

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



USDB



INCC-GN

Mémoire de fin d'études

en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Option : Génétique et Physiologie

Filière : Biologie

THEME

**Validation interne de l'extraction d'ADN par la
méthode QIAamp à partir d'un prélèvement de
référence sang et salive**

Réalisé par

HADJILA Sarra

Soutenu publiquement le **15 juin 2015**

Devant le Jury composé de :

Mr. MOHAMED SAID R.	MA	Université Blida 1	Président
Mme CHERRALLAH A.	MA	Université Blida 1	Examinatrice
Mr. BRAHIM ERRAHMANI M.	MA	Université Blida 1	Promoteur
Mr. DAHO K.	MSF	Expert en identification génétique INCC-GN	Co-promoteur
Mr. LAZREG S.	MSF	Expert en identification génétique INCC-GN	Invité d'honneur

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord à mon promoteur Mr Brahim Errahmani Mohamed, pour avoir accepté de m'encadrer, de me conseiller au quotidien et qui a toujours su diriger avec sagesse mon thème. Un immense merci pour sa disponibilité à toute heure, pour sa gentillesse et son écoute qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Vraiment, j'ai beaucoup appris à ses côtés, toujours dans un esprit de rigueur et d'entrain mêlés.

J'adresse aussi des remerciements tout particuliers à Mr Daho Kaddour, Responsable de la Qualité et spécialiste en analyse d'ADN au Laboratoire d'Analyses de l'ADN à l'INCC, qui a tout d'abord accepté de m'encadrer et pour le temps qu'il m'a consacré. Merci infiniment de m'avoir guidée, aidée et conseillée tout au long de mon travail.

Mes remerciements vont aussi aux membres du jury, Mr Mohamed Saïd Ramdane, Président et M^{me} Cherrallah Amira, pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

J'adresse mes chaleureuses salutations ainsi que mes sincères remerciements à tous mes enseignants du département de Biologie à l'Université Blida 1 pour leur efforts, le temps qu'ils nous ont consacré, et surtout pour toutes les connaissances qu'ils nous ont inculquées.

Je tiens aussi à remercier le Directeur Général de l'INCC pour m'avoir ouvert les portes de l'Institut, ainsi que Mr Boussoufi Ahmed, Chef du Département de Biologie, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Un immense merci au Mr Lazreg Samir, Chef du Laboratoire d'Analyses de l'ADN, pour m'avoir donné de son temps et pour l'intérêt qu'il a accordé à mon travail, son soutien a été précieux. Sa présence dans ce jury est un grand honneur pour moi.

Un grand merci à toutes les personnes travaillant au Laboratoire d'Analyses d'ADN de l'INCC pour m'avoir aussi bien accueillie, aidée, guidée et soutenue tout au long de mon stage. Ma gratitude s'adresse tout particulièrement Mr Aggoune Abdennacer pour sa gentillesse et pour son soutien théorique sans oublier Mr Bouchareb Adel qui a fait preuve d'écoute et de disponibilité.

Enfin, des vœux sincères à mes amies, à ma famille et surtout à mes parents, leur soutien et leurs encouragements m'ont été très précieux, un immense merci à tous.

Résumé

L'analyse de l'ADN est devenue une pratique de routine dans les laboratoires de médecine légale du monde entier ; cependant l'obtention d'un bon profil génétique nécessite une bonne méthode d'extraction d'ADN.

Les méthodes d'extraction de l'ADN existent en grand nombre, les meilleurs d'entre elles doivent répondre à deux impératifs : d'une part, fournir des quantités suffisantes d'ADN pour l'établissement de profils génétiques exploitables, et d'autre part, minimiser les inhibiteurs et toutes sortes d'impuretés.

Notre travail a consisté à valider en interne l'une de ces méthodes, basée sur l'utilisation du QIAamp Blood Mini Kit (firme QIAGEN), pour extraire l'ADN à partir de prélèvements de référence de sang et de salive.

Pour ce faire, plusieurs critères pertinents ont été évalués, la répétabilité et la reproductibilité interne avec des quantités extraites d'ADN restées tout le temps appréciables, comparables à celles données par le fabricant, avec des fluctuations raisonnables. En outre, l'étude de rendement effectuée en utilisant une concentration connue d'ADN a été trouvée dans une plage acceptable. Enfin, la dilution du sang pur jusqu'au $1/32^{\text{ème}}$ a donné une quantité d'ADN supérieure à la quantité d'ADN optimale requise pour produire un profil ADN complet et interprétable en utilisant tout kit commercial d'amplification.

Le critère de linéarité, testé pour évaluer la PCR RT, a montré que les quantités extraites d'ADN ont été linéairement corrélées, de façon très significative, aux concentrations de départ de la matière biologique; les cycles de seuil de la quantification par PCR en temps réel ont été trouvés proportionnels aux logarithmes des concentrations initiales c_i , en accord avec la théorie, ce qui a permis de déterminer l'efficacité E de la quantification trouvée proche de 100%.

Cette validation a permis de consolider la fiabilité du protocole d'extraction QIAamp Blood Mini Kit pour le sang et la salive, elle pourrait servir de guide pour la validation d'autres protocoles basés sur le même kit mais avec des teneurs d'ADN plus faibles.

Mots clés : profils génétiques, validation, QIAamp Blood Mini Kit, prélèvements de référence, la répétabilité, la reproductibilité interne, étude de rendement, la linéarité.

Abstract

DNA analysis has become a routine practice in any forensic laboratory worldwide nowadays; however obtaining a good DNA profile requires a good DNA extraction method. In order to choose the best DNA extraction method one should bear in mind two important criteria's: obtaining significant amount of DNA with high quality.

The present study consisted of an internal validation of a DNA extraction method using the QIAamp Blood Mini Kit from QIAGEN, applied for DNA extraction from reference samples of blood and saliva.

In order to achieve our goal, several parameters have been assessed, such as repeatability, intermediate precision where the DNA amount extracted was all the time significant and comparable to those obtained by the manufacturer with reasonable fluctuations. In addition, the yield study carried out using a known DNA amount was found in an acceptable range. Finally the result obtained from 1/32 dilution yield an amount of DNA greater than the optimum DNA amount required to produce a full and an interpretable DNA profile using any commercial amplification Kit.

The linearity parameter, tested to assess the RT PCR, demonstrated that the DNA quantities produced in different series have been linearly and significantly correlated with the starting concentration of the biological material. The cycling threshold of the quantification (Ct) was found to be proportional to the logarithm of the initial concentration (c_0) in agreement with the theory, the latter allowed to determine the efficiency E of the quantification that was near 100%.

This study allows corroborating the reliability of QIAamp Blood Mini Kit for DNA extraction form both reference sample blood and saliva. In addition, this study can be used as guidelines to perform further validation studies using the same Kit for trace DNA extraction.

ملخص

أصبح تحليل الحمض النووي ممارسة روتينية في المختبرات الجنائية عبر جميع أنحاء العالم في الوقت الحاضر، ولكن الحصول على حمض نووي ذو نوعية جيدة يتطلب طريقة استخلاص جيدة وفعالة.

كثيرة ومتعددة هي طرق استخلاص الحمض النووي المنقوص الأكسجين ADN إلا أن اختيار الأفضل منها يعتمد على تحقيق معياريين أساسيين، أولهما الحصول على كمية كافية من الحمض النووي لإنجاز البصمة الوراثية، وثانيهما تقليص كمية المثبطات وجميع أشكال الشوائب التي تحول دون الحصول على النتائج المرجوة

تتمثل هذه الدراسة في إثبات فعالية طريقة استخلاص الحمض النووي من عينات بيولوجية مرجعية من الدم واللغاب باستعمال "QIAamp Blood Mini kit" على المستوى الداخلي لمخبر التعرف الوراثي بالمعهد الوطني للأدلة الجنائية وعلم الإجرام للدرك الوطني.

من أجل تحقيق هذا الهدف تم تقييم عدة معايير كالتكرار باستعمال نفس العينة عدة مرات. وتوافق استخراجية النتائج باستعمال نفس الطريقة من طرف عدة تقنيين، حيث لوحظ أن كميات الحمض النووي المستخلصة بقيت دائما معتبرة ومقاربة للكميات التي أكدت من طرف المصنع مع بعض الاختلافات والتي كانت معقولة ومقبولة. بالإضافة الى دراسة المردودية، والتي تمت انطلاقا من تركيز معروف وأعطت نتائج مقبولة. وأخيرا الكمية المحصل عليها من العينة ذات التخفيف 32/1 اثناء دراسة معيار الحساسية لهذه الطريقة والتي سمحت بإعطاء كمية كافية بكثير من الكمية المطلوبة لإنجاز بصمة وراثية كاملة. ومعيار الخطية الذي تم دراسته من اجل التقنية التي استعملت من اجل تكميم الكميات المستخلصة بتقنيات الاستخلاص محل هذه الدراسة.

من جهة أخرى دورة التضخيم العتبة خلال مرحلة التكميم وجدت متناسبة مع لوغاريتم التركيز الاولي للعينات البيولوجية. هذه الأخيرة سمحت بالحساب الفعالية والتي كانت تقارب % 100.

هذه الدراسة اثبتت مصداقية "QIAamp Blood Mini kit" بالاستخلاص ADN من العينات المرجعية الدم و اللغاب بالإضافة الى ذلك يمكن استعمالها كدليل من اجل انجاز دراسات مصادقة أخرى باستعمال نفس الkit من اجل استخلاص ADN من عينات بيولوجية ذات كميات قليلة.

Glossaire

ADN codant

C'est la portion de l'ADN qui sera transcrite puis traduite en protéines. Il rassemble les gènes qui sont le support de l'information génétique essentielle à la vie de l'individu.

ADN non codant

Il représente la plus grande partie du génome et contient des séquences qui ne sont pas traduites en protéines ou qui n'ont pas de fonction biologique identifiée.

Allèles

Ce sont les différentes versions d'un même gène. Chaque allèle se différencie par une ou plusieurs différences de la séquence de nucléotides ; ces différences apparaissent par mutation, ou par recombinaison génétique. Tous les allèles d'un gène occupent le même locus (emplacement) sur un même chromosome.

Amorces

Ce sont des courtes séquences monocaténares d'ADN nécessaires pour initier la réplication par une ADN polymérase.

Amplicon

C'est un fragment d'ADN amplifié par PCR.

Agent chaotropique

C'est une molécule qui détruit la structure spatiale (tridimensionnelle) des macromolécules biologiques telles que les protéines et les acides nucléiques (ADN et ARN).

Chélation

C'est la formation d'un complexe caractérisé par un chélateur (le ligand) et un cation métallique lié au ligand par 2 liaisons ou plus. Les complexes sont des composés chimiques très stables.

Electrophorèse capillaire

Technique utilisée pour la séparation des protéines ou des acides nucléiques à l'aide de capillaires à base de silice. Elle est fondée sur le déplacement d'ions avec des vitesses de migration différentes sous l'effet d'un champ électrique.

Eléctrophorégramme

Condensé de résultats d'une analyse effectuée par séquençage automatique d'électrophorèse. Il montre une séquence de données produites par un système automatisé de séquençage de l'ADN de la machine.

Echelle allélique

Mélange artificiel d'allèles communs présents dans la population humaine pour un marqueur STR. Ils sont générés avec les mêmes amorces que les échantillons testés et fournissent ainsi une taille d'ADN de référence pour chaque allèle inclus dans l'échelle. Ces échelles alléliques servent comme une règle pour chaque locus STR.

Fluorochrome

Substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation.

Génome

Ensemble des informations génétiques constituant le patrimoine génétique de l'espèce.

Inhibiteur

Substance qui entraîne des erreurs de génotypage, biaisant ainsi l'identification des individus.

Thiocyanate de guanidinium

Sel composé des cations guanidinium $[\text{CH}_6\text{N}_3]^+$ qui est l'acide conjugué de la guanidine et d'anions thiocyanate, utilisé comme agent de dénaturation des protéines et communément utilisé pour l'extraction d'ADN et d'ARN.

Locus

Emplacement d'un segment d'ADN sur un chromosome défini par son contenu informationnel (gène) ou sa séquence qu'elle soit polymorphe ou non.

Lysats

Produits résultants de la désintégration de la membrane d'une cellule biologique par un agent physique, chimique ou biologique.

Marqueur génétique

Gène ou une séquence polymorphe d'ADN aisément détectable grâce à un emplacement connu sur un chromosome, utilisée en génétique pour identifier des individus ou des espèces.

PCR-multiplex

PCR destinée à amplifier simultanément plus d'un amplicon à la fois, par l'utilisation d'au moins trois amorces par réaction de PCR.

Polymorphisme

Coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou un locus donnés dans une population.

Profil d'ADN ou profil génétique

Résultat d'une analyse génétique rendant possible l'identification d'une personne à partir d'une petite quantité de ses tissus biologiques.

Protéinase K

Enzyme de la famille des protéases à sérine, elle permet de digérer des cellules et d'extraire des acides nucléiques (ADN ou ARN) à partir de cellules de mammifères ou de micro-organismes.

Résine échangeuse d'ions

L'échangeur d'ions est un matériau solide, souvent une résine, capable d'éliminer par adsorption des ions puis de les remplacer par une quantité équivalente d'autres ions de même charge.

Science forensique

Ensemble des principes scientifiques et des techniques appliqués à l'investigation criminelle, pour prouver l'existence d'un crime et aider la justice à déterminer l'identité de l'auteur.

Standard interne

Mélange de plusieurs fragments d'ADN dont les tailles sont connues.

Stutter

Produits secondaires qui apparaissent 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 dominant.

Taq polymérase

Enzyme, plus particulièrement une ADN polymérase thermostable isolée à partir la bactérie *Thermus aquaticus*, utilisée dans la PCR.

Abréviations

μL	micro litre
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
AE	Elution Buffer (Tampon d'élution)
AL	Lysis Buffer (Tampon de lyse)
ARN	Acide ribonucléique
AW	Wash Buffer (Tampon de lavage)
C	Cytosine
Ct	Threshold cycle (Cycle seuil)
CV	Coefficient de variation
dNTP	Désoxynucléotides triphosphate
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
ENFSI	European Network of Forensic Science Institutes
G	Guanine
INCC	Institut National de Criminalistique et Criminologie
IPC	Internal Positive Control
ISO	International Standardisation Organisation
kb	kilobase (=1000 bases)
mg	milligramme = 10^{-3} g
mL	millilitre = 10^{-3} L
ng	nanogramme = 10^{-9} g
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline

PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentiel hydrogen
QP	QIAGEN Protease (Protéase QIAGEN)
rpm	Rotations par minute
RT-PCR	Polymerase Chain Reaction en temps réel
S	écart type
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
STD	Standard
STR	Short Tandem Repeat
SWGDM	Scientific Working Group on DNA Analysis Methods
T	Thymine
VNTR	Variable Number Tandem Repeats

Liste des Tableaux

Tableau 1	Types de matériel biologique qui peuvent être récupérés d'une scène de crime ou des échantillons de référence	10
Tableau 2	Série 1 (répétabilité) de sang et de salive pour l'extraction de l'ADN	23
Tableau 3	Séries 2 et 3 (précision intermédiaire) de sang et de salive pour l'extraction de l'ADN	24
Tableau 4	Préparation de la série 4 des dilutions successives	26
Tableau 5	Protocole d'extraction de l'ADN par la méthode QIAamp pour le sang et la salive (Guide QIAamp, 2012)	29
Tableau 6	Calcul du rapport des dilutions pour l'amplification d'ADN	33
Tableau 7	Résultats de l'extraction d'ADN de la salive ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) à partir des séries de 10 répétitions chacune	36
Tableau 8	Résultats de l'extraction d'ADN du sang ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) à partir des séries de 10 répétitions chacune	39
Tableau 9	Rapports de dilution des quantités extraites d'ADN à partir de 10 échantillons de salive	43
Tableau 10	Rapports de dilution des quantités extraites d'ADN à partir de 10 échantillons de sang	43
Tableau 11	Dilutions successives allant du sang pur (1) à la 5 ^{ème} dilution ($1/32^{\text{ème}}$).	49

Liste des figures

Figure 1	Schéma du polymorphisme nucléotidique simple (SNP)	7
Figure 2	Processus impliqués dans la génération d'un profil d'ADN suite à un crime.	8
Figure 3	La liaison de l'ADN à la matrice de silice	12
Figure 4	L'immobilisation de molécules d'acide nucléique sur la membrane de silice	13
Figure 5	Le suivi en temps réel d'une réaction PCR	15
Figure 6	Principe de la technologie 5'-nucléase avec sonde Taqman.	16
Figure 7	Exemple d'un profil génétique étudiant le polymorphisme des STRs des autosomes sur deux loci vWA et D16S539.	17
Figure 8	Sang pur et série des 5 dilutions successives	25
Figure 9	Préparation de la série des dilutions successives	27
Figure 10	Distribution des concentrations d'ADN en $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ des 10 mesures de la série de répétabilité et des deux séries de reproductibilité de salive.	37
Figure 11	Graphes combinés de la répétabilité (1) et de la reproductibilité (2 et 3)	37
Figure 12	Comparaison des concentrations moyennes de l'ADN extrait de la salive. Les « box-plots » représentent la moyenne, l'erreur standard $ES = \frac{s}{\sqrt{n}}$ et la déviation standard s (écart-type)	38
Figure 13	Distribution des concentrations d'ADN en $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ des 10 mesures	39

de la série de répétabilité et des deux séries de reproductibilité

Figure 14	Graphe combiné de la répétabilité (1) et la reproductibilité (2 et 3)	40
Figure 15	Comparaison des concentrations moyennes de l'ADN extrait du sang. Les « box-plots » représentent la moyenne, l'erreur standard $SE = \frac{s}{\sqrt{n}}$ et la déviation standard s (écart-type)	40
Figure 16	Profil génétique complet obtenu à partir de la dilution 1 de la série de répétabilité de la salive (concentration d'ADN 3,39 ng.µL ⁻¹) établi grâce au kit AmpFISTR® IdentifierPLUS®	45
Figure 17	Profil génétique complet obtenu à partir de la dilution 1 de la série de reproductibilité de la salive (concentration d'ADN 2,08 ng.µL ⁻¹) établi grâce au kit AmpFISTR® IdentifierPLUS®	46
Figure 18	Profil génétique complet obtenu à partir de la dilution 1 de la série de répétabilité du sang (concentration d'ADN 33,28 ng.µL ⁻¹) établi grâce au kit AmpFISTR® IdentifierPLUS®	47
Figure 19	Profil génétique complet obtenu à partir de la dilution 1 de la série de reproductibilité du sang (concentration d'ADN 18,85 ng.µL ⁻¹) établi grâce au kit AmpFISTR® IdentifierPLUS®	48
Figure 20	Quantités moyennes extraites d'ADN du sang pur jusqu'à la 5 ^{ème} dilution (1/32 ^{ème})	50
Figure 21	Profil génétique complet obtenu à partir d'une concentration en ADN de 1,22 ng.µL ⁻¹ (dilution au 1/32 ^{ème}) établi grâce au du kit AmpFISTR® IdentifierPLUS®	53
Figure 22	Relation entre les quantités extraites d'ADN et les dilutions successives. La droite pleine est la droite de régression linéaire, la	54

région entre les lignes pointillées représente l'intervalle de confiance à 95%.

Figure 23	Détection de la fluorescence en temps réel et détermination de la concentration de l'ADN à l'aide du cycle seuil (Ct)	56
Figure 24	Courbe standard donnant le cycle de seuil Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité de matrice initiale	56
Figure 25	Représentation graphique des (Ct) retrouvés en fonction du logarithme des concentrations pour la série de dilution de sensibilité	57

Sommaire

Résumé

Glossaire et abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Introduction 1

Partie 1

Partie bibliographique 4

I. Le matériel génétique 5

I.1 Organisation de l'ADN dans les chromosomes 5

II. Analyse génétique 5

II.1 Le polymorphisme génétique 6

II.2 Les marqueurs génétiques utilisés à des fins d'identification 6

III. Méthodes d'analyse de l'ADN 8

III.1 Collection, caractérisation et stockage du matériel biologique 9

III.1.1 Sources de l'ADN 9

III.1.1.1 Collecte des échantillons de référence 9

III.1.1.2 Echantillons de traces 11

IV. L'extraction de l'ADN 11

IV.1 Méthodes utilisées pour l'extraction de l'ADN 11

IV.1.1 Kit QIAamp 13

IV.1.2 Le choix de la méthode d'extraction QIAamp 14

V. Quantification de l'ADN 14

V.1. Principe de la PCR quantitative en temps réel 14

V.2 Technologie 5' nucléase ou Taqman 15

VI. Amplification par PCR	16
VII. Détection des produits de la PCR (Electrophorèse capillaire)	16
VIII. Analyse des profils génétiques	17
Partie 2	17
I. La validation	18
I.1 Introduction	18
I.2 Principes de la validation d'une méthode	18
I.2.1 La validation interne	18
II. Les critères de la validation	18
Matériels et méthodes	20
1. Objectif	21
2. Préparations des échantillons	21
I. Extraction d'ADN	21
I.2.1 Préparation des échantillons de sang pour l'extraction	22
I.2.2 Préparation des échantillons de salive pour l'extraction	22
I.3 La validation	23
I.3.1 La répétabilité	23
I.3.2 La précision intermédiaire	24
I.3.3 La sensibilité	25
I.3.4 Etude du rendement	28
I.4 Protocole de l'extraction de l'ADN	28
II. Quantification de l'ADN	31
III. L'amplification par PCR	31

IV. Electrophorèse capillaire	33
V. Lecture et validation des résultats	34
VI. Analyse statistique	34
Résultats et discussion	35
I. Répétabilité et reproductibilité de la méthode d'extraction de l'ADN	36
I.1 Echantillon de salive	36
I.2 Echantillons de sang	38
I.3 Evaluation du rendement d'ADN à partir des prélèvements de sang et de salive	41
I.4 Vérification de la qualité de l'ADN obtenu par la méthode QIAamp	43
II. Résultats de la sensibilité	49
III. Linéarité de la méthode	51
IV. Etude de rendement	54
V. Résultats de la quantification	55
Conclusion	59
Bibliographie	
Annexes	

Introduction

Durant ces dix dernières années, une technique révolutionnaire est devenue une pratique courante en criminalistique. C'est la technique d'analyse de l'ADN, aussi appelée analyse des empreintes génétiques, décrite pour la première fois en 1985 par le généticien anglais Jeffreys (Butler, 2005).

L'analyse génétique implique le croisement d'un grand nombre de disciplines scientifiques, parmi lesquelles la biologie moléculaire, la génétique et l'analyse statistique, pour comprendre l'utilité ainsi que les limites de l'utilisation de l'ADN dans l'analyse criminalistique.

Dans le monde de la criminalistique, les expertises d'ADN touchent différents domaines d'application, tels que les tests de paternité, l'identification de restes humains suite à des catastrophes naturelles ou d'origine humaine, les attaques terroristes, mais également lors de la recherche de personnes disparues, ou d'auteurs de viols ou d'agressions. Ces expertises sont en général réalisées dans le cadre d'enquêtes judiciaires.

