



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



**UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme

de Master en science de la nature et de la vie

Filière Sciences Biologiques

**Option** : Génétique et physiologie

**Thème :**

VALIDATION INTERNE DU PROTOCOL D'EXTRACTION SEMI  
AUTOMATIQUE D'ADN A PARTIR DE DIFFERENTS SUPPORTS  
BIOLOGIQUES PAR L'UTILISATION DU KIT DNA IQ™ PRO ET  
L'AUTOMATE MAXWELL 16® PROMEGA

**Réalisé par :**

M<sup>lle</sup> ATIF Sarah

M<sup>lle</sup> BOULASNAM Nour-El-Houda

**Soutenu le** : 17/09/2018

**Devant le jury composé de:**

Nom et Prénom	Grade	Lieu	Qualité
M <sup>me</sup> RAHIM I.	MCB	USDB1	- Présidente
M <sup>f</sup> MOHAMED SAID R.	MCB	USDB1	- Examineur
M <sup>me</sup> ABDUL-HUSSAIN A.	MCB	USDB1	- Promotrice
M <sup>f</sup> BOUCHAREB A.	MSF	INCC/GN	- Co-promoteur
M <sup>f</sup> LEZREG S.	MSF	INCC/GN	- Invité

Promotion 2017-2018

# Remerciement

*En préambule à ce mémoire ; 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.*

*Ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'intervention, consciente, d'un grand nombre de personnes.*

*Nos remerciements s'adressent en premier lieu à Notre promotrice, M<sup>me</sup> ABDUL-HUSSAIN. Pour son amabilité, sa bienveillance et pour son encouragement constant. Elle a dirigé et accompagné de très près, jour par jour, et avec beaucoup de patience, la longue et lente rédaction de ce travail.*

*Nous tenons à remercier très chaleureusement Monsieur BOUCHAREB ADEL qui a accepté de diriger notre mémoire, qu'il a suivie avec attention tout au long de sa réalisation. Ses précieux conseils, sa grande disponibilité et son inconditionnel soutien nous ont aidé à aller jusqu'au bout de ce travail dans la confiance et la reconnaissance. Qu'il trouve ici l'expression de nos profondes reconnaissances. Nous avons été extrêmement sensibles à ses qualités humaines, d'écoute, et de compréhension tout au long de ce travail.*

*Nos remerciements vont ensuite aux membres du jury, M<sup>me</sup> RAHIM I., est présidente de ce jury, Mr MOHAMED SAID R., examinateur, qui ont accepté, sans réserve aucune de lire et d'évaluer ce mémoire à sa juste valeur, et de nous faire part de leur remarques sûrement pertinentes qui, avec un peu de recul, contribueront, sans nul doute, au perfectionnement du présent travail.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude au Directeur Général de l'INCC pour nous avoir ouvert les portes de l'Institut, à Monsieur BOUSSOUFI A., Mr LAZREG S., Mr DAHO K., Mr GUELLIL H., Mr AGGOUNE A., FACI H. et Mr BOULESNAM B. pour nous avoir bien accueillie, orienté, pour leur gentillesse et soutien.*

*En outre, on remercie le personnel du laboratoire d'analyses d'ADN de l'INCC, en leur témoignant toute notre gratitude pour leur entière collaboration, leur disponibilité et leur aide inestimable à ce projet.*

*Nous tenons enfin à exprimer notre reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail ainsi qu'à toute personne qui fera l'effort de lire ce document.*

*Pour la même occasion, on adresse nos remerciements à tous nos enseignants pour leurs efforts qui ont guidé nos pas et enrichi nos travaux tout au long de nos études universitaires.*

# Dédicace

*Je dédie le fruit de mes cinq années d'études*

## ***Au meilleur des pères Khaled***

*Autant de phrases ne seraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. En lui transmettant mes plus vifs remerciements pour la peine qu'il s'est donné et l'aide qu'il m'a apporté pour la réalisation et le déroulement de mes études.*

