

**LA REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**



**Université Blida 1**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

**Mémoire de fin d'études**  
**En vue de l'obtention d'un Diplôme de Master**  
**Option : Génétique et Physiologie**  
**Filière : Biologie**

**THÈME**

**Validation interne de l'extraction d'ADN par la méthode de billes magnétiques à partir d'un  
prélèvement de référence (Salive)**

Réalisé par

**DJELIDA Soumia et YAZID Maroua Zahra**

Soutenu publiquement **devant le jury composé de :**

Mme AISSANI R.	MAA	Université Blida 1	Présidente
Mme ZERROUTI .	MAA	Université Blida 1	Examinatrice
Mme CHERRALLAH A .	MCA	Université Blida 1	Promotrice
Mr. HEDJAM A .	CDP	Police scientifique	Co-promoteur

**Promotion : 2015 / 2016**

Tables des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Etudes bibliographiques</b> .....	1
<b>I. Validation d'une méthode</b> .....	3
I.1 Validation .....	3
I.2 Norme ISO 17025 .....	3
I.3 Principe .....	3
I.4 Entité juridique .....	3
I.5 Validation interne .....;	4
I.6 Critères de validation .....	4
I.6.1 Fidélité .....	4
I.6.2 Linéarité .....	5
I.6.3 Limite de quantification (LOQ) .....	5
I.6.4 Limite de détection (LOD) .....	6
I.6.5 Sensibilité .....	6
<b>II. Concept génétique de base</b> .....	6
II.1 Indices biologiques .....	6
II.1.1 Preuve biologique dans les Scènes de crime .....	6
<b>III. Identification génétique</b> .....	7
III.1 Marqueurs utilisés pour l'identification génétique .....	8
III.1.1 Polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) .....	8
III.1.2 Polymorphisme de longueur RFLP (restriction fragment length polymorphism).....	9
III.1.3 Polymorphisme de répétition.....	9
<b>IV. Techniques d'analyse d'ADN</b> .....	11
IV.1 Extraction d'ADN.....	11
IV.1.1 Extraction organique phénol-chloroform .....	11
IV.1.2 Extraction inorganique .....	13
IV.2 Quantification de l'ADN .....	16
IV.2.1 La PCR en temps réel.....	16
IV.3 Amplification par PCR .....	17
IV.4 Etablissement de profils génétiques.....	18
<b>Matériels et Méthodes</b> .....	20
<b>I. Matériel</b> .....	20
I.1 Matériel biologique.....	20
I.2 Matériel non biologique.....	21

<b>II. Méthodes</b>	21
II.1 Extraction d'ADN	21
II.2 Quantification d'ADN	23
II.3 Amplification par PCR	25
II.3.1 Pré-amplification	25
II.3.2 Post Amplification (Post-PCR)	26
II.3.3 Analyse des fragments	27
II.3.4 Lecture des résultats de l'amplification des STRs par GeneMapper ID	27
<b>III. Validation de la méthode d'extraction par Smart D-N-Adem-Kit Profiling</b>	28
<b>IV. Etude statistique</b>	29
<b>Résultats et discussion</b>	31
<b>I. Quantification</b>	31
<b>II. Validation interne</b>	37
II.1 Répétabilité et reproductibilité de la méthode d'extraction de l'ADN	37
II.2 Profils génétiques obtenus à partir des ADN extraits « série de répétabilité »	38
II.3 Etape de confirmation de profils génétiques sans quantification d'ADN	38
<b>III. Sensibilité</b>	41
III.1 Profil génétique saturant obtenu à partir d'un échantillon du test de sensibilité	42
III.2 Profil génétique partiel obtenu à partir d'un échantillon du test de sensibilité	42
	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Conclusion</b>	46

# Remerciements

Au terme de ce master, accompli au laboratoire de biologie légale ADN de la police scientifique et technique en collaboration avec l'université Blida 1, nous adressons nos sincères remerciements à :

Avant tout, Louange à DIEU le tout puissant, le miséricordieux, de nous avoir donné le courage, la force, la santé et la persévérance pour pouvoir effectuer ce travail dans de meilleures conditions.

Nous tenons à remercier :

Mr ZEKRI M., sous-directeur de la police scientifique et technique, pour nous avoir accueillies au sein de son équipe avec amabilité et simplicité.

Mme. CHERRALLAH, A., notre promotrice , pour l'honneur qu'elle nous a fait en proposant et en dirigeant ce travail, pour son aide, ses conseils tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Mr HEDJAM, A., co-promoteur, pour sa disponibilité malgré ses obligations professionnelles, ses orientations très utiles et son aide très apprécié dans l'accomplissement de ce travail.

Mme AISSANI, R., professeur, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'être la présidente du jury de soutenance.

Mme ZERROUTI, à la faculté de biologie de l'université de Blida 1, qui a bien voulu participer à ce jury et examiner notre travail.

Mme HACINI, I., pour son aide et sa participation dans le jury.

Mr Brahim ERRAHMANI M , pour son aide lors des analyses statistiques .

Nous remercierions également :

Le personnel du département de biologie légale ADN notamment : Mme DEGHTMOUM, N., lieutenant de police, Mrs BECHAR M et MAMOUNI A., pour leur aide et leurs conseils durant l'élaboration de l'expérimentation de ce travail.

Nos vifs remerciements vont à l'ensemble des membres du département de biologie et physiologie cellulaire de Blida 1.

On ne saurait terminer sans remercier toutes ces personnes qui sont dans l'ombre et dont la contribution à notre travail est non négligeable notamment le personnel de la bibliothèque et de l'administration.

En fin, nous remercions tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à :*

À ma mère et mon père pour leur soutien, leur aide, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance, ma gratitude et tout mon amour.

À mon cher fiancé Tarék pour ses multiples encouragements et sa patience. Qu'il trouve ici toute mon affection.

À mes frères Yacine et Youssef, À ma sœur Maroua.

*Mes oncles, mes tantes : Naziha , Nadjet , Nawel , Soror , Nacira , Sadjida et leurs familles.*

À ma belle mère, mes beaux frères et mes belles sœurs.

À toute la promotion « génétique 2015-2016 »

À Chakib HASSISI pour son soutien et ses encouragements.

*Je le dédie aussi à :*

*Mon très cher binôme, Maroua YAZID, en lui souhaitant bonheur et succès dans sa vie. À sa tante Houria pour son aide et à toute sa famille.*

*Mes amies : Nawel, Ikram, Hadjer, Nour el houda, Soumia, Rédha. Fethia, Farah, Salah, Raouf, Hannan, Sarah, Imène, Aicha, Ibtisssem, Ayoub, Selma, Nesrine.*

*Soumia*

*Je dédie cet humble travail à :*

*À ma mère et mon père pour leur soutien, leur aide, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils m'ont enseigné. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance, ma gratitude et tout mon amour.*

*À ma chère tante Houria pour ses encouragements et sa patience. Qu'elle trouve ici toute mon affection et tout mon amour.*

*À mes frères Fateh et Lotfi pour leur présence dans ma vie.*

*Mes oncles, tantes et leurs familles.*

*À toute la promotion « génétique 2015-2016 »*

*N'oublier pas de dédier à :*

*Ma très chère binôme, Djelida Soumia, avec mes vœux de bonheur et succès dans sa vie. À sa mère Meskia et Chakib Hassisi pour leur soutien et leur aide.*

*Mes amis : Fethia, Farah, Salah, Kenza, Ragan, Youcef, Raouf et Younes.*

*Maroua*

## Résumé

Le laboratoire de la police scientifique et technique vise l'accréditation du département de biologie légale. Pour cela, tous le matériel et kits, notamment la méthode d'extraction d'ADN, doivent être validés selon les recommandations de la norme ISO 17025. Une bonne méthode d'extraction est capable de fournir des quantités suffisantes d'ADN pour l'établissement de profils génétiques et minimiser les inhibiteurs et toutes sortes d'impuretés.

Cette étude avait pour but, de valider en interne la méthode d'extraction d'ADN, utilisant la technologie «billes magnétiques», fournie par le kit Smart D-N-Adem-Kit Profiling. Cette extraction se fait à partir d'un prélèvement de référence «salive» en séparant les molécules d'ADN par des billes magnétiques. Cette technique doit produire une quantité d'ADN qui doit être  $\geq 0.05\text{ng}/\mu\text{l}$  pour pouvoir augmenter de manière significative la qualité des profils génétiques obtenus et par conséquent améliorer l'efficacité des laboratoires de médecine légale.

Nous avons vérifié la performance et la fiabilité du kit Smart D-N-Adem à travers l'étude de trois critères importants de validation interne à savoir : la répétabilité, la reproductibilité et la sensibilité. En effet, les résultats des tests de répétabilité et de reproductibilité de la méthode d'extraction d'ADN, à partir des échantillons de salive quantifiés, était satisfaisants, avec des fluctuations raisonnables. Par ailleurs, un test de sensibilité effectué en diluant de la salive jusqu'au  $1/32^{\text{ème}}$  a donné une quantité d'ADN suffisante et requise pour produire un profil génétique complet et interprétable.

Afin de vérifier que le kit Smart D-N-Adem par la méthode des billes magnétiques est bien conçu pour permettre le passage à l'étape d'amplification sans quantification préalable , nous avons directement amplifié les échantillons de salive extraits par PCR. Les résultats de cette étape restent comparables à ceux donnés par le fabricant.

Cette validation interne du kit Smart D-N-Adem a permis de donner un meilleur rendement et une plus grande rapidité avec une bonne qualité.

**Mots clés :** profil génétique, extraction d'ADN, validation interne, kit Smart D-N-Adem-Kit Profiling, salive



## ملخص

مخبر الشرطة العلمية والتقنية يسعى إلى اعتماد قسم الأحياء الجنائية، لهذا فإن كل الأجهزة ومستلزمات العمل يجب التحقق من صحتها وفقا لتوصيات معيار ISO 17025 .

الهدف من هذا العمل هو التحقق من صحة طريقة استخراج الحمض النووي باستخدام Smart D-N-Adem-Kit Profiling، المستخلص من اللعاب هذه الطريقة تسمح بفصل الجزيئات بفضل حبيبات مغناطيسية والتي ينبغي أن تعطي كمية من الحمض النووي  $\leq 0.05 \text{ ng/ul}$  التي تزيد في نوعية الهوية الوراثية المحصل عليها وبالتالي زيادة كفاءة مختبرات الطب الشرعي. و من خصائص هذه الطريقة أيضا هي الذهاب مباشرة بالـ DNA إلى التضخيم "PCR" من دون خطوة تكيم (RT-PCR).

من خلال هذا العمل سوف نتحقق من النوعية والاعتمادية بدراسة عدة معايير مختلفة ، التكرار، إعادة التكرار و الحساسية . إذ أن نتائج اختبار التكرار و إعادة التكرار لطريقة استخراج الحمض النووي من عينات اللعاب كانت معتبرة , و من جهة أخرى أعطى اختبار الحساسية لهذه الطريقة كمية كافية من DNA للحصول على مواصفات جينية كاملة و واضحة بعد عملية التمديد إلى 1/32 .

و بهدف التأكد من إحدى خاصيات , Smart D-N-Adem-Kit Profiling قمنا بتضخيم الحمض النووي (PCR) مباشرة مما أكد لنا أن النتائج تتوافق و ما أعطاه المنتج .

أفضل طريقة لاستخلاص الـ DNA لها خاصية توفير كميات كافية من الحمض النووي لتحديد الهوية الجينية وتقليل الشوائب.

إذن قد سمحت لنا الإعتماضية الداخلية لـ Smart D-N-Adem-Kit Profiling بإعطاء أحسن النتائج في خضم و كم أوجز و بنوعية و كم جيد .

**كلمات البحث :** مواصفات جينية , إستخلاص الحمض النووي, الإعتماضية الداخلية, , طقم Adem-tech اللعاب .

## Abstract

The scientific and technical police laboratory aims for accreditation process of the forensic biology department. So, all materials and kits must be validated according to the recommendations of the standard ISO 17025; especially the extraction method of DNA. A good extraction method has to provide a significant amount of DNA for genetic profiling and minimize the inhibitors and all kinds of impurities.

The objective of this work is to validate DNA extraction method, from saliva, by using Smart DN-Adem-Profiling Kit. The extraction is based on separating the DNA molecules by magnetic beads. This method must deliver a quantity of DNA which should be  $\geq 0.05\text{ng} / \text{ul}$  to increase the quality of genetic profiles and therefore the efficiency of forensic laboratories. We should mention that the kit is designed to pass directly to the amplification "PCR" without passing by the quantization step (RT-PCR).

We have verified the performances and the reliability of the kit Smart DN-Adem-Profiling Kit, through the validation of three broad criteria (repeatability, reproducibility, sensibility). Indeed, the results of the repeatability and reproducibility tests of the DNA extraction method taken from quantified saliva samples were satisfactory with reasonable fluctuations.

Another test called sensitivity test performed by diluting saliva till  $1/32^{\text{nd}}$ , produce a sufficient quantity of DNA requirements to produce a complete and interpretable genetic profile.

In order to verify one of these features of Smart DN-Adem-Profiling Kit , we have directly amplified the saliva samples extract by PCR. The results of this step are similar to those given by the manufacturer.

This internal validation of Smart DN-Adem-Profiling Kit allowed to give a best performance, also a fast and good quality.

**Keywords:** genetic profil, DNA , extraction, internal validation, , Smart-N-D-Adem Profiling Kit, saliva.

- CCD** : Charge Coupled Device
- Ct** : Threshold Cycle (cycle seuil)
- CV** : Coefficient de variation
- dNTP** : Désoxynucléotides Triphosphate
- ENFSI** : European Network of Forensic Science Institutes
- G** : Guanine
- Indet** : Indetectable
- IPC** : International Positive control
- ISO** : International Standardization Organization
- kb** : Kilobase
- mg** : Milligramme
- ml** : Millilitre
- ng** : Nano-gramme
- N** : Nombre d'échantillons
- PB** : Paires de base
- PCR** : Polymerase Chain Reaction
- PK** : Protéinase K
- RFLP** : Restriction Fragments Length Polymorphism

**Rpm** : Rotation par minute

**RT-PCR:** Real-Time Polymerase Chain Reaction

**S** : Écart-type

**SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate

**SNP** : Single Nucleotide Polymorphism

**STD** : Standard

**STR** : Short Tandem Repeat

**SWGAM:** Scientific Working Group on DNA Analysis Methods

**T** : Thymine

**VNTR** : Variable Number Tandem Repeat

---

<b>Figure 1:</b> Extraction organique d'ADN .....	11
<b>Figure 2:</b> : Mode d'actions des billes magnétiques.....	13
<b>Figure 3:</b> Principe schématisé de la technologie TaqMan® dans le kit Quantifiler™ Humann DNA Quantification .....	16
<b>Figure 4 :</b> Présentation du résultat d'analyse (Profil génétique déterminé à partir d'un échantillon biologique) avec le Kit Identifiler (Laboratoire Central de Police Scientifique et Technique de la Sûreté Nationale, 2009).....	18
<b>Figure 5 :</b> Repartitions des échantillons utilisé lors de la validation .....	19
<b>Figure 6:</b> Les phases de la RT-PCR.....	23
<b>Figure 7:</b> Courbe standard donnant le cycle de seuil (Ct), en fonction du logarithme décimal de la quantité matrice initiale ( $y=-3,271861 +27,827765$ ) .....	31
<b>Figure 8:</b> Courbe standard donnant le cycle seuil .....	34
<b>Figure 9 :</b> Courbe standard donnant le cycle seuil (Ct) en fonction du logarithme décime de la quantité matrice initiale $Y=3,348718x+28,599888$ .....	34
<b>Figure 10:</b> Courbe standard donnant le cycle seuil (Ct) en fonction du logarithme de la quantité matrice initiale $Y=-3,106688x+27,821724$ . .....	34
<b>Figure 11:</b> Courbe standard donnant le cycle seuil (Ct) en fonction du logharithme de la quantité matrice initiale $Y=3,0968x+27,658047$ .....	34
<b>Figure 12:</b> Profil génétique complet, obtenu à partir de la dilution 1 de la répétabilité de la salive (concentration d'ADN 1,6), établi grâce au kit AmpFISTR Identifiler PLUS.....	38
<b>Figure 13:</b> Profil génétique complet, obtenu à partir d'un échantillon de salive non quantifié, établi grâce au kit AmpFISTR Identifiler PLUS.....	39
<b>Figure 14:</b> Concentrations moyennes extraites d'ADN de salive pure (1) diluée jusqu'à l'ordre 5 (1/32). .....	41
<b>Figure 15:</b> Profil génétique saturant, obtenu à partir de la salive pur (concentration d'ADN 1,9), établi grâce au kit AmpFISTR Identifiler PLUS. ....	42
<b>Figure 16:</b> Profil génétique partiel, obtenu à partir d'un échantillon de salive (concentration d'ADN 0,02 ng ng/μl), établi grâce au kit AmpFISTR Identifiler PLUS.....	43

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau I :</b> Avantages et inconvénients de l'extraction organique d'ADN.....	13
<b>Tableau II :</b> Séries d'extraction de salive.....	20
<b>Tableau III:</b> Réactifs nécessaires pour n échantillon.....	21
<b>Tableau IV:</b> Préparation de la gamme standard.....	24
<b>Tableau V:</b> Programme utilisé pour la réalisation de la PCR.....	26
<b>Tableau VI:</b> Les 16 loci du AmpFI STR Identifier .....	27
<b>Tableau VII:</b> sensibilité pour les dilutions successives.....	29
<b>Tableau VIII :</b> Récapitulatif des courbes standards.....	32
Tableau VIII: Récapitulatif des quantités d'ADN extraites à partir des échantillons de salive et les cycles seuils (Ct)correspondants .....	35
<b>Tableau X :</b> Résultats de l'extraction d'ADN de la salive (ng.µl <sup>-1</sup> ) à partir de séries de 5 répétition chacune.....	36
<b>Tableau XI:</b> Dilutions successives : de salive pure (1) à la 5 éme dilution (1/32). .....	40



La découverte du polymorphisme de l'ADN a permis d'établir des empreintes génétiques. Bien que les humains soient génétiquement proche les uns des autres, la présence d'un grand polymorphisme dans l'information génétique crée une biodiversité rendant chaque être humain unique. Ce polymorphisme est la base des moyens d'identification par les empreintes génétiques constituées par plusieurs marqueurs génétiques. Par ailleurs, les domaines d'application des empreintes génétiques sont très variés notamment : la criminalistique, la recherche de parenté, l'identification des victimes de catastrophe, l'hérédité, etc. Plus encore, l'analyse d'ADN, nommée aussi l'empreinte génétique, constitue un outil primordial pour le système policier et judiciaires afin de remplir sa mission faisant souvent appel aux sciences forensiques.

