2013].

Il y a plus d'un million de SNPs dans le génome humain, dont plusieurs constituent des polymorphismes distincts et peuvent être génotypés en utilisant des méthodes peu coûteuses et rapides ce qui est utile dans les tests médico-légaux. Cependant, ces derniers sont limités dans leur variabilité. En fait, il ne peut y avoir que quatre allèles possibles pour chaque SNP, car on ne peut avoir que soit un A, C, G, T dans cette position nucléotidique [Michaelis et al., 2011].

Deux applications principales s'en déduisent par l'analyse des SNPs : L'estimation de l'origine ethnique d'une personne et la détermination d'apparences morphologiques. Ces analyses représentent des aides à l'enquête car elles peuvent prédire : la couleur de la peau, la couleur des yeux, la couleur des cheveux,... [Doutremepuich, 2012].

I.4. L'ÉTABLISSEMENT D'UN PROFIL GÉNÉTIQUE

I.4.1. Source d'ADN

Le profil génétique peut être établi à partir :

- Des traces (échantillon de cellules humaines trouvé sur une scène de crime)
- Des prélèvements de référence (échantillon de cellules humaines prélevé sur des personnes connues) [Van, 2002]

Avant de procéder à l'analyse d'ADN, il est assez important de connaître le type d'échantillon prélevé car le choix de la technique d'extraction d'ADN ainsi que sa réussite dépend principalement de la quantité et de la qualité de cette molécule dans un échantillon biologique donné. La quantité du matériel génétique varie en fonction de la densité de cellules nucléées dans les différents liquides biologiques. Les rendements typiques d'ADN extrait de divers matériaux biologiques sont indiqués dans le tableau I.

Tableau I. Les rendements typiques de l'ADN extrait de divers matériaux biologiques [Butler, 2011]

Type d'échantillon	Quantité d'ADN
Sang liquide	20 000ng/ mL à 40 000ng/ mL
Sperme liquide	150 000ng/ mL à 300 000ng/ mL
Poil (avec la racine)	1ng/ racine à 750ng/ racine
Salive liquide	1000ng/ mL à 10 000ng/ mL
Os	3ng/ mL à 10ng/ mL
Tissus	50ng/ mg à 500ng/ mg

I.4.2. Extraction d'ADN

Tout échantillon biologique obtenu à partir d'une scène de crime ou un échantillon provenant d'un individu connu, contient un certain nombre de substances autre que l'ADN. Les protéines qui empaquettent l'ADN dans l'environnement cellulaire peuvent inhiber la capacité de son analyse. Le but du processus d'extraction d'ADN est typiquement de lyser des cellules pour

libérer les molécules d'ADN de tout autre matériel cellulaire et de l'isoler dans un format compatible avec les applications en aval, y compris l'amplification par PCR.

I.4.2.1. Extraction par carte FTA®

L'extraction d'ADN par la technologie des cartes FTA®, fut initialement développée à la fin des années 1980 par Lee Burgoyne à l'Université de Flinders en Australie comme une méthode pour l'extraction et le stockage de l'ADN. FTA signifie à l'origine "*Fitzco/Flinder Technology Agreement*". FTA® est une chimie brevetée de la société *Whatman*. Cette chimie permet la lyse des membranes des cellules déposées et de leurs organelles suivie du largage des acides nucléiques directement sur le papier traité. Ces derniers restent enchâssés et protégés dans les fibres du support sans utiliser de procédés d'extraction supplémentaires (figure 1). Cette carte contient aussi des substances chimiques permettant de protéger les acides nucléiques des attaques fongiques et de la dégradation enzymatique ou oxydative ; et de les préserver de la croissance bactérienne et virale. En conséquence, l'ADN sur ce papier peut être conservé durant plusieurs années à température ambiante [Butler, 2011 ; Funel et al., 2010].

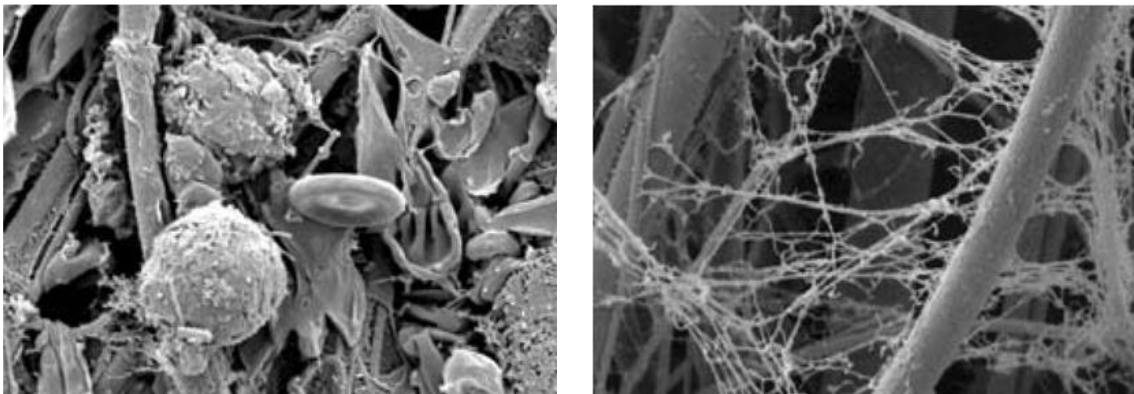


Figure 1 : Vue en microscopie électronique d'une portion d'un dépôt de sang sur un support FTA® **a** - dépôt frais de sang (1500 X); **b** - dépôt de sang sur une carte FTA® après un lavage au réactif FTA (10000 X). Source : *Whatman*

La technologie FTA® présente plusieurs avantages :

- Une seule carte peut être réutilisée pour obtenir plusieurs poinçons pour l'amplification et le typage séquentiel de l'ADN ;
- En raison de ses capacités de conservation et de stockage, ces cartes sont actuellement les plus utilisées pour la collecte généralisée de preuves sur les lieux des crimes sans aucun investissement lourd pour le stockage ;
- Le temps de traitement des échantillons pour isoler l'ADN est de 15 à 30 minutes, ce qui évite les procédures d'isolation longues à étapes multiples.

Malheureusement, en raison des effets électrostatiques, les poinçons à papier sec risquent de sauter entre les puits dans une plaque de micro-tube contenant des échantillons [Butler, 2011].

I.4.3. Amplification par PCR

I.4.3.1. Principe

La PCR est une réaction enzymatique basée sur un principe simple : on utilise deux amorces complémentaires des deux brins d'une séquence d'ADN, orientées l'une vers l'autre, quand l'ADN polymérase fonctionne sur ces amorces et sur la séquence d'intérêt, les amorces des brins complémentaires à la matrice sont néo-synthétisés, chaque nouveau brin contenant une amorce. Quand on répète ce mécanisme, on obtient une grande quantité de séquences correspondant à l'ADN situé entre les deux amorces [Raven et al., 2010].

I.4.3.2. Étapes de la PCR

Le processus d'amplification d'ADN par PCR est composé d'une série de cycles identiques et successifs (environ 30 cycles en général). Chaque cycle implique 3 étapes à températures différentes. La figure 2 présente le principe général de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

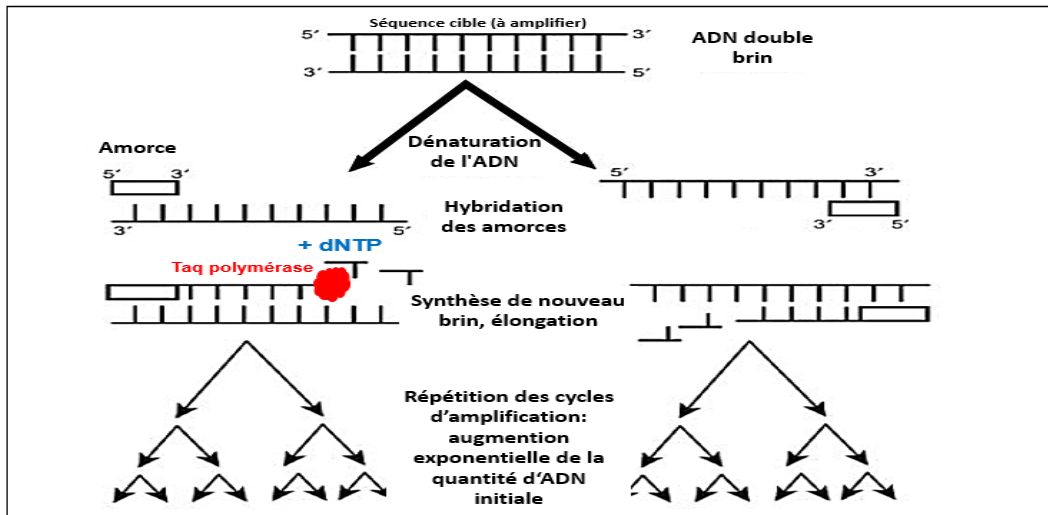


Figure 2 : Principe général de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) [Butler, 2011]

Les cycles de températures sont précédés par un choc thermique (appelé « *hold* ») à haute température (environ 95°C) pour activer les ADN polymérase. En fait, lors de la préparation des réactifs dans le micro-tube à température ambiante, les amorces pourraient s'hybrider de façon non spécifique et l'ADN polymérase pourrait commencer son activité à ces positions non spécifiques avant le démarrage de la PCR.

Afin d'éviter ces phénomènes, l'ADN polymérase (AmpliTaq Gold DNA polymerase) fournis dans les kits commerciaux actuellement utilisés par les laboratoires des analyses médico-légales est maintenu sous forme inactive par la formation d'un anhydride. Lors du chauffage à 95°C la hausse de température abaisse suffisamment le pH pour activer cette enzyme. Le pH de la solution tampon de la PCR varie en fonction de la température (le pH de la solution descend avec 0,02 à chaque 1 °C) et par la suite cette forte température cause des modifications au niveau des groupements amines des résidus lysine de l'enzyme, permettant son activation [Coquoz et Taroni, 2006 ; Butler, 2011].

Cette première étape est suivie de **n** cycle. Chaque cycle comprend les trois étapes suivantes allant de quelques dizaines de secondes à quelques minutes :

Dénaturation : au cours de cette étape la solution de la réaction est chauffée au-dessus de point de fusion des deux brins d'ADN cible (environ 94°C), ce qui permet de séparer les deux brins d'ADN complémentaires suite à la rupture des liaisons non covalentes (ponts hydrogènes) entre les bases appariées.

Hybridation : au cours de cette étape la température est abaissée (entre 40 et 70°C) ce qui permet aux liaisons hydrogène de se reformer entre les amorces et leurs séquences complémentaires d'ADN cibles. La longueur et la composition en nucléotides des amorces contribuent à la spécificité de la liaison à la séquence cible. D'une part, les paires G-C sont plus stables que les paires A-T. D'autre part, plus une amorce est longue, plus la probabilité qu'elle soit unique dans le génome est grande [**Garibyan et Avashia, 2013 ; Iglesias, 2009**].

La spécificité de ces amorces est ainsi fortement définie par la température, donc cette étape se déroule à une température bien déterminée et suffisamment élevée pour garantir une hybridation parfaite entre l'amorce et la séquence d'ADN cible [**Coquoz et Taroni, 2006**].

Élongation : au cours de cette étape la température est élevée à nouveau (environ 72°C) ce qui permet à l'ADN polymérase d'étendre les amorces donc de synthétiser un nouveau brin complémentaire au brin matrice en ajoutant des désoxynucléosides triphosphates complémentaires en direction 5'-3' qui rejoint le groupe 5' phosphate du dNTP avec le groupe 3' hydroxyle à l'extrémité du brin d'ADN en croissance [**Garibyan et Avashia, 2013 ; Iglesias, 2009**].

À la fin des cycles, un autre cycle final d'élongation est rajouté. Ce cycle est utile pour que l'ADN polymérase puisse terminer son élongation. Il faut savoir que la Taq polymérase tend à ajouter un nucléotide (Adénosine) à l'extrémité 3' de la séquence amplifiée, malgré l'absence de nucléotide en vis-à-vis sur le brin modèle. Lorsque l'ADN polymérase ne réussit pas à rajouter ce nucléotide sur tous les brins en construction, à cause d'un excès d'ADN initial ou par inhibition, un fragment plus petit d'une paire de base est obtenu. Le résultat obtenu sur le graphique de l'analyseur de fragments est la présence de deux pics séparés par une seule paire de base. Ce phénomène porte le nom d'addition A incomplète [**Iglesias, 2009**].

I.4.3.3. Amplification des STRs

Les limites de la taille imposée par la PCR ont attiré l'attention sur la classe des séquences répétitives courtes, les STRs, ces séquences de taille en générale inférieurs à 500 pb de longueur, leur permet d'être des cibles clés pour la PCR, de plus cette classe est extrêmement vaste donc elle présente une source quasi inépuisable de polymorphisme [**Coquoz et Taroni, 2006**]. Depuis l'introduction de la PCR, des progrès étonnants ont été réalisés. Aujourd'hui, les microsatellites sont analysés par PCR en utilisant des amorces marquées par des fluorophores

et séparé puis détectés par électrophorèse capillaire. L'analyse des STRs peut maintenant être effectuée rapidement et efficacement par différents types de kits commerciaux disponibles qui permettent l'analyse simultanée de multiples loci STRs, dénommé STR multiplexage (figure 3), ainsi que celle du gène de l'amélogénine afin de révéler le sexe de la personne à l'origine de l'échantillon [Butler, 2005].

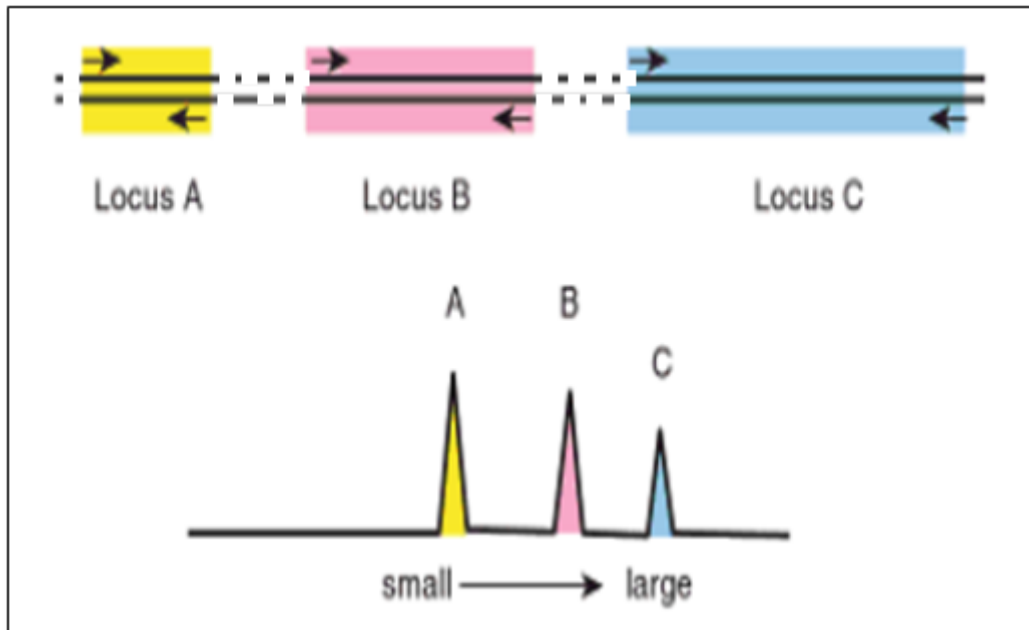


Figure 3 : Schéma de la PCR multiplex [Butler, 2005]

a) Marqueurs de base et STRs communs

Pour que le typage d'ADN soit efficace sur plusieurs territoires judiciaires, un ensemble commun de marqueurs standardisés sont actuellement utilisés. Quelques d'autres nouveaux marqueurs peuvent être ajoutés pour augmenter la discrimination, ces derniers varient d'un laboratoire à un autre. il existe 13 locus communs (figure 4) [Butler, 2011].

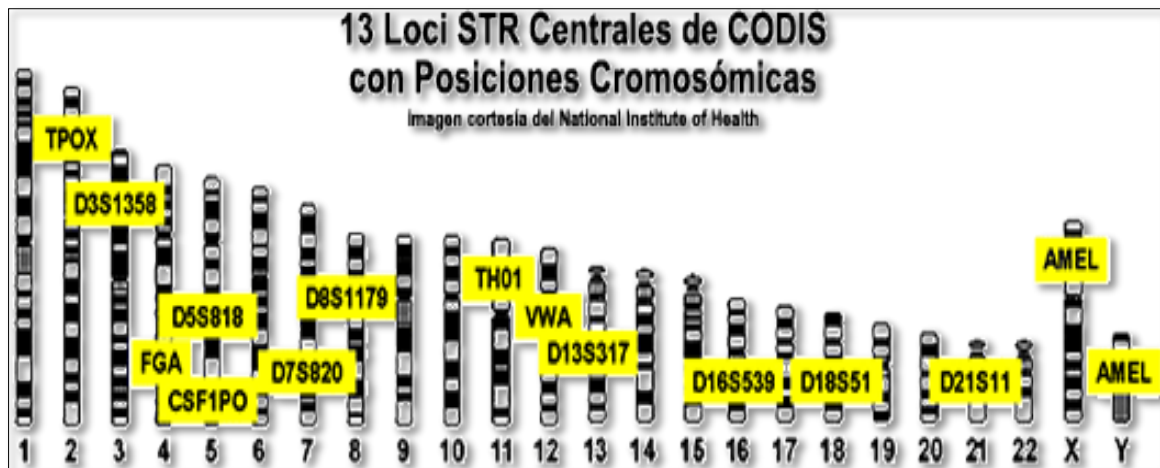


Figure 4 : Les 13 loci communs analysés sur les autosomes plus l'amélogénine [Principles of Forensic DNA for Officers of the Court]

b) Détermination du sexe

Le marqueur habituellement analysé pour déterminer le sexe de la personne à l'origine d'échantillon biologique étudié est le locus d'amélogénine. Ce n'est pas un STR. Il se situe dans le premier intron du gène qui code pour la protéine Amélogénine, protéine présente dans l'émail dentaire. Ce gène est présent sur X et sur Y, mais au niveau du locus du marqueur il y a une délétion de 6 pb sur X. En fait, le gène sur le chromosome X est de 106 pb, et sur le chromosome Y est de 112 pb. Donc, après l'amplification par la PCR des fragments d'ADN de deux longueurs différentes peuvent être générés. Un seul pic pour AMEL X est obtenu si l'ADN est fourni par une femme et deux pics distincts (pour AMEL X et AMEL Y) sont obtenus si l'ADN est fourni par un homme (figure 5) [Primorac et Schanfield, 2014 ; Manuel technique Promega, 2014].

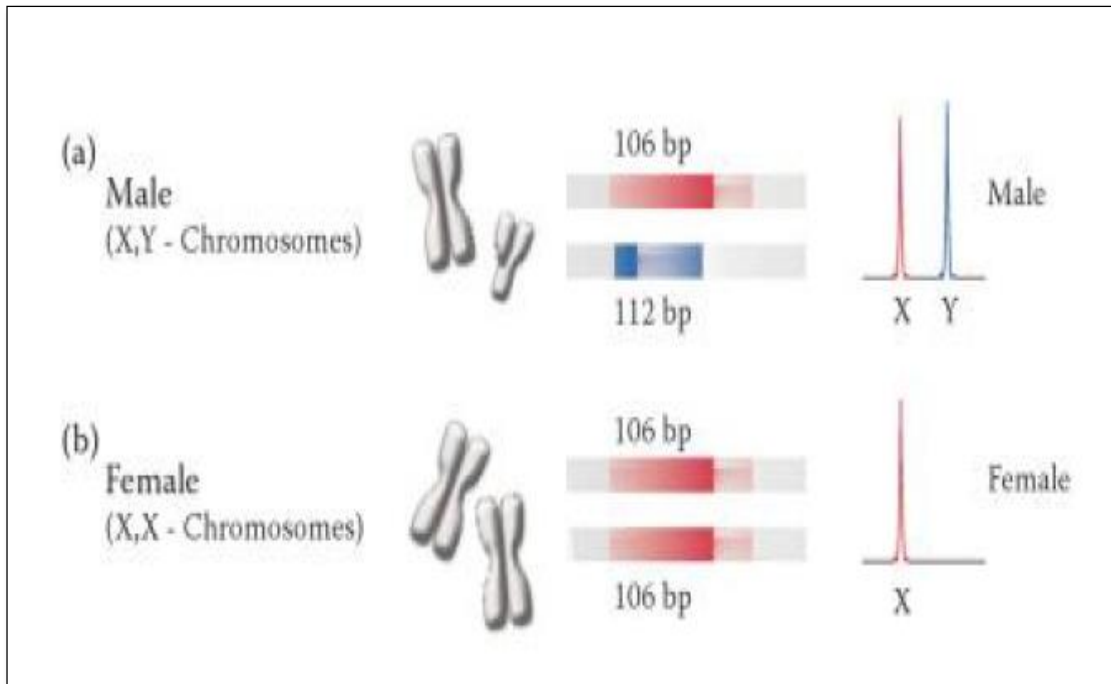


Figure 5 : Schéma du locus mâle (a) et femelle (b) d'amélogénine sur les chromosomes X et Y, et au niveau d'électrophorégramme [Primorac et Schanfield, 2014]

I.4.4. Séparation et détection

L'utilisation de l'électrophorèse capillaire s'est imposée comme un appareillage clé dans le processus analytique d'une analyse ADN, supplantant l'électrophorèse sur gel des acides nucléiques.

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique qui permet la séparation des produits de PCR sous l'influence d'un champ électrique selon leur rapport charge/masse. Les séparations se font dans un capillaire en verre très fin de 20 à 200 μm de diamètre, permettant ainsi de réguler facilement la température qui est maintenue constante (à 65°C) et d'utiliser des tensions électriques très élevées.

La longueur du capillaire peut varier de 20 à 200 cm. Il est revêtu à l'intérieur de silice fondue recouverte d'un gel. Ce gel est composé d'une solution visqueuse « polyamide ». Le capillaire, enfermé dans un système de thermostatisation, est rempli de tampon et plongé dans deux réservoirs contenant cette même solution. Chaque réservoir est connecté à une électrode reliée à un générateur de courant. Grâce à l'application d'un champ électrique très élevé, les produits

de PCR entrent dans les capillaires par une injection dite électrocinétique, puis se déplacent du pôle négatif (cathode) vers le pôle positif (anode) du circuit électrique. Les petites molécules d'ADN migrent plus facilement tandis que les grosses molécules sont retardées dans leur migration. Les amplifiants passent devant une fenêtre optique où la détection s'effectue. La détection est assurée par une mesure de fluorescence après excitation par un laser (figure 6) [Cotton et al.; 2005].

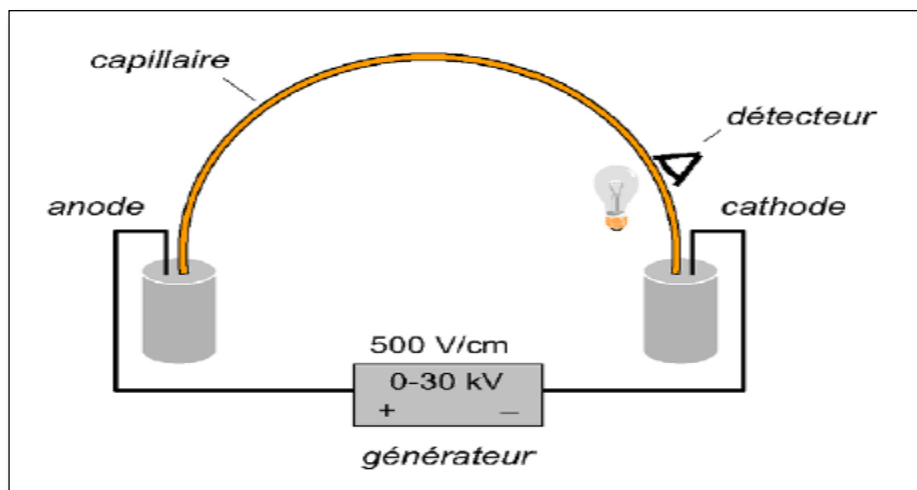


Figure 6 : Représentation schématique d'un appareillage de l'électrophorèse capillaire [Cotton et al., 2005].

I.4.5. Traitement des données et validation des résultats

Les signaux fluorescents subissent une décomposition spectrale (prisme) et chaque faisceau est capté par une caméra CCD (*Charge Coupled Device*) qui transforme les signaux lumineux en signaux électriques qui seront collectés par le logiciel "Data Collection" (figure 7) [Butler, 2011].

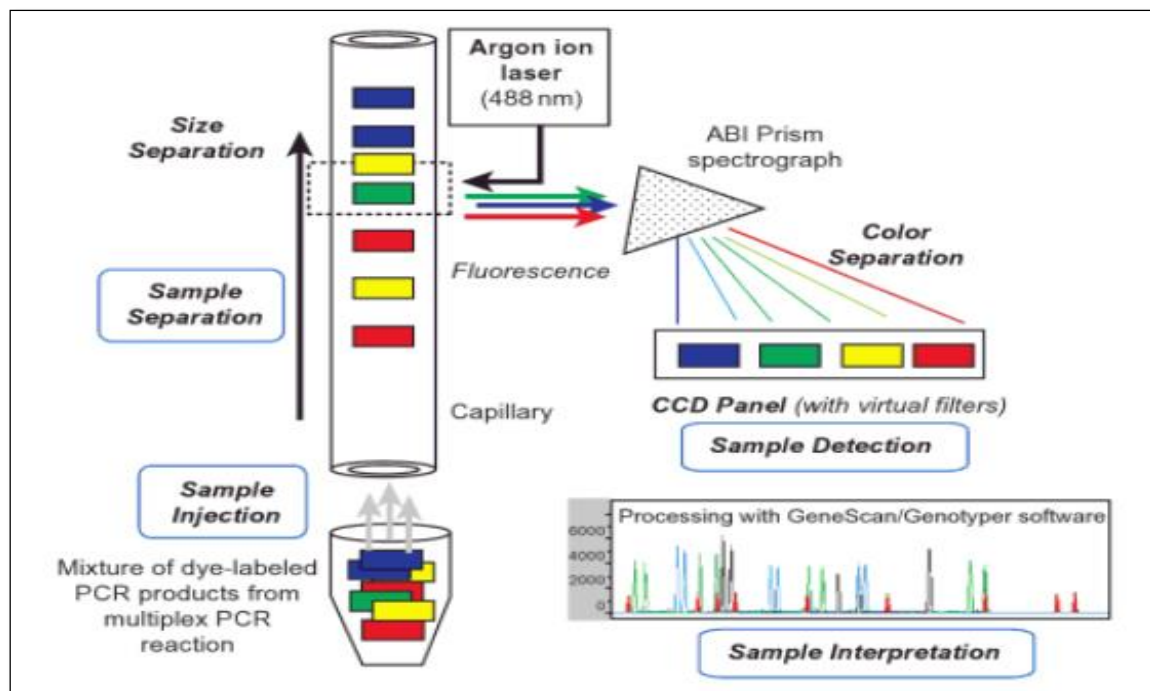


Figure 7 : Schéma de la séparation et la détection des STRs par le séquenceur ABI Prism
 [Butler, 2011]

Le traitement des données collectées se fait par des logiciels développés ("GeneMapper", par exemple) qui permet dans un premier temps d'assigner une taille aux fragments identifiés en les comparant avec le standard de taille. Ce dernier est une échelle de taille comportant des fragments d'ADN synthétiques de tailles connues.

En second, chaque allèle est identifié d'une manière très spécifique en le comparant avec une échelle allélique (le ladder) qui contient un maximum d'allèles probablement trouvés pour chaque marqueur dans la population humaine. Cette échelle permet d'attribuer le nombre allélique approprié aux fragments d'ADN d'après leurs tailles (pb) et le fluorochrome associé.

I.4.5.1. Paramètres de lecture du logiciel de traitement des données

Afin de filtrer correctement les artefacts qui peuvent interférer avec l'analyse des résultats, il est nécessaire de modifier les plages d'analyse « *Analysis Ranges* » par défaut dans les paramètres de chaque logiciel d'analyse de données de manière à respecter les conditions d'analyse spécifiques au kit d'amplification utilisé.

Le seuil d'amplitude des pics (valeur seuil) correspond à la hauteur minimale de pic à laquelle le logiciel d'analyse de données peut considérer le signal observé comme fiable et l'enregistrer comme un pic. Cela dépendra du kit utilisé, des conditions de migration, et de l'analyseur génétique utilisé. La valeur d'amplitude seuil de pics est généralement 50 RFU. Mais cette valeur peut changer d'un laboratoire à un autre sur la base des expériences de validation interne. Quand la quantité d'ADN initiale est très faible ($\leq 100\text{pg}$) un phénomène connu sous le nom de fluctuation stochastique peut se produire. Les pics avec une hauteur en unité relative de fluorescence au-dessus de 50 RFU mais situé dans la zone stochastique (50-150 RFU) peuvent fausser les résultats car le risque de la perte d'allèle (droup out) ou d'apparition de nouveaux allèles (drop in) à cette plage est très élevé.

Une fois les paramètres réglés puis les données traitées, un résultat final sous la forme d'une série de graphiques de pics de différentes hauteurs est obtenu, correspondant chacun à un ensemble de fragments d'ADN de même taille. La hauteur des pics est indiquée par « unité fluorescente relative » (RFU).

L'électrophorégramme tracé représente ce que l'on nomme profil génétique. Selon le spectre de longueur d'ondes, chacun des fluorochromes sera représenté par une couleur. **Ce profil doit être comparé à ceux existés dans une base de données.** Cette dernière présente le répertoire informatisé qui regroupe les informations requises de tous les cas traités [Rudin et Keith, 2010].

Les pics situés en dehors des segments géniques du panel (hors *Bin*) sont étiquetés par Off Ladder (Hors échelle) (OL) (figure 8). C'est le résultat d'un signal supplémentaire qui est identifié comme un pic de l'échelle allélique en raison d'un dysfonctionnement au cours de l'électrophorèse en cas d'une saturation en ADN.

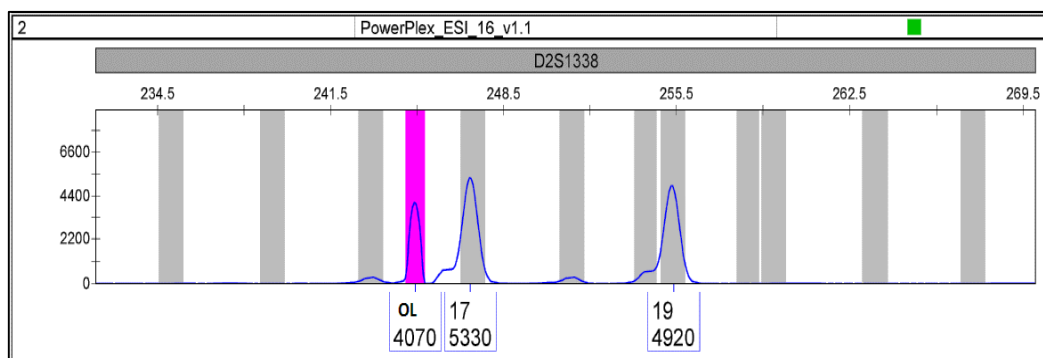


Figure 8 : Exemple des pics tracés par GeneMapper en présence des pics hors échelles

I.5. Limites de la génétique médico-légale

I.5.1. Les inhibiteurs de la PCR

Certains types d'échantillons sont très difficiles à analyser à cause de la présence d'inhibiteurs comme l'hémoglobine, la mélanine ou l'urée et les colorants des vêtements. Il peut s'agir aussi de molécules qui sont co-extraites avec l'ADN. Le mode d'action de ces inhibiteurs est variable. Certains agissent au niveau de l'étape d'extraction de l'ADN en empêchant la lyse cellulaire, d'autres entraînent une dégradation de l'ADN ou s'y lient pour rendre les brins inaccessibles pour l'enzyme d'amplification et d'autres molécules inactivent directement l'enzyme qui ne peut donc copier les différents brins [Butler, 2010].

I.5.2. Les artéfacts liés aux erreurs d'amplification

I.5.2.1. Les stutters

L'amplification des STRs par la PCR produit inévitablement des produits secondaires non désirés que l'on dénomme selon le terme anglais *stutters*. Ces produits secondaires apparaissent de façon aisément reconnaissable sur les profils ADN sous la forme d'un pic de taille réduite correspondant à un allèle ayant un élément répétitif de moins que l'allèle nominal [Coquoz et Taroni, 2006].

La figure 9 montre un exemple présentant des stutters au niveau des allèles du marqueur vWA. L'individu analysé possède 16 répétitions sur l'un des chromosomes du pair n° 12 et 18 répétitions sur l'autre. En réalité on aura à la réception des fragments de 16 et 18 répétitions pour ces allèles. Mais dans ce cas un élément répétitif a été oublié pour chaque allèle et deux nouvelles séquences réduites par une unité répétitive ont été produites, ces séquences réduites seront aussi recopiées lors des cycles de PCR suivants. Donc, à la fin du processus de génotypage deux pics principaux correspondent à 16 et 18 répétitions et deux petits pics secondaires de 15 et 17 répétitions seront décrétés.

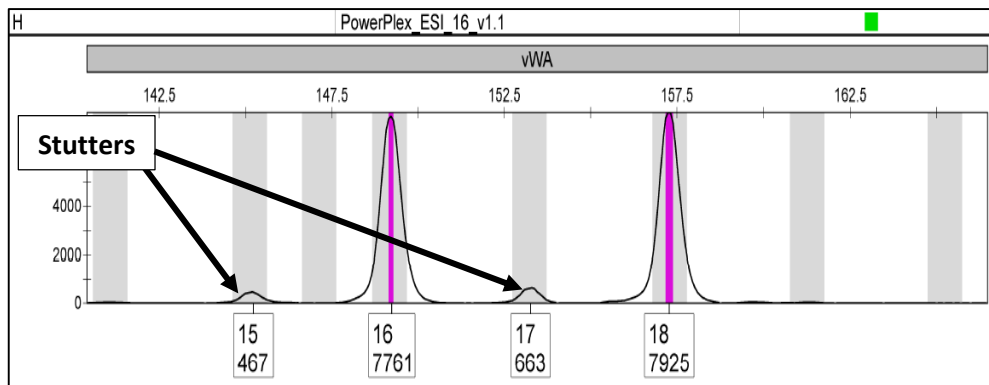


Figure 9 : Exemple des allèles du marqueur vWA présentant des stutters

Ce type d'erreur dépend de la quantité d'ADN analysée. Lorsque la quantité d'ADN est optimale, ces erreurs sont rares (moins de 1%) mais ce pourcentage augmente en cas de saturation. En fait, les stutters résultent de glissement de l'ADN polymérase sur un brin d'ADN lors de l'étape d'extension de la PCR ce qui provoque habituellement une suppression d'une unité répétitive (Parfois deux unités). Ce phénomène est causé par la grande quantité d'ADN analysé, ce qui perturbe l'activité de l'enzyme. Le recopiage du brin complémentaire à partir du brin matrice devient de plus en plus moins correcte car la réparation des erreurs lors de l'amplification n'aura pas lieu [AmpFISTR® SGM Plus® PCR Amplification Kit User Guide, 2012].

I.5.2.2. Les pul-up

Les pul-up c'est un autre type d'artéfacts qui résultent de la mauvaise séparation spectrale des produits de PCR en cas d'une quantité importante d'ADN, ce qui provoque des chevauchements lors de la détection des couleurs de fluorescence (figure 10) [Butler, 2010].

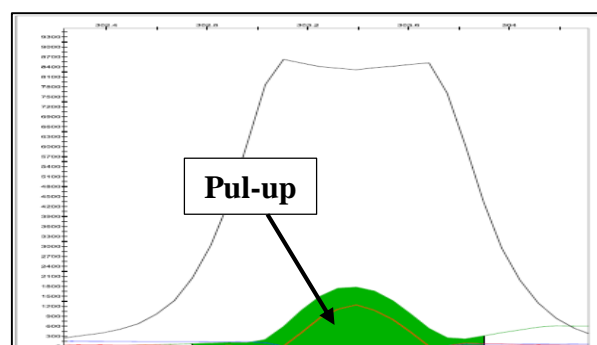


Figure 10 : Exemple d'un Pul-up

Chapitre II :

Matériel et méthodes

Le travail présenté dans cette partie a été réalisé dans le laboratoire d'identification génétique, au département de biologie légale au sein de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie *INCC*, gendarmerie nationale algérienne, localisé à *Bouchaoui*, Alger.

II.1. ÉCHANTILLON D'ADN HUMAIN

L'étude réalisée au cours de ce travail a été effectuée sur l'ADN extrait par la technologie des cartes FTA® (*whatmen*) à partir d'un prélèvement sanguin d'un donneur connu (prélèvement de référence) de sexe masculin. Le donneur a été maintenu sous forme anonyme durant toute cette étude pour des raisons éthiques. L'ADN extrait a resté stocké sur la carte protégé dans une pochette spéciale dans des conditions adaptées, à température ambiante et éloigné d'humidité. Le sang en question a été conservé dans un tube EDTA pour des utilisations ultérieures.

II.2. MÉTHODES DE TRAVAIL

Quatre étapes principales ont été réalisées lors de ce travail, chacune avec ses propres équipements, consommables, réactifs spécifiques et suivant des protocoles bien définis (figure 11). Une étape préparatoire a principalement été effectuée avant de procéder aux étapes principales.

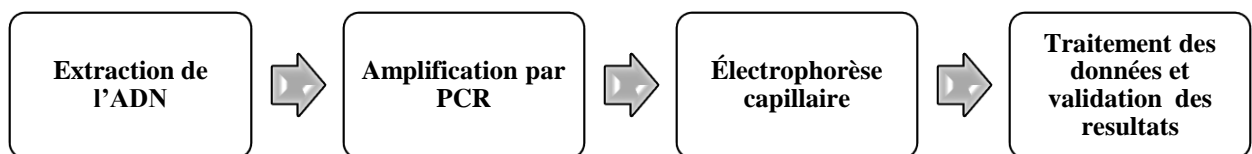


Figure 11 : Processus d'établissement d'un profil génétique

II.2.1. Extraction d'ADN par la technique FTA®

a. Préparation des échantillons

Au cours de ce travail, la technologie des cartes FTA® a été utilisée pour extraire l'ADN du prélèvement sanguin. Les cartes utilisées sont dénommées « mini-cartes FTA® ». Ces dernières possèdent deux emplacements circulaires pouvant accueillir chacun un échantillon. La zone située en bas de la carte est réservée à l'identification des différents échantillons (figure 12a).



Figure 12 : a. Mini-cadre FTA. **b.** Pochette de stockage pour la protection des cartes FTA® contre les gaz ou les liquides. **c.** Tapis de coupe et micro-poinçonneuse.

L'extraction de l'ADN par la méthode FTA® a été réalisée suivant le protocole présenté par le fabricant. D'abord, une petite quantité du sang (200µl) a été déposée au centre de chacun des deux cercles imprimés sur la carte qui est mise à sécher à température ambiante.

Une fois séchée, une étape de préparation des déchantions a été effectuée. Dans un premier temps, 60 tubes stériles de 0.2 ml ont été identifiés (étiquetés), puis répartis en deux séries chacune contenant 30 tubes (Tableau II).

Tableau II : Répartition des tubes identifiés pour les 60 ADN.

60 tubes	
Série 1 : 30 tubes	Série 2 : 30 tubes
éch ₁ , éch ₂ , éch ₃ , éch ₄ , éch ₅ , éch ₆ , éch ₇ , éch ₈ , éch ₉ , éch ₁₀ , éch ₁₁ , éch ₁₂ , éch ₁₃ , éch ₁₄ , éch ₁₅ , éch ₁₆ , éch ₁₇ , éch ₁₈ , éch ₁₉ , éch ₂₀ , éch ₂₁ , éch ₂₂ , éch ₂₃ , éch ₂₄ , éch ₂₅ , éch ₂₆ , éch ₂₇ , éch ₂₈ , éch ₂₉ , éch ₃₀	éch _A , éch _B , éch _C , éch _D , éch _E , éch _F , éch _G , éch _H , éch _I , éch _J , éch _K , éch _L , éch _M , éch _N , éch _O , éch _P , éch _Q , éch _R , éch _S , éch _T , éch _U , éch _V , éch _W , éch _X , éch _Y , éch _Z , éch _{A1} , éch _{B2} , éch _{C3} , éch _{D4}

Après l'étiquetage, une étape de mise en tube des échantillons a été effectuée comme suit :

- 50 μ L de tampon TE ont été déposés dans chaque tube de 0.2ml ;
- 60 disques (*punch*) de 1,2 mm de diamètre ont été découpé à l'aide d'une micro-poinçonneuse à partir du centre du cercle imprégné du sang, puis placé dans chaque tube ;
- Les 50 μ L de TE ont été aspirés puis éliminés à l'aide d'une micropipette.

b. Lavage

Avant de procéder à l'amplification par PCR, une étape de lavage est nécessaire pour éliminer l'hème et d'autres inhibiteurs de la réaction PCR qui peuvent interférer puis inhiber l'activité de l'ADN polymérase. Cette purification peut être vu visuellement parce que le papier est lavé donc la couleur rouge de l'hémoglobine est éliminée avec le surnageant.

Le punch est normalement lavé à 3 reprises par 100 μ L de tampon TE suivant les recommandations du fabricant. Mais au cours de cette étude, cette étape a été optimisée et le nombre des lavages du poinçon imprégné du sang a été augmenté de 3 à 4 lavages afin de tester l'effet de lavage sur le taux d'inhibition provoqué par l'hémoglobine ainsi que dans l'élimination de l'ADN immobilisé sur la carte FTA.

Les lavages effectués pour les poinçons de chaque série ont été réalisés comme suit :

- Les disques de la série 1 ont été lavés 3 fois au tampon TE
- Les disques de la série 2 ont été lavés 4 fois au tampon TE

Les étapes de chaque lavage sont illustrées dans le Tableau III.

Tableau III : Les étapes des lavages effectués pour les 60 échantillons d'ADN.

30 échantillons de la série 1	30 échantillons de la série 2
<p>Premier lavage</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ajouter 100 µL de TE 2. Agiter pendant 3 minutes à une vitesse de 300 tours/ seconde 3. Centrifuger brièvement, environ 15 secondes « <i>quick spin</i> » 4. Aspirer puis éliminer les 100 µL de TE 	<p>Premier lavage</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ajouter 100 µL de TE 2. Agiter pendant 3 minutes à une vitesse de 300 tours/ seconde 3. Centrifuger brièvement, environ 15 secondes « <i>quick spin</i> » 4. Aspirer puis éliminer les 100 µL de TE
<p>Deuxième lavage</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ajouter 100 µL de TE 2. Agiter pendant 2minutes et 30 secondes à une vitesse de 300 tours/ seconde 3. Centrifuger brièvement, environ 15 secondes « <i>quick spin</i> » 4. Aspirer puis éliminer les 100 µL de TE 	<p>Deuxième lavage</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ajouter 100 µL de TE 2. Agiter pendant 2minutes et 30 secondes à une vitesse de 300 tours/ seconde 3. Centrifuger brièvement, environ 15 secondes « <i>quick spin</i> » 4. Aspirer puis éliminer les 100 µL de TE
<p>Troisième lavage</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ajouter 100 µL de TE 2. Agiter pendant 2minutes et 30 secondes à une vitesse de 300 tours/ seconde 3. Centrifuger brièvement, environ 15 secondes « <i>quick spin</i> » 4. Aspirer puis éliminer les 100 µL de TE 5. Conserver les tubes à +4°C pour l'étape de pré-amplification 	<p>Troisième lavage</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ajouter 100 µL de TE 2. Agiter pendant 2minutes et 30 secondes à une vitesse de 300 tours/ seconde 3. Centrifuger brièvement, environ 15 secondes « <i>quick spin</i> » 4. Aspirer puis éliminer les 100 µL de TE
	<p>Quatrième lavage</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ajouter 100 µL de TE 2. Agiter pendant 2minutes et 30 secondes à une vitesse de 300 tours/ seconde 3. Centrifuger brièvement, environ 15 secondes « <i>quick spin</i> » 4. Aspirer puis éliminer les 100 µL de TE 5. Conserver les tubes à +4°C pour l'étape de pré-amplification

II.2.2. Amplification par PCR

L'amplification multiplex des STRs effectuée durant ce travail a été réalisée dans le thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) en utilisant le kit commercial PowerPlex® ESI16 System (*European Standard Investigator 16*) qui permet de co-amplifier seize locus situés sur différents chromosomes (quinze STRs et l'Amélogénine déterminant le sexe). Ce système utilise des amorces marquées par quatre Fluorochromes différents permettant la détection des locis analysés (Annexe 1). Il inclue les onze locis compatibles avec la base de données nationale d'ADN du Royaume-Uni (D2S1338, D19S433, D3S1358, D18S51, D16S539, D21S11, vWA, TH01, FGA, D8S1179 et l'Amélogénine), plus les cinq locis dernièrement recommandés par les comités ENFSI (*European Network of Forensic Science Institutes*) et EDNAP (*European DNA Profiling Group*) (D2S441, D10S1248, D22S1045, D1S1656 et D12S391) [Tucker *et al.*; 2010 ; Manuel technique Promega, 2014].