Les laboratoires d'analyse de l'ADN œuvrent à la recherche des profils génétiques d'individus à partir de différents types de matériel biologique (salive, sang, sperme, cheveux ou cellules épidermiques), pouvant provenir d'une large gamme de supports tels que les tampons de coton, le verre, le bois, les vêtements, les objets métalliques etc.

Pour les tests de travaux de routine, une procédure optimale d'extraction de l'ADN devrait permettre d'en récupérer de grandes quantités, cet ADN devant être pur et pouvant provenir de différents types d'échantillons (Castella et al., 2006). La procédure devrait aussi minimiser la plupart des inhibiteurs rencontrés dans les matières biologiques. Une extraction efficace de l'ADN est à la base du succès dans l'établissement d'un bon profil génétique. Les méthodes d'extraction de l'ADN varient dans leur capacité à extraire efficacement l'ADN, aussi bien par le temps de traitement, leur facilité d'utilisation, le type d'échantillon biologique, la quantité collectée dans l'échantillon de preuves ou le type de cellules présentées. Les méthodes d'extraction communes utilisées en analyse génétique sont l'extraction organique, le Chelex, ou celles basées sur des kits commerciaux opérant en phase solide (Kobilinsky et al., 2007)

Le but de notre travail au Laboratoire d'analyses ADN de l'Institut National de Criminalistique et Criminologie de la Gendarmerie Nationale (Bouchaoui) a consisté à évaluer et vérifier l'efficacité de la méthode d'extraction en phase solide utilisant le kit QIAamp DNA Blood Mini (de QIAGEN, annexe1) en mettant en œuvre des procédures de validation interne sur des prélèvements de référence de sang et de salive, grâce au suivi de quatre critères: la répétabilité, la précision intermédiaire, la sensibilité et la linéarité.

Un deuxième objectif consistait à étudier et évaluer le rendement de la méthode d'extraction QIAamp et sa capacité à produire une bonne quantité ainsi qu'une bonne qualité d'ADN humain à partir de prélèvements de référence.

L'extrait ADN a été quantifié par la Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel afin d'évaluer la quantité d'ADN présent dans le matériel biologique de départ.

Le présent manuscrit comporte deux parties : la première représente la synthèse bibliographique relative à l'analyse de l'ADN utilisé pour mettre en évidence le profil génétique en vue de l'identification des victimes de catastrophes, des auteurs dans des scènes de crime ou de viol, des personnes disparues. La deuxième partie est expérimentale avec un chapitre « Matériel et méthodes », un chapitre « Résultats et discussion » et une conclusion-perspective.

Partie

Bibliographique

L'utilisation de l'ADN dans le processus d'identification est devenue de plus en plus commune. Nous présenterons dans cette partie un précis succinct sur l'ADN et un aperçu sur le processus d'analyse génétique.

I. Le matériel génétique

Tous les organismes vivants sont constitués de cellules, qui sont les unités intégrées fondamentales de l'activité biologique. Chez les êtres humains, comme pour tous les autres organismes supérieurs, le matériel héréditaire, qui est l'acide désoxyribonucléique (ADN), se trouve dans le noyau de la cellule à l'intérieur des chromosomes : c'est l'ADN nucléaire, mais il ne représente pas la totalité de l'ADN des êtres humains puisque il existe un autre type d'ADN qui est l'ADN mitochondrial.

I.1. Organisation de l'ADN dans les chromosomes

Au sein de chaque cellule nucléée humaine, il existe deux copies du génome. Chez l'homme, le génome haploïde contient environ 3,2 milliards de paires de bases (pb), et est organisé en 23 chromosomes. Chez les humains, il y a 2 jeux de chromosomes, une version de chaque chromosome est héritée de l'un des parents ce qui donne un total de 46 chromosomes (Sozer, 2014)

L'ADN nucléaire est constitué de deux parties distinctes :

Une première partie (régions codantes) régulant la synthèse des protéines. Aux dernières estimations dans le génome humain, elle contiendrait 20 à 25 000 gènes, représentant environ 3% seulement de l'ADN génomique (Goodwin et al., 2007).

Une deuxième partie (régions non codantes) représentant les 97% restants. Une grande partie de cette séquence non codante est répétitive, la même séquence est répétée à plusieurs reprises, que ce soit en tandem ou dispersée sur les chromosomes (James et al., 2005).

II. Analyse génétique

L'analyse de l'ADN dans le traitement des dossiers judiciaires a pour but de produire un profil ADN. Ce profil est unique pour chaque individu.

En vue de l'identification génétique, ce sont des fragments de l'ADN non codant, qui seront examinées pour établir un profil génétique. Ces régions de forte variabilité sont très informatives pour l'analyse génétique. Plusieurs types de polymorphismes de l'ADN ont été utilisés comme marqueurs de la génétique, chacun révélant un niveau différent de variabilité.

II.1 Le polymorphisme génétique

Tous les individus qui composent l'espèce humaine sont génétiquement très proches les uns des autres, mais la présence d'un grand polymorphisme dans l'information génétique crée une biodiversité qui rend chaque être humain unique. C'est ce polymorphisme qui est à la base des moyens d'identification par les empreintes génétiques, qui sont constituées par plusieurs marqueurs génétiques et c'est en 1985 que Jeffreys décrit des régions génomiques très polymorphes, formées par de courtes séquences d'ADN qui se répètent en tandem (Mansuet-Lupo et al., 2007).

II.2 Les marqueurs génétiques utilisés à des fins d'identification

II.2.1 Le polymorphisme de répétition

Les séquences répétitives sont réparties tout au long du génome. Ces séquences répétitives représentent environ 50% du génome humain (James et al., 2005)

Deux catégories importantes de répétition en tandem ont été largement utilisées dans l'analyse génétique :

II.2.1.1 Les minisatellites ou VNTR

Les « minisatellites » ou VNTR « Variable Number Tandem Repeats » qui ont été les premières séquences décrites par Jeffreys.

La découverte des minisatellites a révolutionné l'utilisation de l'ADN en matière d'identification et de filiation. Les VNTR varient beaucoup en taille mais partagent tout un court motif entre 9 et 100 pb. Ce qui les caractérise particulièrement est la très grande variabilité du nombre de répétitions en tandem d'un individu à l'autre (0,5 à 30 kb en moyenne), d'où leur principale utilisation pour réaliser des empreintes d'ADN spécifiques à chaque individu. Les VNTR se trouvent toujours dans l'euchromatine, un grand nombre est situé dans les régions proches des télomères mais ils peuvent être aussi présents sur d'autres sites chromosomiques (Petkovski, 2006)

II.2.1.2 Les microsatellites ou STR

Les « microsatellites » ou STR « Short Tandem Repeats » décrits par Weber and May (1989) (Mansuet-Lupo et al., 2008). Ce sont des marqueurs formés de courtes séquences qui se répètent consécutivement dans des fragments d'ADN.

L'ADN microsatellite est constitué d'alignements de répétitions très courtes (2 à 5 nucléotides). Les STR sont très nombreux dans le génome et souvent très polymorphes par le nombre variable de répétitions. Ils sont uniformément dispersés dans toute la partie euchromatique des génomes (Butler and Hill, 2012).

Les microsatellites sont les piliers de l'analyse génétique (Lareu, 2013) en raison de leur petite taille qui en fait de meilleurs candidats pour une utilisation dans des applications d'identification génétique-

II.2.2 Les Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Les SNP ou Single Nucleotide Polymorphisms sont des variations de la séquence d'ADN portant sur un seul nucléotide (Figure 1).

Ces marqueurs sont répartis sur l'ensemble du génome, toutes les 500 paires de bases en moyenne, aussi bien dans les régions codantes (exons) que dans les régions non codantes (introns). Ils sont le plus souvent phénotypiquement neutres, c'est à dire qu'ils ne modifient pas le phénotype de celui qui les porte. A l'heure actuelle, plus de 5 millions de SNP ont été caractérisés.

Dans le domaine de l'identification génétique humaine, ces marqueurs se révèlent intéressants pour l'analyse de prélèvements biologiques dégradés, mais également dans les tests de paternité. Néanmoins, leur principal inconvénient réside dans le nombre élevé de zones à amplifier ; d'où leur faible utilisation à ce jour dans l'analyse d'ADN (Keyser and Petkovski, 2006)

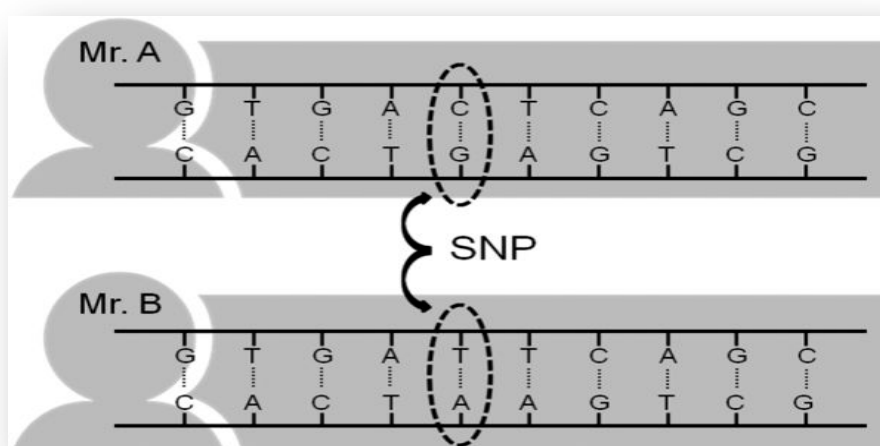


Figure 1 : Schéma du polymorphisme nucléotidique simple (SNP) (Hashiyada,2011)

II.2.3 Analyse de l'ADN mitochondrial

La plupart des cellules humaines contiennent des centaines de copies du génome de l'ADNmt. Ce nombre élevé de copies augmente la probabilité de récupérer suffisamment d'ADN provenant d'une quantité limitée de matériel biologique.

Une autre particularité de cet ADN est qu'il se transmet exclusivement par la voie maternelle. Il s'agit donc d'un ADN particulier qui n'est utilisé que par défaut en l'absence d'ADN nucléaire. Il est souvent exploité à partir des prélèvements d'os, de dents ou d'éléments pileux (Moore and Isenberg, 1999)

III. Méthodes d'analyse de l'ADN

Les laboratoires d'analyse d'ADN reçoivent dans un premier temps le matériel biologique récupéré à partir des scènes de crime et des échantillons de référence provenant d'individus connus (suspects, victimes...). Le rôle de la génétique criminalistique dans le processus d'enquête va être de comparer ce matériel avec celui des échantillons de référence.

L'analyse de la preuve génétique nécessite le passage par un certain nombre d'étapes (Figure 2).

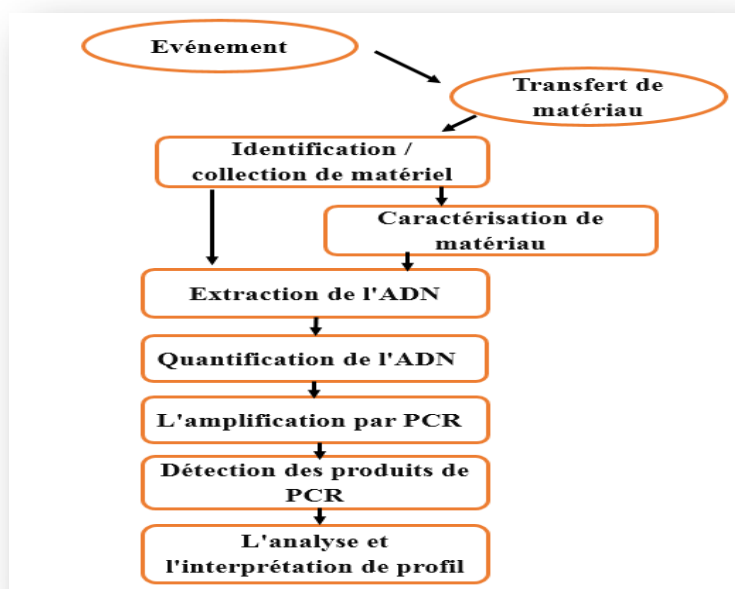


Figure 2 : Processus impliqués dans la génération d'un profil d'ADN suite à un crime (Goodwin et al., 2007).

III.1 Collecte, caractérisation et stockage du matériel biologique

Les données biologiques d'une scène de crime doivent être soigneusement collectées, transportées et stockées. Une mauvaise manipulation de la preuve peut avoir des conséquences graves comme causer une contamination, conduire à une dégradation de l'échantillon et même confondre l'interprétation de la preuve.

III.1.1 Sources de l'ADN

L'ADN a pu être extrait et analysé avec succès à partir d'une grande variété de matériels biologiques (Butler, 2011). En effet, l'ADN peut être extrait à partir de n'importe quelle partie du corps humain, les sources les plus communes étant les échantillons de sang ou de tissus mous du corps, les os, les cheveux, la salive, la sueur et l'urine (Taupin and Cwiklik, 2011).

De façon principale, les quatre types de cellules nucléées les plus courantes, récupérées à partir de scènes de crime, sont les globules blancs, les spermatozoïdes, les cellules épithéliales et les follicules pileux.

III.1.1.1 Collecte des échantillons de références

Afin d'identifier les échantillons récupérés à partir d'une scène de crime, des échantillons de référence sont nécessaires pour la comparaison (Tableau 1). Les échantillons biologiques de références, ou des échantillons connus, doivent être obtenus auprès des suspects et des victimes. Après analyse de l'ADN, les experts en criminalistique comparent les profils d'ADN générés à partir du matériel de la scène de crime aux profils d'ADN de référence (Brown and Davenport, 2015).

Les échantillons de référence proviennent également des membres d'une même famille dans les cas des tests de paternité, de personnes disparues ou d'identification des victimes de catastrophes de masse (Butler, 2011; Brown and Davenport, 2015).

Deux types d'échantillons sont plus souvent utilisés dans les laboratoires d'analyse d'ADN, la collecte des cellules buccales où le prélèvement de sang.

Tableau 1 : Différents types de matériel biologique pouvant être récupéré d'une scène de crime ou d'échantillons de référence

Echantillon de traces (scènes de crime)	Echantillon de référence
Sang	Sang
Sperme	Frottis buccal
Cheveux arrachés	Salive
Cellules épithéliales	
Salive	
Muscle	
Dents	
Os	
Trace de contact	

III.1.1.1.1 Échantillon de salive

Les échantillons de salive sont souvent utilisés comme des échantillons de référence pour l'analyse de l'ADN (Tilstone et al., 2006). L'ADN obtenu à partir de la salive n'est pas présent dans les excréments salivaires elles-mêmes, mais dans les cellules buccales contenues dans la salive. Par ailleurs, le taux de succès de l'ADN de la salive est variable car il est impossible de prévoir la quantité de cellules buccales dans la bouche (Taupin, 2013).

Les avantages de l'utilisation de la salive est qu'elle est facilement disponible, facile à percevoir, et bénéficie d'un stockage simple et à faible coût (Lima et al., 2010).

III.1.1.1.2 Echantillon de sang

La collecte de sang de personnes connues est une ressource facilement accessible pour l'extraction de l'ADN et son analyse ultérieure dans un protocole d'identification. Bien qu'il soit possible d'obtenir de l'ADN d'autres sources telles que des prélèvements buccaux ou des échantillons de cheveux, leur utilité est souvent limitée en raison des faibles rendements par rapport à ceux obtenus à partir du sang. C'est ainsi que ce dernier fournit une des sources les plus courantes d'ADN de haute qualité en quantité élevée à des fins d'identification (Richardson et al., 2006).

III.1.1.2 Echantillons de traces

En criminalistique, les traces biologiques exploitables correspondent à des substances issues d'êtres vivants, échangées ou laissées sur une scène de crime. En particulier, le transfert direct de l'ADN d'un individu à un autre ou à un objet peut être utilisé pour relier un suspect à une scène de crime (Butler, 2011).

IV. L'extraction de l'ADN

L'ADN provenant d'un échantillon biologique doit être purifié des autres matières cellulaires avant d'être examiné (Butler, 2011). Cependant, l'ADN est emballé et protégé à l'intérieur de la cellule par des protéines qui peuvent en inhiber le processus d'analyse, d'où les méthodes d'extraction développées pour la séparation des protéines et d'autres matières cellulaires (Butler, 2005).

Les principales caractéristiques recherchées dans les méthodes d'extraction comprennent une récupération élevée d'ADN et une élimination des impuretés et des inhibiteurs (Sozer, 2014). En effet, il existe de nombreuses méthodes pour extraire l'ADN dont le choix dépend d'un certain nombre de facteurs comme le type d'échantillon, la quantité disponible, le temps que prend la procédure d'extraction ainsi que le type de produits chimiques utilisés.

IV.1 Méthodes utilisées pour l'extraction de l'ADN

Il existe un grand nombre de méthodes d'extraction de l'ADN.

L'extraction organique basée sur la méthode au phénol-chloroforme, progressivement éliminée dès le milieu des années 1990, principalement en raison de la nature toxique du phénol, mais qui reste toutefois utilisée dans certains laboratoires d'analyse génétique (Goodwin et al., 2007). C'est en particulier une méthode de choix pour des échantillons contenant de très petites quantités d'ADN (tige de cheveux, échantillons d'os, échantillons décomposés) (Köchel et al., 2005).

L'extraction « Chelex », méthode souvent favorisée car elle est plus rapide que la méthode organique, ne nécessite pas les multiples transferts de tube et n'utilise pas de solvants organiques toxiques tels que le phénol-chloroforme (Kirsty et al., 2012). En outre, l'extraction Chelex comporte moins d'étapes et donc moins de risques de contamination de l'échantillon. Elle produit toutefois un ADN simple brin à la suite du processus d'extraction

(Butler, 2011), avec un certain inconvénient puisque le produit extrait n'est pas pur, cette méthode restant incapable d'éliminer les inhibiteurs (Kirsty et al., 2012).

L'extraction en phase solide : permettant un haut débit et basée sur des produits d'extraction à base de silice (Butler, 2011). Cette technologie a été développée par la firme néerlandaise QIAGEN (N.V., Spoorstraat 50, 5911 KJ Vento, The Netherlands) avec le kit QIAamp DNA Blood Mini Kit, qui, à ce jour, fait toujours l'objet de multiples publications (Greenspoon, 1998).

Dans cette approche, les acides nucléiques s'adsorbent de manière sélective à la silice fixée sur un support. La fixation de l'ADN à la matrice de silice est due à la forte affinité de l'ADN, chargé négativement, pour les particules de silice chargées positivement (Figure 3) (Esser et al., 2006). L'ADN se lie à la silice par interactions de type hydrogène sur une matrice hydrophile fournie par la silice, le tout baignant dans des sels chaotropiques fortement concentrés (Figure 4) (Berensmeier, 2006). L'adsorption de l'ADN sur la surface de la silice est donc due à l'effet de la force ionique et est fonction de la température, du pH et de la taille de l'ADN. Les contaminants et les débris cellulaires, quant à eux, sont éliminés par lavage ; l'ADN est ensuite élué de la membrane de silice dans un tampon pauvre en sel (Biopolymer Isolation Technologies, LLC).

Dans la pratique, cette dernière méthode est rapide, non toxique et peut produire des rendements élevés d'ADN pur, en général de haute qualité et double brin; il peut être utilisé pour une grande variété d'applications (Rudin and Inman, 2001).

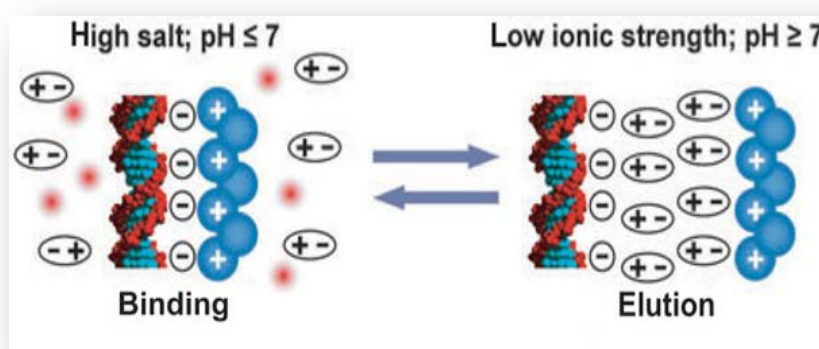


Figure 3 : La liaison de l'ADN à la matrice de silice (Esser et al., 2006)

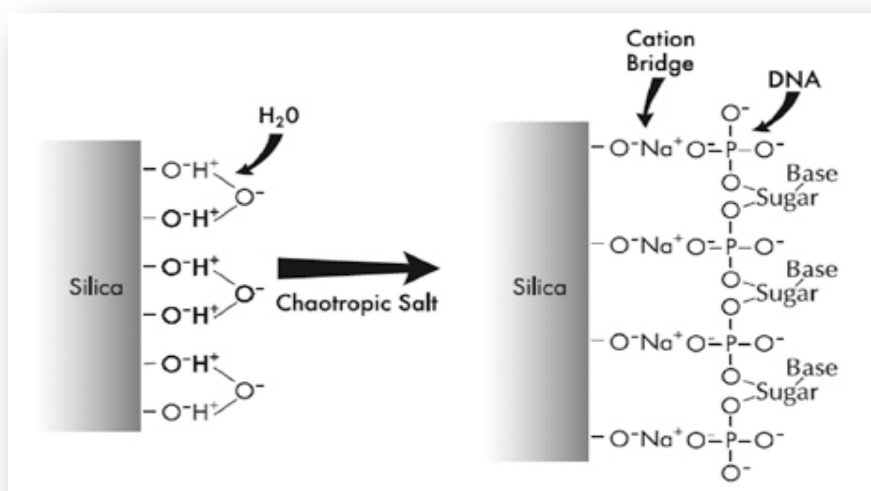


Figure 4 : La membrane de silice fournit un support universel pour l'immobilisation des molécules d'acide nucléique (van Pelt et al., 2008).

Dans ce qui suit va être détaillé le principe d'extraction de l'ADN en utilisant le QIAamp DNA Blood Mini, kit d'extraction de QIAGEN.

IV.1.1 Kit QIAamp

La méthode d'extraction par le kit QIAamp DNA Blood Mini Kit a été développée par QIAGEN pour des applications en analyse génétique (Xenophontos et al., 2015). Elle est utilisée dans le traitement simultané de plusieurs échantillons et fournit le moyen le plus rapide et le plus facile pour purifier l'ADN en vue d'une utilisation fiable dans les techniques d'amplification.

