

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahlab Blida
Faculté de Sciences de la nature et de la vie
Département de biologie-physiologie cellulaire



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

Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Génétique et physiologie

VALIDATION INTERNE DE LA PLATEFORME ROBOTIQUE JANUS
ET CONFIGURATION D'UN PROTOCOL ROBOTISE POUR
L'ETABLISSEMENT D'UN PROFIL GENETIQUE À PARTIR DE
PRELEVEMENT D'ADN SUR CARTE FTA.

Réalisé par
BENNACER Rayan

Mme A EDDAIKRA	MAA	USDB1	Présidente
Mme A CHERRALLAH	MCB	USDB1	Examinatrice
Mr. R MOHAMED SAID	MCB	USDB1	Promoteur
Mme M BESSAKRI	Experte en identification génétique	INCC-GN	Co promotrice
Mme K TAHRI	Experte en identification génétique	INCC-GN	Invitée

Soutenu publiquement : le 2Juillet 2018

Remerciements

En préambule à ce mémoire, j'aimerais rendre hommage à tous ceux qui de loin ou de près m'ont apportés leurs aides et leurs encouragements durant l'élaboration de mon sujet de fin d'étude.

Je tiens tout d'abord à remercier mon responsable de filière et mon encadreur, Monsieur R.MOHAMED SAID pour ses conseils, ses explications et sa disponibilité.

Je souhaite notamment remercier Madame M.BESSAKRI qui m'a formé pour toutes les techniques que j'ai pu utiliser pendant mon stage, me permettant ainsi d'être autonome.

Je suis sensible à l'honneur que me fait Madame A.EDDAIKRA. de présider le jury de ce travail. Qu'elle veuille accepter mon profond respect et mon immense estime.

Je suis particulièrement heureuse que Madame A.CHERRALLAH. fasse l'honneur de faire partie du jury de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de mes sentiments les plus distingués.

Je remercie particulièrement Mr le Colonel Sid-Ahmed BOUREMANA ,directeur général de l'institut national de criminalistique et criminologie relevant de la gendarmerie nationale, pour m'avoir permis de réaliser mon stage au sein de cette prestigieuse enceinte, un véritable joyau au plan organisationnel ,infrastructurel ,mais surtout au plan de la qualification humaine qui assure un « veille criminalistique » permanente au service de l'Etat de droit.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les membres du département de biologie notamment à madame K. TAHRI pour sa serviabilité et ses conseils.

Dédicace

A mes chers parents,

*Qui n'ont cessé de me supporter tout au long du chemin et dans l'affection
et la patience ne m'ont jamais fait défaut.*

*Qui m'ont indiqués la bonne voie en me rappelant que la volonté et la
patience mèneront au Chemin de réussite.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer le respect, l'amour et la reconnaissance
que je vous porte, et rien ne saurait jamais compenser les sacrifices que vous
avez consentis pour mon éducation.*

*Vous trouveriez dans ce modeste travail, le fruit de vos efforts et vos précieux
conseils.*

*Puisse dieu vous combler de santé, de bonheur et de prospérité et vous
accorde longue vie.*

A ma famille,

Qui m'a beaucoup soutenue et encouragée tout au long de mes études.

Aucun mot ne saurait exprimer tout mon amour et toute ma gratitude.

A mes amis,

Dounia , Fulla, Meriem , Sara, Houda , Joe

*Pour les meilleurs instants que nous avons passés ensemble, pour l'affection
que nous avons senti, que nous serons amis pour la vie.*

*Une spéciale dédicace à cette personne qui compte énormément pour moi et
surtout pour avoir su me supporter tout au long de mon parcours. Merci*

Abdou

Résumé

Le profil génétique correspond au résultat d'une analyse génétique, à partir d'une petite quantité de tissu ou liquide biologiques et qui permet à chaque être humain d'être génétiquement unique.

Depuis plusieurs années l'automatisation s'est imposée dans la plus grande partie des Laboratoires des machines d'analyses ont été développées réalisant de façons autonomes des opérations de plus en plus complexes qui nécessitaient jusque-là une intervention humaine.

L'objectif du travail envisagé consiste principalement à étudier l'efficacité de l'utilisation de la plateforme robotique JANUS qui permet l'automatisation des étapes de la chaîne d'analyse des échantillons, par une validation interne qui est donc un ensemble d'opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte pour avoir confiance dans les résultats fournis. et par une vérification des performances d'une méthode d'analyse qui comprend deux étapes :

- ✓ La détermination des critères de performance pertinente qui sont habituellement : la linéarité, la fidélité, la justesse et la robustesse.
- ✓ La réalisation des vérifications expérimentales selon la procédure établie par le laboratoire.

Cette validation a abouti à l'établissement de profils génétiques le recours à cette démarche est plus que nécessaire lorsque le nombre d'échantillons à traiter est élevé, le prélèvement salivaire, dans la présente étude est particulièrement approprié pour la collecte d'échantillon des individus de façon rapide et efficace.

Pour cela, Nous mettons en jeu, un nombre important de prélèvement salivaire ce qui à démontrer l'efficacité du mode automatisé du robot dans l'obtention de résultats fiables. Et que cette méthode apporte un réel intérêt lorsqu'un nombre important d'échantillons est acheminé au laboratoire, et qu'il serait judicieux d'effectuer toutes les étapes d'analyse en mode automatisé

Mots clés : Profils génétique, validation interne, linéarité, la fidélité, la justesse et la robustesse.

Abstract

The genetic profile is the result of a genetic analysis, from a small amount of tissue or biological fluid that allows each human being to be genetically unique.

For several years, automation has become essential in most of the laboratories of analytical machines have been developed autonomously performing increasingly complex operations that previously required human intervention.

The objective of the proposed work is mainly to study the efficiency of the use of the JANUS robotic platform which allows the automation of the steps of the sample analysis chain, by an internal validation which is therefore a set of operations necessary to prove that the protocol is accurate enough to trust the results provided. and by a performance check of an analysis method that includes two steps:

- The determination of the relevant performance criteria that are usually: linearity, fidelity, accuracy and robustness.
- The carrying out of the experimental verifications according to the procedure established by the laboratory

This validation has led to the establishment of genetic profiles the use of this approach is more than necessary when the number of samples to be treated is high, salivary sampling, in this study is particularly appropriate for the collection of samples of individuals quickly and efficiently.

For this, we bring into play, a large number of salivary sampling which demonstrates the effectiveness of automated robot mode in obtaining reliable results. And that this method brings a real interest when a large number of samples are sent to the laboratory, and it would be wise to perform all the analysis steps in automated mode

ملخص

إن المظهر الوراثي هو نتيجة تحليل جيني ، انطلاقاً من كمية صغيرة من الأنسجة أو سوائل بيولوجية التي تسمح لكل إنسان أن يكون فريداً وراثياً.

منذ عدة سنوات، أصبحت الأتمتة ضرورية في معظم المختبرات من آلات التحليل وقد تم تطويرها بشكل مستقل سمحت بأداء عمليات معقدة بشكل متزايد والتي كانت على وقت قريب، تتطلب تدخل اليد البشرية. الهدف من العمل المقترح هو بشكل أساسي دراسة كفاءة استخدام منصة JANUS الآلية التي تسمح بأتمتة خطوات سلسلة تحليل العينات ، من خلال التحقق الداخلي الذي هو بالتالي مجموعة من العمليات من الضروري إثبات أن البروتوكول دقيق بما فيه الكفاية ليثق في النتائج المقدمة. وبتحقق الأداء من طريقة التحليل التي تتضمن خطوتين:

- تحديد معايير الأداء ذات الصلة التي عادة ما تكون: الخطية والإخلاص والدقة والمتانة.
- تنفيذ التحقق التجريبي وفقاً للإجراء الذي حدده المختبر.

وقد أدى هذا التحقق إلى إنشاء ملفات جينية لاستخدام هذا النهج أكثر من اللازم عندما يكون عدد العينات المراد علاجها مرتفعاً ، وأخذ العينات اللعابية ، في هذه الدراسة مناسباً بشكل خاص لجمع عينات من الأفراد بسرعة وكفاءة.

لهذا ، نضع في الاعتبار ، عدد كبير من أخذ العينات اللعابية مما يدل على فعالية وضع الروبوت الآلي في الحصول على نتائج موثوقة. وأن هذه الطريقة تجلب اهتماماً حقيقياً عند إرسال عدد كبير من العينات إلى المختبر ، وأنه من الحكمة إجراء جميع خطوات التحليل في الوضع التلقائي ، يمكن للبرنامج تشغيل الاختبار المحدد لعدد كبير من العينات يصل إلى ستة (6) لوحات. ومع ذلك ، حتى إذا كانت الاختبارات التي أجريت جعلت من الممكن الحصول على نتائج موثوقة وقابلة للتكرار ، يجب أن يظل المختبر كذلك تقييم الاهتمام الحقيقي باستخدام هذه التقنية الروبوتية ، بالنظر إلى التكاليف الناتجة عن هذا التحليل.

Liste des abréviations

µl: Micro litre

A : Adénine

AD : Acide désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

C : Cytosine

CV : Coefficient de variation

dNTP : Désoxynucléotides triphosphate

EDTA : Acide éthylènediamine tétraacétique

G : Guanine

INCC : Institut National de Criminalistique et Criminologie

ISO : International Standardisation Organisation

kb : kilobase (=1000 bases)

pb : Paire de bases

pH : Unité de mesure d'acidité, sur une échelle allant de 1 à 14.

Tris-HCL : Trishydroxyméthylaminométhane.

Liste des tableaux

Tableau 1	Les différents supports d'ADN	Page 7
Tableau 2	Tableau des essais établis pour l'étude des volumes distribués	Page 20
Tableau 3	Les essais établis pour l'étude d'aspiration du tampon de lavage	Page 23
Tableau 4	: Préparation du MixPCR premier essai	Page 23
Tableau 5	: Préparation du Mix PCR (deuxième essai)	Page 24
Tableau 6	Préparation du control positif dilué	page 25
Tableau 7	Plan de plaque expriment les résultats obtenus	Page 36

Liste des figures

Figure 1 Le génome humain.	Page 3
Figure 2 Exemple de microsatellite répété en tandem.	Page 4
Figure 3 Etape de création d'un test de distribution du tampon pour le premier lavage	Page 18
Figure 4 Plan de distribution des disques de poinçonnage sur le BSD 600.	Page 21
Figure 5 Etapes de distribution des échantillons amplifiés de la première plaque vers la deuxième (deuxième essai).	Page 26
Figure 6 Diagramme des principaux facteurs pouvant influencer les résultats	Page 30
Figure 7 Graphe retraçant les coefficients de variation des deux allèles	Page 31
Figure 8 Profil génétique (premier réplica)	Page 33
Figure 9 Profil génétique (deuxième réplica)	Page 34
Figure 10 Profil génétique (troisième réplica)	Page 35
Figure 11 Témoin négatif d'amplification	Page 36

Sommaire

Introduction

Première partie : Généralités

Chapitre I : Les particularités du génome humain utilisées en identification génétique

I.1- Polymorphismes de l'ADN nucléaire..... Page 3

I.1.1- Les marqueurs STR autosomiquesPage 3

I.1.2- Les marqueurs STR sexuels (chromosome Y)Page 4

I.1.3- Les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) Page 4

I.2- Les régions hypervariables de l'ADN mitochondrial Page 5

Chapitre II : L'établissement d'un profil génétique comme outil d'identification humaine

II.1- Les différents supports d'ADNPage 6

II.2- Différentes étapes d'analyse d'ADN à partir d'un prélèvement salivaire ..Page 8

II.2.1- Prélèvement de la salive..... Page 8

II.2.2- Extraction d'ADN.....Page 8

II.2.2.1- Définition et base de la technique d'extraction.....Page 8

II.2.2.2- Avantages de la technique d'extraction sur cartes FTA.....Page 9

II.2.3- Amplification d'ADN par PCRPage 9

II.2.3.1- PrincipePage 10

II.2.3.2- Les étapes de la PCRPage 10

II.2.3.3- Les différents kits commerciaux d'amplification des STR.....Page 11

II.2.4- Analyse des produits amplifiés par électrophorèse capillaire.....Page 11

II.3- Concordance de profils génétiques et calcul de probabilitésPage 12

II.4- Les banques de données ADNPage 12

Chapitre III : L'automate de distribution des liquides Janus®

III.1- Présentation de la plateforme robotique Janus Page 13

III.2- Fonctionnement général du Janus.....Page 13

III.3- Avantages de l'automatisation des étapes d'analyse ADN.....Page 13

Chapitre IV : La validation des méthodes d'analyse

IV.1- Définition et principePage 14

IV.2- Paramètres de la validation.....Page 15

IV.2.1- La fidélité.....Page 15

IV.2.1.1- La réplicabilitéPage 15

IV.2.1.2- La répétabilitéPage 15

IV.2.1.3- La fidélité intermédiaire.....Page 15

IV.2.2- La justesse.....Page 15

IV.2.3- La linéarité.....	Page 15
IV.2.4 -Robustesse	Page 15

Deuxième Partie : Expérimental

Chapitre I : Matériel et méthodes.....	Page 16
Objectif	Page 16
I.1-Matériel	Page 16
I.1.1 Réactifs et Kits.....	Page 16
I.1.2 - Echantillons	Page 16
I.2-Méthodes d'étude.....	Page 17
I.2.1- Préparation des échantillons.....	Page 17
I.2.1.1 - Etablissement d'un plan de plaque pour le dépôt des échantillons à tester.....	Page 17
I.2.2 Préparation de la plateforme robotique.....	Page 17
I.2.3 - Création d'un test de distribution du tampon de lavage.....	Page 17
I.2.3.1- Distribution du tampon pour le premier lavage	Page 17
I.2.3.2 Etude des volumes distribués	Page 18
I.2.4- Poinçonnage des cartes FTA par l'appareil semi automatique –BSD 600	Page 20
I.2.5- Mise en application de l'agitateur et la centrifugeuse par un test préprogrammé.....	Page 21
I.2.6 - Création d'un test d'aspiration pour l'élimination du tampon de lavage déposé.....	Page 21
I.2.6.1-Elimination du tampon du premier lavage.....	Page 21
I.2.6.2-Etude des paramètres d'aspiration	Page 21
I.2.7- Etablissement du deuxième lavage	Page 22
I.2.7.1- Distribution, lavage et élimination du tampon pour le deuxième lavage..	Page 22
I.2.7.2 - Etude d'aspiration de l'excès du tampon de lavage	Page 22
I.2.8 - Amplification	Page 23
I.2.8.1 - Préparation des Mix.....	Page 23
I.2.8.1.1 - Premier essai	Page 23
I.2.8.1.2-. Deuxième essai.....	Page 24
2.8.1 - Dilution du contrôle positif à une concentration optimale	Page 24
2.8.2 - Les étapes d'amplification.....	Page 25
2.9 - Post amplification	Page 25