Le kit PowerPlex® ESI 16 system est utilisé pour l'obtention de profils d'ADN dans le domaine des sciences forensiques, à des fins d'identification de personnes. La configuration des locis analysés par est représentée dans la figure 13.

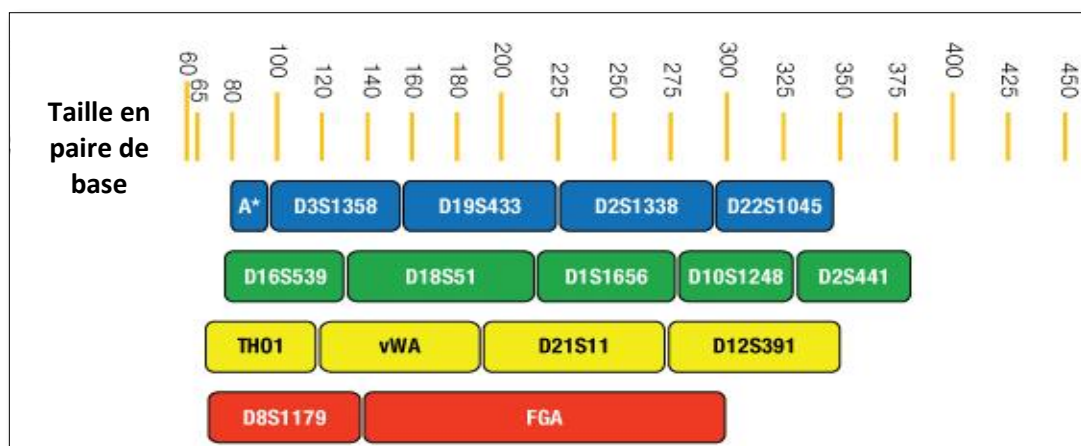


Figure 13 : Configuration des locis analysés par le kit PowerPlex ® ESI 16 system

. A* = Amelogenin. Source : Promega

Le kit PowerPlex® ESI 16 system contient tous les réactifs nécessaires à la réalisation de génotypage des STRs (Tableau IV).

Tableau IV. Réactifs de kit PowerPlex® ESI 16 system

		Réactif	Volume	Conditions de stockage
Kit PowerPlex® ESI 16 system	Pré-amplification	Master Mix	500µl	-30°C à -10°C
		Primer Pair Mix	250µl	
		AND control 2800M, 10ng/µl	25µl	
		Eau ultra-pure (Water, Amplification Grade)	5 × 1,250µl	
	Post-amplification	Allelic Ladder Mix	50µl	
		Standard de taille	300µl	

Il est à savoir que le Master Mix contient les composants suivants : Taq Gold polymérase, Tampon, Sels, MgCl₂, dNTPs)

a. Pré-amplification

Cette étape consiste à la préparation du milieu réactionnel d'amplification suivant des volumes bien définis pour chaque réactif (Tableau V). Selon le manuel technique du kit PowerPlex® ESI 16 System, le volume final pour chaque réaction de PCR en utilisant un seul poinçon de carte FTA® imprégné du sang est de 25 µl.

Tableau V. Composition du milieu réactionnel et volume des différents réactifs utilisés (pour un volume final de 25 µl)

	Échantillon	Contrôle positif	Contrôle négatif
Master Mix 5X	5 uL	5 uL	5 uL
Primer Pair Mix	2.5 uL	2.5 uL	2.5 uL
l'ADN contrôle		17.5 uL	
Eau ultra-pure	17.5 uL		17.5 uL
Volume final	25 uL	25 uL	25 uL

Les étapes de préparation du milieu réactionnel sont les suivantes :

- 1) Le Master Mix et le Primer Pair Mix ont été complètement décongelés ;
- 2) Une fois décongelés, les deux réactifs ont été centrifugés brièvement pour mettre le contenu vers le fond ;
- 3) Le nombre de réactions à être mis en place doit être déterminé en ajoutant les réactions des témoins positifs et négatifs afin de déterminer le volume total de Mix à préparer ;
- 4) Pour chaque réaction, un mélange (Mix) de 5 uL Master Mix avec 2.5 uL Primer Pair Mix doit être préparé ;
- 5) le Mix préparé a été agité brièvement dans le vortex afin de bien mélanger le contenu ;
- 6) 7.5 uL de Mix ont été déposés dans le tube contenant déjà le poinçon d'échantillon ;
- 7) 17.5 uL d'eau ultra-pure (fournit avec le kit) ont été ajoutés afin d'ajuster le volume réactionnel jusqu'au 25 uL ;
- 8) La préparation de contrôle positif et de contrôle négatif a été effectuée comme suit :

❖ **Contrôle positif :**

Le contrôle positif permet d'estimer le taux d'erreur et de s'assurer des bonnes conditions de déroulement de la réaction d'amplification. C'est un ADN de séquence connue qui va être amplifié en utilisant les mêmes amorces, puis avec les mêmes paramètres que l'amplification des autres STRs. Le contrôle positif a été préparé comme suit :

- Le tube de l'ADN contrôle a été agité dans le vortex ;

- 1 uL d'ADN contrôle (10ng/μl) a été dilué dans 349 uL d'eau ultra-pure de manière à obtenir 0,5 ng dans le volume final d'ADN choisi ;
- 7.5 uL de Mix ont été déposés dans un tube préalablement identifié ;
- 17.5 uL d'ADN contrôle dilué ont été ajoutés.

❖ **Contrôle négatif :**

Le contrôle négatif (sans matrice) permet de détecter une contamination éventuelle des réactifs. La quantité d'ADN doit être nulle, donc ce dernier ne doit présenter aucun produit d'amplification. Le témoin négatif a été préparé comme suit :

- 7.5 uL de Mix ont été déposés dans un tube préalablement identifié ;
- 17.5 uL d'eau ultra-pure ont été ajoutés au Mix.

9) Tous les tubes ont été centrifugés brièvement (environ 15 secondes) afin d'apporter le contenu au fond et d'éliminer les bulles d'air. ;

10) Les tubes ont été placés dans la plaque MicroAmp optique 96 puits Reaction (*Applied Biosystems*).

b. Exécution du programme d'amplification

Les échantillons sont normalement amplifiés à 29 cycles par PCR suivant les recommandations du fournisseur ; mais au cours de cette étude, cette étape a été optimisée et le nombre de cycles d'amplification par PCR a été diminué de façon décroissante de 29 cycles jusqu'à 24 cycles dans le but de déterminer le nombre de cycle adéquat pour donner un profil ADN complet et interprétable. Pour chaque nombre de cycle, 10 échantillons d'ADN ont été amplifiés : un groupe de 5 échantillons à 3 lavages, et un autre groupe de 5 échantillons à 4 lavages.

Un contrôle positif et un contrôle négatif ont été préparés puis ajoutés pour être amplifié avec chaque deux groupe d'échantillon de même nombre de cycle (figure 14).

Une fois les tubes placés dans le thermocycleur, les réactions d'amplification par PCR multiplexe commencent en utilisant le programme suivant :

Dénaturation initiale à 96°C pendant 2minutes

Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes	}	n cycles (n = 29, 28 ; 27 ; 26 ; 25 ; ou 24)
Hybridation à 59°C pendant 2 minutes		
Élongation à 72°C pendant 90 secondes		

Élongation finale à 60°C pendant 45minutes

Une fois le protocole de cycles thermiques achevé, les produits PCR sont conservés à 4°C pour une utilisation immédiate n'excédant pas deux semaine d'attente, au- delà cette période, pour assurer leur stabilité, ils sont gardé à -20°C.

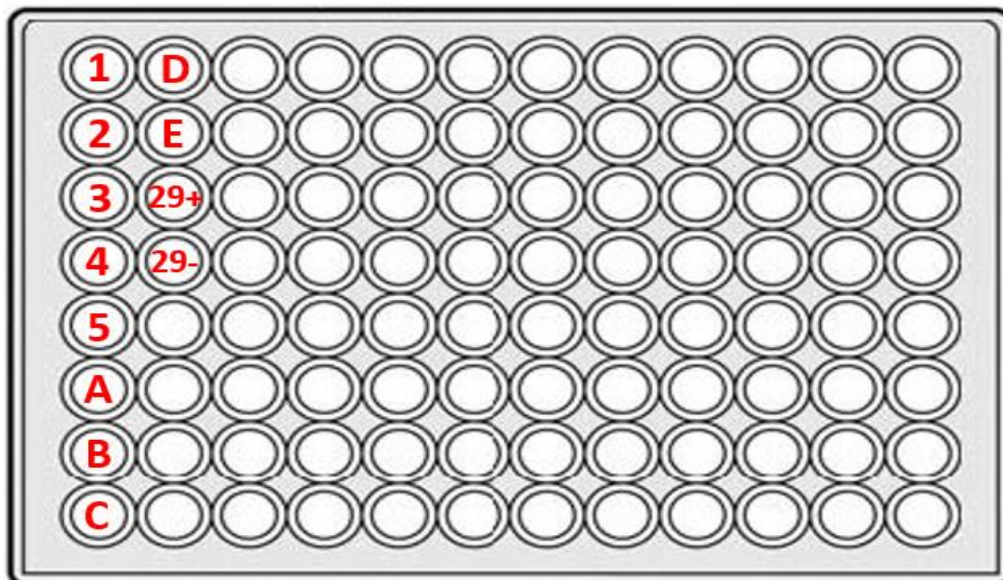


Figure 14 : Répartition des tubes des échantillons dans la plaque de 96 puits de thermocycleur, (exemple **n**=29 cycles)

Les différentes étapes d'optimisation des lavages et d'amplification développés au cours de ce travail sont présentées dans sur figure 15.

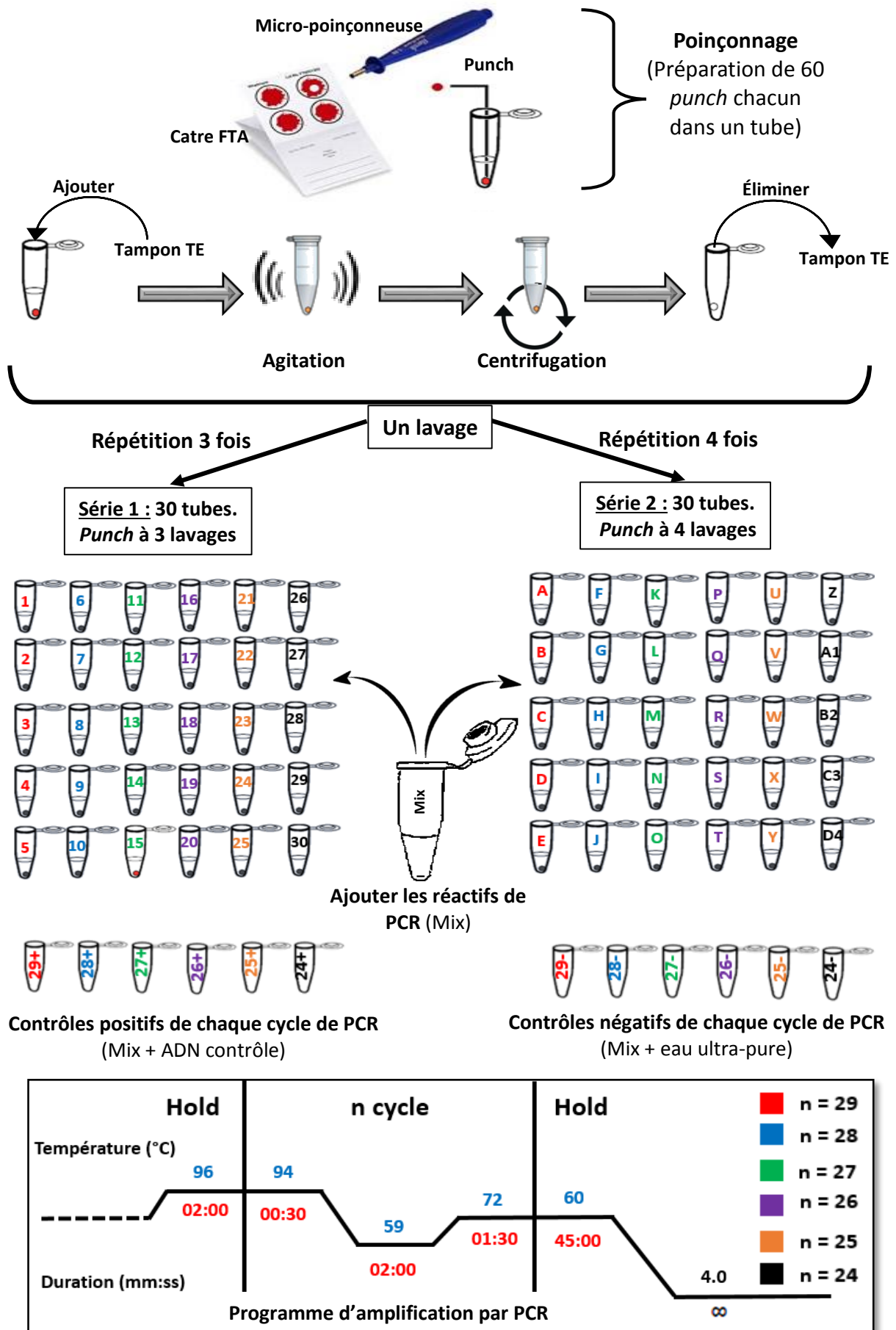


Figure 15 : Schéma général de dispositif expérimental de l'optimisation des lavages et de l'amplification

II.3. Électrophorèse capillaire

Avant de procéder à la séparation des produits de PCR par électrophorèse capillaire, une étape de préparation dite « post-amplification » a été effectuée. Cette étape est primordiale pour la séparation des STRs par le séquenceur ; son but est de dénaturer les fragments d'ADN en séquences monocaténares, le maintien en simples brins étant assuré par addition de formamide.

II.3.1. Protocole expérimental de la post-amplification

Le protocole de préparation des échantillons pour l'électrophorèse capillaire a été effectué comme suit :

- Le dépôt des produits de PCR a été effectué dans une plaque d'électrophorèse à 96 puits, avec 6 runs dont chaque run possède 16 puits répartie en 2 rangés. ;
- Pour un seul puits, un mélange contenant 10 μL de formamide et 1 μL de standard de taille doit être préparé ;
- Le volume total de mélange (Standard de taille/Formamide) a été calculé puis préparé selon le nombre de réactions ;
- Le Mix préparé a été agité dans un vortex pendant 5 à 10 secondes ;
- Un volume de Mix (10 μL de formamide et 1 μL de standard de taille) a été déposé dans chaque puits ;
- Un microlitre de chaque produit d'amplification a été ajouté à chaque puits contenant le Mix (Standard de taille/Formamide) suivant le plan de la plaque (figure 16) ;
- À chaque run un puits supplémentaire est ajouté contenant les 11 μL du Mix (Standard de taille/Formamide) et 1 μL de ladder ;
- Les contrôles positifs et les contrôles négatifs de chaque cycle de PCR ont été déposés de la même manière que les échantillons. Un volume de 11 μL du Mix (Standard de taille/Formamide) a été déposé dans les puits correspondants, puis 1 μL de chaque contrôle a été ajouté dans le puits correspondant ;
- Un volume d'environ 12 μL d'eau ultra-pure a été déposé dans les puits qui ne contenaient pas d'échantillons afin d'éviter les dommages des capillaires suite aux tensions électriques de voltage très élevé ;
- Une fois préparé, un Septums plat, propre et sec de caoutchouc a été fixé sur la plaque d'échantillons ;

- La plaque est centrifugée brièvement (environ 15 secondes) afin d'apporter le contenu au fond des puits et d'enlever les bulles d'air. Si les bulles ne sont pas retirées, des résultats inégaux peuvent être obtenus ;
- Cette dernière a été déposée sur une plaque chauffante à 95°C pendant 3 minutes afin de dénaturer les fragments amplifiés, puis en le refroidissant immédiatement sur un bloc réfrigéré pendant 3 minutes afin de maintenir les fragments sous cette forme dénaturée ;
- La plaque a été couverte par un plastique solide de fermeture avant de la placer dans le séquenceur.

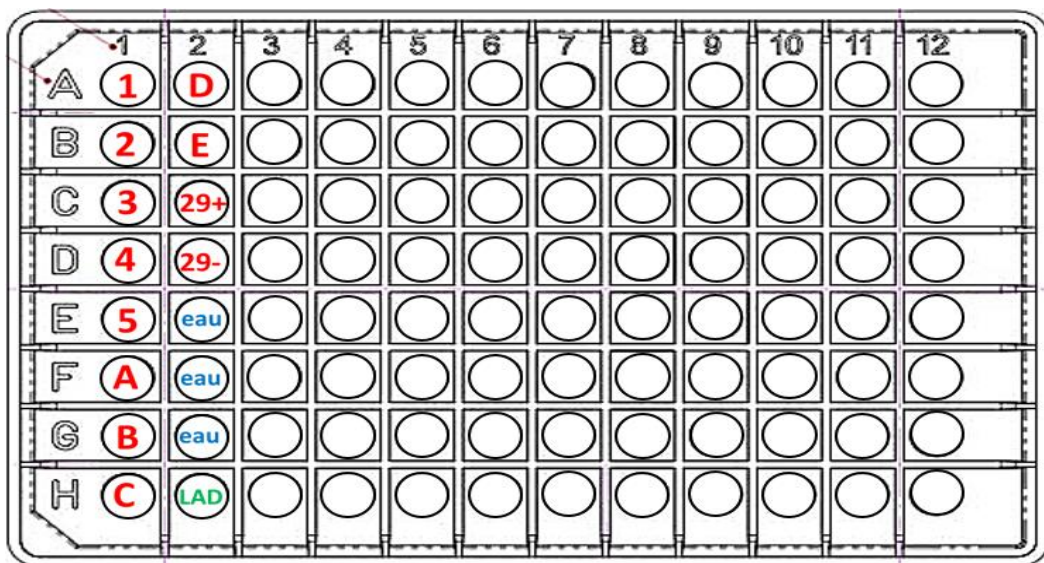


Figure 16 : Configuration de la plaque de 96 puits de séquenceur (exemple de répartition des échantillons amplifié avec 29 cycles)

II.3.2. Séparation et détection des fragments d'ADN amplifiés

Le séquenceur utilisé dans notre travail était un (Applied Biosystems) ABI 3130 XL Genetic Analyzer, version 4.1. Il comprend 16 capillaires (36 cm de longueur/ 50 µm de diamètre) ce qui offre l'opportunité d'analyser simultanément 16 échantillons.

Dans un premier temps, la plaque de 96 puits est placée dans le séquenceur, puis une plateforme automatisée a ensuite amené la plaque des échantillons au niveau de la tête à 16 capillaires disposés en parallèle et remplis d'un polymère POP 4 (*Performance Optimized Polymere 4*)

de faible viscosité qui joue le rôle de tamis moléculaire. L'électrophorèse a lieu dans les tubes capillaires sous un champ électrique de 3kV/5 sec. Les données sont ensuite collectées par le logiciel « Data Collection » v3.0.

II.4. Traitement des données et validation des résultats

II.4.1. Traitement des données

Au cours de notre travail, les fichiers séquences collectés par le logiciel Data collection ont été analysés par le logiciel GeneMapper ID v.3.2.1 (AB) en utilisant les paramètres de lecture exigés par la validation interne du laboratoire d'identification génétique au sein de l'INCC (figure 17).

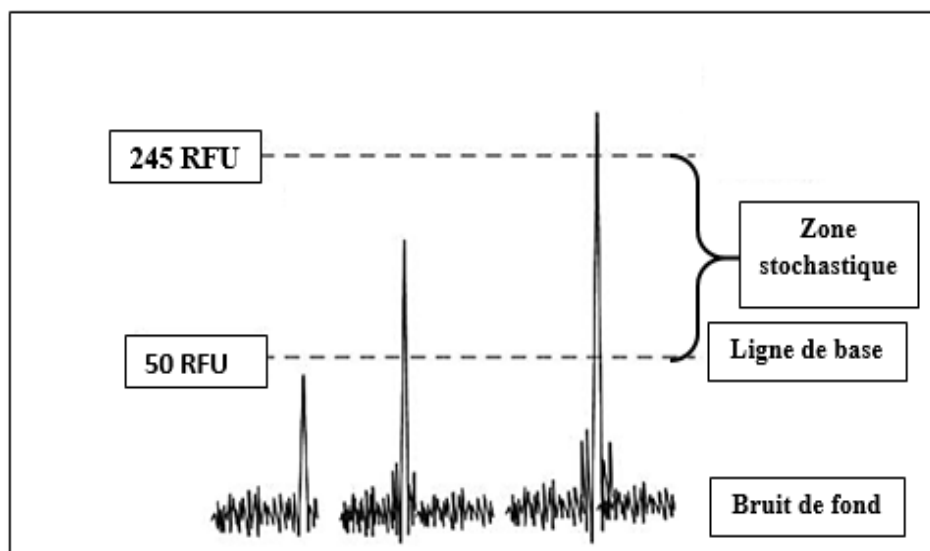


Figure 17 : Valeur minimale et valeurs de la zone stochastique du kit PowerPlex® ESI 16 system selon la validation interne du laboratoire d'identification génétique de l'INCC

II.4.2. Validation des résultats

La validation d'un profil génétique par un analyste est alors tributaire de la vérification d'un certain nombre de critères, notamment la vérification de la migration du standard de taille et du ladder, les profils des témoins positifs et négatifs et l'observation de l'allure générale du profil

(hauteur des pics, seuil d'acceptabilité, ...). Ce n'est qu'à l'issue de la validation de ces caractères que le résultat peut être exploité.

II.5. ANALYSES STATISTIQUES

Après le génotypage des 60 échantillons d'ADN, les données correspondant aux hauteurs de pics des différents marqueurs propres à chaque échantillon ont été rassemblées dans des tableaux qui se trouvent en Annexe 2. Chaque tableau regroupe 10 échantillons amplifiés au même nombre de cycles par PCR (5 échantillons lavés 3 fois/ 5 échantillons lavés 4 fois).

L'Analyse des données désigne un sous-ensemble de la « statistique multi-variée ». Elle correspond à un ensemble de techniques essentiellement descriptives, dont l'outil mathématique majeur est l'algèbre matricielle, et qui s'exprime sans supposer a priori un modèle probabiliste [Benzécri, 1977]. Selon Jean de Lagarde : « Le propre de l'analyse des données, dans son sens moderne, est de raisonner sur un nombre quelconque de variables » [Stafford et Bodson, 2006].

Une variable est une caractéristique étudiée pour une population donnée. Les variables peuvent être qualitatives ou quantitatives. Les variables concernées par l'analyse dans cette étude sont de type quantitatif, elles représentent les hauteurs de pics correspondant aux différents marqueurs et mesurées par unité relative de fluorescence (RFU).

L'analyse des données a été effectuée à l'aide de logiciel XLSTAT (version 2015) qui offre de nombreuses fonctionnalités et des utilitaires pour faciliter la manipulation des données sous Excel.

II.5.1. Comparaison intra-groupe

a) Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'étude simultanée de toutes les variables quantitatives correspondant aux 60 échantillons d'ADN analysés présente de nombreuses difficultés, notamment que chaque échantillon présente un nombre important de variables. Donc, afin de réduire le nombre de variables à analyser et en même temps avoir une meilleure combinaison de données de manière à minimiser la perte d'information issue de cette réduction ; nous avons choisi de nous focaliser sur l'analyse des données les plus informatives en se basant sur une méthode multidimensionnelle très employée connue sous le nom d'Analyse en Composantes Principales « ACP » qui permet d'obtenir le résumé le plus pertinent possible des données initiales.

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode très efficace pour l'analyse de données quantitatives, elle consiste à passer d'un tableau des données brutes (hauteur de pics) à certaines représentations graphiques interprétables par l'utilisateur telles que les nuages de points. Cette méthode nous a permis dans un premier temps d'analyser les corrélations des variables entre les 5 échantillons de mêmes conditions (même nombre de lavages/ même nombre de cycle d'amplification). Et dans un deuxième temps d'analyser les corrélations des variables entre les échantillons de la même série (série 1 : 30 échantillons à 3 lavages/ série 2 : 30 échantillons à 4 lavages) afin d'identifier des états se différenciant fortement des autres.

II.5.2. Comparaison inter-groupe

La comparaison entre les données de chaque deux groupe d'échantillons amplifiés au même nombre de cycle par la PCR a été effectuée par un test de *Student*. Les conditions d'application du test ont été considérées comme respectées. Les marqueurs des échantillons d'ADN analysés ont été considérés comme normales.

Ce test permet d'estimer la probabilité p que la différence entre les deux moyennes soit aussi importante par hasard. Au-delà de la valeur p critique, c'est-à-dire pour $p > 0,05$ non significatif, on considère que la différence entre les deux moyennes n'est pas liée au nombre de lavages de la carte FTA® au tampon TE et que les deux moyennes sont comparables pour le marqueur considéré.

Le choix de nombre de cycle adéquat pour l'amplification a été effectué en se basant sur les résultats des analyses de variance ANOVA qui ont été effectuées pour la comparaison des moyennes des valeurs quantitatives propres aux échantillons de la série 1 et celles de la série 2.

Chapitre III :

Résultats et discussion

III.1. RESULTATS D'ANALYSES GENETIQUES

Une fois les données traitées par le logiciel GeneMapper en respectant les paramètres effectués, la fenêtre de graphe affiche des tracés correspondants aux produits de PCR analysés par électrophorèse capillaire sous forme d'*électrophorégramme*. La figure 18 montre un exemple de résultat de génotypage obtenu pour les 15 microsattellites plus l'amélogénine marqués différemment.

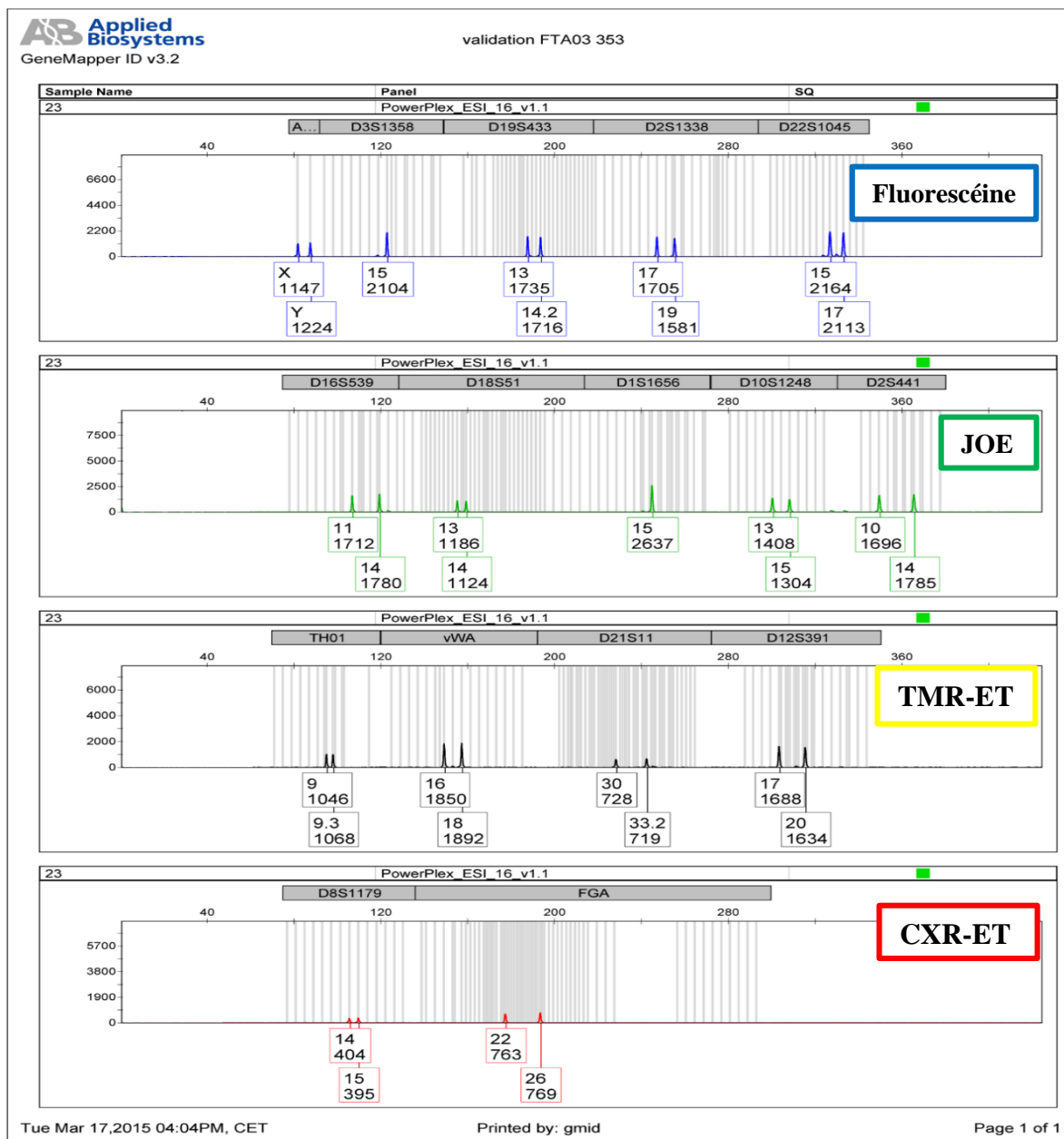


Figure 18 : Profil génétique complet obtenu à partir de la co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit PowerPlex® ESI 16 system.

Chaque ligne de l'*électrophorégramme* correspond à une couleur de fluorochrome (bleu, vert, jaune et rouge du haut vers le bas respectivement). Le nom des 16 marqueurs étudiés est mentionné au-dessus de chaque série de pics. Les traits gris en ligne de fond correspondent à « l'échelle allélique » ou marqueur de taille. Cette plage est appelée « *Bin* ». Le profil de mélange d'échelle allélique PowerPlex® ESI 16 system est présenté dans la Figure 19.

Chaque pic est caractérisé en abscisse par sa position (qui dépend de la vitesse de migration donc de la taille) et en ordonnée par l'intensité relative de la fluorescence initiale exprimée en Unité de Fluorescence Relative (RFU). La position du pic coloré correspond à une taille de fragment d'ADN qui est mentionnée au-dessus de chaque série de pics en paire de bases.

Chaque marqueur est représenté par deux formes alléliques, un allèle venant du père de l'individu analysé, et l'autre de sa mère. Pour chaque marqueur 1 ou 2 pics étiquetés peuvent être détectés. La visualisation d'un seul pic représente que cet individu est décrit comme étant homozygote pour ce marqueur c'est-à-dire qu'il a hérité le même allèle de ses deux parents avec le même nombre de répétitions de l'élément répétitif du STR étudié. La visualisation de deux pics désigne qu'il est hétérozygote pour ce marqueur et donc il a hérité deux allèles avec un nombre de répétitions différent provenant de ses deux parents.

Pour le profil génétique présenté dans la figure 17, par exemple pour le système D2S1338 situé sur le chromosome 2, l'individu analysé possède 17 répétitions sur l'un des chromosomes de la paire n° 2 et 19 répétitions sur l'autre, donc il est hétérozygote pour le marqueur D2S1338. Or que pour le marqueur D3S1358 situé sur le chromosome 3, il possède 15 répétitions sur les deux chromosomes de la paire n° 3 ; ce qui signifie qu'il est homozygote pour ce marqueur. On identifie de la même façon le nombre de répétitions pour chacun des 16 systèmes.

Pour le marqueur D19S433, on constate que le nombre de répétition sur l'un des deux chromosomes de la paire n°19 est étiqueté par 14.2, cela veut dire que l'allèle correspondant est composé de 14 répétitions de l'unité répétitive concernée [AAGG/AAGG]₁₄, plus 2 nucléotides [AA]. Le marqueur D19S433 est de type complexe donc diverses séquences peuvent être intercalées entre les deux blocs [AAGG]. Ce type de polymorphisme est appelé « micro-variant », car les allèles diffèrent l'un de l'autre par des tailles ne correspondant pas à une unité répétitive complète. Pour ce marqueur 4 allèles peuvent être observés avec le même nombre de répétitions de l'unité répétitive (14) mais différent au niveau de nombre de nucléotides supplémentaires à cette séquence d'éléments répétitifs (14.1 ; 14.2 ; 14.3).

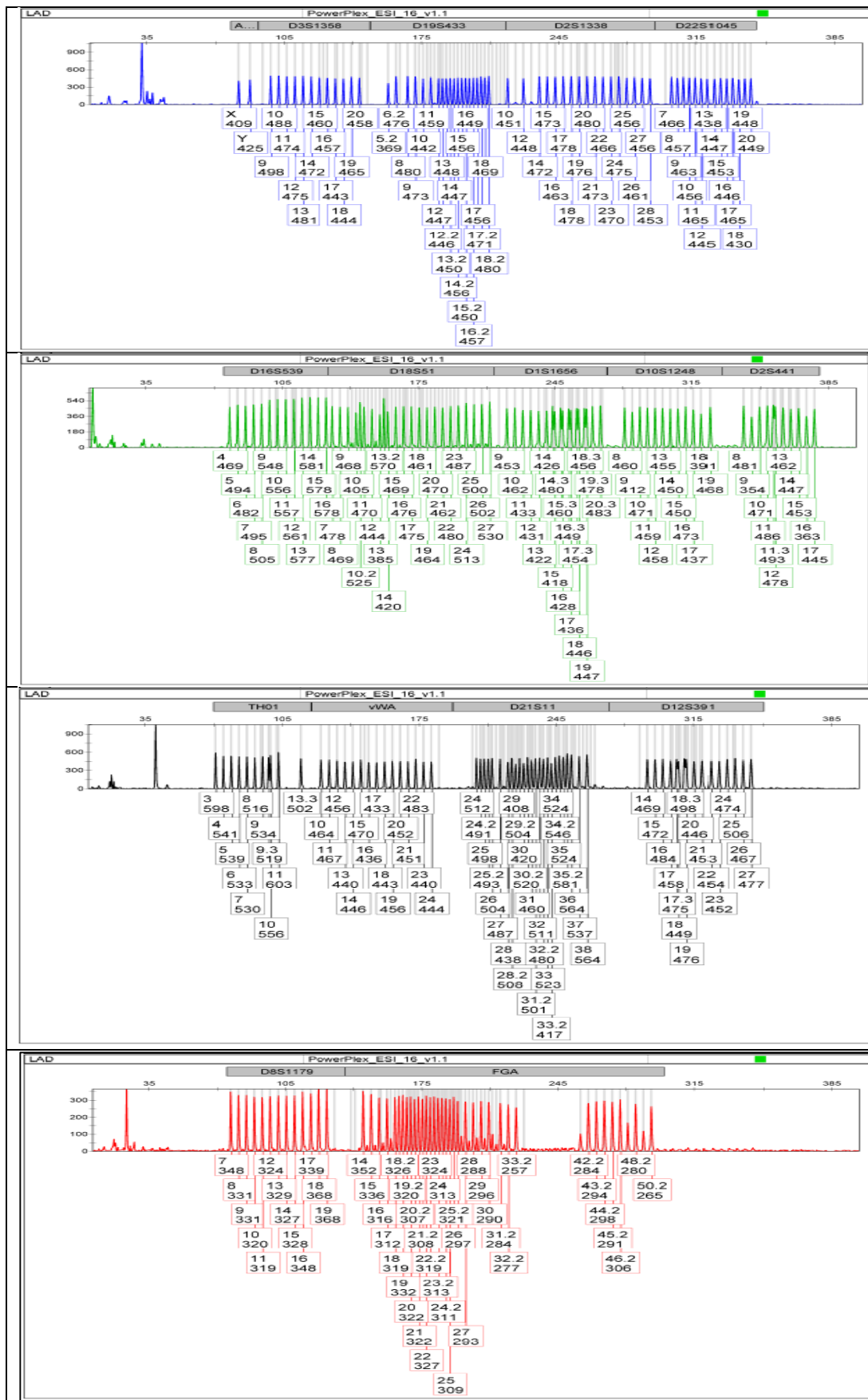


Figure 19 : Profil génétique d'allelic ladder du kit PowerPlex® ESI 16 system.

Les profils génétiques obtenus de géotypages des 30 échantillons d'ADN de la série 1 à 3 lavages (groupe d'échantillons amplifiés à 29, 28, 27, 26,25 et 24 cycles par PCR) ont été complets, aucune perte d'allèle n'a été observée.

En ce qui concerne les échantillons de la série 2 à 4 lavages, les profils génétiques obtenus de géotypages des échantillons amplifiés à 29, 28, 27, 26, et 25 cycles par PCR ont donnés des profils complets, cependant les échantillons amplifiés à 24 cycles de PCR ont donnés trois catégories de profils : des profils complets, d'autres partiels et même nuls. Le profil nul correspond à l'échantillon D4 ; et le profil génétique partiel dont les deux allèles du marqueur D8S1179 n'ont pas été détectés (droup-out) correspond à l'échantillon C3 (Figure 20).

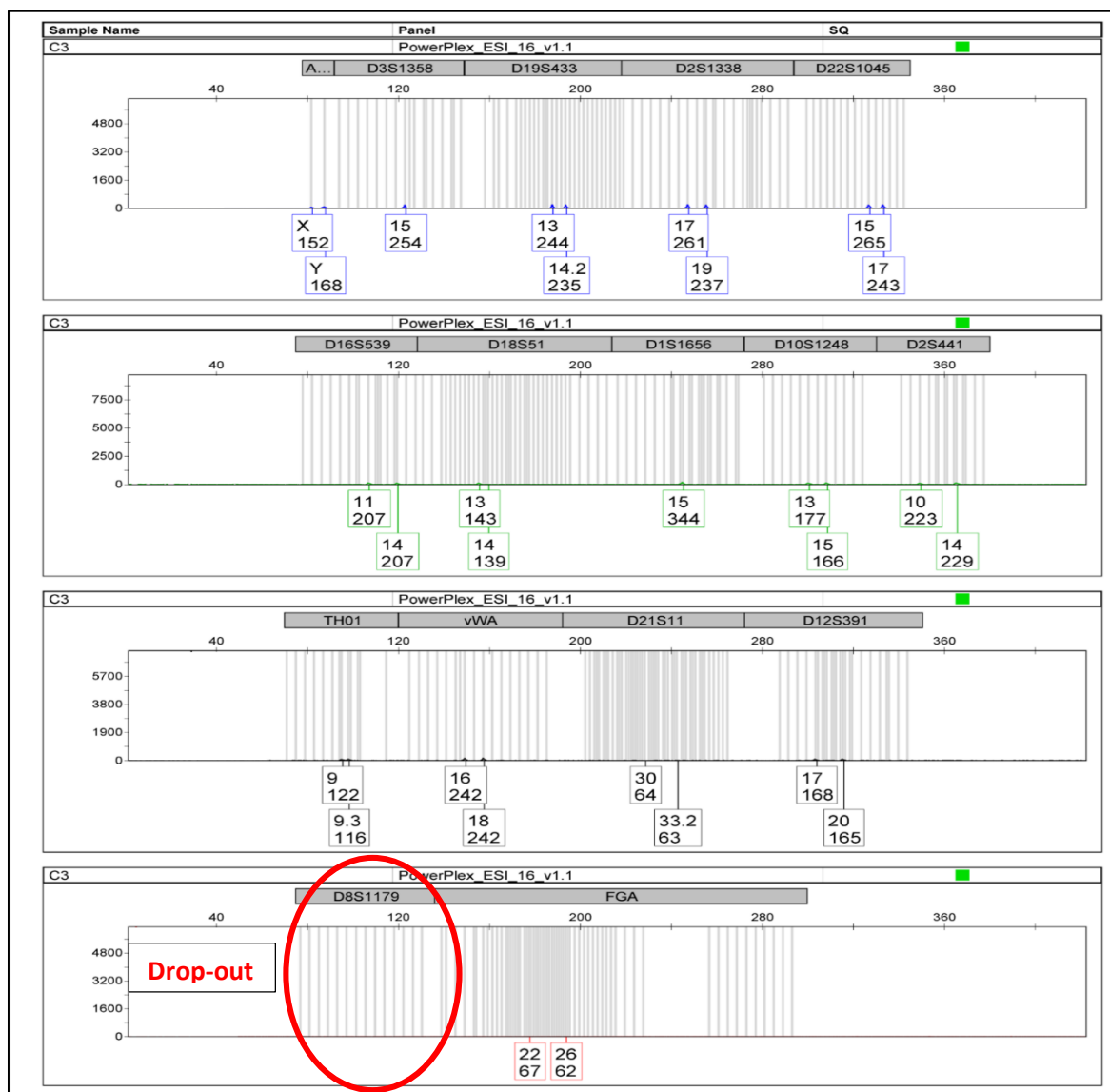


Figure 20 : Profil génétique partiel obtenu à partir de l'échantillon C3 après la co-amplification des 16 marqueurs inclus dans le kit PowerPlex® ESI 16 system

Les profils génétiques des témoins positifs ont été bien observés, nous pouvons en déduire que l'ADN contrôle et les réactifs utilisés sont de bonne qualité, ce qui confirme le bon déroulement de processus d'amplification (Figure 21).

L'utilisation de témoin négatif de réaction, a permis de tester la présence ou l'absence d'ADN étranger lors du processus d'amplification. En effet, aucun pic n'a été observé sur les électrophorégrammes résultants de génotypage des contrôles négatifs (Figure 22). Cette négativité est un élément important pour la validation de notre manipulation qui exclue toute contamination.

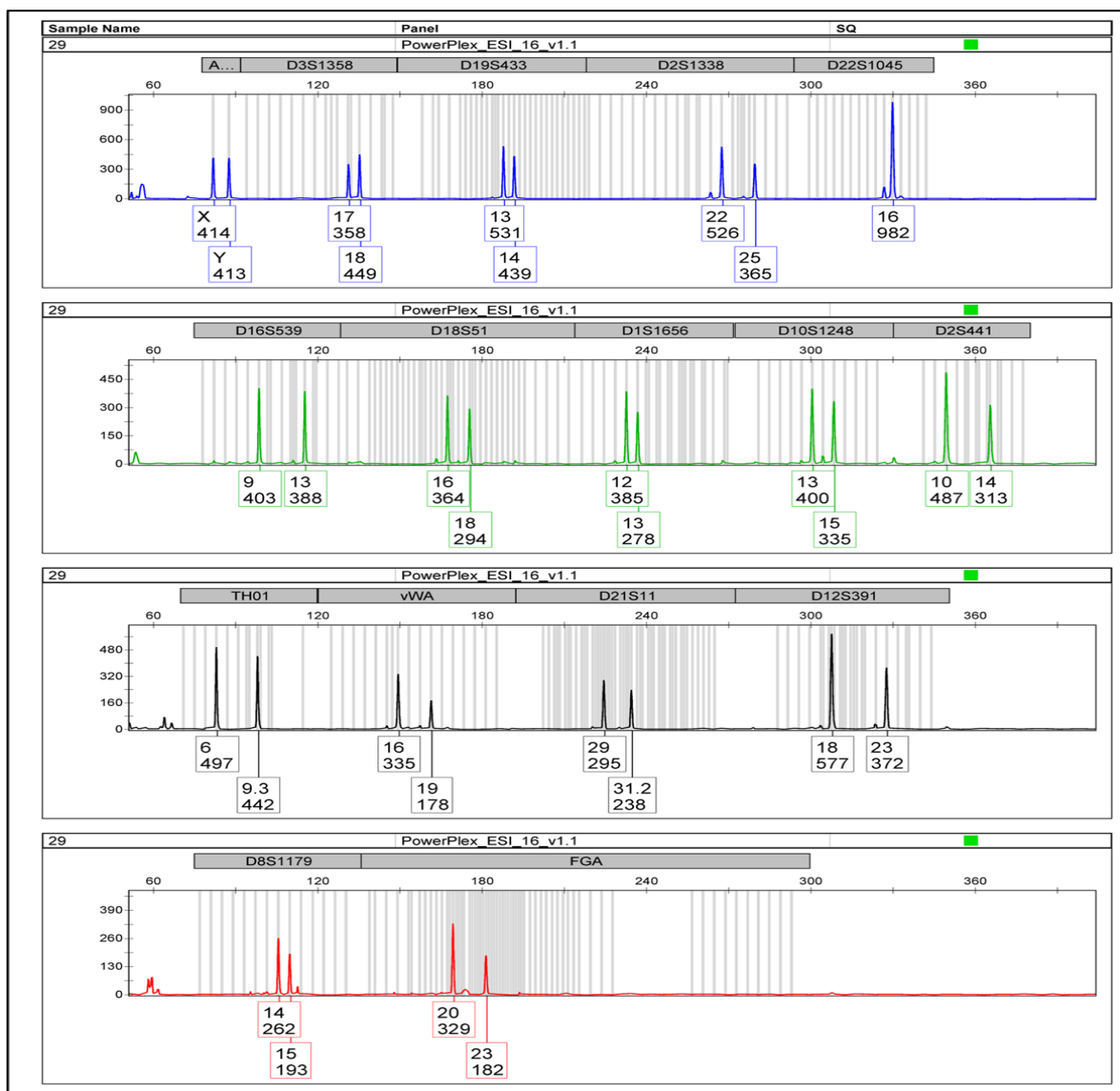


Figure 21 : Profil génétique complet de contrôle positif (0,5ng) obtenu après la co-amplification à 29 cycles des 16 marqueurs inclus dans le kit PowerPlex® ESI 16 system.