Hormis l'extraction d'ADN à partir du sang, celle à partir de la salive utilisant le QIAamp DNA Blood Min Kit est référencée dans plusieurs publications (El Mogy et al., 2012; Ghirmai, Biomatrix) de même que la variabilité des quantités extraites (Ng et al., 2004)

Cette méthode comprend quatre étapes principales (Kennedy, 2010) :

a. La lyse des cellules dans l'échantillon

Cette première étape de l'extraction comprend l'incubation du matériau cellulaire dans un tampon de lyse contenant un détergent en présence de la protéinase K. Le tampon de lyse contient une forte concentration de sels chaotropiques qui déstabilisent les protéines conduisant à la dégradation de la structure cellulaire.

b. La fixation de l'ADN du lysat cellulaire à la membrane d'une colonne QIAamp DNA Blood Mini

Dans cette 2^{ème} étape, l'éthanol est ajouté pour améliorer la liaison de l'ADN de notre échantillon à la membrane de silice de la colonne QIAamp.

c. Le lavage de la membrane

La colonne est ensuite lavée avec des tampons pour en éliminer toutes les impuretés. Il existe typiquement deux lavages, suivis chacun par une étape de centrifugation. Le premier lavage sera souvent faiblement concentré en sels chaotropiques pour une élimination efficace des protéines et des contaminants colorés. Il s'ensuit un deuxième lavage, fortement concentré en éthanol, qui parachèvera l'élimination des sels restants.

d. L'élution de l'ADN à partir de la membrane

Lorsque le tampon d'élution est ajouté aux acides nucléiques, ces derniers s'hydratent et se dégagent de la membrane. L'élution de l'ADN peut être maximisée en permettant au tampon de s'étaler dans la membrane pendant quelques minutes avant la centrifugation.

IV.1.2 Le choix de la méthode d'extraction QIAamp

L'avantage de la méthode d'extraction manuelle utilisant le kit QIAamp est sa facilité d'utilisation, son adaptation à divers types d'échantillons et la diminution des risques de contamination intertubes. L'ADN extrait est de bonne qualité.

V. Quantification de l'ADN

C'est une étape importante pendant laquelle l'ADN doit être quantifié à partir d'extractum d'échantillons biologiques. L'introduction de la technologie PCR en temps réel a considérablement amélioré et simplifié la quantification des acides nucléiques.

V.1 Principe de la PCR quantitative en temps réel

La PCR en temps réel utilise le principe de base d'une amplification mesurée tout au long de la réaction, donc en temps réel. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. Ceci permet de suivre la cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN (Mathys et al., 2007).

Cette méthode se base sur la détection et la quantification d'une molécule fluorescente (*reporter*) dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction. (Figure 5).

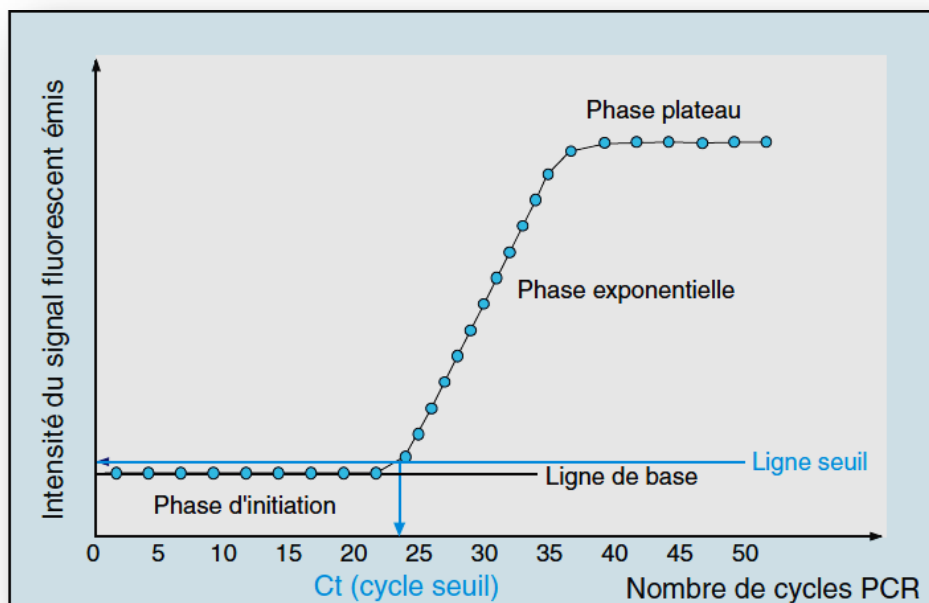


Figure 5. Le suivi en temps réel d'une réaction PCR dont la cinétique met en jeu trois phases : une phase d'initiation, une phase exponentielle et une phase plateau (Tse and Capeau, 2003)

Dans cette étude le système de PCR en temps réel nécessite des sondes marquées par un fluorophore et qui utilisent l'activité 5' nucléase de la Taq polymérase.

V.2 Technologie 5' nucléase ou Taqman

La technologie 5' nucléase détecte l'accumulation des produits de la PCR par l'hybridation et le clivage d'une sonde fluorogénique doublement marquée pendant la réaction d'amplification (Livak et al., 1995).

Les sondes TaqMan utilisent l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser la sonde fluorescente fixée sur sa cible. Au cours de la phase d'hybridation de la PCR, la sonde se lie à sa séquence cible. Pendant la phase d'élongation, lorsque la Taq polymérase atteint la sonde hybridée, son activité exonucléasique 5'-3' va déplacer la sonde et la dégrader. Cela entraîne un éloignement des fluorophores rapporteurs et accepteurs et donc une augmentation de la fluorescence du fluorophore rapporteur qui est mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification (Figure 6) (Chiaroni et al., 2011).

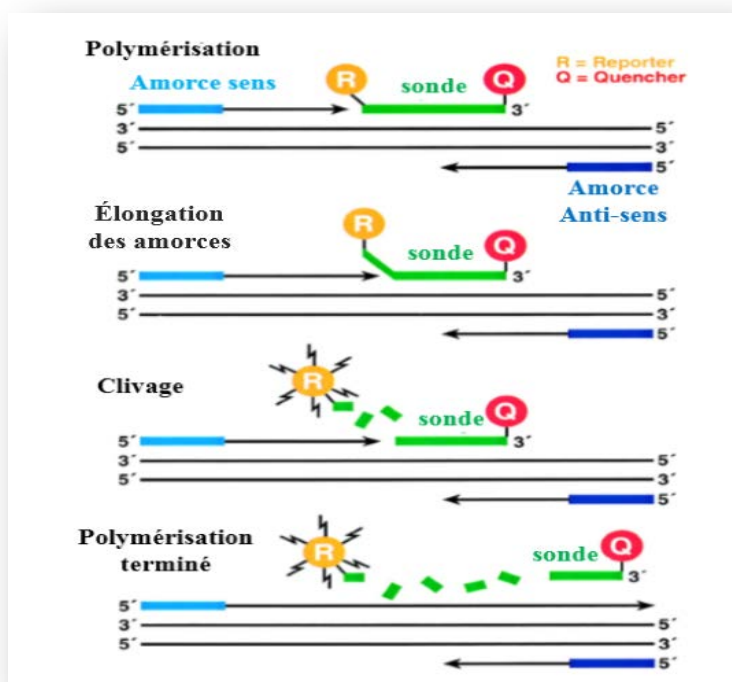


Figure 6 : Principe de la technologie 5' nucléase avec sonde Taqman
(adapté d'après Livak et al., 1995)

VI. Amplification par PCR

L'amplification est actuellement la méthode la plus largement répandue pour l'étude des profils génétiques. On utilise en particulier la PCR multiplex qui permet d'étudier simultanément plusieurs STRs en utilisant plusieurs amorces spécifiques des différentes régions d'intérêt, chacune de ces amorces étant marquée par un fluorochrome différent (Mansuet-Lupo et al., 2007).

VII. Détection des produits de la PCR (Electrophorèse capillaire)

La séparation de l'ADN amplifié est couramment effectuée par électrophorèse ou d'autres méthodes instrumentales. La méthode couramment utilisée dans les laboratoires d'analyse génétique est l'électrophorèse capillaire (Sozer, 2014).

La détection des allèles est mise en évidence par amplification PCR et analysées par électrophorèse capillaire automatique. La détection se fait au moyen de kits commerciaux qui permettent une analyse simultanée et entièrement automatisée de plusieurs STRs (entre 12 et

16) associés à un marqueur sexuel du gène de l'amélogénine afin de révéler le sexe de la personne à l'origine de l'échantillon analysé (Mansuet-Lupo et al., 2007).

VIII. Analyse des profils génétiques

Une fois que les résultats techniques d'ADN sont obtenus après séparation et détection des produits de la PCR, un profil d'ADN est généré. De façon typique, ces profils sont obtenus grâce à des logiciels d'analyse génétique, les données de l'électrophorégramme sont converties en un profil d'ADN (Figure 7).

Ceci est le but ultime de tout laboratoire d'ADN : générer un profil d'ADN pour tout type d'échantillon inconnu provenant de restes humains ou de références en vue de comparaisons à des fins d'identification (Sozer, 2014).

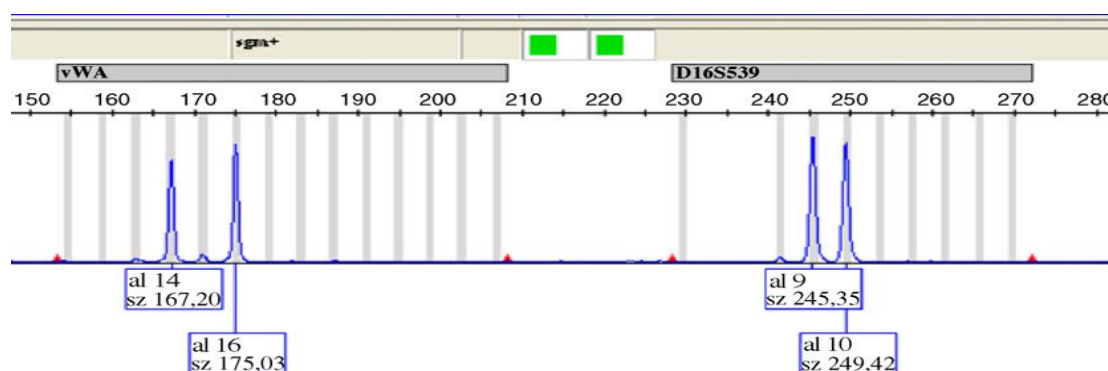


Figure 7 : Exemple d'un profil génétique étudiant le polymorphisme des STRs des autosomes sur deux loci vWA et D16S539. Les deux pics correspondent aux deux allèles, les chiffres indiquent le nombre de répétitions et la taille en paires de bases (exemple : al 14 et sz 167,20 pour 14 répétitions et 167,2 paires de bases) (Mansuet-Lupo et al., 2007).

Partie 2

I. La validation

1. Introduction

Au-delà de la qualité des personnels analystes qui peut être confirmée par des tests de compétence, l'instrumentation et les méthodes de tout laboratoire doivent être authentifiés par la validation (Butler, 2011)

D'une façon aussi claire que possible, le contenu des exigences de la norme internationale ISO/IEC 17025 (2005), définissant les prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais, précise que lorsqu'ils mettent en œuvre une méthode analytique usuelle, les laboratoires accrédités doivent s'assurer de la qualité des résultats obtenus (Résolution Oeno, 2005). Le travail présenté dans ce mémoire s'appuie en totalité sur les exigences de cette norme (ISO/IEC 17025, 2005).

2. Principes de la validation d'une méthode

Selon le SWGDAM (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, 2012), la validation est un processus par lequel une procédure est évaluée pour être opérationnelle.

En général, la validation correspond à une vérification des performances annoncées par le fabricant et souhaitées par le laboratoire, afin de lui apporter une confirmation et une preuve de la validité des résultats rendus, par rapport à ses propres besoins. Cette validation est à prendre en termes de maîtrise du processus analytique (Gruson, 2005).

2.1 La validation interne

C'est une accumulation de données au sein d'un laboratoire pour démontrer que les méthodes et les procédures établies fonctionnent comme prévu. Le SWGDAM préconise la validation interne pour tout laboratoire d'analyse de l'ADN, mettant en exergue la démonstration interne de la fiabilité et des limites de la procédure (SWGDAM, 2012)

3. Les critères de la validation

Il existe toute une batterie de critères propres à la validation, mais une sélection doit être réalisée en fonction du besoin et de l'analyse du processus de mesure (Amarouche, 2010).

C'est ainsi que dans ce travail, nous avons retenu cinq paramètres qui nous ont semblé essentiels : la répétabilité, la précision intermédiaire, la sensibilité, la linéarité et l'étude de rendement. Ces paramètres s'évaluent grâce à des protocoles de mesures expérimentales réalisées en interne.

3.1 La répétabilité

La répétabilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats des mesurages successifs du même mesurande (ce que l'on veut mesurer) dans des conditions identiques afin de caractériser la meilleure performance de la technique (Gruson, 2005).

Selon l'ENFSI, les conditions de répétabilité doivent être obtenues par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps (ENFSI DNA,2010)

3.2 La précision intermédiaire

La précision intermédiaire exprime la proximité entre les résultats d'analyse d'un même type d'échantillon mais dans des conditions différentes. Elle concerne donc des essais indépendants obtenus par la même méthode, dans le même laboratoire mais avec différents opérateurs, en utilisant différents lots de réactifs et pendant une période de temps étendue (Gruson, 2005).

3.3 La sensibilité

Les directives du SWGDAM stipulent que c'est l'aptitude à obtenir des résultats fiables dans une gamme donnée de quantités d'ADN. De façon pratique, la quantité minimale d'ADN nécessaire pour obtenir un résultat fiable peut être déterminée en examinant une série de dilutions menées à partir d'un échantillon initial.

Le guide ENFSI (2010) préconise cependant de limiter la série de dilutions à l'ordre 5 (concentration au $1/32^{\text{ème}}$ de la concentration initiale), et testées chacune sur 3 répétitions.

3.4 La linéarité

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité à donner des résultats de mesures proportionnels à la concentration initiale de la substance analysée, dans une plage définie de valeurs.

3.5 L'étude de rendement

Le rendement d'une procédure d'extraction de l'ADN consiste à déterminer la quantité totale d'ADN récupéré à partir d'un élevés e quantité initiale connue. Le but est la recherche du matériel donnant les rendements les plus possibles.

Matériels et méthodes

1. Objectif

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'analyses ADN de l'Institut National de Criminalistique et Criminologie (INCC) de la Gendarmerie Nationale à Bouchaoui, région d'Alger.

Son objectif a été d'évaluer la performance de la méthode d'extraction de l'ADN en utilisant le QIAamp DNA Blood Mini Kit (de QIAGEN Technologies), à partir d'échantillons de sang et de salive en déterminant la quantité et la qualité de cet ADN en vue de son utilisation pour l'établissement de profils génétiques.

La finalité recherchée est la validation de cette méthode par la vérification de sa capacité à répondre à l'usage pour lequel elle est prévue, donc de démontrer que le protocole utilisé est suffisamment fiable pour les résultats qui en sont attendus, ce qui dans notre cas revient à une production d'ADN en quantités suffisantes et de qualité suffisamment appréciable pour pouvoir servir à l'usage qui en est attendu et qui est l'établissement d'un profil génétique.

2. Préparations des échantillons

Pour adapter et valider cette technique d'extraction d'ADN, nous avons travaillé sur deux échantillons : un prélèvement de sang et un prélèvement de salive provenant d'un seul individu.

Ces échantillons biologiques ont été mis à notre disposition par le personnel du laboratoire et sont restés anonymes tout au long de l'étude.

- Le sang a été prélevé dans un tube de 5 mL contenant de l'EDTA pour éviter la coagulation, il a ensuite été stocké à 4°C au laboratoire.
-
- La salive a été prélevée à partir de cellules buccales imbibant un écouvillon qui est frotté sur la face intérieure de la joue du donneur.

I. Extraction d'ADN

I.1 Matériel

L'expérimentation a nécessité le matériel suivant :

Consommables	Equipements
Colonnes QIAamp et tubes adaptés	Bain marie
Gants	Centrifugeuse
Micropipettes à volume variable	Vortex.
Microtubes à volume variable	
Tips à volume variable	

I.1.1 Réactifs

Notre travail a nécessité deux boîtes de kits QIAamp® DNA Mini (QIAGEN Ltd, Royaume-Uni) pour 50 préparations.

Réactifs	Numéro de lot
Ethanol absolu	10 ^E 310509
PBS 1X (Phosphate Buffer Saline)	148047982
QIAGEN Protéase (Protéinase K)	101464
Tampon AE (Elution)	148042749
Tampon AL	148042505
Tampon AW1 (wash 1)	148044465
Tampon AW2 (wash 2)	148041804

I.2 Méthodes

I.2.1 Préparation des échantillons de sang pour l'extraction

I.2.1.1 La mise en tube

- Mettre l'échantillon de sang dans un portoir
- Préparer une série de 10 microtubes de 2 mL pré identifiés dans un portoir
- Ajouter un tube de 2mL vide pour le témoin négatif de la série d'extraction.
- Déposer 200 µL de sang dans chacun des microtubes excepté le témoin négatif. Après chaque dépôt, fermer le capuchon pour éviter tout type de contamination

I.2.2 Préparation des échantillons de salive pour l'extraction

I.2.2.1 La mise en tube

- Sortir les écouvillons portant les prélèvements buccaux
- Préparer une série de 10 microtubes de 2 mL pré identifiés dans un portoir
- Ajouter un tube de 2 mL vide pour le témoin négatif de la série d'extraction
- Mettre la partie coton de chaque écouvillon dans le microtube correspondant, ensuite fermer le capuchon pour éviter tout type de contamination.

I.3 La validation

Afin d'évaluer la performance du kit d'extraction objet de cette étude, une validation interne au sein du laboratoire est nécessaire pour vérifier la capacité de la méthode à produire l'ADN de bonne qualité et de quantités suffisantes pour générer des profils génétiques complets.

Dans cette étude, les critères de validation retenus sont la répétabilité, la précision intermédiaire, la sensibilité et l'étude du rendement. En parallèle, le critère de linéarité a été étudié pour déterminer la courbe de réponse de l'appareil.

I. 3.1. La répétabilité

Nous avons testé la répétabilité de notre technique en préparant (Tableau 2) :

- Une série de 10 échantillons de 200 μ L de sang dans des tubes de 2 mL, provenant du même individu, plus un tube de 2 mL vide réservé pour le contrôle négatif (un blanc d'extraction ne contenant que les réactifs).
- Une série de 10 échantillons de salive sur écouvillons provenant de prélèvements buccaux d'un même individu placés dans des tubes stériles de 2 mL, plus un tube de 2 mL vide réservé pour le contrôle négatif

Conformément au protocole, les essais ont été effectués par la même méthode, dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant les mêmes équipements avec le même lot de réactifs, les mesures étant effectuées dans la même journée.

Tableau 2 : Série 1 de répétabilité du sang et de la salive pour l'extraction de l'ADN

Sang	Salive
S01	E01
S02	E02
S03	E03
S04	E04
S05	E05
S06	E06
S07	E08
S09	E09
S10	E10
Tex(-) sang 1	Tex(-) salive 1

I. 3.2 La précision intermédiaire

La précision intermédiaire a nécessité (en double) les mêmes préparatifs :

- Deux séries de 10 échantillons de sang du même individu, préparées dans des microtubes de 2 mL, à raison de 200 μ L par échantillon, plus un microtube de 2 mL vide réservé pour le contrôle négatif
- Deux séries de 10 échantillons de salive sur écouvillons provenant de prélèvements buccaux d'un même individu, plus un microtube pour le contrôle négatif (Tableau 3).

Les analyses ont été effectuées avec la même méthode, sur les mêmes instruments avec des opérateurs différents, qui ont travaillé avec des lots de réactifs différents et en effectuant les mesures à des dates différentes. La première série de mesures a été suivie le lendemain par une deuxième série opérée par un autre manipulateur suivant la même procédure, puis 8 jours après, le même protocole a été reproduit avec un troisième manipulateur sur une troisième série d'extractions de sang et de salive

Tableau 3 : Séries 2 et 3 de la précision intermédiaire du sang et de la salive pour l'extraction de l'ADN

Série 2 pour la précision intermédiaire		Série 3 pour la précision intermédiaire	
Sang	Salive	Sang	Salive
S11	E 11	S21	E21
S12	E12	S22	E22
S13	E13	S23	E23
S14	E14	S24	E24
S15	E15	S25	E25
S16	E16	S26	E26
S17	E17	S27	E27
S18	E18	S28	E28
S19	E19	S29	E29
S20	E20	S30	E30
Tex(-) 02	Tex(-) 02	Tex(-) 03	Tex(-) 03

I.3.3 La sensibilité

Dans l'étude de sensibilité une solution mère de 1200 μL (1,2 mL) de sang a été utilisée, à partir de laquelle 600 μL de sang ont été testés en trois répétitions de 200 μL par échantillon, puis la solution mère est réajustée à 1200 μL par ajout d'eau ultra pure.

Cette solution a ensuite subi une série de cinq dilutions successives en y prélevant à chaque fois 600 μL partagés en 3 répliqués de 200 μL chacun et en réajustant la solution mère à 1200 μL à chaque fois par ajout d'eau ultra pure. Les dilutions ainsi obtenues sont dans les rapports 1 (sang pur), 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32 pour les 6 échantillons (Figure 8 et 9, Tableau 4).

Les analyses ont été effectuées par le même opérateur, utilisant les mêmes équipements, le même lot de réactifs et effectuant les mesures le même jour.

Le critère de la sensibilité est respecté lorsque la gamme de concentrations d'ADN rencontrée dans les divers échantillons à analyser est capable de produire des résultats fiables. On peut ainsi mettre en évidence la plus faible concentration d'ADN permettant à l'opérateur d'obtenir une quantité amplifiable et donc un profil génétique complet (SWGDM, 2012).