L'analyse ADN, un outil puissant pour identifier les personnes, commence toujours par une phase d'extraction à partir d'un petit échantillon de substances biologiques (sang, sperme, salive, cheveux, cellule épidermique, etc.). Plusieurs méthodes d'extraction d'ADN sont utilisées dans les kits d'extraction se trouvant sur le marché notamment : la méthode organique et la méthode par séparation magnétique (**Dhaliwal, 2013**). Ces deux techniques suivent deux protocoles différents. Toutefois, la méthode conventionnel utilise des solvants organiques dangereux, prend du temps pour accomplir l'extraction et ces résidus de phénol peuvent être présents dans l'ADN extrait faussant en particulier la PCR. Ce qui est à l'opposé de la technique d'extraction d'ADN par séparation magnétique (rapide, sans passer par la quantification, adaptable à l'automatisation, etc).

Ce processus d'analyse ADN, délicat, rigoureux, dépendants de divers facteurs (outils, environnement de test, polluants, etc.) et décrit à travers ces différentes phases (extraction, purification, amplification, etc.), promet un meilleur rendement et une plus grande rapidité dans le kit **Smart D-N-Adem**.

L'objectif de notre travail, réalisé au niveau du laboratoire de la police scientifique, est de vérifier l'efficacité de l'extraction d'ADN par les billes magnétiques en utilisant un kit d'extraction **Smart D-N-Adem** sur des prélèvements de référence (salive) et la validation de ce kit. De plus, nous avons évalué la capacité de ce kit à produire une bonne qualité d'ADN humain.



### I. Validation d'une méthode

#### I.1 Validation

Toute mesure, obtenue expérimentalement, comporte une incertitude confirmant (ou non) la validité de la méthode testée. Ainsi, la validation permet d'analyser et de caractériser les méthodes d'essai par rapport aux limites de performances assurant la validité. En tenant compte des incertitudes, la validation démontre avec traçabilité qu'une méthode d'essai est appropriée pour remplir les conditions d'une tâche fixée. Elle est souvent ramenée à une estimation des performances effectives de la méthode.

Ce chapitre décrit la démarche à suivre pour la validation et l'évaluation de l'incertitude de mesure des méthodes d'extraction d'ADN. Selon la norme ISO/IEC 17025, la validation est la «confirmation par examen et apport de preuves tangibles que les exigences particulières, pour un usage spécifique prévu, sont satisfaites» (**Baumgartner et al., 2013**).

#### I.2 Norme ISO 17025

La norme ISO 17025 décrit «les exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais». Elle est applicable à toutes les organisations qui procèdent à des essais et/ou des étalonnages dans le but notamment de faire du contrôle de qualité et de la certification de produits. Elle peut, également, être utilisée par les clients des laboratoires, les autorités réglementaires et les organismes d'accréditation engagés dans des activités de confirmation ou de reconnaissance de la compétence des laboratoires (**Huber, 2009**). Par ailleurs, un laboratoire doit pouvoir présenter la preuve de son existence juridique et une police d'assurance lui permettant de couvrir les risques auxquels il expose l'utilisateur direct ou indirect de ses résultats d'essais ou d'étalonnages (**quid de la norme ISO 17025**).

#### I.3 Principe

La validation s'inscrit dans une vérification des performances annoncées par le fabricant ou souhaitées par le laboratoire. Ceci apporte confirmation et preuve de la validité des résultats rendus par rapport à ses propres besoins et une maîtrise du processus analytique (**Grusan et al ; 2005**).

#### I.4 Entité juridique

Le laboratoire doit pouvoir présenter la preuve de son existence juridique et une police d'assurance lui permettant de couvrir les risques auxquels il expose l'utilisateur direct ou

indirect de ses résultats d'essais ou d'étalonnages. En général, un laboratoire public est couvert par l'État lui-même (l'État étant son propre assureur) (**quid de la norme iso 17025**).

### **I.5 Validation interne**

La première rencontre historique (1988), organisée en collaboration avec le laboratoire du FBI, s'intéressant à la validation de la technologie DNA forensique, a donné naissance au regroupement international SWGDAM (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods). Ce groupe d'experts scientifiques en analyse DNA a pour mission de servir de forum pour discuter, partager et évaluer les méthodes de biologie forensique, les protocoles, la formation et la recherche. Ceci est dans le but d'améliorer les services de biologie médico-légale ainsi que de fournir notamment des recommandations au directeur du FBI sur la qualité norme d'assurance pour l'analyse génétique (**SWGDAM**).

Dans ce sens, la validation d'une méthode non normalisée passe par la constitution d'un dossier de validation apportant la preuve que les performances obtenues sont en adéquation avec les besoins formulés et les prescriptions particulières en lien avec son utilisation. La plupart du temps, cette approche s'effectue dans le cadre d'une démarche qualité. Usuellement, il s'agit de quantifier par caractérisation intra-laboratoire et suivant les procédures établies (**Amarouch, 2010**).

### **I.6 Critères de validation**

Avant d'effectuer l'opération de validation, il est important de choisir les critères de performance et limites d'acceptabilité (spécifications, seuils) d'une méthode d'essai (**Grusan et al ; 2005**).

Selon la ICH (Conférence Internationale d'Harmonisation) Q2(R1) 2005, la validation d'une méthode analytique consiste à vérifier des critères tels que : la répétabilité, la précision intermédiaire, l'étude de rendement, la linéarité, la limite de quantification (LOQ) et la limite de détection (LOD).

#### **I.6.1 Fidélité**

Elle est définie par l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures, provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène, dans des conditions prescrites. Elle fournit une indication sur les erreurs dues au hasard : variance, écart-type et coefficient de variation. Elle est exprimée et validée à travers les critères répétabilité, précision intermédiaire et reproductibilité.

### **I.6.1.1 Répétabilité**

La répétabilité exprime la fidélité évaluée dans des conditions opératoires identiques (même opérateur, même équipement, même laboratoire, ...), à partir d'un même échantillon et dans un court intervalle de temps. (ENFSI) (Blanchin, 2010).

Il est recommandé d'utiliser au moins deux niveaux de concentration. Les niveaux sont choisis en fonction des valeurs physiopathologiques et/ou de la réglementation (Grusan *et al.*, 2005).

### **I.6.1.2 Précision intermédiaire : variation intra-laboratoires**

La précision intermédiaire exprime les variations survenant dans un même laboratoire. Les essais sont accomplis dans des conditions différentes. Ainsi, les analyses sont réalisées à différents jours, par des personnes différentes, avec des équipements différents, etc.

### **I.6.1.3 Reproductibilité : variation inter-laboratoires**

La reproductibilité exprime la variabilité inter-laboratoires (études collaboratives) habituellement appliquée à la standardisation de la méthodologie. Les expérimentations sont faites à partir d'un même échantillon. Une méthode est reproductible si elle est applicable dans des conditions différentes (milieux différents, opérateurs différents, équipements physiquement différents) et produit des résultats similaires (résultats compris dans la marge d'incertitude attribuée à la méthode).

### **I.6.2 Linéarité**

La linéarité d'une méthode est exprimée par sa capacité, à l'intérieur d'un intervalle donné, d'obtenir des résultats de mesures directement proportionnels à la concentration (ou quantité) dans l'échantillon analysé (Blanchin, 2010).

### **I.6.3 Limite de quantification (LOQ)**

Cette limite est définie comme la quantité minimale, dans un échantillon analysé, qui peut être déterminée quantitativement avec une fidélité et une exactitude appropriée. L'exactitude spécifie la concordance entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée (erreur minimale) (Blanchin, 2010).

### **I.6.4 Limite de détection (LOD)**

La limite de détection d'une méthode d'analyse correspond à la plus petite quantité d'une substance à analyser, dans un échantillon, pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte.

### **I.6.5 Sensibilité**

La sensibilité à une concentration donnée correspond au rapport de la variable de la grandeur mesurée à la valeur correspondante de la concentration de l'élément à doser.

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

## **II. Concept génétique de base**

Le corps humain est composé d'un nombre important de cellules renfermant la même information génétique. En effet, le noyau d'une cellule contient des chromosomes dont le constituant de base est l'acide désoxyribonucléique «ADN» qui est l'outil de base de l'établissement de profils génétiques (identifiant unique d'une personne). L'analyse de ces profils est devenue un élément clé dans le domaine de la criminalistique qui les utilisent comme preuve judiciaire scientifique.

### **II.1 Indices biologiques**

#### **II.1.1 Preuve biologique dans les Scènes de crime**

En criminalistique, l'analyse des traces biologiques est basée sur les différentes propriétés de l'ADN. Des échantillons d'origine connue sont appelés «échantillons de référence». Il existe plusieurs types d'échantillons de référence d'ADN, utilisés pour identifier les restes humains sur une scène de crime, tels que : les références directes, les objets personnels et les échantillons de parenté. Pour qu'un laboratoire puisse donner des résultats significatifs, chaque type de référence doit être correctement collecté et identifié (**Sozer, 2014**).

Une variété de preuves biologiques, recueillies sur une scène de crime, peuvent être utilisées pour inculper ou disculper un suspect avec une très grande fiabilité. L'ADN est extrait des cellules humaines, existantes sur les lieux du crime, pouvant provenir de tâches de sang, du sperme, de la salive, de l'urine, des sécrétions vaginales, des cheveux, des ongles, etc.

Sans entrer dans le détail des prélèvements effectués, voici les principales traces analysées, leur méthode de détection et leur potentiel en criminalistique.

### Traces de salives

Des tests présomptifs pour la salive font usage de l'enzyme  $\alpha$ -amylase (présente à des concentrations élevées) et des digestions d'amidon et de sucres complexes. La digestion de l'amidon peut être mesurée par la libération de colorants qui ont été liés de façon covalente à des molécules d'amidon insoluble. Cette libération provoque un changement de couleur qui peut être facilement détectée. Par ailleurs, les amylases sont présentes dans d'autres fluides corporels tels que la sueur, les sécrétions vaginales, le lait maternel et les sécrétions pancréatiques. Cependant, l'amylase est présente dans la salive à des concentrations élevées (50 fois plus que dans les autres fluides corporels) (**Goodwin *et al.*, 2007**).

Notons que le test le plus utilisé est le test Phadebas capable de détecter la présence de salive quel que soit le type de support.

Les traces de salive (cellules provenant des lèvres et de la muqueuse buccale) se trouvent sur des supports aussi différents qu' : une morsure, un mégot de cigarette, une enveloppe, un timbre, un chewing-gum, une brosse à dents, etc. (**Brandt-Casadevall et Mangin, 1998**). L'avantage de la salive est aussi sa facilité de transfert, au moment où un individu parle, sur les objets placés proche de la bouche (téléphone, vêtements, micro...) (**Coquoz et Taroni, 2006**). De plus, elle est susceptible de se trouver dans une plus grande variété d'échantillons que le sang ou le sperme. Par ailleurs, la salive est le support le plus couramment utilisé par les services de police scientifique pour établir le profil ADN d'un suspect. Toutefois, les traces de salive contiennent usuellement très peu de matériel biologique. Depuis l'arrivée des analyses d'ADN utilisant la PCR, les traces de salive font partie des traces biologiques modernes exploitées à large échelle. Les prélèvements à grande échelle (ex : bases de données de profils d'ADN) sont en principe des prélèvements des muqueuses buccales permettant de conserver les échantillons à température ambiante pour de nombreuses années (**Coquoz *et al.*, 2013**).

### III. Identification génétique

La comparaison de l'ADN de deux personnes, prises au hasard, donne en moyenne une différence tous les 1200 nucléotides (**Sachidanandam *et al.*, 2001**). Ces régions variables d'ADN offrent la possibilité d'utiliser l'information de l'ADN à des fins d'identification génétique.

En 1985, l'analyse d'ADN, dont le résultat est l'empreinte génétique, est introduite en criminalistique grâce à la découverte de séquences répétitives hautement polymorphes (**Blandin, 2004**). Cette empreinte génétique, permettant l'identification d'un individu de

manière spécifique, est plus précisément l'image de la répartition des zones non codantes de l'ADN (minisatellites) constituant l'hérédité d'un humain. Cette image est identique pour l'ADN extrait du noyau de n'importe quelle cellule d'un individu et elle est caractéristique de celui-ci (**Hottois et Missa, 2001**).

Des méthodes ont été développées pour localiser et caractériser ces variations génétiques au niveau de sites spécifiques dans le génome humain.

### **III.1 Marqueurs utilisés pour l'identification génétique**

L'identification des agresseurs ou victimes en criminalistique est devenue, à force d'utilisation et d'évolution technologique, une pratique courante apportant un complément de preuves, aux investigations policières, pouvant être d'une importance vitale.

Un marqueur génétique est un outil très important en criminalistique (médecine , test de parenté , cartographie ) devant répondre à un certain nombre de critères : transmissible, présenter un faible taux de mutations et être polymorphe et phénotypiquement neutre (**Petkovski, 2006**).

#### **III.1.1 Polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP)**

Le type le plus simple de polymorphisme est le SNP. Chez l'homme, on pense qu'il y a environ 3 millions de SNP distribués de façon plus ou moins aléatoire toutes les 300 à 1 000 bases. Il représente la forme la plus abondante de variations génétiques. En général, il n'existe que deux allèles à chaque locus (SNP bi alléliques) (**Griffiths et al., 2010**).

Par ailleurs, ce type de polymorphisme de l'ADN présente une altération de la séquence qui ne touche qu'un seul nucléotide. Cette altération, correspondant à une substitution d'un nucléotide, a une position spécifique dans le génome ce qui crée les allèles différentes. Ainsi, le SNP est classé comme polymorphisme de structure (**Loistron, 2009**).

De nombreuses méthodes existent pour mettre en évidence des différences d'un nucléotide. Une des plus performantes actuellement est l'usage des puces à ADN (**Loistron, 2009**)

#### **III.1.2 Polymorphisme de longueur RFLP (restriction fragment length polymorphism)**

Le polymorphisme de longueur de fragments de restriction est le premier type de marqueurs moléculaires utilisé dans les études de liaison génétique.

Les RFLP apparaissent à la suite de mutations, qui créent ou détruisent les sites reconnus par des enzymes de restriction spécifiques, conduisant à des variations, entre les individus, de la longueur de fragment de restriction produits à partir de régions identiques de génome.

On peut détecter les différences de taille entre les fragments de restriction, appartenant à des individus distincts, en réalisant un transfert de type southern. Ce transfert est effectué par une sonde marquée spécifique d'une région d'ADN dans laquelle on connaît l'existence d'un RFLP (**Lodish *et al.*, 2005**).

### III.1.3 Polymorphisme de répétition

Le génome humain contient plusieurs séquences répétitives qui représentent environ 50% du génome entier (**Lander *et al.*, 2001**). Ces séquences comportent des copies parfaites ou légèrement imparfaites de motifs d'ADN de longueurs variables.

La variation entre les différents allèles est provoquée par une différence dans le nombre d'unités répétitives. Ceci se traduit par des allèles qui ont des longueurs différentes. Pour cette raison, les polymorphismes de répétition en tandem sont connus comme des polymorphismes de longueur (**Goodwin *et al.*, 2007**).

Deux catégories importantes de répétition en tandem ont été largement utilisées à des fins d'identification génétique : VNTRs et STRs.

#### III.1.3.1 Minisatellites variable number tandem repeats VNTRs

Jeffrys *et al.* (1985) ont découvert au niveau du génome un type de marqueurs moléculaires polymorphes nommés «minisatellites hypervariables». Ces derniers sont constitués de répétitions en chaîne d'un motif, formé de 17 à 70 nucléotides, appelé VNTR (**Ould-Ahmed, 2009**).

Ce motif est répété de 2 à 100 fois à chaque locus ce qui aboutit à des fragments de 500 pb à 20 kpb. Le nombre de répétitions est variable d'un individu à un autre. Ces variations de taille sont à la base de la technique de médecine légale appelée «empreinte génétique» (**Loistron, 2009**).

Les VNTRs, se trouvant toujours dans l'euchromatine, sont en grand nombre situés dans les régions proches des télomères. Ils peuvent aussi être présents dans d'autres sites chromosomiques (**Farce, 2000**).

Les minisatellites sont assez instables. Le nombre d'exemplaire d'une séquence donnée augmente, ou diminue, souvent d'une génération à une autre à la suite de croisements (crossing over) inégaux. (**KARP, 2010**)

### III.1.3.2 Microsatellites short tandem repeats STRs ou SSR

Des études (**Ames et al., 2008**) ont démontré que de courtes répétitions en tandem (STR) qui sont distribuées principalement dans les régions terminales des chromosomes humains. Les séquences les plus courtes, de 2 à 6 bases, sont présentes par dizaines de milliers dans tout le génome (**Ould Ahmed, 2009**) et répétées, de 2 à 50 fois, à chaque locus. Ce qui aboutit à des allèles variant en taille entre 50 et 500 pb (**Petkovski, 2006**).

Les STR sont uniformément dispersés dans toute la partie euchromatine des génomes (**Farce, 2000**) avec la présence d'un locus toutes les 6 à 10 kpb.

Le plus souvent, dans le génome humain, la séquence de base du microsatellite est un dinucléotide ce qui est moins adapté pour la réalisation de PCR

En effet lors de la réplication in vivo, il peut se produire un glissement qui provoque l'apparition de «stutters» ou pics de bégaiement de la polymérase. Ces derniers sont le plus souvent des allèles réduits d'une à deux répétitions par rapport à l'allèle réel. (**Loistron, 2009**).

Les STR Tétranucléotides sont préférés en raison de leur faible pourcentage de bégaiement (15%) par rapport aux di- et trinucleotides (30%) (**Van Hoppe et al., 2016**)



### IV. Techniques d'analyse d'ADN

#### IV.1 Extraction d'ADN

Un échantillon biologique, obtenu à partir d'une scène de crime, provenant d'un individu, contient un certain nombre de substances en dehors de l'ADN impactant son extraction. Ainsi, les protéines cellulaires, qui assurent la protection de l'ADN dans la cellule, peuvent inhiber la capacité d'analyser l'ADN. Par conséquent, les procédés d'extraction ont été mis au point pour séparer les protéines et les autres constituants cellulaires des molécules d'ADN (**Butler, 2011**).