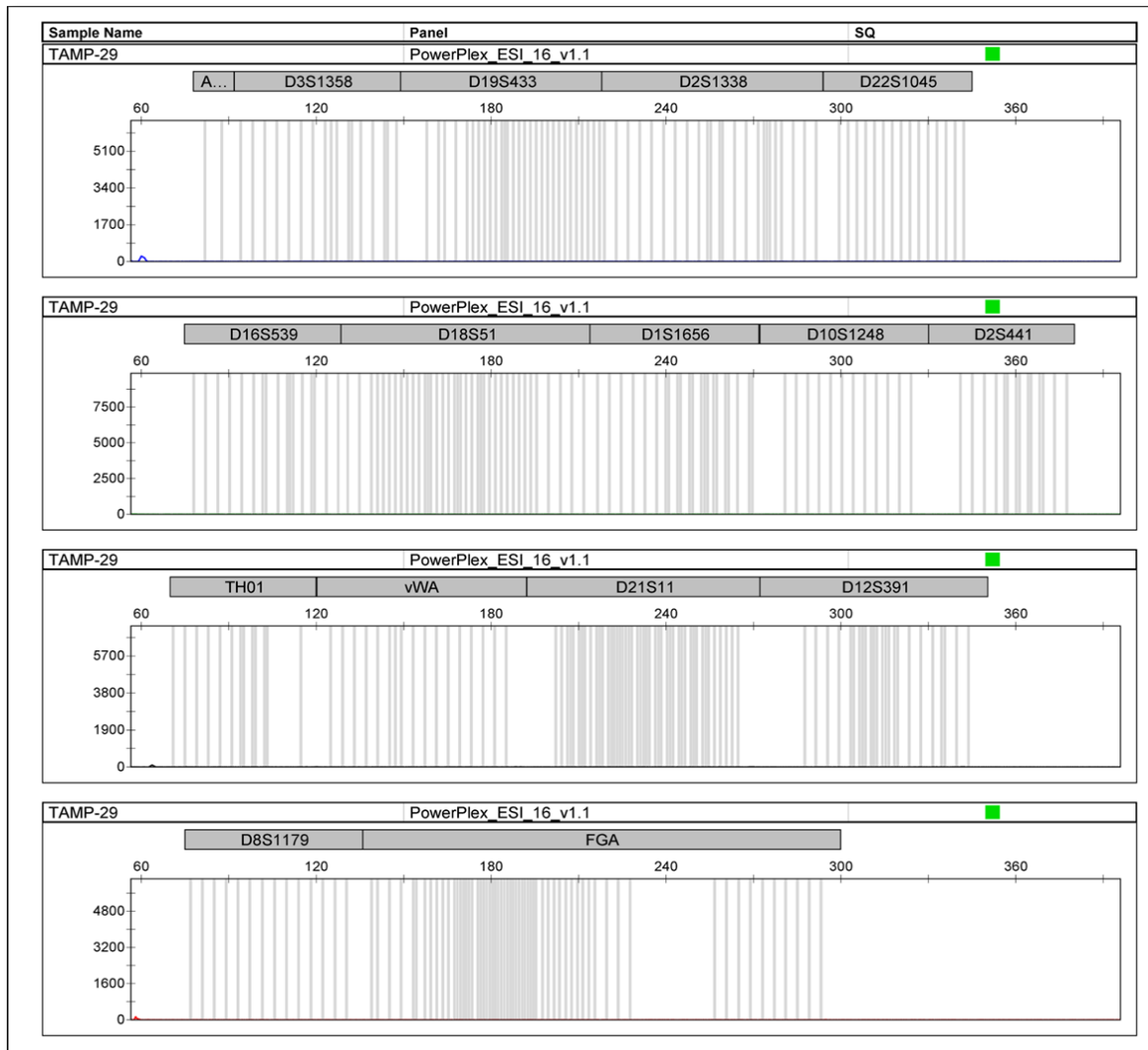
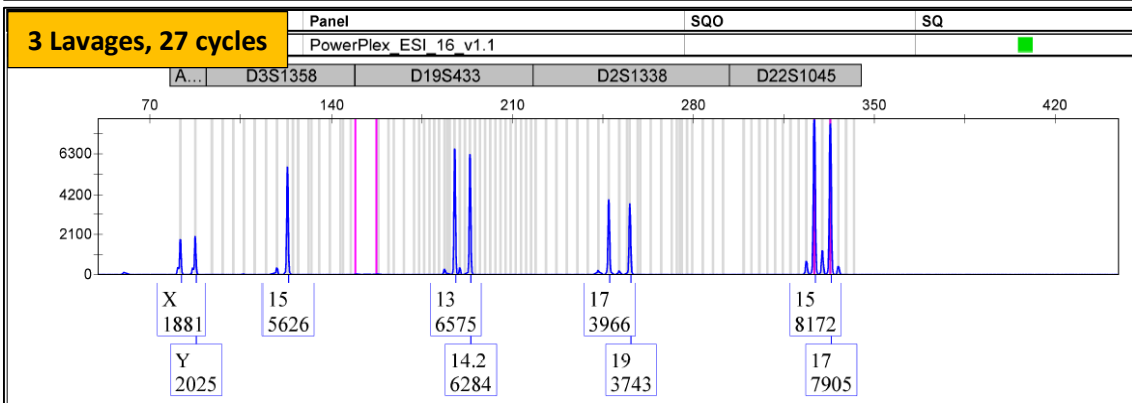
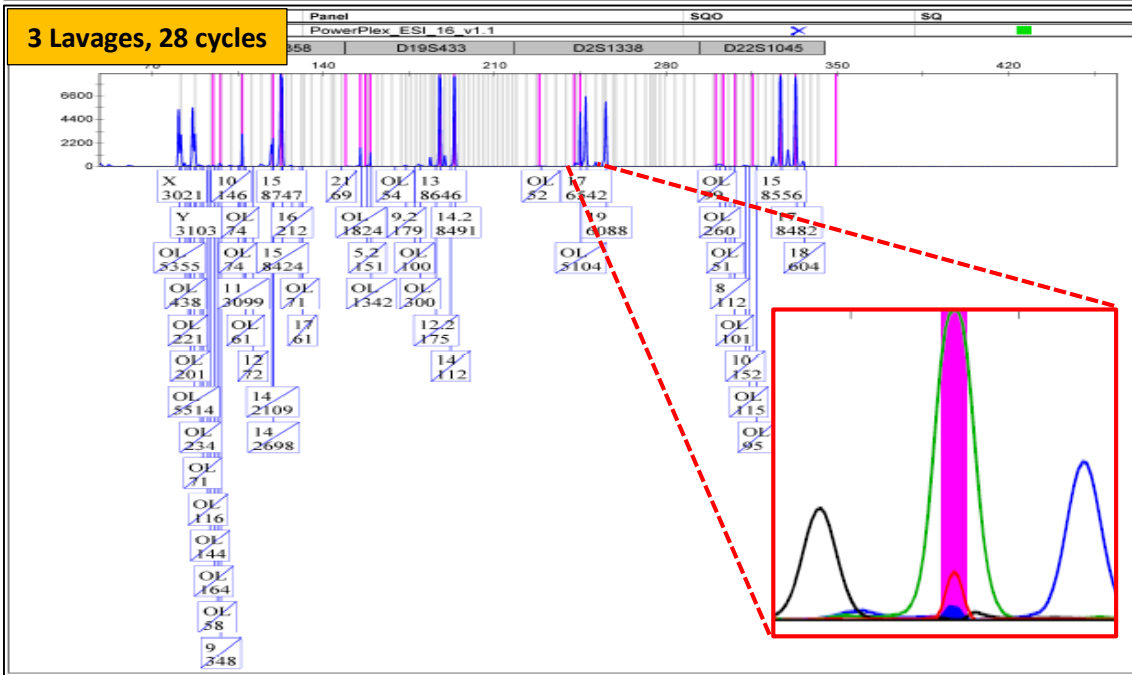
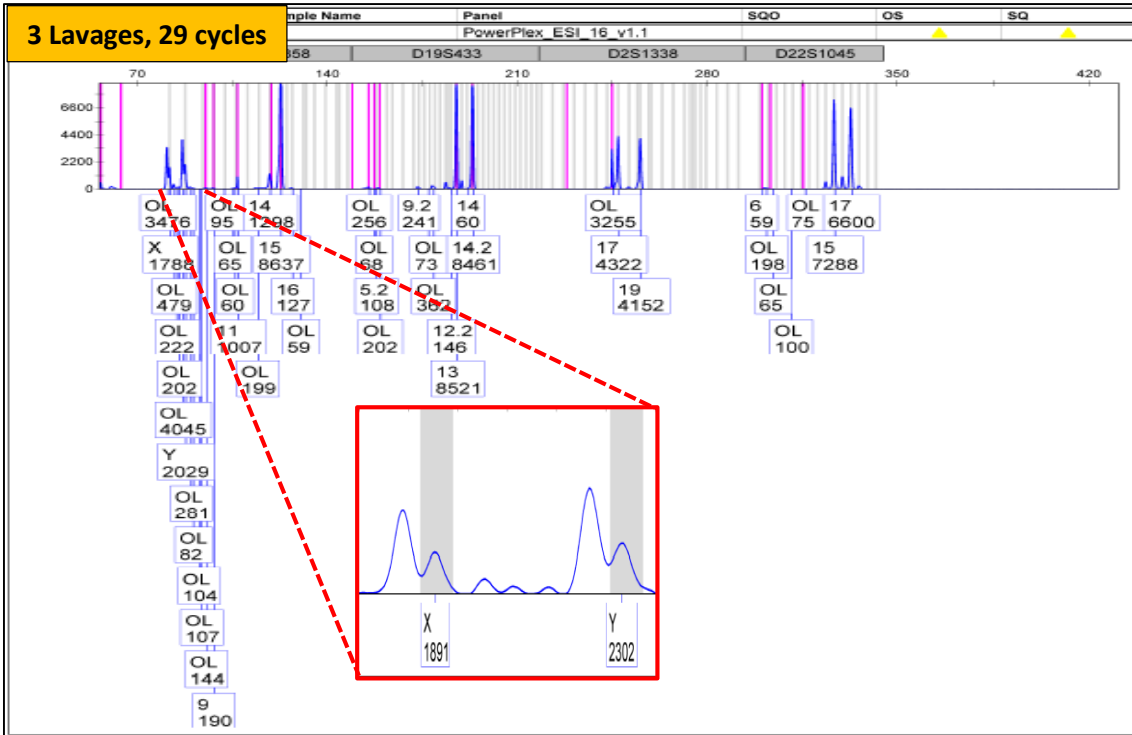


Figure 22 : Profil génétique nul de contrôle négatif obtenu après la co-amplification à 29 cycles des 16 marqueurs inclus dans le kit PowerPlex® ESI 16 system.

La notion de saturation de profil génétique est expliquée par deux caractéristiques : la hauteur des pics très élevée et l'abondance des artéfacts tels que les stutters, les pul-up et même les doubles pics produits par l'addition A incomplète.

Selon les électrophorégrammes nous pouvons constater que les échantillons amplifiés à 24, 25 et 26 cycles de PCR ne comportent pas de saturation pour les deux séries analysées, mais les saturations sont visibles dans les profils des échantillons amplifiés à 27, 28 et 29 cycles de PCR pour les deux séries analysées (figure 23 et 24). Cette saturation diminue en décroissant le nombre de cycles d'amplification de 29 cycles à 24 cycles. Des exemples de profils génétiques complets sont présentés en Annexe 3.



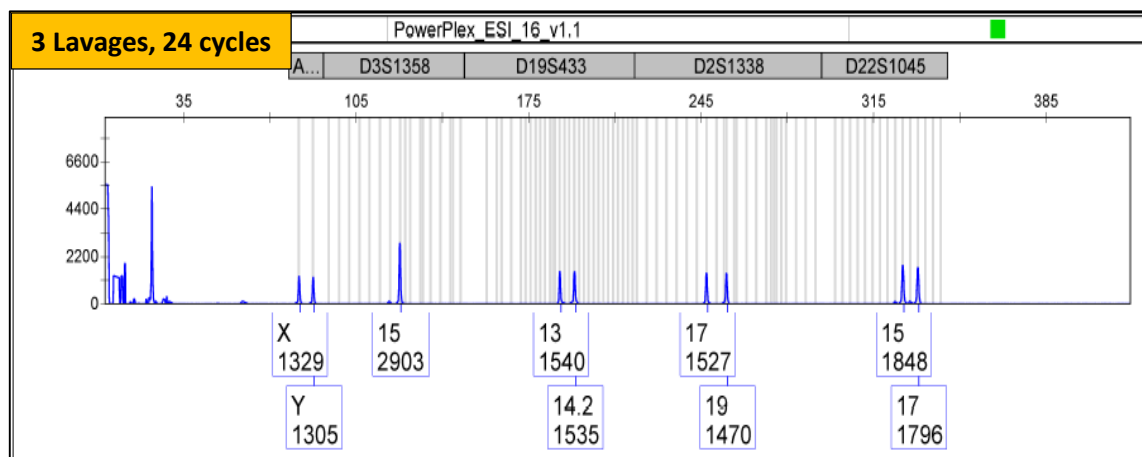
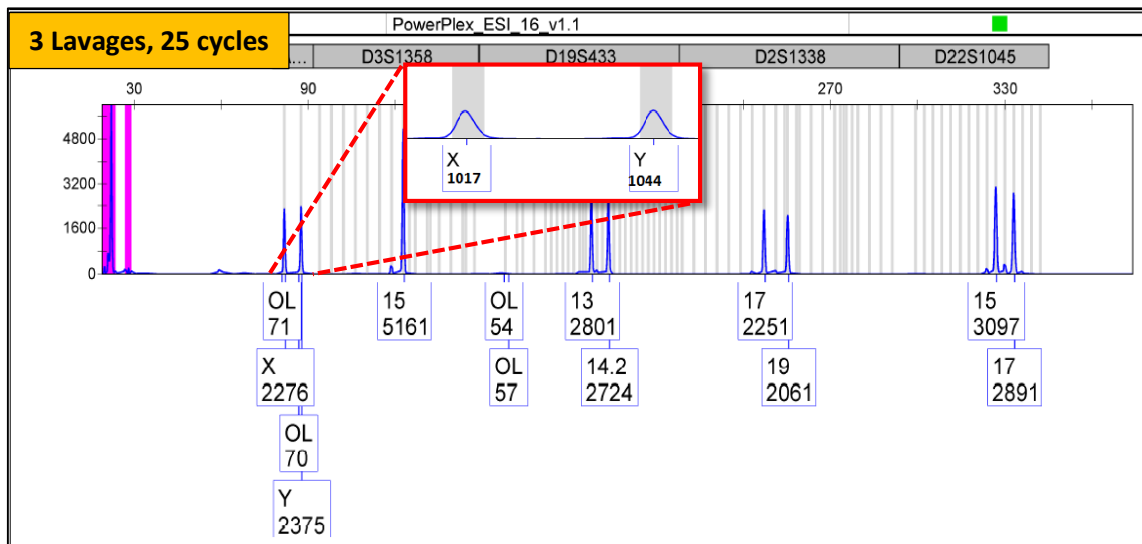
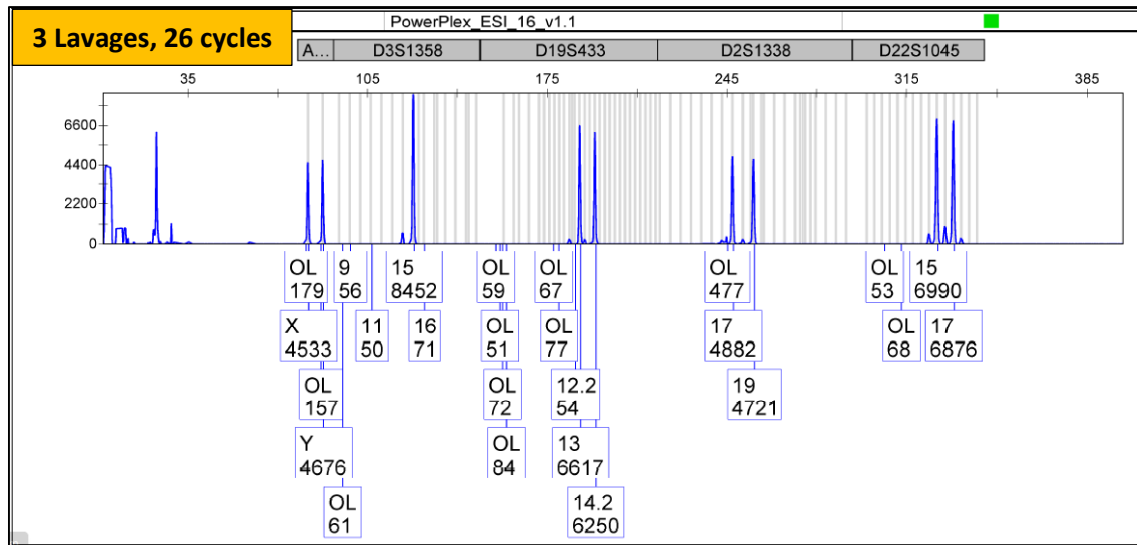
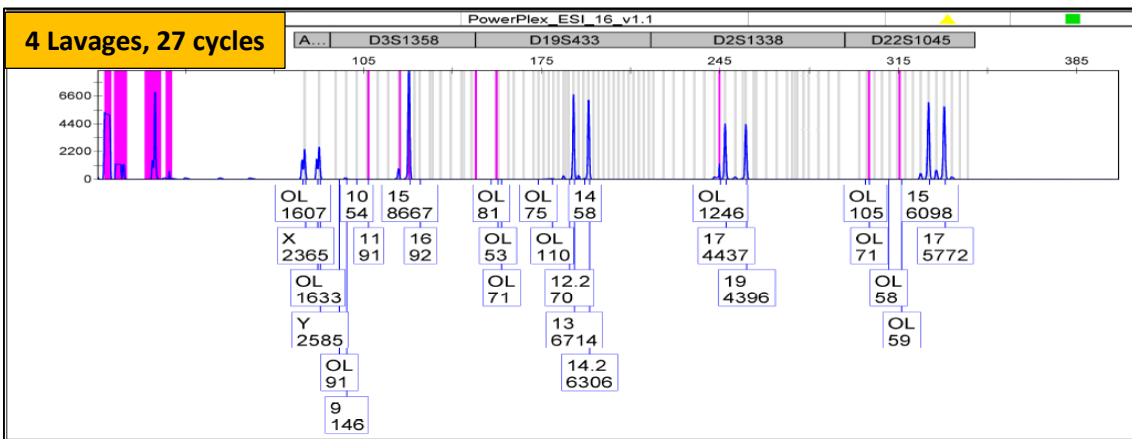
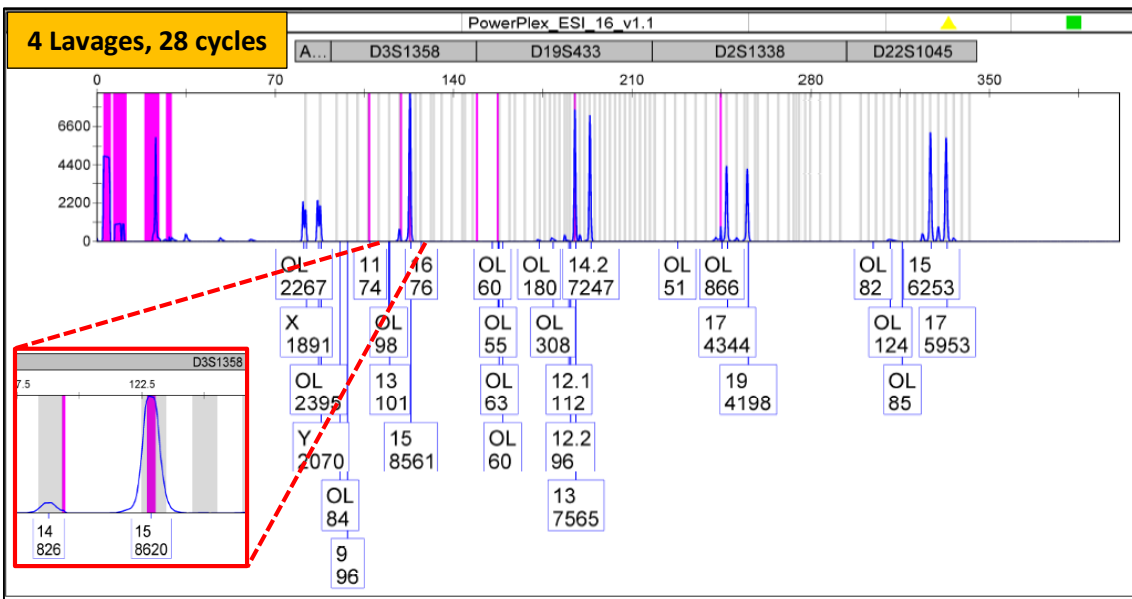
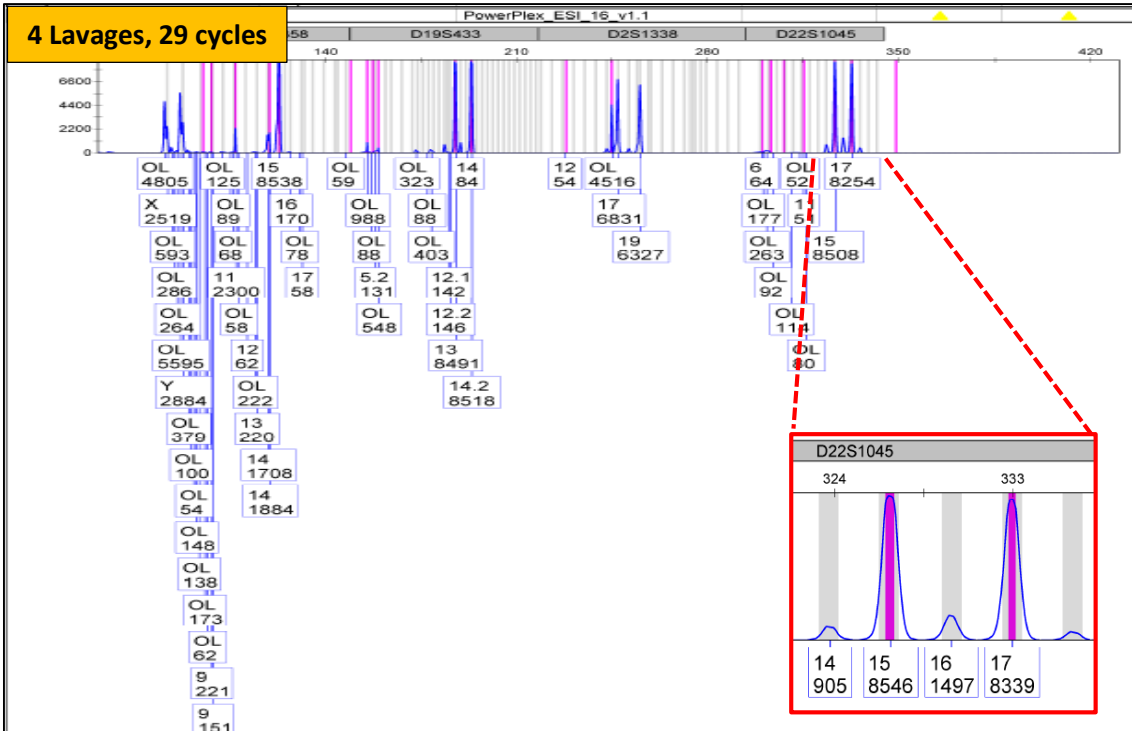


Figure 23 : Exemples de la première ligne des profils génétique obtenus après 3 lavages.



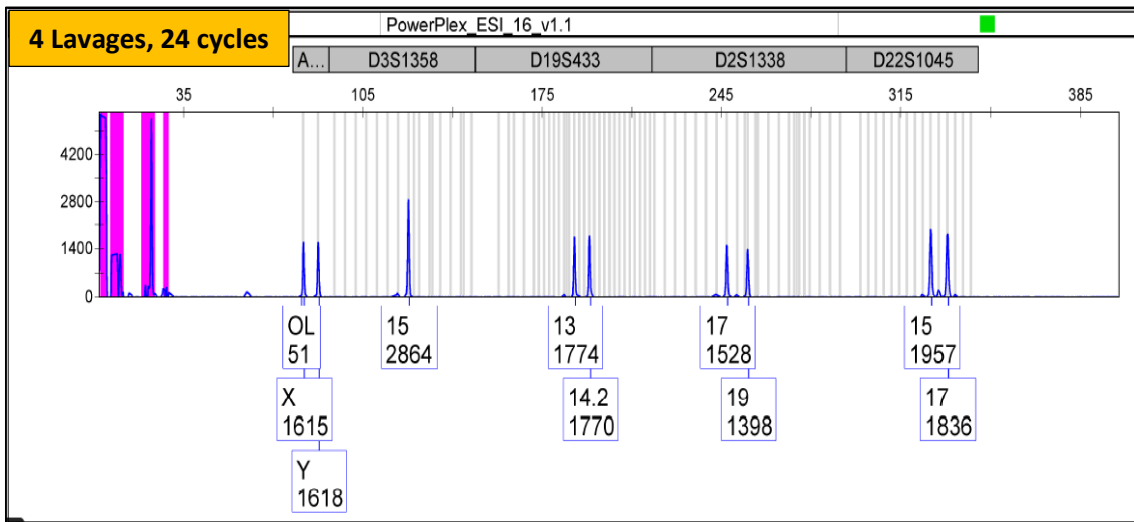
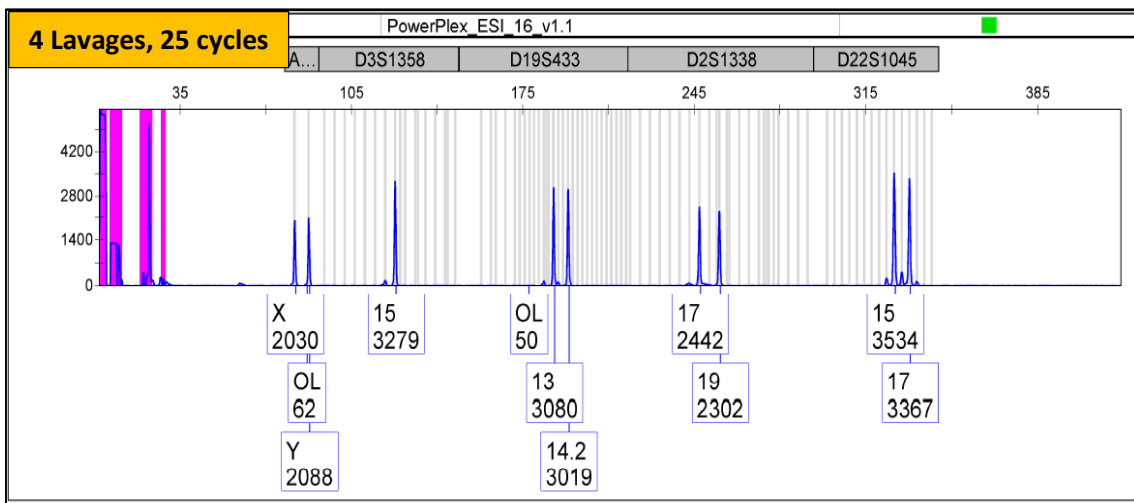
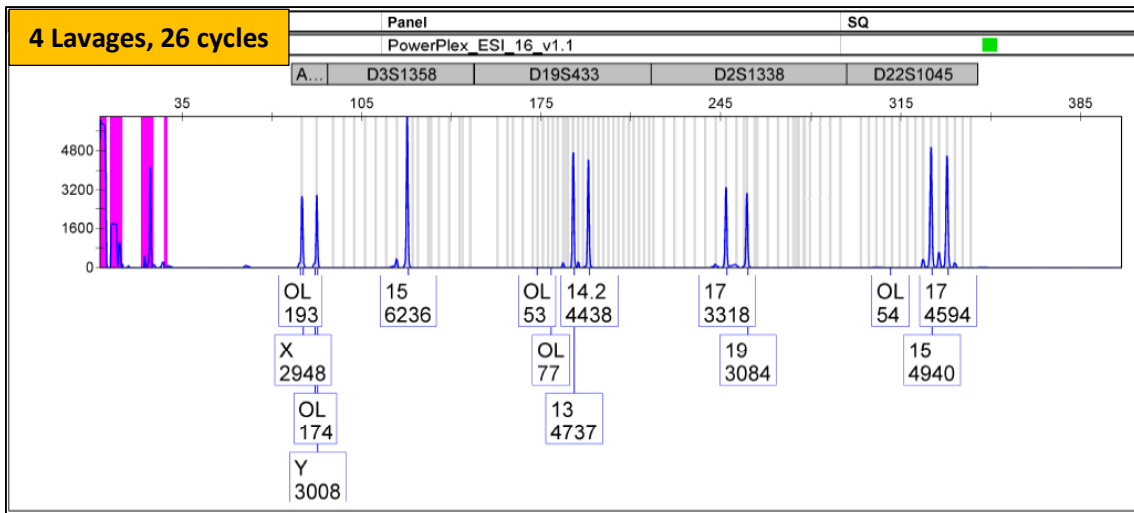


Figure 24 : Exemples de la première ligne des profils génétique obtenus après 4 lavages.

III.2. RÉSULTATS D'ANALYSE STATISTIQUE

III.2.1. Résultats de comparaison intra-groupe

III.2.1.1. Comparaison intra-groupe des échantillons amplifiés à 29 cycles

La comparaison entre chaque deux groupe d'échantillons amplifiés avec le même nombre de cycle de PCR nécessite d'abord une analyse des variables pour chaque groupe puis une élimination des échantillons contenant des valeurs aberrantes afin de réduire le risque d'erreur lors de la comparaison inter-groupes.

Pour avoir une idée visuelle sur la différence entre les électrophorégrammes des échantillons de même groupe, des graphiques sous formes de courbes représentant les hauteurs de pics correspondants aux différents marqueurs ont été réalisées pour chaque groupe d'échantillon à analyser. Les courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois puis amplifiés avec 29 cycles de PCR sont présentées dans la figure 25.

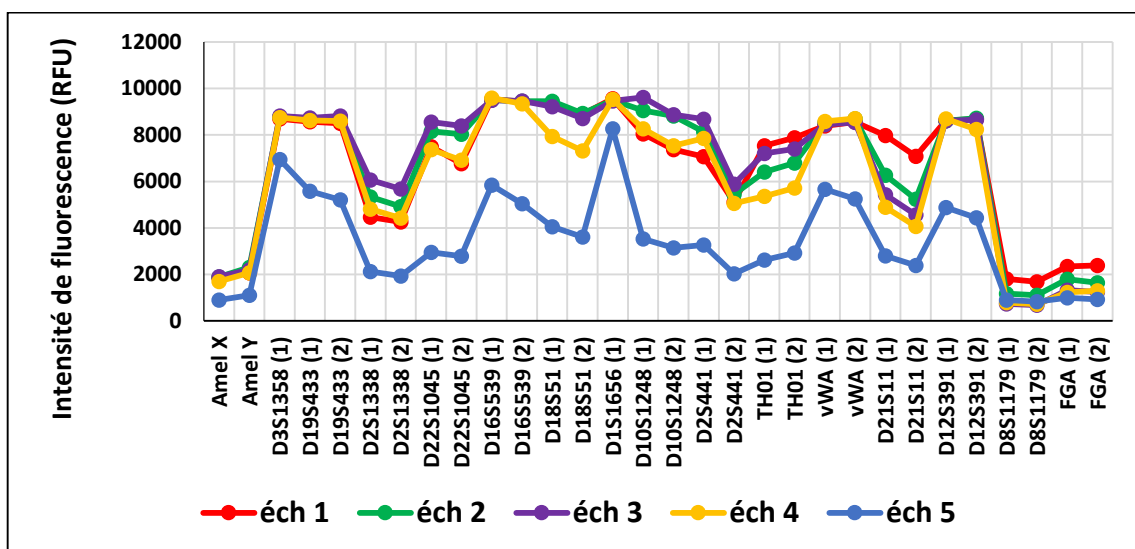


Figure 25 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois, amplifiés avec 29 cycles de PCR

Les marqueurs de l'échantillon 5 ont des valeurs très faibles, ils présentent une courbe qui semble plus éloignée des autres. Sur la base de ces courbes, nous pouvons considérer que les échantillons 1, 2, 3 et 4 présentent des pics avec des valeurs similaires alors que celles de l'échantillon 5 semblent aberrantes donc à exclure de la comparaison inter-groupes, mais aucune supposition ne pourrait être retenue sans une analyse statistique.

1) Représentation graphiques

a) Choix du nombre d'axes à retenir

Afin de mieux représenter les nuages de points, il faut retenir les axes dont les valeurs propres sont les plus importantes (Tableau VI). On peut par exemple pour le groupe d'échantillons de 3 lavages, 29 cycles de PCR se contenter de sélectionner les deux premiers axes. En effet, d'un côté, la chute d'inertie est très importante dès le troisième axe, qui ne conserve que 1,159 % de l'inertie totale ; de l'autre, les deux premiers axes conservent plus de 98,531 % de l'inertie ce qui est excellent. Avec les deux premiers axes, nous disposons donc d'un espace compréhensible par l'œil sans subir une déformation trop prononcée du nuage. Le choix des axes pour la représentation des autres échantillons a été effectué de la même manière.

Tableau VI. Tableau des valeurs propres

	F1	F2	F3	F4
Valeur propre	14,557	2,193	0,197	0,053
Variabilité (%)	85,631	12,900	1,159	0,310
% cumulé	85,631	98,531	99,690	100,000

b) Nuage de points

Le nuage de points est construit en projection sur un plan à des axes factoriels, considérés comme virtuels dans cette étude. La présentation de ce nuage permettra de visualiser les corrélations qui existent entre les différentes variables (hauteurs de pics) et d'identifier les échantillons ayant pris des hauteurs de pics proches sur certaines marqueurs.

Le but final de cette analyse de corrélation est d'identifier et d'éliminer l'échantillon qui est moins corrélé aux autres, car, pour chaque échantillon soumis à des conditions bien précises, seulement 5 répétitions ont été considérées (5 échantillons/ groupe). Ces 5 répétitions ont pu ne pas avoir le même résultat et fausser la moyenne obtenue par groupe.

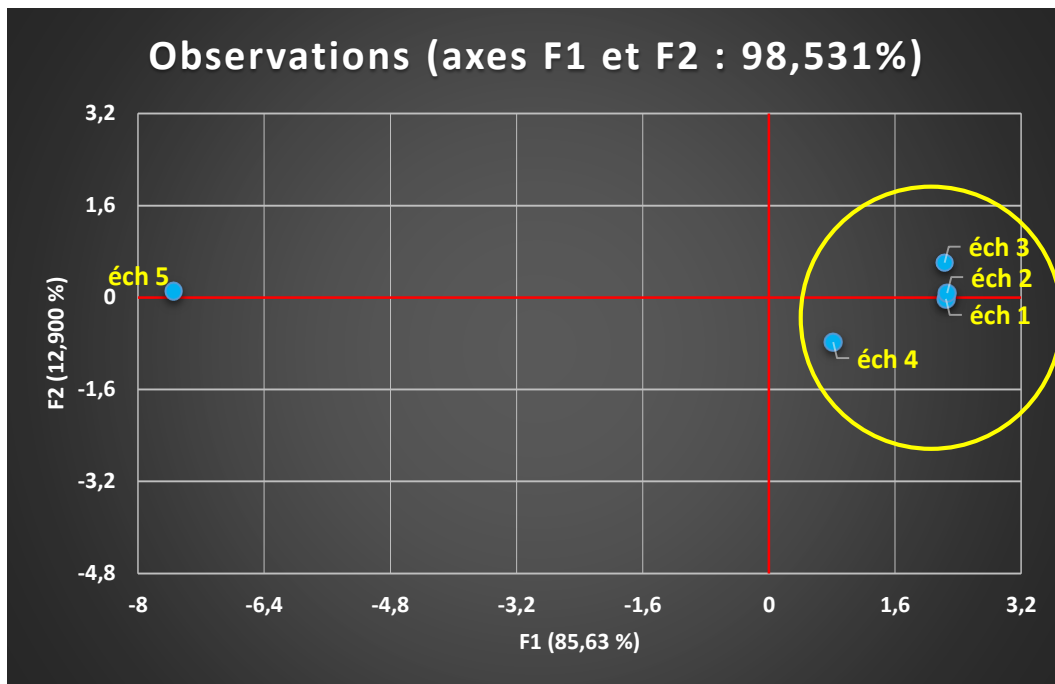


Figure 26 : Graphe de nuage de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 3 fois et amplifiés à 29 cycles de PCR

Pour les 5 échantillons lavés 3 fois, puis amplifiés avec 29 cycles de PCR, au vu des graphiques, on peut distinguer que les échantillons qui participent le plus à la formation de l'axe 2 sont les échantillons 1 ; éch 2 ; éch 3 et éch 4. On observe aussi un éloignement trop important de l'échantillon 5 par rapport à l'ensemble des échantillons. Cet échantillon a une forte contribution négative à l'axe 1 ; il est caractérisé en réalité par des valeurs très faibles (hauteurs de pics très faibles par rapport aux autres). Donc, l'échantillon 5 a été exclu de l'ensemble des échantillons amplifiés à 29 cycles et lavés 3 fois, puis la comparaison inter-groupes a été effectuée en prenant compte que des 4 échantillons restants. Les échantillons des autres groupes ont été sélectionnés de la même manière. Les graphiques de groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés avec 29 cycles de PCR sont représentés dans les figures 27 et 28.

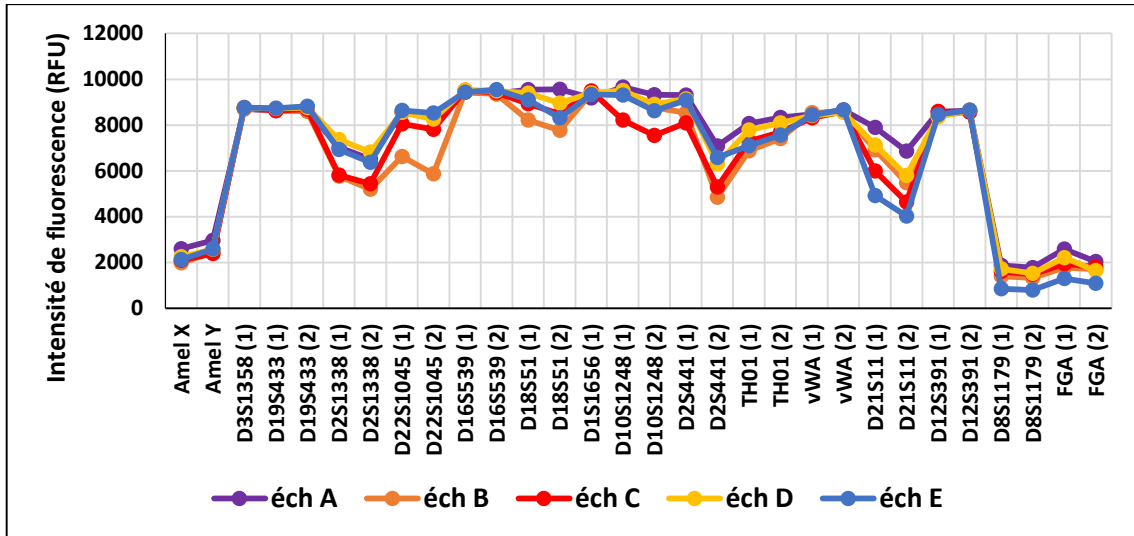


Figure 27 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 4 fois, amplifiés avec 29 cycles de PCR

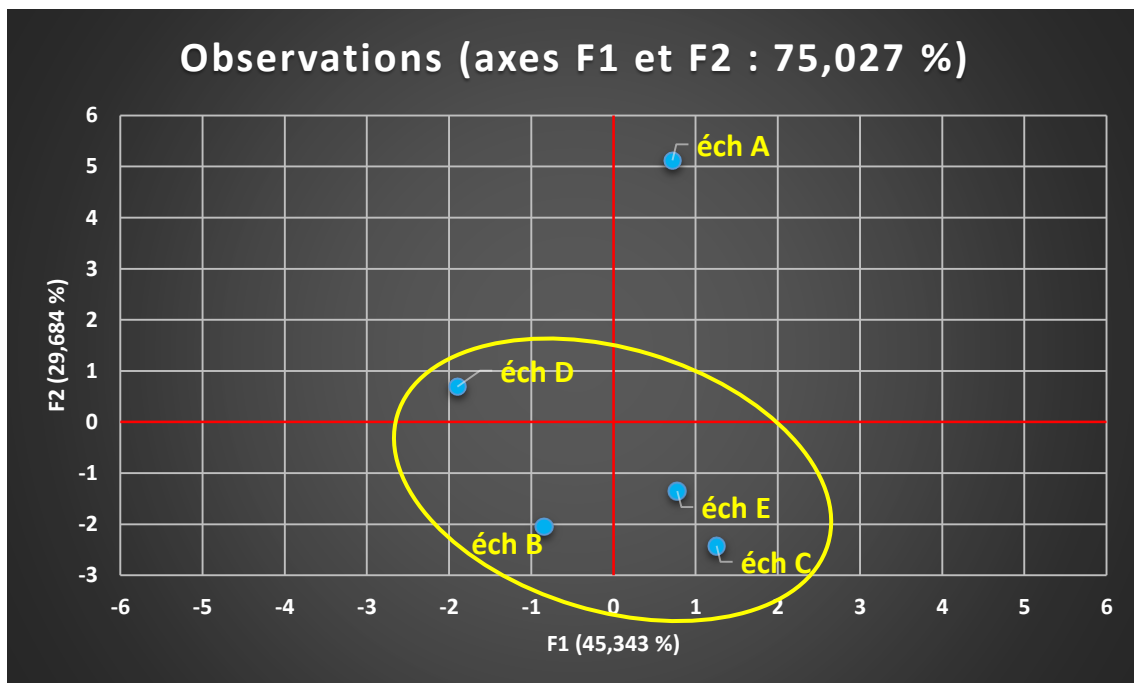


Figure 28 : Graphe de nuage de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés à 29 cycles de PCR

III.2.1.2. Comparaison intra-groupe des échantillons amplifiés à 28 cycles

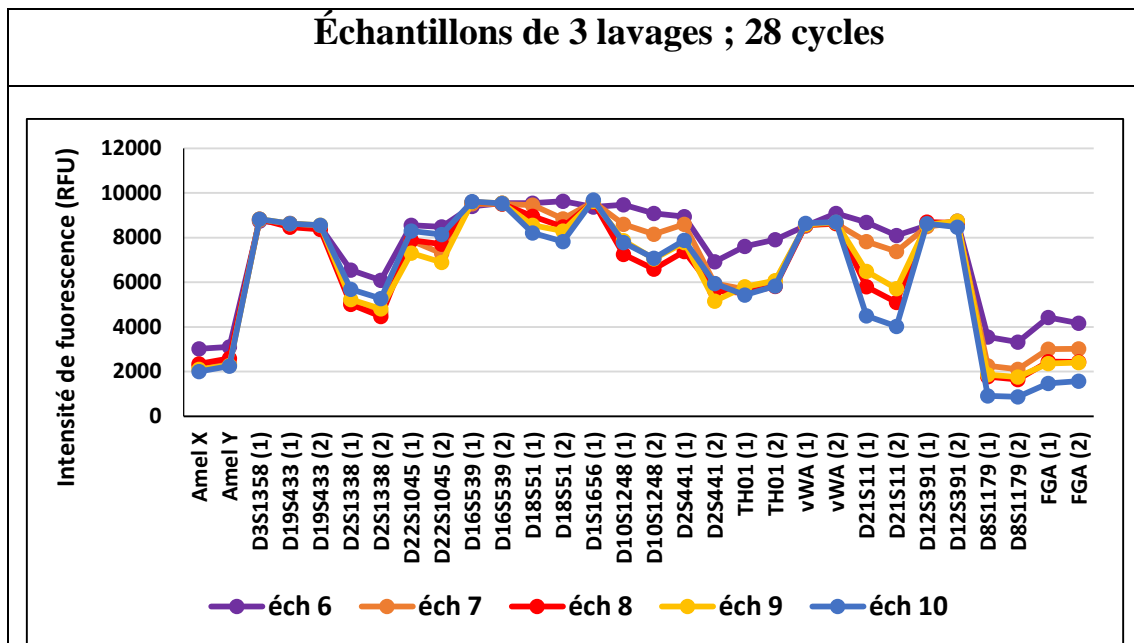


Figure 29 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois, amplifiés avec 28 cycles de PCR