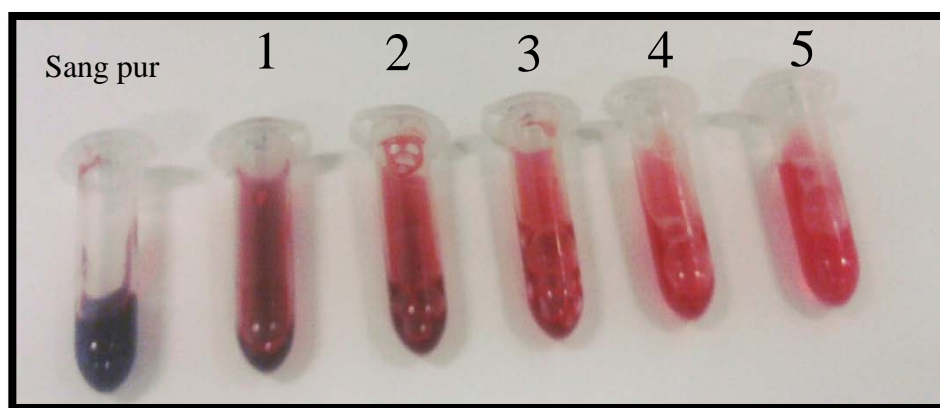


Figure 8 : Sang pur et série des 5 dilutions successives (Original)

Tableau 4 : Série 4 de sensibilité pour les dilutions successives

Echantillon	Dilution	Nombre de répétitions
D₀	Sang pur	D ₀ -a
		D ₀ -b
		D ₀ -c
D₁	1/2	D ₁ -a
		D ₁ -b
		D ₁ -c
D₂	1/4	D ₂ -a
		D ₂ -b
		D ₂ -c
D₃	1/8	D ₃ -a
		D ₃ -b
		D ₃ -c
D₄	1/16	D ₄ -a
		D ₄ -b
		D ₄ -c
D₅	1/32	D ₅ -a
		D ₅ -b
		D ₅ -c
Tex(-) val-sang 04	---	---

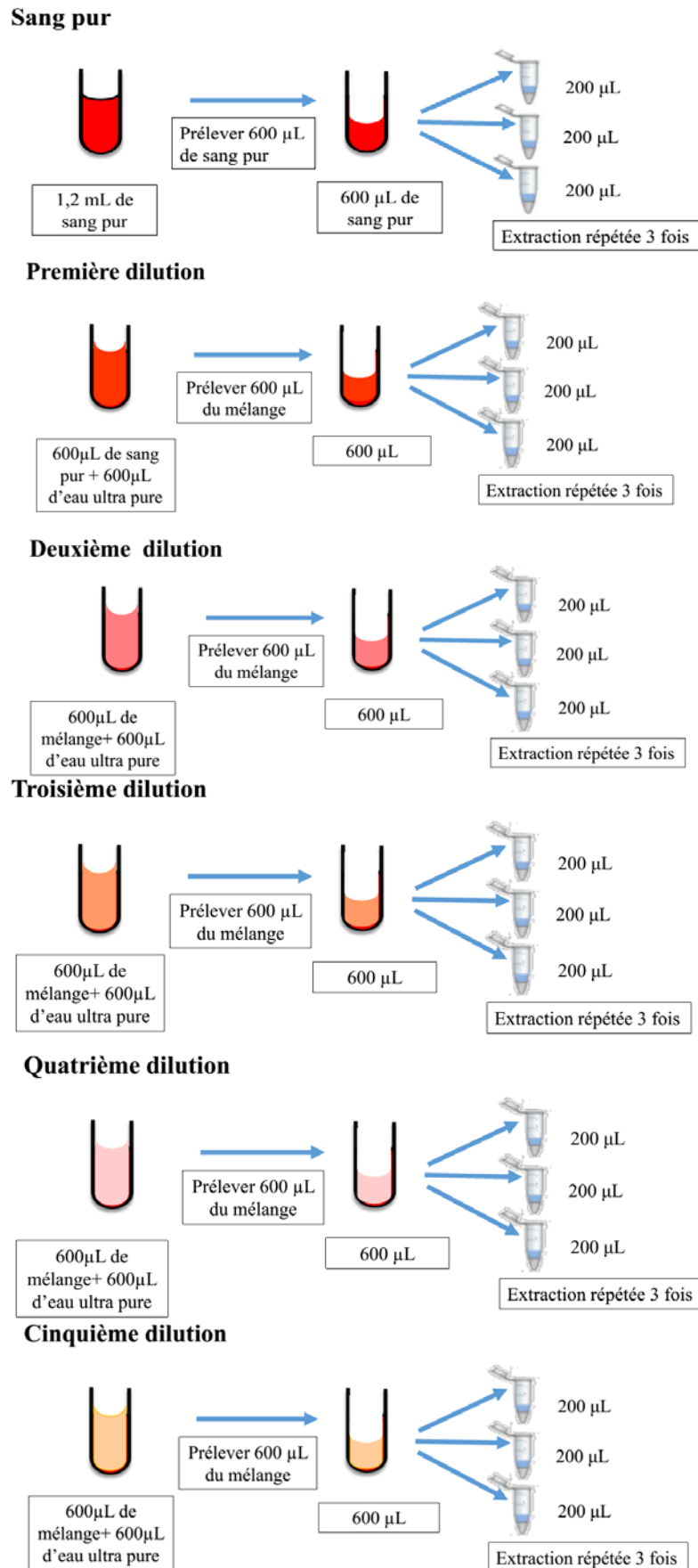


Figure 9 : Préparation de la série des dilutions successives (Original)

I.3.4 Etude du rendement de la procédure d'extraction d'ADN

Le rendement de la procédure d'extraction est calculé comme le rapport de la quantité extraite finale d'ADN (output) sur la quantité initiale disponible (input). L'étude du rendement permet d'évaluer la performance de la méthode QIAamp. A cette fin, le contrôle positif «ADN 2800M» du kit d'amplification PowerPlex[®]ESI fourni par la société «Promega Corporation» (Madison, WI, USA) est utilisé. Sa concentration en ADN est connue et est fournie par le fabricant.

Le contrôle positif est commercialisé à un volume de 25 µL contenant 10 ng.µL⁻¹ d'ADN, soit une quantité globale de 10*25 = 250 ng d'ADN. Une dilution est opérée par ajout d'eau ultrapure jusqu'à l'obtention d'une solution de 1000 µL (1 mL), la concentration volumique d'ADN chute ainsi à $\frac{250}{1000} = 0,25 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$.

Afin d'évaluer la concentration d'ADN après l'extraction, une série de 5 échantillons de 200 µL est préparée dans des microtube de 2 mL. L'ADN est ensuite purifié sur les colonnes de silice du kit QIAamp selon les recommandations du fabricant.

La détermination de la concentration initiale d'ADN s'obtient directement à partir de l'échantillon initial (non extrait). Un volume de 10 µL est ainsi réparti sur 5 microtubes à raison de 2 µL par microtube et dont l'ADN est directement quantifié.

Toutes ces manipulations ont été réalisées par le même opérateur sur le même instrument, avec le même lot de réactifs et en effectuant les mesures le même jour.

I.4. Protocole de l'extraction d'ADN

Le protocole comporte quatre étapes :

- ❖ La lyse cellulaire
- ❖ La fixation de l'ADN du lysat cellulaire à la membrane d'une colonne de centrifugation QIAamp Mini
- ❖ Le lavage de la membrane
- ❖ L'élution de l'ADN à partir de la membrane

La particularité de chaque étape est détaillée pour les deux échantillons dans le tableau 5.

Tableau 5 : Protocole d'extraction de l'ADN par la méthode QIAamp pour le sang et la salive (Guide QIAGEN, 2012)

Étapes	Protocole d'extraction QIAamp à partir d'un prélèvement du sang	Protocole d'extraction QIAamp à partir d'un prélèvement buccal
La lyse cellulaire	<ol style="list-style-type: none"> 1. Déposer 200 µL de sang dans les microtubes préalablement identifiés. 2. Ajouter 20 µL de solution QIAGEN protéase à l'échantillon de sang. 3. Ajouter 200 µL de tampon AL 4. Passer immédiatement au Vortex pendant 15 s. 5. Incuber à 56°C pendant 10 min. 6. Centrifuger quelques secondes (quick run) pour éliminer les gouttelettes accumulées à l'intérieur du capuchon. 7. Ajouter 200 µL d'éthanol, et mélanger en aspirant et éjectant, à l'aide d'une micropipette. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mettre l'échantillon de salive dans les microtubes préalablement identifiés. 2. Ajouter 600 µL de PBS à l'échantillon de salive. 3. Ajouter 20 µL de solution QIAGEN protéase. 4. Ajouter 600 µL de tampon AL. 5. Passer immédiatement au Vortex pendant 15 s. 6. Incuber à 56°C pendant 15 min. 7. Centrifuger quelques secondes (quick run). 8. Ajouter 600 µL d'éthanol, et mélanger en aspirant et éjectant, à l'aide d'une micropipette.
La fixation de l'ADN génomique du lysat cellulaire à la membrane d'une colonne QIAamp	<ol style="list-style-type: none"> 8. Transférer la totalité de la solution (environ 600 µL) sur la colonne QIAamp et fermer le couvercle. 9. Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min. 10. Transférer les colonnes sur de nouveaux tubes adaptés et jeter le tube de collecte contenant le 1^{er} éluât. 	<ol style="list-style-type: none"> 9. Transférer 600 µL de cette solution sur la colonne QIAamp et fermer le couvercle. 10. Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min. 10. Transférer les colonnes sur de nouveaux tubes adaptés et jeter le tube de collecte contenant le 1^{er} éluât. 11. Transférer le reste de la solution initiale (maximum 650 µL) sur la colonne et répéter les étapes 11 et 12.

<p>Le lavage de la membrane</p>	<p>11. Ouvrir prudemment les colonnes et ajouter 500 µL de tampon de lavage AW1 sans mouiller le bord de la colonne.</p> <p>12. Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min.</p> <p>13. Transférer les colonnes sur de nouveaux tubes adaptés et jeter le tube de collecte contenant le 2^{ème} éluât.</p> <p>14. Ouvrir prudemment les colonnes et ajouter 500 µL de tampon de lavage AW2, sans mouiller le bord de la colonne.</p> <p>15. Centrifuger à 8000 rpm pendant 2 min.</p>	<p>13. Ouvrir prudemment les colonnes et ajouter 500 µL de tampon de lavage AW1 sans mouiller le bord de la colonne.</p> <p>14. Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min.</p> <p>15. Transférer les colonnes sur de nouveaux tubes adaptés et jeter le tube de collecte contenant le 2^{ème} éluât.</p> <p>16. Ouvrir prudemment les colonnes et ajouter 500 µL de tampon de lavage AW2, sans mouiller le bord de la colonne.</p> <p>17. Centrifuger à 8000 rpm pendant 2 min.</p>
<p>L'éluion de l'ADN</p>	<p>16. Transférer les colonnes sur de nouveaux microtubes de 1.5 mL préalablement identifiés.</p> <p>17. Ajouter 200 µL de tampon AE.</p> <p>18. Incuber pendant 5 min à température ambiante.</p> <p>19. Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min.</p> <p>20. Récupérer les microtubes contenant l'ADN élué.</p> <p>21. Prélever 3 µL d'ADN extrait dans de nouveaux microtubes de 1.5 mL préalablement identifiés, pour quantification ultérieure.</p>	<p>18. Transférer les colonnes sur de nouveaux microtubes de 1.5 mL préalablement identifiés.</p> <p>19. Ajouter 200 µL de tampon AE.</p> <p>20. Incuber pendant 5 min à température ambiante.</p> <p>21. Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min.</p> <p>22. Récupérer les microtubes contenant l'ADN élué.</p> <p>23. Prélever 3 µL d'ADN extrait dans de nouveaux microtubes de 1.5 mL préalablement identifiés, pour quantification ultérieure.</p>

II. Quantification de l'ADN

II.1 Matériels

L'expérimentation a nécessité le matériel suivant :

Consommables	Equipements	Réactifs
Film adhésif	7500 Real Time PCR	Eau ultra pure
Gants	system	Kit Quantifiler Human DNA
Microtubes	Centrifugeuse pour plaques	<i>Quantification</i>
Plaque RT-PCR	Hotte	Quantifiler Human DNA Standard
96 puits	Logiciel de pilotage (SDS	Quantifiler Human Primer Mix (primers,
Tips	Software 7500 V1.2.3).	sonde et IPC)
	Micropipettes	Quantifiler PCR Reaction Mix
	Vortex	(AmpliTaq [®] Gold DNA Polymerase, dNTPs, dUTP)

II.2 Méthodes

Les extraits d'ADN provenant des échantillons tests (sang et salive) ont été quantifiés grâce à la Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel utilisant le kit «Quantifiler Human DNA Quantification» (Applied Biosystems, USA), avec le système de détection ABI PRISM 7500 du même fabricant.

Outre la quantification de l'ADN, ce système permet aussi de détecter la présence des inhibiteurs de la PCR grâce à l'amplification simultanée d'un ADN contrôle ou «Internal Positive Control» (IPC) inclus dans la réaction.

Le protocole de quantification de l'ADN est présenté en annexe 2.

III. L'amplification par PCR

III.1 Matériels

Equipements	Consommables	Réactifs
Centrifugeuse	Gants	AmpFISTR® Control DNA 9947
Micropipettes	Microtubes	AmpFISTR® Identifiler® Plus Master Mix
Thermocycler	Tips	AmpFISTR® Identifiler® Plus Primer Set
9700		AmpFISTR® IdentifilerPLUS® PCR amplification Kit
Vortex		(Applied Biosystems®)
		Eau ultra pure

III.2 Méthodes

Les échantillons ADN ont été amplifiés en utilisant le kit d'amplification AmpFISTR® Identifiler PLUS® sur le système PCR GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems, UK) en suivant les recommandations du fabricant (programme de la PCR en annexe 3). Ce kit permet d'amplifier simultanément en une seule réaction 15 marqueurs autosomaux (allèles) de tétranucléotides (CSF1P0, D7S820OX, vWA, D5S818, FGA D8S1179, D21S11, D2S1338, D3S1358, D13S317, D16S539, TH01, D18S51, D19S433, TPOX), ainsi que le marqueur du sexe nommé amélogénine (Life technologies, 2015).

La réaction PCR est réalisée dans un volume total de 25µL dont 10 µL de chaque échantillon d'ADN sont ajoutés à 15 µL du mix réactionnel.

Comme nous le verrons dans les résultats, ce ne sont pas tous les échantillons qui ont servi à l'amplification par PCR au vu des grandes quantités d'ADN obtenues par le kit QIAamp. En effet, même à la cinquième dilution (donc au 1/32^{ème} de la solution de sang pur), les quantités d'ADN récupérées restent largement supérieures à celles exigées par le fournisseur et qui sont de 0,1 ng.µL⁻¹. En conséquence, nous avons choisi, de façon aléatoire (Tableau 6) cinq échantillons (un seul provenant de chaque série) pour les faire passer à l'amplification, plus un control négatif et un control positif.

Les échantillons devant subir l'amplification se composent de solutions de 10 µL devant contenir chacune 1 ng d'ADN soit une concentration de $\frac{1}{10} = 0,1 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$.

C'est ainsi qu'un échantillon contenant une quantité de x ng.µL⁻¹ devra donc subir une dilution par un facteur $\frac{x}{0,1} = 10 \text{ fois } x$ (Exemple, le 1^{er} échantillon concentré à 3,39 ng.µL⁻¹

aura un facteur de dilution égal à $\frac{3,39}{0,1} = 10 \times 3,39 = 33,9 \approx 34$. Ces facteurs sont automatiquement

fournis par logiciel.

L'amplification de l'ADN a été effectuée selon le protocole du kit AmpFISTR® Identifier® PLUS réalisé à 28 cycles (Annexe 3).

Tableau 6 : Calcul des dilutions pour l'amplification d'ADN

Echantillon	Concentration (ng.µL ⁻¹)	Facteurs de dilution 1 :
E01	3.39	34
S01	33.28	333
E11	2.08	21
S11	18.85	189
D05	1.22	12

IV. Electrophorèse capillaire

IV. 1 Matériels

Cette partie du travail a nécessité le matériel suivant :

Equipements	Consommables	Réactifs
Centrifugeuse	Gants	Eau ultra pure
Micropipettes	Microtubes	Hi-Di formamide
Séquenceur ABI Prism® 3130xl	Tips	Echelle allélique
Vortex		Polymère POP4
Bloc chauffant		Standard de taille 500 LIZ
Cryo bloc		

(Annexe 4)

IV. 2 Méthode

Les fragments d'ADN amplifiés et marqués sont ensuite séparés par la technique d'électrophorèse capillaire en utilisant le système ABI PRISM 3130xl équipé de 16 capillaires (Applied Biosystems, USA).

Les échantillons sont injectés toutes les 5 s dans les capillaires à 36 cm de longueur, qui contiennent un polymère de migration (POP4). La migration des fragments amplifiés s'effectue donc sous l'effet d'un courant électrique appliqué sous une tension de 15 kV, ce qui provoque la migration des produits amplifiés chargés négativement vers l'anode (pole positif), le tout étant maintenu à 60°C.

Il existe un gradient lié à la taille, les petits fragments d'ADN migrant plus rapidement que les plus grands. Vers la fin de ce processus, les fragments marqués sont excités par un faisceau laser lors de leur passage par une fenêtre de détection ; par la suite, la fluorescence émise est détecté par une caméra CCD. A l'issue de ce processus, les données de séparation sont collectées par le logiciel 3130xl DATA collection vs 3.0 (Applied Biosystems, USA).

V. Lecture et validation des résultats

Les données brutes sont traitées par le logiciel GeneMapper ID v3.2 (Applied Biosystems, USA) qui attribue à chaque fragment d'ADN d'intérêt (STR) :

- un numéro allélique en le comparant avec une échelle allélique (annexe 5)
- une taille en pb en comparaison avec un standard.

Les profils génétiques obtenus sont validés selon des paramètres fixés par le laboratoire après une étude de validation (Daho et al., 2012)

VI. Analyse statistique

Pour une étude R&R, consistant à tester la répétabilité et la reproductibilité, nous avons privilégié la méthode des moyennes et des écarts (Average and Range method) suivie d'une analyse de variance (ANOVA) pour la comparaison des moyennes. C'est ainsi que pour un échantillon de mesures donné, nous déterminons la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation. Les variances des mesures ont été comparées par un test de Cochran.

La répétabilité et la reproductibilité ne permettent de quantifier que la variabilité des mesures, la précision sera déterminée par les tests de linéarité et la détermination des biais des mesures.

Les divers tests sont détaillés en annexe 6

Les analyses ont été réalisées sur Statistica 10 de Statsoft Inc., OK, Tulsa, USA.

Résultats et discussion

I. Répétabilité et reproductibilité de la méthode d'extraction de l'ADN

I.1 Échantillon de salive

La première série de mesures (répétabilité) établie sur un échantillonnage de 10 prélèvements aléatoires de salive (Tableau 7, annexe 7) a donné une moyenne de 3.16 ± 1.18 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ d'ADN, soit un coefficient de variation égal à 37.3%.

Pour la précision intermédiaire, les deux séries de 10 prélèvements chacune ont donné des moyennes égales à 2.46 ± 0.43 et 2.10 ± 0.64 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, soit des coefficients de variation de 17.5% et 30.4% respectivement.

Tableau 7 : Résultats de l'extraction d'ADN de la salive ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) à partir de séries de 10 répétitions chacune.

Séries salive	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Moyenne ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Ecart-type ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	CV (%)
Répétabilité	3,39	4,29	4,68	3,86	4,50	3,30	2,15	1,67	1,79	1,97	3.16	1.18	37.3
Reproductibilité 1	2,08	2,78	2,90	3,34	2,01	2,31	2,32	2,19	2,60	2,12	2.46	0.43	17.5
Reproductibilité 2	2,23	1,42	2,48	2,34	3,14	2,11	1,44	1,64	1,31	2,90	2.10	0.64	30.4

Les 3 dernières colonnes du tableau 7 regroupent la moyenne, l'écart-type estimé et le coefficient de variation en %.

Ces résultats sont visualisés (Figure 10) où nous observons que les 2 séries de reproductibilité semblent globalement comparables, le CV relativement élevé (30,4%) de la série 2 de reproductibilité est dû à la faible valeur de la moyenne. La série de répétabilité débute par des valeurs plus élevées, nous observons ensuite, vers la 7^{ème} mesure, des concentrations d'ADN qui rejoignent les 2 séries de reproductibilité.

La figure 11 résume les résultats combinés de la répétabilité et de la précision intermédiaire. Les 3 groupes de valeurs encadrées représentant la répétabilité (1) et la précision intermédiaire (2 et 3). Tout point de ce graphe représente l'écart de la mesure par rapport à la moyenne respective de la mesure des 3 séries (opérateurs). La ligne bleue horizontale dans chaque série donne l'écart moyen de la série correspondante (de l'opérateur) par rapport à la moyenne générale de toutes les séries (tous les opérateurs).

Ce graphe montre clairement pour la série de répétabilité que la distribution des points se trouve regroupée autour de la moyenne dans un intervalle d'environ ± 1 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, tandis que pour les 2 séries de reproductibilité, le gros de la variabilité est à environ $\pm 0,5$ $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

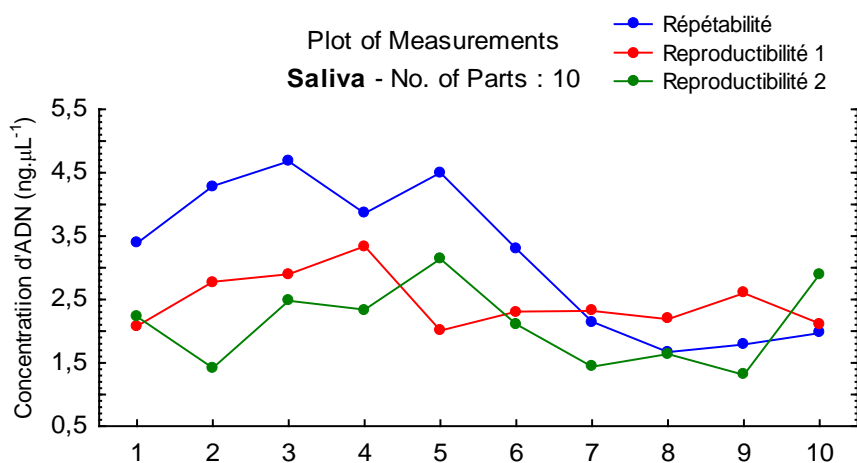


Figure 10 : Distribution des concentrations d'ADN en ng.µL⁻¹ des 10 mesures de la série de répétabilité et des deux séries de reproductibilité.

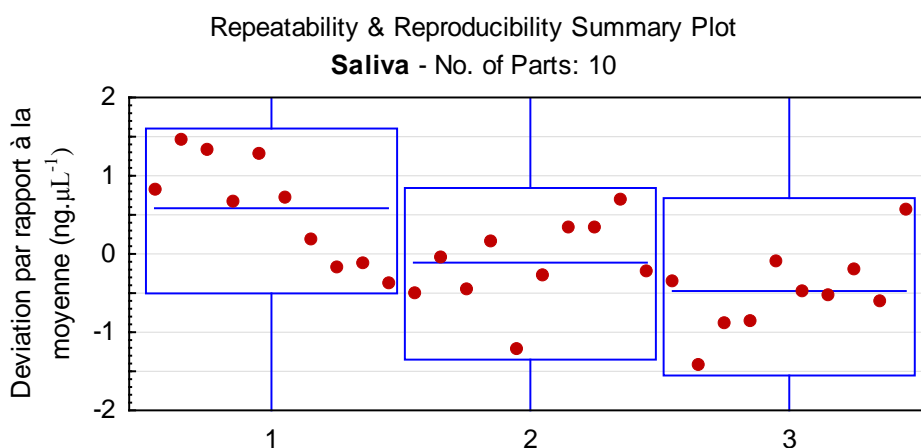


Figure 11 : Graphe combiné de la répétabilité (1) et la reproductibilité (2 et 3).

Ces constatations préliminaires vont être confirmées par l'analyse de variance (ANOVA), qui est une méthode puissante de comparaison des moyennes (Figure 12).