## ***A la meilleure des mères Nadia***

*Affable, honorable, aimable: Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*Qu'ils trouvent en moi la source de leur fierté*

## ***A mes grands parents***

*Qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur. Puisse ALLAH lui prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur.*

## ***A ma chère sœur Rahil***

*Ma fidèle accompagnante dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Tes sacrifices, ton soutien moral, ta gentillesse sans égal.*

## ***A ma petite sœur Lina***

*La douce, au cœur si grand. Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur.*

*Puisse ALLAH vous gardez et vous aidez à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.*

## ***A mes chers tantes et oncles, à mes chers cousines et cousins***

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.*

## ***A mon binôme Nour-El-Houda***

*Qui m'a supporté durant la réalisation de ce travail. Et en souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.*

## ***A mes chers amis***

*Rayane et Hadjer pour tout l'amour qu'elles me témoignent chaque jour, pour leur indéfectible soutien et à qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite et de bonheur.*

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

***Sans vos aides, vos conseils et vos encouragements ce travail n'aurait vu le jour.***

SARAH

# Dédicace

*Je dédie cet humble travail*

*A mes chers parents; Sources de mes joies, secrets de ma force. Vous serez toujours le modèle*

## **A MON TRÈS CHER PÈRE : Tahar**

*Autant de phrases et d'expressions aussi éloquents soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Ma réussite est la tienne que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.*

## **A MA TRÈS CHÈRE MÈRE : Dalila**

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés. Tu as tant souhaité que je parvienne à ce but. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.*

## **A Mes chers grands parents**

*Que ce modeste travail soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.*

**A mes sœurs : Chourouk ; Sarah, Ines, Amel et Khalida et mes frères Amine et Mahdjoub**

*En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent. Ce travail est un témoignage de mon attachement et de mon amour.*

## **A mes chers Oncles et Tantes, à mes chers cousines et cousins**

*Par vos mots apaisés, vos conseils inestimables et vos encouragements, vous avez toujours su me pousser à croire et aller de l'avant. Que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond Respect.*

*A mon binôme Sarah, ma meilleure amie que je la prends non seulement pour amie mais pour la sœur d'âme, avec laquelle j'ai vécu les meilleurs souvenirs.*

*A mon amie Rayane qui a toujours su me faire rire dans mes moments les plus durs, et à mes chers amis(e), spécialement El Hadi.S en témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*N/Elhouda*

## *Résumé*

Au cours de ces dernières années, de très nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques ont été décrits, et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels. Pour cela tous les matériels et kits et notamment la méthode d'extraction d'ADN doivent être validés afin de générer un ADN pur de bonne qualité et de quantité suffisante pour établir un profil génétique interprétable. L'objectif de ces méthodes de purification est notamment d'éliminer les contaminants qui pourraient perturber les techniques ou réactions effectuées par la suite.

Notre étude a consisté à valider en interne une méthode d'extraction semi-automatique en utilisant les kits DNA IQ pro et l'automate Maxwell 16 promega à partir de différents supports biologiques (sang, salive, sperme, cheveux, ongles et traces de contacts).

Pour ce faire, deux critères ont été évalués, la répétabilité et la reproductibilité qui ont assuré des résultats convaincants et des profils de bonnes qualités à partir des quantités d'ADN initiales indéterminées.

Au vu de tous ces résultats, la méthode d'extraction semi-automatique d'ADN par l'automate Maxwell®16 Promega et les kits DNA IQ pro est jugée acceptable permettant une analyse d'ADN fiable et rapide.

**Mots clés :** Extraction semi-automatique, maxwell®16 promega, kits DNA IQ pro, validation, profil génétique.

# Abstract

During the last few years, so many nucleic acid extraction methods have been described and kits are currently proposed by a number of manufacturers. For this purpose, all the equipment, kits and in particular the DNA extraction method must be validated in order to generate a pure DNA of good quality and sufficient quantity to establish a complete and interpretable genetic profile. The purpose of these purification methods is to eliminate contaminants that could interfere with subsequent techniques or reactions.