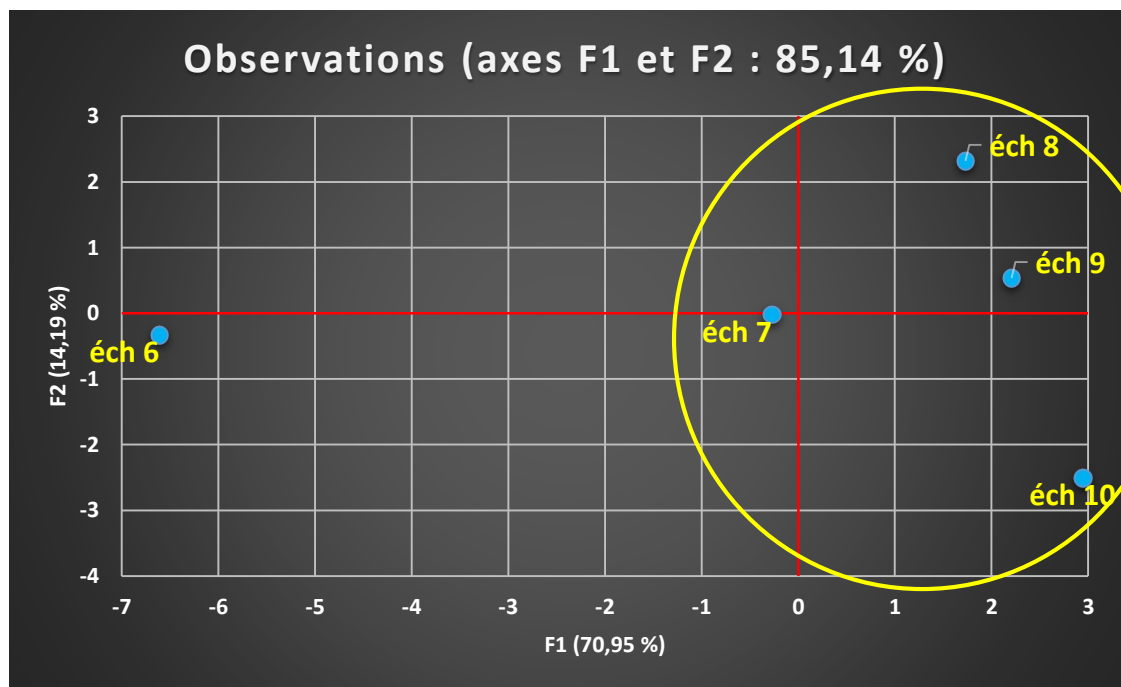


Figure 30 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 3 fois et amplifiés à 28 cycles de PCR

Échantillon inclus	Échantillons exclus
7 ; 8 ; 9 ; 10	6

Échantillons de 4 lavages ; 28 cycles

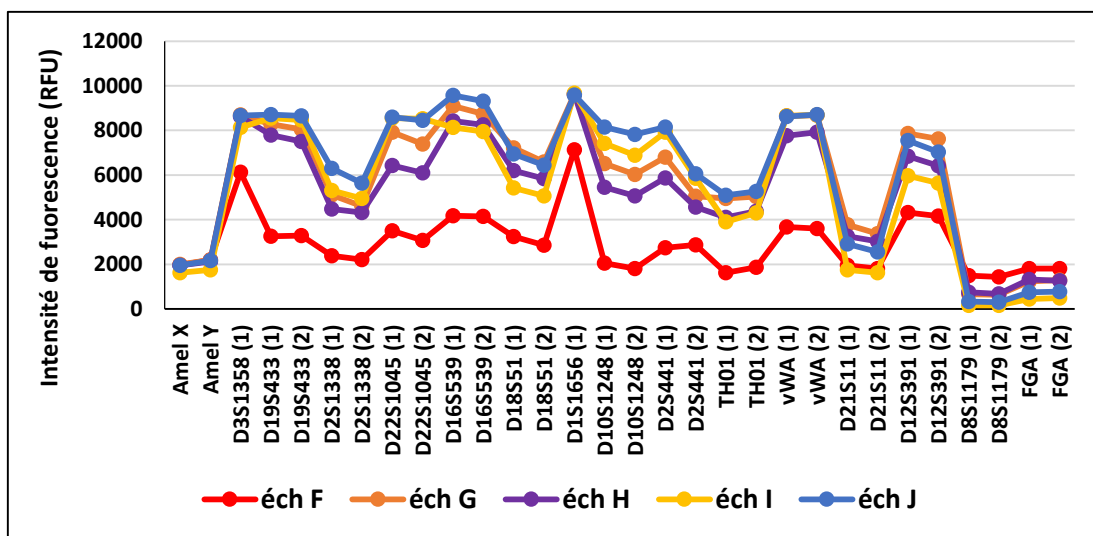


Figure 31 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 4 fois, amplifiés avec 28 cycles de PCR

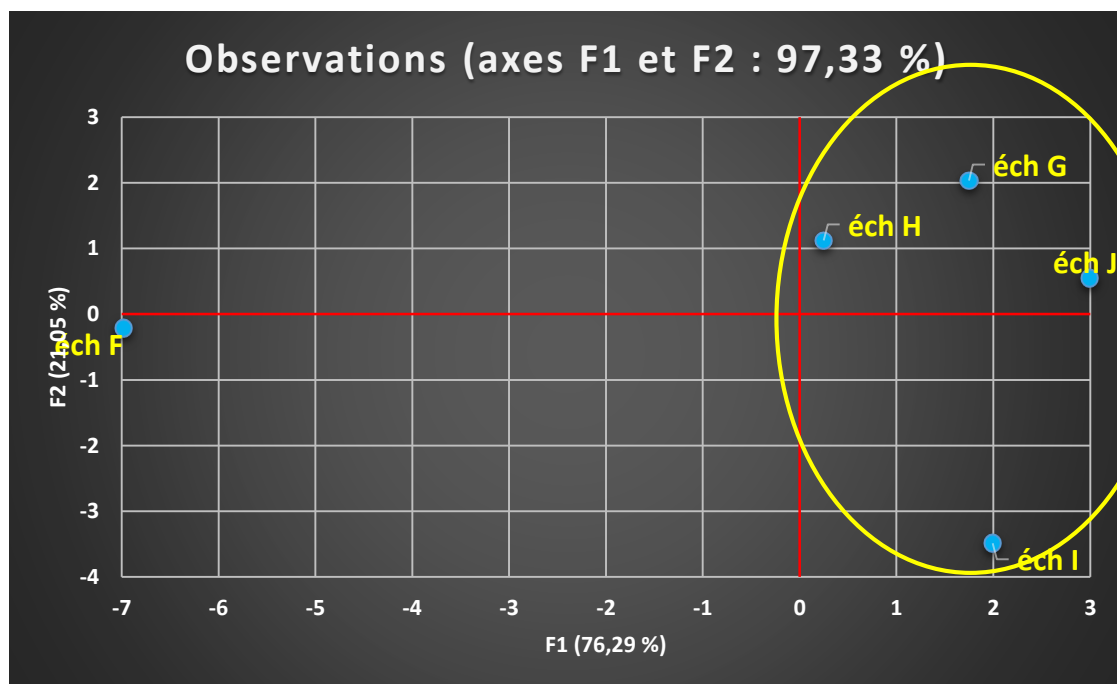


Figure 32 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés à 28 cycles de PCR

Échantillon inclus	Échantillons exclus
G ; H ; I ; J	F

III.2.1.3. Comparaison intra-groupe des échantillons amplifiés à 27 cycles

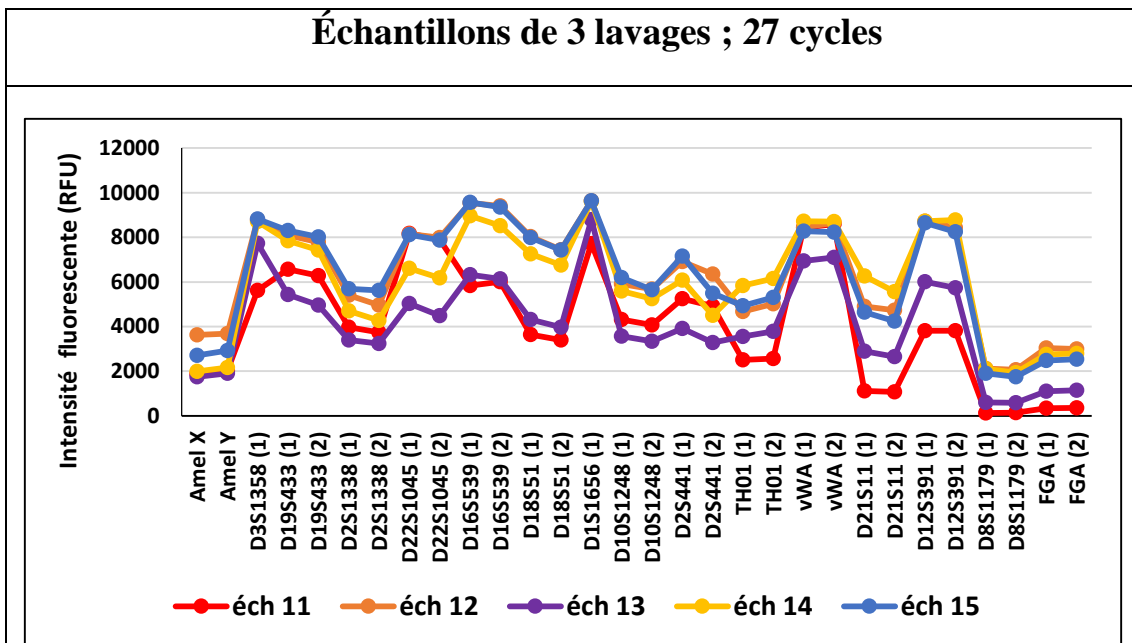


Figure 33 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois, amplifiés avec 27 cycles de PCR

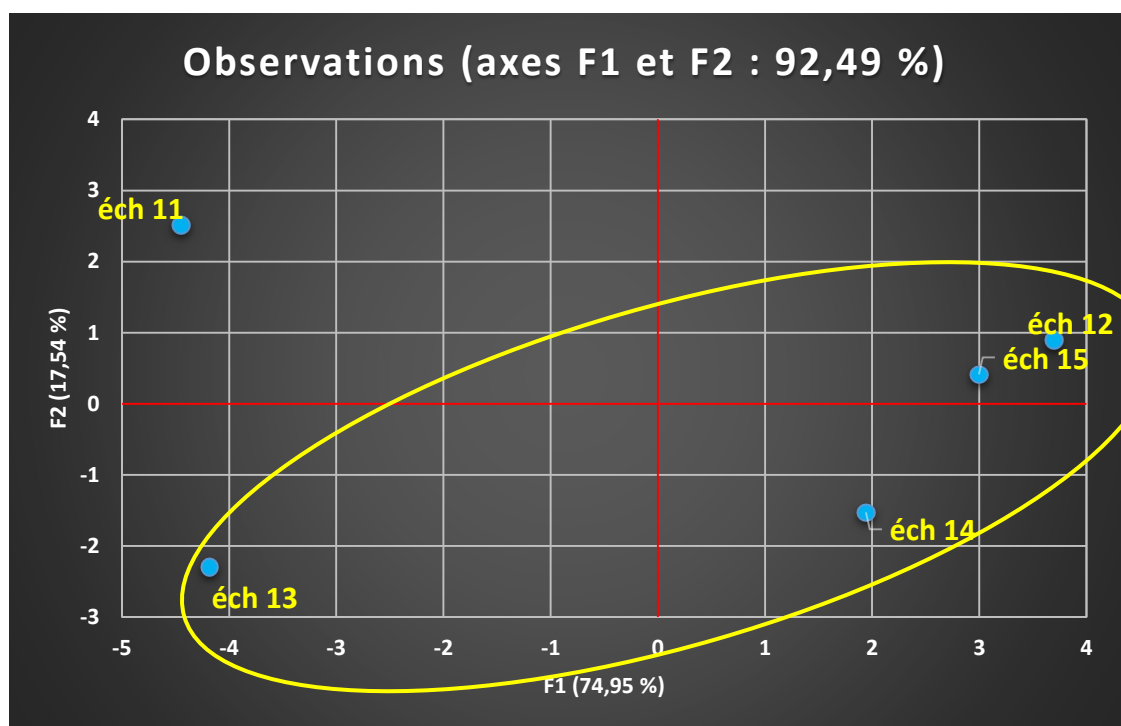


Figure 34 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 3 fois et amplifiés à 27 cycles de PCR

Échantillon inclus	Échantillons exclus
12 ; 13 ; 14 ; 15	11

Échantillons de 4 lavages ; 27 cycles

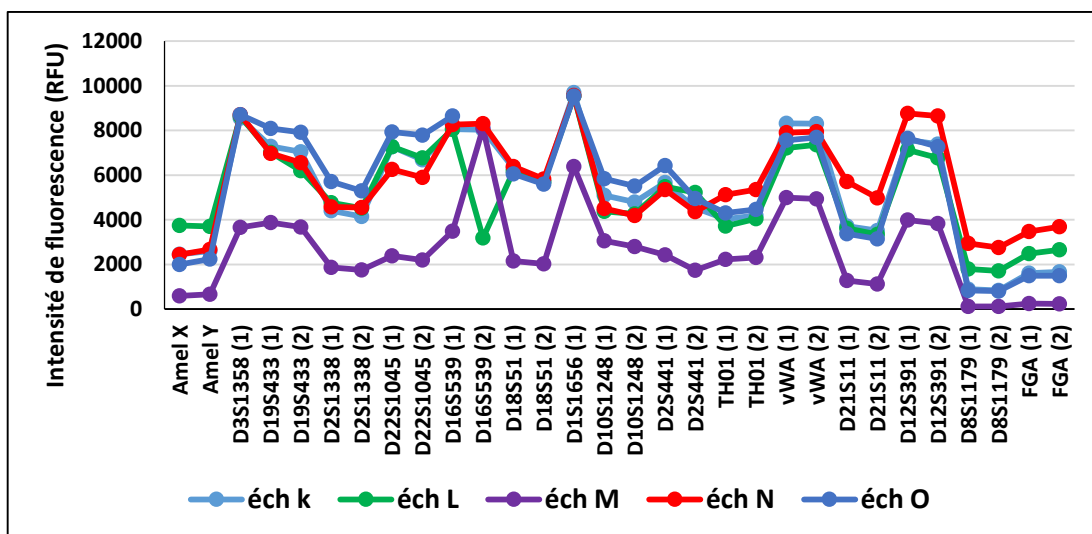


Figure 35 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 4 fois, amplifiés avec 27 cycles de PCR

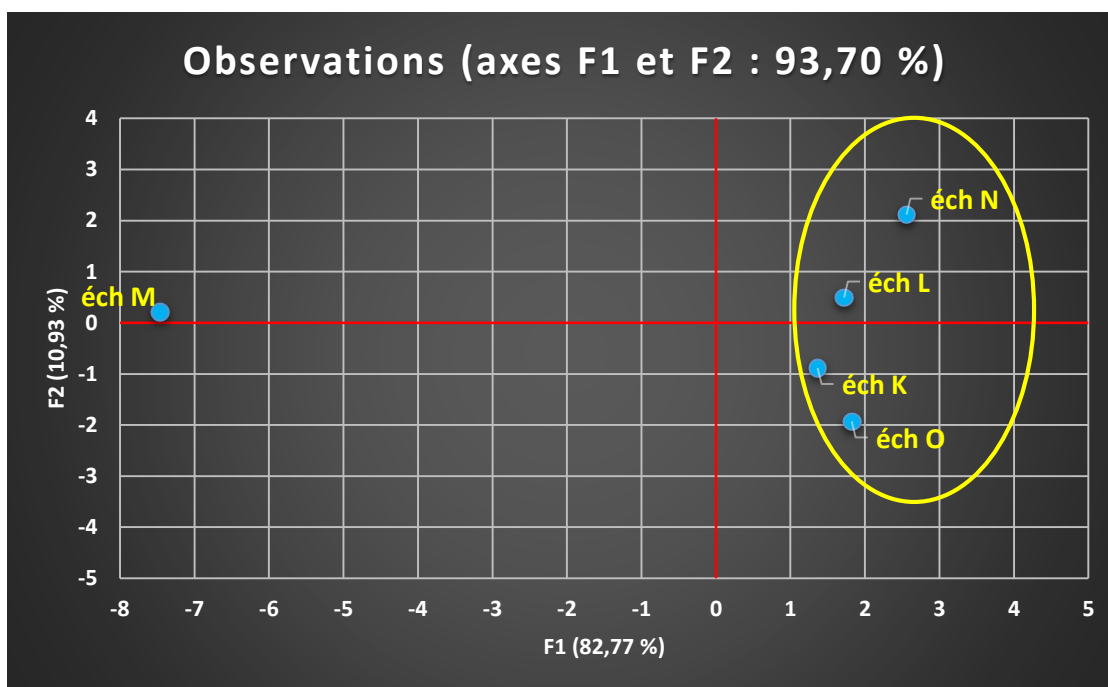


Figure 36 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés à 27 cycles de PCR

Échantillon inclus	Échantillons exclus
L ; N ; O ; K	M

III.2.1.4. Comparaison intra-groupe des échantillons amplifiés à 26 cycles

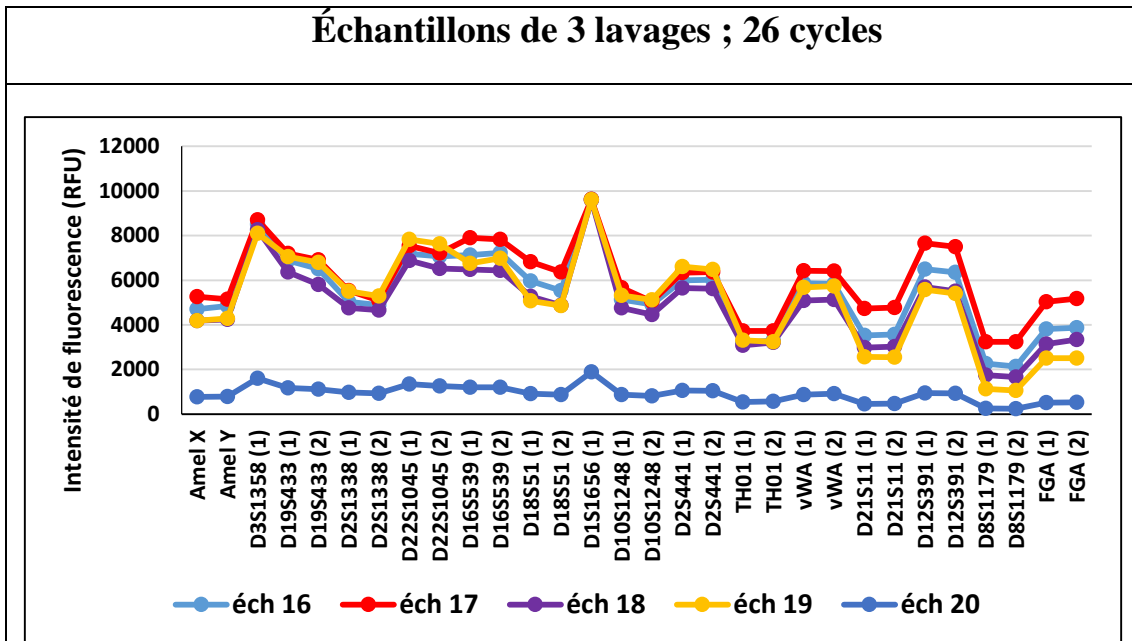


Figure 37 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois, amplifiés avec 26 cycles de PCR

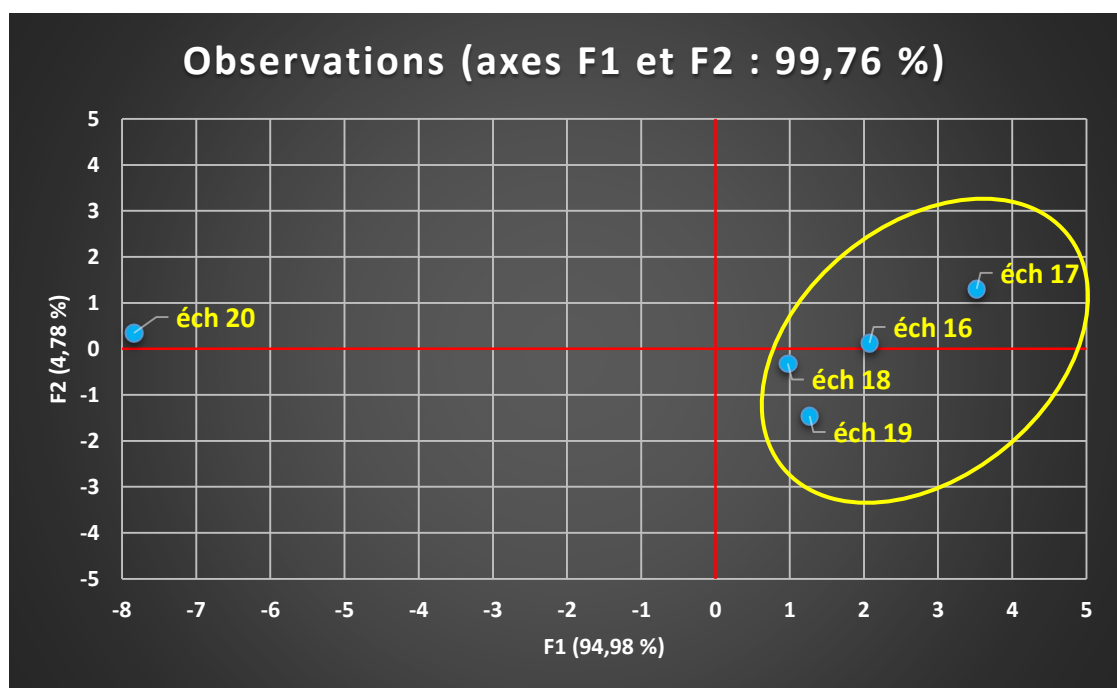


Figure 38 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 3 fois et amplifiés à 26 cycles de PCR

Échantillon inclus	Échantillons exclus
16 ; 17 ; 18 ; 19	20

Échantillons de 4 lavages ; 26 cycles

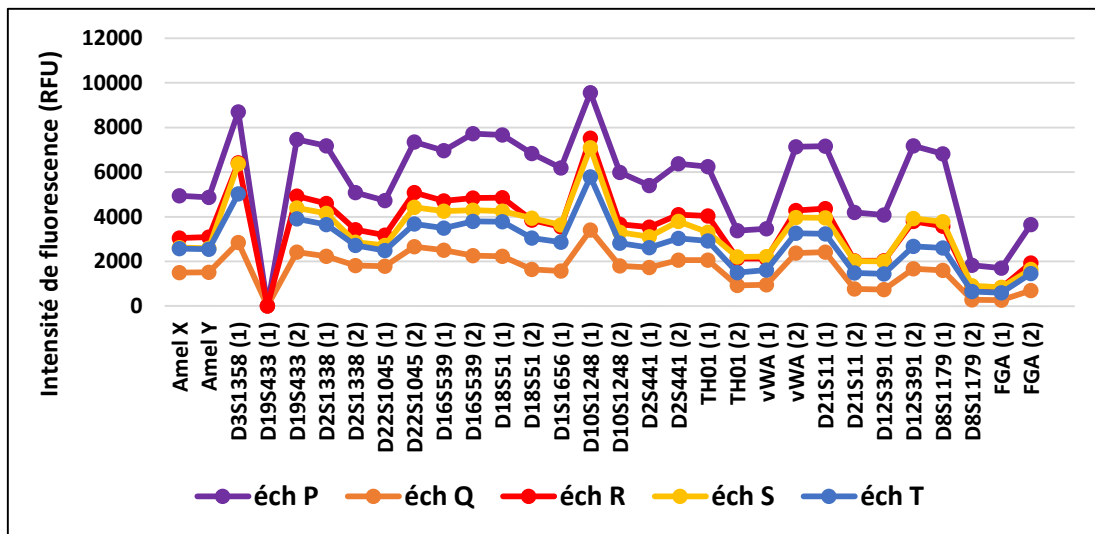


Figure 39 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 4 fois, amplifiés avec 26 cycles de PCR

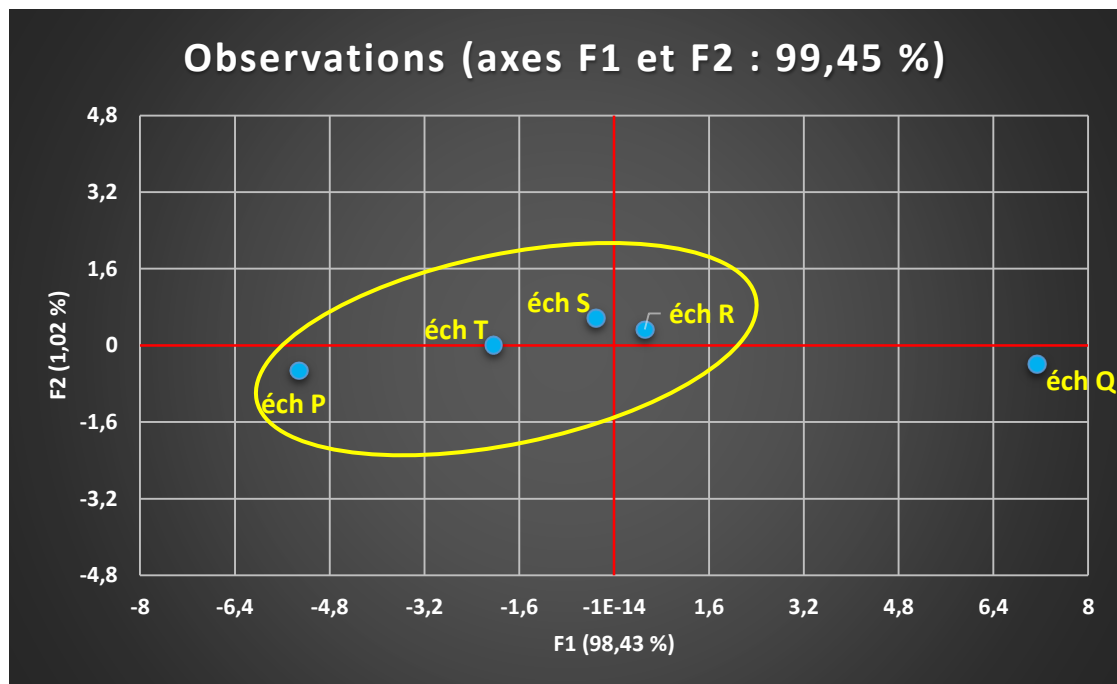


Figure 40 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés à 26 cycles de PCR

Échantillon inclus	Échantillons exclus
P ; S ; T ; R	Q

III.2.1.5. Comparaison intra-groupe des échantillons amplifiés à 25 cycles

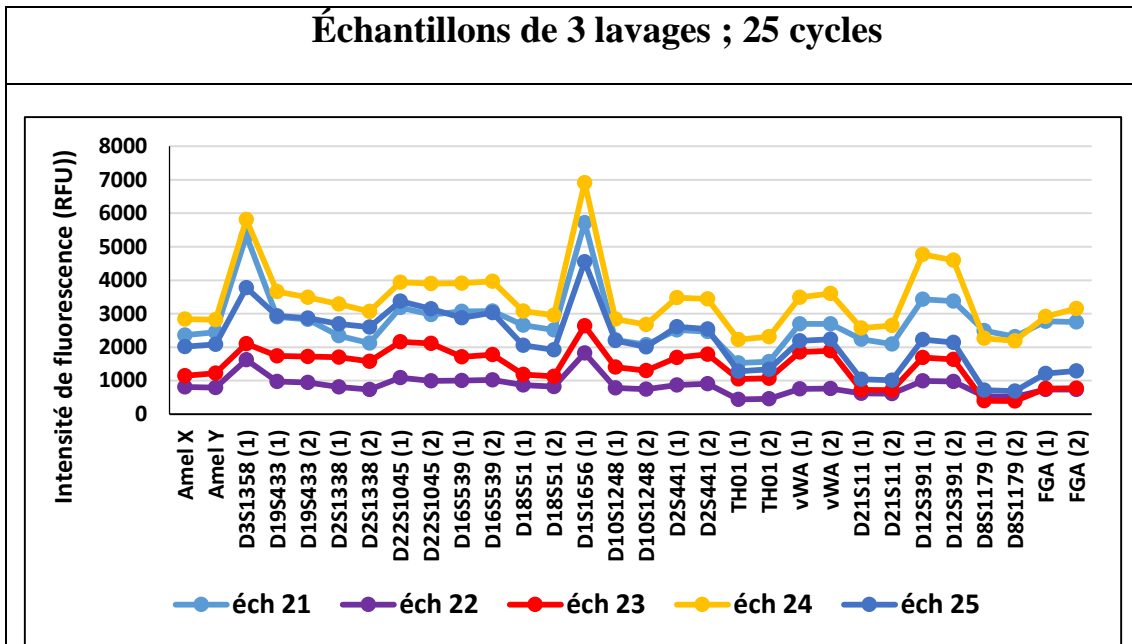


Figure 41 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois, amplifiés avec 25 cycles de PCR

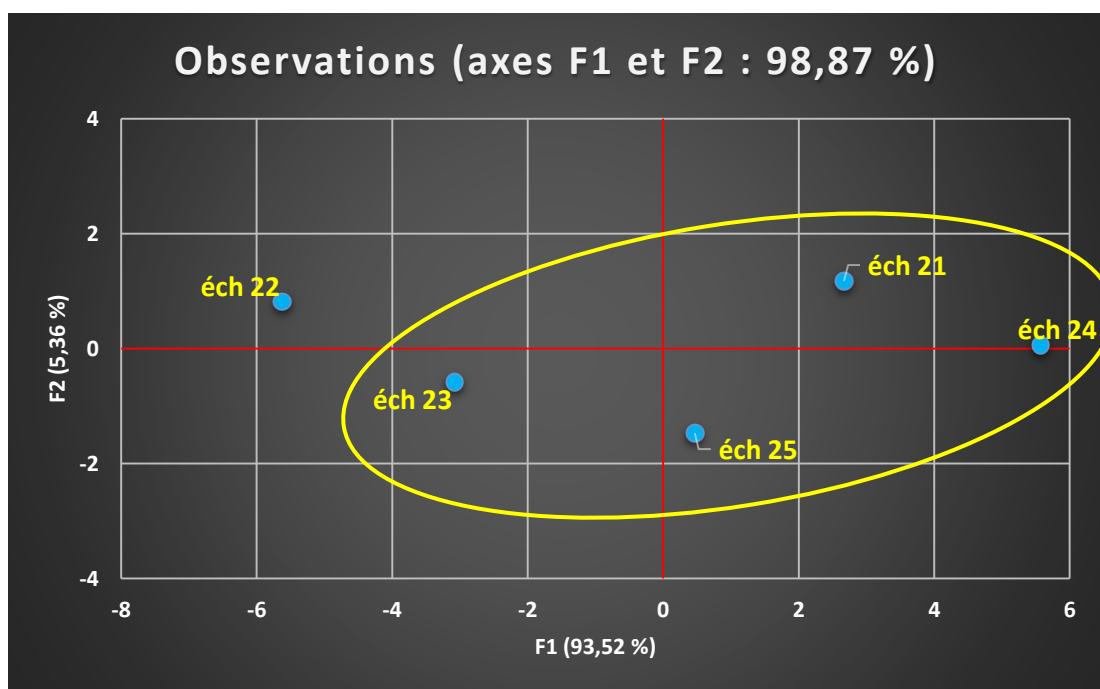


Figure 42 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 3 fois et amplifiés à 25 cycles de PCR

Échantillon inclus	Échantillons exclus
21 ; 23 ; 24 ; 25	22

Échantillons de 4 lavages ; 25 cycles

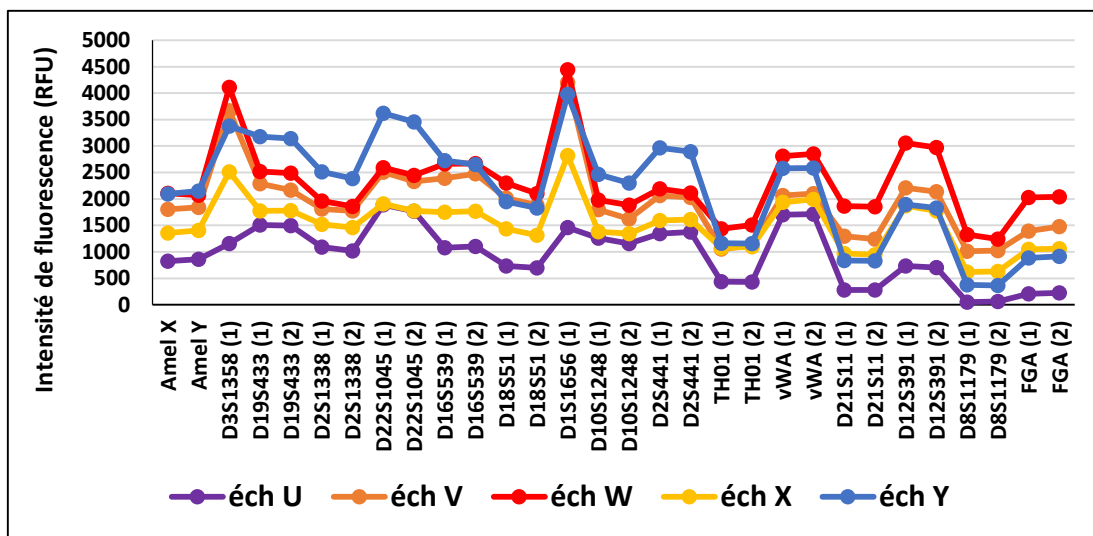


Figure 43 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 4 fois, amplifiés avec 25 cycles de PCR

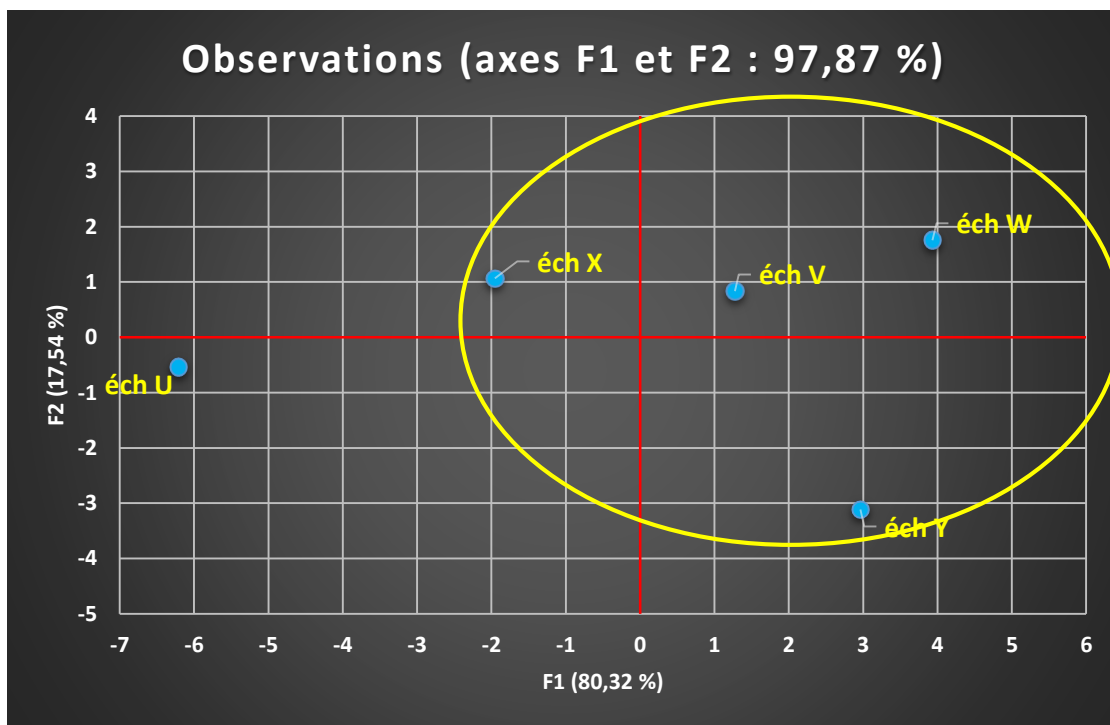


Figure 44 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés à 25 cycles de PCR

Échantillon inclus	Échantillons exclus
V ; W ; X ; Y	U

III.2.1.6. Comparaison intra-groupe des échantillons amplifiés à 24 cycles

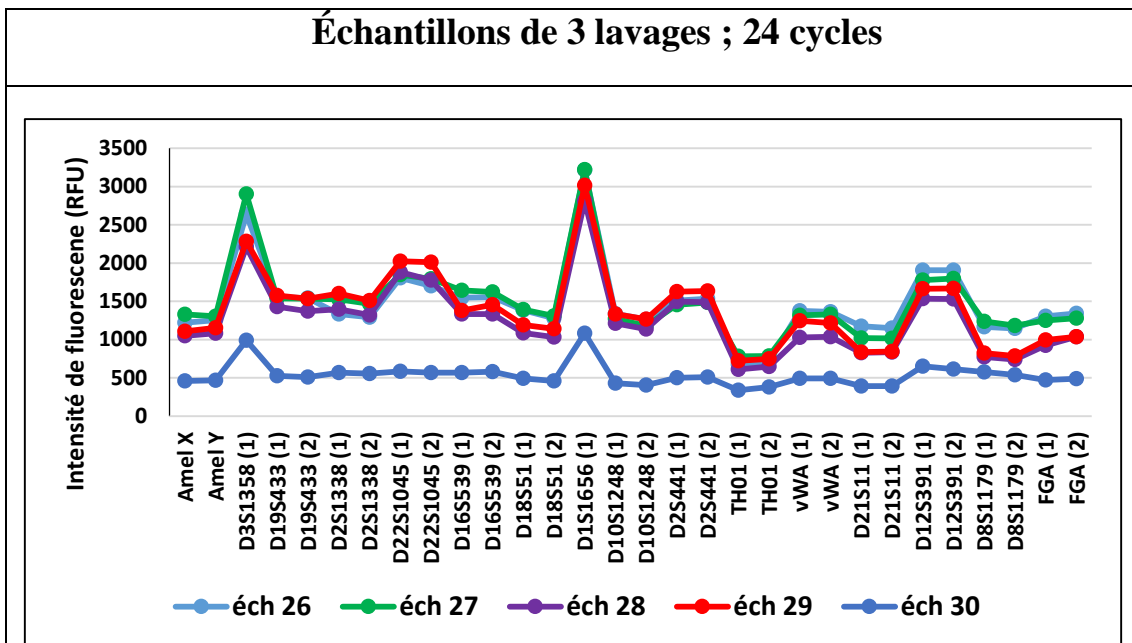


Figure 45 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 3 fois, amplifiés avec 24 cycles de PCR

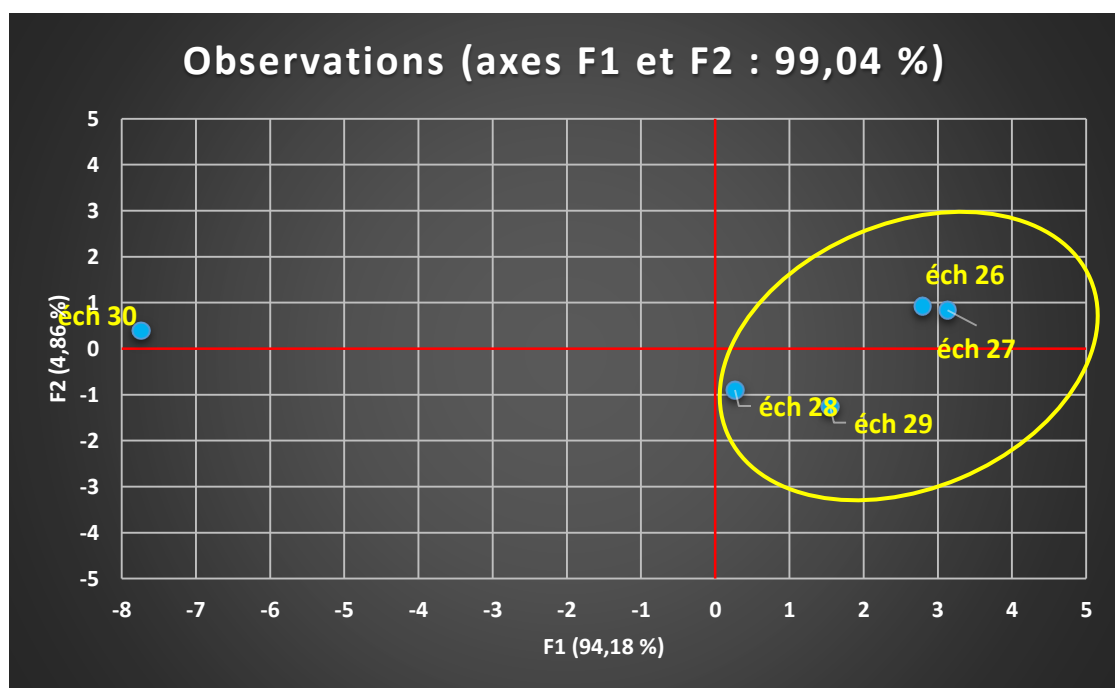


Figure 46 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 3 fois et amplifiés à 24 cycles de PCR

Échantillon inclus	Échantillons exclus
26 ; 27 ; 28 ; 29	30

Échantillons de 4 lavages ; 24 cycles

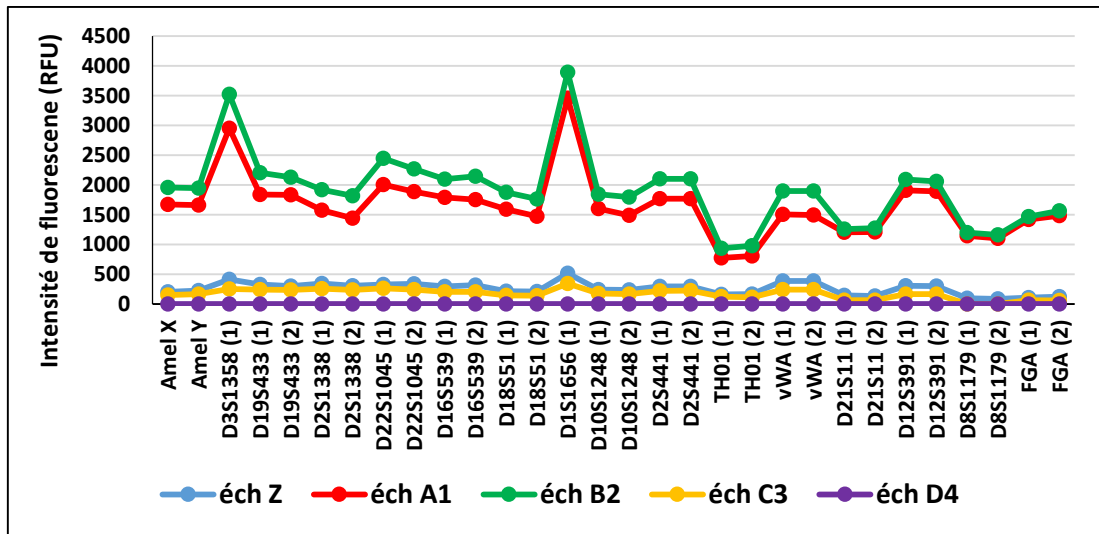


Figure 47 : Courbes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN lavés 4 fois, amplifiés avec 24 cycles de PCR

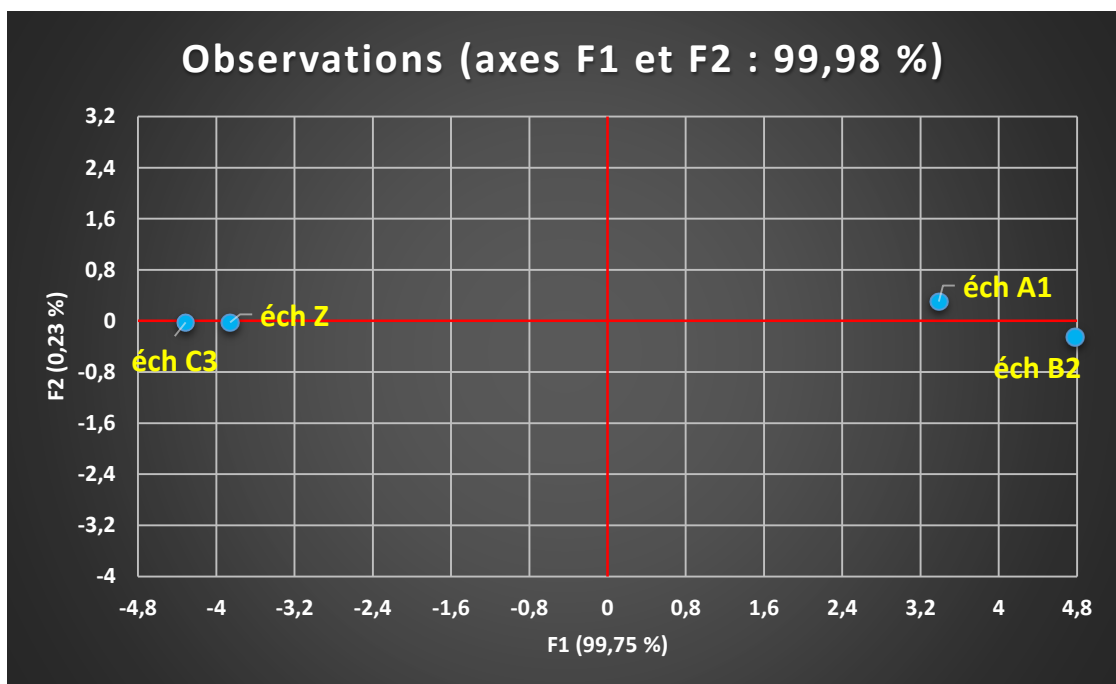


Figure 48 : Nuages de points sur le plan factoriel (1,2) : groupe d'échantillons lavés 4 fois et amplifiés à 24 cycles de PCR

Échantillon inclus

On remarque la formation de deux groupes désassemblés (éch Z, éch C3 et éch A1, éch B2), mais vu qu'un échantillon n'a donné aucun profil (D4), donc les 4 échantillons restants ont été obligatoirement retenus pour la comparaison inter-groupes malgré leur hétérogénéité distincte.