Les trois principales étapes de l'extraction d'ADN sont: (i) la rupture des membranes cellulaires entraînant la lyse cellulaire, (ii) la dénaturation des protéines et enfin (iii) la séparation de l'ADN des protéines dénaturées et d'autres composants cellulaires (**Goodwin et al., 2007**).

Plusieurs techniques sont utilisées aujourd'hui dans le domaine de la criminalistique pour l'extraction d'ADN, à savoir : extraction organique «phénol-chloroform» et extraction inorganique.

##### IV.1.1 Extraction organique phénol-chloroform

Les méthodes d'extraction d'ADN reposent généralement sur des mécanismes chimiques et/ou mécaniques permettant la décomposition des parois cellulaires et l'extraction du contenu de la cellule pour obtenir l'ADN. Ceci est plus facile dans le cas de traitement des échantillons contenant une abondance de cellules contrairement au traitement des échantillons tirés d'une scène de crime. Dans ce dernier cas, nous avons un petit nombre de cellules et la possibilité d'une exposition à la pourriture faisant que l'ADN est non conforme. Dans la plus part des cas, une méthode générale, appelée extraction organique, est souvent utilisée. Cette méthode d'extraction est plus susceptible de conserver l'ADN en gros morceaux et de purifier l'ADN de manière plus approfondie que les autres méthodes d'extractions (**Rudin et Inman, 2001**).

La méthode phénol-chloroform est une méthode d'extraction bien établie en criminalistique bien qu'elle soit laborieuse par rapport à d'autres approches (**Carracedo, 2005**). Elle est l'une des méthodes traditionnelles qui utilise des réactifs toxiques, tels que le phénol, pour isoler l'ADN ce que nécessite des précautions de sécurité particulières dans le laboratoire. Les étapes de cette méthode peuvent être résumé comme suit (**Figure 1**) :

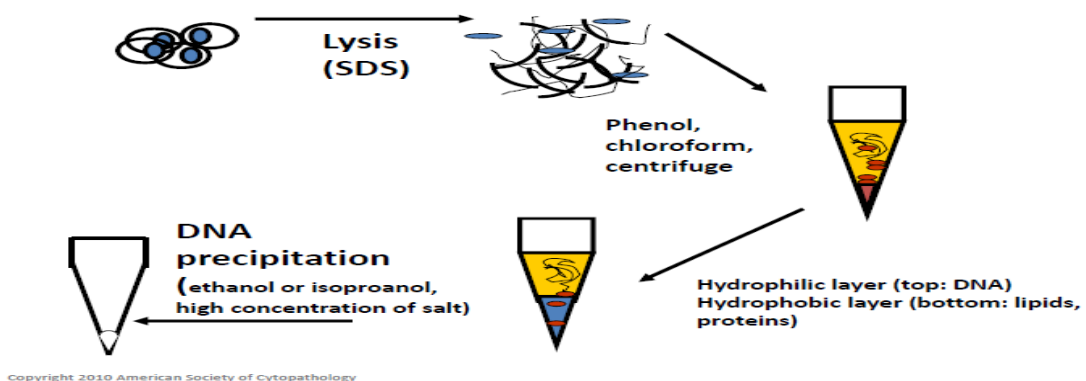
- les cellules sont lysées et les débris cellulaires éliminés par centrifugation,
- les protéines sont dégradées à l'aide d'une protéase.

Dans la méthode d'extraction organique, après dénaturation, les protéines sont éliminées à l'aide de phénol ou d'un mélange de phénol-chloroforme. Les solvants organiques précipitent les protéines laissant les poly nucléotides (ADN et ARN) en solution et le précipité de protéines est ensuite séparé par centrifugation. L'ADN purifié est généralement récupéré par précipitation à l'aide d'éthanol ou d'isopropanol. En présence de cations monovalents à une température inférieure à 20°C, l'éthanol absolu précipite l'ADN efficacement (**Ahmed Mohamed Rafaat, 2014**).

Dans le tableau suivant, nous présentons les avantages et inconvénients de la méthode d'extraction organique (Encyclopédie).

**Tableau I :** Avantages et inconvénients de l'extraction organique d'ADN.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Meilleure méthode pour extraire l'ADN à partir des échantillons criminels contenant une petite quantité d'ADN et/ou des molécules d'ADN non intact à cause de pourriture ou d'incendie.</li> <li>❖ peu coûteuse, très efficace.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Dangereuse et nocif pour la santé du manipulateur en raison de l'utilisation de produits chimiques toxiques (phénol, chloroforme).</li> <li>❖ Complexe, nécessitant plusieurs étapes.</li> <li>❖ Méthode lente, travail intensif, nécessite de travailler sous hotte.</li> <li>❖ Ne peut être utilisée que si la quantité de matériel de départ est relativement abondante.</li> <li>❖ chloroforme peuvent être présents dans l'ADN extrait et peuvent inhiber certaines applications en aval telles que la PCR.</li> </ul>



**Figure 1:** Extraction organique d'ADN

### **IV.1.2 Extraction inorganique**

Les techniques inorganiques réduisent l'exposition aux réactifs dangereux tout en produisant de l'acide nucléique purifié de qualité comparable. De nombreux kits commerciaux utilisent des procédés de purification inorganiques dont le relargage aux sels «salting out», extraction à base de silice, méthode d'échange d'anion et extraction par les billes magnétiques (Coleman et Tsongalis, 2007).

Les avantages de ces méthodes sont notamment la rapidité et la facilité d'application, l'utilisation de produits non toxiques avec l'obtention de bons rendements d'extraction (ADN de haut qualité).

#### **IV.1.2.1 Extraction par les billes magnétiques**

C'est une méthode d'extraction qui repose sur l'utilisation de microbilles paramagnétiques avec une capacité de liaison à l'ADN.

Le présent procédé présente également l'avantage d'être rapide, permettant ainsi d'isoler l'ADN rapidement avec un faible coût, une simplicité de réalisation avec l'obtention de rendements élevés.

L'emploi de billes magnétiques dans les techniques d'extraction a considérablement réduit la présence d'inhibiteurs de PCR. Il est à noter qu'en 2010, 55 % de 15 492 analyses présentaient des inhibiteurs de PCR. Or, en 2011, aucun extrait sur 16 899 analyses ne présentait d'inhibiteur (Doutremepuich, 2012).

#### **IV.1.2.2 Composition et principe de liaison des billes magnétiques**

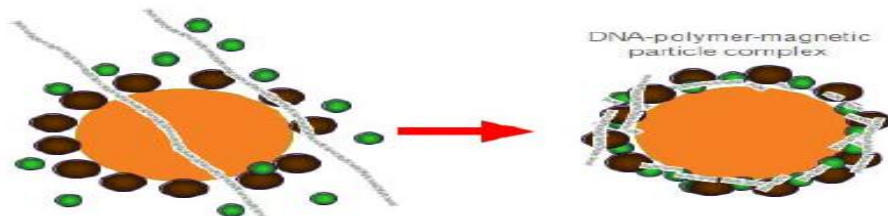
Un kit, basé sur cette nouvelle technologie, comprenant des particules magnétiques et un tampon de liaison contenant un sel et le polyalkylèneglycol approprié. Ce kit peut comprendre, en outre, un tampon de lavage approprié, un tampon d'élution, et les réactifs pour la préparation (ex : tampons ou réactifs pour préparer un lysat).

Les particules magnétiques, utilisées pour la purification de l'ADN, peuvent être fabriquées à partir de polymères synthétiques, du verre poreux ou des matériaux métalliques tel que : oxyde de fer. Ces particules sont soit revêtues avec des groupes fonctionnels ou laissées sans revêtement. Les particules revêtues, liées à l'acide carboxylique, sont les plus efficaces pour la liaison de l'ADN. D'autres molécules, telle que la streptavidine ou contenant des

groupes thiol libres, peuvent également être fixées à la couche de silane (**Magnetic DNA Purification: History and recent developments, 2015**). Par contre, le développement des particules magnétiques à haut rendement, qui ne nécessitent pas un revêtement, sont préférées, à cause de l'absence des groupes fonctionnels et d'un revêtement, permettant une plus grande surface pour la liaison de l'acide nucléique. En outre, les particules sans revêtement sont plus sensibles à un champ électrique appliqué. Enfin, avec un bon réglage, les particules magnétiques "nues" pourraient augmenter le rendement (**Saiyed, 2006**), (**Hawkins et Somerville, 1998**).

La charge positive de l'oxyde de fer permet la captation de l'ADN chargé négativement. (**Figure 2**).

Ce qui suit explique le principe d'extraction d'ADN en utilisant le Kit Ademtech swab.



**Figure 2** : Mode d'actions des billes magnétiques

### IV.1.2.3 Smart D-N-Adem-Kit Profiling

Ademtech a développé le Smart D-N-Adem-Kit for Profiling, qui délivre une quantité fixe d'ADN pur. Ceci est pour augmenter considérablement la qualité des profils génétiques obtenus et par conséquent améliorer l'efficacité des laboratoires de médecine légale.

### IV.1.2.4 Description du Smart D-N-Adem-Kit for Profiling

Ce kit contient un ensemble de réactifs : particules magnétiques et tampons nécessaires pour assurer la capture de l'ADN et sa normalisation.

Les particules magnétiques Smart-Adembeads présentent une surface de capture innovante pour la capture de l'ADN compatible avec une amplification directe sans étape déliution. La procédure de ce kit permet d'obtenir un ADN d'excellente qualité car elle n'utilise pas de solvants comme le phénol, l'éthanol ou le chloroforme ni d'agents chaotropiques qui peuvent inhiber la PCR.

### IV.1.2.5 Description des particules magnétiques

Les particules magnétiques Smart-Adembeads sont calibrées en taille 30 nm et offrent une surface spécifique élevée pour garantir une reproductibilité optimale dans la capture. Ces caractéristiques techniques uniques permettent aux particules magnétiques de capturer une quantité fixe d'ADN.

Les particules magnétiques sont composées d'un cœur magnétique entouré par une enveloppe de polymère. Le taux important d'oxyde de fer (70%) augmente la force magnétique des particules. Ce qui leur permet d'être aimantées rapidement dans le but d'une capture efficace de l'ADN.

Du fait de leur petites tailles, les particules magnétiques ne sédimentent pas et sont idéales pour l'automatisation, les particules magnétiques concurrents présentent généralement une distribution hétérogène en taille ainsi qu'une surface irrégulière et poreuse qui compromettent la reproductibilité de la capture.

La séparation est effectuée sur un portoir magnétiques Adem-Mag MODULO Classic qui est constitué de deux parties :

- une embase magnétique qui contient l'aimant utilisée pour créer le culot magnétique,
- un portoir sur lequel les tubes sont placés et qui peut être rapidement enlevé de l'embase magnétique pour la remise en suspension des particules magnétiques.

Cette méthode comprend cinq étapes principales : a/ préparation des échantillons, b/ lyse cellulaire, c/ capture de l'ADN génomique pour normalisation, d/ lavage et e/ élution de l'ADN.

## IV.2 Quantification de l'ADN

L'estimation de la quantité d'ADN, extraite à partir d'un prélèvement biologique, est possible grâce à deux méthodes : la quantification traditionnelle (Quantiblot) qui n'est plus utilisée et la quantification par la RT-PCR.

### IV.2.1 La PCR en temps réel

La PCR en temps réel est une méthode qui a révolutionné la quantification. Elle est basée sur la détection de la fluorescence des amplicons. La fluorescence est la propriété que possèdent certaines substances à émettre un rayonnement électromagnétique lorsqu'elles sont excitées par un faisceau (Audigi *et al.*, 1986).

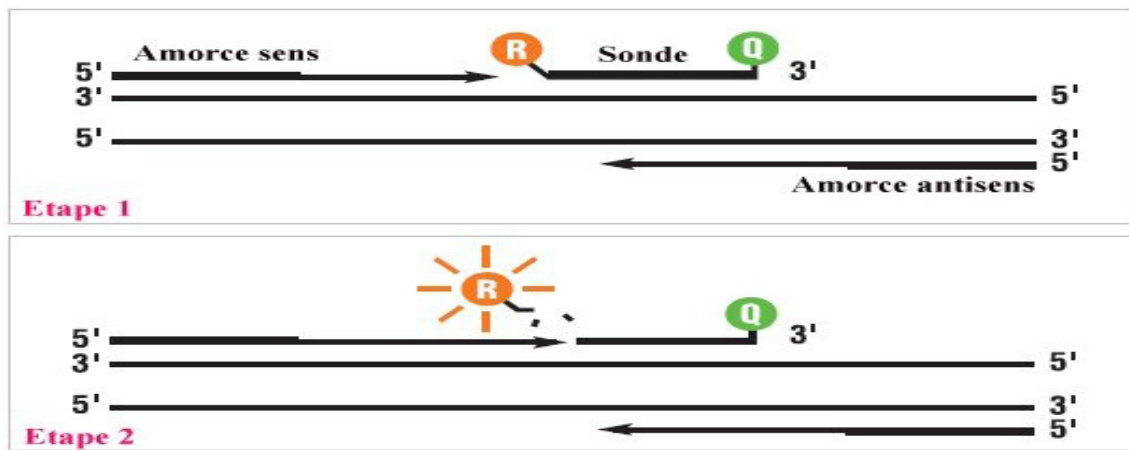
L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle. La première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (Template) **(Poitras et Houde, 2002)**.

Cette méthode est basée sur l'hybridation des sondes, marquées par un fluorophore, qui utilise l'activité 5' nucléase de la Taq polymérase.

### **Technologie de la détection**

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR **(Poitras et Houde, 2002)**.

La sonde TaqMan porte à son extrémité 5' une molécule fluorescente (fluorochrome) dite "Reporter" et à son extrémité 3' un "Quencher". Le "Reporter" est une molécule qui, après excitation par un faisceau laser, émet un signal de fluorescence à une longueur d'onde spécifique qui est mesurée à la fin de chaque cycle de PCR. En absence d'amplification, la sonde reste intacte, le "Quencher" (suppresseur) « absorbe » en grande partie la fluorescence du "Reporter" (émetteur) et seule une fluorescence résiduelle est émise. En revanche, s'il y a amplification, la sonde TaqMan est hydrolysée lors de l'étape d'élongation de l'ADN (activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase). Le « Reporter » est alors libéré et sa fluorescence n'est plus « absorbée » par celle du "Quencher". La méthode PCR est sensible à la présence d'inhibiteurs, qui bloquent partiellement ou totalement l'amplification et peuvent conduire à de faux négatifs. La méthode de PCR-Q permet de visualiser la présence d'inhibiteurs dans les échantillons via l'utilisation d'un contrôle interne. Ce contrôle est un fragment d'ADN spécifique qui est ajouté à chaque échantillon. Si ce fragment « contrôle » n'est pas amplifié alors la présence d'inhibiteurs est confirmée. **(Figures 3)**



**Figure 3:** Principe schématisé de la technologie TaqMan® dans le kit Quantifiler™ Humann DNA Quantification

### IV.3 Amplification par PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet l'amplification *in vitro* des séquences d'ADN par la répétition de réactions d'élongations en présence d'ADN polymérase et d'amorces nucléotidiques spécifiques. Cet ADN polymérase, isolé d'une bactérie thermophile, adaptée à la vie dans les sources thermales (*thermus aquaticus*), a révolutionné cette technique (Kerkouche et Benkhalek, 2009).

En sciences forensiques, la PCR multiplexe permet d'étudier les séquences répétées des polymorphismes STRs simultanément. Ceci est possible en utilisant plusieurs amorces spécifiques des différentes régions d'intérêt. Chacune des amorces est marquée par un fluorochrome différent permettant d'attribuer un allèle à un système de STR donné (Mansuet-lupo *et al.* , 2007).

### IV.4 Etablissement de profils génétiques

Après l'étape de recherche de traces, les échantillons biologiques passent par les différentes étapes du processus analytique de l'analyse génétique d'ADN à savoir : l'extraction afin de libérer l'ADN du noyau, la quantification pour estimer la quantité d'ADN présente dans l'échantillon et l'amplification de cet ADN par PCR. Les fragments amplifiés sont révélés par électrophorèse capillaire réalisée sur des séquenceurs (ABI Prism 130, 3100 ou 3130)

La disponibilité de quatre colorants fluorescents distincts facilite le développement du système de réaction de polymérisation en chaîne des séquences (Doutremepuich, 2001). Il s'agit d'une analyse de STR au moyen d'un kit multiplex.

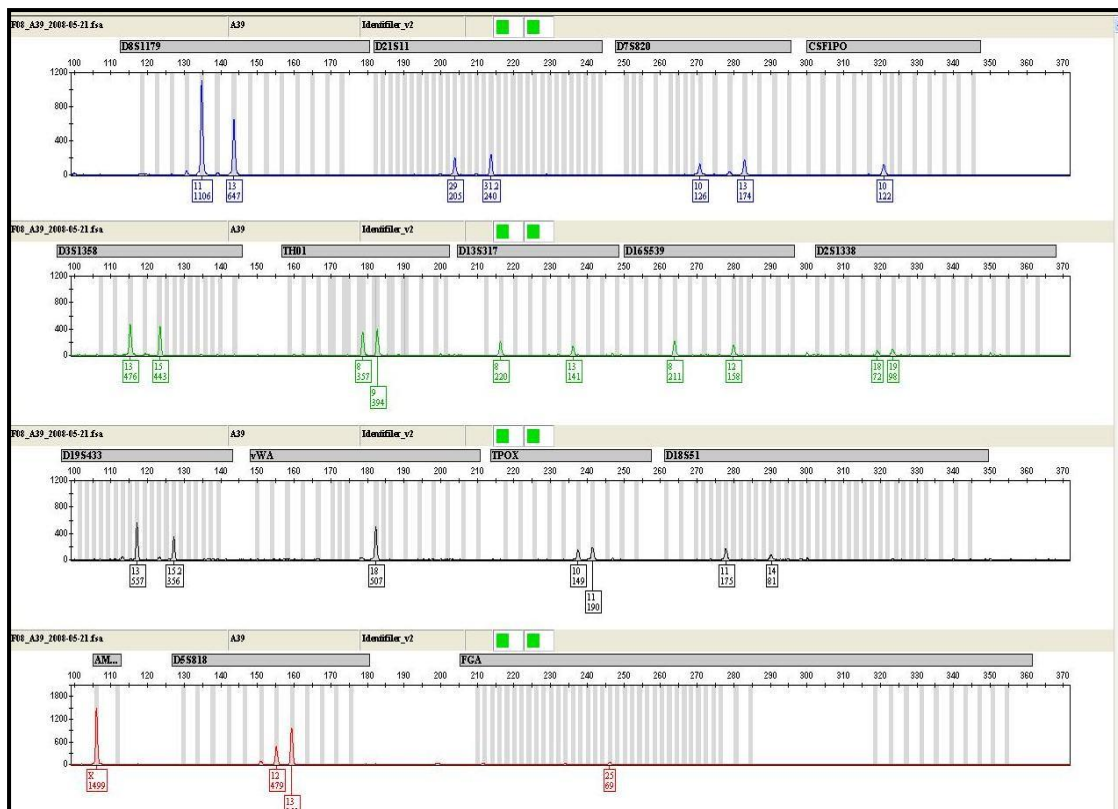
Le profil génétique d'un individu est unique et spécifique (en dehors des cas de jumeaux). Il existe statistiquement moins d'une chance sur des milliards pour rencontrer deux profils génétiques identiques issus de deux êtres distincts. Le nombre de répétitions, cité auparavant, a engendré des variations de taille appelées «allèles».