Nous observons une différence légèrement significative entre les concentrations moyennes des 3 séries ($F=4.39$; $p=0,022 < 0,05$; annexe 8). Les concentrations d'ADN Salive 1 et Salive 2 restent comparables ($p=0,15$), de même que Salive 2 et Salive 3 ($p=0,58$). La seule différence légèrement significative est entre Salive 1 et Salive 3 ($p=0,02$). Notons qu'au risque 1%, les différences entre les 3 moyennes sont non significatives ($p=0,02 > 0,01$).

Le test d'homogénéité des variances de Cochran corrobore ces résultats, il est en effet légèrement significatif à 5% mais pas à 1% (C=0.700; p=0,013; annexe 9) ce qui signifie qu'il existe une différence légèrement significative à 5% entre les variances.

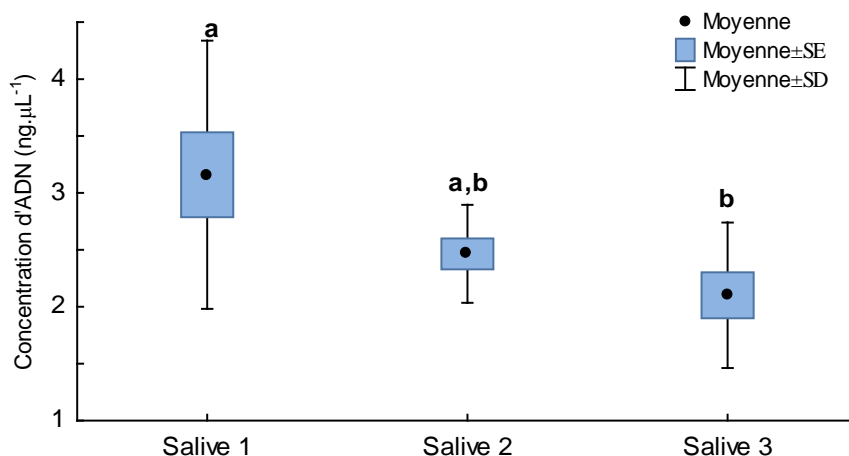


Figure 12 : Comparaison des concentrations moyennes de l'ADN extrait de la salive. Les « box-plots » représentent la moyenne, l'erreur standard $ES = \frac{s}{\sqrt{n}}$ et la déviation standard (écart-type) s.

I.2 Échantillons de sang

Le même travail est établi pour une première série de mesures de répétabilité sur 10 prélèvements de 200 µL du même sang prélevé sur la même personne et qui a donné (Tableau 8) une moyenne de 21,2±5,7 ng.µL⁻¹ d'ADN, soit un coefficient de variation égal à 26.8%.

Pour la précision intermédiaire, les deux séries composées chacune de 10 prélèvements de 200 µL, ont donné des moyennes égales à 18,6±4,2 et 25,3±3,2 ng.µL⁻¹, soit des coefficients de variation égaux à 22.6% et 12.6% respectivement.

Tableau 8 : Résultats de l'extraction d'ADN du sang (ng.µL⁻¹) à partir de séries de 10 répétitions chacune.

Séries sang	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Moyenne (ng.µL ⁻¹)	Ecart-type (ng.µL ⁻¹)	CV (%)
Répétabilité	33,28	19,67	27,50	21,25	19,04	19,28	19,73	17,25	22,84	12,54	21.2	5.7	26.8
Reproductibilité 1	18,85	18,01	13,29	26,68	24,81	18,30	18,47	16,35	15,22	15,60	18.6	4.2	22.6
Reproductibilité 2	20,10	31,77	24,61	25,24	26,10	25,78	23,72	25,93	27,50	21,77	25.3	3.2	12.6

Là aussi, avec les résultats visualisés en Figure 13, nous observons les fluctuations entre les différentes valeurs pour les 3 séries, avec un CV allant jusqu'à 26,8% pour la série de répétabilité.

On observe une certaine proximité pour quelques mesures de la répétabilité avec la reproductibilité 2, et pour les dernières valeurs avec la reproductibilité 1.

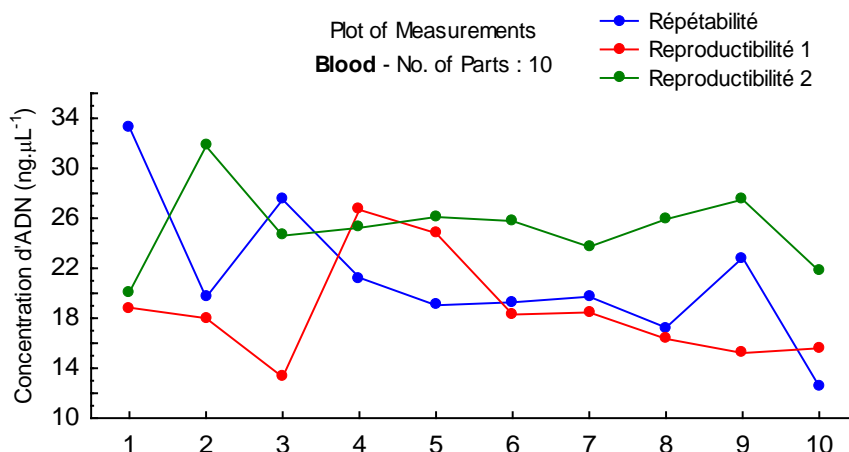


Figure 13 : Distribution des concentrations d'ADN en ng.µL⁻¹ des 10 mesures de la série de répétabilité et des deux séries de reproductibilité

Dans le graphe combiné (Figure 14), nous observons des mesures qui restent globalement agglutinées autour de leur moyenne avec des fluctuations plutôt faibles de ±3 à ±4 ng.µL⁻¹, il faut toutefois noter quelques mesures qui s'en écartent sensiblement, essentiellement pour la série de répétabilité.

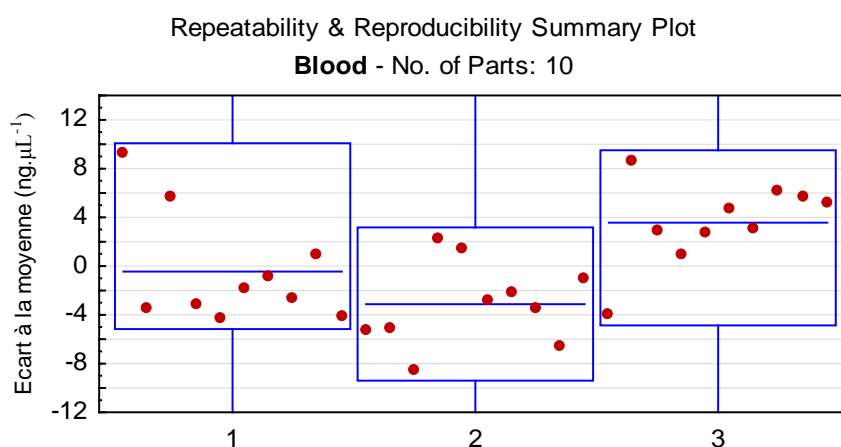


Figure 14 : Graphe combiné de la répétabilité (1) et la reproductibilité (2 et 3).

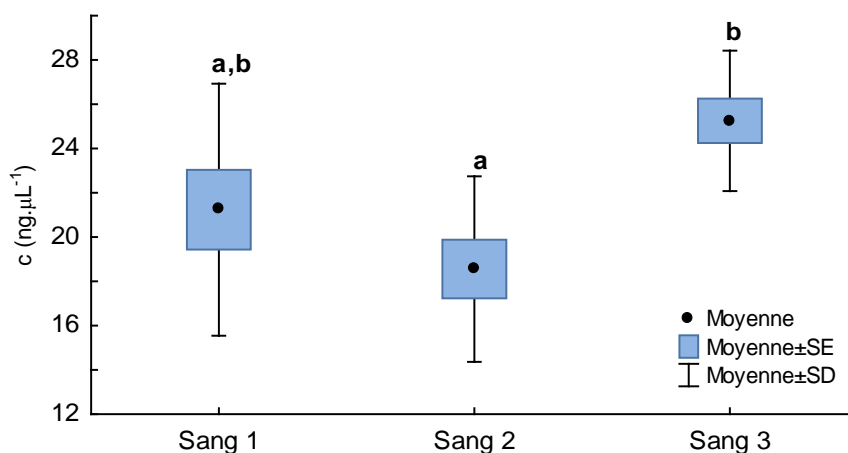


Figure 15 : Comparaison des concentrations moyennes de l'ADN extrait du sang. Les « box-plots » représentent la moyenne, l'erreur standard $SE = \frac{s}{\sqrt{n}}$ et la déviation standard (écart-type) s.

L'analyse de variance (Figure 15) est significative et corrobore les observations précédentes ($F=5,67$; $p=0,009$; annexe 10). Les concentrations d'ADN pour les séries Sang 1 et Sang 2 restent comparables ($p=0,19$) de même que celles des séries Sang 1 et Sang 3 ($p=0,05$), seuls les séries Sang 2 et Sang 3 de la précision intermédiaire présentent une différence significative ($p=0,006$).

Le test d'homogénéité des variances de Cochran a été trouvé non significatif ($C=0,540$; $p=0,236$; annexe 11), ce qui signifie que les fluctuations des données autour de chaque moyenne sont comparables (en dépit des différences trouvées plus haut entre les 3 moyennes).

I.3 Evaluation du rendement en ADN à partir des prélèvements sang et salive

Les résultats de travaux publiés par le fabricant QIAGEN sur les rendements moyens en ADN obtenus à partir de sang par la méthode QIAamp DNA Blood Mini montrent que ce rendement est fonction de la concentration des leucocytes dans l'échantillon initial (Lehmann et al, 2011). Dans le présent travail, ces concentrations de leucocytes ne sont pas préalablement déterminées, seul le volume de sang est soigneusement mesuré.

Les rendements de la méthode QIAamp DNA Blood Mini, donnés par le fabricant, peuvent varier dans une plage de 3 à 12 µg d'ADN pour un échantillon de 200 µL de sang d'un individu en bonne santé, et de 0,5 à 3,5 µg d'ADN pour un écouvillon buccal.

Les quantités extraites attendues devraient donc varier entre :

$$- \frac{0,5}{200} = 0,0025 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1} = 2,5 \approx 3 \text{ ng}.\mu\text{L}^{-1} \quad \text{et} \quad \frac{3,5}{200} = 0,0175 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1} = 17,5 \approx 18 \text{ ng}.\mu\text{L}^{-1}$$

à partir de prélèvements de salive.

$$- \frac{3}{200} = 0,015 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1} = 15 \text{ ng}.\mu\text{L}^{-1} \quad \text{et} \quad \frac{12}{200} = 0,06 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1} = 60 \text{ ng}.\mu\text{L}^{-1}$$

à partir de prélèvements de sang.

Deux des 3 quantités d'ADN extrait de la salive sont dans les normes ($3,16 \approx 3,2$ et $2,46 \approx 2,5 \text{ ng}.\mu\text{L}^{-1}$), la troisième est légèrement en-deçà ($2,1 < 2,5 \text{ ng}.\mu\text{L}^{-1}$), elle reste toutefois amplement suffisante et exploitable pour un profil génétique. Concernant l'ADN extrait du sang, les trois quantités sont dans les normes du fabricant ($18,6$; $21,2$ et $25,3 \text{ ng}.\mu\text{L}^{-1} > 15 \text{ ng}.\mu\text{L}^{-1}$).

Les différences légèrement significatives de ces concentrations d'ADN, extrait à partir du sang ou de la salive, et mises en évidence par ANOVA, peuvent être expliquées par le type de prélèvement lui-même, sachant que le rendement en ADN varie selon le type et le nombre de cellules initiales (leucocytes) dans l'échantillon (Guide QIAGEN, 2012). Il y a lieu de noter aussi que les prélèvements buccaux ne sont pas standardisés, les prélèvements sont donc totalement aléatoires, pouvant donner lieu à des quantités fortement variables d'un écouvillon à l'autre.

D'autres sources possibles de variation des résultats expérimentaux peuvent être liée aux erreurs de pipetage des différents opérateurs, pouvant se produire lors du transfert de l'ADN dans les puits d'échantillon pour la quantification par RT-PCR.

De fait, si un volume réduit est introduit dans une pipette, moins d'ADN sera extrait (Kirsty et al., 2012). D'autres sources peuvent influencer les résultats comme l'efficacité de l'élution à travers la colonne QIAamp ou la compétence elle-même de l'opérateur.

En dépit de toutes ces considérations, les résultats obtenus sont jugés satisfaisants pour répondre aux exigences de l'application de la technique dans le domaine de l'identification génétique puisque pour toutes les mesures effectuées, nous avons obtenu des quantités d'ADN exploitables donnant des profils génétique complets.

De plus, si nous prenons en considération les CV, atteignant jusqu'à 37,3%, nous pouvons affirmer que les amplitudes de variation sont loin d'être dramatiques.

Elles restent en effet dans les ordres de grandeur citées par la littérature comme dans le travail de Laus et al. (2011) où ces auteurs ont comparé les performances de la méthode manuelle QIAamp et le système automatisé QIASymphony et aboutissent à des résultats donnant des CV allant de 6.8% jusqu'à 56.6% pour les concentrations d'ADN du virus d'Epstein-Barr (EBV) extrait à partir d'échantillons de sang.

Dans le but d'établir des profils et d'en vérifier la qualité, nous avons amplifié un échantillon de chacune des séries de sang et de salive en utilisant le Kit d'amplification AmpFlSTR® IdentifierPLUS® basé sur l'analyse de 16 STR.

Les quantités d'ADN obtenues ont tout le temps été trouvées largement supérieures au seuil (0,1 ng.µL⁻¹) donné par le fournisseur, nous avons donc à chaque fois effectué des dilutions afin d'obtenir la concentration requise.

Les rapports de dilution pour les échantillons de salive et de sang sont automatiquement donnés par le programme (Tableaux 9 et 10), ils représentent le quotient de la quantité extraite d'ADN à la quantité minimale exploitable pour l'établissement du profil génétique recherché et s'obtiennent à partir de la relation $\frac{\text{Quantité d'ADN (ng.}\mu\text{L}^{-1})}{0,1} = 10 \times \text{Quantité d'ADN (ng.}\mu\text{L}^{-1})$

Pour l'échantillon de salive, nous avons des rapports de dilution variant de 1:13 dans le pire des cas à 1:47 dans le meilleur des cas avec des moyennes égales à 32±12, 21±6 et 25±4 pour les séries 1, 2 et 3 respectivement (Tableau 9). Nous sommes donc tout le temps dans des gammes de quantités extraites amplement suffisantes pour le but recherché.

Nous avons le même constat pour l'échantillon de sang, avec des valeurs oscillant entre 1:133 à 1:333 et des moyennes égales à 212±57, 186±42 et 253±32 pour les séries 1, 2 et 3 respectivement (Tableau 10).

Tableau 9 : Rapports de dilution des quantités d'ADN extrait à partir de 10 échantillons de salive.

Séries salive	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Rapport de dilution (1:)
Répétabilité	34	43	47	39	45	33	22	17	18	20	32±12
Reproductibilité 1	21	28	29	33	20	23	23	22	26	21	25±4
Reproductibilité 2	22	14	25	23	31	21	14	16	13	29	21±6

Tableau 10 : Rapports de dilution des quantités d'ADN extrait à partir de 10 échantillons de sang.

Séries sang	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Rapport de dilution
Répétabilité	333	197	275	213	190	193	197	173	228	125	212±57
Reproductibilité ¹	189	180	133	267	248	183	185	164	152	156	186±42
Reproductibilité ²	201	318	246	252	261	258	237	259	275	218	253±32

I.4 Vérification de la qualité de l'ADN obtenu par la méthode QIAamp

Notre but dans cette étape de génération des profils génétiques était de vérifier la qualité des profils génétiques et donc de se renseigner sur la qualité de l'ADN (inhibiteurs, dégradation) extrait par la méthode QIAamp.

L'analyse des données brutes a été établie avec le logiciel d'identification GeneMapper (Applied Biosystems, USA) qui permet de comparer tous les allèles inconnus du profil à l'échelle allélique contenant tous les allèles communs.

Le résultat final est un électrophorégramme où nous observons une série de pics représentant les différents allèles, de tailles et de hauteurs proportionnelles à la quantité du produit de la PCR détecté. Les résultats générés par l'analyseur génétique sont représentés dans les figures 16 à 19.

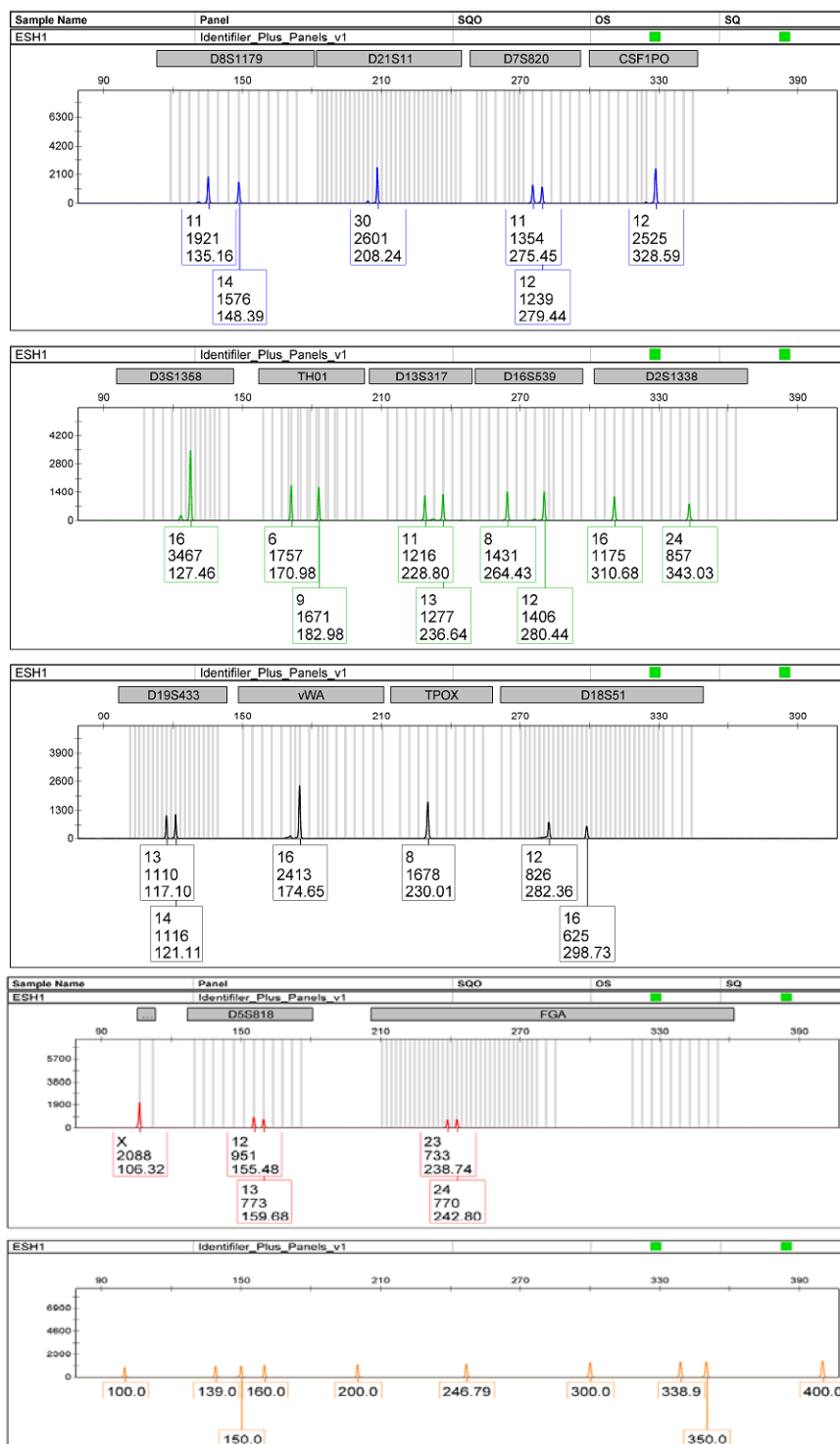


Figure 16. Profil génétique complet obtenu à partir de la dilution 1 de la série de répétabilité de la salive (concentration d'ADN 3,39 ng.µL⁻¹), établi grâce au kit AmpFlSTR[®] IdentifilerPLUS[®].

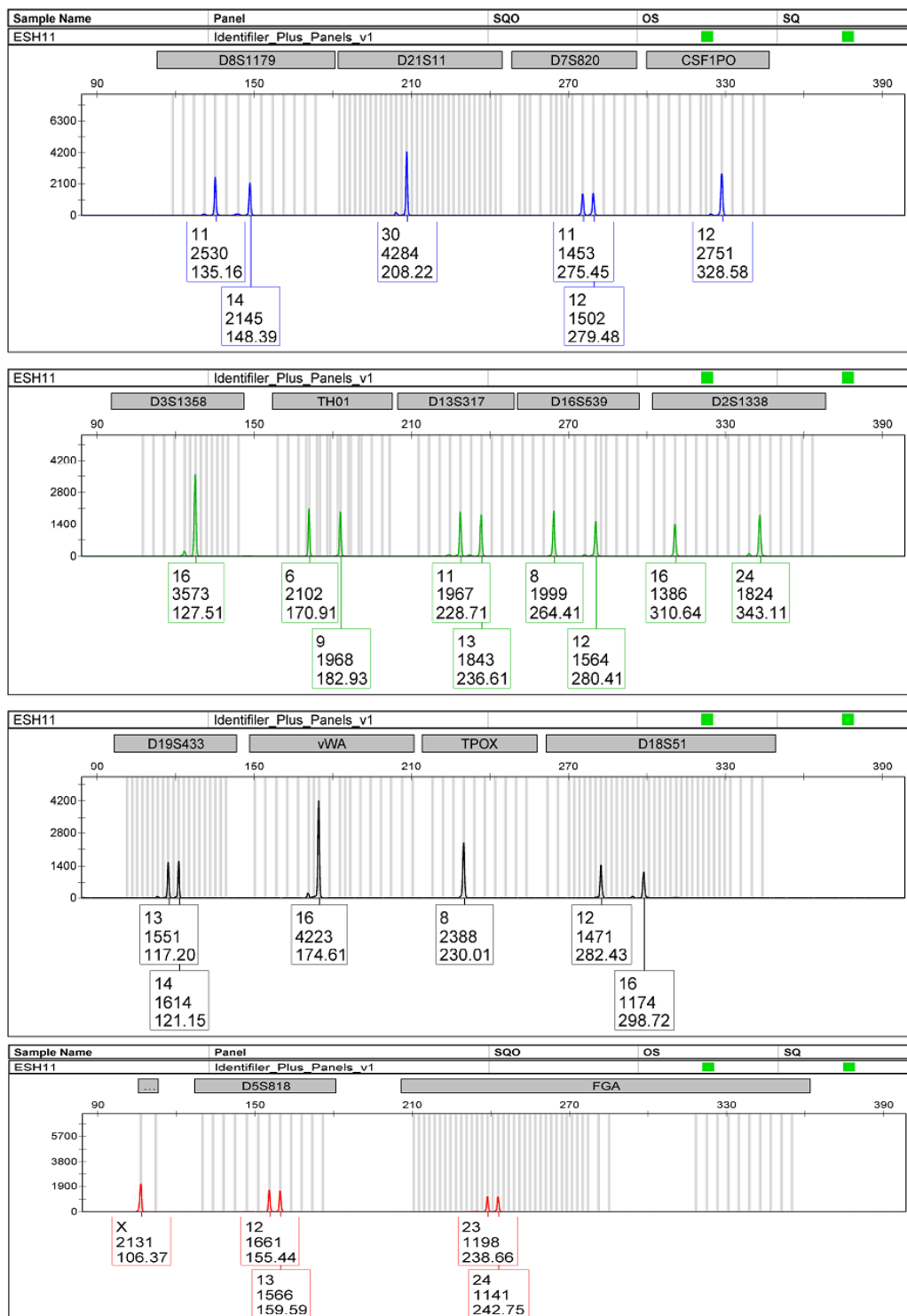


Figure 17. Profil génétique complet obtenu à partir de la dilution 1 de la série de reproductibilité de la salive (concentration d'ADN 2,08 ng.µL⁻¹), établi grâce au kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®.