Our study consisted in internally validating a semi-automatic extraction method using the DNA IQ pro kits and the Maxwell 16 promega automaton from different biological supports (blood, saliva, semen, hair, nails and traces of contact).

To do this, two criteria were evaluated, repeatability and reproducibility that ensured convincing results and good quality profiles from the undetermined initial quantities of DNA.

In view of all these results, the DNA semi-automatic extraction method by the Maxwell®16 Promega and the DNA IQ pro kits is considered acceptable allowing a reliable and rapid DNA analysis.

**Key words:** Semi-automatic extraction, maxwell®16 promega, DNA IQ pro kits, validation, genetic profile.

## ملخص

خلال السنوات الاخيرة، تم طرح عدد كبير من عمليات استخراج الاحماض النووية، والتي يقوم بعض الصناعيين حاليا باقتراح مجموعات منها. ولهذا الغرض، يجب التحقق من صحة جميع المواد و مجموعات الكواشف، وعلى وجه الخصوص طريقة استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين من أجل الحصول على حمض نووي ريبوي منقوص الأوكسجين نقي من نوعية جيدة وكمية كافية لإنشاء ملف جيني كامل وقابل للتفسير. و الغرض من هذه التقنية هو القضاء على الملوثات التي قد تخل بالتقنيات أو التفاعلات اللاحقة.

تتمثل هذه الدراسة في إثبات فعالية طريقة استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين الشبه أوتوماتيكية على المستوى الداخلي للمخبر، باستخدام DNA IQ Pro kits والة Maxwell® 16 Promega من عينات بيولوجية مختلفة (الدم، اللعاب، السائل المنوي، الشعر، الأظافر، وأثار الاتصالات).

للقيام بذلك، تم تقييم معيارين (التكرار وتوافق استخراجية النتائج) الذين قدموا نتائج مقنعة ومواصفات جينية ذو نوعية جيدة من كميات حمض النووي ريبوي منقوص الأوكسجين أولية غير محددة.

في ضوء كل هذه النتائج، نجد أن طريقة استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين الشبه أوتوماتيكية بواسطة Maxwell®16 و DNA IQ Pro kits يعتبر مقبولا لتحليل موثوق وسريع للحمض النووي.

**كلمات البحث:** استخلاص الحمض النووي الشبه أوتوماتيكية، الفعالية، ملف جيني، Maxwell®16 ، DNQ IQ Pro

.kits

## *Glossaire*

**Allèles** Ce sont les différentes expressions d'un même gène. Chaque allèle se différencie par une ou plusieurs différences de la séquence de nucléotides. Tous les allèles d'un gène occupent le même locus (emplacement) sur un même chromosome.

**Amorce** C'est une courte séquence d'ARN ou d'ADN, complémentaire du début d'une matrice, servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire de cette dernière matrice par une ADN polymérase.

**Amplicon** C'est un fragment d'ADN amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Le terme d'amplicon est souvent employé de manière interchangeable avec « Produit PCR ».

**Chélate** (prononcer "kelate"), est un complexe organique dans lequel un cation métallique est susceptible d'être chélaté, c'est à dire "séquestré" entre plusieurs groupements complexant (ligands) de la molécule chélatante qui exercent un effet de pince, rendant l'ensemble particulièrement stable.

**Chelex ®100** c'est une résine stable sur toute la gamme de pH. La résine a une très grande affinité pour les ions métalliques polyvalents, tels que le magnésium ( $Mg^{2+}$ ); elle chélate les ions métalliques polyvalents et les élimine efficacement de la solution.

**Cycle seuil (Ct)** Correspond au nombre de cycles à partir duquel la quantité de produit formé est distinct du "bruit de fond". Ce Ct marque le début de la phase exponentielle d'amplification.