III.2.2. Résultats de comparaison inter-groupes

Les graphiques des moyennes des hauteurs de pics obtenus de génotypage de chaque deux groupe d'échantillons d'ADN amplifiés avec le même nombre de cycle ont été présentés dans les figures 49, 50, 51, 52,53 et 54.

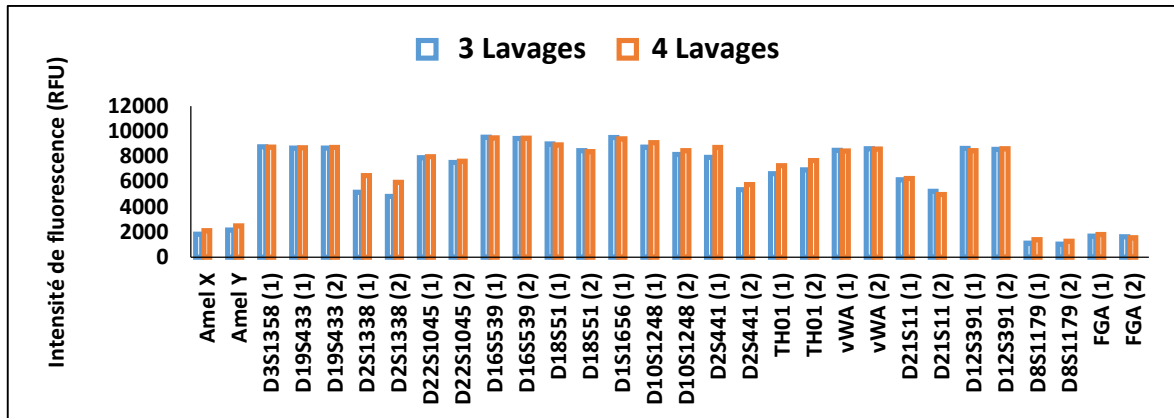


Figure 49 : Graphique des moyennes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN amplifiés avec 29 cycles de PCR

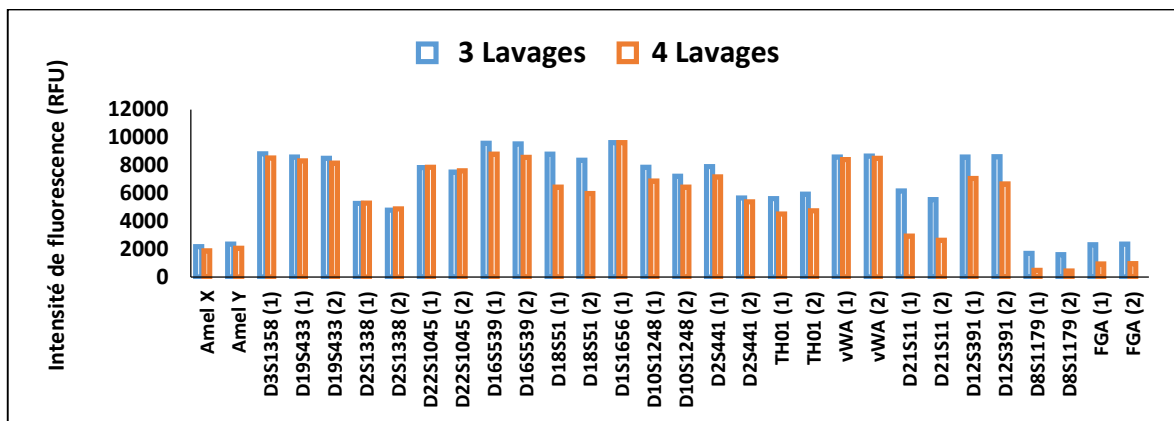


Figure 50 : Graphique des moyennes des hauteurs de pics d'électrophorégrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN amplifiés avec 28 cycles de PCR

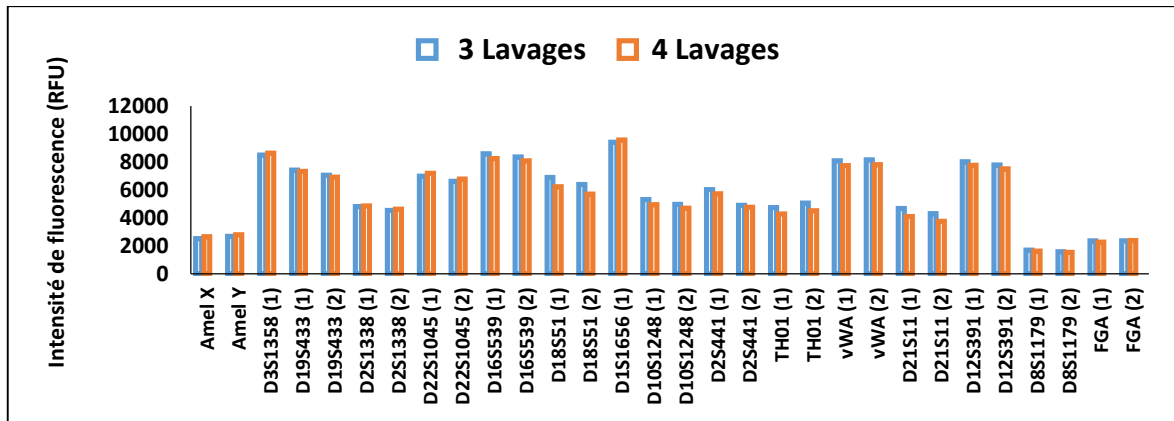


Figure 51 : Graphique des moyennes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN amplifiés avec 27 cycles de PCR

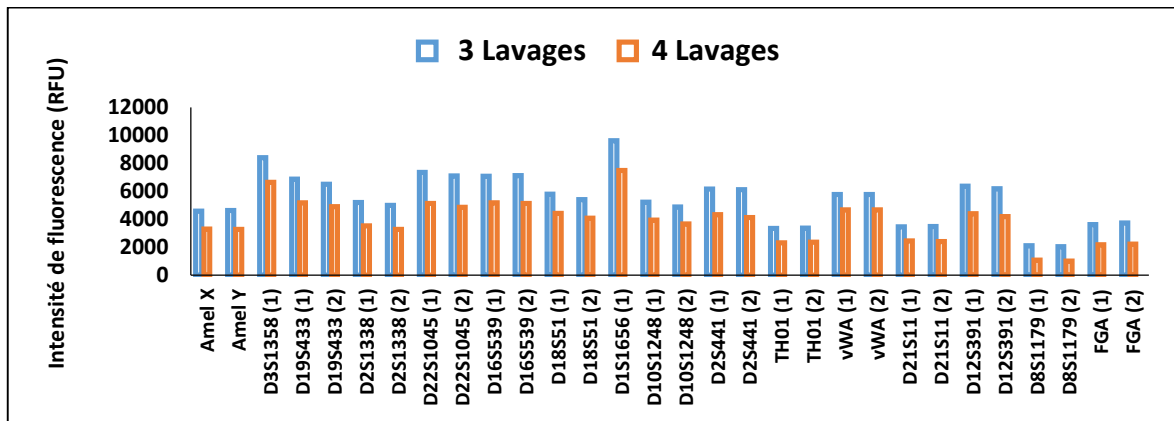


Figure 52 : Graphique des moyennes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN amplifiés avec 26 cycles de PCR

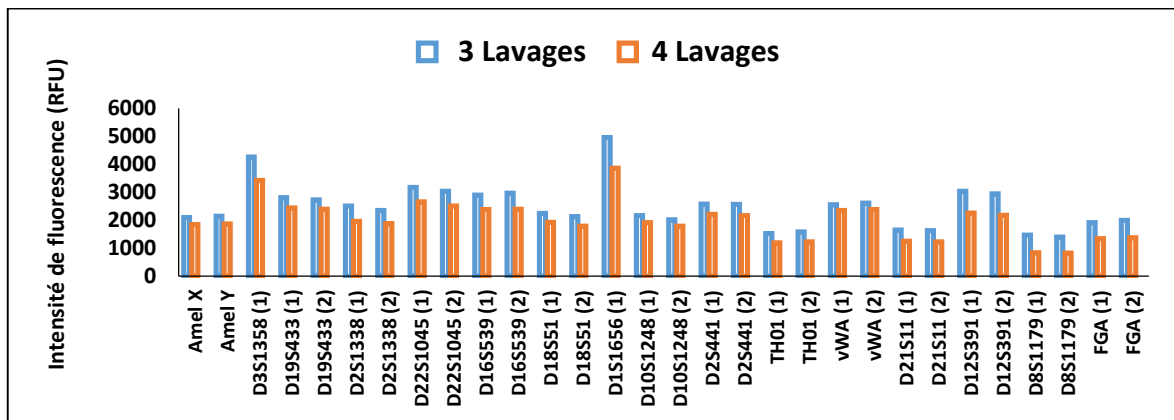


Figure 53 : Graphique des moyennes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN amplifiés avec 25 cycles de PCR

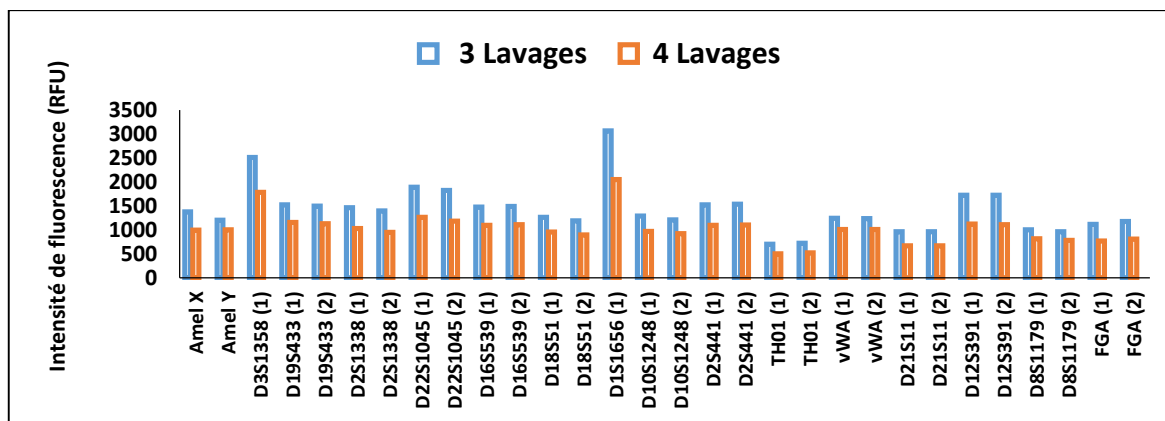


Figure 54 : Graphique des moyennes des hauteurs de pics d'électrophorogrammes obtenus de génotypage des échantillons d'ADN amplifiés avec 24 cycles de PCR

En utilisant la valeur de p critique à 0,05 ; on ne constate aucune différence significative entre les hauteurs de pics obtenus des échantillons de la série 1 et ceux de la série 2 ($p > 0,05$) pour tous les groupes d'échantillons amplifiés à différents cycles par PCR (29, 28, 27, 26, 25, 24 cycles). Les valeurs p calculés se trouvent en Annexe 2.

Cela montre qu'il n'existe aucune interaction entre la quantité d'ADN initiale immobilisée sur la carte FTA® et le nombre de lavages au tampon TE ce qui signifie que les fragments d'ADN extraits puis fixés sur le papier de la carte n'ont subi aucune perte même en rajoutant un autre lavage avec le tampon TE.

III.2.3. Choix de nombre de cycle adéquat

III.2.3.1. Série d'échantillons de 3 lavages

Une analyse en composantes principales ACP a été effectuée en utilisant les moyennes de chaque marqueur pour le même groupe d'échantillons comme variables. La moyenne pour chaque groupe a été calculée en prenant compte que des 4 échantillons les plus corrélés.

Un graphique sous forme de nuage de points est représenté dans la figure 55 dont chaque point correspond à un groupe d'échantillons d'un cycle d'amplification précis.

On observe la formation de deux groupes distincts sur le plan factoriel (1,2), un groupe rassemble les groupes d'échantillons amplifiés avec 29, 28, 27 et 26 cycles, qui se caractérisent

par des profils avec des hauteurs de pics élevées, et un groupe représentant les échantillons amplifiés à 25 et à 24 cycles, ces derniers se caractérisent par des hauteurs de pics plus faibles.

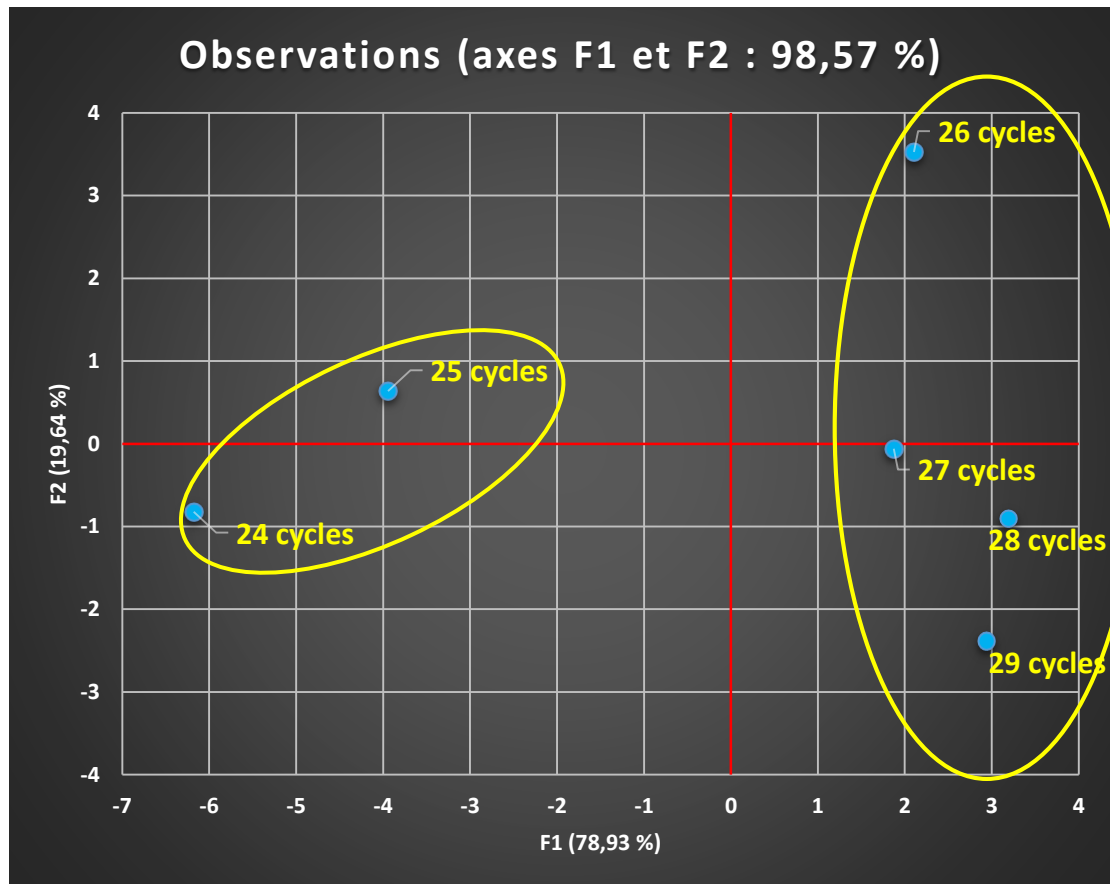
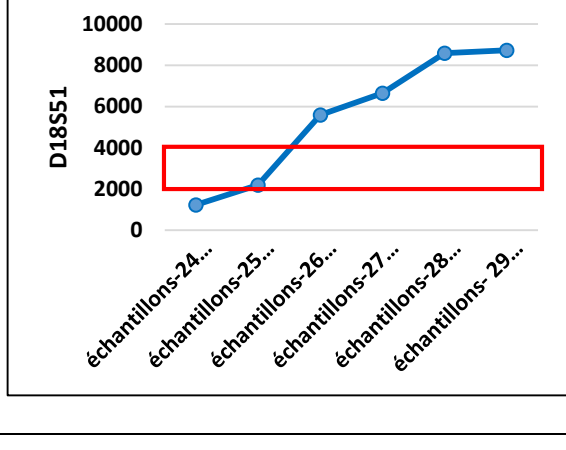
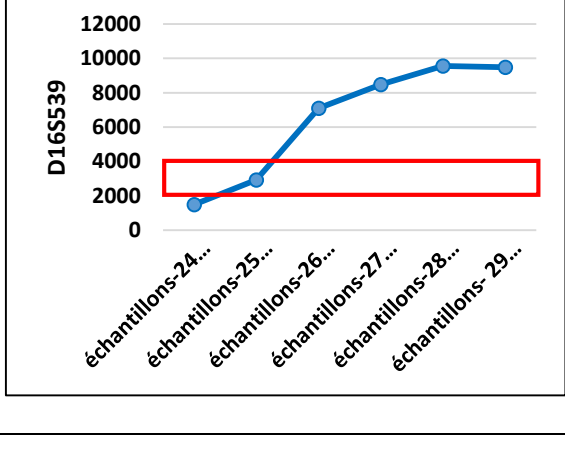
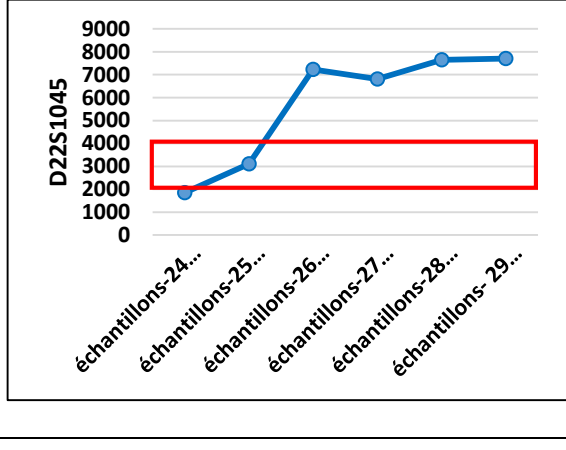
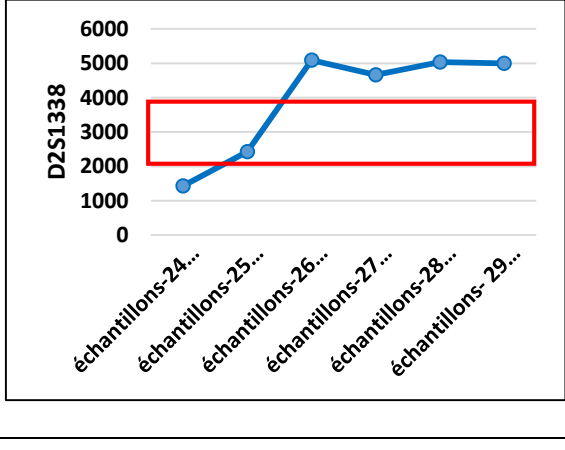
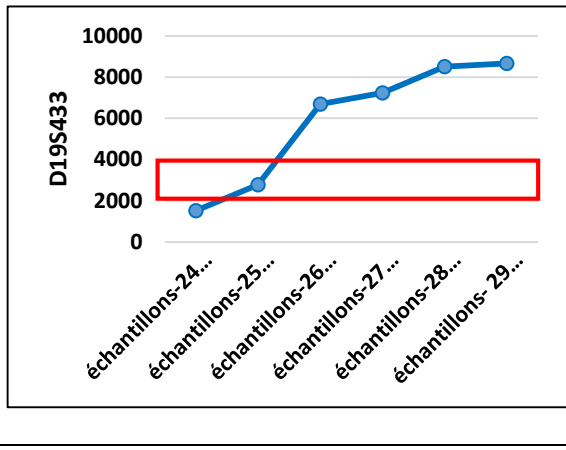
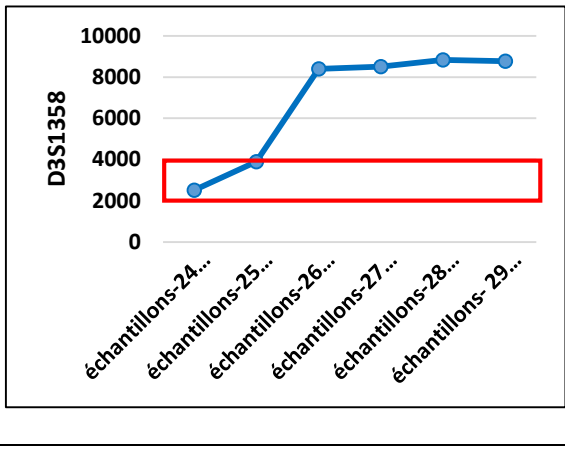
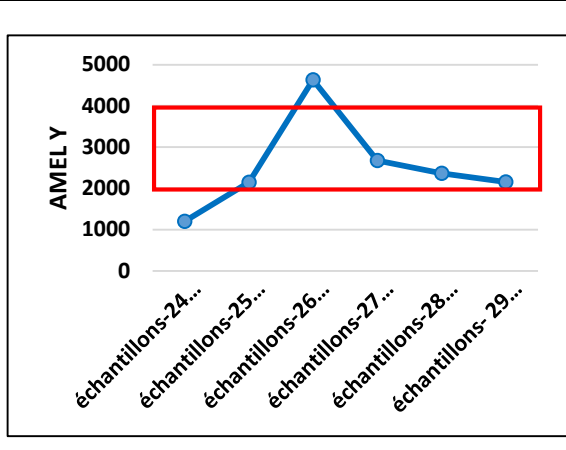
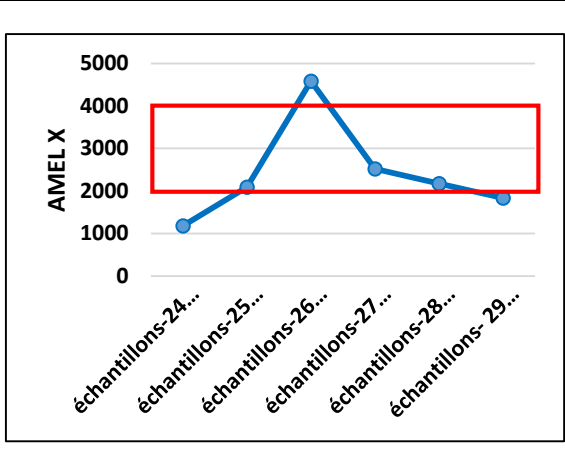
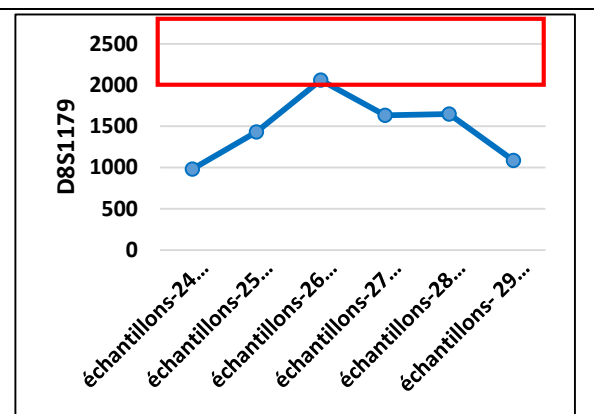
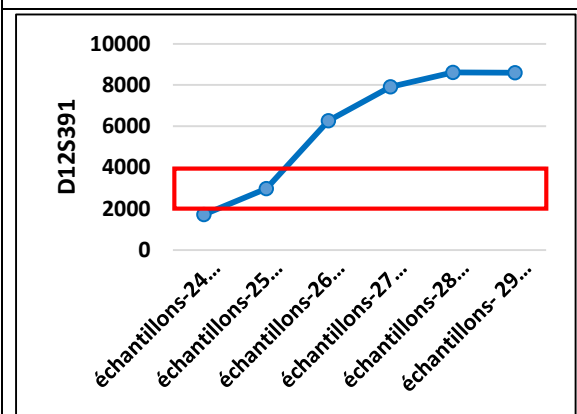
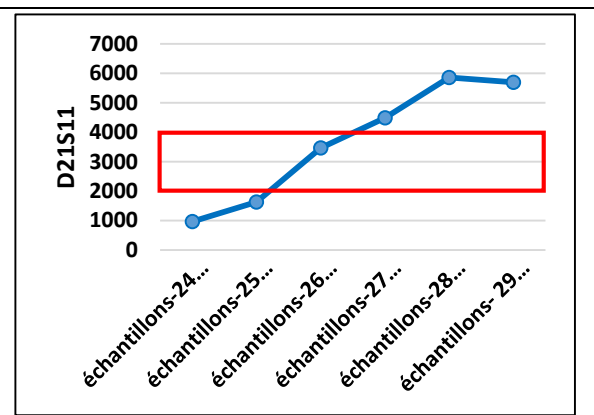
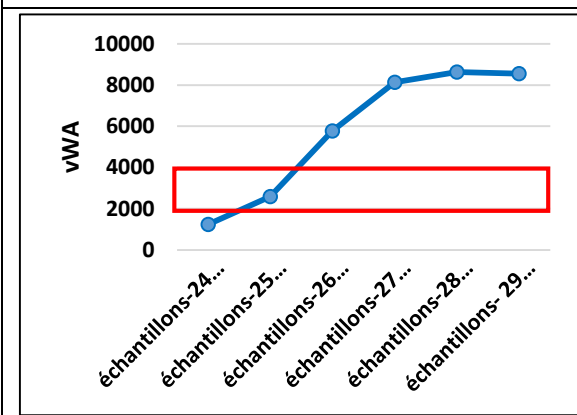
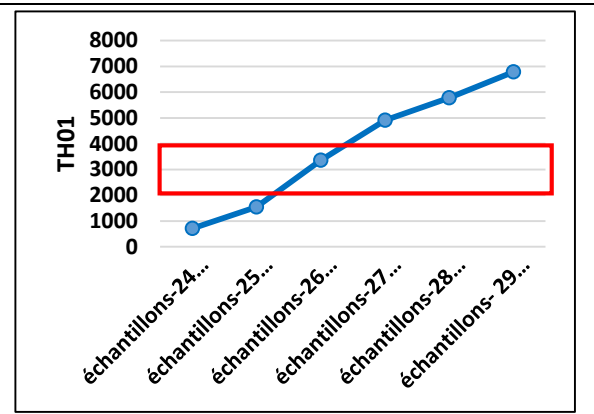
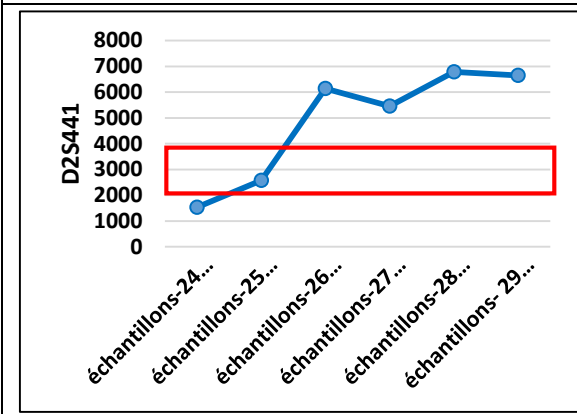
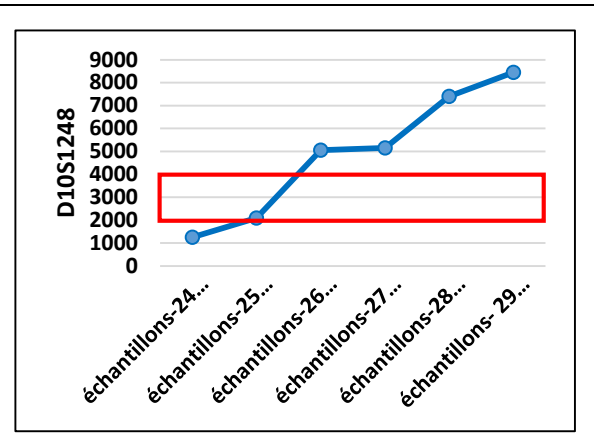
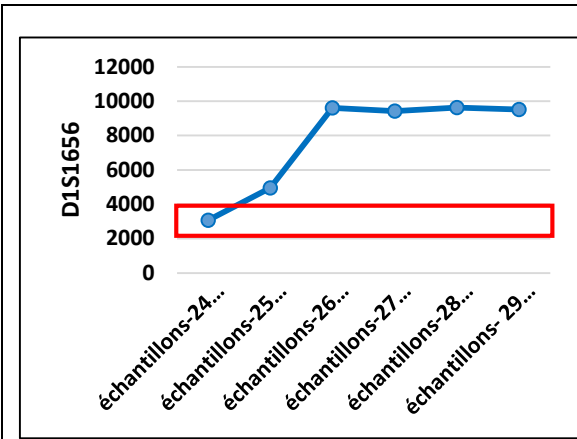


Figure 55 : Graphe de nuage de points sur le plan factoriel (1,2) : série d'échantillons lavés 3 fois au tampon TE

Des analyses de variance ANOVA ont été effectuées pour la comparaison des moyennes des valeurs quantitatives propres aux 30 échantillons de la série 1 supposés indépendants. Le but principale de cette analyse a été de tirer des conclusions visant à préciser le nombre de cycle le plus adéquat qui permet d'obtenir des pics dont la hauteur est optimale (2000-4000 RFU) [Manuel du kit Investigator ESSplex Plus, 2011]. Pour répondre aux mieux à cet objectif, on a focalisé notre sélection en se basant sur les graphiques des moyennes des hauteurs de pics pour chaque marqueur amplifiés à différents cycles représenté ici- dessous (figure 56). Les moyennes calculées sont représentés en Annexe 4.





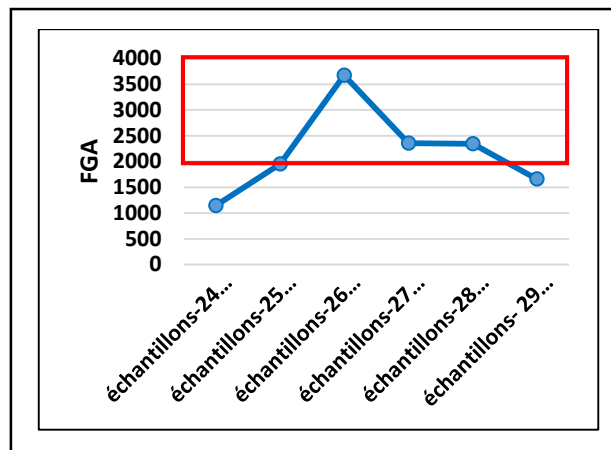


Figure 56 : Graphiques des moyennes des hauteurs de pics pour chaque marqueur amplifiés à différents cycles (échantillons à 3 lavages)

Au vu des graphiques présentés dans la figure 56, on constate que l'intensité de fluorescence relative à la quantité d'ADN détectée par le séquenceur prend des valeurs différentes. D'un côté, pour le même électrophorégramme les différents marqueurs ne se comportent pas de la même manière face au même nombre de cycles de PCR. D'un autre côté, le même marqueur ne prend pas les mêmes valeurs pour un nombre différent de cycle. C'est-à-dire, les valeurs présentées par chaque pic de l'électrophorégramme est dépendante de deux facteurs : le marqueur analysé ainsi que le nombre de cycles de PCR.

Parmi les groupes d'échantillons d'ADN lavés 3 fois au tampon TE, on remarque que les pics avec des hauteurs optimales ont été obtenus par le groupe d'échantillons d'ADN amplifiés à 25 cycles de PCR. À ce cycle on observe que la majorité des marqueurs ont donné des pics à des moyennes comprises entre 2000-4000 RFU. Ces pics correspondent aux marqueurs suivants : AMEL X, AMEL Y, D19S433, D2S1338, D22S1045, D16S539, D18S51, D10S1248, D2S441, vWA, et D12S391. Les moyennes de ces derniers ont été 2091 RFU, 2144 RFU, 2766 RFU, 2425 RFU, 3101 RFU, 2928 RFU, 2186 RFU, 2090 RFU, 2567 RFU, 2582 RFU et 2982 RFU respectivement.

Par contre pour les deux marqueurs D3S1358 et D1S1656 les moyennes des hauteurs de pics ont été 3897 RFU et 4954 RFU respectivement mêmes en 25 cycles de PCR. Ces systèmes ont donnée des valeurs optimales (2510 RFU et 3066 RFU respectivement) avec un nombre de

cycle plus faible (24 cycles). Ces deux marqueurs sont homozygotes, donc le signal détecté à partir des produits d'amplification à 25 cycles de PCR est logiquement plus fort que le signal détecté par les marqueurs hétérozygotes. Donc, la détection de leurs pics correspondant nécessite un nombre de cycle d'amplification plus faible que les autres STRs.

Les marqueurs TH01, D21S11 et D8S1179 ont pris des valeurs plus faibles à 25 cycles, dont les moyennes ont été égales à 1547 RFU, 1630 RFU et 1432 RFU respectivement qui sont très proche de 2000 RFU donc les hauteurs ont été acceptables et les pics ont été interprétables.

D'après ces résultats, et en prenant compte de la plupart des marqueurs, le nombre de cycle adéquat pour obtenir des valeurs optimales après 3 lavages de la carte FTA® imprégné du sang est 25 cycles

III.2.3.2. Série d'échantillons de 4 lavages

Une analyse en composants principales des moyennes de différents marqueurs des groupes d'échantillons lavés 4 fois au tampon TE a donné un graphique sous forme d'un nuage de points qui est représenté dans la figure 59.

On observe la formation de deux groupes distincts sur le plan factoriel (1,2), un groupe rassemble les moyennes des marqueurs amplifiés à 29, 28, et 27 cycles de PCR et qui se caractérisent par des hauteurs de pics élevées, et un groupe représentant les moyennes des marqueurs amplifiés à 26, 25 et 24 cycles, ces derniers se caractérisent par des hauteurs de pics plus faibles.

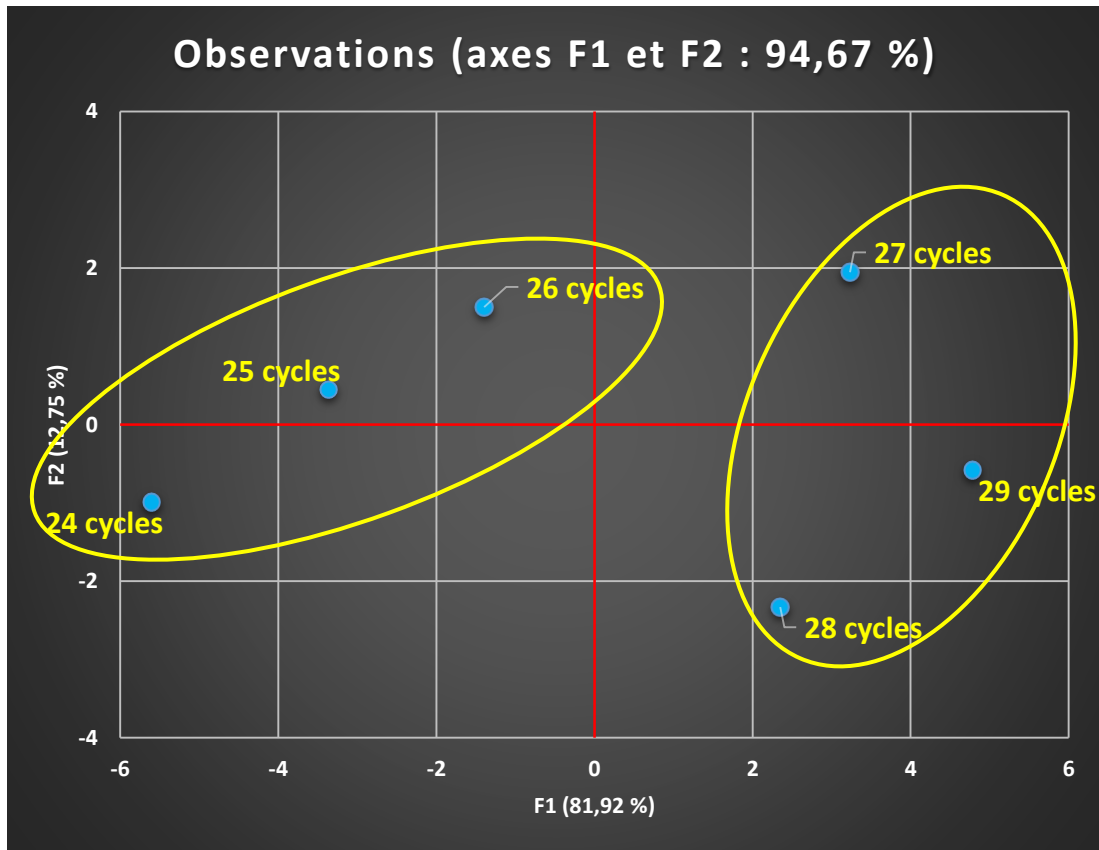
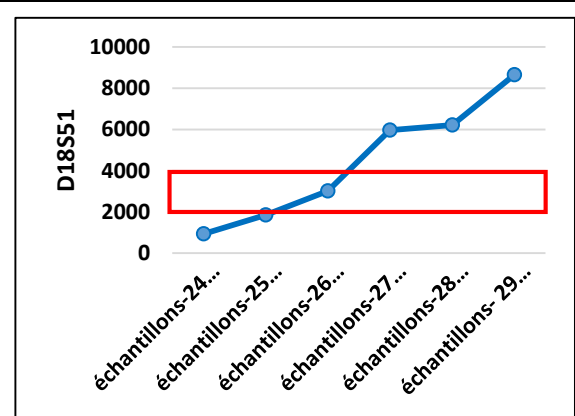
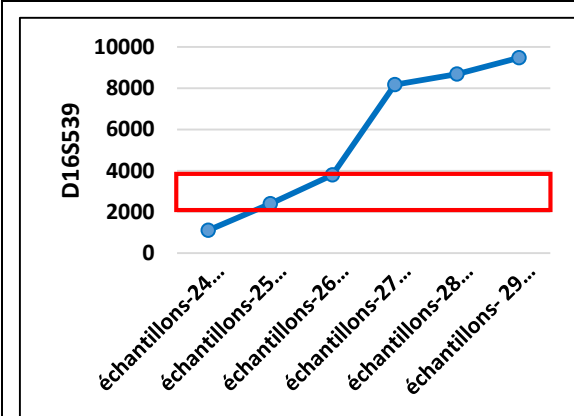
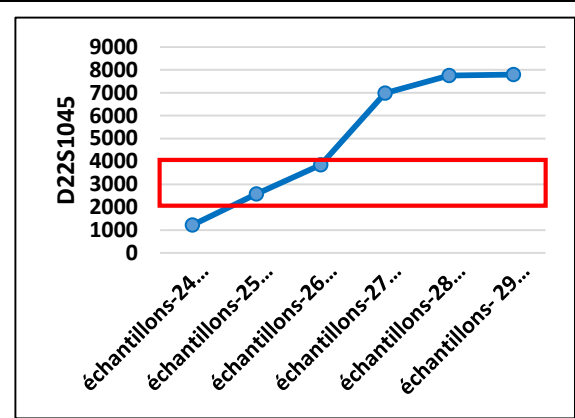
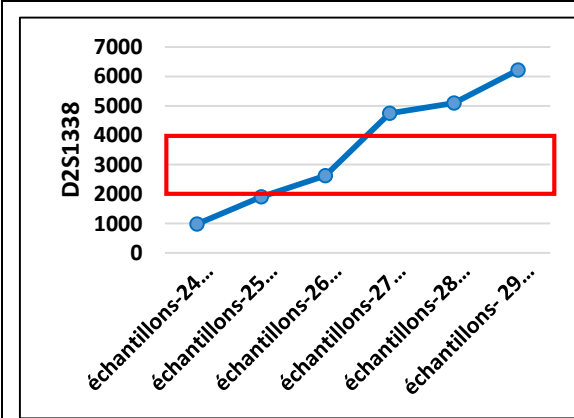
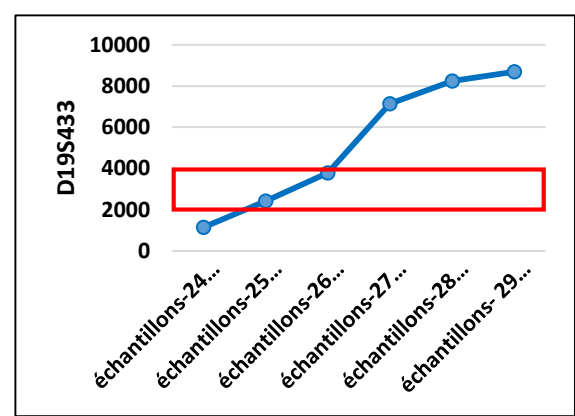
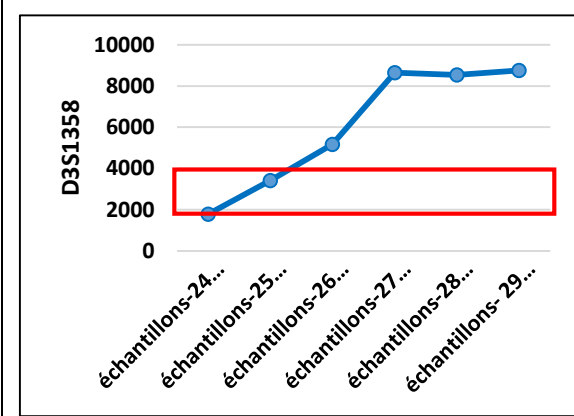
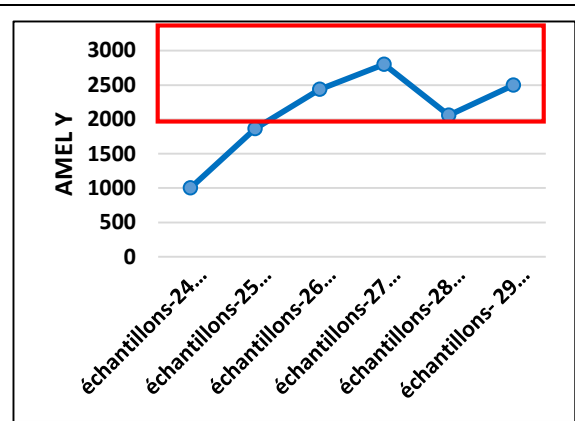
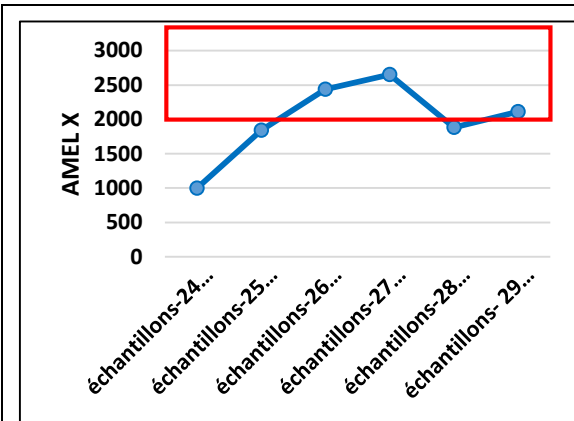
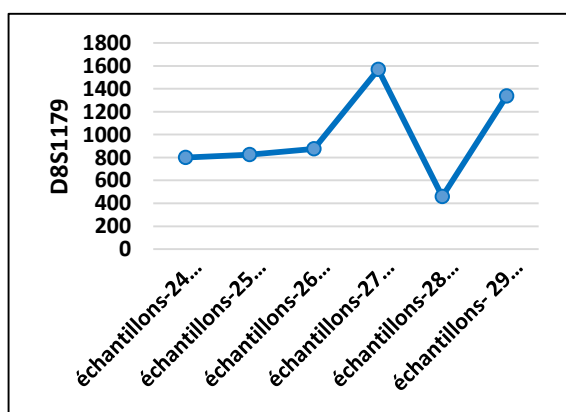
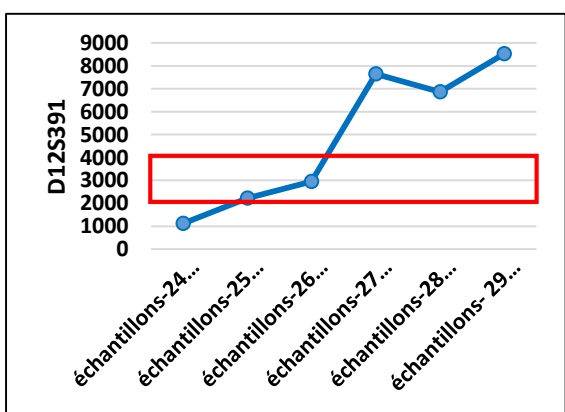
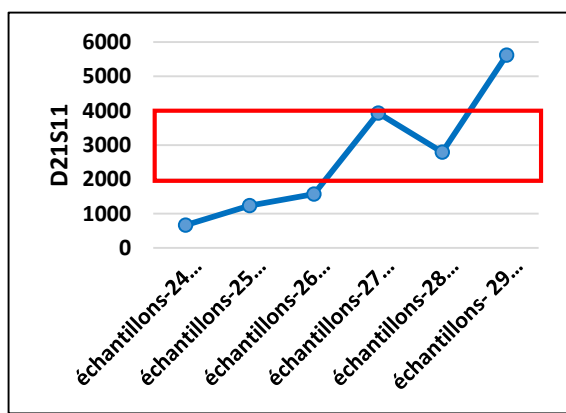
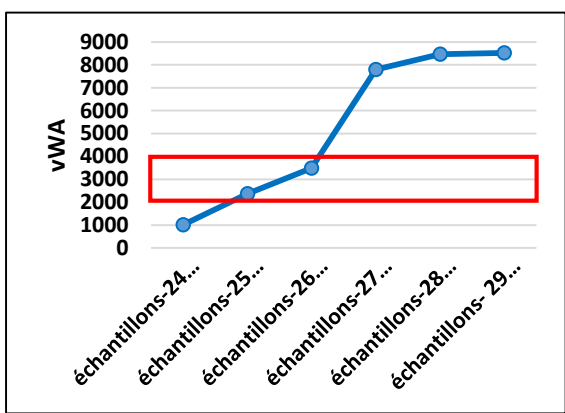
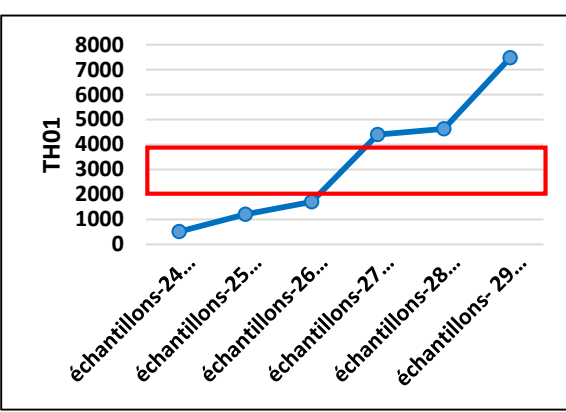
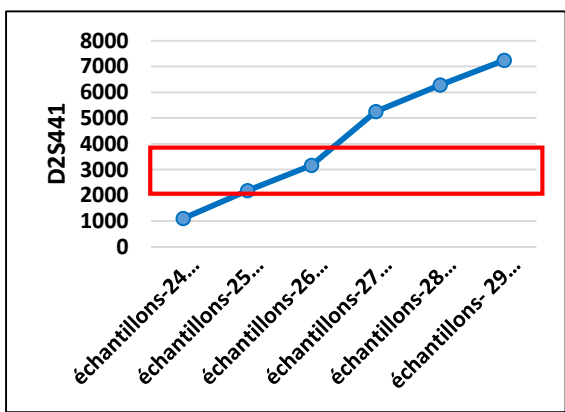
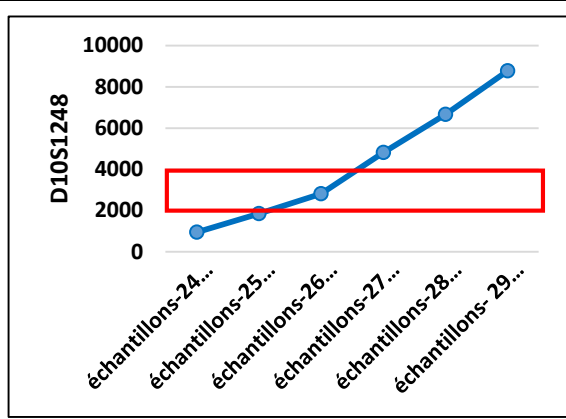
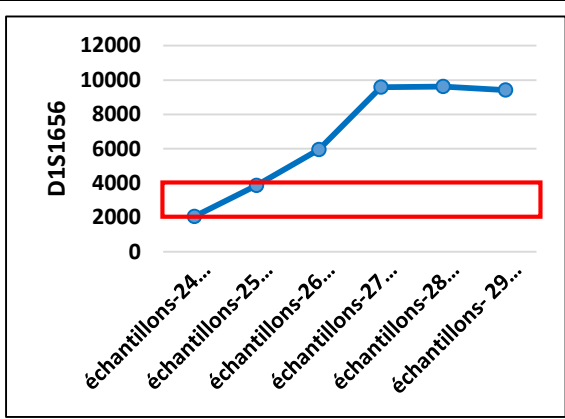


Figure 57 : Graphe de nuage de points sur le plan factoriel (1,2) : série d'échantillons lavés 4 fois au tampon TE

Une analyse de variance ANOVA a été effectuée sur les moyennes de cette série d'échantillons, puis les graphiques obtenus sont présentés dans la figure 58. Les moyennes calculées sont représentées en Annexe 5.