L'allèle est la version alternative d'un même gène différent par la séquence nucléotidique. Il y a, cependant, des systèmes bi-allélique ou multi-alléliques. Par extension, il désigne aussi les variations non codantes en le même locus.

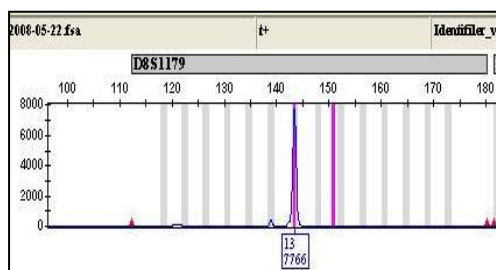
Bien qu'il existe une multitude d'allèles pour un marqueur particulier (**Figure 4**), un individu ne peut avoir que deux allèles (**Figure 4**) soit homozygote (allèles identique) ou hétérozygote (deux allèles différents).

Pour la description d'un profil ADN comprenant tous les marqueurs d'un type multiplex, il suffit de donner une liste de numéro correspondant aux allèles détectés pour ces marqueurs. Par exemple, un individu, de type 16/ 18 pour un marqueur donné, possède les allèles 16 et 18 qui correspondent à son héritage paternel et maternel (**Coquoz, 2003**).

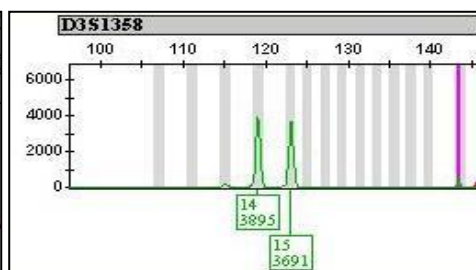




(a) Exemple de profil génétique déterminé à partir d'un prélèvement buccal



(b) personne homozygote pour le marqueur D8S1179



(c) personne Hétérozygote pour le marqueur D3S1358

**Figure 4 :** Présentation du résultat d'analyse (Profil génétique déterminé à partir d'un échantillon biologique) avec le Kit Identifiler (Laboratoire Central de Police Scientifique et Technique de la Sûreté Nationale, 2009)

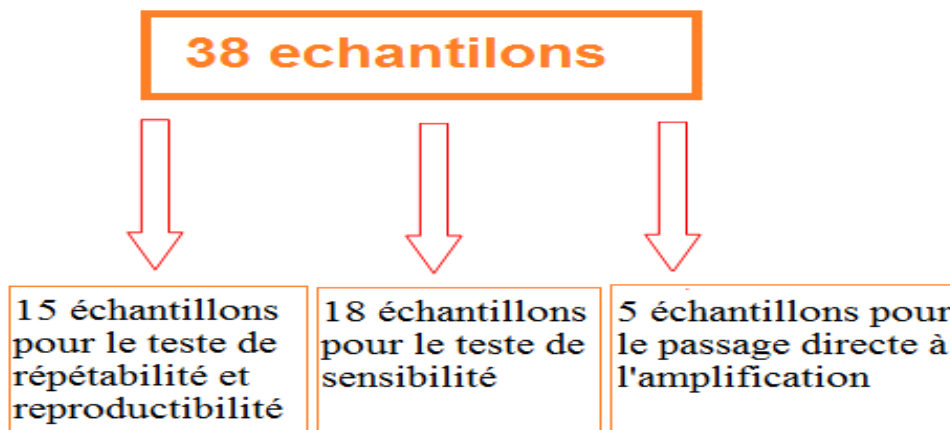
*Les allèles détectés portent une étiquette avec leur nom et sont surmonté du non des STR auquel ils appartiennent. Pour la plus part des STR l'échantillon analysé présente deux pic, il est hétérozygote pour ces marqueur, il présente toute fois un seul pic pour d'autre marqueur, pour les quels il est donc homozygote*

Ce mémoire a été réalisé au niveau du Laboratoire de Police Scientifique et Technique de la Sûreté Nationale. Notre stage s'est déroulé du mois de Mars au mois de Mai de l'année 2016. L'objectif de notre travail était de valider la méthode d'extraction de l'ADN en utilisant **Smart D-N-Adem-Kit Profiling**, pour augmenter considérablement la qualité des profils génétiques réalisés dans les laboratoires de médecine légale. Ce travail a été réalisé à partir des prélèvements buccaux « **Salive** » qui délivrent une quantité d'ADN pur qui devrait être  $\geq 0.05$  ng.

### I. Matériel

#### I.1 Matériel biologique

Ce travail a été réalisé à partir de 38 échantillons de salive prélevés sur individus volontaires du département de biologie légale /ADN. (**Figure 5**)



**Figure 5** : Repartions des échantillons utilisé lors de la validation .

Afin de procéder à la validation de l'extraction par **Smart D-N-Adem-Kit Profiling**, nous avons effectué plusieurs prélèvements : **Tableau (II)**.

- Nous avons procédé aux prélèvements de quinze échantillons de salive sur écouvillons stérile par frottement sur la paroi buccale dans des conditions d'asepsie rigoureuse (port de gants, charlotte, masque et sur chaussure obligatoire), Afin de valider la répétabilité et la reproductibilité de la technique.
- Nous avons préparé une solution mère de 1200  $\mu$ l du crachat, en obtenant dix-huit échantillons afin de tester la sensibilité de la technique.

- Nous avons préparé une série de cinq échantillons afin de les passer directement à l'amplification.

La préparation des quinze échantillons de salive a été réalisée en trois séries détaillées dans le tableau suivant :

**Tableau II : Séries d'extraction de salive.**

Séries	Les échantillons de salive	
Série 1	Répétabilité	Cinq prélèvements + un témoin négatif.
Série 2	Reproductibilité 1	Cinq prélèvements + un témoin négatif.
Série 3	Reproductibilité 2	Cinq prélèvements + un témoin négatif.

### I.2 Matériel non biologique

Les équipements utilisés pour la réalisation de nos travaux sont répertoriés dans la partie annexe.

## II. Méthodes

Tous les échantillons de salive ont subit, le même protocole d'analyse génétique :

### II.1 Extraction d'ADN

Le protocole utilisé est tiré du Smart D-N-Adem-Kit Profiling,

#### - Mise en tube des échantillons de salive

- ❖ Placer l'extrémité d'un écouvillon sec dans un microtube 2 ml.
- ❖ Casser la tige de l'écouvillon ou en pousser la tête au fond du tube afin de pouvoir le fermer.

#### - Mode opératoire

L'extraction d'ADN se déroule en 4 étapes essentielles :

Avant de commencer la procédure d'extraction d'ADN, tous les tampons doivent être à température ambiante (20-25°C) pour une performance optimale.

- **Lyse cellulaire**

La solution de lyse s'obtient en mélangeant le tampon de lyse (Lysis Buffer), la protéinase K et la Rnase selon les proportions indiquées dans le tableau (IV).

**Tableau III : Réactifs nécessaires pour n échantillon.**

<b>Lysis Buffer</b>	<b>500 µl</b>
<b>Protéinase K solution</b>	2,5 µl
<b>RNase A solution</b>	0,5 µl
<b>Volume totale</b>	503 µl

- **lyse des échantillons**

- Ajouter 500 µl de la solution de lyse fraîchement préparée dans le microtube contenant l'écouvillon.
- Agiter vigoureusement pendant 5 secondes.
- Placer le tube dans un thermo-shaker pendant 30 min à 56°C à 800 rmp.
- Après l'incubation, Agiter vigoureusement pendant 5 secondes, pour faire tomber les gouttes accumulées dans le capuchon.
- Prélever ensuite 50 µl du lysat pour réaliser l'extraction d'ADN.

- **Capture de l'ADN génomique pour normalisation**

- Distribuer 100 µl de Smart-Adembeads dans un microtube neuf.
- Transférer le lysat (50 µl de surnageant) dans le tube contenant les smart-Adembeads.
- Mélanger, en vortexant (5 sec, 1800-2000 rpm).
- Incuber 5 minutes à température ambiante sous agitation 900 rpm.

- **Lavage**

- Après la liaison de l'ADN aux particules magnétiques, le lavage de celles-ci va permettre d'éliminer les impuretés et les inhibiteurs de la PCR.

- Placer les microtubes, sur l'aimant durant au moins 5 minutes et retirer le surnageant avec précaution.
- Retirer le microtube de l'aimant et y ajouter 100 µl de Washing Buffer.
- Placer le microtube sur l'aimant pendant au moins 5 minutes, et retirer le surnageant.
  - **Elution de l'ADN**
- Après l'étape de lavage, l'ADN purifié a été remis en suspension et séparé des particules magnétiques.
- Retirer le microtube de l'aimant et y ajouter 100 µl de tampon d'élution.
- Placer le microtube dans un thermo-shaker et l'incuber 10 min à température ambiante à 900 rpm .
- Laisser incuber le microtube , la nuit à 4°C , afin d'optimiser le rendement d'ADN récupéré

### II.2 Quantification d'ADN

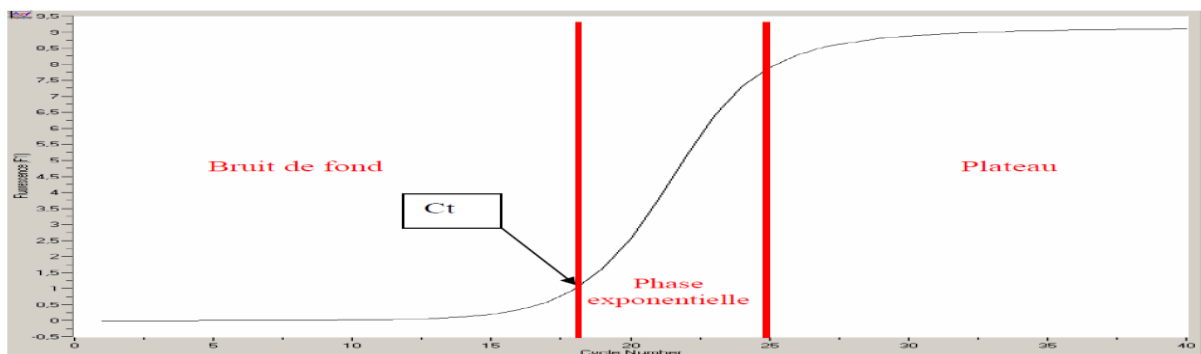
La quantification a été effectuée grâce au kit QUANTIFILER HUMAN DNA QANTIFICATION KIT.

Cette technique de quantification d'ADN repose sur l'activité 5' nucléase de l'ADN polymérase impliquée dans la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). En effet, en progressant, celle-ci va déplacer et cliver la sonde Taq man (allèle spécifique hybridée à l'ADN cible). Cette sonde est conçue de manière à permettre la capture de fluorescence du fluophore donneur (en 5' de la sonde) par le fluophore receveur en 3' de la sonde. Ainsi, lors du clivage de la sonde par l'ADN polymérase, les fluophores donneur et receveur sont éloignés permettant la détection de la fluorescence.

Le kit «Quantifiler» de quantification de l'ADN humain, reposant sur la technique d'amplification PCR en temps réel et utilisé dans l'identification, permet de quantifier les extraits d'ADN. Le système de détection ABI PRISM 7500 du même fabricant, est capable de détecter la présence des inhibiteurs PCR au moyen de l'indicateur IPC (Internal Positive Control) incorporé dans chaque réaction.

Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes (**Figure6**) :

- **Phase de bruit de fond** : La quantité de fragments amplifiés est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.
- **Phase exponentielle** : La quantité de fragments amplifiés génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.
- **Phase de plateau (ou de saturation)** : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitant. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.



**Figure 1:** Les phases de la RT-PCR

**Le protocole de quantification par la PCR en temps réel comprend les étapes suivantes.**

**- Préparation de la gamme standard**

Une gamme standard est préparée à chaque fois qu'on ouvre un nouveau kit Human Quantifier. La concentration de départ de l'ADN standard était de 200 ng/μl. Afin d'obtenir une courbe étalon, nous avons procédé à des dilutions de cet ADN standard. La courbe standard nous servira de référence pour établir les quantités d'ADN analysés, à partir du logiciel SDS qui calcule la concentration d'ADN dans chaque échantillon (**Tableau V**).

**Tableau III:** Préparation de la gamme standard.

Standards	Concentration	Facteur de dilution	Dilution
<b>STD1</b>	50 ng/μl	¼	30μl (eau ultra pure)+10μl(sol mère)
<b>STD2</b>	16,7 ng/μl	1/3	20μl (eau ultra pure) +10μl STD1
<b>STD3</b>	5,56 ng/μl	1/3	20μl (eau ultra pure) +10μl STD2
<b>STD4</b>	1,85 ng/μl	1/3	20μl (eau ultra pure) +10μl STD3
<b>STD5</b>	0,62 ng/μl	1/3	20μl (eau ultra pure) +10μl STD4
<b>STD6</b>	0,21 ng/μl	1/3	20μl (eau ultra pure) +10μl STD5
<b>STD7</b>	0,068 ng/μl	1/3	20μl (eau ultra pure) +10μl STD6
<b>STD8</b>	0,023 ng/μl	1/3	20μl (eau ultra pure) +10μl STD7

**- Préparation du Master Mix**

- Mélanger le Mix doucement par retournement.
- Vortexer les primers.
- Prélèver  $12.5 \cdot (n+2)$  μl Quantifiler PCR Réaction Mix. (n=nombre d'échantillons)
- Ajouter  $10.5 \cdot (n+2)$  μl Quantifiler PCR Primer Mix.
- Calculer les volumes des différents réactifs nécessaires au Mix.
- Préparer le Mix dans un microtube.

**- Préparation de la plaque de 96 puits**

- Répartir 23μl de ce mix dans chaque puit.
- Ajouter dans chaque puits 02 μl de chaque échantillon et standard.
- Recouvrir la plaque avec du papier adhésif.
- Placer la plaque dans le thermocycleur 7500.

### II.3 Amplification par PCR

L'amplification des échantillons d'ADN a été effectuée en utilisant le Kit d'amplification AmpFISTR® Identifier® Plus qui contient tous les réactifs nécessaires pour l'amplification d'ADN génomique humain. Les réactifs sont développés par Applied Biosystèmes®.

Le kit AmpFI STR<sup>®</sup> Identifier<sup>®</sup> Plus permet d'amplifier simultanément 15 allèles de tétranucléotides et l'amélogénine (marqueur déterminant du sexe).

### II.3.1 Pré-amplification

cette étape consiste à diluer les échantillons obtenu par le kit Smart-D-N Ademtech qui ont une concentration d'ADN supérieur a celle recommandée par le fabricant de kit ID+ (0.1 ng/μl) pour avoir une concentrations d'ADN optimum nécessaire pour établir le profile génétique. En revanche, les échantillons ayant une concentration d'ADN inférieur à 0.05 ng ne seront pas amplifiés.

#### Préparation de la plaque PCR

Après cette étape, nous avons commencé par préparer une plaque PCR, en identifiant et en calculant les volumes des différents réactifs nécessaires au Mix pour n échantillons :

(5. n primers + 10. n Reaction Mix).

- Vortexer, afin d'homogénéiser les échantillons d'ADN à amplifier ainsi que le DNA control et les différents réactifs de la PCR, et centrifuger 3 à 5 secondes.
- Après homogénéisation et centrifugation du mix. Répartir 15 μl dans chaque puits, selon le dépôt préparé.

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

- Dans chaque puit, mettre 1μl de chaque échantillon à amplifier et terminer par le DNA control kit (témoins positif et témoin négatif).

La dernière étape de pré-amplification consiste à placer la plaque dans un thermocycleur préalablement programmé pour STR après avoir vérifié tout les puits, et on la couvre avec une feuille en aluminium.

Des cycles thermiques successifs sont entrepris (28 cycles) par le thermocycleur ABI 9700. Le programme est illustré dans le tableau V.



**Tableau V:** Programme utilisé pour la réalisation de la PCR

incubation initiale (1)	Phase de dénaturation (1)	Phase d'hybridation (2)	Phase d'extension (3)	Phase d'extension finale	plateau final
Hold	28 cycles				Hold
95°C 11 min	94°C 1 min	59°C 1min	72°C 1min	60°C 60 min	4-25°C ∞

□

### II.3.2 Post Amplification (Post-PCR)

Cette étape est importante pour l'analyse des fragments. Elle consiste à dénaturer les fragments amplifiés afin d'obtenir un ADN simple brin, et l'incorporation d'une molécule chimique qui est la formamide.

- commencer par préparer une plaque pour la poste PCR. Puis, calculer les volumes des réactifs nécessaires au Mix pour n échantillons.