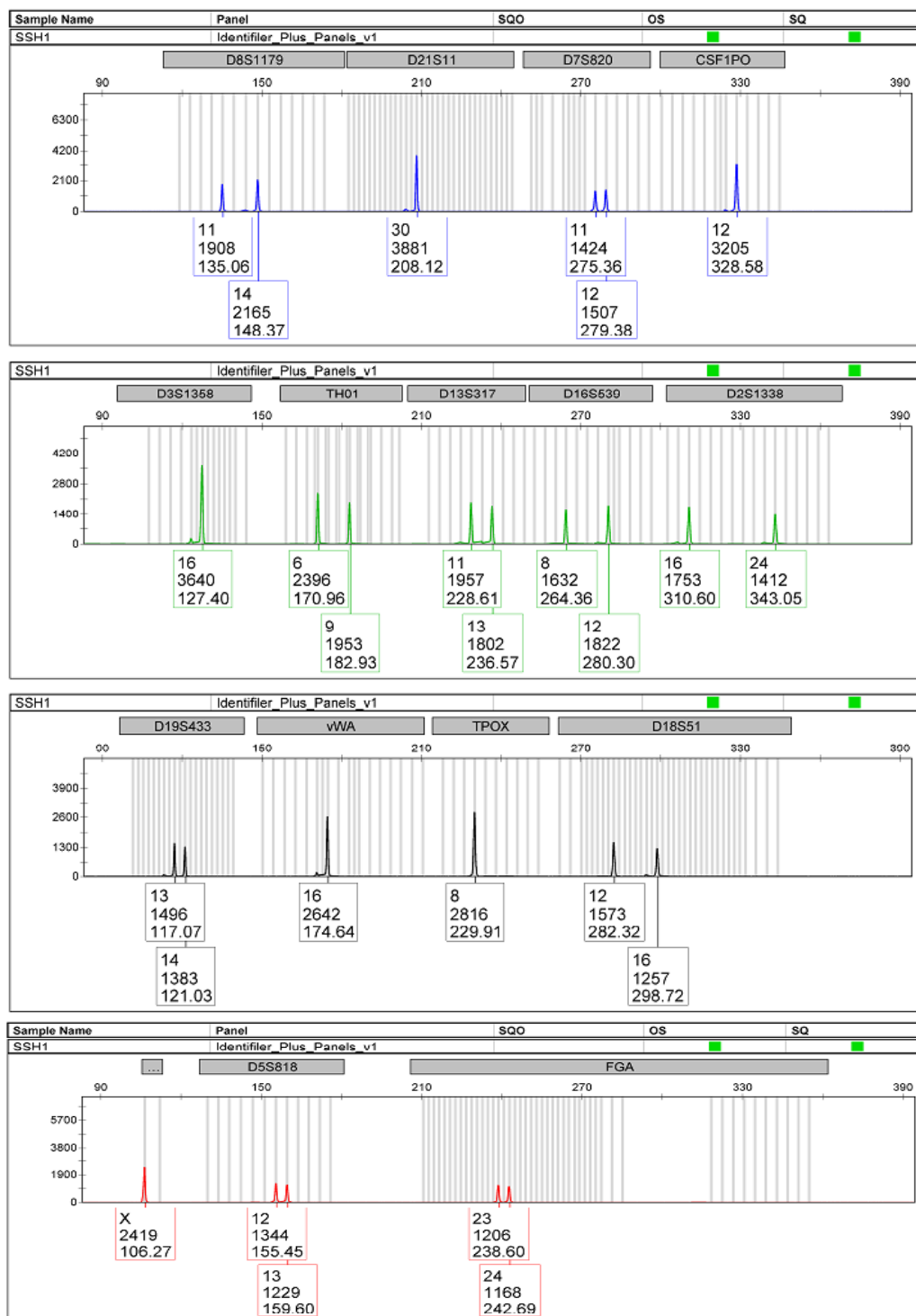


Figure 18. Profil génétique complet obtenu à partir de la dilution 1 de la série de répétabilité du sang (concentration d'ADN 33,28 ng.µL⁻¹), établi grâce au kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®.

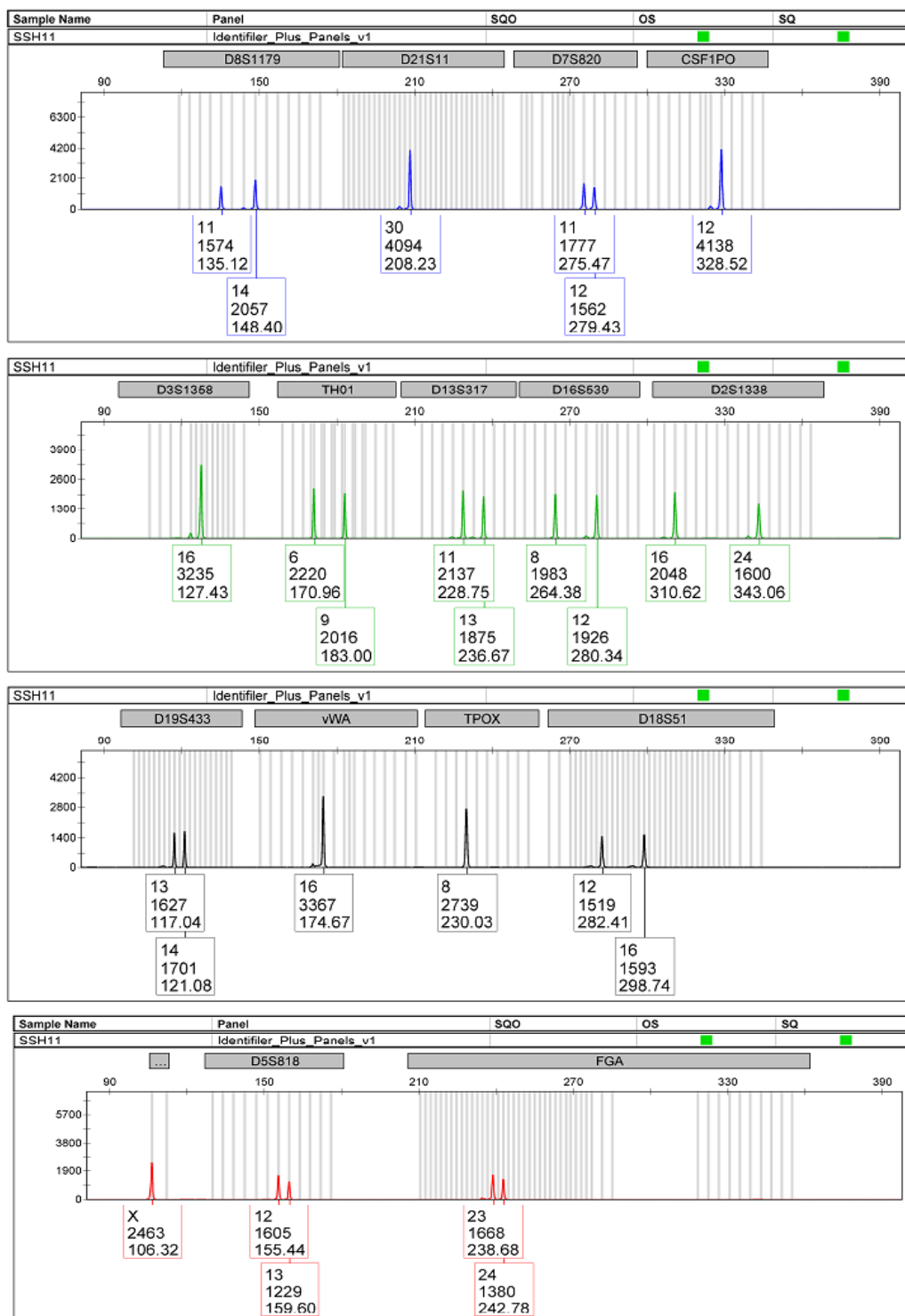


Figure 19. Profil génétique complet obtenu à partir de la dilution 1 de la série de reproductibilité du sang (concentration d'ADN 18,85 ng.µL⁻¹), établi grâce au kit AmpFISTR[®] IdentifilerPLUS[®].

La position de chaque pic correspond à un marqueur, donc à un STR, auquel est attribuée une hauteur (en unité de fluorescence relative) à partir de laquelle une taille (en paires de bases) en comparaison avec un standard de taille et le nombre de motifs répétés sont déduits.

Un examen attentif met en évidence la concordance entre les 4 profils, d'où la conclusion, comme attendu, que ces 4 profils sont bien ceux d'une même personne, et l'affirmation que cette technique permet bien d'obtenir avec succès des profils génétiques complets exploitables et totalement interprétables.

II. Résultats de la sensibilité

A partir d'une solution initiale de 1200 μL (1.2 mL) de sang pur, nous avons préparé une série de dilutions dans les rapports 1, 1/2, 1/4, 1/8^{ème}, 1/16^{ème} et 1/32^{ème} formant les 6 échantillons de mesure. La quantité extraite d'ADN est estimée pour chaque échantillon sur 3 réplicats.

Les concentrations moyennes sont représentées dans le tableau 11 (Annexe 12), avec R1, R2 et R3 les estimations individuelles des 3 réplicats de chaque série.

Tableau 11 : Dilutions successives allant du sang pur (1) à la 5^{ème} dilution (1/32^{ème}).

Rapport de dilution	R1 (ng. μL^{-1})	R2 (ng. μL^{-1})	R3 (ng. μL^{-1})	Moyenne (ng. μL^{-1})	Ecart-type (ng. μL^{-1})	CV (%)	AB 0.1 ng. μL^{-1}
1 (sang pur)	28.23	28.48	29.76	28.82	0.82	2.8	288±9
0.5 (1/2)	11.56	17.17	17.35	15.36	3.29	21.4	154±33
0.25 (1/4)	9.99	9.30	9.87	9.72	0.37	3.8	97±4
0.125 (1/8)	5.06	5.71	5.63	5.47	0.35	6.5	55±3
0.0625 (1/16)	3.04	3.10	3.15	3.10	0.06	1.8	31±1
0.03125 (1/32)	1.63	1.22	1.35	1.40	0.21	15.0	14±2

On observe que le facteur multiplicatif que l'on sait maintenant très élevé pour le sang pur (288±9) reste tout à fait appréciable après la 5^{ème} dilution (14±2).

Le deuxième échantillon (dilution 1/2) se caractérise par une valeur qui nous a semblé aberrante, pouvant être due à une erreur de pipetage, mais que nous avons conservée, faute de pouvoir le prouver par le test de Grubbs inopérant ici (n=3, échantillon trop petit). Cette valeur de 11.56 ng. μL^{-1} est vraisemblablement plus basse que les 2 autres (≈ 17 ng. μL^{-1}) d'où le CV élevé = 21,4%.

Nous donnons à titre d'illustration en figure 20 les quantités extraites moyennes d'ADN.

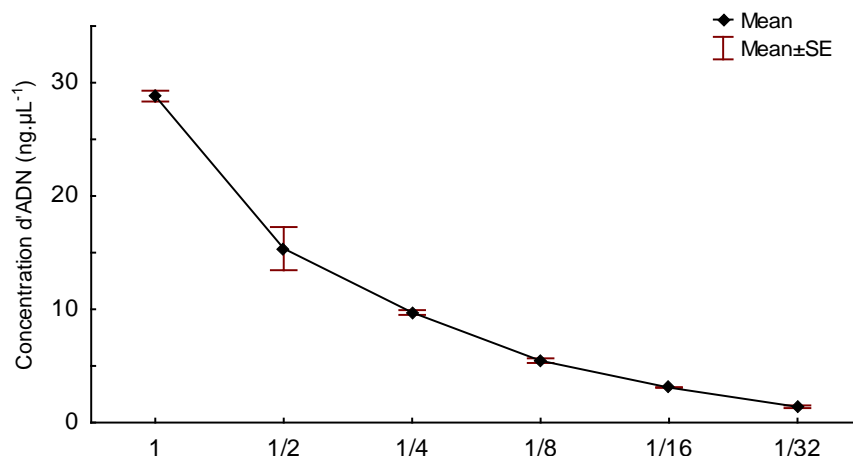


Figure 20. Quantités moyennes extraites d'ADN du sang pur dilué jusqu'à l'ordre 5 (1/32^{ème})

Notre objectif dans l'étude de sensibilité a été d'évaluer la capacité du kit QIAamp à détecter la quantité minimale d'ADN amplifiable. Nous nous sommes cependant limités, sur les recommandations internationales de l'ENFSI (2010), à la cinquième dilution.

Nous avons tout d'abord constaté de faibles CV (entre 1,8 et 15,0%) pour les mesures faites par le même opérateur et répétées dans chaque échantillon. La valeur 15,0% pour l'échantillon le plus dilué (1/32^{ème}) est tout à fait normale car le CV a tendance à augmenter quand la concentration diminue (même si ce n'est pas une règle absolue).

II.1 La limite de détection

La limite de détection est égale à la quantité minimale de matériau de base pouvant donner après extraction une quantité exploitable d'ADN.

Les prélèvements de référence, objet de notre étude, donnent des résultats parfaitement fiables à la dilution au 1/32^{ème}, frontière probablement jamais atteinte pour ce type de prélèvements. Il nous a donc semblé inutile de tester des dilutions plus fortes (qui entreraient dans le cadre des prélèvements de traces).

La solution mère initiale de sang pur à 28.8 ng.µL⁻¹ d'ADN a un rapport de dilution égal à 1:288. Après les 5 dilutions successives, on aboutit à une solution au 1/32^{ème} à 1,4 ng.µL⁻¹ et un rapport de dilution égal à 1:14. Cette concentration reste 14 fois plus élevée que la concentration minimale requise par le fabricant. D'où la fiabilité de la méthode QIAamp pour

ce qui en est attendu, c'est-à-dire nous fournir une quantité d'ADN suffisante pour établir un profil génétique.

II.2 Etablissement d'un profil génétique

Afin de vérifier la qualité de l'ADN extrait à partir des solutions diluées, nous avons établi un seul profil génétique (Figure 21) basé sur l'échantillon ultime (dilution 1/32^{ème}), avec la concentration minimale en ADN (1,22 ng.µL⁻¹), cette concentration étant largement plus élevée que la valeur limite (0,1 ng.µL⁻¹) fournie par le fabricant.

Nous avons ainsi réalisé un profil génétique complet, exploitable et interprétable.

III. Linéarité de la méthode

Partant des résultats de la sensibilité, nous avons voulu vérifier la linéarité de la méthode d'extraction dont l'hypothèse stipule que les quantités extraites d'ADN devraient être proportionnelles aux quantités présentes dans l'échantillon initial. Ce critère repose essentiellement sur l'appareillage et il n'existe aucune raison théorique ou expérimentale pour l'infirmer. Des mesures peuvent par contre le confirmer.

La linéarité de la méthode peut être démontrée par la technique de la régression linéaire basée sur les points représentatifs des concentrations obtenues d'ADN en fonction des diverses dilutions (Figure 22).

Dans cette hypothèse, les dilutions successives à partir du sang pur (1, 1/2, 1/4 etc..) doivent se solder par des quantités extraites d'ADN dans le même rapport, ce qui signifie d'une façon plus simple que si, par exemple, nous divisons la concentration initiale d'ADN par 4 (dilution au 1/4), la quantité d'ADN extrait devrait être divisée par 4.

Nous avons donc calculé le coefficient de corrélation linéaire $r(x,y)$ entre x , rapport de dilution et y , concentration en ADN. La procédure de calcul (Annexe 13) a donné $r = 0,997$, très proche de 1, ce qui signifie une excellente corrélation linéaire positive entre la concentration d'ADN et le rapport de dilution. Le coefficient de détermination r^2 qui donne le nombre de points expliqués par la régression est égal à 0,994=99.4%, soit plus de 99% des points expliqués par la régression).

La droite de régression $y=ax+b$ se caractérise par une corrélation hautement significative ($p < 0,001$), donc une pente significativement différente de zéro (pente $a=27,5$), confirmant notre hypothèse de départ. Son équation est $c(\text{ADN}) = 27,50 (\text{RD}) + 1,62$ où RD est le rapport de dilution.

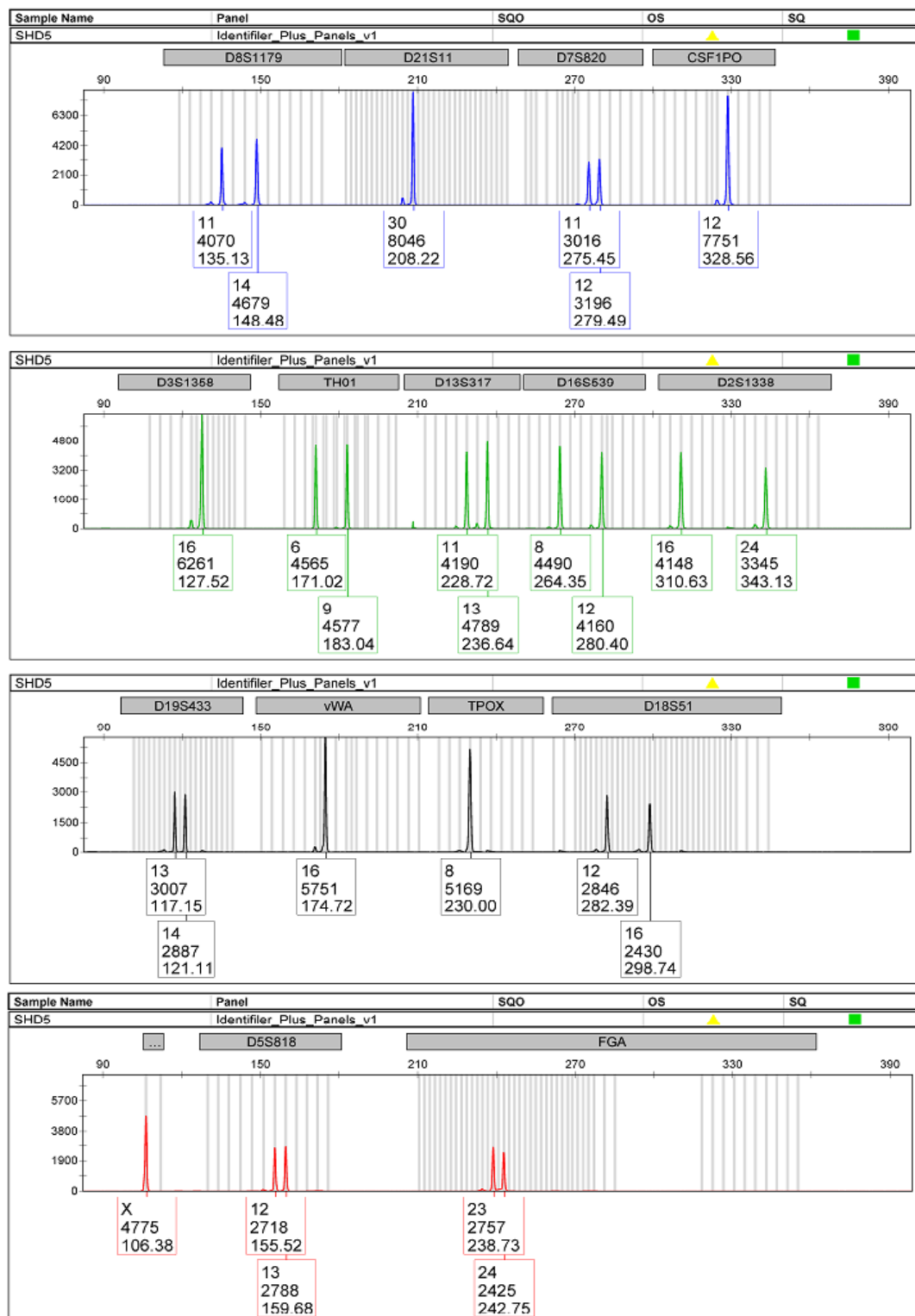


Figure 21. Profil génétique complet obtenu à partir d'une concentration en ADN de 1,22 ng.µL⁻¹ (dilution au 1/32^{ème}), établi grâce au kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®.

Précision importante, la droite de régression a bien une pente positive, ce qui signifie que si la concentration initiale augmente correspondant à un sang plus concentré, la quantité extraite d'ADN augmente. Toutefois expérimentalement, nous diluons le sang, donc nous diminuons la concentration, d'où la courbe (Figure 22) volontairement inversée pour mieux appréhender la procédure réelle (on a 1 puis 1/2 etc.) et donc une droite de pente paraissant négative.

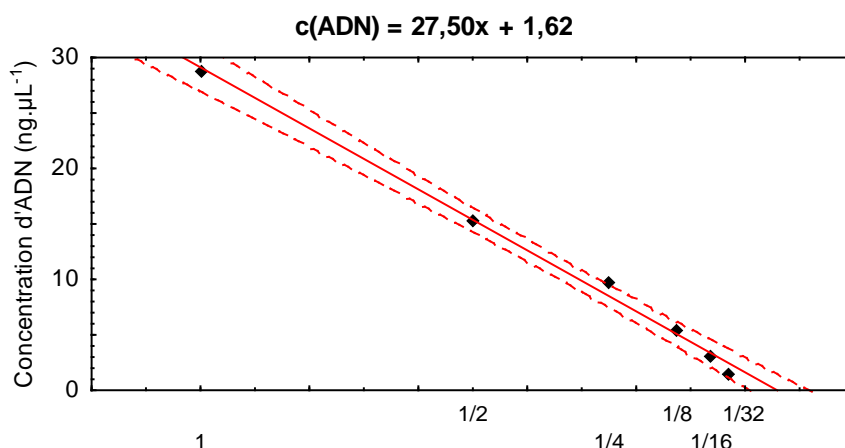


Figure 22 : Relation entre les quantités extraites d'ADN et les dilutions successives. La droite pleine est la droite de régression linéaire, la région entre les lignes pointillées représente l'intervalle de confiance à 95%.