I.2.9.1- Distribution du mix post-amplification sur une nouvelle plaque 96 puits	Page 25
I.2.9.2-Distribution des échantillons amplifiés de la première vers la deuxième plaque.....	Page 25
I.2.9.3-Remplissage des puits vides par le formamide.....	Page 26
I.2.9.4-Distribution de L'Allelic Lader	Page 27
I.9.4.1 -Premier essai	Page 27
I.9.4.2- Deuxième essai	Page 27
I.9.4.3-Troisième essai.....	Page 27
I.10- Electrophorèse capillaire.....	Page 27
Chapitre II : Résultats et discussion.....	Page 28
I.Configuration des protocoles de chaque étape	Page 28
1-Configuration du protocole du premier lavage	Page 28
2- Configuration du protocole du deuxième lavage.....	Page 28
3- Configuration du protocole d'amplification	Page 29
4- Configuration du protocole de poste amplification	Page 29
Résultats Final.....	Page 30
II.Exploitation des résultats	Page 30
1-Evaluation des coefficients de variation (CV) pour les hauteurs de pics.....	Page 30
2-Evaluation des profils génétiques par réplicas	Page 32
3- Evaluation générale	Page 37
Conclusion.....	Page 38

La médecine légale concerne de larges domaines et va trouver beaucoup d'applications à notre époque. L'analyse de l'ADN est utile pour déterminer la filiation entre les individus, mais aussi en criminalistique pour rechercher des personnes disparues, ou encore pour l'identification de victimes lors d'une catastrophe de masse. Les techniques d'identification les plus efficaces aujourd'hui sont basées sur l'ADN, ce sont les empreintes génétiques. Il existe de nombreuses sources d'ADN : cheveux, salive, sang, sperme, dents...

Dans ce contexte, il nous apparaît important de se questionner autant sur le cheminement de la preuve par l'ADN que sur les différentes techniques employées pour aboutir au profil génétique notamment l'extraction, l'amplification et l'analyse par électrophorèse capillaire. Lorsqu'un nombre important d'échantillons est acheminé au laboratoire serait-il plus prudent d'effectuer toutes ces étapes d'analyse en mode manuel ou bien faudra-t-il passer vers l'automatisation? Et dans ce cas précis, Comment évaluer et vérifier l'efficacité du mode automatisé pour obtenir des résultats fiables ?

Nous tenterons de répondre à ces diverses questions et plus encore, au fil du présent essai qui comporte deux parties :

- la première partie représente les généralités relatives à l'analyse de l'ADN utilisé pour mettre en évidence le profil génétique en vue de l'identification humaine,
- La deuxième partie est expérimentale comportant, un chapitre portant sur Matériel et méthode, un chapitre Résultats et discussion.

Dans la première partie, nous aborderons l'aspect fondamental de l'ADN porteur de l'information génétique en tant que « fondement moléculaire du patrimoine génétique, l'ADN est présent dans toutes les cellules des organismes vivants », d'ailleurs, l'analyse de l'ADN d'une personne peut notamment être effectuée à partir d'un prélèvement de sang, de sperme, de salive, de peau, d'os, de cheveux ou de toute autre substance corporelle. Nous nous attarderons aussi au processus analytique en vue de l'obtention des profils génétiques, nous aborderons quelques aspects entourant l'avènement des tests d'ADN au laboratoire d'identification génétique de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale (INCC/GN). Nous verrons qu'il existe plus d'une technique (extraction ; amplification et post amplification) pour arriver à identifier le profil génétique par la mise en évidence de courtes séquences répétitives d'ADN dont le nombre de répétitions est caractéristique de chaque individu

Dans la deuxième partie, nous nous pencherons sur l'étude de la validation interne de l'utilisation de la plateforme robotique JANUS au niveau dudit laboratoire en vue de

l'établissement de profils génétiques, procédure nécessaire au laboratoire lorsque le nombre d'échantillons à traiter est élevé. Nous mettrons ainsi en œuvre des procédures de vérification de la mise en marche et de l'efficacité de l'automatisation, et ce, grâce au suivi de quatre critères qui sont : la répétabilité, la précision intermédiaire, la sensibilité et la linéarité. A cet effet, un échantillonnage des prélèvements de salive nous a été fourni par le laboratoire sur des cartes FTA prélevés d'individus consentants et anonymes.

A la fin, nous prendrons connaissance de l'impact de l'automatisation en évaluant le rendement et la production des profils génétiques réalisés dans cette étude.

Chapitre I Les particularités du génome humain utilisées en identification génétique

L'identification génétique est réalisée en utilisant des marqueurs sur les chromosomes autosomiques, le chromosome X et Y et l'ADN des mitochondries.

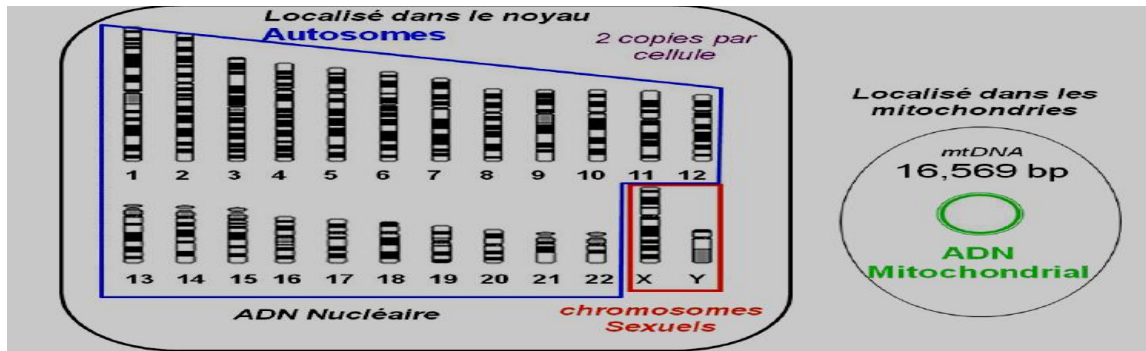


Figure 1 Le génome humain (Bultter ,2009).

L'ADN, est le support des gènes (séquences codantes), toutefois, les séquences qui sont non codantes composent la partie la plus importante du génome. Cette partie non codante est extrêmement variable ; c'est ce qui constitue « le polymorphisme ». Il se caractérise par l'existence de marqueurs au sein du génome qui sont des variations particulières de l'ADN et qui peuvent être facilement détectées grâce aux méthodes de biologie moléculaire (Solena, 2009). Ainsi on distingue

I.1- Polymorphismes de l'ADN nucléaire

L'ADN nucléaire est présent dans chacune des cellules de notre organisme (à l'exception des globules rouges). Les marqueurs principalement utilisés sont les STR (*Short Tandem Repeat*). Ces séquences sont appelées microsatellites, il s'agit de petites répétitions de motifs nucléotidiques très courts, leur longueur et le nombre de nucléotides varient énormément d'un individu à l'autre, en général entre quinze et vingt quatre marqueurs STR autosomiques (présents sur les chromosomes non sexuels) sont utilisés pour établir un profil génétique. Ils ont été choisis car ils sont facilement amplifiables (courtes séquences) et sont de haute valeur discriminante (grande variabilité interindividuelle) (Catalifaud, 2012).

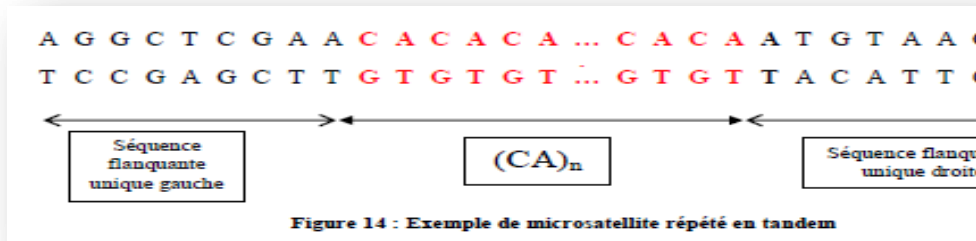


Figure2 Exemple de microsatellite répété en tandem (Soléna , 2009).

I.1.1- Les marqueurs STR autosomiques

Le profil génétique autosomal d'une personne est le plus discriminant. Le profil obtenu après l'analyse des STR autosomiques peut être utilisé pour définir les liens de parenté avec un fort taux de fiabilité. Cependant, ce type d'analyse ne sera pas toujours efficace si les restes humains sont dégradés. L'analyse des microsatellites, qui peut donner des résultats avec de l'ADN dégradé a été mise au point avec de plus courtes séquences (min-STR) pour accroître le taux de réussite dans ce type de situation (**Comité International De La Croix Rouge, 2009**).

I.1.2- Les marqueurs STR sexuels (chromosome Y)

Le chromosome Y humain (ChrY) est le deuxième plus petit chromosome humain avec une longueur d'environ 60 millions de nucléotides. L'extrémité du chromosome Y, qui est nommée la région pseudo-autosomale, se recombine avec les régions homologues du chromosome X. Le reste du chromosome Y (95%) est connu comme la partie non recombinante du chromosome Y, ou NRY. Le NRY reste le même de père en fils à moins qu'une mutation ne se produise (**Solena, 2009**).

Il est possible d'analyser plusieurs microsatellites (STR) se trouvant sur le chromosome Y résultant en un haplotype Y, afin de comparer les restes d'une personne décédée avec ses proches masculins de même lignée paternelle (notamment les frères, les oncles ou les cousins). Cela peut être utile en l'absence de parents avec lesquels effectuer une comparaison de profils génétiques. Comme l'ADN mitochondrial, les marqueurs du chromosome Y ne permettent pas d'effectuer une comparaison aussi fiable que ceux des chromosomes autosomiques, car l'haplotype Y n'est pas unique et peut être commun à des personnes qui

n'ont que de vagues liens de parenté. Les STR des chromosomes X peuvent aussi être utiles dans certains cas particuliers (**Comité International De La Croix Rouge, 2009**).

I.1.3- Les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)

Les SNPs sont des marqueurs bialléliques correspondant à la substitution d'un seul nucléotide à une position spécifique dans le génome. Ce qui crée des allèles différentes qui sont à l'origine d'une mutation d'une cellule germinale qui a échappé au système de réparation de l'ADN, et donc la mutation a été transmise à la descendance. Selon l'endroit d'apparition, l'effet est différent ce qui crée des allèles distincts (**Solena , 2009**).

Le SNP est donc un polymorphisme de séquence qui suscite depuis peu un engouement grandissant dans le domaine de l'identification génétique humaine. Ces marqueurs se révèlent intéressants pour l'analyse de prélèvements biologiques dégradés, mais également dans les tests de paternité. Outre leur utilisation à des fins médico-légales, les SNP constituent également des marqueurs de choix en anthropologie moléculaire pour distinguer différents groupes (ou haplogroupes) au niveau des lignées paternelles et maternelles et estimer ainsi l'origine ethnique des individus étudiés (**Keyse et Petkovski , 2006**).

I.2- Les régions hypervariables de l'ADN mitochondrial

L'ADN, mitochondrial (ADNmt) est une petite chaîne d'ADN, circulaire qui ne contient que 16 569 paires de base. Il se trouve dans les organites qui produisent l'énergie cellulaire, appelées mitochondries (**Quintana-Murci et al .,1999**).

L'avantage de l'utilisation de l'ADN mitochondrial est qu'il est présent en multiples exemplaires dans la cellule, et donc plus facile à récupérer sur des restes qui ne sont pas bien conservés. L'ADN mitochondrial est uniquement transmis aux enfants par la mère. Les restes d'une personne peuvent ainsi être comparés avec l'ADN des ascendants ou descendants de même lignée maternelle (mère, grand-mère, sœur, etc.) (**Comité International De La Croix Rouge , 2009**)

Chapitre II L'établissement d'un profil génétique comme outil d'identification humaine.

Le profil génétique correspond au résultat d'une analyse génétique, à partir d'une petite quantité de tissu ou liquide biologiques et qui permet à chaque être humain d'être génétiquement unique.

L'ADN, est utile dans le cadre de programmes d'identification de restes humains et d'enquêtes pénales pour plusieurs raisons, ainsi il permet

- D'identifier directement ou indirectement des personnes concernées par une infraction,
- D'établir des liens entre dossiers exclusivement via les banques nationales de données ADN,
- De vérifier des liens de parenté.
- D'exclure l'implication présumée de certaines personnes .