- Mix 9 µl x (n) : Standard de taille LIZ + HI-DI formamide.
- Volume totale du Mix : (8,7 µl formamide + 0.3 de LIZ).n
- (T-) et(T+) n : nombre d'échantillons

- Répartir 9 µl de ce mix dans chaque puis suivi de 4 µl de chaque échantillon amplifié y compris le ladder (produits pré amplifié du kit AmpFISTR contenant tout les allèles possible pour les 16 marqueurs).
- Couvrir la plaque par un septa spécifique. et placer dans un thermocycleur préalablement programmé pour la dénaturation des fragments d'ADN pendant 3 mn à 95 °C.
- Déplacer la plaque dans une cryobloc et centrifuger pendant 3 min à 13000 rpm.

### II.3.3 Analyse des fragments

Après l'amplification de l'ADN, les STRs amplifiés sont séparés par électrophorèse capillaire, dans un analyseur génétique 3130 xl<sup>®</sup> ABI (**Applied Biosystem**).

Ce séquenceur est composé de Seize capillaires à 36 cm de longueur, remplis d'un support de migration qui est un polymère liquide (POP4) contenant le polymère de migration, les sels nécessaires à la migration et l'urée (conditions dénaturantes).

Les petites molécules d'ADN migrent plus facilement du pôle négatif (cathode) vers le pôle positif (anode), sous l'effet du champ électrique (15 Kv). Il y a donc une séparation électrophorétique des fragments d'ADN une fois qu'une molécule migre et arrive à la fenêtre de détection. La molécule est bombardée par un faisceau laser, ce qui la pousse à émettre une fluorescence spécifique correspondant au fluorochrome qui lui est attaché. Cette fluorescence émise est captée par une caméra CCD (Charge Couple Device), puis transmise au système électronique de lecture.

Les 16 marqueurs génétiques utilisés dans le kit AmpFISTR Identifier sont donnés dans le tableau (VI).

Tableau IV :Les 16 loci du AmpFISTR Identifier															
D8	D2	D7	CSF	D3	TH	D13	D16	D2	D19	VW	TP	D1	Am	D5	
S11	1S1	S8	1PO	S13	01	S31	S5	S13	S4	A	OX	8S	el	S81	FGA
79	1	20		58		7	39	38	33			51		8	

### II.3.4 Lecture des résultats de l'amplification des STRs par GeneMapper IDx

Les données collectées par la caméra CCD lors de l'électrophorèse capillaire sont transmises au logiciel de lecture des résultats, GeneMapper ID x (Applied Biosystems). La validation des résultats se fait selon les étapes suivantes :

- Assemblage des données.
- Identification des pics.
- Détermination de la taille des molécules.
- Séparation par couleurs.
- Comparaison au ladder allélique (figure en annexe 10)
- Assignation de la nomenclature de chaque allèle
- Validation des profils obtenus par un analyste.

Les résultats sont obtenus sous forme de profils. Chacun comporte plusieurs pics correspondants aux allèles détectés, selon le spectre de longueur d'onde.

Chacun des fluorochromes est présenté par une couleur.

### III. Validation de la méthode d'extraction par Smart D-N-Adem-Kit Profiling

La validité des méthodes d'essai et mesure est donnée par 3 conditions essentielles :  
La reproductibilité, la répétabilité et la sensibilité.

#### - **Répetabilité :**

Pour cela ,nous avons testé la répétabilité de notre technique ,en préparant une série de 5 échantillons de salive sur écouvillons provenant de prélèvements buccaux d'un même individus placés dans des tubes stériles de 2 ml plus un tube de 2 ml vide pour le contrôle négatif .

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.

#### - **Reproductibilité :**

Celle-ci est applicable par des opérateurs différents en utilisant des équipements physiquement différents, même si conceptuellement analogue, tout en obtenant des résultats similaires, donc compris dans la marge de certitude attribuée de la méthode.

La méthode est appliquée dans le même laboratoire. Il s'agit donc de la reproductibilité interne ou la précision intermédiaire.

Deux séries de 5 échantillons de salive sur écouvillons provenant de prélèvements buccaux d'un même individu, plus un tube de 2 ml pour le contrôle négatif.

#### - **Sensibilité :**

La sensibilité à une concentration donnée correspond au rapport de la variable de la grandeur mesurée à la valeur correspondante de la concentration de l'élément à doser.

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.

Dans notre étude, nous avons préparé une série de sensibilité pour la dilution successive, à partir d'une solution mère de 1200 µl de salive « crachat », à partir de laquelle 600 µl de solution mère ont été partagés en trois séries de 200 µl par échantillon, puis la solution est réajustée à 1200 µl par l'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 réplicats de 200 µl, chacun et en réajustant la solution mère à 1200 µl à chaque fois par l'ajout de l'eau ultra pure.

Une gamme de dilution (1/2,1/4 ,1 /8 ,1/16,1 /32) est établie à partir d'un échantillon de concentration très élevée. Le tableau ci-dessous représente une série d'échantillons de sensibilité pour les dilutions successives.

**Tableau V:** sensibilité pour les dilutions successives.

Echantillons	Dilution	Nombre de répétition		
<b>C</b>	1	C'	C''	C'''
<b>C1</b>	1/2	C1'	C1''	C1'''
<b>C2</b>	¼	C2'	C2''	C2'''
<b>C3</b>	1/8	C3'	C3''	C3'''
<b>C4</b>	1/16	C4'	C4''	C4'''
<b>C5</b>	1/32	C5'	C5''	C5'''
<b>Témoin (-)</b>	-	-	-	-

#### **IV. Etude statistique**

Une étude **Gauge R&R** permet de tester les deux critères : répétabilité et la reproductibilité afin d'évaluer la performance du kit d'extraction objet de cette étude.

Pour cela nous avons étudiés Les trois méthodes afin de conduire une étude R&R :

- La méthode des écarts (Range method)
- La méthode des moyennes et des écarts (Average and Range method) , (coefficient de variation , écart type , Moyenne , Facteur multiplicatif )

Les analyses sont réalisées sur le logiciel Statgraphics Centurion XVI version 16.1.11 et Statistica (2010).

Afin de valider la technique d'extraction par les billes magnétiques utilisée dans le kit Smart D-N-Adem-Kit Profiling, nous avons choisi et testé trois critères (répétabilité, reproductibilité et sensibilité). Ces essais ont été faits sur des prélèvements buccaux «salive». Le kit est supposé délivrer une quantité d'ADN pur qui doit être  $\geq 0.05$  ng favorisant l'augmentation de la qualité des profils génétiques réalisés dans les laboratoires de médecine légale.

### I. Quantification

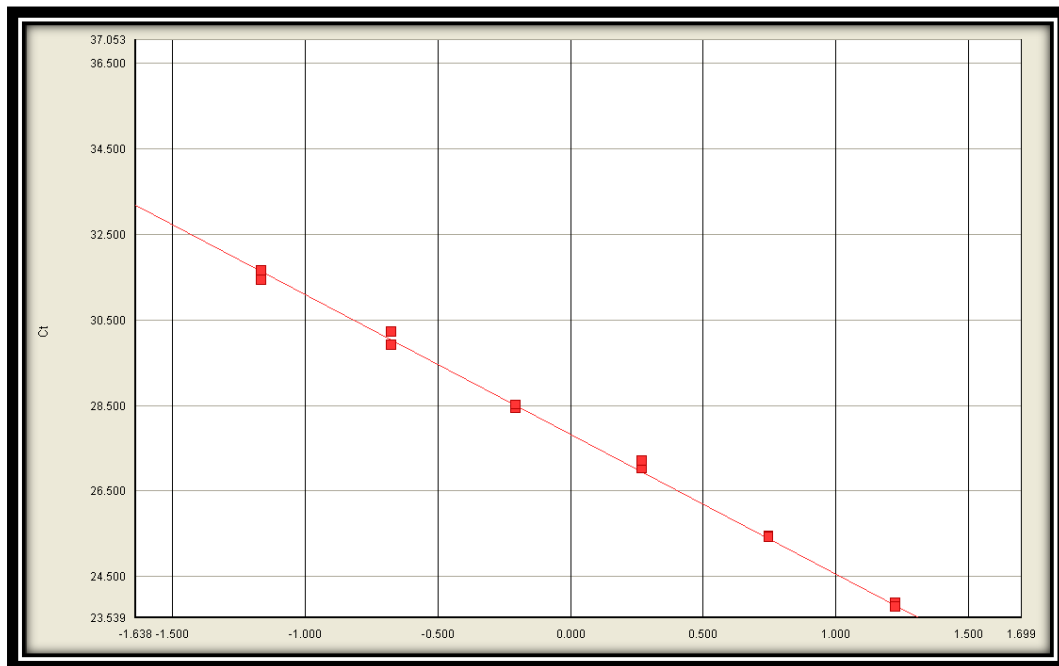
La PCR en temps réel permet

- La détection de l'amplification d'un produit basée sur la fluorescence durant une réaction de PCR.
- La mesure de la quantité initiale d'un acide nucléique en déterminant le nombre de cycle requis pour atteindre un niveau déterminé de produit.
- La quantification durant la phase exponentielle de l'amplification.

Pour ce suivi, il est alors possible de tracer une courbe qui caractérise les différentes phases de la cinétique PCR et de mesurer la quantité de produit d'amplification généré. L'amplification des points de gamme montre que la PCR a été efficace aussi bien pour les ADN concentrés que pour les ADN dilués.

Une série de dilutions d'un ADN, à concentration connue, a été effectuée pour calculer la quantité d'ADN des échantillons inconnus. Après l'amplification de la série de dilution standard, une droite est générée par le logiciel donnant le Ct (cycle seuil) en fonction du logarithme décimal de la concentration en ADN. Selon Stratagene (2007), un résultat fiable est obtenu avec au moins six dilutions standards et un coefficient de détermination très proche de 1.

Dans notre cas, la courbe standard, générée à partir de cette quantification, a été produite avec un coefficient de détermination  $R^2=0,998708$  très proche de 1 indiquant que les dilutions standards ont été bien préparées et que la RT-PCR fonctionne normalement (résultat fiable). Cette courbe est représentée par une droite de pente  $=-3,271861$  et d'ordonnée à l'origine  $= 27,827765$ . (**Figure 7**).



**Figure 2:** Courbe standard donnant le cycle de seuil (Ct), en fonction du logarithme décimal de la quantité matrice initiale ( $y = -3,271861 + 27,827765x$ ).

Les résultats de l'analyse génétique sont décrits par la quantité d'ADN extraite suivie des profils génétiques déterminés pour certains échantillons de salive. Nous avons noté que la quantité d'ADN, extraite pour chaque échantillon, est très variable d'une série de dilution à une autre dépendamment des conditions de manipulation (opérateurs, temps, prélèvement, etc.).

La détermination quantitative de l'ADN est basée sur un nombre de cycle minimum «Ct» nécessaire à l'atteinte du seuil correspondant à une fluorescence donnée dans le puits réactionnel. Le seuil est déterminé pour correspondre à la zone d'amplification exponentielle de la réaction de PCR.

Les résultats des expérimentations, que nous avons effectuées pour chaque série, en suivant le protocole standard de billes magnétiques (Smart D-N-Adem-Kit Profiling) sont décrits ci-dessous :

- La série 1 de répétabilité : les quantités d'ADN obtenues varient entre 1,6 et 2,5 ng/μl avec des valeurs Ct normales (entre 25,36 et 27,71) et une absence totale d'inhibition. Cette quantification a été produite avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,999149$  très proche de 1 et se caractérise par une droite de pente = -3,190740 et d'ordonnée à l'origine = 28,389990 ( $Y = -3,190740x + 28,389990$ ). La droite correspond à la **Figure 8**.

- La série 2 de reproductibilité 1 : les quantités d'ADN obtenues varient, entre 0,4 et 1,3 ng/μl, avec des Ct normaux (entre 26,63 et 28,31 cycles) et la présence d'une inhibition (30,41). Cette quantification a été créée avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,999198$  très proche de 1 et dont la courbe standard (**Figure 9**) suit une droite de pente = -3,348718 et d'ordonnée à l'origine = 28,599888 ( $Y = -3,348718x + 28,599888$ ).
- La série 3 de reproductibilité 2 : les quantités d'ADN obtenues varient entre 0,033 et 0,600 ng/μl. Les valeurs Ct sont normales (entre 26,25 et 29,25 cycles) et on observe la présence d'une inhibition (32,22). Cette quantification a été produite avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,998188$  (très proche de 1) et la courbe standard (**Figure 10**) est décrite par une droite de pente = -3,0968 et d'ordonnée à l'origine = 27,658047 ( $Y = -3,0968x + 27,658047$ ).
- La série 4 de sensibilité : les quantités d'ADN obtenues varient entre 0,02 et 1,9 ng/μl, les Ct sont normaux (entre 27,53 et 29,36 cycles) et on note aussi la présence d'une inhibition (entre 30,60 et 33,90). Cette quantification a été générée avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,999056$  (très proche de 1) et la courbe standard (**Figure 11**) est donnée par une droite de pente = -3,106688 et d'ordonnée à l'origine = 27,821724 ( $Y = -3,106688x + 27,821724$ ).

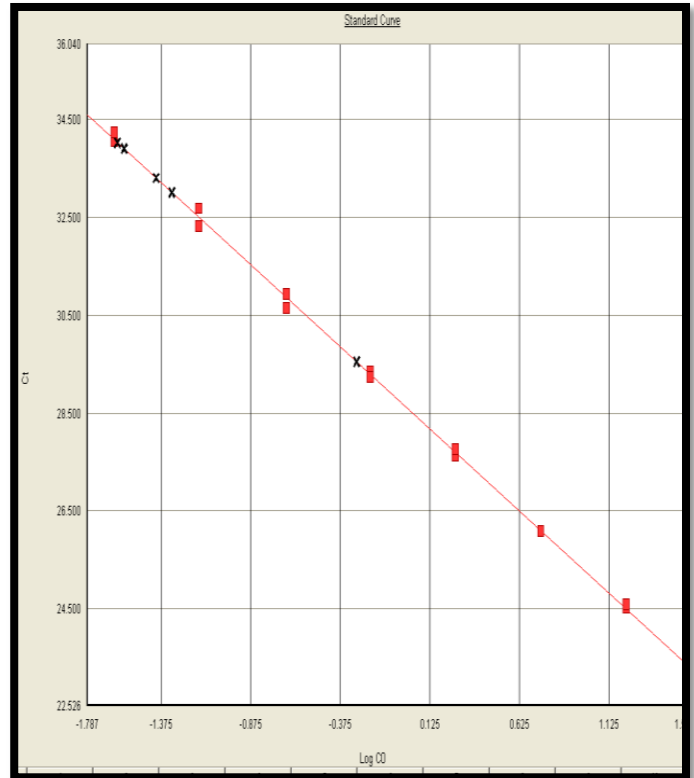
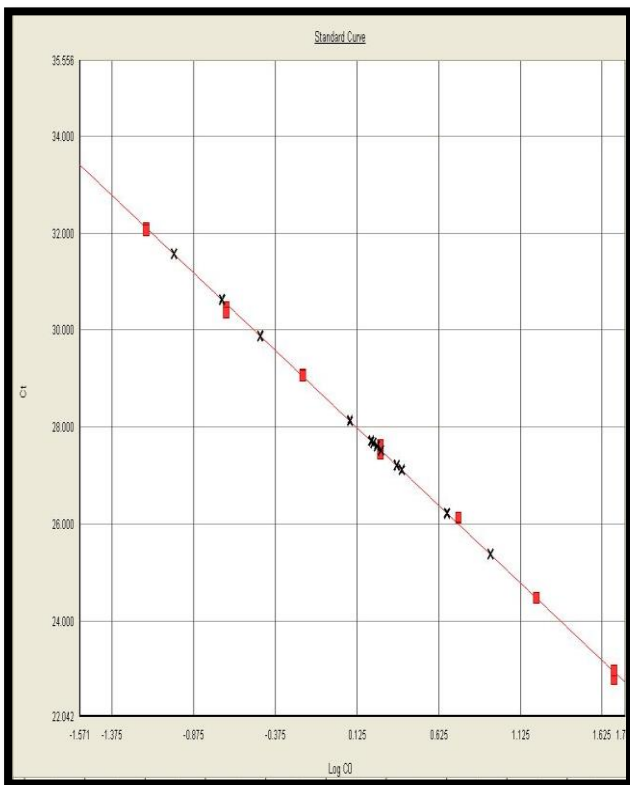
**Tableau VI : Récapitulatif des courbes standards.**

Droite de pente et d'ordonné à l' origine		$R^2$
Série 1	$Y = -3,190740x + 28,389990$	<b>0,999149</b>
Série 2	$Y = -3,348718x + 28,599888$	<b>0,999198</b>
Série 3	$Y = -3,0968x + 27,658047$	<b>0,998188</b>
Série 4	$Y = -3,106688x + 27,821724$	<b>0,999056</b>

Nous avons remarqué, pour ces échantillons, une diminution remarquable de la quantité d'ADN extraite grâce à la dilution réalisée pour tester la sensibilité du kit utilisé. Par ailleurs, Un cycle seuil supérieur à 30 indique la présence d'inhibiteurs. Cette inhibition pourrait être expliquée notamment par la présence des cellules qui n'étaient pas lysées au cours de l'extraction d'ADN. De plus, un temps de lyse inadéquat conduit à la présence d'inhibiteurs.