**Électrophorégramme** Une représentation visuelle sur un écran, sur gel ou sur papier. C'est un condensé de résultats d'une analyse effectuée par séquençage automatique d'électrophorèse.

**Enzyme de restriction** Une protéine capable de couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides caractéristique appelée site de restriction.



**La criminalistique** C'est l'ensemble des techniques mises en œuvre par la justice et la police pour établir la preuve d'un délit ou d'un crime et d'en identifier son auteur.

**La criminologie** Peut être définie comme l'étude scientifique du crime et du criminel. Elle vise à comprendre et expliquer le phénomène criminel.

**Locus** Lieu ou position sur l'ADN d'un gène. Ce terme est utilisé pour décrire la « géographie » de l'ADN. Dans le contexte des profils ADN, ce mot est utilisé comme un équivalent de « marqueur génétique ».

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

**Répétition en Tandem** c'est une suite de plusieurs motifs de nucléotides, adjacents dans une séquence d'ADN et qui se répètent à l'identique.

**Sciences forensiques** se définissent comme l'ensemble des principes scientifiques et des techniques appliqués à l'investigation criminelle, qui interviennent dans l'ensemble des processus juridiques, de la compréhension des crimes et des délits, jusqu'à la présentation d'éléments de preuve et de leur valeur probante devant un tribunal.

**Sonde** Population connue d'acides nucléiques ou d'oligonucléotides, utilisée dans une étude par hybridation afin d'analyser une population souvent complexe d'acides nucléiques pour identifier des séquences apparentées à la cible pouvant former des hétéroduplex.

## *Liste des abréviations*

**ADN** : Acide Désoxy Ribonucléique

**ADNmt** : Acide Désoxy Ribonucléique mitochondrial

**COFRAC** : Comité Français d'accréditation

**CV** : coefficient de variation

**dNTP**: DésoxyNucléotides TriPhosphate

**DTT** : DiThioThrétol

**INCC**: Institut National de Criminalistique et de Criminologie

**Kb**: Kilobase (1000 bases)

**LEV** : Low elution volume

**Pb**: Paire de bases

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**PK**: Proteinase K

**Rpm**: Rotation par minute

**RT-PCR**: Real time polymerase chain reaction

**S**: Ecartype

$\bar{x}$  : Moyenne

## *Liste des tableaux*

<b>Numéro du tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau I</b>	Les inhibiteurs de la PCR.	<b>14</b>
<b>Tableau II</b>	Série 01 de la répétabilité des supports pour l'extraction de l'ADN.	<b>23</b>
<b>Tableau III</b>	Série 02 de la reproductibilité des supports pour l'extraction de l'ADN.	<b>24</b>
<b>Tableau IV</b>	Plan de la plaque de quantification de la série 01.	<b>31</b>
<b>Tableau V</b>	Plan de la plaque de quantification de la série 02.	<b>31</b>
<b>Tableau VI</b>	Plan de la plaque d'amplification d'ADN	<b>33</b>
<b>Tableau VII</b>	Plan de la plaque de post amplification d'ADN.	<b>35</b>
<b>Tableau VIII</b>	Les quantités d'ADN, la moyenne, l'écart type et les coefficients de variation de la série 01.	<b>39</b>
<b>Tableau IX</b>	Les quantités d'ADN, la moyenne, l'écart type et les coefficients de variation de la série 02.	<b>40</b>
<b>Tableau X</b>	Comparaison entre les concentrations D'ADN, cycle seuil des méthodes d'extraction par le Maxwell®16 et la résine Chelex.	<b>55</b>