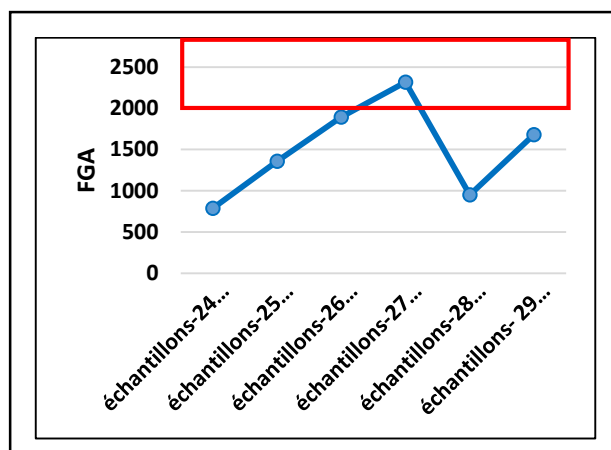


Figure 58 : Graphiques des moyennes des hauteurs de pics pour chaque marqueur amplifiés à différents cycles (échantillons à 4 lavages)

Au vu des graphiques, parmi la série d'échantillons lavés 4 fois au tampon TE, on remarque que le groupe d'échantillons amplifiés à 25 cycles à donner des valeurs optimales pour certains marqueurs tels que D3S1358, D19S433, D2S44, D1S1656 et vWA qui ont pris les moyennes suivantes respectivement : 3417 RFU, 2418 RFU, 2182 RFU , 3859 RFU et 2366 RFU. Plusieurs d'autres marqueurs tels que D18S51 et D10S1248 ont pris des moyennes égales à 1853 RFU et 1847 RFU qui sont très proches à 2000 RFU. Pour d'autres marqueurs, les valeurs optimales ont été obtenues suite à leur amplification à 25 cycles et même à 26 cycles. C'est le cas de D2S1338, D22S1045, D16S539 et D12S391. Ces derniers ont pris des moyennes égales à 1910 RFU, 2580 RFU, 2387 et 2218 RFU respectivement à 25 cycles de PCR, et ils ont pris des moyennes égales à 2621 RFU, 3852 RFU, 3787 RFU et 2950 RFU à 26 cycles de PCR.

Il est remarquable que le marqueur D8S1179 a pris des moyennes faibles même aux nombre élevé de cycle de PCR et même le marqueur FGA (825 RFU, 1356 RFU respectivement). Cela peut s'expliquer sur le plan génétique par la longueur de ces marqueurs qui est assez importante par rapport à la taille des autres STRs analysés, ce qui prolonge la durée de l'amplification de ces fragments par l'ADN polymérase. En même temps les autres STRs ont un taux d'amplification très important liée à la rapidité de l'activité de l'ADN polymérase sur ces courts fragments. Ce phénomène est connu sous le nom de l'amplification préférentielle dont l'ADN polymérase préfère amplifier les courts fragments que les longs.

D'après ces résultats, l'amplification à 25 cycles peut donner des valeurs optimales après 4 lavages du punch au tampon TE.

III.3. DISCUSSION

Au cours de ce travail, nous avons tenté d'optimiser le protocole standard d'établissement de profils génétiques à partir d'ADN extrait du prélèvement du sang (prélèvement de référence) par la technologie FTA®.

L'objectif final de ce travail a été d'obtenir des profils génétiques non saturés, complets et interprétables. Pour cela, on a proposé de réduire le nombre de cycle de la PCR de 29 cycles (défini par le fournisseur) jusqu'à 24 cycles, niveau adéquat pour les objectifs assignés d'une manière décroissante afin de déterminer le nombre de cycle adéquat pour obtenir des pics avec des hauteurs optimales et avec un nombre minimal d'artéfacts. Aussi en parallèle on a augmenté le nombre de lavage au tampon TE de 3 lavages (défini par le fabricant) à 4 lavages afin de tester l'effet du lavage d'une part sur le taux d'inhibition causé par l'hémoglobine et d'autre part sur l'élimination des fragments d'ADN immobilisés sur la carte.

Parmi les 60 échantillons analysés, un échantillon n'a donner aucun profil (D4) ; cela nous a permis de supposer dans un premier temps que des erreurs lors de la manipulation telle qu'un mauvais pipetage de l'un des composants principaux de la réaction d'amplification a été effectué, donc pas d'amplification d'ADN. Ou bien une très faible quantité d'ADN a été amplifiée puis l'intensité du produit final de la PCR n'a pas dépassé les 50 RFU donc il n'a pas été détecté. Cependant une simple vérification du graphe en utilisant certains paramètres avancés du logiciel d'analyse de données nous a permis de cibler le problème : le stand de taille ajouté au tube correspondant à l'échantillon D4 n'a pas été analysé par le séquenceur pour une simple raison c'est la très faible quantité de mix (formamide /standard de taille) déposée dans le tube. De ce fait, aucune taille n'a pu être assignée aux produits de la PCR analysés. Donc aucun pic n'a été affiché sur le graphe.

Le profil partiel obtenu par l'analyse de l'échantillon C3 a été le résultat d'une très faible quantité de produit de PCR obtenu qui a donné lors du passage par le camera CCD des signaux à une intensité très faible située pour la plupart des marqueurs dans la zone stochastique, puis le signal des deux allèles du marqueur D8S1179 a été inférieur à 50 RFU, donc non considéré comme des pics par le logiciel GeneMapper.

La comparaison entre les échantillons analysés avec les mêmes conditions (même nombre de lavage/ même nombre de cycle) montre une différence dans la hauteur des pics des électrophorégrammes des 5 échantillons de même groupe. Cela n'est pas étonnant puisque de nombreuses études ont démontré qu'un seul punch de 1.2 mm imprégné du sang peut contenir

de 15–20 ng d'ADN [Barash et al., 2006]. Donc la quantité d'ADN sur les différents punch est variables et souvent bien plus grande que celle recommandée pour l'amplification optimale (0,5 ng) [Barash et al., 2006 ; Tucker et al., 2010].

En respectant les paramètres d'analyses définis par la validation interne du laboratoire et en prenant en considération que les hauteurs optimales en unités relatives de fluorescence sont comprises entre 2000-4000 RFU [Manuel du kit Investigator ESSplex Plus, 2011], on constate que les échantillons amplifiés avec 29 et 28 cycles de PCR (3 lavages/ 4 lavages) présentent des électrophorégrammes saturés avec des hauteurs de pics très élevés (dépassant 9000 RFU pour certains marqueurs tels que D16S539). Cette intensité diminue en décroissant le nombre de cycle de 29 à 24 pour les deux séries d'échantillons analysés. L'intensité des pics des échantillons amplifiés à 24 cycles par exemple ne dépasse pas les 3000 RFU.

Cette variété est expliquée par la quantité d'ADN analysée qui est proportionnelle au nombre de cycle de PCR. En fait, chaque cycle de PCR donne 2^n comme produit final d'amplification [Butler, 2011]. Cette diminution des hauteurs s'accompagnait aussi d'une réduction des artéfacts. Il est remarquable que ces derniers ont été fréquemment rencontrés dans le cas de pics amplifiés particulièrement intenses (signal élevé). Cela nous a permis de déduire que les échantillons très concentrés présentent un niveau plus élevé de bruit de fond qui peut interférer avec l'analyse. D'ailleurs, de nombreuses études ont déjà montré que la fréquence des artéfacts est très élevée quand la quantité d'ADN analysés est supérieure ou égale à 20 ng [Manuel technique Promega, 2014].

Le lavage ne semble pas avoir d'effet visible sur la quantité d'ADN initiale immobilisée sur la carte FTA®. En fait, les résultats statistiques de la comparaison entre chaque deux groupe d'échantillons amplifiés au même nombre de cycles nous a démontrés que les hauteurs de pics obtenus des échantillons des deux séries analysées ne présentent pas de différences significatives ($p > 0,05$) (Annexe 2).

Il est connu que le lavage du punch au tampon TE joue un rôle dans l'élimination des inhibiteurs de la PCR tels que l'hémoglobine ce qui favorise l'activité de l'ADN polymérase donc, une amplification optimale [Butler, 2011].

Les protocoles présentés dans les manuels techniques officiels du fabricant (*Watman*) n'indiquent aucun effet du lavage sur l'élimination des fragments d'ADN enchâssés sur les fibres de la carte. Mais l'effet du lavage au tampon TE sur l'élimination des fragments d'ADN

immobilisés sur la carte FTA® ne peut être visible par l'ajout d'un seul lavage, mais seulement une différence de 2 à 3 lavages en plus qui peuvent confirmer ou affirmer cet effet.

Les résultats d'analyse de la variance portée sur les différents marqueurs analysés nous nous a permet de déduire le nombre de cycles adéquat pour l'amplification par PCR.

En fait, les échantillons de la série 1 lavés 3 fois au tampon TE ont donné des intensités de pics optimal à 25 cycles (2000-4000 RFU) ; mais les échantillons de la série 2 lavés 4 fois au tampon TE ont donné des valeurs plus faibles à ce même nombre de cycle mais qui ont été très proches de la plage optimale (1800-1950 RFU). Cela est due au faible effet du lavage sur l'élimination des fragments d'ADN immobilisée sur la carte FTA® bien qu'il a été non significatif de point de vue statistique.

Au final, 3 lavages au tampon TE, puis 25 cycles de PCR seront les paramètres adéquats à adépoter pour le nouveau protocole optimisé.

III.3.1. Étude de cas

À fin de vérifier l'efficacité du nouveau protocole optimisé, nous avons eu l'opportunité de disposer de deux échantillons judiciaires d'un cas concret dans le cadre d'un test de paternité, qui présente une des affaire les plus fréquemment traitées au laboratoire d'indentification génétique de l'INCC. Le principe de la recherche de la paternité consiste à confronter les profils génétiques d'une mère et de son enfant avec ceux d'un homme susceptible d'en être le père, et que l'on dénomme alors le « père présumé ».

Le test a été effectué en se basant sur l'analyse portée sur l'ADN de la mère, et celui du père présumé. Dans un premier temps, on a utilisé le protocole standard du kit PowerPlex® ESI 16 system qui consiste à utiliser un punch de 1,2mm imprégné du sang, lavé 3 fois au tampon TE puis soumis à l'amplification à 29 cycles de PCR dans un volume réactionnel de 25 µl. Dans un deuxième temps, on a utilisé le nouveau protocole optimisé en effectuant 3 lavages au tampon TE pour chaque punch, et 25 cycles pour l'amplification par la PCR. Les profils complets de la mère, le père présumé et l'enfant en utilisant les deux protocoles sont présentés en Annexe 6. Les témoins positif et négatif sont présentés en Annexes 7.

Le profil génétique de l'enfant n'était pas obtenu par ces protocoles, il a été effectué en utilisant un autre protocole pour l'ADN extrait qui ne sera pas détaillé dans ce mémoire.

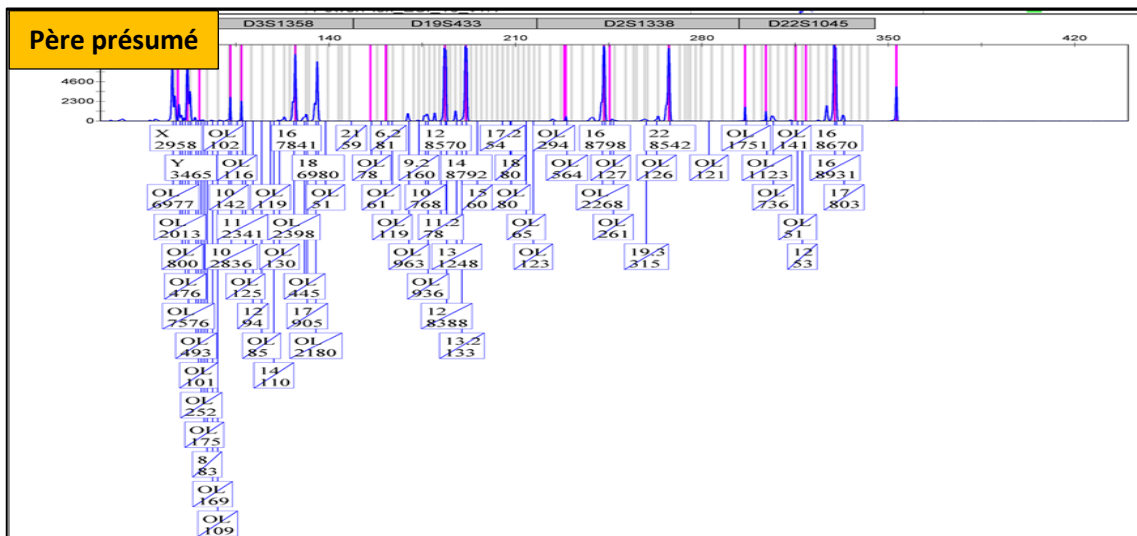


Figure 59 : Exemple de la première ligne de profils génétique, du père présumé, obtenu en utilisant le protocole standard (3 lavages/ 29 cycles)

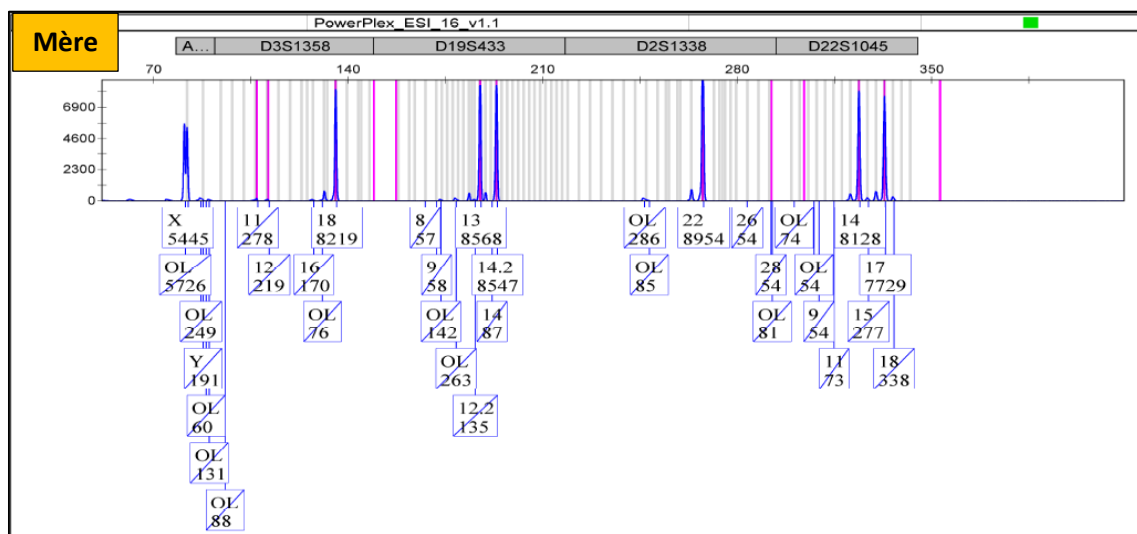


Figure 60 : Exemple de la première ligne de profils génétique, de la mère, obtenu en utilisant le protocole standard (3 lavages/ 29 cycles)

L'interprétation des résultats obtenus suite à l'amplification à 29 cycles a été délicate ; les profils génétiques ont été saturés, chargés des artefacts et la hauteur des pics a été très élevée, arrivant jusqu'à 8000 RFU. Par contre, les profils génétiques obtenus à 25 cycles ont été plus clairs, complets, ne présentant pas d'artefacts et facilement interprétables.

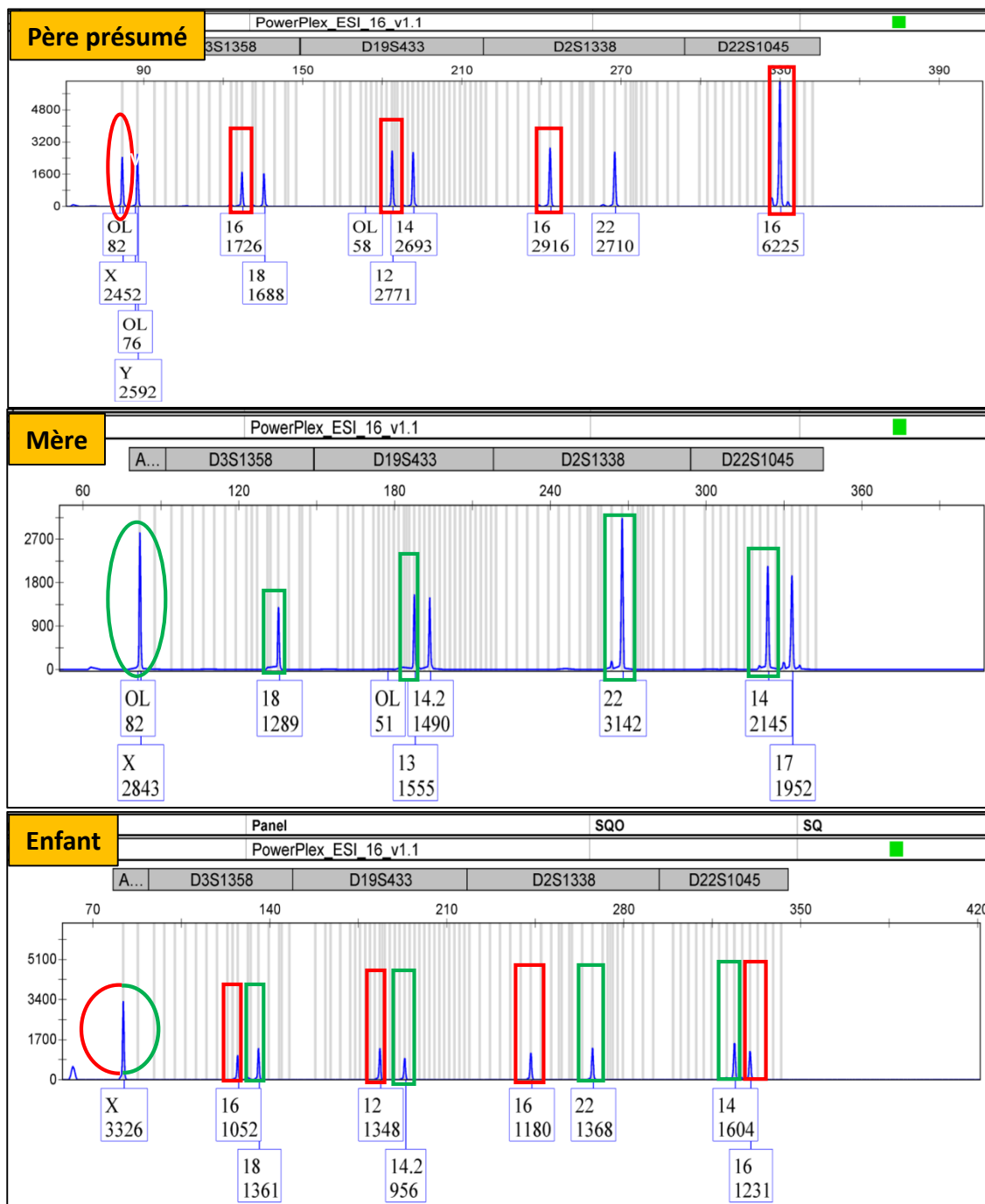


Figure 61 : Exemple de comparaison entre les marqueurs de la première ligne de l'électrophorogramme (enfant, mère et père présumé)

Le reste de la comparaison entre les allèles du père présumés e ceux de l'enfant ont été résumé dans le tableau VII.

Tableau VII. Tableau de comparaison entre les allèles du père présumé, la mère et l'enfant dans le cadre d'un test de paternité.

Marqueur	Père présumé		Mère		Enfant	
	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 1	Allèle 2
AMEL	X	Y	X	X	X	X
D3S1358	16	18	18	18	16	18
D19S433	12	14	13	14.2	12	14.2
D2S1338	16	22	22	22	16	22
D22S1045	16	16	14	17	14	16
D16S539	10	11	11	12	11	12
D18S51	11	15	15	17	15	17
D1S1656	14.3	15	15	15.3	15	15.3
D10S1248	12	14	11	14	12	14
D2S441	11	11	11	14	11	11
TH01	6	18	7	9	6	9
vWA	19	19	16	18	16	19
D21S11	30	30	29	30	30	30
D12S391	20	21	17.3	21	21	21
D8S1179	13	15	11	13	13	13
FGA	19	22	21	22	21	22

D'après les profils, l'enfant partage 50% de son patrimoine avec le père présumé et 50% de son patrimoine avec sa mère, donc nous pouvons en déduire que ce dernier est le père biologique de cet enfant. La **fiabilité du test doit être confirmée par des tests de probabilités qui ne font pas le sujet de ce mémoire, en fait le but de cet exemple a été de s'assurer de l'obtention d'un profil de bonne qualité avec le nouveau protocole optimisé.**

Conclusion

Dans le cadre de ce projet de fin d'étude, nous avons optimisé le protocole standard d'établissement des profils génétiques issus d'ADN extrait par les cartes FTA® à partir du prélèvement du sang (prélèvement de référence). Les profils génétiques obtenus en utilisant le protocole standard (3 lavages/ 29 cycles) ont été saturés. C'est pourquoi l'équipe du laboratoire d'identification génétique de l'*INCC* nous a confié de la responsabilité d'optimiser ce protocole dans le but d'obtenir des profils génétiques exploitables.

Nous avons donc procédé, en premier lieu, à tester l'effet du lavage sur la quantité d'ADN initiale et sur le taux d'inhibition causée par l'hémoglobine en ajoutant un autre lavage par rapport au nombre défini par le fabricant. Ensuite nous avons diminué la quantité d'ADN analysé en réduisant le nombre de cycle d'amplification par PCR de 29 cycles (défini par le fournisseur) à 24 cycles d'une manière décroissante.

Nous avons pu montrer à travers les analyses statistiques que le lavage n'as pas d'effet significatif sur l'élimination des fragments d'ADN immobilisés sur la carte FTA®. C'est pourquoi le nombre de lavage requis a été celui décrits dans le protocole standard, qui consiste a lavé le punch imprégné du sang 3 fois au tampon TE. Et pour le taux d'inhibition, aucun effet visible n'a été détecté sauf pour les échantillons amplifiés à 29 cycles de PCR.

En ce qui concerne l'optimisation de la PCR, nous avons pu déterminer le nombre de cycle adéquat pour donner des profils génétiques de bonne qualité. Le nombre de cycles retenu dans le protocole optimisé est 25 cycles.

La réalisation de ce projet nous a été bénéfique à tous les niveaux et nous a permis d'obtenir des profils génétiques complets, non saturés, sans artéfacts et donc facilement interprétables. En fait ; l'exclusion avec certitude d'une personne innocente gardée en détention ou la confirmation prompte de l'implication d'un accusé dans un crime présentent sûrement un grand succès pour le laboratoire et en même temps des aspects réconfortants pour la population.

Au finale, un test porté sur l'ajout de 2 ou 3 lavages en plus au tampon TE reste nécessaire pour confirmer ou affirmer l'effet du lavage sur la quantité d'ADN immobilisée sur la carte FTA®. Et pour finaliser la validation de ce nouveau protocole optimisé, les mêmes analyses devront être réalisées sur un plus grand nombre d'échantillons.

Références bibliographiques

ANDREW Read et DONNAI Dian. Génétique médicale : De la biologie à la pratique clinique. Boeck Supérieur, 2008, pp 113

BARASH Mark, SHPITZEN Moshe et ASHIRA Nany Zamir. A Modified Method for Purification of Biological Samples Collected on FTA Cards for STR Analysis. *Journal of Forensic Identification*. 2006; 56 (2)

BENZÉCRI Jean-Paul. Histoire et Préhistoire de l'Analyse des données. Dunod, 1977, pp 9-40

BUTLER John M. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. 2^{ème} ed. Academic Press; 2005, pp 2-223

BUTLER John M. Houston DNA Training Workshop: STR and Molecular Biology Artifacts. *National Institute of Standards and Technology*. 2007

BUTLER John M. Fundamentals of Forensic DNA Typing. Academic Press, 2010, pp140-302

BUTLER John M. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Academic Press; 2011, pp 15-192

COQUOZ Raphaël et TARONI Franco. Preuve par l'ADN : la génétique au service de la justice. 2^{ème} ed. France : PPUR presses polytechniques, 2006, pp 11-89

COTTON F, VERTONGEN F et GULBIS B. Électrophorèse capillaire et hémoglobinopathies. *Elsevier SAS*. 2005 ; 21 (1) :45-50

DOUTREMEPUICH Christian. Les empreintes génétiques en pratique judiciaire. *Bull. Acad. Natle Méd.* 2012 ; 196, (6) :1117-1130

EL OSSMANIL H, B. BOUCHRIF, J. TALBI, H. EL AMRI, A. CHAFIK. La diversité génétique de 15 STR chez la population arabophone de Rabat-Salé-Zemmour-Zaer. *Antropo*. 2007 ; 15 :55-62

FARCE Marie-Hélène. Génétique moléculaire. 2000, pp 37

FERNANDEZ Frédéric, SCHNEIDER Anne, GAUB Marie-Pierre, LINDNER Véronique, OUDET Pierre, LANG Hervé, SAUSSINE Christian et JACQMIN Didier. Intérêt de l'analyse des microsatellites urinaires dans le diagnostic du cancer du rein. *Prog Urol*; 2006, pp 429

stoire et Préhistoire de l'Analyse des données. 1977, pp 9-40

BUTLER John M. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. 2^{ème} ed. Academic Press; 2005, pp 2-223

BUTLER John M. Houston DNA Training Workshop: STR and Molecular Biology Artifacts. *National Institute of Standards and Technology*. 2007

BUTLER John M. Fundamentals of Forensic DNA Typing. 2010, pp140-302

BUTLER John M. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Academic Press; 2011, pp 15-192

COQUOZ Raphaël et TARONI Franco. Preuve par l'ADN : la génétique au service de la justice. 2^{ème} ed. France : PPUR presses polytechniques, 2006, pp 11-89

COTTON F, VERTONGEN F et GULBIS B. Électrophorèse capillaire et hémoglobinopathies. *Elsevier SAS*. 2005 ; 21 (1) :45-50

DOUTREMEPUICH Christian. Les empreintes génétiques en pratique judiciaire. *Bull. Acad. Natle Méd.* 2012 ; 196, (6) :1117-1130

EL OSSMANIL H, B. BOUCHARIF, J. TALBI, H. EL AMRI, A. CHAFIK. La diversité génétique de 15 STR chez la population arabophone de Rabat-Salé-Zemmour-Zaer. *Antropo.* 2007 ; 15 :55-62

FARCE Marie-Hélène. Génétique moléculaire. 2000, pp 37

FERNANDEZ Frédéric, SCHNEIDER Anne, GAUB Marie-Pierre, LINDNER Véronique, OUDET Pierre, LANG Hervé, SAUSSINE Christian et JACQMIN Didier. Intérêt de l'analyse des microsatellites urinaires dans le diagnostic du cancer du rein. *Prog Urol*; 2006, pp 429

FUNEL Lonvaud, RENAUF et STREHAIANO ; Microbiologie du vin : bases fondamentales et applications. 2010, pp 332

FURKEL Françoise. L'identification par empreintes génétiques en matière civile en république fédérale D'Allemagne. *Revus internationale de droit comparés* 2004 ; 56 (2) :389-416

GARIBYAN Lilit et AVASHIA Nidhi . Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* 2013; pp 133

GILLIQUET Véronique. Biologie 6eme -Manuel : Sciences générales (2 pér./sem.) ; 2009, pp 146

GOODWIN William, LINACRE, ADRIAN et HADI, SIB. An introduction to forensic genetics. 2^{ème} ed. England: John Wiley & Sons Ltd; 2011, pp 216

GRIFFITHS Anthony J. F. et SANLAVILLE Chrystelle . Analyse génétique moderne. France : Boeck Supérieur ; 2001, pp 5

IGLESIAS Miriam sous la supervision du Dr Raphaël Coquoz. Ajout d'un contrôle d'inhibition dans des kits STR multiplex .Laboratoire AURIGEN, Lausanne, 2009

KARP Gerald. Biologie cellulaire et moléculaire : Concepts and experiments. 3^{ème} ed ; 2010, pp 410

KEYSER Christine, CRUBÉZY Éric et LUDES Bertrand. L'analyse ADN dans l'approche anthropologique des populations du passé. *Médecine/sciences* 2013 ; 29 : 637-641

KORZENIEWSKI Sylvia, HOFMAN Paul et BREST Patrick. Des polymorphismes silencieux plutôt bruyants. *Médecine/sciences* 2013 ; 29 (2) : 124

LARSEN William. Embryologie humaine, 2^{ème} ed. 2003 pp 1

MADER Sylvia S. Biologie humaine. 2010, pp 378-379

MERLIN Jean-Louis. Les biomarqueurs moléculaires en oncologie. 2014, pp 4-6

MICHAELIS Ron C, FLANDERS Rober G, WULFF Paula JR. A Litigator's Guide to DNA: From the Laboratory to the Courtroom. Academic Press; 2011, pp 23

PETKOVSKI Elizabet. Polymorphismes ponctuels de séquence et identification génétique, Étude par spectrométrie de masse MALDI-TOF. 2006. Thèse de doctorat : Sciences du vivant ; Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie : Université Louis Pasteur de Strasbourg I : 2006

PRIMORAC Dragan et SCHANFIELD Moses. Forensic DNA Applications : An Interdisciplinary Perspective. 2014, pp 12-25

RAVEN Peter H. , GEORGES B. Johnson, KENNETH A. Mason, JONATHAN B. Losos et SUSAN S. Singer. Biologie. 2010, pp 275-359

Richard Li. Forensic Biology: Identification and DNA Analysis of Biological Evidence. 2011, pp 408

RUDIN Norah et KEITH Inman. An introduction to forensic DNA analysis. 2^{ème} ed. 2010, pp 43-103

SHEWALE Jaiprakash G et LIU Ray H. Forensic DNA Analysis: Current Practices and Emerging Technologies. 2013, pp 8-43

SOUIDEN Y, CHAIEB K, ROMDHANI M et, MAHDOUANI K. Apport des empreintes génétiques par rapport à la technique de groupage ABO/Rhésus dans l'expertise de filiation. *Ann Biol Clin* 2007; 65 (6): **663-670**

STAFFORD Jean et BODSON Paul . L'Analyse Multivariée Avec Spss. 2006, pp 3

STEPHENSON Frank H., et ABILOCK Marian. PCR Optimization, Student Guide. 2012, pp 1

TAUPIN Jane Moira. Introduction to Forensic DNA Evidence for Criminal Justice Professionals. CRC Press; 2013, pp 4-5

TUCKER Valerie C, HOPWOOD Andrew J, SPRECHER Cynthia J, MCLAREN Robert S, RABBACH Dawn R, ENSENBERGER Martin G, THOMPSON Jonelle Met STORTS Douglas R. Developmental validation of the PowerPlex1 ESI 16 and PowerPlex1 ESI 17 Systems: STR multi plexes for the new European standard. *Forensic Science International: Genetics* 2010; 5 (5): 436-48

VAN Vaerenbergh, G. La criminalistique : du mythe à la réalité quotidienne : manuelle de la police. 2002, pp 152-159

Sites web visités

Whatman FTA[®] card technology. Disponible sur :

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z719730?lang=en®ion=DZ>,

[Consulté le 12/10/2014]

Proméga Corporation .Technical manual PowerPlex[®] ESI 16 System Instructions for use of Products reference DC6770 and DC6771, 2014. Disponible sur :

<https://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-esi-16-system-protocol/> , [Consulté le 21/11/2014]

Configuration de kit PowerPlex ESI[®] 16 system Disponible sur :

<http://www.promega.com/resources/profiles-in-dna/2014/using-complementary-str-typing-systems-to-genotype-problematic-samples/?activeTab=0>, [Consulté le 13/12/2014]

Principles of Forensic DNA for Officers of the Court. Disponible sur :

<http://projects.nfstc.org/otc/module2/2.2.005.htm>, [Consulté le 04/01/2015]

Manuel du kit Investigator ESSplex Plus, 2011. Disponible sur :

<http://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.qiagen.com%2Fresources%2Fdownload.aspx%3Fid%3Dcd1869c3-5e11-4598-9c94-07fdc1a73339%26lang%3Dfr-FR&ei=n01iVZ8zxoBTs5yBkAo&usg=AFQjCNEuIKqOdH8MLqAMySdsVJT2gpJgiQ&sig2=MrPmObPajyuR0MM-MA0v2Q> , [Consulté le 12/04/2015]

Life technology, AmpFISTR[®] SGM Plus[®] PCR Amplification Kit User Guide. 2012.

Disponible sur :

https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041049.pdf, [Consulté le 28/04/2015]

Annexes

Annexe 1

Tableau des marqueurs co-amplifiés et leurs fluorochromes associé du kit PowerPlex® ESI 16 system [Manuel technique Promega, 2014].

Désignation du marqueur	Localisation chromosomique	Séquence répétitive De 5' à 3'	Fluorochrome
Amelogénine	X : p22.1-22.3 Y: p11.2		Fluorescéine
D3S1358	3p21.31 (45.557Mb)	TCTA Complex	
D19S433	19q12 (35.109Mb)	AAGG Complex	
D2S1338	2q35 (218.705Mb)	TGCC/TTCC	
D22S1045	22q12.3 (35.779Mb)	ATT	
D16S539	16q24.1 (84.944Mb)	GATA	JOE
D18S51	18q21.33 (59.1Mb)	AGAA (19)	
D1S1656	1q42 (228.972Mb)	TAGA Complex	
D10S1248	10q26.3 (130.567Mb)	GGAA	
D2S441	2p14 (68.214Mb)	TCTA	
TH01	11p15.5 (2.149Mb)	AATG (19)	TMR-ET
vWA	12p13.31 (5.963Mb)	TCTA Complex (19)	
D21S11	21q21.1 (19.476Mb)	TCTA Complex (19)	
D12S391	12p12 (12.341Mb)	AGAT/AGAC Complex	
D8S1179	8q24.13 (125.976Mb)	TCTA Complex (19)	
FGA	4q28 (155.866Mb)	TTTC Complex (19)	CXR-ET

Annexe 2

Tableau des hauteurs de pics de différents marqueurs amplifié à différents cycles par la PCR.

Le nombre de ddl=6, $t_{table}=2,448$.

Tableau des hauteurs de pics des échantillons amplifiés à 29 cycles par la PCR

Marqueur	Allèle	29 cycles										t	p
		3 lavages					4 lavages						
		éch 1	éch 2	éch 3	éch 4	éch 5	éch A	éch B	éch C	éch D	éch E		
AMEL	X	1853	1891	1903	1700	894	2596	1979	2101	2247	2122	-3,820	0,009
	Y	2071	2302	2186	2071	1103	2959	2449	2393	2574	2584	-4,718	0,003
D3S1358	15	8701	8772	8824	8748	6943	8704	8719	8764	8761	8766	0,313	0,765
D19S433	13	8567	8689	8742	8631	5584	8630	8634	8639	8722	8734	-0,543	0,607
	14.2	8503	8740	8820	8593	5206	8631	8591	8697	8768	8815	-0,622	0,557
D2S1338	17	4459	5330	6060	4815	2122	7025	5777	5814	7370	6925	-2,461	0,049
	19	4265	4920	5678	4423	1929	6511	5202	5431	6815	6379	-2,281	0,063
D22S1045	15	7496	8155	8560	7370	2947	8546	6624	8054	8551	8644	-0,134	0,898
	17	6769	8033	8394	6921	2782	8339	5863	7815	8262	8531	-0,122	0,907
D16S539	11	9541	9506	9492	9587	5840	9432	9445	9520	9536	9437	1,422	0,205
	14	9436	9450	9470	9348	5039	9385	9348	9427	9488	9541	-0,506	0,631
D18S51	13	9343	9450	9219	7935	4056	9541	8213	8937	9396	9092	0,178	0,865
	14	8888	8929	8702	7317	3616	9561	7768	8479	8964	8318	0,168	0,872
D1S1656	15	9561	9497	9472	9529	8271	9184	9393	9484	9407	9343	3,085	0,022
D10S1248	13	8048	9047	9619	8261	3532	9665	9385	8212	9500	9311	-0,762	0,475
	15	7366	8815	8876	7532	3145	9322	8763	7547	8898	8628	-0,612	0,563
D2S441	10	7067	8143	8681	7856	3273	9306	8542	8089	9141	9082	-1,858	0,113
	14	5111	5448	5881	5051	2027	7088	4853	5295	6308	6585	-0,857	0,425
TH01	9	7538	6402	7212	5356	2626	8063	6881	7299	7781	7095	-1,218	0,269
	9.3	7875	6787	7404	5725	2925	8332	7401	7684	8089	7564	-1,512	0,181
vWA	16	8388	8528	8451	8586	5660	8467	8538	8319	8420	8447	0,915	0,395
	18	8562	8694	8541	8707	5249	8651	8562	8600	8555	8660	0,641	0,545
D21S11	30	7978	6274	5432	4892	2802	7896	6924	5999	7122	4916	-0,114	0,913
	33.2	7089	5239	4564	4069	2383	6865	5478	4645	5803	4029	0,325	0,756
D12S391	17	8627	8607	8608	8689	4874	8573	8419	8592	8354	8456	3,299	0,016
	20	8684	8721	8646	8244	4432	8639	8588	8569	8649	8648	-0,352	0,737
D8S1179	14	1802	1177	727	788	901	1864	1391	1607	1716	847	-0,850	0,428
	15	1684	1108	671	718	826	1766	1327	1479	1524	795	-0,819	0,444
FGA	22	2350	1791	1326	1227	1000	2579	1768	1934	2210	1302	-0,407	0,698
	26	2389	1637	1242	1294	929	2032	1704	1798	1644	1084	0,268	0,798

Tableau des hauteurs de pics des échantillons amplifiés à 28 cycles par la PCR

Marqueur	Allèle	28 cycles										<i>t</i>	<i>p</i>
		3 lavages					4 lavages						
		éch 6	éch 7	éch 8	éch 9	éch 10	éch F	éch G	éch H	éch I	éch J		
AMEL	X	3021	2249	2342	2107	2009	1972	1997	1956	1620	1960	2,550	0,043
	Y	3103	2351	2594	2278	2241	2202	2193	2124	1748	2167	2,350	0,057
D3S1358	15	8747	8787	8824	8831	8832	6123	8692	8620	8142	8668	2,202	0,070
D19S433	13	8646	8630	8468	8632	8623	3254	8284	7786	8550	8706	1,249	0,258
	14.2	8491	8523	8377	8562	8553	3282	8046	7498	8470	8652	1,297	0,258
D2S1338	17	6542	5153	5010	5235	5686	2379	5105	4485	5306	6293	-0,065	0,242
	19	6088	4641	4463	4820	5276	2211	4612	4320	4950	5642	-0,243	0,950
D22S1045	15	8556	7869	7888	7303	8305	3505	7919	6425	8549	8592	-0,055	0,816
	17	8482	7294	7714	6892	8136	3068	7397	6095	8527	8450	-0,172	0,958
D16S539	11	9403	9515	9584	9594	9615	4184	9090	8428	8132	9573	2,369	0,869
	14	9546	9499	9514	9550	9537	4150	8745	8245	7952	9311	3,223	0,056
D18S51	13	9547	9458	8963	8552	8212	3243	7214	6204	5423	6947	4,852	0,018
	14	9633	8845	8492	8301	7830	2864	6590	5845	5071	6437	5,889	0,003
D1S1656	15	9376	9598	9605	9628	9688	7128	9631	9622	9670	9587	0,085	0,001
D10S1248	13	9481	8596	7247	7863	7783	2058	6517	5460	7417	8147	1,535	0,935
	15	9090	8153	6595	7056	7086	1813	6029	5064	6893	7826	1,137	0,176
D2S441	10	8948	8604	7386	7778	7879	2741	6804	5869	7917	8152	1,239	0,299
	14	6917	5947	5626	5163	5942	2878	5047	4570	5862	6050	0,730	0,262
TH01	9	7614	5690	5520	5807	5437	1626	4950	4109	3910	5102	3,543	0,493
	9.3	7911	6052	5816	6073	5832	1861	5033	4377	4311	5271	4,811	0,012
vWA	16	8526	8537	8578	8584	8642	3674	8648	7761	8649	8619	0,753	0,003
	18	9094	8623	8646	8690	8707	3610	8679	7925	8694	8714	0,844	0,480
D21S11	30	8691	7831	5809	6492	4500	1957	3775	3265	1760	2910	3,962	0,431
	33.2	8105	7388	5096	5715	4028	1808	3373	3027	1626	2554	3,647	0,007
D12S391	17	8549	8498	8702	8575	8625	4317	7865	6839	5966	7542	3,657	0,011
	20	8737	8658	8655	8740	8466	4168	7616	6414	5638	7025	4,578	0,011
D8S1179	14	3547	2264	1766	1862	913	1488	661	743	167	327	3,894	0,004
	15	3317	2103	1646	1763	874	1440	637	676	160	298	3,993	0,008
FGA	22	4420	3006	2450	2362	1478	1804	1239	1322	453	746	3,668	0,007
	26	4163	3026	2437	2407	1576	1810	1298	1268	496	779	3,933	0,010