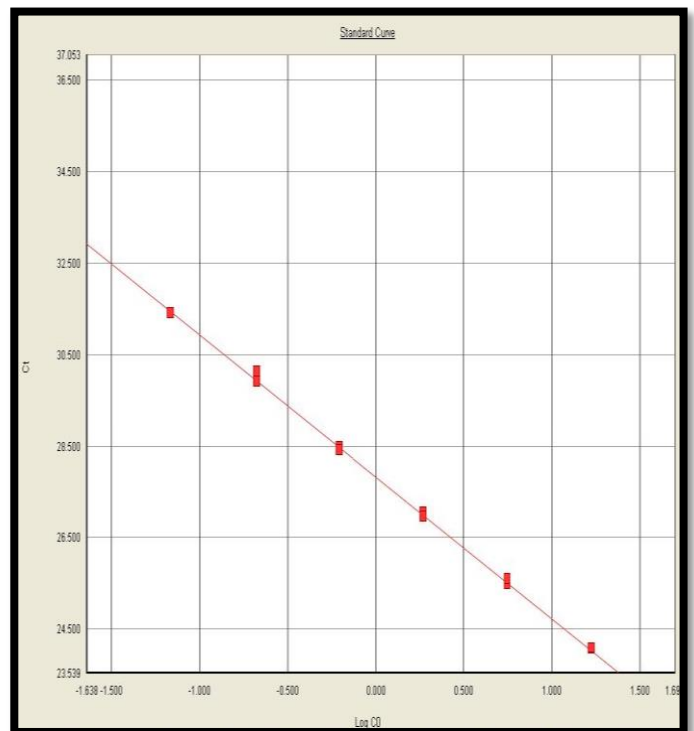
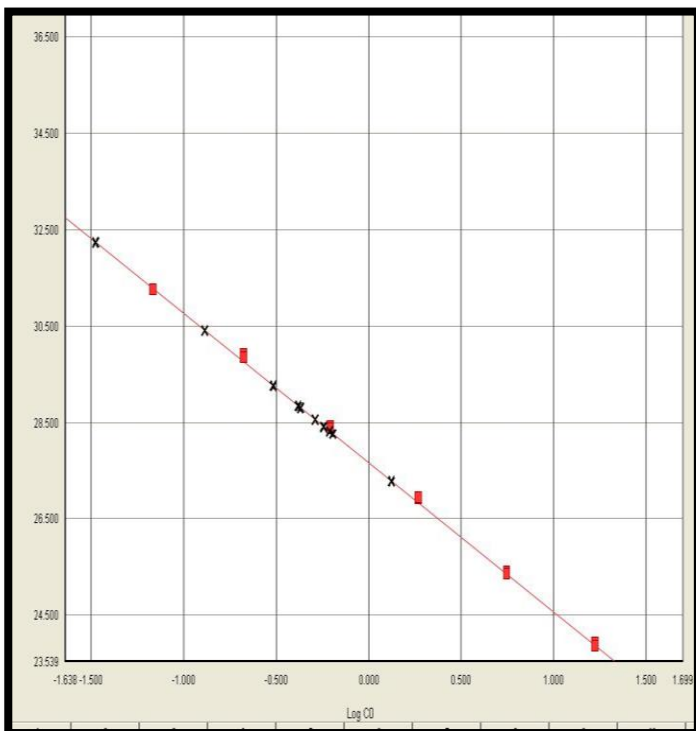
Les concentrations d'ADN obtenues étaient comprises entre 2,3 et 0,02 ng/μl. Pour les échantillons avec une concentration comprise entre [0.05ng/μl et 0.125ng/μl], il n'est pas nécessaire d'effectuer des dilutions pour la réalisation de l'amplification qui va suivre alors que les échantillons présentant des concentrations > 0,125 ng/μl seront dilués afin de réaliser les explorations ultérieures. Pour les échantillons présentant une concentration <0.05 ng/μl, un dosage par minifiler est réalisé afin d'obtenir un profil complet (**Tableau VIII**).





**Figure 8 :** Courbe standard donnant le cycle seuil (Ct) en fonction du logarithme décimale de la quantité matrice initiale  $Y=-3,190740x+28,389990$

**Figure 9 :** Courbe standard donnant le cycle seuil (Ct) en fonction du logarithme décimale de la quantité matrice initiale  $Y=3,348718x+28,599888$



**Figure 10 :** Courbe standard donnant le cycle seuil (Ct) en fonction du logharithme de la quantité matrice initiale  $Y=3,0968x+27,658047$

**Figure 11 :** Courbe standard donnant le cycle seuil (Ct) en fonction du logarithme de la quantité matrice initiale  $Y=-3,106688x+27,821724$ .

**Tableau VIII:** Récapitulatif des quantités d'ADN extraites à partir des échantillons de salive et les cycles seuils (Ct) correspondants.

Séries	échantillons	Ct	Quantité d'ADN ng/μl
<b><u>Série 1</u></b>	1	25,36	1,800
	2	27,71	1,600
	3	27,11	2,500
	4	27,67	1,600
	5	27,21	2,300
<b><u>Série 2</u></b>	1	28,31	0,600
	2	28,41	0,500
	3	30,40	0,120
	4	27,27	1,300
	5	26,63	0,400
<b><u>Série 3</u></b>	1	29,25	0,300
	2	32,22	0,033
	3	26,55	0,500
	4	28,79	0,400
	5	26,25	0,600
<b><u>Séries 4</u></b>	1	27,53	1,9
	2	29,26	1,5
	3	29,36	1,5
	4	29,14	0,3
	5	27,61	0,4
	6	29,17	0,3
	7	31,59	0,06
	8	30,60	0,12
	9	30,63	0,12
	10	31,65	0,053
	11	31,75	0,044
	12	32,01	0,057
	13	32,39	0,033
	14	33,12	0,028
	15	32,52	0,030
	16	33,90	0,020
	17	32,90	0,023
	18	32,75	0,025

**II. Validation interne**

**II. Validation interne**

Afin de valider cette technique d'extraction, nous avons vérifié la répétabilité, la reproductibilité et la sensibilité en utilisant les prises d'essai cité auparavant.

**II.1 Répétabilité et reproductibilité de la méthode d'extraction de l'ADN**

Le tableau X résume les résultats de l'extraction d'ADN de la salive à partir de séries de 5 répétitions chacune. La série (1) de mesures de répétabilité, établie sur un échantillonnage de 5 prélèvements aléatoires de salive, a donné une moyenne  $1.96 \pm 0.42 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  d'ADN avec un coefficient de variation égale à 21.2 %.

Concernant les séries de mesures de reproductibilité interne (1) et (2), nous constatons que (**Tableau X**) :

Le coefficient de variation (CV) de la série reproductibilité (1) est relativement élevé (75,1%) probablement due à une faible concentration d'ADN. De plus le CV pour la répétabilité est acceptable . Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés par Laus et all en 2011 qui ont obtenus des (CV) entre 6,8 et 59,6%.

Nous observons que les quantités d'ADN de la première série de répétabilité sont élevés par rapport aux deux séries de reproductibilité qui ont des valeurs proches l'une de l'autre. Cette différence serait attribuée au fait que le prélèvement ait été effectué sur le même individu au cours d'une même journée. En effet, la quantité de cellules prélevées va diminuer au fur et à mesure des prélèvements successifs.

**Tableau X** : Résultats de l'extraction d'ADN de la salive ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) à partir de séries de 5 répétition chacune.

.Séries salive	1	2	3	4	5	Moyenne ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Ecart-type ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	CV (%)
<b>Répétabilité</b>	1,800	1,600	2,500	1,600	2,300	1.96	0.42	21.2
<b>Reproductibilité 1</b>	0,600	0,500	0,120	1,300	0,400	0.58	0.44	75.1
<b>Reproductibilité 2</b>	0,300	0,033	0,500	0,400	0,600	0.37	0.22	59.3

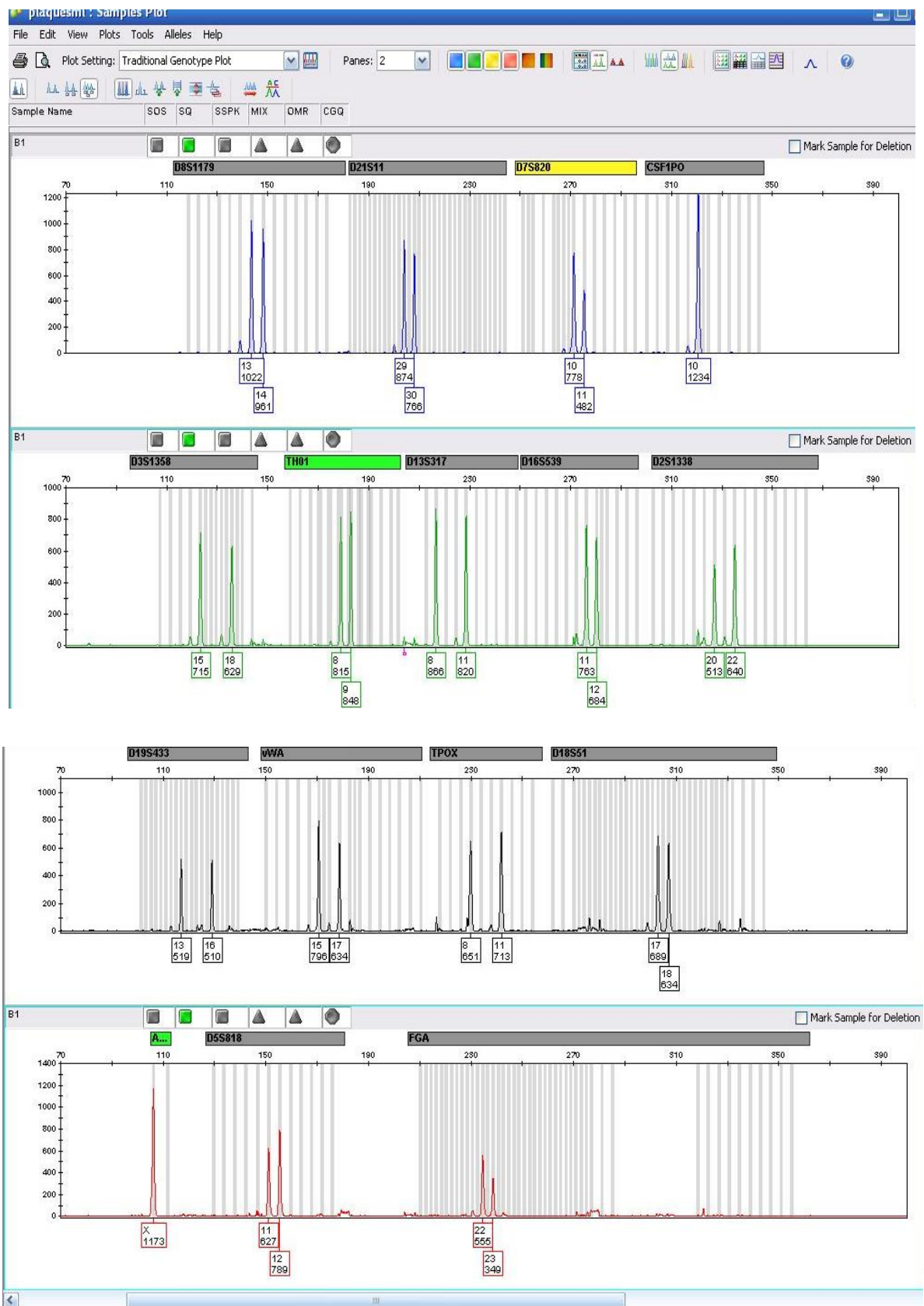
### **II.2 Profils génétiques obtenus à partir des ADN extraits « série de répétabilité »**

L'établissement de la validité de la répétabilité requiert la détermination du profil génétique. Pour cela, nous avons fait des expérimentations avec la dilution 1 de la répétabilité sur un prélèvement de salive (concentration d'ADN 1,6). Nous avons obtenu comme résultat un profil complet interprétable avec 16 STRs et des RFU variant entre 349 et 1234 (**Figure 12**).

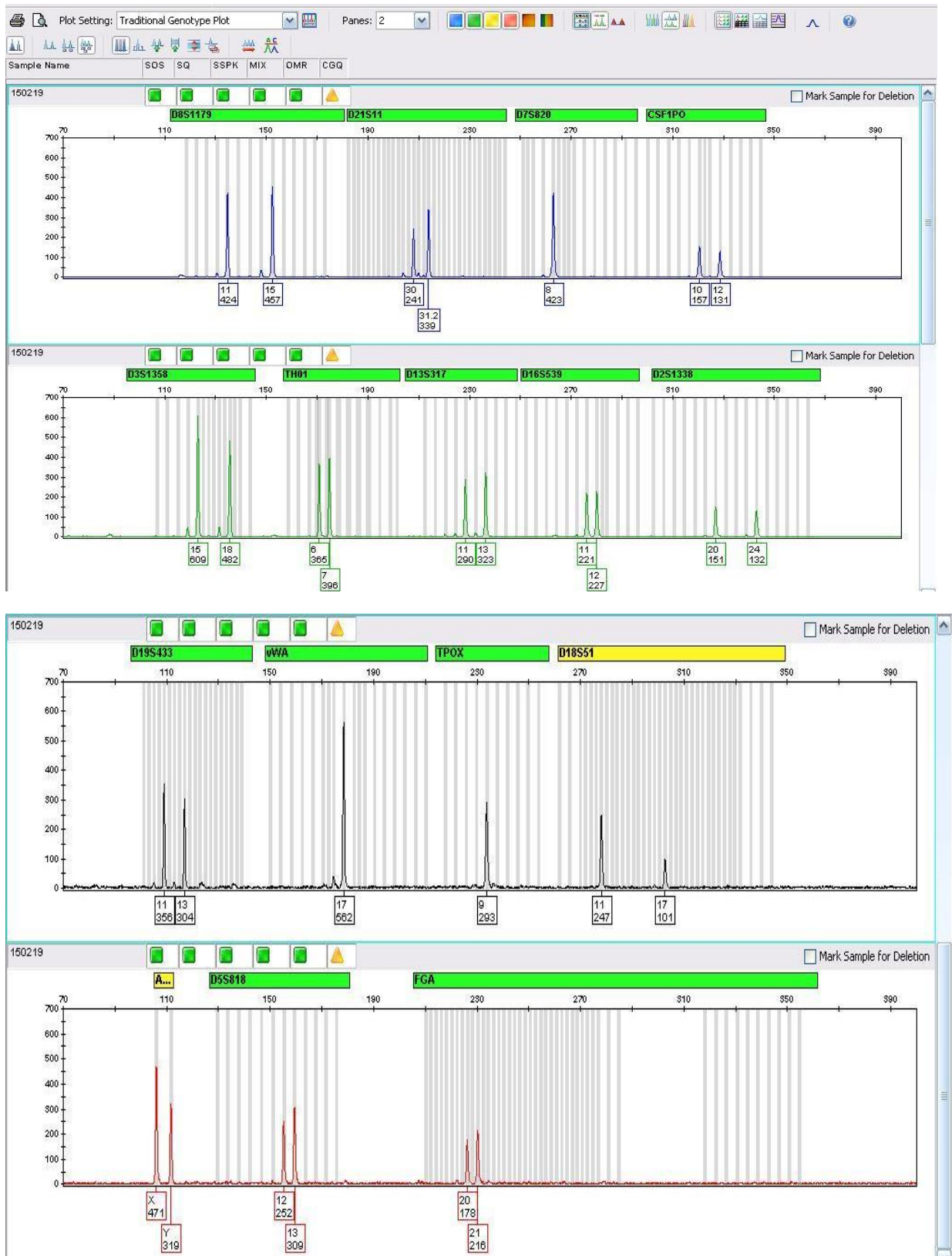
### **II.3 Etape de confirmation de profils génétiques sans quantification d'ADN**

Dans le but de vérifier et de valider l'idée que le kit est bien conçu pour permettre le passage à l'étape d'amplification sans quantification préalable, nous avons préparé une série d'échantillons pour l'extraction d'ADN. Une amplification directe de ces échantillons est ensuite réalisée. Après analyse des résultats obtenus, nous avons pu confirmer l'énoncé du fabricant.

Dans ce cas, nous avons amplifié 15 marqueurs ainsi que l'amélogénine directement sans quantification des prélèvements et donc sans dilutions. Ceci nous a permis d'obtenir un profil complet et exploitable avec 16 STRs et des RFU variant entre 101 et 609 (**Figure 13**).



**Figure 7:** Profil génétique complet, obtenu à partir de la dilution 1 de la répétabilité de la salive (concentration d'ADN 1,6), établi grâce au kit AmpFISTR Identifiler PLUS.



**Figure 8:** Profil génétique complet, obtenu à partir d'un échantillon de salive non quantifié, établi grâce au kit AmpFISTR Identifier PLUS.

### III. Sensibilité

Une série de dilutions, dans les rapports 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32, a été préparée à partir d'une solution mère de 1200 µl de salive liquide pur (crachat). Pour chaque échantillon, la quantité extraite d'ADN est estimée sur 3 répliques. Les concentrations moyennes sont représentées dans le **Tableau XII**.

**Tableau VII:** Dilutions successives de salive pure (1) à la 5<sup>ème</sup> dilution (1/32).

Rapport de dilution	C <sub>1</sub> (ng/µl)	C <sub>2</sub> (ng/µl)	C <sub>3</sub> (ng/µl)	Moyenne (ng/µl)	Ecart-type (ng/µl)	CV (%)	AB (0,05;0,125) 0,125 ng/µl
1 (salive pure)	1,90	1,50	1,50	1,63	0,23	14,1	13± 2
0,5 (1/2)	0,30	0,40	0,30	0,33	0,06	17,3	2,7±0,5
0,25 (1/4)	<b>0,06</b>	0,12	0,12	0,10	0,035	<b>34,6</b>	0,8±0,3
0,125 (1/8)	0,053	0,044	0,057	0,05	0,007	13,0	0,41±0,05
0,0625 (1/16)	0,033	0,028	0,030	0,03	0,003	8,3	0,24± 0,02
0,03125 (1/32)	0,020	0,023	0,025	0,02	0,003	11,1	0,18±0,02

C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>= concentration

AB= facteur multiplicatif

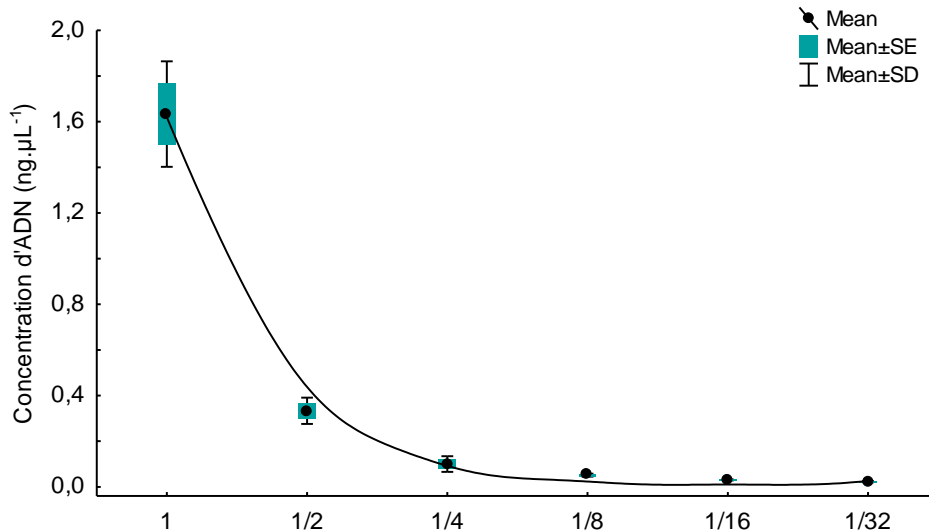
CV= coefficient de variation

L'analyse de nos résultats a permis de montrer que :

- Le facteur multiplicatif est élevé pour la salive pur (13± 2) mais chute en dessous de 1 à partir de la dilution au 1/4 et atteint 0.18 au 1/32.
- Le deuxième échantillon (dilution 1/4) se caractérise par une variabilité élevée due probablement à une erreur de pipetage. La valeur 0,06 ng/µl est vraisemblablement plus basse que les 2 autres (≈0,12 ng/µl) d'où le CV élevé = 34,6%. Ceci pourrait être justifié par le fait qu'un pipetage profond amène les constituants de la salive à remonter à la surface de la solution. La nature visqueuse empêche les cellules de retomber rapidement. Donc, il faut temporiser un peu entre un pipetage et un autre (**Annexe 14**).