IV. Etude de rendement

Afin d'évaluer le rendement en ADN obtenu par notre méthode d'extraction, nous avons utilisé un contrôle positif 2800M du kit ESI[®] de concentration connue égale à 10 ng.µL⁻¹ qui sera amenée par dilution à 0,25 ng.µL⁻¹ (voir I.3.4 Matériels et méthodes). La quantification de l'ADN a été réalisée sur une série de 5 mesures directes (Annexe 14) à partir de l'échantillon primaire et une série de 5 autres mesures après extraction de l'ADN.

Nous avons ainsi pu observer une concentration moyenne, obtenue après extraction, égale à 0,207 ng.µL⁻¹ alors que pour les quantités initiales quantifiées directement, la concentration moyenne a été estimée à 0,335 ng.µL⁻¹, plus élevée que celle attendue (0,25 ng.µL⁻¹) donnée par le fabricant.

Si on se réfère à la concentration initiale théorique du kit ESI[®], donnée par le fabricant, on obtient un rendement de $\frac{0,207}{0,250} \times 100 = 82,8\% \approx 83\%$. Ce rendement, pourtant proche de

celui donné par le fabricant (80%) ne nous semble cependant pas fiable car d'après des expériences de validation interne de la PCR quantitative en temps réel réalisées à l'INCC, il a pu être montré que les contrôles positifs ne sont pas issus de systèmes certifiés et peuvent, par conséquent, s'écarter des concentrations certifiées sur l'emballage.

Le même calcul basé sur notre estimation au laboratoire ($0,335 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) a donné un rendement égal à $\frac{0,207}{0,335} \times 100 = 61.8\% \approx 62\%$, valeur sensiblement inférieure à 80%, mais qui reste malgré tout, parfaitement appréciable.

V. Résultats de la quantification

V.1 La détection en temps réel des produits amplifiés par PCR

Le but est de quantifier l'ADN extrait, ce qui se réalise dans une plaque de 96 puits. La fluorescence émise par une molécule de rapporteur est utilisée pour surveiller la progression de la réaction d'amplification. Avec chaque cycle d'amplification, l'augmentation de l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'amplicon. Par ce suivi, il est alors possible de tracer une courbe qui va caractériser les différentes phases de la cinétique PCR et de mesurer la quantité de produit d'amplification généré (Figure 23).

V.2 La courbe standard

La courbe standard (Figure 24) est une droite générée par le logiciel donnant Ct (cycle de seuil) en fonction du logarithme décimal de la concentration en ADN. C'est l'approche la plus directe et précise pour l'analyse quantitative des données, elle est préparée à partir d'une série de dilutions d'un ADN à concentration connue. Après l'amplification de la série de dilution standard, la courbe d'étalonnage est générée en traçant le Ct en fonction du logarithme du nombre de copies du modèle initial. Un résultat fiable est obtenu avec au moins six dilutions standards et un coefficient de détermination très proche de 1 (Stratagene, 2007).

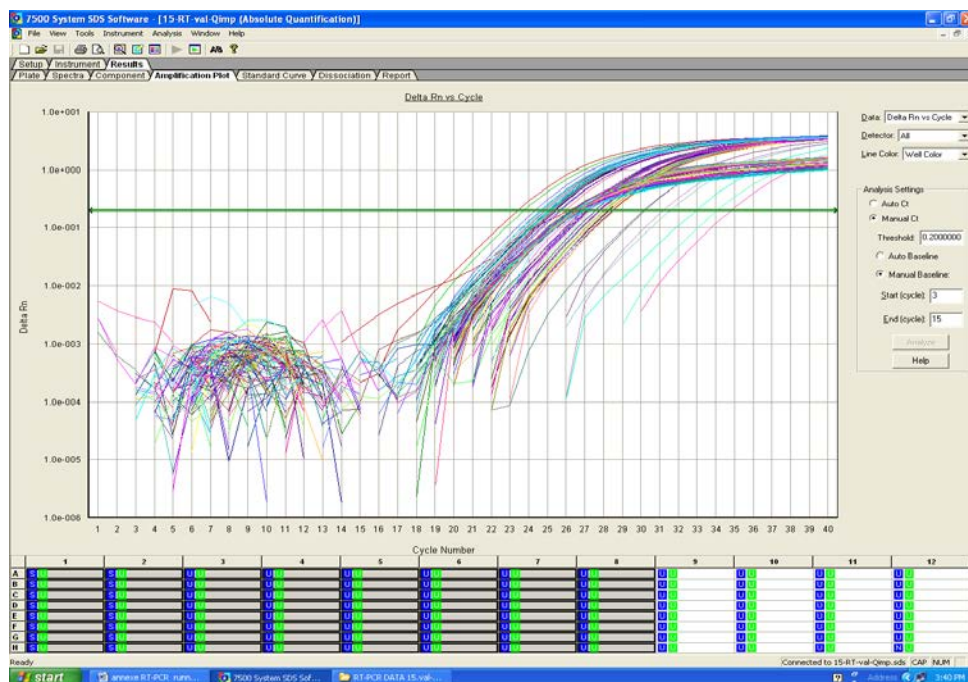


Figure 23 : Détection de la fluorescence en temps réel et détermination de la concentration de l'ADN à l'aide du cycle seuil (Ct).

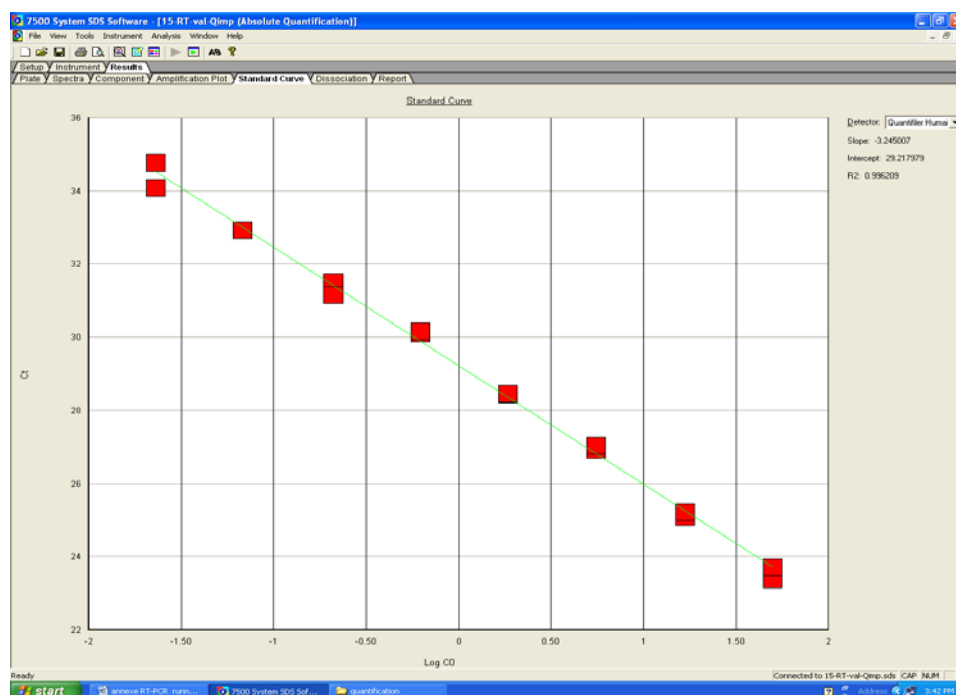


Figure 24 : Courbe standard donnant le cycle de seuil Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité de matrice initiale ($y=ax+b$; pente $a=-3,245$; ordonnée à l'origine $b=29,22$)

La courbe standard générée à partir de cette quantification a été produite avec succès, c'est une droite de pente=-3,245, d'ordonnée à l'origine=29,22 avec un coefficient de

détermination $r^2=0.9962$, très proche de 1, signifiant des dilutions standard bien préparées et un RT-PCR fonctionnant correctement.

V.3 Vérification de la performance de l'appareil de quantification

Dans le but de vérifier le bon fonctionnement de l'équipement utilisé pour la quantification d'ADN, nous avons pris les résultats obtenus à partir de la série de dilution de notre étude de sensibilité et nous avons déterminé la régression expérimentale entre les Ct obtenus et les logarithmes décimaux des concentrations en ADN c'est-à-dire la courbe $Ct = fct\{\text{Log}(c_0)\}$ (Figure 25) ce qui s'établit par un simple changement de variable sur les concentrations.

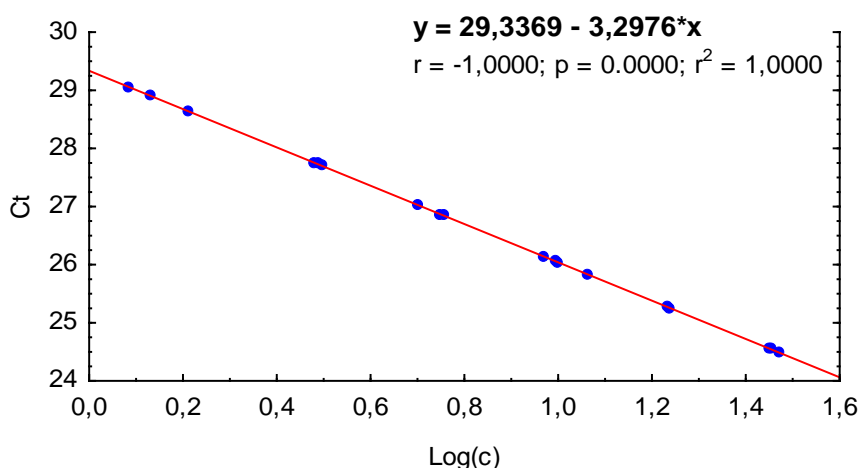


Figure 25 : Représentation graphique des (Ct) retrouvés en fonction du logarithme des concentrations pour la série de dilution de sensibilité.

La procédure de calcul (Annexe 15) a donné un coefficient de corrélation pratiquement égal à 1 ($r=-1.000$, $r^2=1.000$), donc une excellente corrélation linéaire, très hautement significative $p<0.0001$. La pente du droit est égale à -3,30 avec une ordonnée à l'origine égale à 29,34. L'efficacité E de l'amplification est égale à $10^{-1/a} - 1 = 10^{0.303} - 1 \approx 1 = 100\%$.

Il y a lieu de signaler que nos résultats sont proches de ceux générés précédemment par la machine (-3,30 et -3,245 pour la pente ; 29,34 et 29,22 pour l'ordonnée à l'origine). Nous estimons que les légères différences sont dues aux fluctuations naturelles de l'échantillonnage. Ces résultats démontrent la fiabilité des données de quantification et le bon fonctionnement de l'équipement.

Conclusion

Les résultats globaux accumulés durant cette étude ont démontré la fiabilité et la pertinence de la méthode QIAamp.

La première étape de nos travaux a consisté à valider la méthode d'extraction de l'ADN en utilisant le kit QIAamp DNA Blood Mini à partir de prélèvements de référence de sang et de salive.

Nous avons tout d'abord confirmé que nos résultats pour la répétabilité et la reproductibilité dans les deux échantillons étaient satisfaisants, malgré le fait de partir de concentrations initiales d'ADN inconnues dans les deux prélèvements.

Nous avons ensuite montré que cette méthode a présenté une bonne sensibilité, ce qui signifie qu'elle a été capable de détecter une quantité appréciable d'ADN jusqu'à la dilution d'ordre 5 (au 1/32^{ème}).

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons démontré que la méthode QIAamp fournit de l'ADN en bonne quantité avec un rendement jusqu'à 61% et de qualité satisfaisante.

De même, aucune inhibition n'a été observée durant les procédures de quantification. De plus, tous les échantillons témoins négatifs ont donné un résultat quantitatif négatif, ce qui indique l'absence de contamination lors du traitement des échantillons

A la lumière de tous ces résultats, concernant l'ensemble des critères de validation retenus dès le départ, nous pouvons conclure que la méthode d'extraction d'ADN QIAamp est jugée acceptable pour sa mise en place dans l'activité quotidienne du laboratoire d'analyses de l'ADN de l'INCC-GN. Cette technique, grâce à une bonne sensibilité et à une répétabilité et une reproductibilité satisfaisantes, permet une analyse d'ADN fiable et rapide.

Références

Références

1. Amarouche, S., (2010). *Caractérisation d'une méthode de mesure : étape clé dans le processus de validation*. Référence SL1040, Qualité au laboratoire. Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE).
2. Berensmeier, S., (2006). Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73(3) :495–504.
3. Brown, R., Davenport, J., (2015). *Forensic Science: Advanced Investigations*. (1st Ed.). p. 297
4. Butler, J., (2005). *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. (2nd Ed.). Elsevier Academic Press, p. 2, 42–47, 167–168.
5. Butler, J., (2011). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. (1st Ed.). Elsevier Academic Press, pp 3–13, 31–34.
6. Butler, J.M., Hill, C.R., (2012). Biology and Genetics of New Autosomal STR Loci useful for Forensic DNA Analysis. *Forensic Sci Rev*, 24(1):15–26.
7. Castella V., Dimo-Simonin, N., Brandt-Casadevall, C., Mangin, P., (2006). Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. *Forensic Sci Int*, 156(1):70–73.
8. Chiaroni, J., Roubinet, F., Bailly, P., Mannessier, L., Noizat-Pirenne, F, (2011). *Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques*. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 135-136.
9. Daho, K., Bessekri, M., Cherbiti, H., Lazreg, S., Aggoune, A., Bucht, R., Fuller, V., (2012). Concurrent Internal Validation of Four Forensic STR DNA Profiling Kits Using a Single Genetic Analyzer. INCC, GN
10. El-Mogy, M., Simkin, M., Haj-Ahmad, Y., (2012). Comparative Study of DNA Isolated from Saliva Preserved in Norgen's Preservative Using Norgen's Saliva DNA Isolation Kit Versus Qiagen's QIAamp DNA Blood MiniKit. Application Note 56, Saliva DNA Preservation. Norgen Biotek Corporation, Canada.
11. ENFSI DNA Working Group, (2010). Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process.
12. Esser, K.H., Marx, W.H., Lisowsky, T., (2006). maxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. *Nature Methods*, 3, doi: 10.1013/nmeth845.
13. Ghirmai, S. DNA purification from saliva stabilized in DNAgard® Saliva using QIAamp® Blood Mini Kit. Biomatrix the biostability company. www.biomatrix.com.

14. Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S., (2007). An Introduction to Forensic Genetics.
15. Greenspoon, S.A., (1998). QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. *J Forensic Sciences*, 43(5):1024-1030.
16. Gruson, A., (2005). Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique. *Ann Tox Anal*, vol XVII, n° 3, Supp. 1. Soc Française de Toxicologie.
17. Guide AmpF/STR® Identifiler® PLUS PCR Amplification Kit User Guide, 2015. Applied Biosystems, Life technologies, publication number 4440211, revision F, Thermo Fisher Scientific, Inc, 5791 Van Allan Way, Carlsbad, CA, 92008, USA, 148 p.
18. Guide QIAGEN, QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, (2012). *Sample and Assay Technologies*, Third Edition, www.qiagen.com
19. Guide Quantifiler Kits, User Manual, 2012. Applied Biosystems, Life technologies, publication number 4344790, revision F, Foster City, CA 94404 USA, 216 p.
20. Hashiyada, M., (2011). DNA Biometrics, Computer and Information Science, Artificial Intelligence, Jucheng Yang Ed., ISBN 978-953-307-618-8, Published: under CC BYNC-SA 3.0 license.
21. ISO/IEC 17025, (2005). Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais, http://www.iso.org/iso/fr/catalogue_detail?csnumber=39883
22. James, S.H., Nordby, J.J., Bell, S., (2005). Forensic Science: An Introduction to Scientific and Investigative Techniques. CRC Press, 4th ed., pp. 235.
23. Kennedy, S., (2010). How DNA extraction kits work in the lab. *Nucleic Acid Purification and Analysis*. BitesizeBio.
24. Keyser, C., Petrovki, E., (2006). Utilisation des SNP pour l'identification humaine. *Spectra Analyse* n° 249, pp 24-25.
25. Kirsty, P., McCallum, N., Welch L., (2012). A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *FSI Genetics*, 6(2):282-285.
26. Kobilinsky, F., Levine, L., Margolis-Nunno, H., (2007). Forensic DNA Analysis. Infobase Publishing, Chelsea House, New York, p. 35.
27. Köchl, S., Niederstätter, H., Parson, W., (2005). DNA Extraction and Quantitation of Forensic Samples Using the Phenol-Chloroform Method and Real-Time PCR. *Methods Mol Biol*, 297:13-30.
28. Lareu, M., (2013). Short Tandem Repeats, Encyclopedia of Forensic Sciences. *Elsevier Limited*, 2th edition, pp. 219-226.

29. Laus, S., Kingsley, L.A., Green, M., Wadowsky, R.M., (2011). Comparison of QIA Symphony Automated and QIAamp Manual DNA Extraction Systems for Measuring Epstein-Barr Virus DNA Load in Whole Blood Using Real-Time PCR. *J Mol Diagn*, 13(6):695–700.
30. Lehmann, A.S., BS, Haas, D.M., McCormick, C.L., Skaar, T.C., Renbarger, J.L., (2011). Collection of human genomic DNA from neonates: a comparison between umbilical cord blood and buccal swabs. *American J Obstetrics Gynec*, 204(4):362.e1–362.2e6.
31. Lima, D.P., Diniz, D.G., Moimaz, S.A.S., Sumida, D.H., Okamoto, A.C., (2010). Saliva: reflection of the body. *Int J Infectious Diseases*, 14(3):184–188.
32. Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4(6):357–362.
33. Mansuet-Lupo, A., Rouger, P., Van Huffel, V., (2007). Les empreintes génétiques : état de l'art en 2007, techniques, applications et législation. *Transfusion Clinique et Biologique*, 14(3) :334–342.
34. Mansuet-Lupo, A., Van Huffel, V., Rouger, P., (2008). Les empreintes génétiques : nouvel outil en médecine légale. *Médecine et Droit*, 88:24–28.
35. Mathys, V., Lefèvre, P., Fontaine, V., Dehem, M., Donnio, P.Y., Février, F., Le Coustumier, A., Bifani, P., (2007). La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. *Antibiotiques*, 9(3) :205–211.
36. Moore, J.M., Isenberg, A.R., (1999). Mitochondrial DNA Analysis at the FBI Laboratory. Laboratory Services, The Federal Bureau of Investigation. *Forensic Science Community*, Vol 1, n° 2.
37. Ng, D.P., Koh, D., Choo, S.G., Ng, V., Fu, Q., (2004). Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. *Clin Chim Acta*, 343(1–2):191–194.
38. Petkovski, E., (2006). Polymorphismes ponctuels de séquence et identification génétique. Etude par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Thèse de Doctorat de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I, p. 16.
39. Résolution Oeno, (2005). Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité, et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative. *Recueil des méthodes internationales d'analyse*, Guide de validation, Contrôle qualité, OIV-MA-AS1, p. 5.

40. Richardson, A.J., Narendran, N., Guymer, R.H., Vu, H., Baird, P.N., (2006). Blood storage at 4°C - factors involved in DNA yield and quality. *The J Laboratory and Clinical Med*, 147(6):290–294.
41. Rudin, N., Inman, K., (2001). An Introduction to Forensic DNA Analysis, Second Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, London, p. 65–68.
42. Sozer A.C., (2014). DNA Analysis for Missing Person Identification in Mass Fatalities. CRC Press, Taylor & Francis Group, London, pp. 130–133.
43. Stratagene Company (2007). Introduction to Quantitative PCR Methods and Applications, Guide 2007, Stratagene
44. SWGDAM, Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (2012). Validation Guidelines for DNA Analysis Methods.
45. Taupin, J.M., (2013). Introduction to Forensic DNA Evidence for Criminal Justice Professionals. CRC Press, Taylor & Francis Group, London, pp. 39–44.
46. Taupin, J.M., Cwiklik, C., (2011). Scientific Protocols for Forensic Examination of Clothing. CRC Press, Taylor & Francis Group, London, p. 123.
47. Tilstone, W.J., Savage, K.A., Clark, L.A., (2006). Encyclopedia of Forensic Science: An Encyclopedia of History, Methods, and Techniques. ABC-CLIO Publisher, Santa Barbara, CA, USA, p. 256.
48. Tse, C., Capeau, J., (2003). Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann Biol Clin*, 61(3):279–293.
49. van Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A., Hays, J.P., (2008). Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. *Springer Science & Business media*, pp. 36–37.
50. Weber, J.L., May, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, 44(3):388–96. In: Mansuet-Lupo, A., Van Huffel, V., Rouger, P., (2008). Les empreintes génétiques : nouvel outil en médecine légale. *Médecine et Droit*, 88:24–28
51. Xenophontos, S., Christofi, V., Iosif, G., Polycarpou, P., Manoli, P., Demetriou, N., Cariolou, M.A., (2015). Internal validation of the QIAamp DNA Investigator Kit, QIAamp 96 DNA Swab BioRobot Kit and the BioRobot Universal System for DNA extraction from reference and crime scene samples. *Forensic Sci Int Genet*, 14 :e8–e10.

Annexes

Annexe 1 : Kit QIAamp DNA Mini Blood



Annexe 2 : Protocole de quantification de l'ADN

- D'abord, retirer le Primer Mix (PM) et le standard (Std) du congélateur (-20°C), et le Reaction Mix (RM) (+04) environ 15 min avant leur utilisation.
- Mettre en marche et stériliser la hotte environ 15 min avant toute manipulation
- Mettre en marche l'appareil RT-PCR 20 min avant le lancement du Run.

1. Préparation de la Gamme Standard

Nous avons identifié 9 microtubes, dont 8 correspondent aux standards et 1 pour l'eau ultra pure. La Gamme Standard est préparée à partir d'une solution mère à 200 ng.μL⁻¹, suivie de plusieurs dilutions (voir ci-bas). La solution est passée au Vortex après chaque dilution.

Préparation de la Gamme Standard

Standards	Facteur de dilution	Dilution	Concentration Finale (ng.μL ⁻¹)
STD 1	1/4	30 μL (eau ultra pure) + 10 μL (sol mère)	50
STD 2	1/3	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 1)	16,7
STD 3	1/3	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 2)	5,56
STD 4	1/3	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 3)	1,85
STD 5	1/3	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 4)	0,62
STD 6	1/3	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 5)	0,21
STD 7	1/3	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 6)	0,068
STD 8	1/3	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 7)	0,023

2. Préparation du Master Mix

- Identifier un tube de 2 mL pour le Master Mix.
- Passer au Vortex le flacon du Primers Mix pendant 3 à 5 s.
- Mélanger délicatement le contenu du tube du Reaction Mix sans passage au Vortex.
- Prélever $12.5 \times (n + 19)$ μL du Quantifiler[®] PCR Reaction Mix (kit Quantifiler[®]) et les déposer dans le tube préalablement identifié (Tableau 6), n est le nombre d'échantillons et la valeur 19 correspond à 16 standards + 1 témoin négatif + 2 erreurs de pipetage.
- Ajouter $10.5 \times (n + 19)$ μL du Quantifiler[®] Human Primer Mix et les déposer dans le tube.
- Passer au Vortex le tube contenant le Master Mix.