II.1- Les différents supports d'ADN

Sur chaque scène de crime, plusieurs types de traces sont retrouvées, dans des conditions diverses (visibles, latentes, partielles, imparfaites) et en des quantités variables qui seront résumés dans le tableau suivant (**Kebbouche , 2016**)

Tableau 1 Les différents supports d'ADN

Type de traces	Quantité d'ADN nucléaire
➤ Le Sang	▪ Le sang est un élément très important dans une affaire car il permet d'obtenir des profils génétiques mais également de mieux comprendre le déroulement du crime
➤ La salive	▪ La salive a l'avantage d'être présente à de nombreux endroits sur une scène de crime bouteilles, verres, chewing-gum, mégots de cigarettes, etc.
➤ Le sperme	▪ Le sperme est en général une bonne source d'ADN.
➤ Les cheveux	▪ Les cheveux peuvent être une bonne source d'ADN nucléaire mais sont surtout une très bonne source d'ADN mitochondrial.
➤ Les urines	▪ L'urine ne contient normalement que très peu de cellules. Ce n'est pas une bonne source d'ADN.
➤ Dents, Os	▪ Les os, les dents peuvent contenir de bonne quantité d'ADN en fonction de leur état de conservation. Malheureusement l'ADN n'est pas facilement accessible mais reste néanmoins exploitable si l'on ne dispose d'aucun autre élément.
➤ Les ongles	▪ Au niveau des ongles, ceux-ci contiennent également de bonne quantité d'ADN et peuvent donc être utilisés pour identifier une personne.

II.2- Différentes étapes d'analyse ADN à partir d'un prélèvement salivaire

Le prélèvement salivaire est particulièrement approprié pour la collecte d'échantillon des individus de façon rapide et efficace

II.2.1- Prélèvement de la salive

Le prélèvement à partir de la salive et de cellules épithéliales recueillis à l'intérieur de la partie interne de la joue est très simple et rapide à faire grâce aux écouvillons buccaux. Les découvertes et avancées technologiques dans le domaine des tests d'ADN ont également contribué aux taux de succès et à la rapidité d'extraction de l'ADN. Les prélèvements sur individus sont rendus plus simples grâce à l'utilisation de cartes FTA comme suit

- L'écouvillon stérile est frotté légèrement dans la bouche au niveau du dos de la langue, mais aussi des cils de sac gingivaux, des gencives, de la face interne des joues.
- L'extrémité de l'écouvillon est alors pressée contre un papier de la firme Whatman spécialisé dénommé « Indicating FTA Mini Card », de coloration rosée qui indique au dépôt de salive par un virement de couleur blanchâtre. A ce stade, l'ADN, est imprégné dans le papier et peut se conserver pendant 50 ans dans des conditions de température ambiante. Le prélèvement pour analyse est effectué par poinçonnage d'un petit disque à partir de la carte (1.2mm) contenant approximativement la quantité optimale d'ADN pour l'amplification.

II.2.2- Extraction d'ADN

II.2.2.1- Définition et base de la technique d'extraction

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que la PCR. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN mais le principe est à peu près toujours le même

- ✓ On commence en général par une lyse des cellules ou des tissus, consistant éventuellement en un broyage, suivi d'une extraction par des détergents et l protéinase K, qui vont casser les membranes cellulaires et nucléaires et dénaturer les protéines. La solution obtenue est en général très visqueuse, car l'ADN ainsi libéré forme de très longs filaments.
- ✓ Ensuite on utilise généralement du phénol (extraction classique) pour retirer les protéines qui vont se dissoudre dans celui-ci. Il se forme alors un précipité à ce moment l'ADN est

sous forme de pelote. On observe donc une phase organique où se trouvent les protéines et les déchets puis une phase aqueuse avec l'ADN en solution que l'on récupèrera par décantation ou centrifugation car cela fera tomber la pelote d'ADN au fond du tube.

- ✓ Pour éliminer les traces de phénol et d'autres contaminants, ces étapes sont suivies d'une purification de l'ADN.(**Coquoz et al .,2013**).

Plusieurs kits commerciaux sont disponibles qui permettent de faciliter la réalisation de ces étapes d'extraction au laboratoire. L'innovation des cartes FTA représente cependant une manière plus simple pour permettre à la fois trois objectifs extraction, transport et stockage des échantillons d'ADN (**Coquoz et al ., 2013**).

Les papiers FTA contiennent une chimie brevetée de la société Whatman. Cette chimie sur matrice de cellulose permet d'une part la lyse des membranes des cellules déposées et de leurs organelles suivie du largage des acides nucléiques qui seront enchâssés et protégés dans les fibres du support .D'autre part elle inactive les phages, bactéries et virus, les rendant ainsi inertes. Une fois secs, les acides nucléiques sont protégés de la dégradation enzymatique, microbienne, oxydative ou par les radicaux libres, et peuvent être conservés durant plusieurs années à température ambiante. Ces cartes sont disponibles en blanc et en rose. Cartes blanches sont utilisées pour les échantillons faciles à voir, alors que les cartes roses contiennent un produit chimique qui transforme en blanc quand un échantillon est appliqué (voir annexe 1)(**Whatman International**)

II.2.2.2- Avantages de la technique d'extraction sur cartes FTA

L'extraction de l'ADN sur cartes FTA présente d'importants avantages touchant notamment

- ✓ Collecte, transport et stockage à température ambiante
 - Pas de stockage au congélateur
 - Réduction des coûts de transport
- ✓ Inactivation des pathogènes
 - Elimine les risques de contamination pour les personnes manipulant l'échantillon.
 - L'échantillon n'est plus classifié « à risque biologique » et peut être envoyé par la poste
- ✓ Procédure d'isolation d'ADN, limitée à 15-30 minutes
 - Elimine les procédures d'extraction longues et fastidieuses (4-16 heures) (**Whatman International**).

Afin de faciliter le prélèvement et de réduire le temps de manipulation, un système semi automatique de poinçonnage des cartes FTA a été développé. Il est piloté par le logiciel BSD 600 Duet qui permet de programmer des « tests » de poinçonnage en définissant le plan de distribution des punchs sur les plaques et d'exécuter le test sélectionné.

II.2.3- Amplification d'ADN par PCR

II.2.3.1- Principe

La PCR fut décrite pour la première fois par Kary Mullis en 1985. Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase (par exemple la Taq polymérase). Il s'agit en fait d'une répllication in vitro de séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de mettre en évidence le polymorphisme d'un STR à l'aide d'amorces qui s'hybrident aux séquences non polymorphes flanquantes pour produire une très grande quantité d'ADN cible à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel) . Les produits d'amplification sont ensuite analysés à l'aide d'un analyseur de fragments d'ADN par électrophorèse capillaire. La variété des produits d'amplification obtenus permet d'aboutir à des profils qui sont spécifiques des individus. Chaque cycle de PCR comprend les trois étapes suivantes, allant de quelques dizaines de secondes à quelques minutes (**Iglesias et Coquoz ,2009**)

II.2.3.2- Les étapes de la PCR

- ✚ La dénaturation C'est la séparation des deux brins d'ADN, obtenue par élévation de la température à 94°C, dite température de dénaturation. À cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la répllication, est dénaturé les ADN double-brin se séparent en ADN simple-brin (ADN monocaténares). (**Iglesias et Coquoz, 2009**)
- ✚ L'hybridation La deuxième étape s'effectue à une température généralement comprise entre 50 et 65°C, dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, étant de courtes séquences complémentaires, s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, et plus elle est spécifique (**Iglesias et Coquoz, 2009**).
- ✚ L'élongation Elle s'effectue à une température de 72°C, dite température d'élongation. C'est la synthèse du brin complémentaire. Une enzyme polymérase, la Taq polymérase, ajoute à l'extrémité de l'amorce des oligonucléotides présents dans le milieu de réaction. Un thermocycleur, où les montées et descentes en température

sont programmées, permet de réaliser un nombre de cycles déterminé (**Iglesias etCoquoz, 2009**).

II.2.3.3- Les différents kits commerciaux d'amplification des STR

Un certain nombre de kits sont disponibles pour l'amplification PCR simple ou multiplex de marqueurs STR utilisés dans le typage de l'ADN(voir annexe 15). Deux fournisseurs principaux pour les kits STR utilisés par la communauté d'ADN médico-légale la société Promega et Applied Biosystems (**Iglesias etCoquoz, 2009**).

Ces kits ont été conçus pour employer la capacité de détection multicolorée de l'appareil d'analyse génétique (ABI® Genetic Analyzer 3130, par exemple). Une des amorces de chaque marqueur amplifié par ces kits est couplée à un fluorochrome. Ces substances fluorescentes qui émettent à différentes longueurs d'onde, sont détectées sur l'ABI dans le bleu, le vert, le jaune, le rouge et dans l'orange selon leurs longueurs d'onde. Ces différences de longueur d'onde permettent ainsi la co-amplification simultanée de différents marqueurs avec des gammes de taille se chevauchant dans un seul tube PCR et la détection en une seule injection en électrophorèse capillaire (**Iglesias etCoquoz, 2009**).

A l'exception des kits d'amplification des marqueurs du chromosome Y, ces kits sont des multiplex qui permettent l'amplification de plusieurs marqueurs STR situés sur différents chromosomes (**Iglesias etCoquoz, 2009**).

II.2.4- Analyse des produits amplifiés par électrophorèse capillaire

L'analyse des marqueurs microsatellites(Voir annexe 02) est réalisée par un séquenceur « Applied Biosystem 3130xl Genetic Analyzer ». Cet appareil possède 16 capillaires et peut au maximum étudier deux plaques de 96 puits en un peu moins de dix heures. L'analyse se déroule de la façon suivante l'échantillon, ainsi que le tampon, sont prélevés successivement par les capillaires à partir des plaques à 96 puits. Les capillaires contiennent le gel de migration. L'électrophorèse permet de séparer les différents fragments selon leur taille, les plus petits passant en premier devant la fenêtre de lecture. Celle-ci est composée d'un laser d'excitation et d'un détecteur de la fluorescence émise. La lecture et l'interprétation des résultats sont réalisées avec le logiciel « Genemapper » grâce à l'utilisation de deux échelles ; une échelle de taille pour identifier les tailles en bp (paires de bases) des fragments et une échelle allélique pour déterminer les allèles correspondants à ces fragments(voir annexe 03) (**Iglesias et Coquoz, 2009**).

II.3- Concordance de profils génétiques et calcul de probabilités

Pour pallier les difficultés, les experts vont se livrer à un calcul de probabilités. L'idée est simple. Même si on ne peut certifier que deux profils ADN identiques représentent bien un ADN unique, il est toujours possible d'essayer d'estimer la probabilité d'une coïncidence fortuite. Autrement dit, le résultat d'une expertise ADN n'est pas, contrairement à ce qu'on croit, une affirmation du type « l'ADN retrouvé dans cette trace appartient à telle personne » mais bien une affirmation du type « il y a x probabilités pour que l'ADN retrouvé dans cette trace appartienne à telle personne plutôt qu'une autre prise au hasard dans la population ». Si on peut réfuter, avec une certitude absolue, l'identité entre deux profils, on ne peut en revanche jamais confirmer celle-ci avec une certitude de 100 %. En fait, les chiffres de probabilités couramment calculés par les experts sont tels que le doute paraît exclu. Il n'est pas rare en effet, dans le cas des profils génétiques autosomiques l'ADN, de voir avancées des probabilités proches de un sur plusieurs milliards. Dans le cas des haplotypes Y et de l'ADN mitochondrial, les probabilités de faux positifs sont beaucoup plus élevées, en raison de leur distribution plus fréquente dans la population (lignées paternelles et maternelles).

II.4- Les banques de données ADN

Le développement des banques de données génétiques fait en sorte que de plus en plus de traces prélevées sur les lieux d'un crime mènent à des concordances ou des identifications. L'utilisation des identifications génétiques via la base de données dépend des dispositifs juridiques et des circonstances d'un cas particulier. Si par exemple, une trace concorde avec un individu dans la banque de données, les services de justice doivent quand même décider si cette identification particulière est suffisante pour justifier la mise en accusation du suspect, ou si d'autres éléments de preuve sont nécessaires (Alleyne *et al* .,2009)

Chapitre III L'automate de distribution des liquides Janus®

Depuis plusieurs années l'automatisation s'est imposée dans la plus grande partie des laboratoires. Des machines d'analyses ont été développées réalisant de façons autonomes des opérations de plus en plus complexes qui nécessitaient jusque-là une intervention humaine. Les moyens modernes en informatique et en robotique mettent à disposition des outils extrêmement puissants qui n'ont pas fini d'influencer la façon de travailler dans les sciences

forensiques .parmi ces outils on distingue la plateforme robotique JANUS® (Voir annexe 04)(Coquoiz *et al.*,2013).

III 1- Présentation de la plateforme robotique Janus

Le robot JANUS® est un système automatique de manipulation de liquides permettant l'automatisation des étapes de préparation des échantillons. Le système est piloté par le logiciel WinPREP® for JANUS®, qui rend possible la programmation de différentes combinaisons de procédures et la personnalisation d'un test selon un protocole donné(**Guide Janus , 2014**).

III 2- Fonctionnement général du Janus

Le plateau d'équipement de laboratoire ou « Deck », est l'espace de travail de la plateforme robotique, où seront positionner les différents accessoires et consommables nécessaires au protocole, nome « labware »

La configuration des testes au moyen du logiciel permet de définir les trajectoires du gipper et du varispan propres à chaque protocole. Le logiciel permet par la suite d'exécuter le test sélectionné pour le nombre d'échantillons prescrit (maximum 6plaques 96puits) (**Guide Janus , 2014**).