Tableau des hauteurs de pics des échantillons amplifiés à 27 cycles par la PCR

Marqueur	Allèle	27 cycles										<i>t</i>	<i>p</i>
		3 lavages					4 lavages						
		éch 11	éch 12	éch 13	éch 14	éch 15	éch K	éch L	éch M	éch N	éch O		
AMEL	X	1881	3634	1755	1997	2709	2449	3738	594	2437	1988	-0,228	0,827
	Y	2025	3690	1907	2163	2931	2604	3707	666	2663	2234	-0,252	0,809
D3S1358	15	5626	8798	7729	8706	8816	8545	8642	3658	8707	8705	-0,519	0,622
D19S433	13	6575	8086	5438	7850	8301	7282	7021	3876	6967	8092	0,109	0,916
	14.2	6284	7794	4964	7428	8018	7045	6202	3672	6556	7914	0,153	0,884
D2S1338	17	3966	5411	3396	4702	5688	4401	4756	1871	4581	5708	-0,106	0,919
	19	3743	4968	3242	4278	5620	4147	4524	1752	4548	5287	-0,177	0,865
D22S1045	15	8172	8148	5037	6613	8121	7276	7278	2388	6256	7939	-0,254	0,808
	17	7905	7985	4488	6183	7867	6681	6764	2193	5903	7792	-0,169	0,871
D16S539	11	5831	9532	6323	8964	9571	8061	8049	3490	8263	8646	0,438	0,677
	14	6012	9414	6141	8523	9356	7938	8029	3191	8099	8304	0,345	0,742
D18S51	13	3643	8028	4322	7258	7983	6312	6188	2151	6389	6060	0,751	0,481
	14	3398	7444	3977	6753	7422	5707	5693	2021	5820	5599	0,842	0,432
D1S1656	15	7722	9635	8794	9605	9639	9696	9546	6391	9572	9534	-0,798	0,455
D10S1248	13	4317	5912	3570	5598	6193	5100	4381	3061	4510	5834	0,531	0,614
	15	4074	5673	3334	5250	5648	4791	4259	2803	4193	5516	0,451	0,668
D2S441	10	5243	6913	3913	6077	7161	5664	5487	2427	5350	6422	0,368	0,726
	14	4917	6356	3284	4503	5486	4529	5227	1741	4366	4951	0,202	0,847
TH01	9	2509	4679	3563	5832	4935	4034	3710	2220	5122	4303	0,827	0,440
	9.3	2566	5015	3780	6159	5313	4191	4040	2309	5354	4466	0,966	0,371
vWA	16	8440	8444	6936	8715	8274	8314	7218	4998	7902	7564	0,745	0,484
	18	8589	8647	7093	8702	8226	8302	7362	4938	7945	7690	0,809	0,449
D21S11	30	1112	4901	2896	6263	4646	3719	3621	1281	5706	3367	0,654	0,538
	33.2	1079	4732	2657	5571	4244	3509	3350	1117	4976	3144	0,750	0,481
D12S391	17	3814	8722	6011	8725	8648	7568	7127	3992	8769	7646	0,329	0,754
	20	3811	8440	5733	8784	8242	7392	6769	3836	8646	7275	0,347	0,740
D8S1179	14	135	2122	599	2106	1901	887	1796	123	2946	839	0,106	0,919
	15	137	2058	588	1940	1753	833	1708	114	2750	800	0,109	0,917
FGA	22	348	3043	1110	2756	2480	1604	2481	252	3474	1487	0,136	0,896
	26	361	2996	1140	2802	2531	1658	2648	231	3688	1488	-0,005	0,996

Tableau des hauteurs de pics des échantillons amplifiés à 26 cycles par la PCR

Marqueur	Allèle	26 cycles										<i>t</i>	<i>p</i>
		3 lavages					4 lavages						
		éch 16	éch 17	éch 18	éch 19	éch 20	éch Q	éch P	éch R	éch S	éch T		
AMEL	X	4698	5265	4187	4188	779	1506	4945	3045	2623	2578	2,092	0,081
	Y	4847	5150	4250	4281	785	1516	4867	3097	2593	2550	2,307	0,061
D3S1358	15	8506	8711	8266	8099	1606	2847	8701	6420	6371	5024	2,281	0,063
D19S433	13	6877	7198	6364	7050	1180	2421	7468	4926	4403	3911	2,088	0,082
	14.2	6507	6908	5802	6802	1120	2229	7177	4597	4159	3653	1,954	0,098
D2S1338	17	5028	5531	4763	5500	979	1819	5085	3419	2859	2716	2,933	0,026
	19	4894	5089	4659	5296	936	1781	4731	3172	2714	2494	3,266	0,017
D22S1045	15	7183	7541	6877	7829	1340	2665	7344	5079	4432	3681	2,722	0,035
	17	7066	7213	6528	7628	1256	2501	6963	4718	4247	3494	2,888	0,028
D16S539	11	7130	7900	6478	6752	1209	2260	7725	4836	4297	3793	2,039	0,088
	14	7234	7825	6442	6977	1200	2226	7661	4855	4255	3778	2,164	0,074
D18S51	13	5972	6831	5273	5083	917	1639	6829	3846	3931	3041	1,498	0,185
	14	5531	6361	4869	4865	868	1570	6196	3551	3638	2861	1,653	0,149
D1S1656	15	9627	9616	9597	9606	1890	3409	9555	7530	7091	5788	2,715	0,035
D10S1248	13	5130	5666	4763	5326	877	1806	5989	3658	3305	2823	1,755	0,130
	15	4919	5047	4459	5114	820	1723	5398	3532	3106	2611	1,953	0,099
D2S441	10	5998	6341	5646	6607	1055	2055	6375	4098	3798	3037	2,435	0,051
	14	6017	6369	5624	6485	1046	2058	6240	4031	3310	2923	2,608	0,040
TH01	9	3218	3728	3077	3315	542	930	3381	2127	2205	1493	2,473	0,048
	9.3	3299	3733	3218	3234	567	948	3459	2137	2209	1617	2,481	0,048
vWA	16	5868	6421	5096	5678	876	2380	7133	4277	3969	3267	1,236	0,263
	18	5833	6404	5135	5729	912	2411	7164	4369	3954	3228	1,219	0,269
D21S11	30	3527	4730	2977	2560	452	768	4193	2036	2020	1489	1,330	0,232
	33.2	3563	4768	3019	2545	474	745	4081	2036	2005	1441	1,440	0,200
D12S391	17	6497	7658	5697	5583	952	1664	7185	3796	3920	2671	1,814	0,120
	20	6359	7495	5504	5407	926	1593	6822	3574	3780	2604	1,932	0,101
D8S1179	14	2264	3242	1745	1136	261	276	1832	860	907	646	2,000	0,092
	15	2133	3245	1668	1062	247	266	1706	826	838	595	1,983	0,095
FGA	22	3807	5027	3137	2510	513	690	3649	1927	1648	1455	1,969	0,096
	26	3877	5178	3345	2512	522	678	3697	1970	1759	1454	2,004	0,092

Tableau des hauteurs de pics des échantillons amplifiés à 25 cycles par la PCR

		25 cycles											
		3 lavages					4 lavages						
Marqueur	Allèle	éch 21	éch 22	éch 23	éch 24	éch 25	éch U	éch V	éch W	éch X	éch Y	<i>t</i>	<i>p</i>
AMEL	X	2359	810	1147	2842	2017	825	1807	2107	1355	2098	0,626	0,554
	Y	2451	793	1224	2815	2088	864	1839	2070	1405	2151	0,733	0,491
D3S1358	15	5334	1624	2104	5808	3779	1157	3669	4112	2510	3380	0,928	0,389
D19S433	13	2910	979	1735	3659	2933	1511	2292	2521	1773	3181	0,744	0,485
	14.2	2826	941	1716	3488	2867	1497	2167	2489	1783	3143	0,703	0,508
D2S1338	17	2339	811	1705	3290	2692	1093	1811	1960	1523	2510	1,421	0,205
	19	2118	737	1581	3073	2602	1017	1775	1858	1463	2386	1,267	0,252
D22S1045	15	3186	1088	2164	3943	3379	1889	2506	2589	1911	3622	0,994	0,358
	17	2974	996	2113	3905	3144	1770	2334	2446	1775	3458	1,045	0,336
D16S539	11	3072	1001	1712	3908	2879	1080	2391	2665	1749	2727	1,010	0,352
	14	3077	1024	1780	3970	3033	1103	2476	2671	1769	2651	1,152	0,293
D18S51	13	2655	868	1186	3074	2058	732	2014	2301	1435	1948	0,712	0,503
	14	2515	817	1124	2952	1924	698	1884	2099	1316	1827	0,809	0,449
D1S1656	15	5720	1822	2637	6908	4554	1460	4200	4440	2823	3975	1,120	0,306
D10S1248	13	2215	781	1408	2843	2197	1262	1801	1978	1382	2465	0,701	0,509
	15	2074	746	1304	2678	2003	1155	1623	1884	1346	2303	0,650	0,540
D2S441	10	2515	866	1696	3480	2613	1346	2064	2190	1593	2968	0,804	0,452
	14	2464	907	1785	3446	2543	1373	2030	2115	1610	2893	0,917	0,394
TH01	9	1530	440	1046	2230	1284	436	1054	1439	1075	1163	1,255	0,256
	9.3	1571	455	1068	2310	1342	431	1123	1506	1099	1160	1,861	0,261
vWA	16	2697	755	1850	3492	2191	1705	2067	2812	1938	2582	0,503	0,633
	18	2699	761	1892	3606	2236	1715	2103	2852	1991	2585	0,533	0,613
D21S11	30	2236	617	728	2568	1038	278	1296	1864	969	838	0,796	0,456
	33.2	2095	613	719	2644	1017	280	1241	1851	945	834	0,792	0,458
D12S391	17	3427	996	1688	4770	2228	734	2209	3055	1872	1894	1,043	0,337
	20	3377	970	1634	4597	2137	706	2139	2971	1777	1830	1,053	0,333
D8S1179	14	2490	534	404	2269	713	54	1012	1328	619	379	1,111	0,309
	15	2313	511	395	2189	686	63	1025	1243	633	368	1,081	0,321
FGA	22	2768	739	763	2911	1216	210	1393	2032	1049	884	0,959	0,374
	26	2756	734	769	3157	1286	229	1478	2041	1062	915	0,988	0,361

Tableau des hauteurs de pics des échantillons amplifiés à 24 cycles par la PCR

Marqueur	Allèle	24 cycles										<i>t</i>	<i>p</i>
		3 lavages					4 lavages						
		éch 26	éch 27	éch 28	éch 29	éch 30	éch Z	éch A1	éch B2	éch C3	éch D4		
AMEL	X	1222	1329	1048	1107	458	204	1671	1957	152		0,376	0,720
	Y	1254	1305	1084	1155	468	225	1665	1948	168		0,420	0,689
D3S1358	15	2639	2903	2214	2285	992	414	2952	3526	254		0,839	0,434
D19S433	13	1556	1540	1431	1575	526	329	1838	2207	244		0,730	0,493
	14.2	1543	1535	1370	1533	509	304	1835	2133	235		0,736	0,489
D2S1338	17	1334	1527	1396	1600	570	347	1579	1923	261		1,020	0,347
	19	1291	1470	1323	1509	556	305	1440	1817	237		1,112	0,309
D22S1045	15	1808	1848	1884	2025	584	329	2007	2446	265		1,112	0,309
	17	1703	1796	1777	2010	567	340	1890	2268	243		1,209	0,272
D16S539	11	1549	1642	1333	1378	569	298	1790	2100	207		0,756	0,478
	14	1557	1621	1336	1456	580	318	1754	2146	207		0,775	0,468
D18S51	13	1384	1394	1089	1190	494	213	1591	1876	143		0,672	0,527
	14	1279	1309	1034	1141	461	211	1475	1762	139		0,690	0,516
D1S1656	15	3217	3222	2812	3016	1081	517	3459	3897	344		1,069	0,326
D10S1248	13	1338	1273	1213	1333	429	245	1603	1844	177		0,731	0,492
	15	1262	1178	1139	1266	407	236	1493	1797	166		0,682	0,521
D2S441	10	1509	1457	1499	1626	502	298	1769	2101	223		0,868	0,419
	14	1535	1485	1489	1635	508	294	1768	2105	229		0,892	0,407
TH01	9	678	782	611	722	337	163	774	937	122		0,941	0,383
	9.3	710	788	648	749	379	169	807	980	116		0,927	0,390
vWA	16	1375	1317	1027	1247	492	388	1504	1898	242		0,561	0,595
	18	1363	1329	1036	1215	492	387	1497	1899	242		0,552	0,601
D21S11	30	1174	1019	826	835	394	143	1205	1261	64		0,876	0,415
	33.2	1149	1016	837	843	391	134	1209	1276	63		0,857	0,424
D12S391	17	1908	1779	1536	1666	654	306	1912	2095	168		1,162	0,289
	20	1908	1797	1532	1667	613	303	1896	2063	165		1,209	0,299
D8S1179	14	1165	1238	772	823	575	96	1145	1202			1,122	0,305
	15	1145	1184	742	785	538	88	1102	1160			1,123	0,304
FGA	22	1304	1251	923	996	473	110	1421	1471	67		0,871	0,417
	26	1344	1278	1035	1037	491	123	1485	1568	62		0,862	0,422

Annexe 3

Exemples de profils génétiques de la série 1 à 3 lavages et de la série 2 à 4 lavages