## *Liste des figures*

<b>Numéro de figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
Figure 1	Structure de l'ADN	3
Figure 2	Schémas de marqueurs d'ADN minisatellite et microsatellite.	6
Figure 3	Les SNP sont des substitutions, insertions ou délétions de nucléotides qui surviennent à des positions uniques dans le génome.	7
Figure 4	Evolution de la quantité d'amplicons en fonction du nombre de cycles de PCR présentée en échelle linéaire.	12
Figure 5	Principe de la PCR en temps réel.	12
Figure 6	Les étapes de la PCR.	14
Figure 7	L'électrophorèse capillaire.	15
Figure 8	Exemple d'un profil génétique étudiant le polymorphisme des STRs des autosomes sur deux loci vWA et D16S539.	16
Figure 9	Composantes croissantes de la variabilité : Répétabilité, Fidélité intermédiaire et Reproductibilités.	17
Figure 10	Introduction de l'extrémité d'un écouvillon dans un microtube	25
Figure 11	Mélange du Mix des réactifs	26
Figure 12	Incubation des échantillons	26
Figure 13	microtube contenant un spin basket	26
Figure 14	Rack contenant les cartouches placé à la plateforme Maxwell®16	28
Figure 15	Plaque 96 puits	30
Figure 16	Présentation schématique des étapes de l'extraction Chelex.	37
Figure 17 (A, B, C, D, E, F)	Les concentrations d'ADN en ng/μL1 des 05 mesures des différents supports de la série 01 et la séries 02.	42
Figure 18	Illustration de la dispersion des résultats expérimentaux autour de leur moyenne lors de l'étude de la répétabilité.	44
Figure 19	Illustration de la dispersion des résultats expérimentaux autour de leur moyenne lors de l'étude de la reproductibilité.	45
Figure 20	Profil génétique complet obtenu à partir des séries 01 et 02 du sang	48
Figure 21	Profil génétique complet obtenu à partir des séries 01 et 02 des ongles	49
Figure 22	Profil génétique complet obtenu à partir des séries 01 et 02 des cheveux	50

Figure 23	Profil génétique complet obtenu à partir des séries 01 et 02 de la salive	51
Figure 24	Profil génétique complet obtenu à partir des séries 01 et 02 du sperme	52
Figure 25	Profil génétique complet obtenu à partir des séries 01et02 des traces de contact.	53
Figure 26	la résine Chelex 100 (à gauche) / l'automate Maxwell® 16 (à droite)	54

## *Table des matières*

Introduction.....	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
I.1 Le support de l'information génétique.....	3
I.1.1 qu'est- ce- qu'un ADN ?.....	3
I.1.2 génome humain.....	4
I.1.3 L'ADN molécule dans la criminalistique.....	4
I.2 Polymorphisme génétique.....	5
I.2.1 Polymorphisme de longueur « RFLP ».....	5
I.2.2 Polymorphisme de répétition.....	5
I.2.3 Polymorphisme d'un seul nucléotide « SNP ».....	7
I.3 Traces biologiques d'ADN et empreinte génétique.....	7
I.4 Méthodes d'analyse génétique en criminalistique.....	9
I.4.1 Extraction d'ADN.....	9
I.4.1.1. Méthode d'extraction organique « Phéno-chlorophorme ».....	9
I.4.1.2. Méthode d'extraction inorganique « Chelex ».....	10
I.4.1.3. Méthode d'extraction en phase solide.....	10
I.4.1.4.L'extraction semi-automatique d'ADN par l'automate Maxwell®1Promega.....	10
I.4.2 Quantification de l'ADN par la PCR en temps réel.....	11
I.4.3 Amplification d'ADN par Polymerase Chain Reaction .....	13
I.4.4 Séparation et détection des produits de la PCR par Electrophorèse capillaire.....	15
I.5 Etablissement des profils génétiques.....	16
I.6 Validation d'une méthode .....	16

I.6.1 Les critères de validation .....	17
--	----

## **Chapitre II : Matériels et Méthodes**

Cadre d'étude.....	21
II.1 Matériels non biologique.....	21
II.2 Matériels biologique.....	21
II.3 Critères de la validation.....	23
II.4 Techniques moléculaires.....	24
II.4.1 Extraction de l'ADN par l'automate Maxwell®16 Promega.....	24
II.4.2 Quantification de l'ADN.....	29
II.4.3 Amplification de l'ADN.....	31
II.4.4 Electrophorèse capillaire.....	34
II.5 Lecture des profils génétiques.....	36
II.6 Extraction d'ADN par Chelex .....	37