III .3- Avantages de l'automatisation des étapes d'analyse ADN

1. Facile à utiliser	2 .Versatile	3 .Rapide
<p>Création de la méthode en quelques minutes.</p> <p>Logiciel intuitif, pas de connaissances en programmation nécessaires</p> <p>Sélectionner et transférer rapidement et précisément les échantillons à conserver dans de nouveau contenant (plaques à 96 puits).</p>	<p>Programmer toute opération de pipetage standard en plaçant des micro-tubes, des plaques à 96 puits dans un espace de travail configurable à volonté.</p>	<p>Permet de pipeter différents volumes de manière précise et reproductible de tous les réactifs, de mix et de tous les échantillons d'ADN.</p> <p>Conçu pour obtenir le meilleur des performances en pipetage toute en minimisant le risque de contamination de liquide.</p>

Chapitre IV La validation des méthodes d'analyse

IV.1- Définition et principe

Dans la pratique courante, après l'étape d'optimisation, il devient de plus en plus évident et essentiel d'appliquer la norme ISO **17025** qui demande de démontrer au moyen de la validation qu'une méthode optimisée correspond à l'usage attendu tout en fournissant, par ailleurs, des résultats fiables. Ces référentiels demandent également d'évaluer l'incertitude des résultats fournis.

La validation est donc un ensemble d'opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé. Pour cela la vérification des performances d'une méthode d'analyse quantitative comprend alors deux étapes

- ✓ La détermination des critères de performance pertinents à établir et le choix des limites d'acceptabilité correspondantes pour la méthode.
- ✓ La réalisation des vérifications expérimentales selon la procédure établie par le laboratoire.

IV.2- Paramètres de la validation

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

IV.2.1- La fidélité

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises (réplicas) dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de réplicabilité, de répétabilité ou de fidélité intermédiaire pour une méthode. La fidélité traduit la distribution des erreurs aléatoires (**Vassault et al . , 2010**)

IV.2.1.1- La réplicabilité

La réplicabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les mêmes conditions expérimentales (**Vassault et al . , 2010**)

IV.2.1.2- La répétabilité

La répétabilité mesurée dans les conditions suivantes même procédure de mesure, même opérateur, même système de mesure, mêmes conditions de fonctionnement, même milieu, même objet de mesure pendant une courte période de temps (**Vassault et al ., 2010**)

Cette évaluation a pour objet de vérifier, dans les conditions réelles d'utilisation, le bon fonctionnement du système analytique. Les données acquises peuvent être ultérieurement utilisées pour mettre en évidence un dysfonctionnement au cours du temps.

IV.2.1.3- La fidélité intermédiaire

Conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode en utilisant des échantillons identiques dans le même laboratoire et des conditions opératoires différentes (opérateur, étalonnage, lot de réactifs, etc.) pendant un intervalle de temps donné. (**Vassault et al .,2010**)

Cette évaluation permet de connaître la variabilité analytique d'une méthode. Ces données sont exploitées pour le calcul de l'incertitude de mesure utile à l'interprétation des résultats (**Vassault et al., 2010**)

IV.2.2- La justesse

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essai et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques (**Vassault et al .,2010**)

IV.2.3- La linéarité

Selon la norme FD V 01-000 « la linéarité est la capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une réponse instrumentale ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon pour le laboratoire. Cette proportionnalité s'exprime au travers d'une expression mathématique définie a priori » (**Feinberg, 1995**).

IV.2.4- Robustesse

Capacité du protocole de rester non affectée par des variations faibles mais délibérément introduites dans les paramètres de la méthode; fournit une indication sur sa fiabilité dans des conditions normales d'utilisation (**Blanchin ,2010**).

Objectif

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'identification génétique, à l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale (INCC/GN) à Bouchaoui (Alger), pendant une période allant du 01-03-2018 au 12-06-2018.

L'objectif de ce travail consiste principalement à étudier l'efficacité de l'utilisation de la plateforme robotique JANUS® qui permet l'automatisation des étapes de la chaîne d'analyse des échantillons, qui aboutira à l'établissement de profils génétiques.

I.1 Matériel

L'expérimentation a nécessité le matériel présent dans l'annexe (13 ; 14)

1.1 Réactifs et Kits

- Formamide HID.
- Kits d'amplification des STR PowerPlex ES16 system (Promega) et PowerPlex Fusion system (Promega). (Voir annexes 7 ;8)
 - Composition des kits
 - Réactifs de Pré-amplification
 - Reaction Mix
 - Primer Mix.
 - Contrôle positif 2800M.
 - Réactifs de Post-amplification.
 - Standard de taille WEN ILS 500.
 - Allelic Ladder.

1.2 .Echantillons

Pour adapter et valider la plateforme robotique JANUS® nous avons travaillé sur un type d'échantillons « Des prélèvements salivaires ». Ces échantillons biologiques ont été prélevés sur 48 personnes consentantes à partir de cellules buccales imbibant un écouvillon qui est frotté sur la face intérieure de la joue du donneur et déposé sur des cartes FTA. Ces échantillons ont été mis à notre disposition par le personnel du laboratoire et sont restés anonymes tout au long de l'étude.

Chaque échantillon salivaire a été traité trois fois afin de vérifier la capacité de la méthode à produire l'ADN de bonne qualité et de quantités suffisantes pour générer des profils génétiques complets.

I.2.Méthode d'étude

I.2.1Préparations des échantillons

2.1.1. Etablissement d'un plan de plaque pour le dépôt des échantillons a tester

Afin d'étudier les paramètres de répétabilité et reproductibilité 48 échantillons ont été testés, chaque échantillon répliqué en trois fois et déposés aléatoirement sur le plan de plaque, de même pour les témoins négatifs et positifs.(voir annexe 16).

I.2.2 Préparation de la plateforme robotique

Le système nécessite d'abord l'initialisation de la plateforme JANUS®, puis l'établissement d'un flush/wash (rinçage /lavage) (voir annexe 5) , qui est test pré-intégré permettant l'élimination des bulles d'aires des tubulures du système pour assurer la précision du pipetage.

I.2.3Création d'un test de distribution du tampon de lavage

2.3.1Distribution du tampon pour le premier lavage

Avant de distribuer les disques de punch des cartes FTA sur la plaque, il a été jugé nécessaire dans un premier temps, de remplir la plaque avec le tampon de lavage afin d'éviter les effets électrostatiques pouvant causer le déplacement imprévu des disques poinçonnés qui sont de petites tailles 1.2mm, vers le haut ou en dehors de la plaque.

Il s'agit de créer un test de « distribution d'un liquide », qui à pour but de déposer un volume de 100µl du tampon de lavage préalablement préparé et déposé sur le plan de travail de la plateforme, avec les embouts appropriés. La distribution du tampon est effectuée suivant le plan de plaque (tout les puits excluant ceux dédiés a l'allelic ladder, les témoins positifs et négatifs d'amplification, le témoin de post amplification et formamide). Une fois le matériel déposé sur le plan de travail (le bol contenant le tampon, les boites d'embouts, la plaque), trois fonctionnalités sont configurées sur le logiciel

- Création du matériel (labware) sur le plan de travail (deck) au niveau du logiciel, ceci s'effectue en sélectionnant le type de matériels à déposer (embouts 175 μ l sur support, bol de réactif sur support, plaque 96puits sur support refroidissant) et les disposer grâce à la souris sur l'emplacement correspondant au plan de travail physique existant. Il faudra alors spécifier les puits concernés par la distribution en les désélectionnant sur le plan de la plaque au niveau du logiciel.
- Création d'un protocole configurant les étapes de distribution de liquide avec les commandes suivantes prise d'embouts - aspiration de liquide - distribution du liquide - rejet d'embouts.
- Mappage du matériel créé avec le protocole s'effectue en glissant chaque matériel configuré à l'aide de la souris vers l'étape correspondante, ainsi chaque matériel est attribué à chaque étape permettant au système de reconnaître les positions réelles pour effectuer chaque commande.

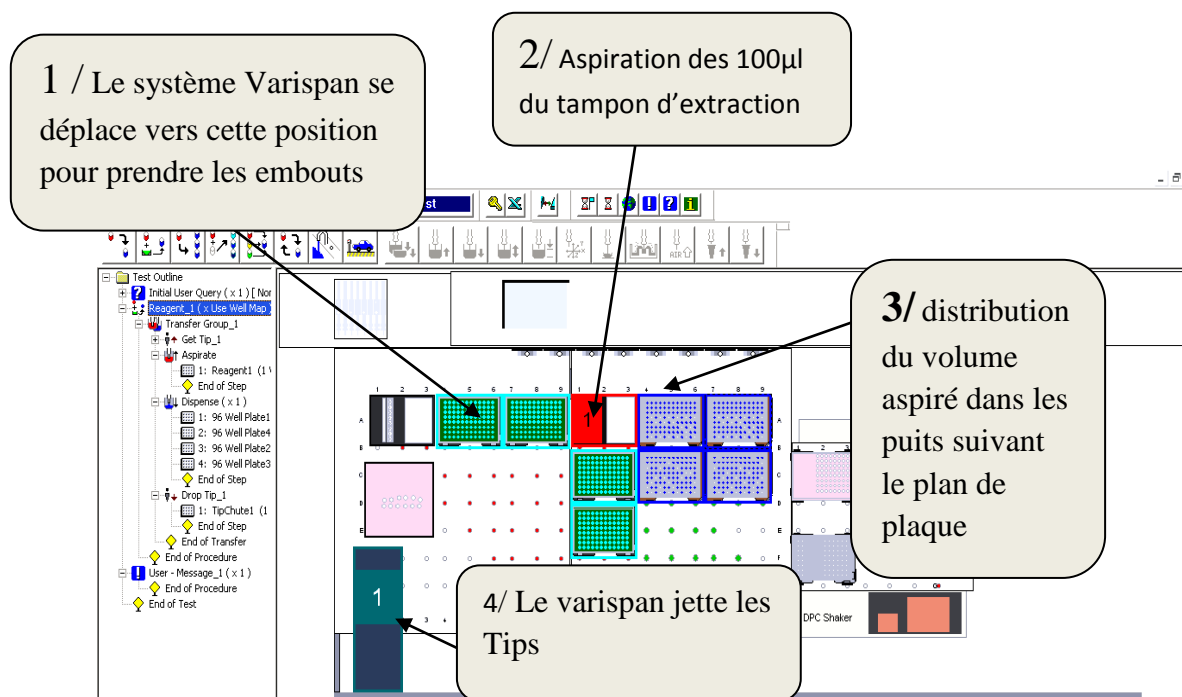


Figure 3 Etapes de création d'un test de distribution du tampon pour le premier lavage

2.3.2 . Etude des volumes distribués

Afin d'effectuer le protocole décrit ci-dessus on a vérifié, en établissant trois essais, les paramètres suivants

- ✓ **Mode** Le système du Varispan prend en charge les fonctionnalités de distribution et aspiration de solution à l'aide du mouvement des seringues et des tubulures remplies d'un liquide.

Deux modes de prise en charge de l'aspiration/distribution existent pour ce système afin de permettre d'effectuer les aspirations et distributions en évitant l'interférence du liquide contenue dans les tubulures avec la solution à manipuler

- **Le mode « Waste »** Le système aspire un volume additionnel de liquide, ce mode est recommandé pour des volumes supérieurs à 50 µl selon les embouts utilisés.
- **Le mode « Blowout »** Le système aspire un vide d'air avant d'aspirer la solution à distribuer et l'élimine après la distribution, ce mode est recommandé pour des volumes inférieurs à 50 µl selon les embouts utilisés.

L'utilisateur choisit le mode à entreprendre selon la solution et le volume à distribuer.

- ✓ **Embouts (Tips)** deux types d'embouts conductifs 175 µl ou 200 µl, sont recommandés pour l'aspiration de volumes allant de 5 µl à 200 µl.
- ✓ **Hauteur de distribution de la solution (Aspirate/Dispense height)** paramètre permettant de définir jusqu'à quelle hauteur l'embout est immergé dans le conteneur désigné avant d'effectuer l'aspiration ou la distribution de la solution. Par défaut le système est instruit à reconnaître la profondeur maximale du conteneur dans le quelle seront immergés les embouts.
- ✓ **Détection de liquide (Liquid tracking)** détermine l'habilité du système à détecter le niveau de la solution à aspirer

Tableau 2 Tableau des essais établis pour l'étude des volumes

Les essais	<u>Premier essai</u>	<u>Deuxième essai</u>	<u>Troisième essai :</u>
Les paramètres changés	<ul style="list-style-type: none"> ○ le Mode Blowout ○ Tips 175µl conductive ○ Dispense Height Labware default ○ Liquid Tracking= 120% 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mode Waste ○ Tips 200 conductive 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tips 175 conductive ○ Mode Waste

I.2.4 Poinçonnage des cartes FTA par l'appareil semi automatique –BSD 600

La plaque est déposée au niveau de l'appareil sur le plateau socle du poinçonneur et son plan est introduit sur le logiciel pilote afin de déterminer les puits concernés par le dépôt des disques de poinçonnage des échantillons. Chaque carte FTA est ensuite enregistrée et faite passée manuellement en dessous de la tête de poinçonnage. Grâce à un laser lumineux pointant en repère au positionnement de poinçonnage, la position de la carte est ajustée selon la tache du dépôt salivaire, pour ensuite être poinçonnée au point désigné après l'application d'une pression sur la pédale positionnée sous le pied de l'utilisateur.