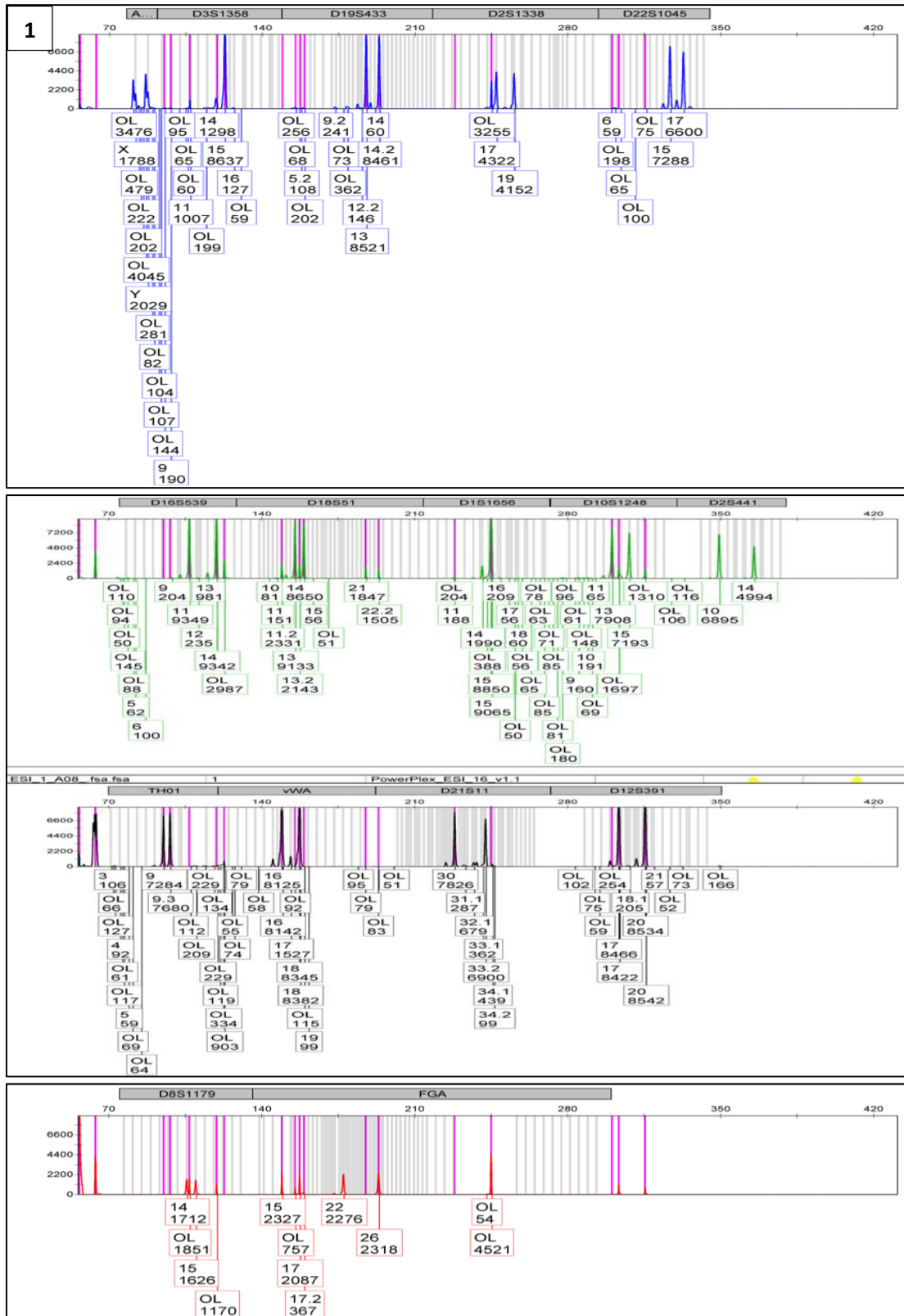


Figure 1 : Exemple de profil génétique d'un échantillon de 3lavages, 29 cycles

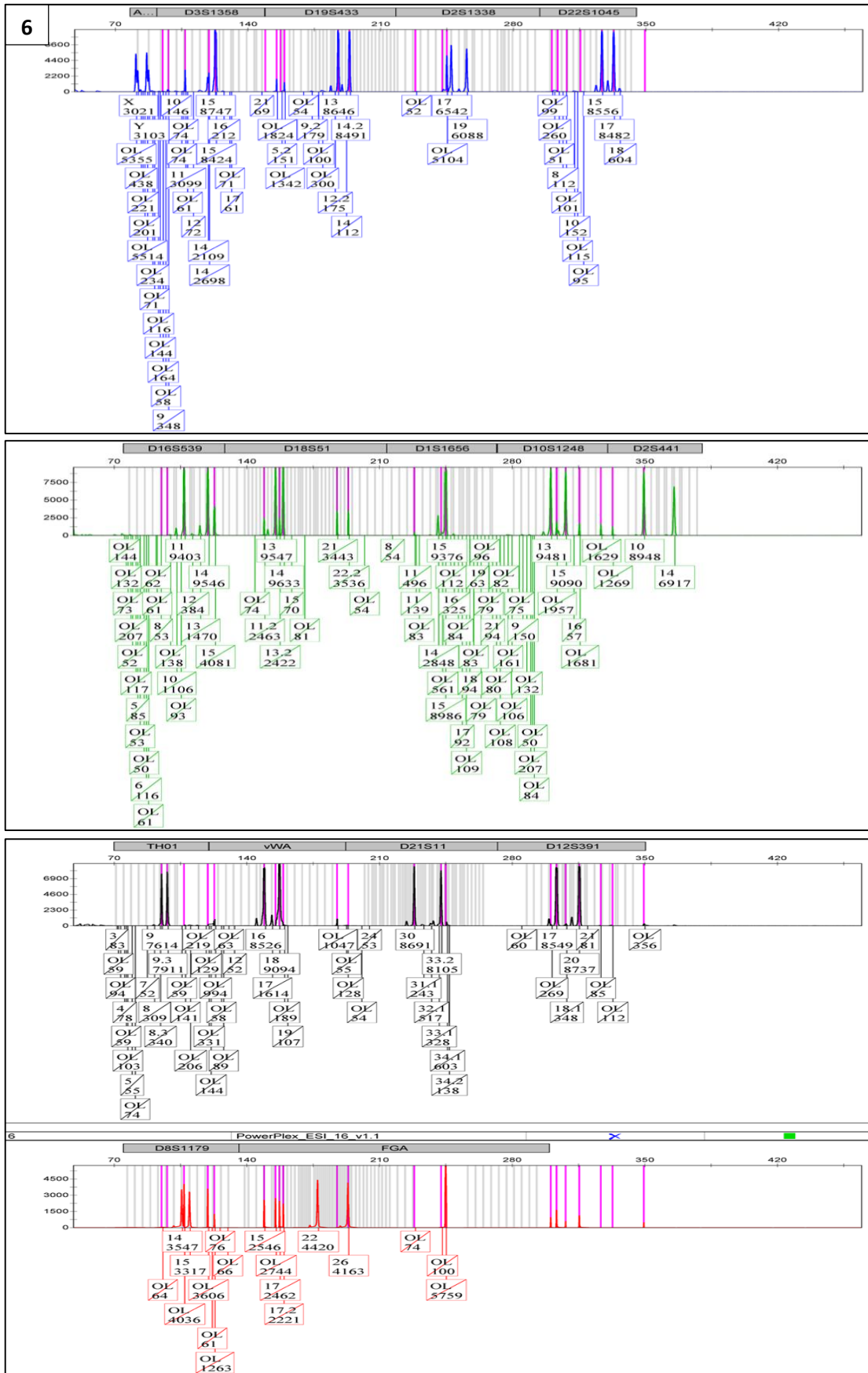


Figure 2 : Exemple de profil génétique d'un échantillon de 31lavages, 28 cycles

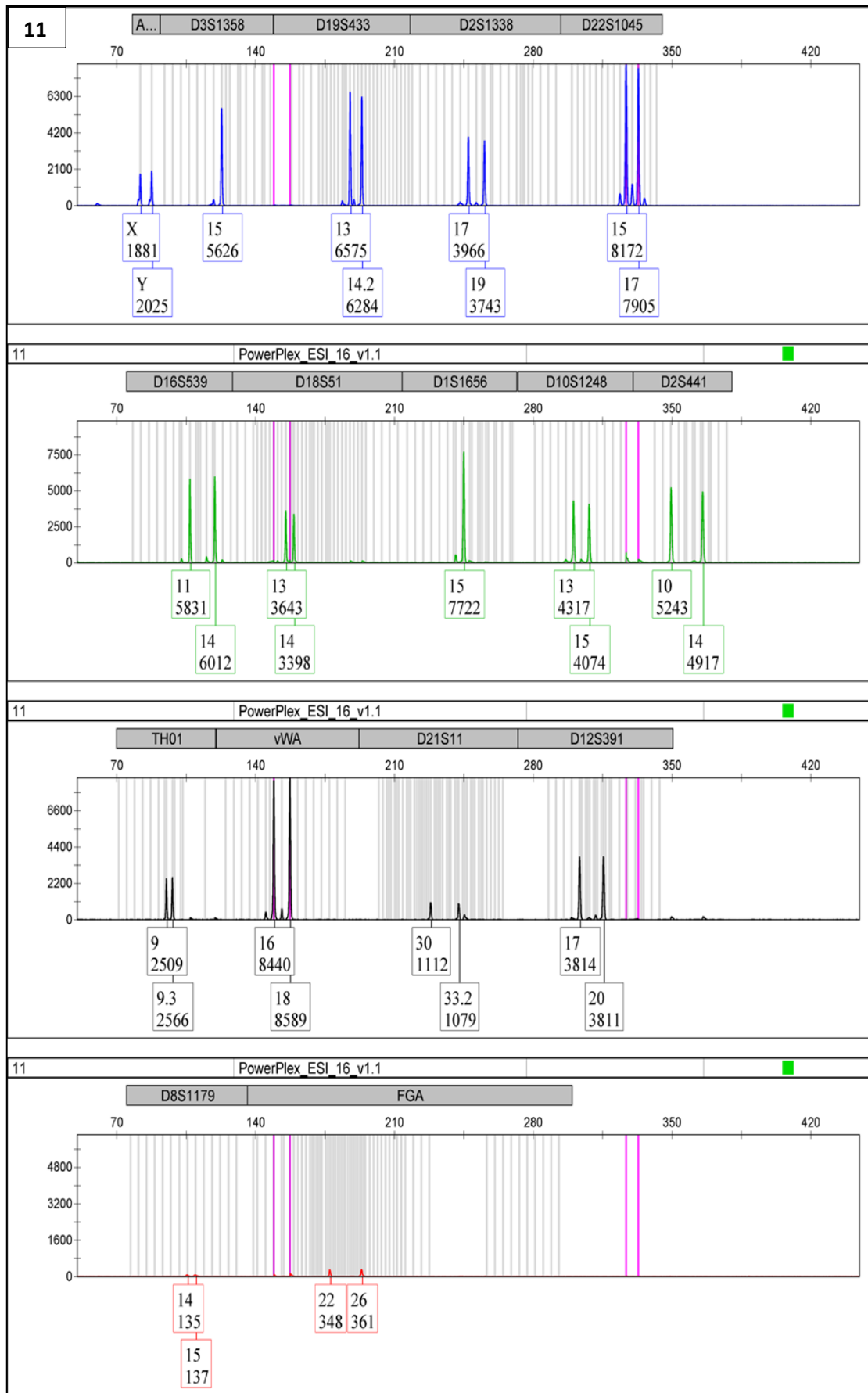


Figure 3 : Exemple de profil génétique d'un échantillon de 3lavages, 27 cycles

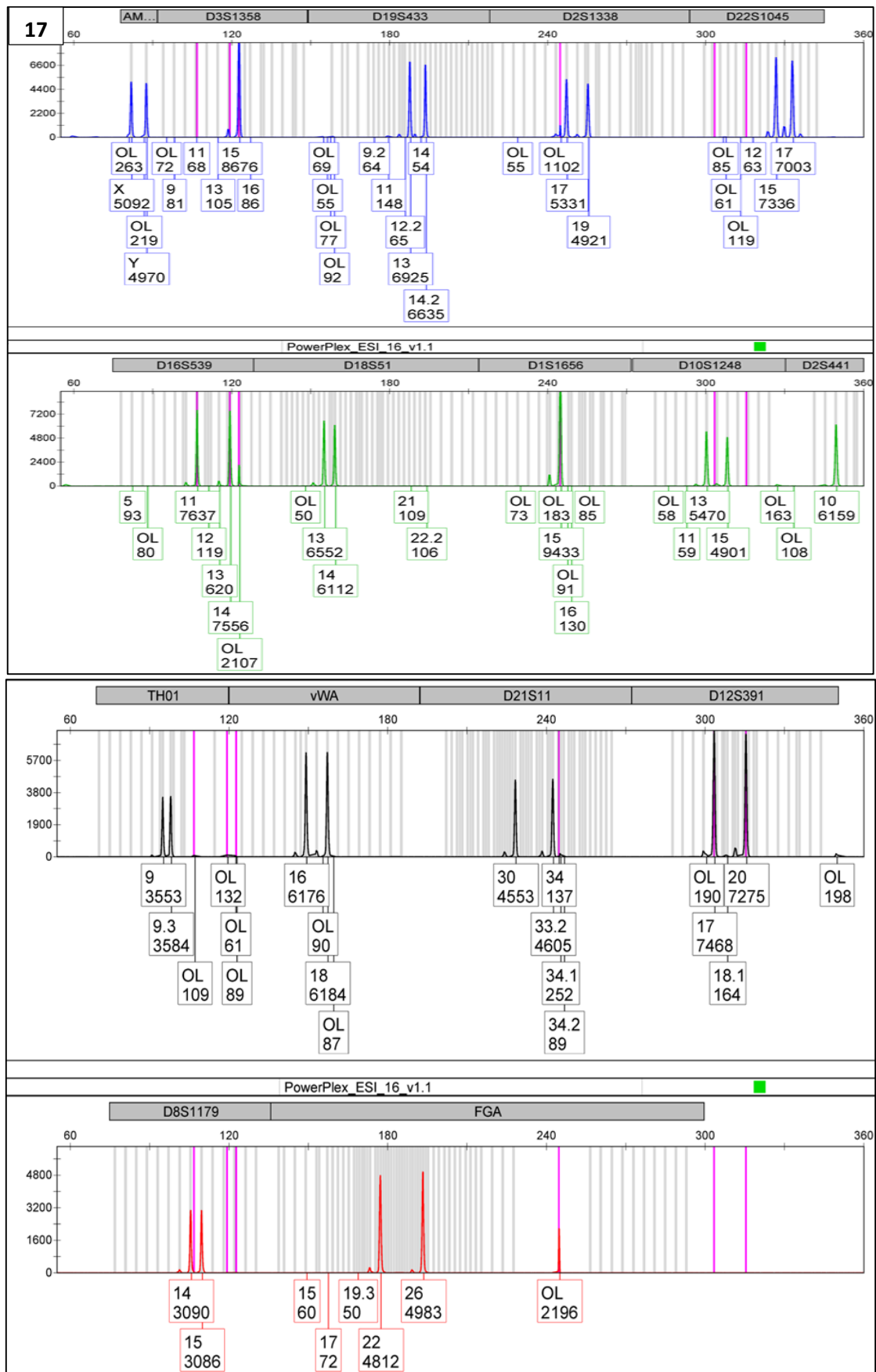


Figure 4 : Exemple de profil génétique d'un échantillon de 3 lavages, 26 cycles

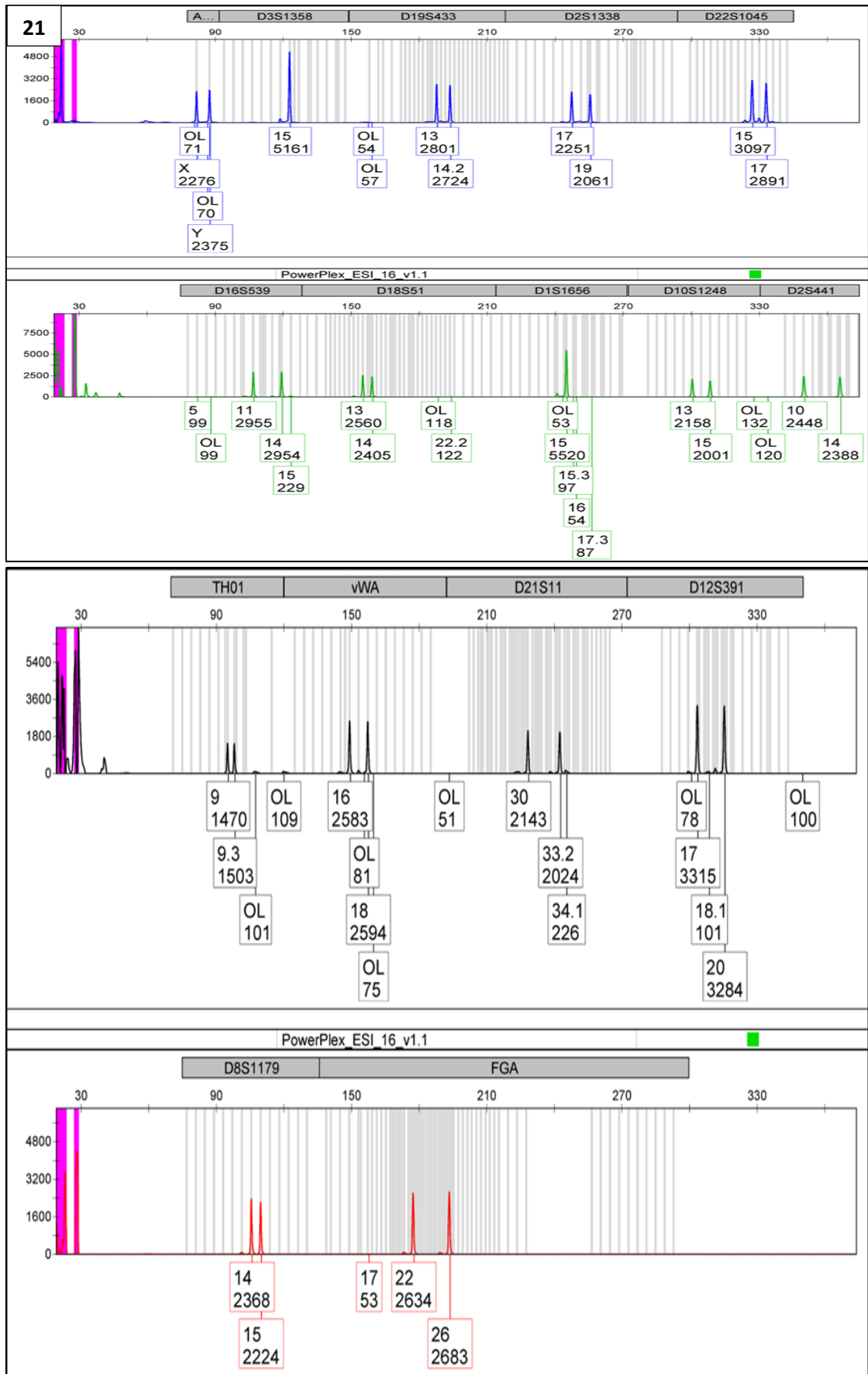


Figure 5 : Exemple de profil génétique d'un échantillon de 3 lavages, 25 cycles

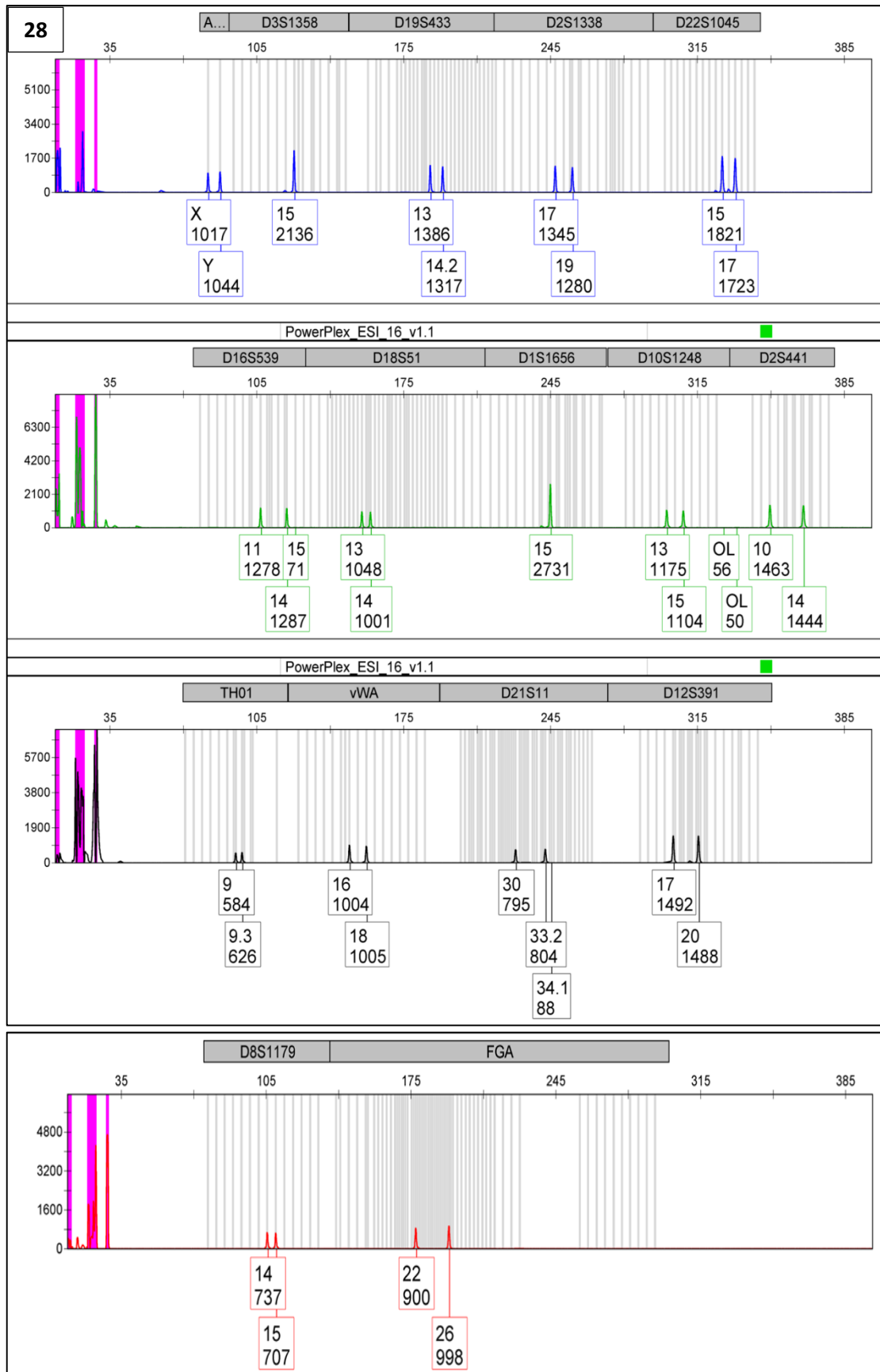


Figure 6 : Exemple de profil génétique d'un échantillon de 3 lavages, 24 cycles

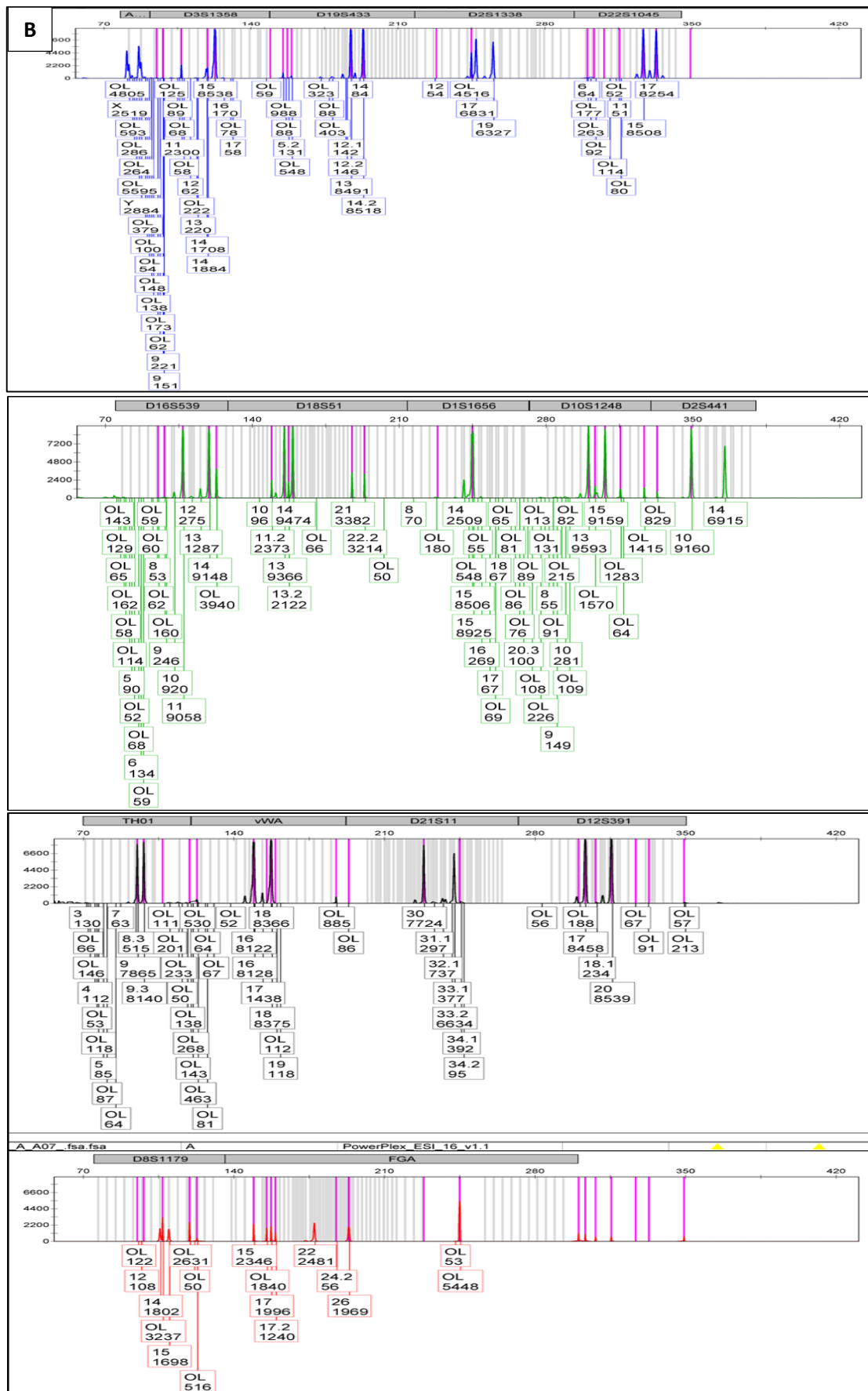


Figure 7 : Exemple de profil génétique d'un échantillon de 4 lavages, 29 cycles

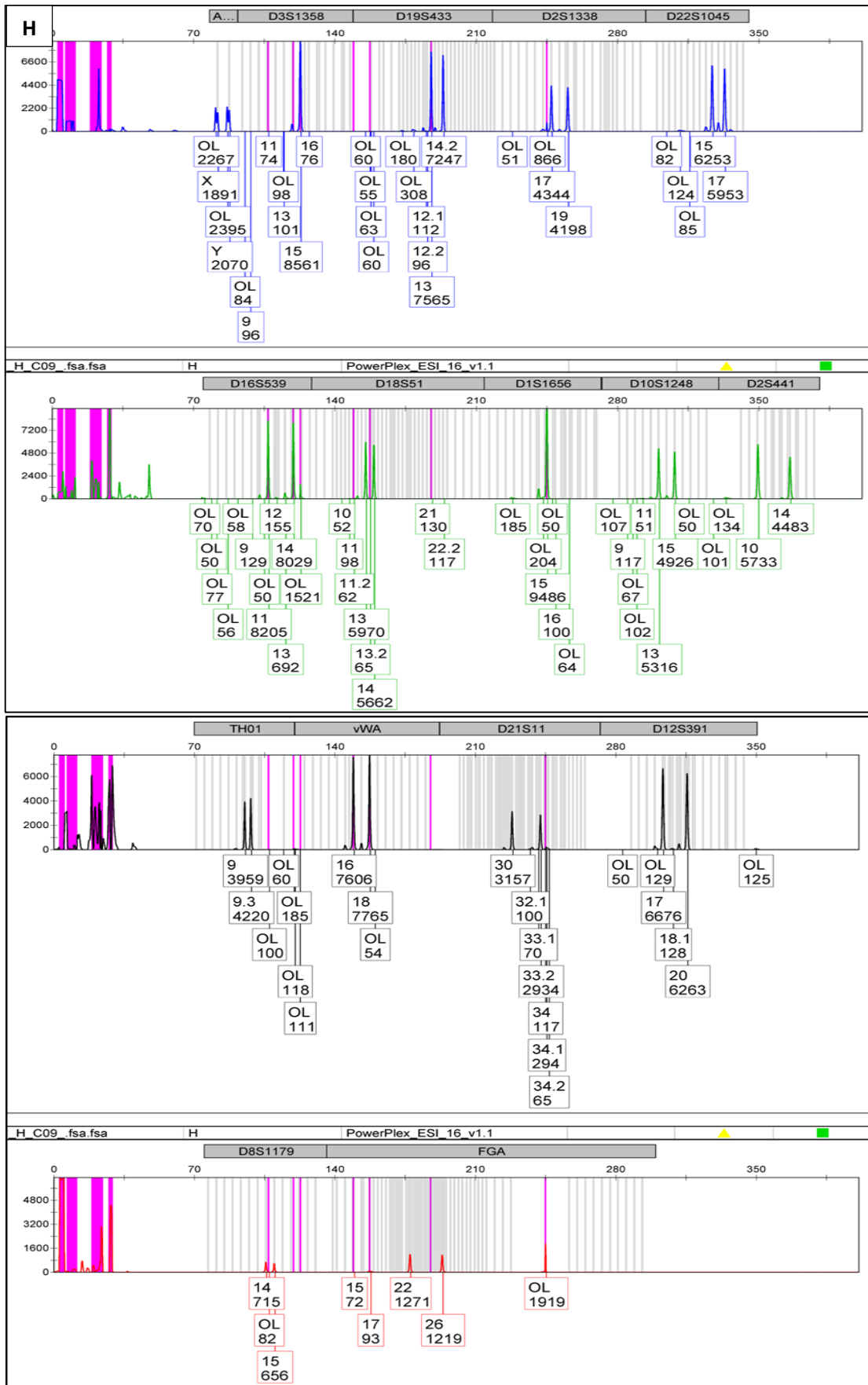


Figure 8 : Exemple de profil génétique d'un échantillon de 4 lavages, 28 cycles

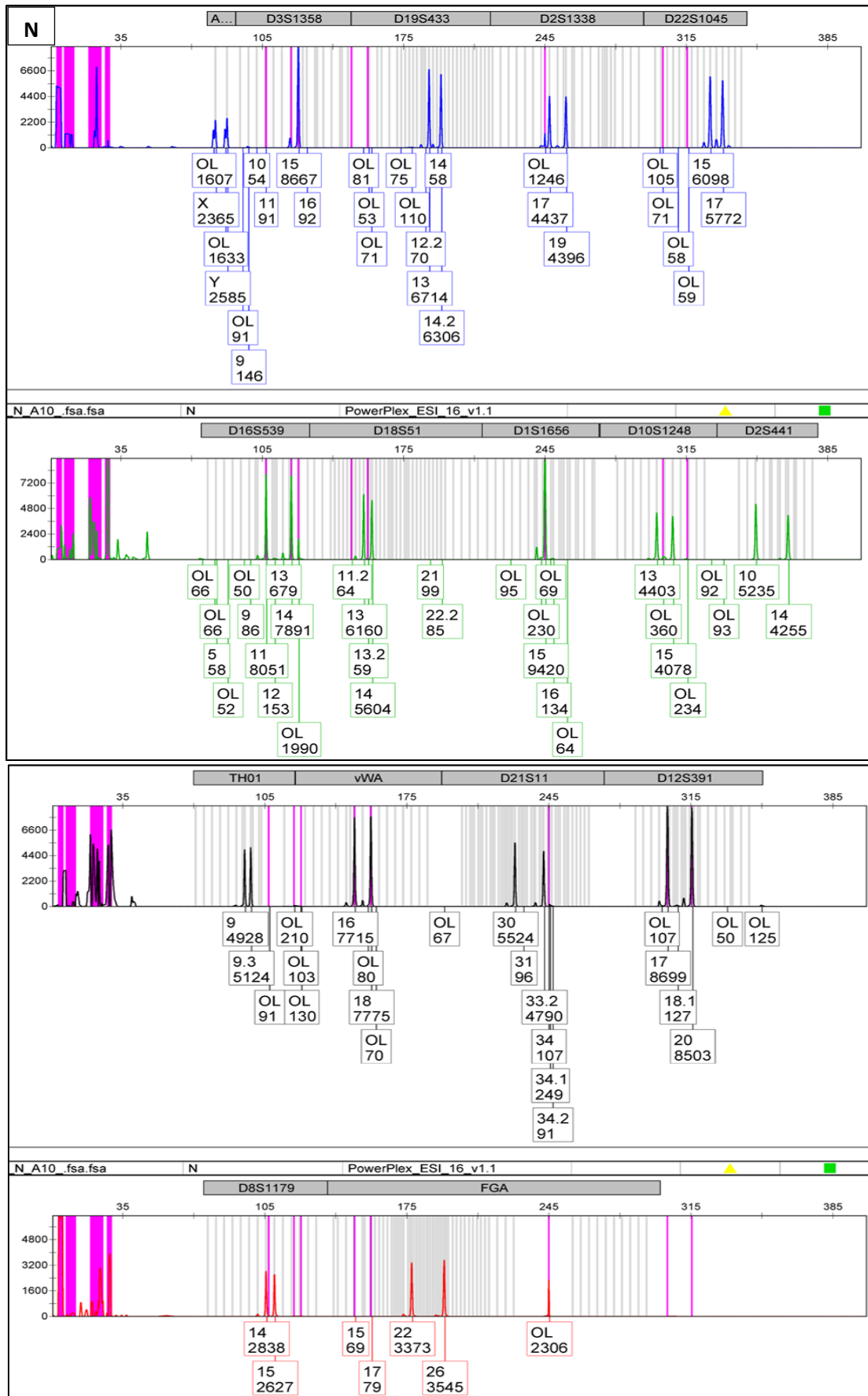


Figure 9 : Exemple de profil génétique d'un échantillon de 4 lavages, 27 cycles

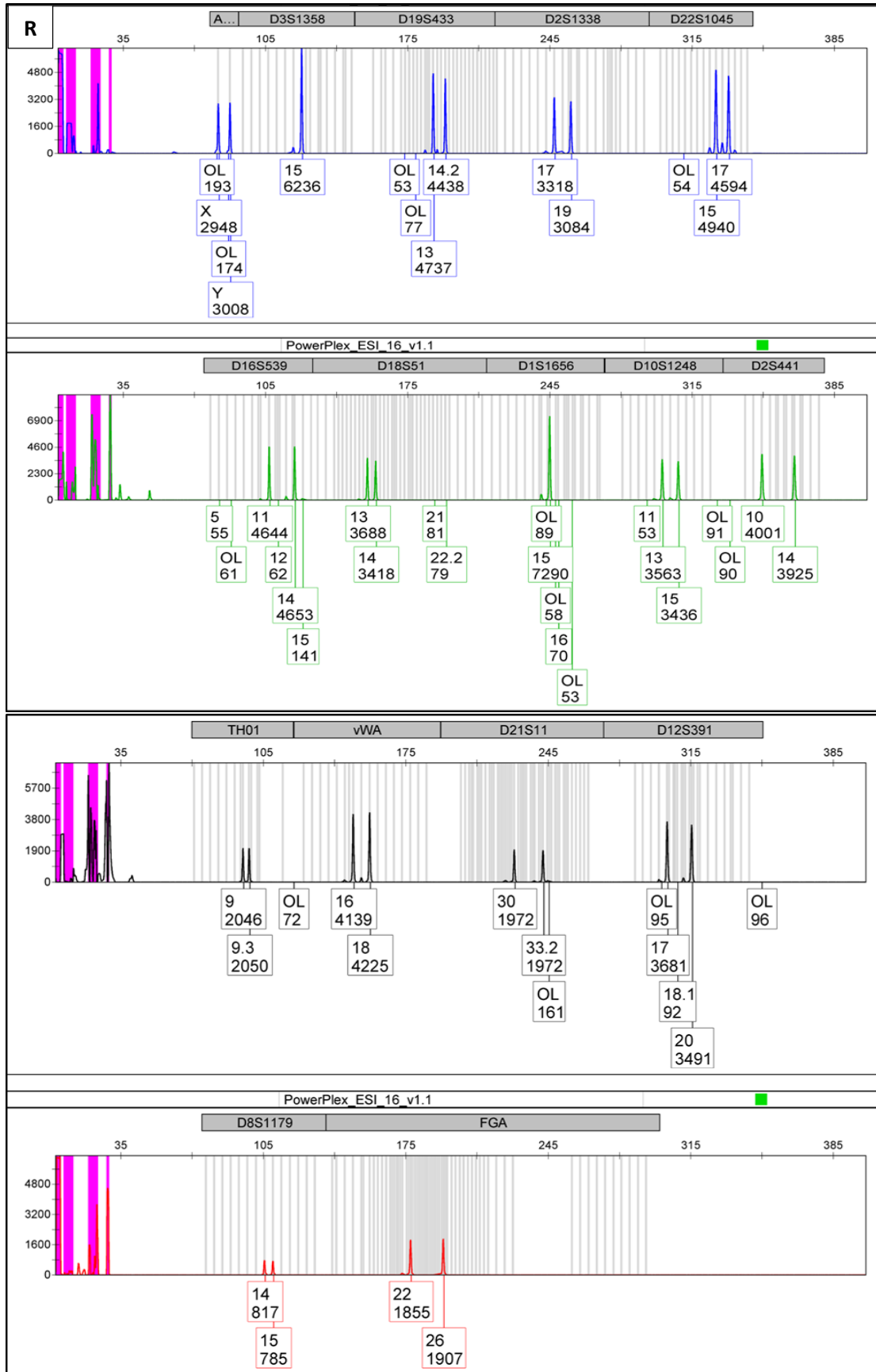


Figure 10 : Exemple de profil génétique d'un échantillon de 4 lavages, 26 cycles

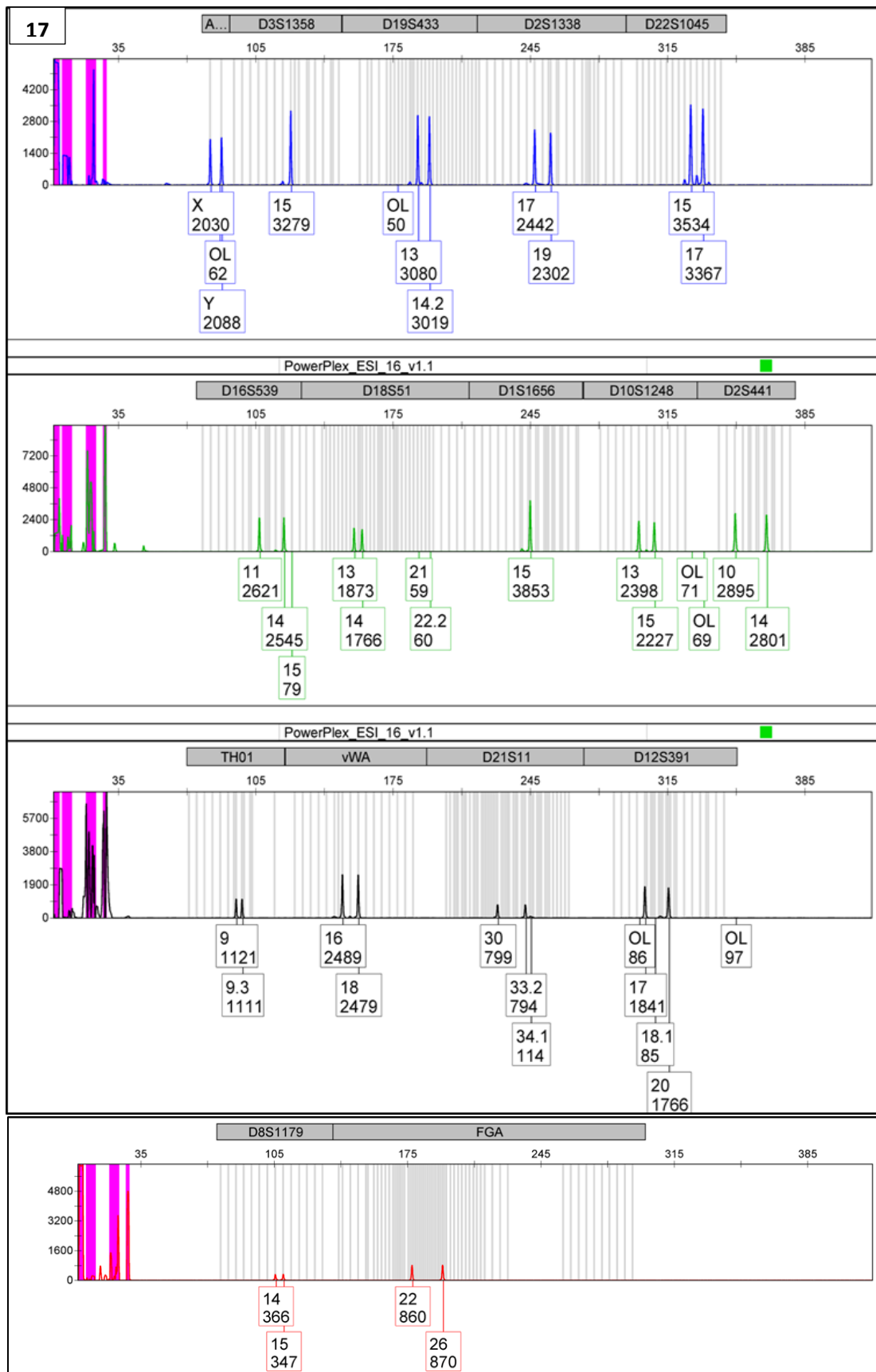


Figure 11 : Exemple de profil génétique d'un échantillon de 4 lavages, 25 cycles

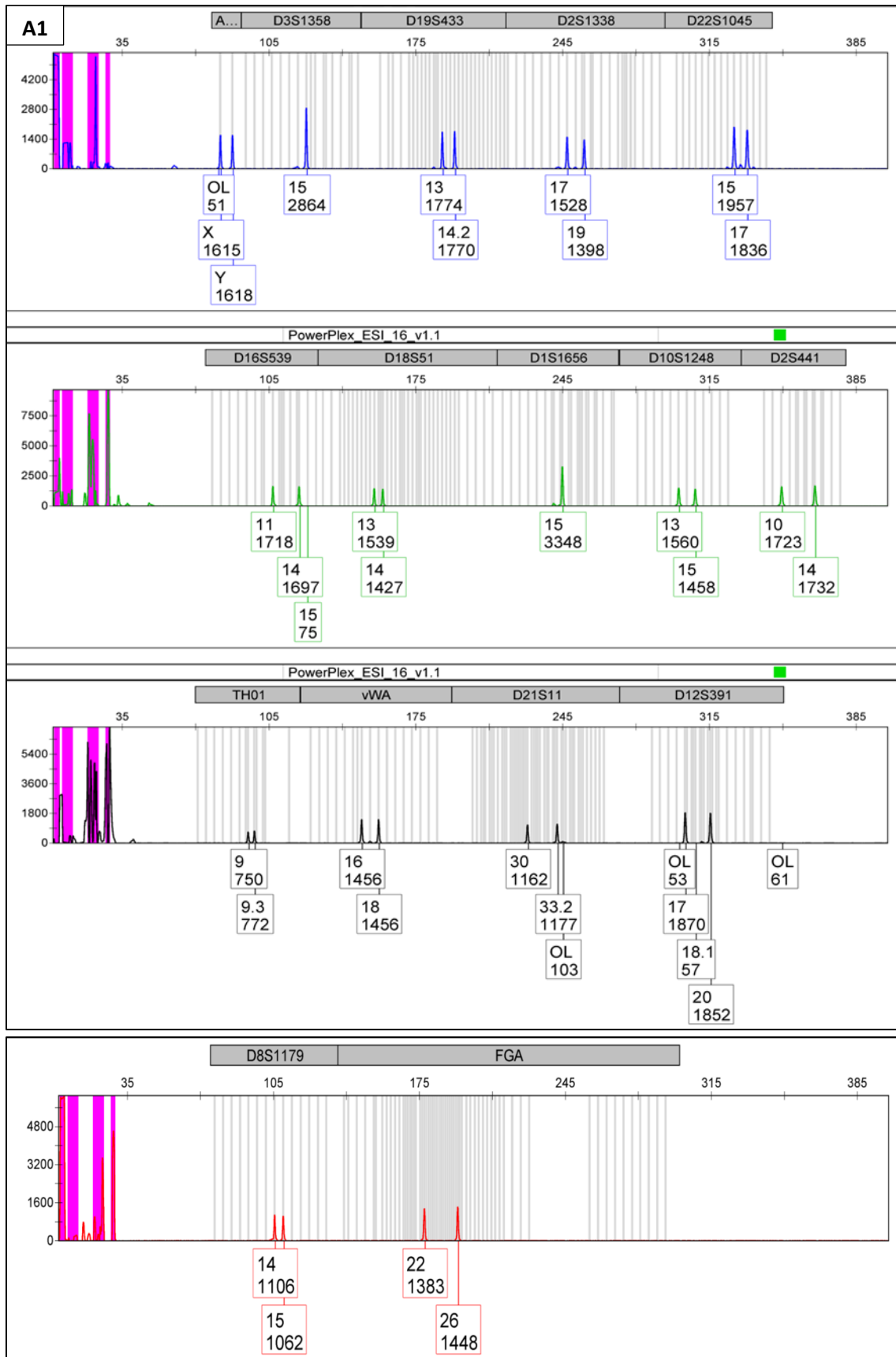


Figure 12 : Exemple de profil génétique d'un échantillon de 4 lavages, 24 cycles

Annexe 4

Tableau des moyennes des hauteurs de pics de différents marqueurs de la série 1 (3 lavages) à différents cycles d'amplification par PCR (29, 28, 27, 26, 25, et 24 cycles)

Marqueur	29 cycles	28 cycles	27 cycles	26 cycles	25 cycles	24 cycles
AMEL X	1836,750	2176,750	2523,750	4584,500	2091,250	1176,500
AMEL Y	2157,500	2366,000	2672,750	4632,000	2144,500	1199,500
D3S1358	8761,250	8829,000	8512,250	8395,500	3897,000	2510,250
D19S433	8660,625	8503,750	7234,875	6688,500	2766,750	1510,375
D2S1338	4993,750	5035,500	4663,125	5095,000	2425,000	1431,250
D22S1045	7712,250	7647,429	6805,250	7233,125	3101,000	1856,375
D16S539	9478,750	9551,000	8478,000	7092,250	2928,875	1484,000
D18S51	8722,875	8581,625	6648,375	5598,125	2186,000	1227,500
D1S1656	9514,750	9629,750	9418,250	9611,500	4954,750	3066,750
D10S1248	8445,500	7397,571	5147,250	5053,000	2090,250	1250,250
D2S441	6654,750	6790,625	5461,625	6135,875	2567,750	1529,375
TH01	6787,375	5778,375	4909,500	3352,750	1547,625	711,000
vWA	8557,125	8625,875	8129,625	5770,500	2582,875	1238,625
D21S11	5692,125	5857,375	4488,750	3461,125	1630,625	962,375
D12S391	8603,250	8614,875	7913,125	6275,000	2982,250	1724,125
D8S1179	1084,375	1648,875	1633,375	2061,875	1432,375	981,750
FGA	1657,000	2342,750	2357,250	3674,125	1953,250	1146,000

Annexe 5

Tableau des moyennes des hauteurs de pics de différents marqueurs de la série 2 (4 lavages) à différents cycles d'amplification par PCR (29, 28, 27, 26, 25, et 24 cycles)

Marqueur	29 cycles	28 cycles	27 cycles	26 cycles	25 cycles	24 cycles
AMEL X	2112,250	1883,250	2653,000	2438,000	1841,750	996,000
AMEL Y	2500,000	2058,000	2802,000	2439,000	1866,250	1001,500
D3S1358	8752,500	8530,500	8649,750	5165,500	3417,750	1786,500
D19S433	8700,000	8249,000	7134,875	3787,375	2418,625	1140,625
D2S1338	6214,125	5089,125	4744,000	2621,750	1910,750	988,625
D22S1045	7793,000	7744,250	6986,125	3852,125	2580,125	1223,500
D16S539	9467,750	8684,500	8173,625	3787,500	2387,375	1102,500
D18S51	8645,875	6216,375	5971,000	3009,625	1853,000	926,250
D1S1656	9406,750	9627,500	9587,000	5954,500	3859,500	2054,250
D10S1248	8780,500	6669,125	4823,000	2820,500	1847,750	945,125
D2S441	7236,875	6283,875	5249,500	3163,750	2182,875	1098,375
TH01	7474,250	4632,875	4402,500	1708,250	1202,375	508,500
vWA	8512,625	8461,125	7787,125	3481,875	2366,250	1007,125
D21S11	5614,500	2786,250	3924,000	1567,500	1229,750	669,375
D12S391	8534,375	6863,125	7649,000	2950,250	2218,375	1113,500
D8S1179	1335,750	458,625	1569,875	875,200	825,875	798,833
FGA	1680,500	950,125	2316,000	1892,700	1356,750	788,375

Annexe 6

Profils génétiques du père présumé, de la mère et de l'enfant pour le test de paternité

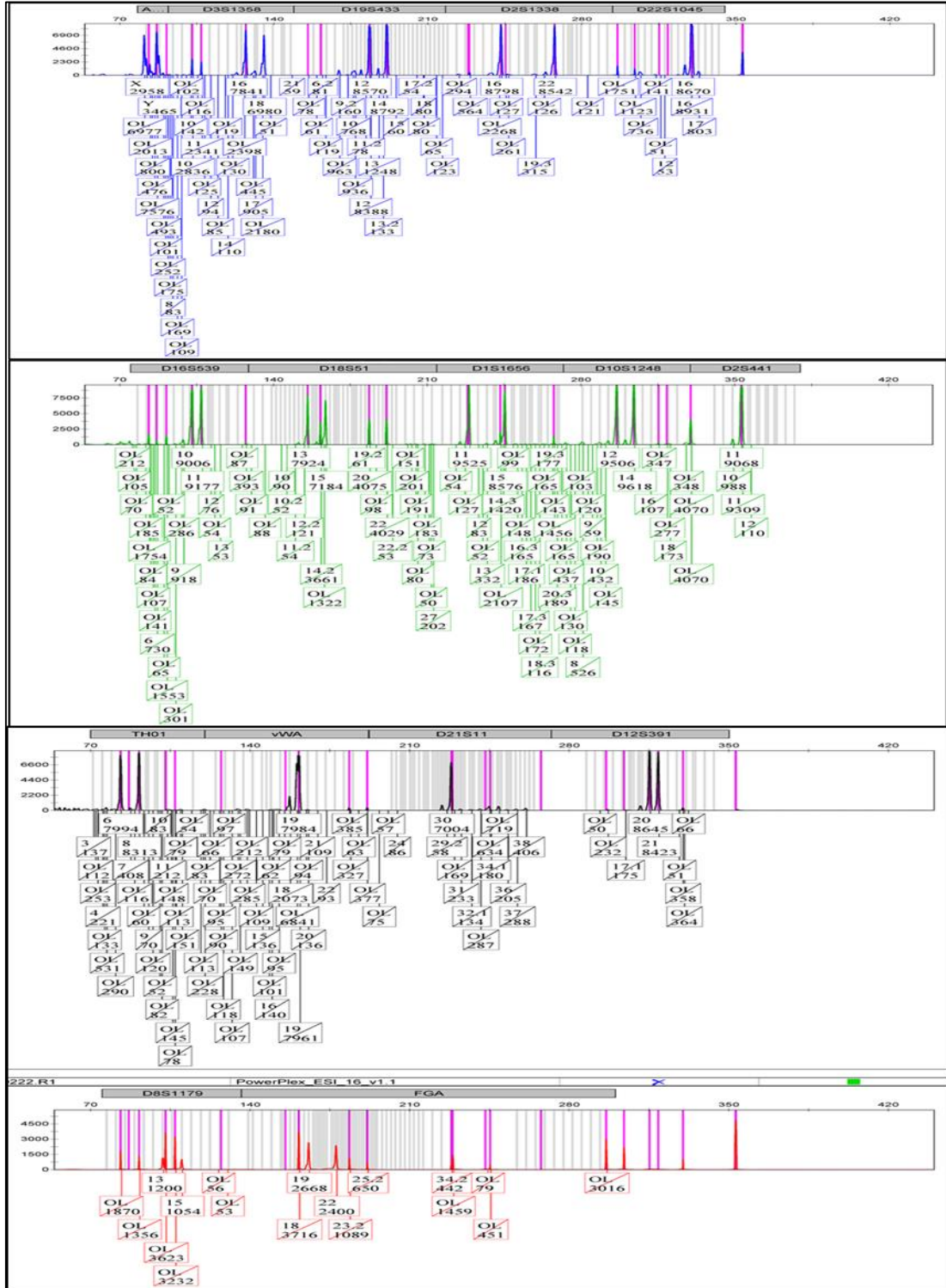


Figure 13 : Profils génétique du père présumé, obtenus en utilisant le protocole standard (3lavages / 29 cycles)

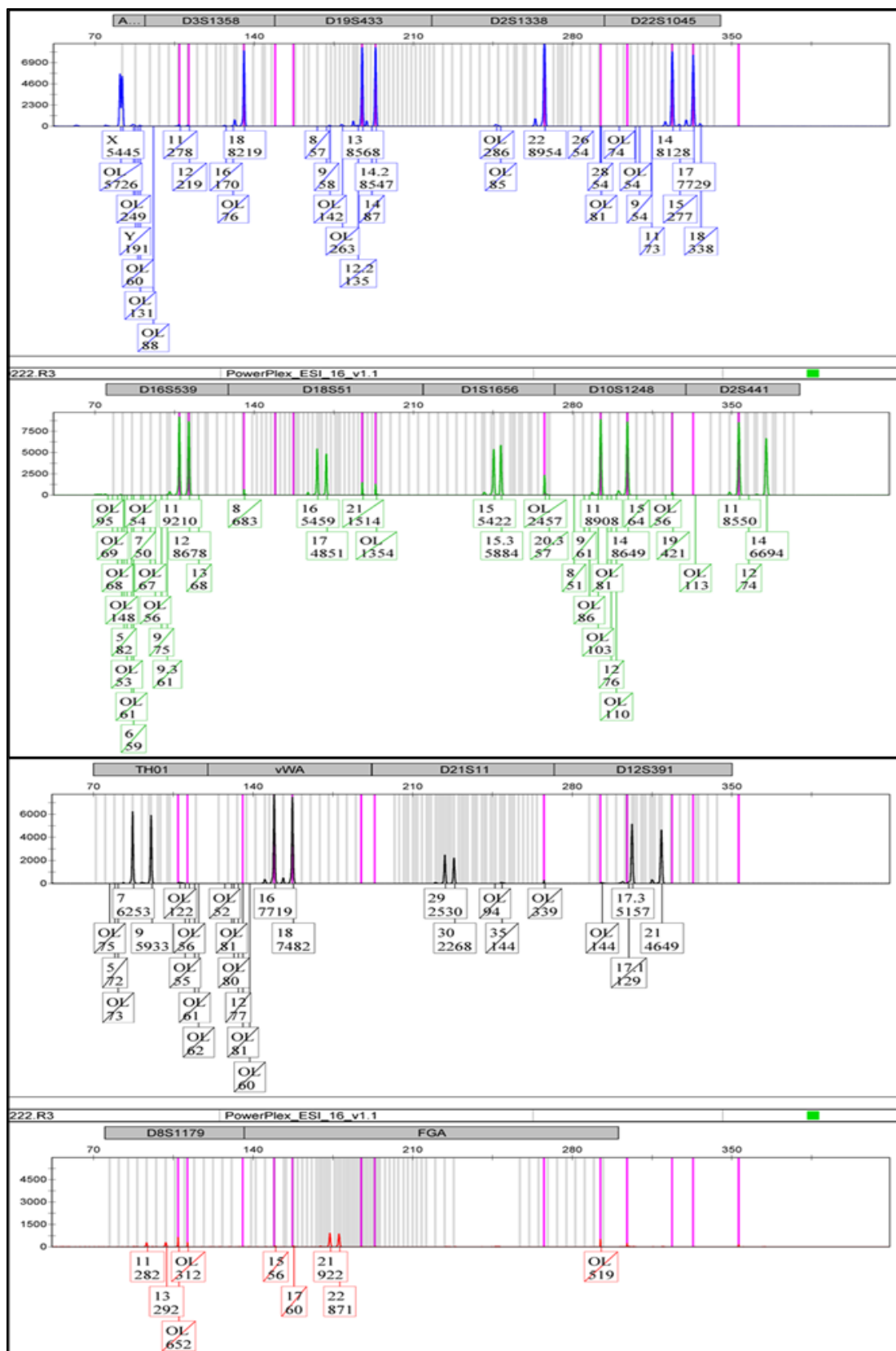


Figure 14 : Profils génétique de la mère, obtenus en utilisant le protocole standard (3lavages / 29 cycles)

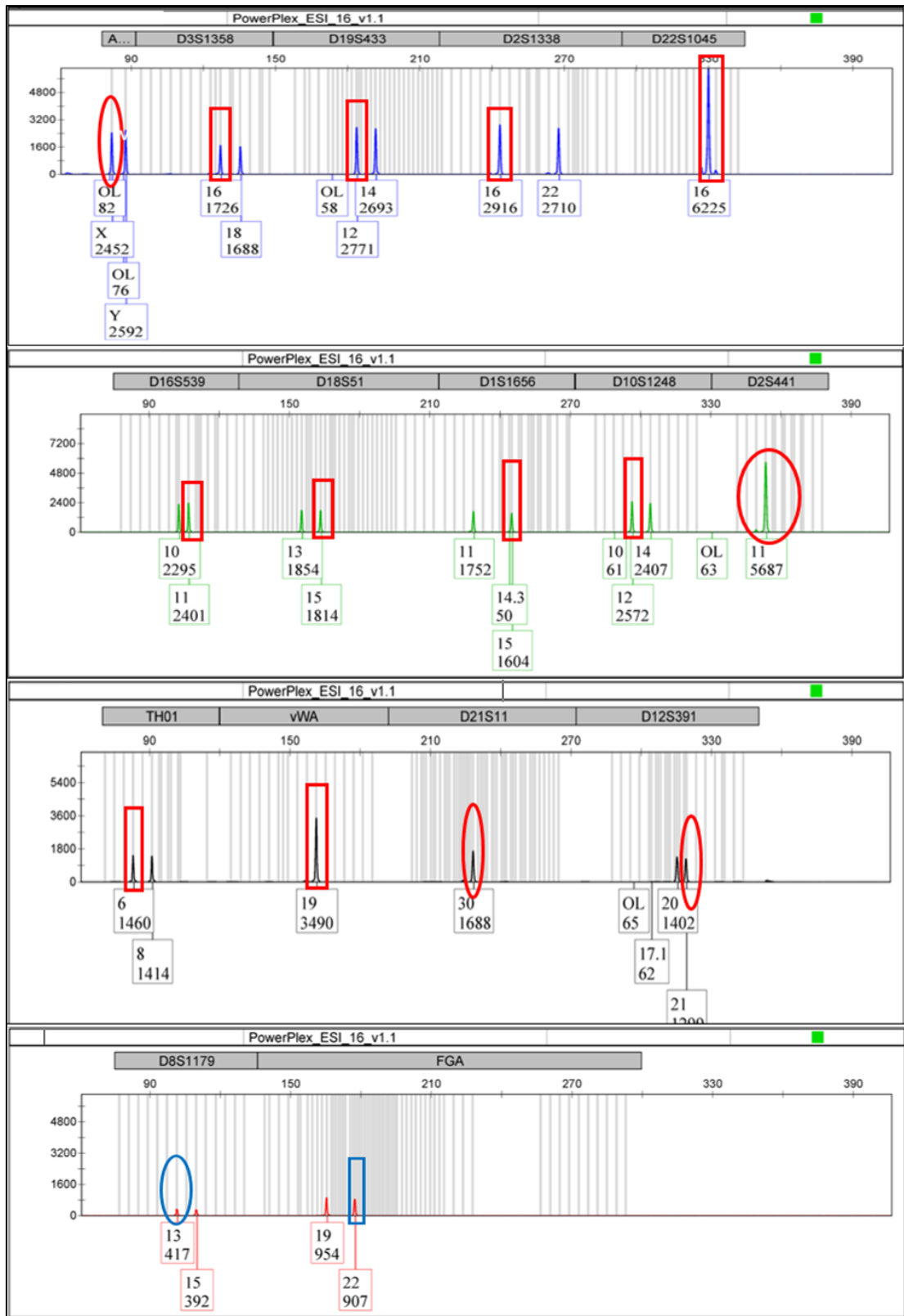


Figure 15 : Profils génétique du père présumé, obtenus en utilisant le protocole optimisé (3lavages / 25 cycles)

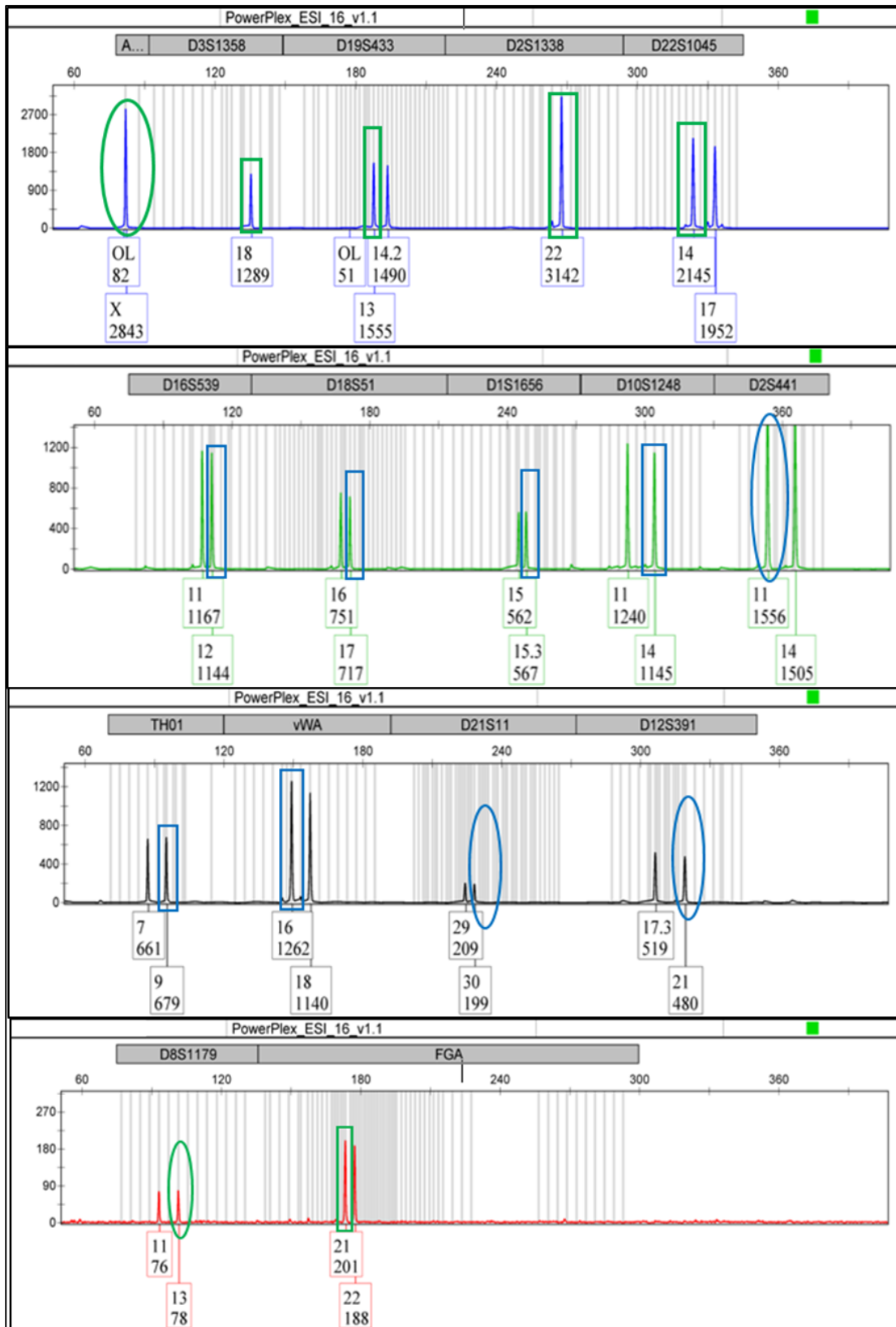


Figure 16 : Profils génétique de la mère, obtenus en utilisant le protocole optimisé (3lavages / 25 cycles)

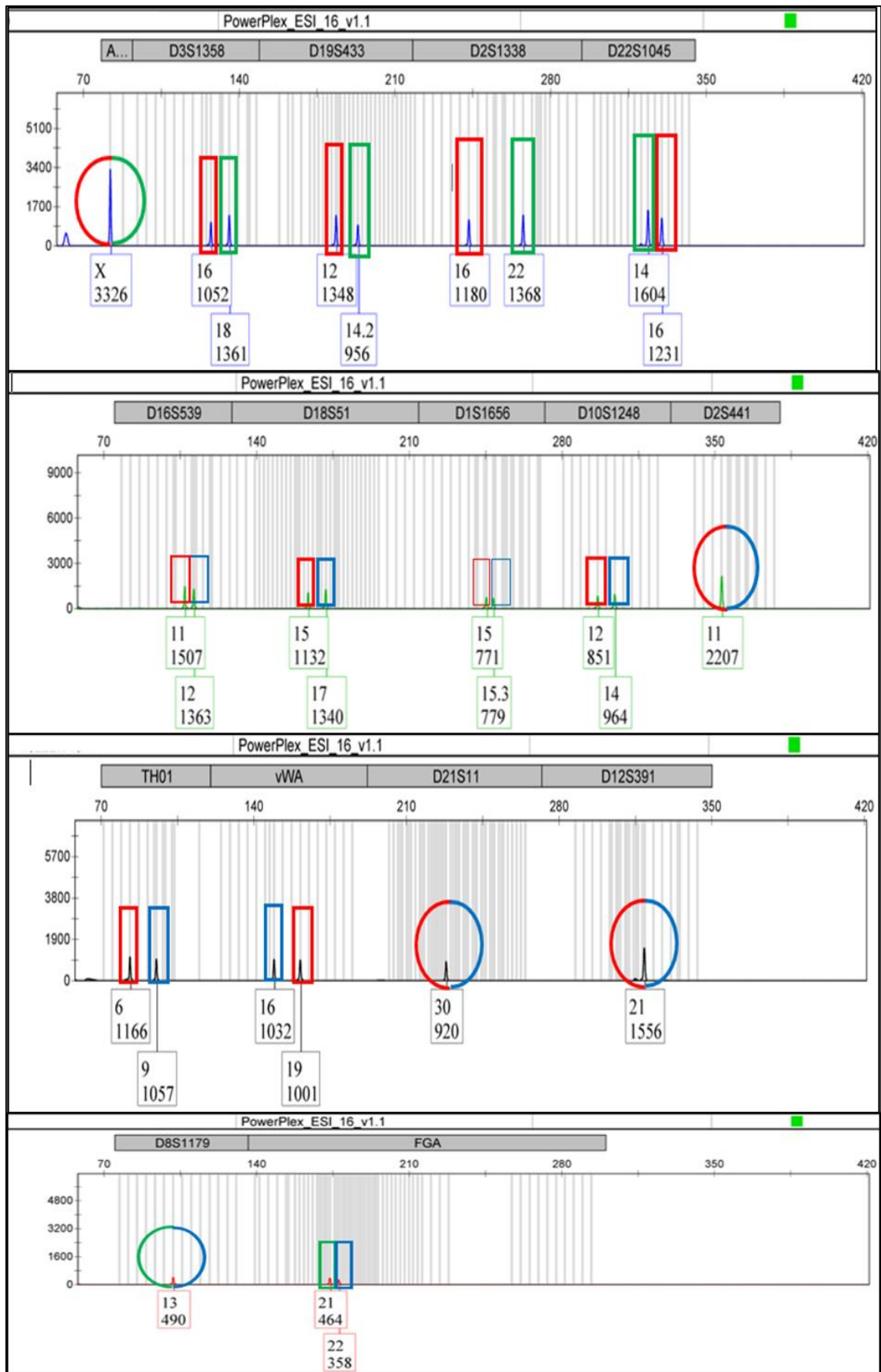


Figure 17 : Profils génétique de l'enfant

Annexe 7

Profils génétique de témoin positif et de témoin négatif des échantillons du père présumé et de la mère pour test de paternité

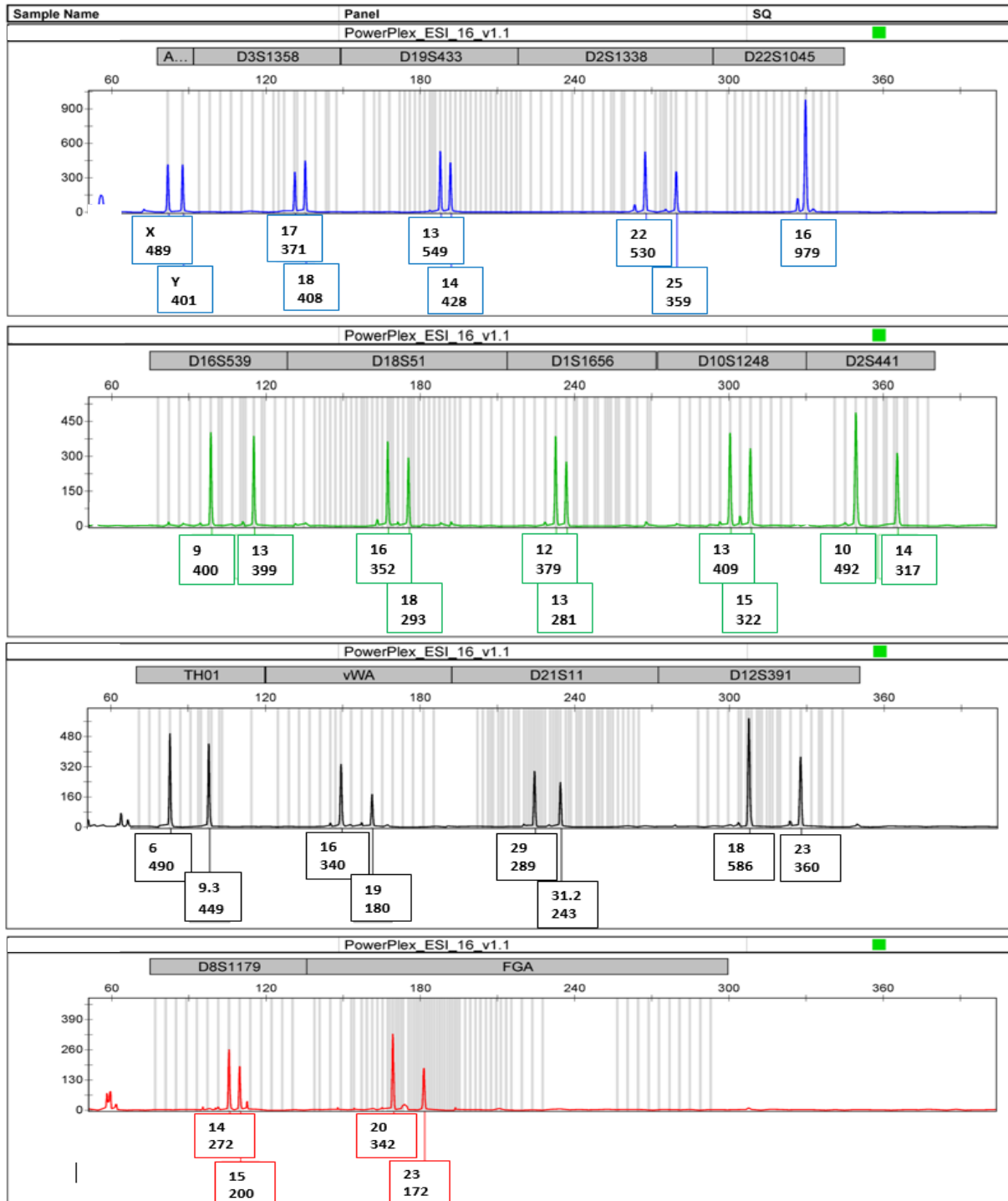


Figure 18 : Profil génétique de contrôle positif (0,5ng) obtenu après la co-amplification à 29 cycles des 16 marqueurs inclus dans le kit PowerPlex® ESI 16 system (amplifié avec l'échantillon du père présumé et celui de la mère)

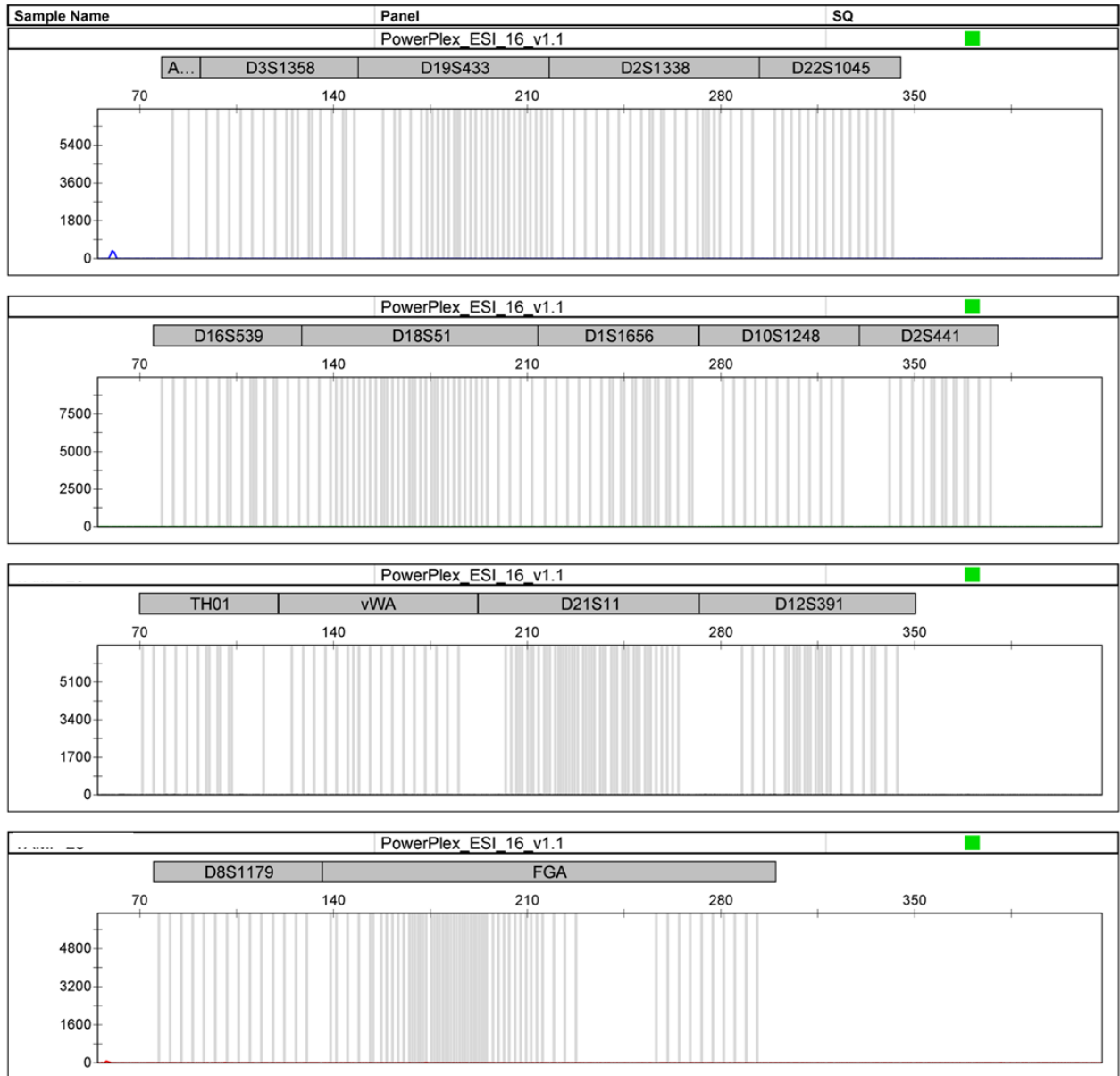


Figure 19 : Profil génétique nul de contrôle négatif obtenu après la co-amplification à 29 cycles des 16 marqueurs inclus dans le kit PowerPlex® ESI 16 system (amplifié avec l'échantillon du père présumé et celui de la mère).