## **Chapitre III : Résultats et Discussion**

I. Quantification de l'ADN.....	39
II. Répétabilité et reproductibilité de la méthode d'extraction d'ADN par le maxwell®16.....	44
III. Décèlement d'une contamination.....	47
IV. Etablissement des profils génétiques.....	47
V. Vérification de la qualité de l'ADN obtenu par la méthode d'extraction d'ADN par le Maxwell®16.....	54
Conclusion.....	58

Références bibliographiques

Annexe

# ***Introduction***



Le matériel génétique humain contient un certain nombre d'informations tout à fait particulières, qui le rendent un outil essentiel dans le domaine forensique.

L'ADN présente également un intérêt pour l'analyse criminalistique dans la mesure où des analyses ADN sont susceptibles de constituer un apport essentiel dans un dossier judiciaire.

Aujourd'hui, les enquêteurs disposent de différents outils scientifiques pour élucider le cas d'un suspect et les enquêtes criminelles passent souvent par l'étude des ADN détectés sur les scènes de crime.

Les laboratoires médico-légaux peuvent consacrer jusqu'à un tiers de leur temps et de leur travail à la préparation d'échantillons, le plus souvent l'extraction et la purification des biomolécules tels que les acides nucléiques. Le nombre, la diversité des types d'échantillons et la nécessité d'améliorer la cohérence des résultats ont incité de nombreux laboratoires à chercher des moyens d'améliorer la préparation des échantillons sans sacrifier la qualité. A cet effet, Promega a développé le système de recherche Maxwell® 16 et ses kits Casework tel que DNA IQ™ pro en tant que solution de haut débit et de coût d'opportunité pour répondre aux demandes d'efficacité du laboratoire de recherche.

C'est quoi précisément l'ADN ? Où le trouvons-nous ? Comment est-il analysé et que peut apporter une analyse de ce type ? Quel est le niveau de fiabilité des analyses automatisées ? Le Maxwell® 16 en particulier ? Cet appareil vue sa haute technologie et les avantages qu'il présente, pourrait-il révolutionner le domaine de la criminalistique ?

L'objectif principal de notre étude réalisée au niveau du laboratoire d'identification génétique, consiste à :

- Valider en interne l'une des méthodes d'extraction d'ADN semi-automatique, basée sur l'utilisation des Kit DNA IQ™ pro et l'automate Maxwell® 16 Promega par l'évaluation de sa capacité de produire une bonne qualité d'ADN humain à partir des prélèvements des échantillons frais de différents supports biologiques avec des quantités initiales indéterminées.

*Chapitre I*  
*Synthèse Bibliographique*

## I.1 Le support de l'information génétique

### I.1.1 Qu'est-ce que un ADN?

La vie ne tient qu'à un fil ; ce fameux brin d'ADN (Acide désoxyribonucléique), qui déroule les informations dont chaque cellule qui compose les êtres vivants a besoin pour fonctionner et se reproduire. Lire cette molécule, c'est un peu lire le livre de la vie. L'ADN a souvent été décrit comme le «plan directeur de la vie», qui effectue un tel rôle biologique fondamental est relativement simple. (Goodwin, 2007).

Les informations contenues dans le «plan» de l'ADN sont codées par la séquence des quatre différentes bases azotées, quelle que soit la source : adénine(A), guanine(G), thymine(T) et cytosine(C), et d'un groupement phosphate, d'une molécule de désoxyribose et sur le sucre phosphate épine dorsale ; organisés en groupe appelés nucléotides (Goodwin, 2007).