Les cartes FTA (48) sont ainsi présentées au système l'une après l'autre ; chaque disque poinçonné est récupéré dans le puits correspondant selon le plan introduit grâce au déplacement du plateau. Le témoin négatif a consisté au poinçonnage d'une carte FTA à blanc.

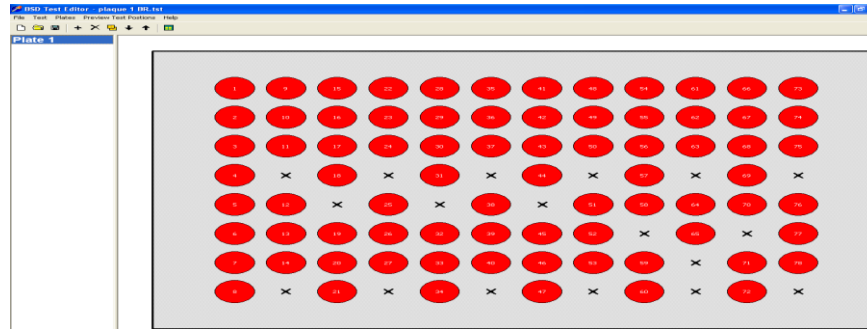


Figure 4 Plan de distribution des disques de poinçonnage sur le BSD 600

La plaque est redéposée sur le plan de travail du Janus.

I.2.5 Mise en application de l'agitateur et la centrifugeuse par un test préprogrammé

Le bras du système (gripper) récupère la plaque du plan de travail et la positionne sur l'agitateur pour effectuer le lavage des disques. L'agitation est programmée pour 3 minutes suivant lesquelles le bras prendra la plaque vers la centrifugeuse pour un quick-spin de 30 seconde permettant de replacés les disques au fond des puits après leur agitation.

I.2.6. Création d'un test d'aspiration pour l'élimination du tampon de lavage déposé

2 .6.1. Elimination du tampon du premier lavage

Le test « aspiration d'un liquide », permettra d'aspirer le volume de 100µl du tampon de lavage à partir des puits de la plaque afin de l'éliminer. Les étapes du protocole sont configurées avec les commandes suivantes prise d'embouts - aspiration de liquide - rejet d'embouts. Le mappage se comprendra les éléments suivants embouts, plaque, poubelle d'élimination des embouts (les embouts sont éliminés avec le volume aspiré du tampon de lavage)

2.6.2 Etude des paramètres d'aspiration

2.6.2.1Premier essai

L'essai a consisté à tester le niveau d'aspiration du tampon de lavage afin d'éviter que les disques des échantillons ne soient affectés par les embouts et/ou prélevés avec la solution aspirée.

Les paramètres

- ✓ **Air de transport (Air gape) = 5 μ l**
- ✓ **Hauteur d'aspiration 2mm en dessus du fond du puits**
- ✓ **Volume d'aspiration=100 μ l**
- ✓ **Détection de liquide 100%**

2.6.2.2Deuxième essai

Les paramètres sont altérés afin de remédier au fait qu'un certain volume restait encore au niveau des puits vidés.

-Airgap=8 μ l

-Aspiration a la surface du liquide

-Volume d'aspiration= 100 μ l

I.2.7. Etablissement du deuxième lavage

2.7.1. Distribution, lavage et élimination du tampon pour le deuxième lavage

Les étapes précédentes sont reprises pour effectuer le deuxième lavage des disques avec le tampon de lavage

- Distribution de 100 μ l du tampon dans la plaque à 96 puits suivant le plan.
- Etablissement d'une agitation et une centrifugation.
- Etablissement un Flush /Wash pour éviter les bulles d'air du système.
- Aspiration des 100 μ l du tampon de lavage.

A la fin du deuxième lavage, il a été nécessaire d'établir une deuxième aspiration afin d'éliminer l'excès de volume du tampon de lavage restant dans les puits

2.7.2 Etude d'aspiration de l'excès du tampon de lavage

Tableau 3 Les essais établis pour l'étude d'aspiration du tampon de lavage

Essais	Premier essai	Deuxième essai
Paramètres changés	Dispense volume = 50µl	Dispense volume = 25µl

I.2.8 Amplification

2.8.1. Préparation des Mix

2.8.1.1. Premier essai

-Utilisation du kit PowerPlex ESI 16 system Fast

Afin de préparer l'amplification, deux réactifs doivent être mélangés pour constituer le mélange réactionnel (appelé Mix PCR)

- Le « reaction mix » contenant la Taq polymérase et son milieu réactionnel.
- Le « primer mix » contenant les amorces pour les marqueurs à amplifier et les dNTPs,

Selon le manuel technique du kit PowerPlex® ESI16 System Fast, le volume final de MasterMix est de 25 µl.

Les proportions des deux composants pour une (01) réaction d'amplification sont comme suit

Tableau 4 Préparation du Mix PCR (premier essai) .

	Réaction Mix	Primer Mix	Eau (pour les disques FTA et le témoin négatif)
Mix PCR 1 réaction	V=5µl	V=2 ,5 µl	V=17 ,5 µl

Le mix est vortexé et séparé sur 2 tubes de 2ml pour être disposés sur le bloc froid au niveau du plan de travail de l'automate.

2.9.1.2. Deuxième essai

-Utilisation du kit PowerPlex Fusion Suite à la rupture de stock du kit ESI Fast, un autre kit a été employé ; PowerPlex Fusion, tout aussi sensible et comportant plus de marqueurs (24 marqueurs).

Le mix de l'amplification est préparé selon les recommandations du pour un volume final de 25 μ l.

Les proportions des deux composants pour une (01) réaction d'amplification sont comme suit

Tableau 5 Préparation du Mix PCR (deuxième essai)

	Réaction Mix	Primer Mix	Eau (pour les disques FTA et le témoin négatif)
Mix PCR 1 réaction	V=5μl	V=5 μl	V=15 μl

Le mix est vortexé et séparé sur 2 tubes de 2ml pour être disposés sur le bloc froid au niveau du plan de travail de l'automate.

2.8.2. Dilution du contrôle positif à une concentration optimale

Le contrôle positif 2800M est livré avec le kit d'amplification à une concentration de 10ng/ μ l. Pour un volume réactionnel final de 25 μ l la concentration optimale recommandée est 0.028ng/ μ l (équivalant à une quantité optimale d'ADN de 0.5ng pour un volume de 17.5 μ l) avec 30 cycles d'amplification. Comme les disques des cartes FTA nécessite un nombre de cycles moins élevé (29 cycles pour ESI et 28 cycles pour Fusion), la concentration du témoin positif a été approximativement doublée (0.04ng/ μ l), la dilution a été donc établie ainsi

Note Le même témoin positif est utilisé pour les deux kits testés.

2.8.3 Les étapes d'amplification

- Distribution de 25 μ l du Mix PCR

- Distribution du mix pour le control positif d'amplification
- Distribution du control positif dilué

Les plaques ainsi préparées pour l'amplification sont placées manuellement au niveau du thermocycleur pour les cycles de la PCR.

Programmes du Thermocycleur

- Le programme de PCR lancé avec le kit ESI 16 system Fast est le suivant

D'abord 96°C pendant 1 minute

Puis 29 cycles

{ 96°C pendant 5 secondes
60°C pendant 35 secondes
72°C pendant 5 secondes

Enfin 60°C pendant 2 minutes

Ainsi lancée, la PCR dure environs une 1heure.

- Le programme de PCR lancé avec le kit Fusion est le suivant

D'abord 96°C pendant 1 minute

Puis 28 cycles

{ 94°C pendant 10 secondes
59°C pendant 1 minute
72°C pendant 30 secondes

Enfin 60°C pendant 20 minutes

Ainsi lancée, la PCR dure environs une 1heure 30 minutes.

I.2.9 Post Amplification

Cette étape requiert la préparation des échantillons pour être lancés sur l'appareil d'électrophorèse capillaire ; le Genetic analyzer 3130xl. Un tel appareil est conçu pour séparer et détecter des fragments d'ADN. Un mélange composé de formamide et d'un standard interne de taille est ajouté au produit de la PCR. Le premier sert à dénaturer les amplicons afin de standardiser les résultats tandis que le second est une échelle standard permettant de calculer le nombre de paires de bases des fragments d'ADN détectés.

2.9.1 Distribution du mix post-amplification sur une nouvelle plaque 96 puits

- Configuration du plan de plaque

- Etablissement d'un Flush/Wash
- Distribution d'un volume de 11 μ l du mix dans les puits d'une nouvelle plaque 96puits selon le plan (l'ensemble des puits mis à part les puits Formamide).

2.9.2 Distribution des échantillons amplifiés de la première vers la deuxième plaque

2.9.2.1 Premier essai

- Distribution de 1 μ l de chaque échantillon amplifié (volume recommandé) à partir de la première plaque vers la nouvelle plaque contenant le mix de post amplification.

2.9.2.2 Deuxième essai consiste en l'ajustement du volume pris de la plaque des échantillons amplifiés de afin d'améliorer la précision d'aspiration

- Préparation d'un nouveau mix post-amplification
- Distribution d'un volume de 11 μ l du mix dans les puits d'une nouvelle plaque 96puits selon le plan (l'ensemble des puits mis à part les puits Formamide).
- Distribution de 2.5 μ l de chaque échantillon amplifié à partir de la première plaque vers la nouvelle plaque contenant le mix de post amplification.

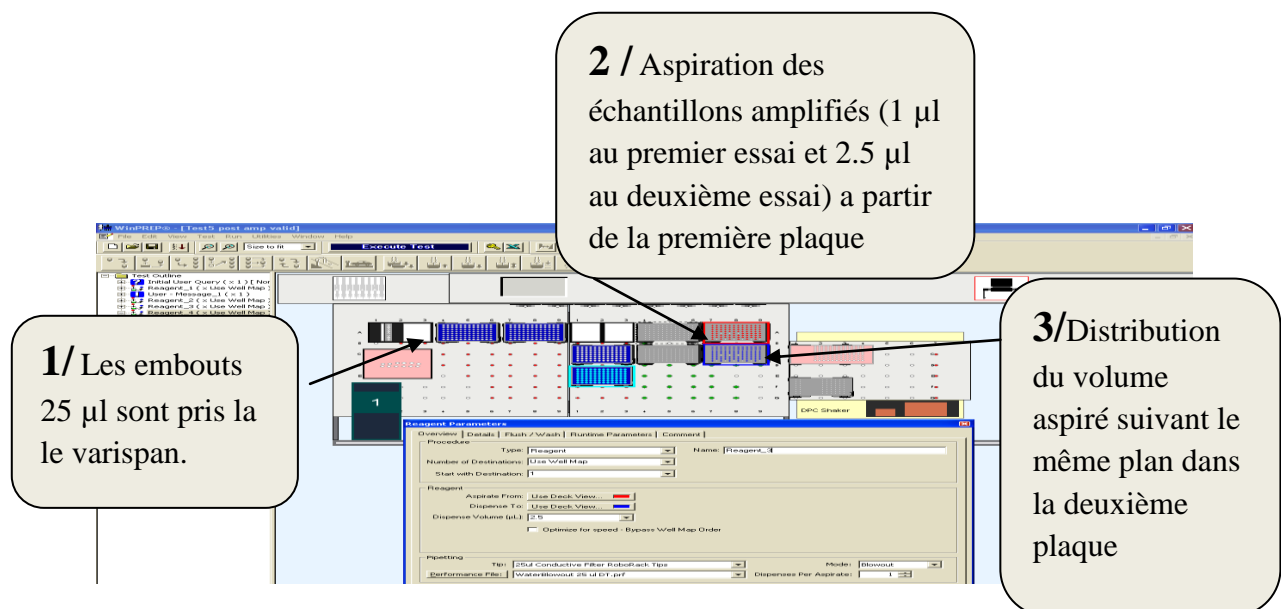


Figure 5 Etape de distribution des échantillons amplifiés de la première vers la deuxième plaque (deuxième essai).

2.9.3 Remplissage des puits vides par le formamide

- Distribution d'un volume de 10 μ l au niveau des puits contenant Formamide seulement. Ce sont des puits restés vides (sans dépôt d'échantillons) et doivent être rempli de formamide avant de passer la plaque a l'électrophorèse capillaire

2.9.4 Distribution de l'allelic ladder

2.9.4.1 Premier essai

- Le tube du ladder est déposé sur le bloc froid du plan de travail
- Distribution de 1,5 μ l de l'allelic ladder à partir du bloc froid dans les puits de plaque appropriés.(Voir annexe....)
- **Dispense Volume= 1,5 μ l**

2.9.4.2 Deuxième essai dû au faible volume (1.5 μ l) et à la forme du tube du ladder (microtube 1.5ml conique), il a été nécessaire d'améliorer l'efficacité de l'aspiration.

✓ **Mode Blowout**

✓ **Dispense Volume 5 μ l**

2.9.4.3 Troisième essai consiste au dépôt manuel de 1.5 μ l ladder dans les puits correspondants

I.2.10 Electrophorèse capillaire

- La plaque à tester est recouverte par un septa stérile
- Un choc thermique est établi en déposant manuellement la plaque pendant 3min sur le bloc chauffant 95 puis 3 minutes sur le bloc froid.
- La plaque est positionnée sur le support adapté, recouverte et introduite dans l'appareil d'électrophorèse capillaire (Genetic analyzer 3130xl).
- Les paramètres de l'injection sont comme suit Temps d'injection 5 secondes, voltage 3kV, Temps de run 1,500 seconds.
- Les données brutes sont collectées au fur et mesure qu'un run est analysé (run =16 échantillons – correspondant aux 16 capillaires de l'appareil)
- La lecture et validation des données s'effectue l'aide du logiciel GeneMapper ID

Au cours de ce travail, une étude de validation interne a été menée pour exploiter le système robotique Janus au niveau du laboratoire d'identification génétique de l'INCC/G N.