Notre objectif dans l'étude de sensibilité a été d'évaluer la capacité du kit Adem-tech à détecter la quantité minimale d'ADN amplifiable. Dans nos essais, nous nous sommes basés sur les recommandations internationales de l'ENFSI se limitant à la 5<sup>ième</sup> dilution.

Nous avons ainsi constaté de faibles CV, variant entre 8,29 et 17,32, pour les mesures faites par le même opérateur dans chaque échantillon.



**Figure 9:** Concentrations moyennes extraites d'ADN de salive pure (1) diluée jusqu'à l'ordre 5 (1/32).

### III.1 Profil génétique saturant obtenu à partir d'un échantillon du test de sensibilité

Le protocole, suivi pour tester la sensibilité mais sans dilution, a permis de produire un profil complet saturant avec 16 STRs. Cela est dû probablement à la grande quantité d'ADN et sa pureté dans cet échantillon (**Figure 14**).

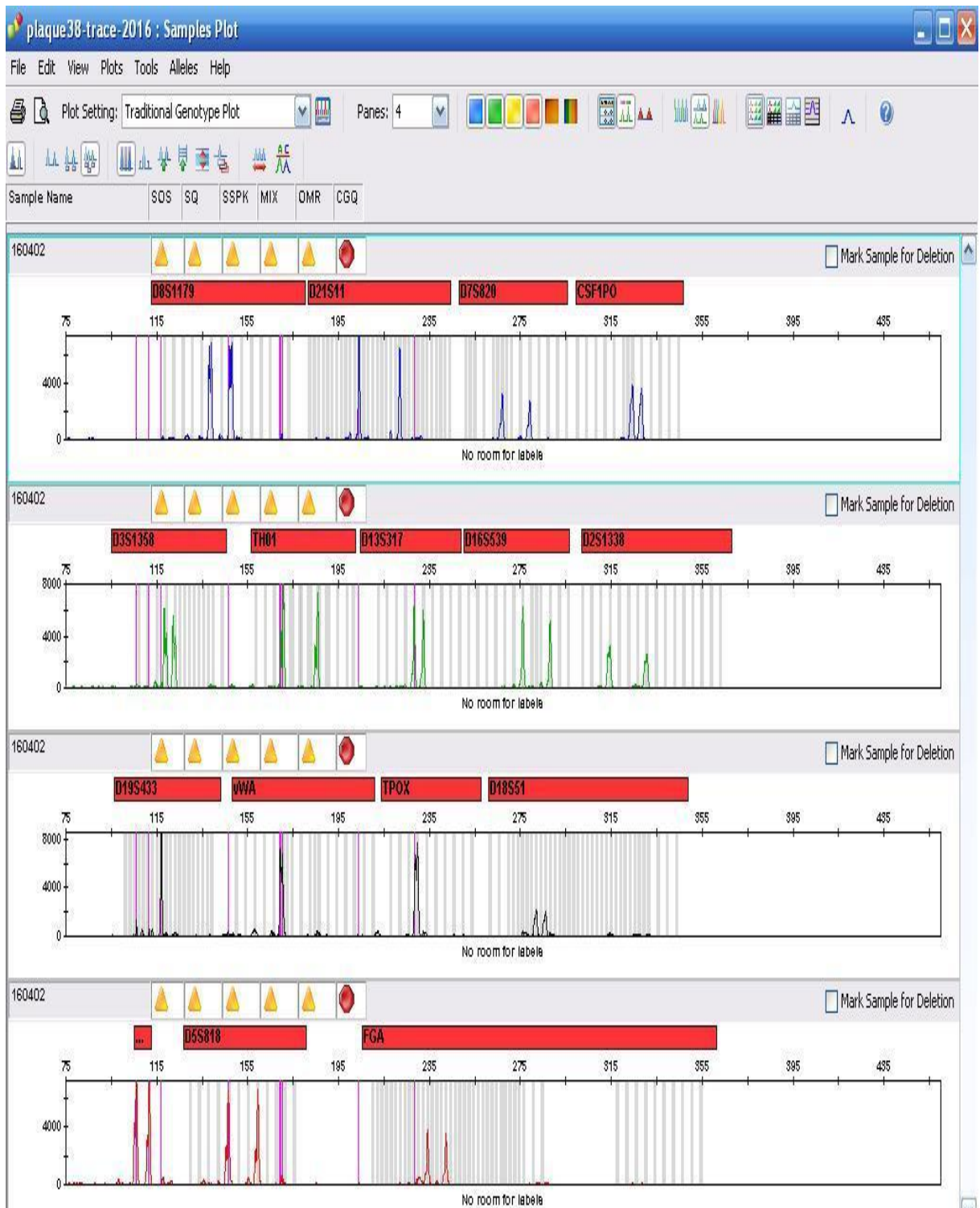
### III.2 Profil génétique partiel obtenu à partir d'un échantillon du test de sensibilité

L'échantillon de salive a permis d'obtenir un profil génétique partiel non exploitable et des RFU variant entre 115 et 2746 (**Figure 16**). Ce résultat peut être dû à une inhibition des échantillons d'ADN et/ou à la faiblesse de la quantité d'ADN détectée. Pour cela, un dosage optimisé du Kit STR ® MiniFiler est ajouté pour avoir un profil génétique complet.

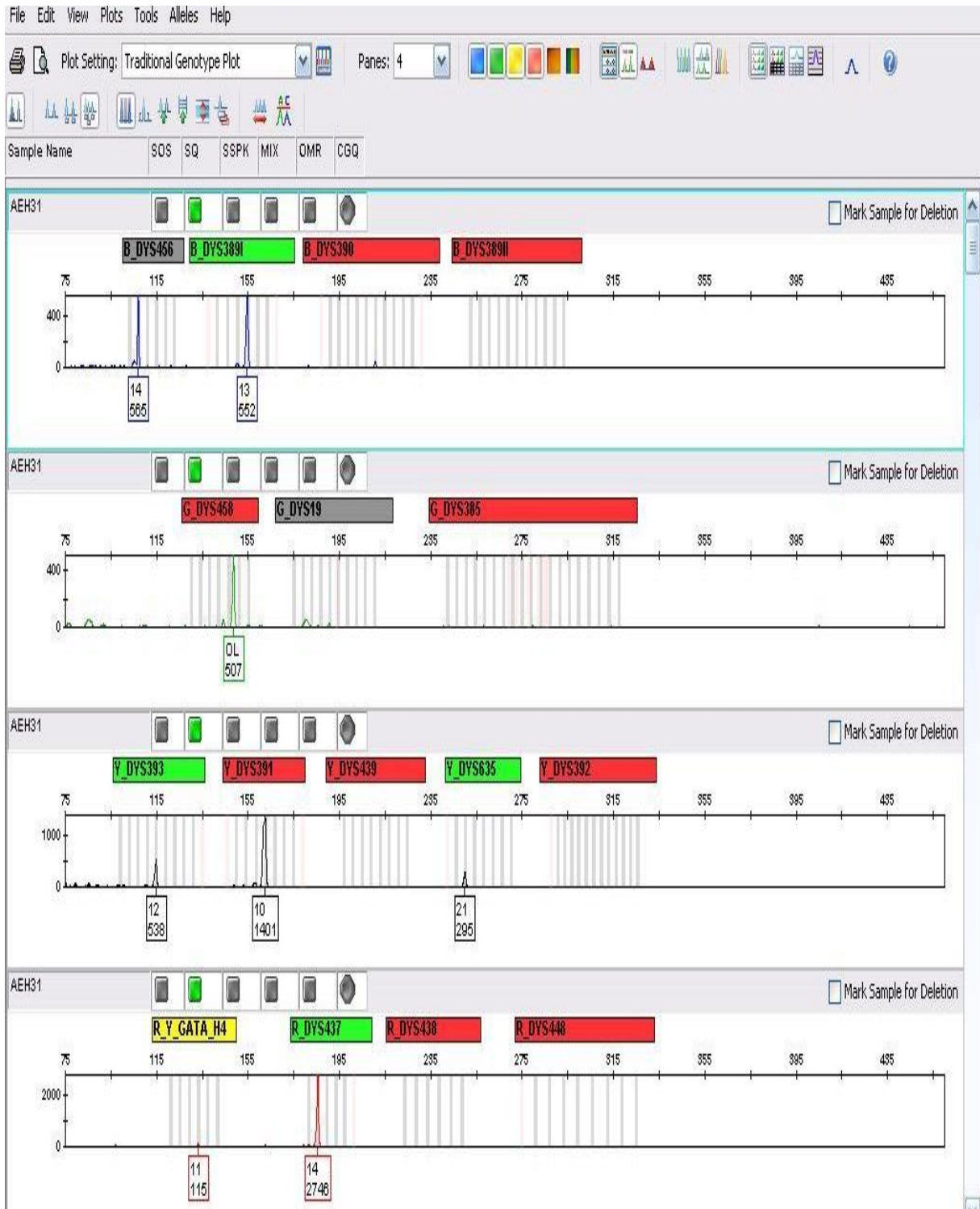
Le kit STR ® MiniFiler, identique au kit ID+ mais plus sensible, contient huit marqueurs autosomique et de l'amélogénine. Il a un taux de réussite plus élevé pour l'analyse des échantillons d'ADN dégradés

Nous pouvons aussi avoir un profil complet à partir d'un profil partiel par l'augmentation de nombre de copies dans le séquençage grâce à l'augmentation du temps d'injection ou du nombre de cycles au cours de l'amplification.





**Figure 10:** Profil génétique saturant, obtenu à partir de la salive pur (concentration d'ADN 1,9), établi grâce au kit AmpFISTR Identifier PLUS.



**Figure 11:** Profil génétique partiel, obtenu à partir d'un échantillon de salive (concentration d'ADN 0,02 ng ng/μl), établi grâce au kit AmpFISTR Identifier PLUS.

En effet nous pouvons noter que:

- La valeur 1,9 ng/μl donne un profil génétique saturant (**Figure 15**).
- La valeur 0,020 ng/μl, pour l'échantillon le plus dilué (1/32), est infime. Ce qui donne un profil génétique partiel (**Figure 16**).
- Les valeurs, entre 0,057 et 0,120, donnent des profils génétiques complets.
- Les dilutions 1/16 et 1/32 ne permettent pas de générer un profil génétique complet à cause de la faiblesse de la quantité détectée.

Ces résultats indiquent que le kit est donc sensible à la 3<sup>ième</sup> dilution (1/8).

Ces dernières années, la réalisation d'empreintes génétiques a connu une grande amélioration que ce soit dans les procédures d'extraction, la performance des analyses ainsi que leur durée.

Le laboratoire de la police scientifique et technique se prépare pour l'accréditation du département d'ADN. Pour cela, tout le matériel et kits doivent être validés selon la norme ISO/CEI 17025. Notre étude s'inscrit dans le cadre de ce processus de validation. Nous avons pour objectif de valider la méthode d'extraction d'ADN, supportée par le kit «Smart D-N-Adem-Kit for Profiling» utilisant les billes magnétiques, à partir des prélèvements buccaux «Salive». Ce Kit, spécifique pour la salive, permet de détecter la quantité la plus infime de l'ADN en passant les échantillons directement à la PCR sans quantification préalable. Par ailleurs, l'évolution des procédures d'extraction et d'analyse, visant à améliorer les performances (rapidité, qualité, etc.), impacte favorablement sur la détermination des empreintes génétiques.

Notre étude nous a permis de constater qu'il était possible d'extraire une quantité suffisante d'ADN, à partir des prélèvements buccaux, puis passer par un ensemble de manipulations (quantification par la PCR en temps réel, amplification par PCR «pré-PCR» et post-amplification «post-PCR») afin de produire un profil génétique.

Suite à l'analyse de nos résultats de quantification par la RT-PCR, nous avons déduit que cette technique est efficace. Nous avons obtenu, des Ct généralement normaux et une absence d'inhibiteurs dans les tests de répétabilité et de reproductibilité. En revanche, nous avons obtenu des Ct élevés pour la sensibilité avec une présence d'inhibitions.

De plus, les résultats des tests de répétabilité et de reproductibilité de la méthode d'extraction de d'ADN, à partir d'échantillons de salive quantifiés, était satisfaisants ce qui a permis d'obtenir des profils génétiques complets interprétable et exploitable.

Nous avons également pu confirmer l'une des caractéristiques du Smart D-N-Adem-Kit Profiling. En effet, l'amplification directe des échantillons issus de salive par PCR nous a permis d'obtenir un profil génétique complet.

Enfin, nous avons montré que l'étude de sensibilité, pour évaluer la capacité du kit Adem-Tech à détecter la quantité minimale d'ADN amplifiable, a généré un résultat acceptable. Le résultat des dilutions, successives jusqu'à la 5<sup>ème</sup> dilution (1/32), s'est traduit par des quantités d'ADN concentré qui donnent des profils génétiques saturants, par des

concentrations pures qui produisent des profils génétiques complets et par de faibles quantités ( $>0,05$  ng/ $\mu$ l) qui génèrent des profils génétique partiels.

Pour conclure , l'emploi de billes magnétiques dans les techniques d'extraction a permis de réduire considérablement la présence d'inhibiteurs de PCR. Nous pouvons donc dire que le Smart D-N-Adem-Kit Profiling permet une analyse d'ADN fiable et rapide.

En se basant sur les résultats de nos expérimentations s'intéressant aux critères de validation retenus dans le cadre de cette étude (répétabilité, reproductibilité, sensibilité), nous pouvons dire que la méthode d'extraction d'ADN du kit Smart D-N-Adem-Kit Profiling est jugée acceptable pour sa mise en place et son intégration dans les activités d'investigation du laboratoire d'analyses de l'ADN de police scientifique et technique. Cette méthode, caractérisée par une bonne répétabilité, une reproductibilité et sensibilité satisfaisantes, offre une analyse d'ADN fiable et rapide.

1. Amarouch,S, (2010). Caractérisation d'une méthode de mesure : étape, clé dans le processus de validation.
2. Ames,D.,Murphy,N.,Helentjaris,T.,Sun,N., and Chandler,V., (2008) . Comparative analyses of human single and multilocus Tandem Repeats. Genetics.
3. Audigi,C ., Dupont,G.,Zonsain,Z.F.,(1986) : Principes des méthode d'analyse biochimiques, édition DOIN.190P.
4. Baumgartner,A., Bischofberger,T., Bissig-Choisat,B., Dalla Torre,M., Emch,H., Gafner,J.L., Hubner,Ph., Meyer., Müller,Ch., Scheffeldt ,P., Spahr ,U., Stephan,R., Waspi ,U.,(2013).Guide pour la validation de méthodes d'essais microbiologiques et l'évaluation de leur incertitude de mesure dans les domaines de la microbiologie alimentaire et de l'environnement.
5. Blanchin,M.D.,(2010).Validation des méthodes d'analyse. Une démarche qualité au service de la chimie.
6. Blandin, P., (2004). Recherche d'ADN et profils génétiques « Institut de médecine légale (STRASBOURG) ».
7. Brandt-Casadevall,C., Mangin,P.,(1998).L'Identification médico-légale des traces biologiques.
8. Butler,J.M.,(2003). Forensic DNA Typing: biology and technology behind STR markers. Academicpress.
9. Butler,J.,(2005). Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers (2<sup>nd</sup>, Ed). Elsevier Academic press.
10. Butler,J.M.,(2011). Advanced Topics In Forensic DN Typing Methodology.Elseiver Academic Press.
11. Carracedo,A.,(2005). Forensic DNA Typing Protocols.
12. Coleman,W.M.,Tsongalis ,G.J.,(2007). Molecular diagnostics for the clinical laboration.
13. Coquoz,R., Taroni ,F ., ( 2006) .Preuve par l'ADN :la génétique au service de la justice « concepts génétiques de base « (2<sup>nd</sup> , Ed) .
14. Dhaliwal,A.,( 2013) . «Extraction et purification de l'ADN».
15. DNA Isolation methods « World of forensic science», (2005). Encyclopedia
16. Doutremepuich,C.,( 2012 ). Les empreintes génétiques en pratique judiciaire.
17. ENFSI (2010). Recommended Minimum criteria for the validation of various aspects of the DNA profiling process.
18. Farce,M .H., (2000). Génétique moléculaire : Principes et Application aux population Animales, ADN et Chromosomes.