3. Préparation de la plaque 96-puits

3.1. Plan de plaque

- Sortir les échantillons du réfrigérateur à 4°C
 - Mettre la plaque 96 puits sur un support de plaque en respectant l'orientation
 - Déposer 23 μL du Master Mix dans chaque puits et 2 μL de standard dans les puits correspondants : Série 01 : STD 1 au STD 8 (A1-H1), Série 02 : STD 1 au STD 8 (A2-H2)
 - Par la suite, déposer 2 μL de chaque échantillon dans le reste des puits (A3-G10) puis dans le dernier puits (H12) ajouter 2 μL d'eau ultra pure (blanc de quantification) témoin négatif.
 - Bien sceller la plaque avec un film optique adhésif transparent approprié afin d'éviter toute évaporation.
- Centrifuger la plaque à 3000 rpm pendant quelques secondes pour récupérer les gouttelettes collées à la paroi. (Guide Quantifiler[®] Kits, 2012)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std01	Std01										
B	Std02	Std02										
C	Std03	Std03										
D	Std04	Std04										
E	Std05	Std05										
F	Std06	Std06										
G	Std07	Std07										
H	Std08	Std08										T(-)

Echantillons ADN

Préparation de la plaque 96 puits pour la quantification de l'ADN.

Annexe 3 : Protocole d'amplification de l'ADN

1. Principe du kit d'amplification de l'ADN

Le kit d'amplification par PCR « ampFLSTR Identifier PLUS » pour l'identification de l'ADN est une courte répétition en tandem (STR) qui peut analyser simultanément 15 marqueurs autosomaux de tétranucléotides (CSF1P0, D7S820OX, vWA, D5S818, FGA D8S1179, D21S11, D2S1338, D3S1358, D13S317, D16S539, TH01, D18S51, D19S433, TPOX), ainsi que celle du gène de l'amélogénine afin de révéler le sexe de la personne à l'origine de l'échantillon guide AmpFLSTR® Identifier® Plus, 2015)

2. Protocole d'amplification de l'ADN

2.1. Préparation du Master Mix :

- Calculer le volume de chaque composant nécessaire aux réactions selon le tableau suivant :

Réactifs	Volume total (µL)
AmpFLSTR® Identifier® Plus Master Mix	11 fois n échantillons $11 * 7 = 77$
AmpFLSTR® Identifier® Plus Primer Set	5,5 fois n échantillons $5.5 * 7 = 38.5$

- Décongeler l'AmpFlSTR® Identifier® plus Kit Master Mix et l'AmpFlSTR® Identifier® Kit plus Primer Set, passer au Vortex pendant 3 s puis centrifuger brièvement avant l'ouverture des tubes pour évacuer tout liquide des bouchons.
- Prélever avec une pipette les volumes requis dans un tube de taille appropriée.
- Passer au Vortex le mélange réactionnel pendant 3 s puis centrifuger brièvement.
- Distribuer 15 μL du mélange de réaction dans chaque tube d'amplification, ainsi que dans deux autres tubes pour le contrôle positif et le contrôle négatif.

2.3. Préparer les échantillons d'ADN :

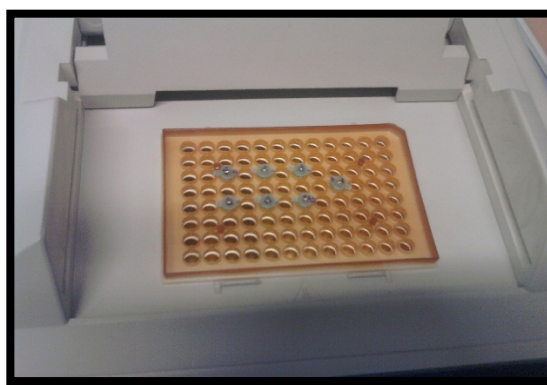
- Diluer une partie de l'échantillon d'ADN de test dans de l'eau pure de façon à avoir 1,0 ng de l'ADN total dans un volume final de 10 μL (Tableau 6). Ajouter ensuite 10 μL de l'échantillon dilué au mélange de réaction dans les puits d'amplification appropriés.
- Mettre en place un contrôle positif de 10 μL (1,0 ng) de 9947A et un contrôle négatif de 10 μL d'eau pure aux puits contenant le Master Mix.

Note : Le volume final de la réaction (de l'échantillon ou du contrôle, plus le mélange réactionnel) est de 25 μL .

- Placez la plaque dans le thermocycleur et amplifiez les échantillons en utilisant le système GeneAmp® PCR 9700.
- Après amplification, retirez les échantillons du thermocycleur et les conservez au réfrigérateur.



Préparation des échantillons d'ADN
et le mélange réactionnel



Placer la plaque 96 puits dans
le thermocycleur.



Le thermocycleur 9700



Vue du programme du thermocycleur

Annexe 4 : Protocole de post-amplification (électrophorèse capillaire)

- Calculer le volume de Hi-Di™ formamide et le Standard de taille GeneScan™ 500 LIZ® nécessaire pour préparer les échantillons selon le tableau suivant :

•

Réactifs	Volume total (µL)
Standard de taille 500 LIZ	0,3 fois n échantillons $0.3 \cdot 11 = 3.30$
Hi-Di formamide	8,7 fois n échantillons $8.7 \cdot 11 = 95.70$

La valeur 11 correspond à 9 réactions + 2 erreurs de pipetage.

- Prélever à la pipette les volumes requis dans un tube de taille appropriée.
- Passer au Vortex le mélange réactionnel pendant 3 secondes, puis centrifuger brièvement.
- Préparer la plaque de 96 puits, ensuite ajouter dans un seul run 9 µL de mix formamide/Standard de taille 500 LIZ et 1 µL d'amplifiât obtenu ou échelle allélique
- Pour le témoin négatif, ajouter 9 µL de Hi-Di formamide et 1µL de l'eau pure.
- Dans les puits vides ajouter 10 µL de mix formamide/Standard de taille 500 LIZ pour éviter le décalage de lecture des résultats par le logiciel.

- Fermer la plaque, puis centrifuger brièvement.
 - Chauffer le plateau de réaction dans un thermocycleur pendant 3 min à 95 ° C.
 - Placez immédiatement la plaque sur de la glace pendant 3 min.
 - Mettre la plaque dans le séquenceur et lancer l'analyse (l'analyse de run dure 45 min).
- (Guide AmpFlSTR® Identifier® Plus, 2015)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E 01	For										
B	S 01	For										
C	E 11	For										
D	S 11	For										
E	D 05	For										
F	Amp-	For										
G	Amp+	For										
H	Post Amp -	lader										



Run

Préparation de la plaque 96 puits pour le séquenceur 3130xl.

Annexe 5 : Liste des loci analysés sur l'ADN autosomal

Locus	Chr	Position	Taille des fragments	Motif répété	Echelle allélique
D8S1179	8	8q	de 128 à 168 pb	(TCTR)n	entre 8 et 19
D21S11	21	21q11-q21	de 189 à 243 pb	(TCTA)n	entre 24.2 et 38
D7S820	7	7q11.21-q22	de 215 à 247 pb	(AGAT)n	entre 6 et 15
CSF1PO	5	q33.3-34 située dans le gène du récepteur cfms proto — oncogène pour le CSF1.	de 295 à 327 pb	(AGAT)n	entre 7 et 15
D3S1358	3	3p	de 114 et 142 pb	(TCTA)n	entre 9 et 19
TH01	11	11p15.5 située dans l'intron 1 du gène de la tyrosine hydrolase	de 154 pb à 178 pb	(TCAT)n	entre 5 et 11
D13S317	13	13q22-q31	de 165 à 197 pb	(AGAT)n	entre 5 et 15
D16S539	16	16q24-qter	de 264 à 304 pb	(AGAT)n	entre 5 et 15
D2S1338	2	2q35-37.1	de 289 à 341 pb	(TGCC)n	entre 15 et 28
D19S433	19	19q12-13.1	de 106 à 140 pb	(AAGG)n	entre 9 et 18.2
vWA	12	12p12 pter située dans l'intron 40 du gène humain VWA	de 135 à 167 pb	(TCTR)n	entre 11 et 22
TPOX	2	2p13 située dans le gène de la thyroïde-péroxidase	de 232 à 248pb	(AATG)n	entre 8 et 12
D18S51	18	18q21.3	de 273 à 341 pb	(AGAA)n	entre 9 et 26
D5S818	5	5q21-31	de 135 à 171 pb	(AGAT)n	entre 7 et 16
FGA	4	4q28	de 219 à 267 pb	(TTTC)n	entre 16.2 et 30

Annexe 6 : Rappels sur les tests statistiques

Analyse de variance ANOVA : cette analyse permet de vérifier s'il y a homogénéité entre les différentes moyennes mesurées.

La variabilité de toute mesure est estimée par le calcul de l'écart-type.

L'écart type est un paramètre central et fondamental en statistiques. Il est donné par la relation

$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$ où les x_i sont les différentes concentrations d'ADN mesurées, \bar{x} est la concentration moyenne d'ADN recueilli et n le nombre total de mesures.

La quantité $(x_i - \bar{x})$ est un écart entre la mesure i et la moyenne, c'est pourquoi $\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$ est appelée somme des carrés des écarts (SCE). La division par n (ou $n-1$) puis l'extraction de la racine carrée nous ramènent donc à une variabilité moyenne qui est l'écart-type, au cœur de toute analyse statistique.

Le coefficient de variation CV est le rapport de l'écart-type à la moyenne, donné en pourcentage. Il est calculé selon la relation $CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$

La répétabilité et la reproductibilité ne permettent de quantifier que la variabilité des mesures, et non leur précision, qui sera déterminée par les tests de linéarité basés sur la technique de régression linéaire, qui permet de déterminer si un paramètre y est distribué de façon linéaire en fonction de données x , autrement dit si $y = f(x) = ax + b$. Cette relation qui définit une droite y en fonction de x a une pente « a » et une ordonnée à l'origine « b ». La détermination de la droite de régression passe par le calcul du coefficient de corrélation linéaire de Pearson

$r(x, y) = \frac{cov(x, y)}{\sigma_x \cdot \sigma_y}$, la corrélation linéaire étant d'autant plus forte que r se rapproche de 1.

Les tests de Cochran permettent de vérifier l'homogénéité des variances de plusieurs échantillons.

Annexe 7 : Statistiques descriptives pour les séries de mesures de répétabilité et de reproductibilité.

Breakdown Table of Descriptive Statistics (Sauvegarde globale.sta)								
N=152(No missing data in dep. var. list)								
Série	c N	c Mean	c Std.Dev.	c Coef.Var.	c Confidence -95.000%	c Confidence +95.000%	R.Dil Mean	R.Dil Std.Dev.
1	10	3,16	1,18	37,26	2,32	4,00	32	12
2	10	21,2	5,7	26,8	17,2	25,3	212	57
3	10	2,46	0,43	17,46	2,16	2,77	25	4
4	10	18,6	4,2	22,6	15,6	21,6	186	42
13	10	2,10	0,64	30,41	1,64	2,56	21	6
14	10	25,3	3,2	12,6	23,0	27,5	253	32

Annexe 8 : Analyse de variance (ANOVA) pour l'échantillon de salive

Analysis of Variance								
Marked effects are significant at $p < ,05000$								
Variable	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
c	5,790	2	2,895	17,820	27	0,660	4,39	0,0224

Tukey HSD test; variable c				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = ,66001, df = 27,000				
Cell No.	Série	c Mean	1	2
3	13	2,1010	****	
2	3	2,4650	****	****
1	1	3,1600		****

Tukey HSD test; variable c				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,66001, df = 27,000				
Cell No.	Série	{1}	{2}	{3}
1	1	3,1600	2,4650	2,1010
2	3	0,1545	0,1545	0,5821
3	13	0,0189	0,5821	

Annexe 9 : Test de Cochran (salive)

Tests of Homogeneity of Variances					
Effect: Type					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
c(ADN)	7,485	0,700	8,650	2,000	0,013

Annexe 10 : Analyse de variance (ANOVA) pour l'échantillon de sang

Univariate Tests of Significance for c					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	14104,14	1	14104,14	704,944	0,00000
Série	227,01	2	113,51	5,673	0,00877
Error	540,20	27	20,01		

Tukey HSD test; variable c				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 20,007, df = 27,000				
Cell No.	Série	c Mean	1	2
2	4	18,558	****	
1	2	21,238	****	****
3	14	25,252		****

Newman-Keuls test; variable c				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = 20,007, df = 27,000				
Cell No.	Série	{1}	{2}	{3}
		21,238	18,558	25,252
1	2		0,1916	0,0550
2	4	0,1916		0,0067
3	14	0,0550	0,0067	

Annexe 11 : Test de Cochran (sang)

Tests of Homogeneity of Variances					
Effect: Type					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
c(ADN)	3,226	0,540	2,889	2,000	0,236

Annexe 12: Statistiques descriptives pour la série de dilution (sensibilité).

Breakdown Table of Descriptive Statistics (Données C 29 mars Quant Dil Préc.sta) N=38(No missing data in dep. var. list)						
Ech	Part	N	Qty c(ADN) Mean	Qty c(ADN) Std.Dev.	Qty c(ADN) Coef.Var.	Qty c(ADN) Std.Err.
1	1	3	28,82	0,82	2,85	0,47
1	2	3	15,36	3,29	21,43	1,90
1	3	3	9,72	0,37	3,79	0,21
2	1	3	5,47	0,35	6,48	0,20
2	2	3	3,10	0,06	1,78	0,03
2	3	3	1,40	0,21	14,97	0,12

Breakdown Table of Descriptive Statistics (Données C 29 mars Quant Dil Préc.sta) N=18(No missing data in dep. var. list)					
Part'	Qty c(ADN)	Qty c(ADN) Mean	Qty c(ADN) Std.Dev.	R.Dil Mean	R.Dil Std.Dev.
1	3	28,82	0,82	288	9
2	3	15,36	3,29	154	33
3	3	9,72	0,37	97	4
4	3	5,47	0,35	55	3
5	3	3,10	0,06	31	1
6	3	1,40	0,21	14	2

Annexe 13 : Analyse de régression

Statistic	Summary Statistics;
	Value
Multiple R	0,997
Multiple R ²	0,994
Adjusted R ²	0,993
F(1,4)	697,7
p	0,000012
Std.Err. of Estimate	0,86

N=6	Regression Summary for Dependent Variable: c(ADN) R= ,99714570 R ² = ,99429956 Adjusted R ² = ,99287444 F(1,4)=697,70 p<,00001 Std.Error of estimate: ,86315					
	b*	Std.Err. of b*	b	Std.Err. of b	t(4)	p-value
Intercept			1,619	0,491	3,298	0,030
Dil	0,997	0,038	27,507	1,041	26,414	0,000012

Effect	Analysis of Variance; DV: c(ADN)				
	Sums of Squares	df	Mean Squares	F	p-value
Regress.	519,8	1,0	519,8	697,7	0,000012
Residual	2,980	4,000	0,745		
Total	522,8				

Annexe 14 : Calcul des concentrations moyennes l'étude de rendement.

Breakdown Table of Descriptive Statistics N=20(No missing data in dep. var. list)					
Ech	Qty c(ADN)	Qty c(ADN) Mean	Qty c(ADN) Std.Dev.	Qty c(ADN) Coef.Var.	Qty c(ADN) Std.Err.
1	10	11,96	3,40	28,42	1,07
2	5	0,207	0,02	8,56	0,008
3	5	0,335	0,04	13,13	0,020

Rapport de dilution

Breakdown Table of Descriptive Statistics (Fichier global.sta) N=50(No missing data in dep. var. list)					
Var1	R.Dil N	R.Dil Mean	R.Dil Std.Dev.	R.Dil Coef.Var.	R.Dil Std.Err.
Salive 1 Répét	10	32	12	37	4
Salive Reprod 2	10	25	4	17	1
Salive Reprod 1	10	21	6	30	2
Sang Reprod 1	10	212	57	27	18
Sang Reprod 2	10	253	32	13	10
All Grps	50	108	107	99	15

Annexe 15 : Régression linéaire pour le critère de linéarité

A3	SHD0a	Quantifiler Humain	Unknown	24,55	28,23
B3	SHD0b	Quantifiler Humain	Unknown	24,54	28,48
C3	SHD0c	Quantifiler Humain	Unknown	24,48	29,76
D3	SHD1a	Quantifiler Humain	Unknown	25,83	11,56
E3	SHD1b	Quantifiler Humain	Unknown	25,27	17,17
F3	SHD1c	Quantifiler Humain	Unknown	25,25	17,35
G3	SHD2a	Quantifiler Humain	Unknown	26,04	9,99
H3	SHD2b	Quantifiler Humain	Unknown	26,14	9,3
A4	SHD2c	Quantifiler Humain	Unknown	26,06	9,87
C4	SHD3a	Quantifiler Humain	Unknown	27,02	5,06
D4	SHD3b	Quantifiler Humain	Unknown	26,84	5,71
E4	SHD3c	Quantifiler Humain	Unknown	26,86	5,63
F4	SHD4a	Quantifiler Humain	Unknown	27,74	3,04
G4	SHD4b	Quantifiler Humain	Unknown	27,72	3,1
H4	SHD4c	Quantifiler Humain	Unknown	27,69	3,15
A5	SHD5a	Quantifiler Humain	Unknown	28,64	1,63
B5	SHD5b	Quantifiler Humain	Unknown	29,05	1,22
C5	SHD5c	Quantifiler Humain	Unknown	28,91	1,35

Summary Statistics; DV: Ct	
Statistic	Value
Multiple R	0,999998
Multiple R ²	0,999996
Adjusted R ²	0,999996
F(1,16)	3803497,3
p	0,000000
Std.Err. of Estimate	0,0031

Regression Summary for Dependent Variable: Ct						
R= ,99999790 R ² = ,99999579 Adjusted R ² = ,99999553						
F(1,16)=3803E3 p<0,0000 Std.Error of estimate: ,00314						
N=18	b*	Std.Err. of b*	b	Std.Err. of b	t(16)	p-value
Intercept			29,337	0,00159	18441,9	0,000000
Log(c)	-0,999998	0,000513	-3,298	0,00169	-1950,3	0,000000

Analysis of Variance; DV: Ct					
Effect	Sums of Squares	df	Mean Squares	F	p-value
Regress.	37,48374	1	37,48374	3803497	0,000000
Residual	0,00016	16	0,00001		
Total	37,48389				

Annexe 16 : Paramètres de validation du profil génétique

1. Paramètres de détection des pics

Analysis Method Editor - HID

General | Allele | **Peak Detector** | Peak Quality | Quality Flags

Peak Detection Algorithm: Advanced

Ranges

Analysis: Full Range (dropdown)
Sizing: All Sizes (dropdown)
Start Pt: 0
Stop Pt: 10000
Start Size: 0
Stop Size: 000

Smoothing and Baseline

Smoothing: None Light Heavy
Baseline Window: 51 pts

Size Calling Method

2nd Order Least Squares
 3rd Order Least Squares
 Cubic Spline Interpolation
 Local Southern Method
 Global Southern Method

Peak Detection

Peak Amplitude Thresholds:
B: 65 R: 65
G: 65 O: 65
Y: 65

Min. Peak Half Width: 2 pts
Polynomial Degree: 3
Peak Window Size: 15 pts

Slope Threshold

Peak Start: 0.0
Peak End: 0.0

Factory Defaults

OK Cancel

2. Filtre des stutters

Panel Manager

File Edit Bins View

Bin Set: Identifier_Plus_Bins_v1

	Marker Name	Dye Color	Min Size	Max Size	Control Alleles	Marker	Marker	Comments	Ladder Alleles
1	D8S1179	blue	118.0	183.5	13	4	0.1	none	8,9,10,11,12,13,14,15,16,17
2	D21S11	blue	184.5	247.5	30	4	0.11	none	24,24.2,25,26,27,28,28.2,29
3	D7S820	blue	251.0	298.5	10,11	4	0.1	none	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
4	CSF1PO	blue	302.12	348.63	10,12	4	0.09	none	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
5	D3S1358	green	98.0	148.0	14,15	4	0.12	none	12,13,14,15,16,17,18,19
6	TH01	green	159.0	205.0	8,9,3	4	0.04	none	4,5,6,7,8,9,9.3,10,11,13.3
7	D13S317	green	205.65	250.16	11	4	0.1	none	8,9,10,11,12,13,14,15
8	D16S539	green	255.3	301.81	11,12	4	0.1	none	5,8,9,10,11,12,13,14,15
9	D2S1338	green	304.8	370.31	19,23	4	0.12	none	15,16,17,18,19,20,21,22,23,
10	D19S433	yellow	101.0	148.0	14,15	4	0.11	none	9,10,11,12,12.2,13,13.2,14,
11	vWA	yellow	151.0	213.5	17,18	4	0.12	none	11,12,13,14,15,16,17,18,19,
12	TPOX	yellow	216.99	260.99	8	4	0.06	none	6,7,8,9,10,11,12,13
13	D18S51	yellow	264.49	350.0	15,19	4	0.14	none	7,9,10,10.2,11,12,13,13.2,14,
14	AMEL	red	105.0	114.0	x	9	0.0	none	X,Y
15	D5S818	red	128.0	180.0	11	4	0.1	none	7,8,9,10,11,12,13,14,15,16
16	FGA	red	206.25	360.0	23,24	4	0.13	none	17,18,19,20,21,22,23,24,25,

OK Cancel Apply

3. Qualité des pics

Analysis Method Editor - HID

General Allele Peak Detector Peak Quality Quality Flags

Signal level

Homozygous min peak height

Heterozygous min peak height

Heterozygote balance

Min peak height ratio

Peak morphology

Max peak width (basepairs)

Pull-up peak

Pull-up ratio

Allele number

Max expected alleles

Factory Defaults

OK Cancel

Annexe 17 : Equipements utilisés durant le stage



Centrifugeuse



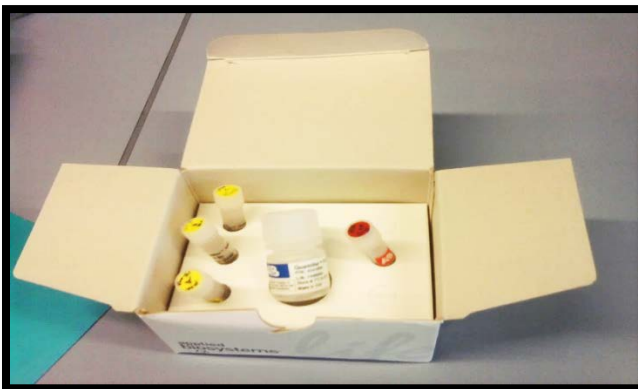
Vortex



Bain-Marie



**ABI Prism 7500 (Applied Biosystems)
Système de PCR en temps réel**



Kit Quantifier Human DNA Quantification