La validation est une confirmation par des épreuves tangibles que les exigences, pour une utilisation spécifique ou une application prévue, ont été satisfaites.

Durant ce projet nous avons ainsi procédé à la vérification des critères de performance suivants

- **La répliquabilité**
- **La répétabilité**

Dans ce chapitre nous avons regroupé les résultats obtenus des différentes procédures et essais menés dans le cadre de la validation du robot Janus et avons configuré son protocole comme détaillé au chapitre II du présent mémoire.

I. Configuration des protocoles de chaque étape

1-Configuration du protocole du premier lavage

Les résultats des étapes principales et les essais entrepris pour tester et valider les paramètres du premier lavage des échantillons déposés

1/En premier lieu il est nécessaire **d'établir un Flush/Wash** pour éviter les bulles d'air du système.

2/ Aspiration/Distribution de 100µl du tampon dans la plaque à 96 puits suivant le plan

- **Premier et deuxième essai** étaient non concluants vu qu'il n'y avait Pas d'équivalence en volume distribué
- **Troisième essai** Concluant. Le volume de 100µl distribué est équivalent dans tous les puits suivant le plan de la plaque

3/Etablissement d'une agitation et une centrifugation

4/Aspiration des 100µl du tampon de la plaque à 96 puits suivant le plan

- **Premier essai non concluant** 7 punches perdus, Sur 78 punches
- **Deuxième essai concluant**
Aspiration de 80 % du tampon de lavage. Les 78 punches sont présents dans leurs puits respectifs

2- Configuration du protocole du deuxième lavage

L'établissement d'un deuxième lavage a été réalisé selon les mêmes prescriptions que le premier ; cette étape a cependant nécessité une aspiration supplémentaire touchant le reste du contenu du tampon de lavage

- ✓ **Premier essai** Le nombre de punches perdus lors de l'aspiration est de cinq.
- ✓ **Deuxième essai** Le tampon de lavage a été totalement aspiré.

3- Configuration du protocole de l'étape d'amplification

1- Configuration de plan de plaque

2-Etablissement d'un Flush/Wash

3- Aspiration/Distribution du Mix PCR pour les échantillons

4-Aspiration/Distribution du mix PCR pour le contrôle positif

5-Aspiration/Distribution du contrôle positif dilué

Premier essai concluant Aspiration et distributions complètes du contrôle positif dilué

Les 78 punches sont présents dans leurs puits respectifs

4-Configuration du protocole de l'étape de post-amplification

1-Configuration de plan de plaque

2- Etablissement d'un Flush/Wash

3-Distribution du mix Post –amplification

4- Distribution des échantillons amplifiés de la première vers la deuxième plaque dont

- **Le Premier essai** était un volume inadéquat à l'aspiration tandis que le **Deuxième essai** où l'aspiration et la distribution de 2,5µl d'échantillon amplifié est réalisée

5- Remplissage des vides par le formamide.

6- distribution de l'Allelic Ladder où on a établie 3 essais

- Les résultats du **premier test et du deuxième** escompté n'ont pas été atteint, le volume n'a pas été détecté par le robot lors du pipetage pour cela vu la sensibilité de l'Allelic Ladder , très chargé en ADN, son dépôt suivant le plan de plaques a été opéré manuellement.

Résultat Final

Suite a l'établissement des étapes d'analyse Lavage, amplification, post-amplification, on a obtenu des profils génétiques contaminés.

Des phénomènes de contamination peuvent être observés lors de l'utilisation de systèmes analytiques. Ils peuvent affecter les échantillons à analyser (contamination inter échantillons) ou les réactifs (contamination inter réactif), comme l'illustre cette figure

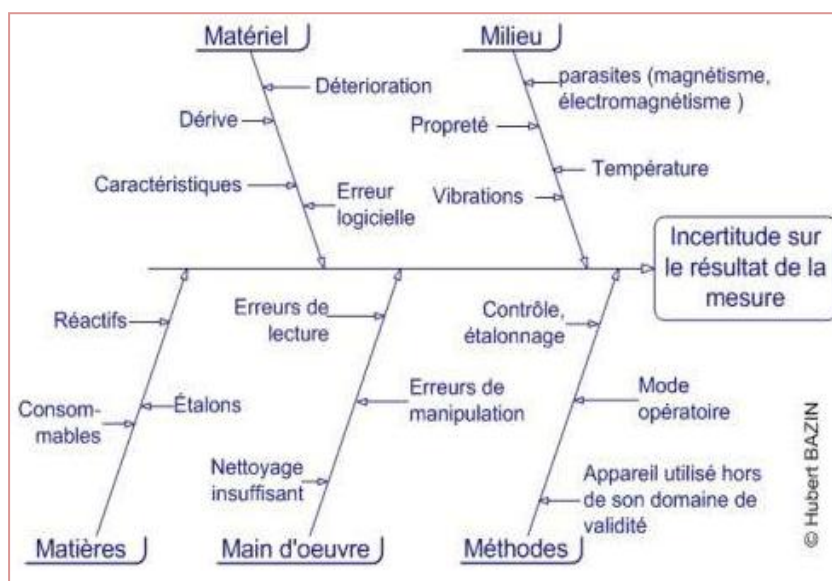


Figure 6 Diagramme des principaux facteurs pouvant influencer les résultats

Dans le cadre de notre étude, les contaminations répétées des échantillons peuvent provenir du tampon d'extraction, ce qui a nécessité l'élimination de cette étape. Et qui a conduit à l'obtention de bon profils génétiques.

II. Exploitation des résultats

1- Evaluation des coefficients de variation (CV) pour les hauteurs de pics

- Afin d'évaluer quantitativement et qualitativement les résultats finaux obtenus suite à la validation du protocole robotisé final, nous avons déterminé, à partir des hauteurs d'allèles obtenues, les calculs statistiques suivants la moyenne (m) des hauteurs de l'allèle de chaque marqueur, l'écart type (s) et le coefficient de variation (CV). Ces opérations ont été effectuées à l'aide de tableaux de calculs sur Microsoft Office Excel.
- Un coefficient de variation est une mesure neutre de dispersion relative, il est donc possible de comparer grâce à ce facteur, l'homogénéité de plusieurs distributions entre elles.

- Le graphe ci-après représente les données de (CV) résultants de trois réplicas d'un échantillon pris en exemple.

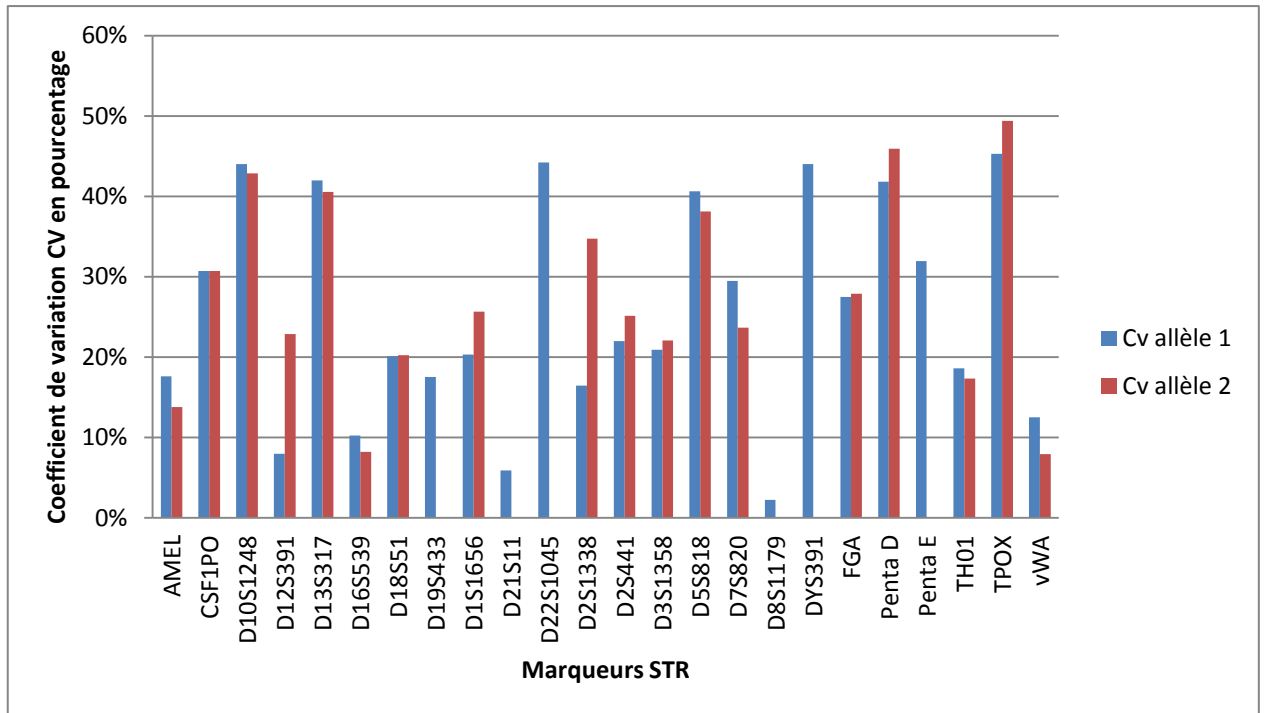


Figure 7 Graphe retraçant les coefficients de variation des deux allèles

- Dans ce cas de figure l'ensemble des valeurs de CV sont relativement faibles, tous au moins inférieurs à 50%, ce qui signifie que plus les données sont homogènes donc plus la moyenne est représentative.

2- Evaluation des profils génétiques par réplicas

Cette étape requiert l'utilisation d'un appareil d'électrophorèse capillaire. Un tel appareil est conçu pour séparer et détecter des fragments d'ADN.

Les fragments d'ADN amplifiés sont soumis à un marquage par des molécules fluorescentes pour déterminer les tailles et l'intensité de la fluorescence. Les résultats obtenus sont ensuite transmises à un ordinateur qui va les collecter et les traiter par un

logiciel spécifique (Gene Mapper ID v3.2) afin de donner un profil génétique. Ces résultats sont représentés sous forme d'un électrophorégramme.

Pour identifier les allèles de chaque marqueur (STR) et établir le génotype de la personne qui a fourni l'échantillon, on compare les pics à analyser avec ceux de l'échelle des allèles de référence (Ladder). Ce logiciel attribue à chaque allèle STR une taille (en paires de bases), ainsi les 24 marqueurs mentionnés au-dessus de chaque série de pics.

- Les profils génétiques ci-après concernent les données obtenus suite à la validation du protocole robotisé touchant l'échantillon portant le numéro 19.

(Figures 2.6- 2.7- 2.8)

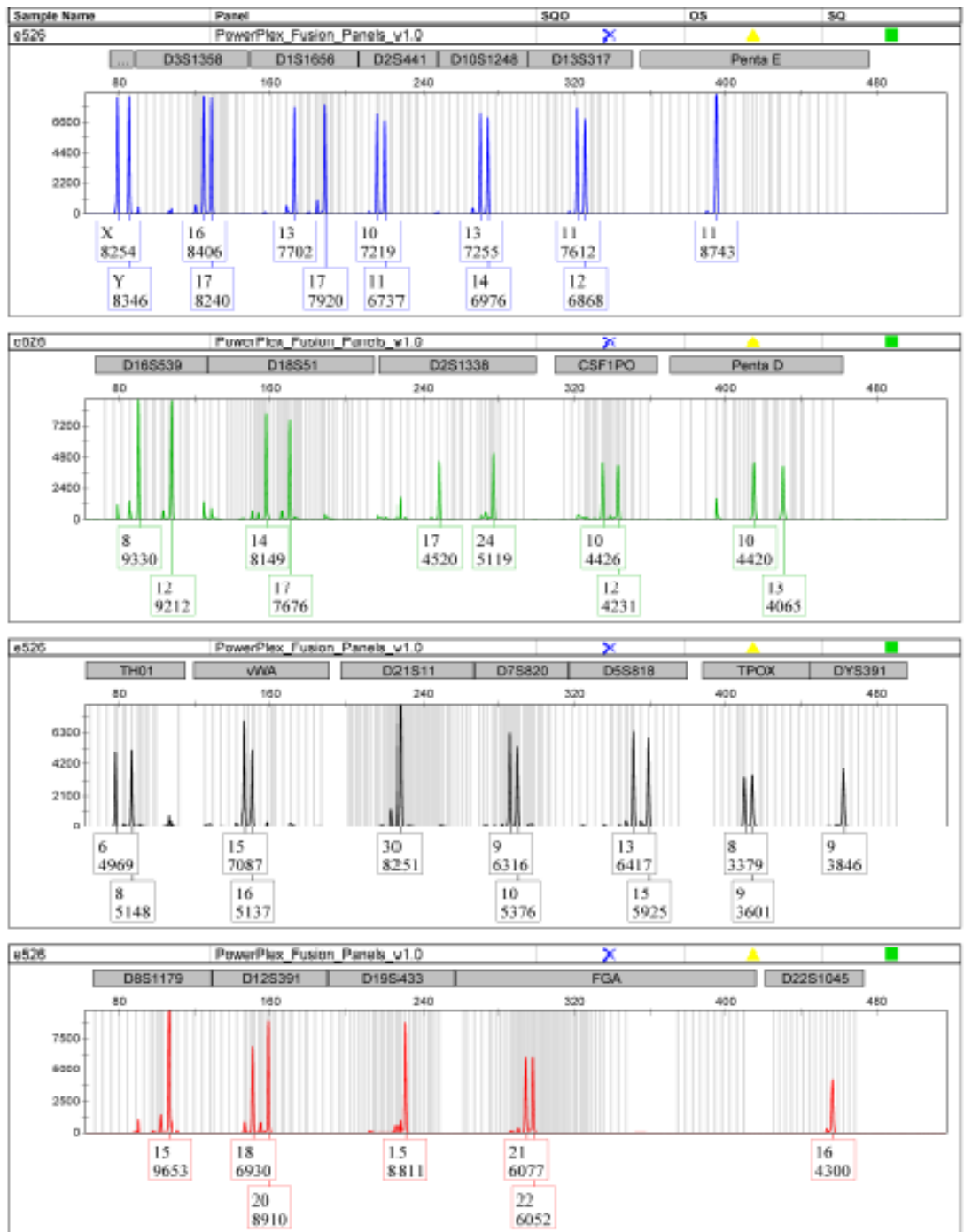


Figure 8 Profil génétique (premier réplica)