19. Friis,S.L. ,Buchard,A., Rockenbauer,E., Børsting,C., Morling,N., (2016). Forensic Science International: Genetics ; Introduction of the Python script STRinNGS for analysis of STR regions in FASTQ or BAM files and expansion of the Danish STR sequence database to 11 STRs , Elsevier .
20. Goodwin, W., Linacre,A., Hadi,S., (2007) . An Introduction to Forensic Genetics .
21. Griffiths,A .J.F.,seean B . Corral, susonwessler , richard .C. Lewontin (2010). Introduction à l'analyse génétique.
22. Gruson,A.,(2005). Aide à la validation des méthodes en toxicologie et suivi thérapeutique pharmacologique Annales de Toxicologie Analytique, vol. xvii, n° 3, supplément 1, Société Française de Toxicologie Analytique.
23. Hawkis,T.,Somerville .,(1998).DNA PURIFICATION AND ISOLATION USING MAGNETIC PARTICLES.
24. Hottois,G., Missa ,J.N.,(2001). « Empreinte génétique », Nouvelle Encyclopédie de bioéthique médecine, Environnement,Biotechnologie.
25. Loistron,S ., (2009) .Les Empreintes génétiques en médecine légale : Réalisation , Législation . Thèse Doctorat en chirurgie dentaire d'Université de Nantes.
26. ISO/IEC,(2005). Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage d'essais. [http://www.iso.org/iso/fr/catalogue\\_detail?csnumber=39883](http://www.iso.org/iso/fr/catalogue_detail?csnumber=39883)
27. Karp, G.,(2010). Biologie cellulaire et moléculaire : Concepts and empreints « Nature du gènes et du génome».
28. Lander,E .S.,Linton,L.M. ,Birren ,B., et al ., (2001). Initial sequencing and analysis of the humain genome, Nature 409.(860-921).
29. Lodish,H.,Berk ,A.,Mostudaira ,P.,Darnell.,J., (2005) . Biologie moléculaire « Identifie et localiser des gènes dans des maladies humaines ».
30. 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.
31. Missawa,K.,(2016). Short Tandem Repeat in the human, cow, chicken and lizard genome are concentration the terminal regions of chromosomes.
32. R,Ahmed-Mohamed .,(2014). Techniques scientifiques d'empreinte génétique . الطبعة الاولى كتاب التقنيات العلمية للبصمة الوراثية
33. O.Kerkouch,B.K.,(2009). Impacts de la prolifération microbienne sur les prélèvements biologiques dans l'analyse ADN. d'USTHB. Mémoire post graduation spécialisée. Empreinte génétique en pratique judiciaire.

34. Ould-Ahmed,M.,(2009). Caractérisation de la population des dromadaires (*Camelusdromadonus*) en Tunisie. Thèse de Doctorat en science Agronomique .
35. Parson,W.,Ballard0,D., Budowls,B.,Butler,J.M.,Gettings, K .B., Gillg,P., Gusmão,L., Haresl,D.R., Irwin,J.A., Kingd,J.L., Knijff,P., Morling,N., Prinz,M., Schneider,P.M., Van Nesteq,C., Willuweit,S., Phillips,C.,(2016) . Forensic Science International: Genetics. Massively parallel sequencing of forensic STRs: Considerations of the DNA commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG) on minimal nomenclature requirements
36. Petkovski,E.,(2006). Polymorphisme ponctuels des séquences et identification génétique. Etude par spectrométrie de masse MALDI TOF. Thèse Doctorat de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I.
37. Poitras,E.,Houde,A.,(2002). La PCR en Temps Réel : Principe et Application.
38. Quid de la norme ISO 17025 : Programme Cofinancé par l'Algérie et l'union européenne.
39. Raudin,N., Inman,K., (2001) . An introduction to forensic DNA Analysis.( 2<sup>nd</sup> , Ed) .
40. Saiyed,Z.M.,Bochiwal,C.,Gorgagia,H .,Telong,S.D.,Ramchand,C.N.,(2016). Application of magnetic particles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) for isolation of genomic DNA from momolian cells. Analytical Biochemistry.
41. Sherwood,L.,(2006). Physiologiehumaine: a human prespective .
42. Singh, A., Gaur, A., Shailaja,K., SatyareBala,B., Singh, L., (2004). Forensic Science International 141:A novel microsatellite (STR) marker for forensic identification of big cats in India, Elsevier.
43. Smart D-N-Adem-kit for profiling (cat #06142) Instruction manual for gDNAnormalisation from Swabs .
44. Sozer A.C., (2014).DNA Analysis for Missing Person Identification in Mass Fatalities .CRC Press, pp .1-11 .
45. Stratagene Company (2007). An Introduction to Quantitative PCR Méthods and Applications, Guide 2007, Stragene.
46. SWGDAM Scientific workinggroup on DNA Analysis methods (2012). Validation guidelines for DNA Analysis Methods.
47. Van Hoppe,M.J.C.,Dy,M.A.V.,Van den Eiden,M .,Lyemgar,A., (2016). SkydancerPlex: A novel STR multiplex validated for forensic use in the hen harrier (*Circus cyaneus*).Elsevier.





## Annexe 1 : Smart D-N-Adem-Kit Profiling .



## Annexe 2 : Matériels et équipement de l'extraction d'ADN .

Consommable	Equipement
Tube eppendorf	Bain marie
Tips a volume variable	Vortex
Micropipette a volume variable	Centrifugeuse
Gants	Adem-Mag MOD $\mu$ LO (# 20105, # 20108)
	Thermo-shaker ou bloc chauffant

## Réactifs et solution

Smart D-N-Adem Kit			
	Volume	Réactifs	Conditions de stockage
1	50 µl	Rnase A	+4°C
2	250 µl	Protéinase K	+4°C
3	50 ml	Lysis Buffer	+4°C
4	10 ml	Smart Adembeads	+4°C
5	10 ml	Washing Buffer	+4°C
6	10 ml	Elution Buffer	+4°C
Réactifs pour 100 normalisations			

## Annexe 3 : Matériels et équipement de la quantification d'ADN

Consommables	Equipements
Gants	Micropipettes
Plaque RT-PCR 96 puits	Vortex
Tips (embout a filtre)	logiciel de pilotage fast system SDS software
Microtubes	7500 real time PCR system
Film adhésif	Centrifugeuse pour plaque
	Hotte

---

**Réactifs**


---

**Réactifs**

- 
- Eau ultra pure
  - kit Quantifiler human DNA Quantification
  - Quantifiler human primer Mix (primer ,sonde, IPC)
  - Quantifiler human DNA standard
  - Quantifiler PCR Réaction Mix (dNTP, dUTP)
- 

**Annexe 4 : matériels et équipements de l'Amplification par PCR**

Consommables	Equipements
Gants	Micropipettes
Tips	Vortex
Microtubes (eppendorfs)	Thermocycler 9700 Centrifugeuse

---

**Annexe 5 : Le protocole de quantification par la PCR en temps réel**

- commencer par la décongélation du primer Mix ainsi que le reaction Mix
- Remplir le plan de dépôt quantification Real time PCR
- Mettre en marche et stériliser la hotte environ 20min avant toute manipulation
- Allumer l'appareil RT-PCR 20 min avant le lancement du Run

**1. Principe de détection de L'ABI PRIM 7500 Fast system**

**1**-la lampe (halogen tungsten) dirige la lumière dans chaque puits a travers l'Optical adhésive en excitant les fluorochromes.

**2**-un système compose de lentilles ; filtres miroir dichroïque focalise l'émission de fluorescence vers une camera CCD (Camera Coupled Device).

**3**-bases sur des longueurs d'ondes, les filtres séparant la lumière en traversant camera CCD.

**4**-Durant le run la camera CCD détecte la fluorescence émise entre 500 et 600 nm de chaque puits.

5-le software SDS (Séquence détection system) collecte les données de la fluorescence émise de la camera CCD et applique l'analyse logarithmique des données.

## 2. Etapes à suivre pour la mise en marche de l'appareil

1-allumer l'onduleur

2-allumer le micro ordinateur

3-une fenêtre apparaît, y introduire le mot de passe

4-allumer l'appareil 7500 Fast (vérifier que le voyant vert s'est allumé)

5-cliquer sur l'icône 7500 Fast system

6-la fenêtre 7500 Fast system SDS Software apparaît « quick Start up document ».

## Annexe 6 : Matériels et équipement de l'amplification de l'ADN pré-PCR

Consommables	Equipements
Gants	Micropipettes
Tips	Vortex
Microtubes (Eppendorfs)	Séquenceur ABI Prism® 3130XI
	Centrifugeuse
	Bloc chauffant

### Réactifs

- Eau ultra pure
- Standard de taille 500 LIZ
- Polymère POP4
- Hi-Di formamide
- Echelle allélique (Ladder)

## Annexe 7 : Matériels et équipements de l'amplification du post-PCR

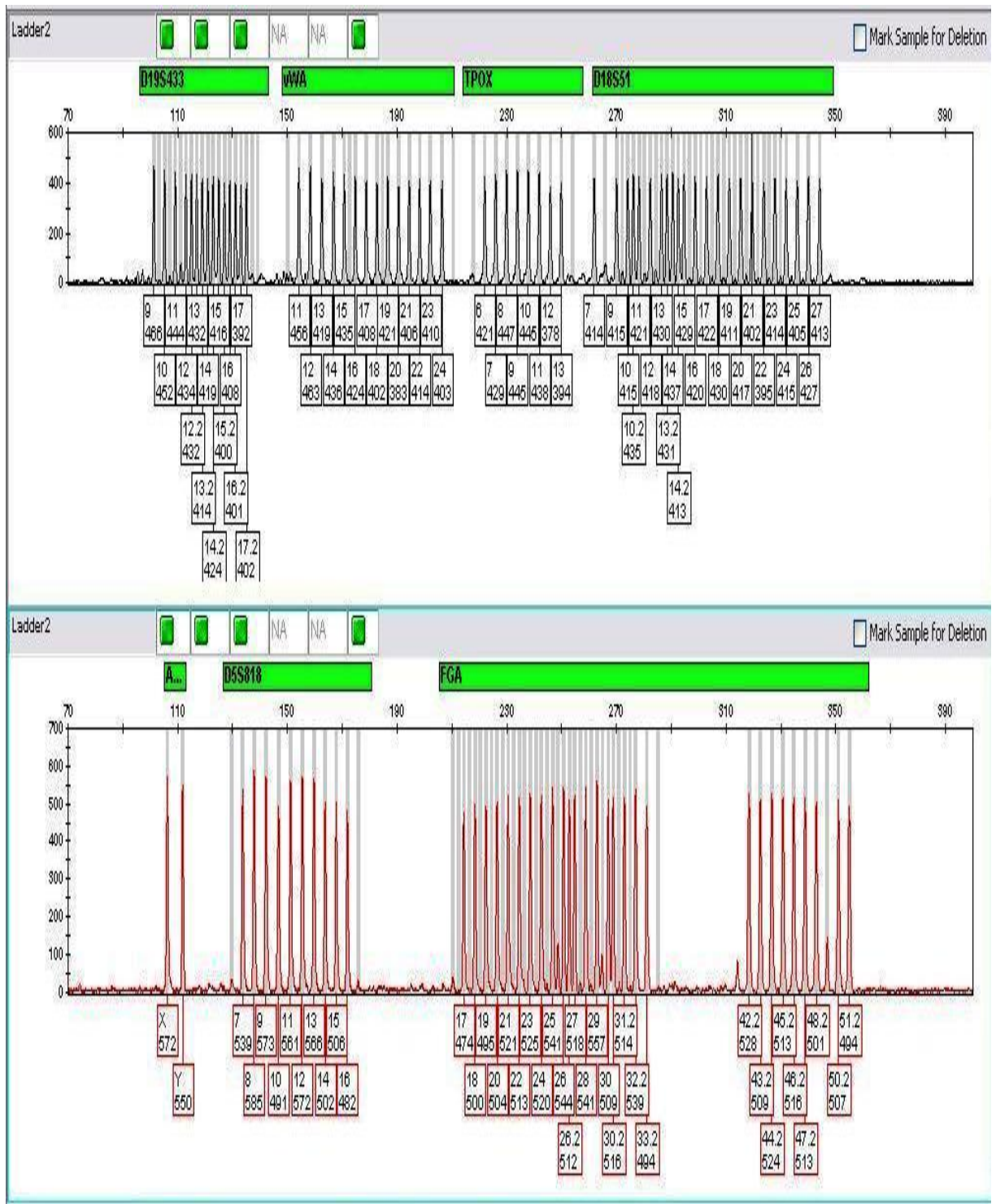
Consommables	Equipements
Gants	Micropipettes
Tips	Vortex
Microtubes (Eppendorfs)	Séquenceur ABI Prism® 3130XI
	Centrifugeuse
	Bloc chauffant

## Annexe 8 : Protocole de poste amplification

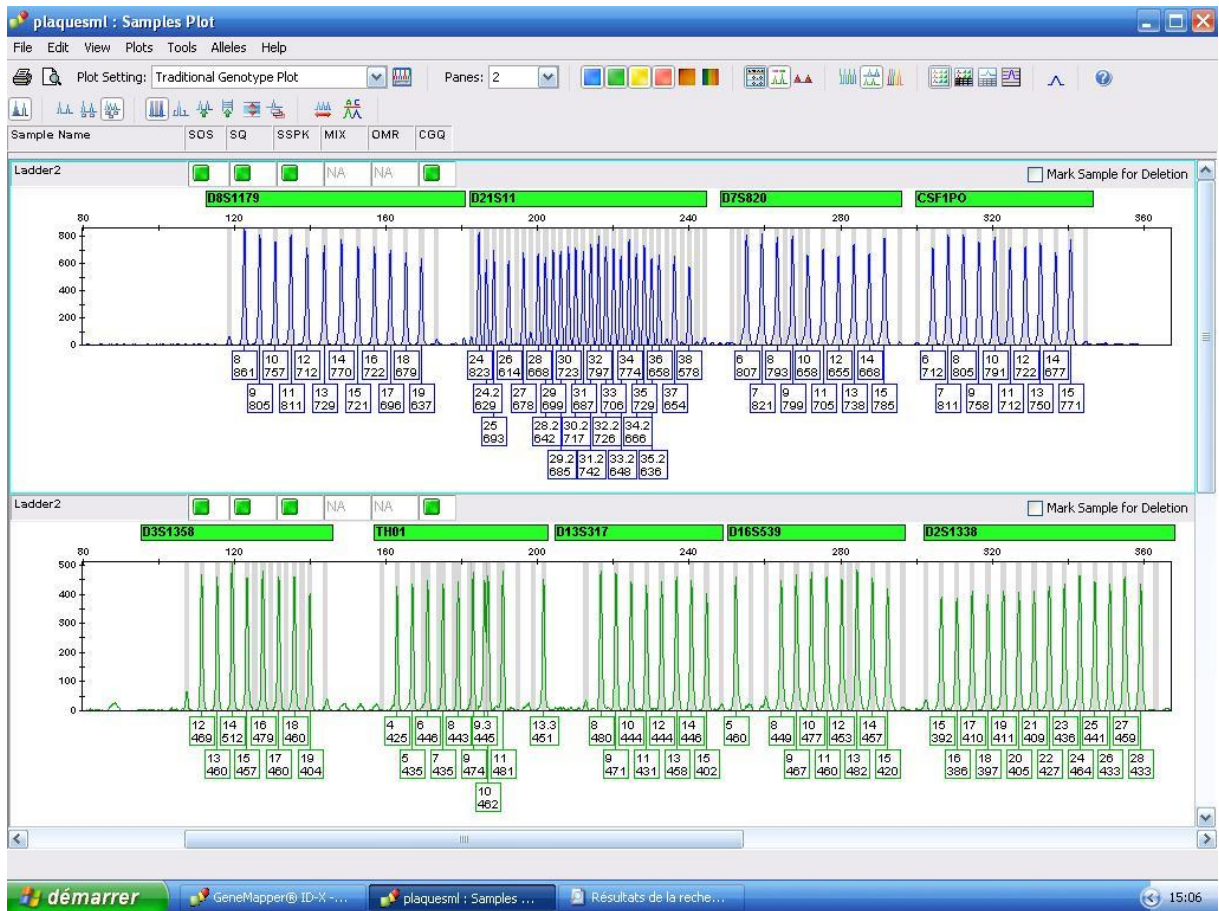
Mix 9 µl x (n)	Volume totale du Mix
Standard de taille LIZ + HI-DI formamide	( 8,7 µl Formamide + 0.3 de LIZ).n n : nombre d'échantillons + (T-) et(T+)

## Annexe 9 :liste des loci analysés sur ADN autosomal .

Locus	Emplacement chromosomique	Échelle allélique
D8S1179	8	Entre 8 et 19
D21S11	21q11.2-q21	Entre 24.2 et 38
D7S820	7q11.21-22	Entre 6 et 15
CSF1PO	5q33.3-34	Entre 7 et 15
D3S1358	3p	Entre 9 et 19
TH01	11p15.5	Entre 5 et 11
D13S317	13q22-31	Entre 5 et 15
D16S539	16q24-qter	Entre 5 et 15
D2S1338	2q35-37.1	Entre 15 et 28
D19S433	19q12-13.1	Entre 9 et 18.2
vWA	12p12-pter	Entre 11 et 22
TPOX	2p23-2per	Entre 8 et 12
D18S51	18q21.3	Entre 9 et 26
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X et Y
D5S818	5q21-31	Entre 7 et 16
FGA	4q28	Entre 16.2 et 30



Annexe 10 : La figure ci-dessus représente le LADDER ou standar allélique pour les 15 marqueurs étudiés plus l'mélogénine ( marqueur qui détermine le sex ).



Annexe 11 : le standart externe ( Alléle Ladder ).

Annexe 12 : Paramètre pour validation de profile génétique

The figure shows the 'Login to GeneMapper® ID-X' dialog box. On the left, there is a logo for GeneMapper ID-X Software Version 1.1 by Applied Biosystems. The main area contains three input fields: 'User Name' with the value 'gmidx', 'Password' (empty), and 'Database Host' with the value 'sdpst-5b4c74755'. At the bottom, there are six buttons: 'New Host...', 'Delete Host', 'Default Host', 'OK', 'Exit', and 'Help'. The copyright notice '© 1999-2008 Applied Biosystems. All Rights Reserved.' is visible at the bottom of the dialog.

Figure ci-dessus représente le logiciel GeneMapper ID-X.



**Annexe 13 : Statistiques descriptives pour les séries de mesures de répétabilité et de reproductibilité .**

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
Répétabilité	5	1,96	0,415933	21,2211%	1,6	2,5	0,9
Reproductibilité 1	5	0,584	0,438497	75,0852%	0,12	1,3	1,18
Reproductibilité 2	5	0,3666	0,217435	59,3111%	0,033	0,6	0,567
Total	15	0,9702	0,806942	83,1727%	0,033	2,5	2,467

**Annexe 14: Statistiques descriptives pour la série de dilution ( sensibilité ).**

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
1	3	1,63333	0,23094	14,1392%	1,5	1,9	0,4
1/2	3	0,333333	0,057735	17,3205%	0,3	0,4	0,1
1/4	3	0,1	0,034641	34,641%	0,06	0,12	0,06
1/8	3	0,0513333	0,00665833	12,9708%	0,044	0,057	0,013
1/16	3	0,0303333	0,00251661	8,29652%	0,028	0,033	0,005
1/32	3	0,0226667	0,00251661	11,1027%	0,02	0,025	0,005
Total	18	0,361833	0,600887	166,067%	0,02	1,9	1,88