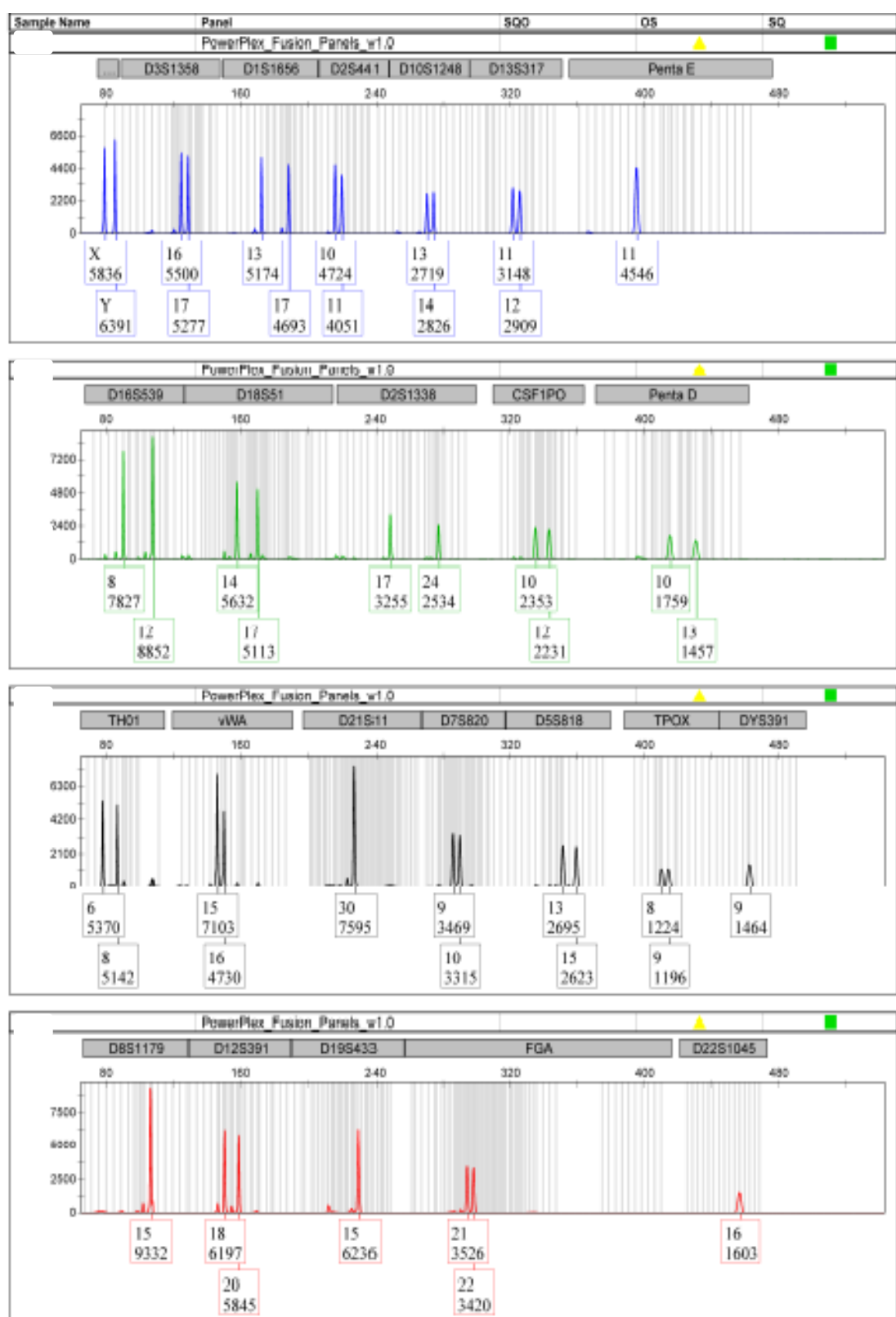


Figure 9 Profil génétique (deuxième réplique)

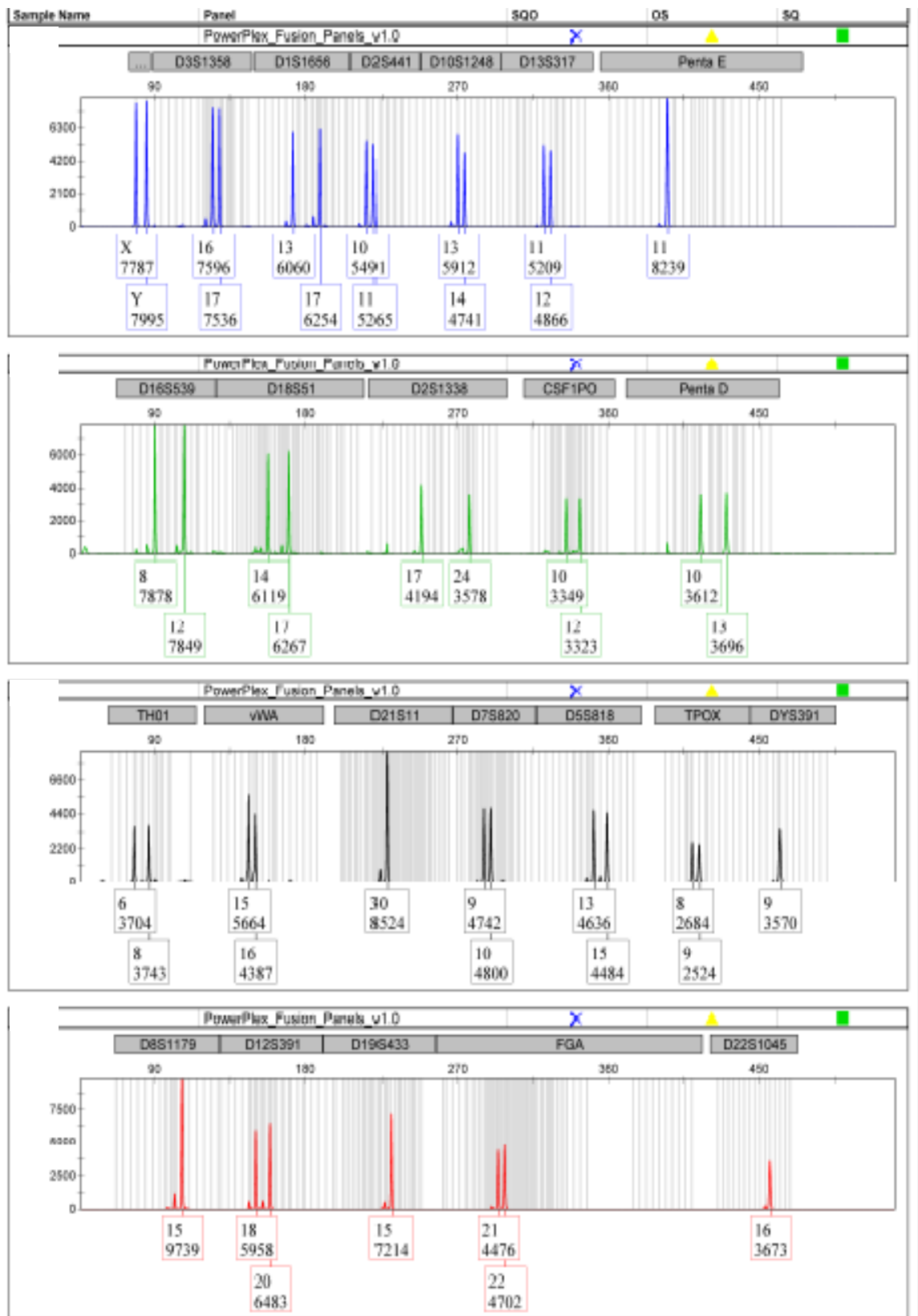


Figure 10 Profil génétique (troisième réplique)

Les résultats obtenus pour l'ensemble des échantillons testés sont représentés sur le plan de plaque et définis à l'aide un code couleur comme suit

- En vert profil génétique complet obtenu pour les trois réplias.
- En rouge Pas de profil génétique obtenu pour un réplica d'échantillon.
- En bleu Aucun profil génétique obtenu pour le témoin négatif ou puits vide.

Tableau7 Plan de plaque expriment les résultats obtenus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E1	E3	E5	E7	E9	E11	E13	E15	E17	E20	E21	E24
B	E1	TEX	E5	TEX	E9	TEX	E13	E16	E18	E20	E22	E24
C	E1	S4	E6	E8	E10	E12	E14	E16	E18	E20	E22	E24
D	E2	T-	E6	T-	E10	T-	E14	T+	E18	T+	E22	T+
E	E2	E4	T-Post	E8	T-Post	E12	T-Post	E16	E19	E21	E23	E25
F	E2	E4	E6	E8	E10	E12	E14	E17	For	E21	for	E25
G	E3	E5	E7	E9	E11	E13	E15	E17	E19	for	E23	E25
H	E3	LAD	E7	LAD	E11	LAD	E15	LAD	E19	LAD	E23	LAD

- La grande majorité des échantillons ont généré des résultats satisfaisant comparables pour les trois réplias testés. Ce qui a permis de confirmer l'efficacité de cette chaine analytique robotisé
- Les témoins négatifs à chaque étape configurée n'ont pas généré de profils génétiques, ce qui démontre que l'utilisation de l'automate pour les pipetage ne cause pas de contaminations à aucune des étapes, sauf pour les premiers tests de lavage qui ont été éliminés du protocole final.



Figure 11 Témoin négatif d'amplification

- Le résultat négatif obtenu pour les répliques des échantillons E5, E6, E21 et E25, n'est observé que lors d'un seul réplica sur les trois (sauf pour l'échantillon E21). Il ne s'agit donc pas d'une erreur ou d'un dysfonctionnement de la part du système robotisé. Le phénomène est plus probablement dû la variation du dépôt et de la distribution d'ADN sur les cartes FTA en termes de quantité et de qualité.
- Par essence, les manipulations qui sont effectuées dans les laboratoires donnent des résultats qui ne peuvent pas être absolument identiques. Il existe toujours une marge d'incertitude, liée au caractère aléatoire des variations observées lorsque l'on répète une mesure.
- Les principaux facteurs qui contribuent à ces variations ne peuvent être résumés sur le diagramme suivant

3- Evaluation générale

Dans l'ensemble, les résultats des protocoles optimisés et générés par l'automate Janus peuvent être décrits comme comparables et satisfaisants pour établir la validation interne, l'implémentation et l'utilisation de cet instrument.

Conclusion

Le but de ce travail consistait en l'étude de la validation interne de l'utilisation de la plateforme robotique JANUS au niveau du laboratoire en vue de l'établissement de profils génétiques.

Les résultats obtenus suite à l'analyse des échantillons démontrent l'efficacité du mode automatisé du robot dans l'obtention de résultats fiables.

Cette méthode apporte un réel intérêt lorsqu'un nombre important d'échantillons est acheminé au laboratoire, et qu'il serait judicieux d'effectuer toutes les étapes d'analyse en mode automatisé, le logiciel permet d'exécuter le test sélectionné pour un nombre important d'échantillons atteignant six (6) plaques, soit 540 échantillons.

L'impact de cette automatisation est d'autant plus perceptible dans le cadre de la gestion des calamités ou le facteur temps devient un élément clef dans l'évaluation de bons profils génétiques.

Cela dit, même si les essais effectués permettaient d'obtenir des résultats fiables et reproductibles le laboratoire devrait encore évaluer le réel intérêt à recourir à cette technique robotisée, vu les coûts engendrés par une telle analyse.

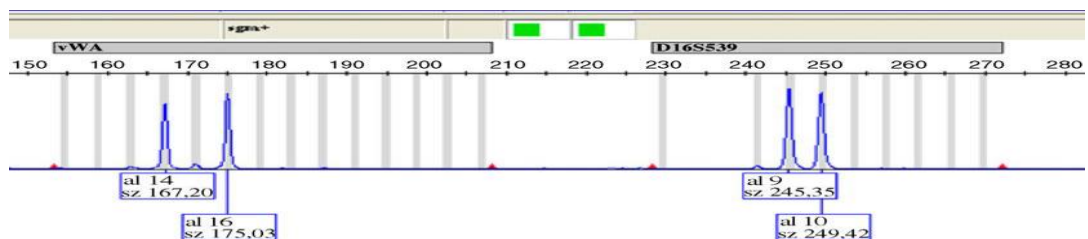
Annexes



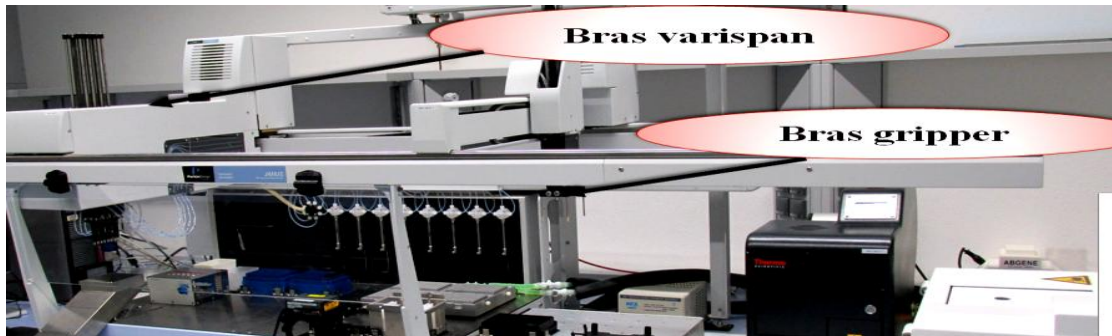
Annexe 1 : Cartes FTA



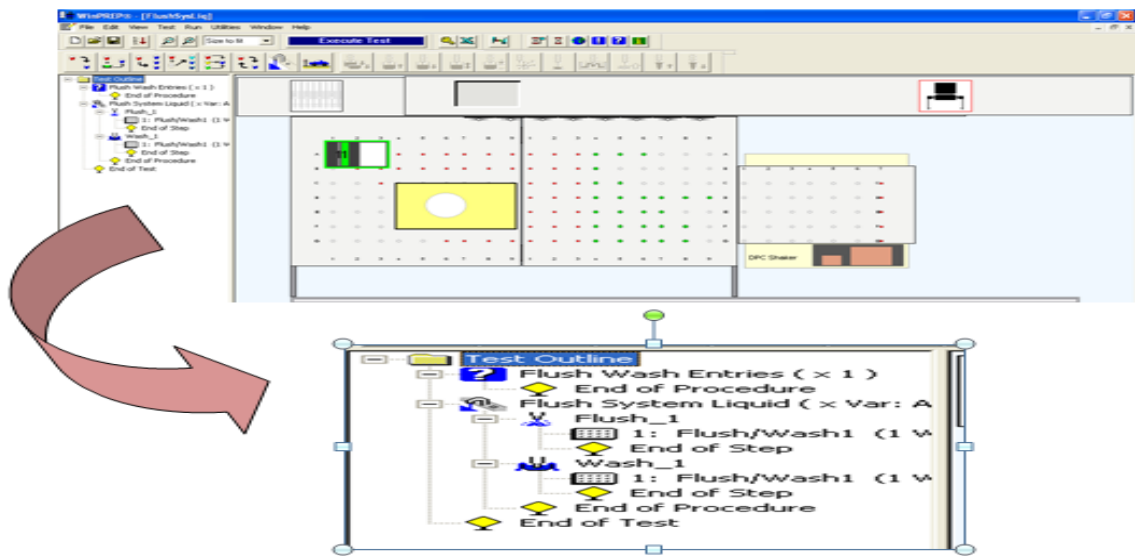
Annexe02: Séquenceur Applied Biosystem 3130xl Genetic Analyzer (Prugnot, 2008).



Annexe03 : Exemple d'un profil génétique étudiant le polymorphisme des STRs des autosomes sur deux loci vWA et D16S539. Les deux pics correspondent aux deux allèles, les chiffres indiquent le nombre de répétitions et la taille en paires de bases (exemple : al 14 et sz 167,20 pour 14 répétitions et 167,2 paires de bases) (Mansuet-Lupo et al., 2007).



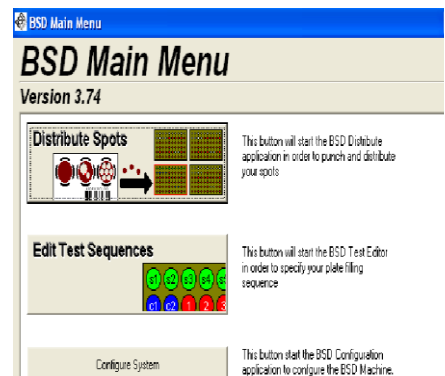
Annexe 04 : Robot Janus



Annexe 05: Protocole du Flush/Wash



**Annexe 06 : Système de poinçonnage Puncher BSD
600**



**Annexe 07: Logiciel du système de poinçonnage Puncher BSD
600**



**Annexe 08 : La scelleuse
Thermo SIENTIFIC ALPS
300**



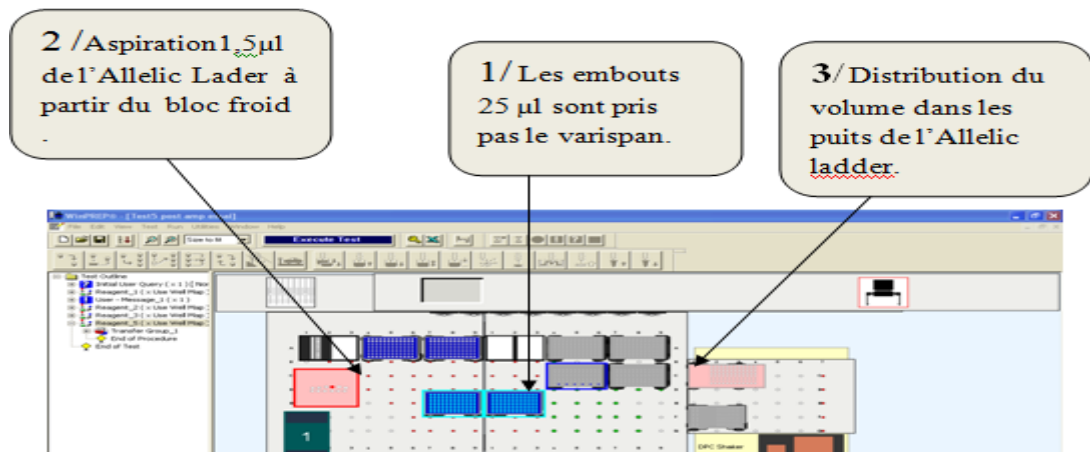
**Annexe 09 :
Centrifugeuse ROTANA
46 RSC**



**Annexe 10: PowerPlex ESI16
system (Promega)**



**Annexe 11 : PowerPlex Fusion
system (Promega)**



Annexe 12: Etapes de distribution de l'Allelic Lader (premier essai)

Consommable

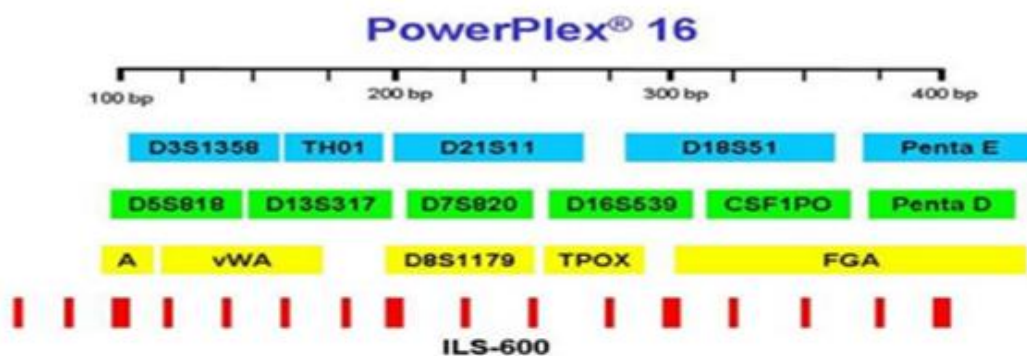
Equipement de protection personnelle

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ❖ Microtubes eppendorf de 0.6ml, 1.5 ml et 2 ml stériles. ❖ Embouts (tips) à filtre adaptés aux micropipettes Eppendorf RESEARCH. ❖ Embouts (tips) à conductivité adaptés au système varispan du système Janus. ❖ Plaques 96 puits (Applied Biosystems). ❖ Film adhésif optique MicroAmp pour plaques 96 puits . ❖ Septa pour plaques 96 puits. Papier aluminium. ❖ Parafilm. | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Gants en latex. ❖ Masques de protection. ❖ Charlottes. ❖ Blouses de laboratoire. |
|---|---|

Annexe 13

Logiciel	Equipement
<ul style="list-style-type: none"> • Win-Prep logiciel de pilotage du système Janus . • Data collection software logiciel de pilotage du Genetic analyzer 3130xl. • GeneMapper ID v3.2 software logiciel de lecture et validation des données. 	<ul style="list-style-type: none"> • Système de poinçonnage Puncher BSD 600. • Plateforme robotique Janus et accessoires liés (scelleuse agitateur, centrifugeuse). (voir annexes 4 ;5 ;6) • Centrifugeuse pour plaques 96puits. • Thermocycleurs 9700 "PCR" (Applied Biosystems)

Annexe 14



Annexe 15 : Schéma des tailles des allèles possibles

Le kit PowerPlex® 16 System permet la coamplification et la détection de seize marqueurs (quinze marqueurs STR et l'amélogénine déterminant le sexe). Ce kit permet l'amplification des marqueurs suivants: Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, Vwa, amélogénine, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S8220, D13S317 et D5S818 (Iglesias etCoquoz, 2009).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E1	E3	E5	E7	E9	E11	E13	E15	E17	E20	E21	E24
B	E1	TEX	E5	TEX	E9	TEX	E13	E16	E18	E20	E22	E24
C	E1	511	E6	E8	E10	E12	E14	E16	E18	E20	E22	E24
D	E2	T-	E6	T-	E10	T-	E14	T+	E18	T+	E22	T+
E	E2	E4	T-Post	E8	T-Post	E12	T-Post	E16	E19	E21	E23	E25
F	E2	E4	E6	E8	E10	E12	E14	E17	For	E21	for	E25
G	E3	E5	E7	E9	E11	E13	E15	E17	E19	for	E23	E25
H	E3	LAD	E7	LAD	E11	LAD	E15	LAD	E19	LAD	E23	LAD

Annexe 16: Plan de plaque

TEX=Témoïn d'extraction. ; T⁻Amp= Témoïn négatif d'amplification ; T⁺Amp= Témoïn positif d'amplification ; T⁺Post-Amp= Témoïn positif de post amplification : for= Formamide ; LAD= Allelic Lader.

Références bibliographique

Alleyne, L. *et al.*, (2009) Guide Interpol sur l'échange des données génétiques et sur la pratique en matière d'analyse d'ADN 11

Amarouche, S., (2010). *Caractérisation d'une méthode de mesure : étape clé dans le processus de validation*. Référence SL1040, Qualité au laboratoire. Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE).

Blanchin, M., (2010) Validation des méthodes d'analyses P33

Butler, J., (2009). *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. (2nd Ed.). Elsevier Academic Press

Catalifaud, C. Analyse génétique et histoire. Mémoire. Journalisme scientifique. université Paris de Diderot. (2011, 2012) format pdf. disponible sur : « <http://charlene2017.catalifaud.com/wp-content/uploads/2017/09/Memoire-M2JS-CharleneCatalifaud.pdf> » consulté le 10/3/2018

COMITE INTERNATIONAL DE LA CROIX ROUGE. (2009) Guide des meilleures pratiques à suivre dans les situations de conflit armé et autres situations de violence P5, 19, 20

Coquoz *et al.*, (2013) La preuve par ADN: La génétique au service de la justice
Désenfant, M., Priel, M., Rivier, C., (S.D) De la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure 2, 3

Iglesias, M., Coquoz, R. Ajout d'un contrôle d'inhibition dans les Kits STR multiplex. Travail de diplôme. Laboratoire AURIGEN, Lausanne. (2009) P 8, 9, 14, 15, 16

Giovannangeli, C. (S.D) Cibler l'ADN: pour la compréhension du vivant 1-3

Guide JANUS® Automated Liquid Handling System, User Manual, 2014. PerkinElmer, Publication Number 1694282, revision K, USA 14-32

Horchani,A.Application des empreintes génétiques dans l'établissement de la filiation parentales:A propos des 16 dossiers d'analyses à l'INH de rabat .Thèse de doctorat.Pharmacie.université de Mohamed V,(2009)

KEBBOUCHE,Doudja.Contribution de la science forensique dans l'enquête sur les cambriolages résidentiels commis sur le territoire desservi par le SPVM.Travail dirigé en vue de l'obtention du grade de maîtrise en criminologie.Université Montréal.Faculté des arts et des sciences.(2016)Format Pdf disponible sur :« https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/14084/Kebbouche_Doudja_2016_travail_dirige.pdf?sequence=1 » Consulté le 4/3/2018

KEYSE,Ch.PETKOVSKI,E. ,(2006)Utilisation des SNP pour l'identification humaine:Technologie appliqué 1,2

LOISTRON,Soléna.Les empreinte génétique en medcine légale:réalisation,législation. These de doctorat.Chirurgie dentaire.Université de Nante. (2009)

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*

Prugnot,H.Utilisation des marqueurs microsatellites afin de vérifier la nature génogénétique de naissains produits dans le but d'établir les lignées clonale produites chez l'hyitre creuse *Crassostrea gigas*.Rapport de stage.Biochimie.université de la Rochelle (2007-2008).Format PDF disponible sur «<http://archimer.ifremer.fr/doc/00369/48025/48111.pdf> » le 18/04/2018

Quintana-Murci,L *et al.*,(1999)L'ADN mitochondrial, le chromosome Y et l'histoire des populations humaine P2

Vassault,A.,(2010) Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse 1,8-15

Whatman International.(En ligne) Collecte, transport, stockage et extraction d'acides nucléiques à température ambiante. Whatman FTA Elute. Diponible sur « <https://www.gazettelabo.fr/archives/pratic/2008/131whatman.pdf> » consulté le 3/3/2018