L'ADN existe normalement sous la forme d'une molécule double brin qui adopte un arrangement hélicoïdal dont les brins sont liés et orientés de manière antiparallèle par des ponts hydrogènes selon la complémentarité suivante: à chaque A est apparié un T et à chaque C, un G (Watson et Crick, 1953). Pour des raisons organisationnelles, l'ADN s'enroule autour d'histones, des protéines de structure, formant ainsi la chromatine qui, une fois condensée, forme les chromosomes (Bourgon, 2000) (Figure 1).

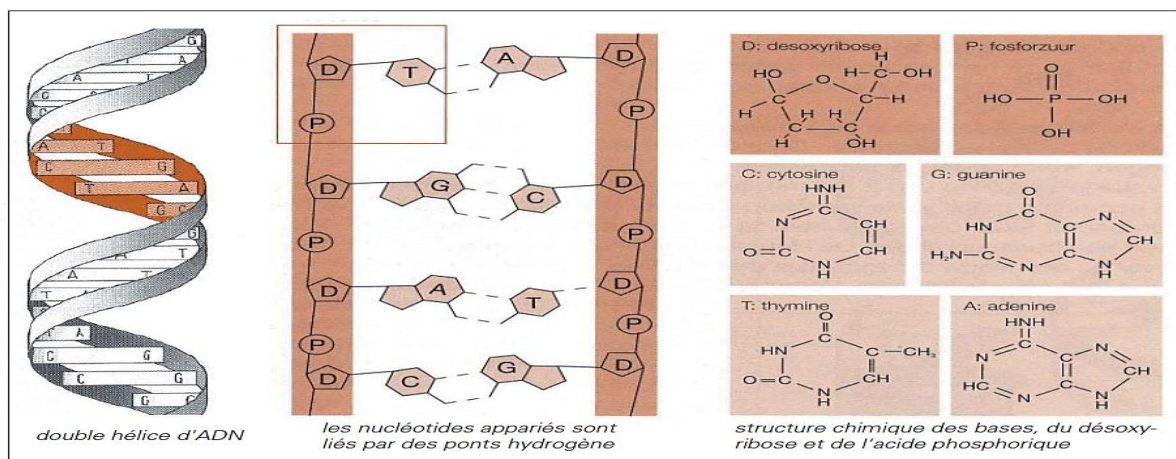


Figure 1 : structure de l'ADN (Dossier détactique, 2006).

## **I.1.2 Génome humain**

Le génome humain correspond à notre patrimoine génétique. Il est constitué de 3.2 milliards de paires de bases comporte environ 20 000 gènes **(Hanquet et al., 2018)**.

Il existe deux sortes d'ADN : la première est l'ADN génomique ou nucléaire ; il se situe dans le noyau de chaque cellule eucaryote, sous la forme de chromosomes (une molécule d'ADN par chromosome). La deuxième forme est l'ADN mitochondrial ou chondrome ; on le trouve en plusieurs copies dans les mitochondries de l'organisme.

### **I.1.2.1 ADN nucléaire**

Chaque cellule somatique nucléée d'un être humain contient 23 paires de chromosomes; 22 paires d'autosomes et 1 paire de chromosome sexuels, XX pour une femme et XY pour un homme **(Mader, 2010)**.

### **I.1.2.2 ADN mitochondrial**

A l'exception de l'ADN nucléaire, il existe un petit génome circulaire bi caténaire trouvé dans les mitochondries qui ne réside pas dans le noyau des cellules, comme l'ADN nucléaire, mais dans la matrice des mitochondries, c'est l'ADN mitochondriale (ADN mt) **(Butler, 2012)**.

## **I.1.3 L'ADN molécule clé dans la criminalistique**

La criminalistique prend une place de plus en plus grande dans l'enquête judiciaire. Mener une enquête judiciaire pour la résolution d'un crime, c'est rechercher des moyens pour le comprendre. Il existe différents modes de preuves.

L'analyse de l'ADN est utile pour rechercher des personnes disparues, ou encore pour l'identification de victimes lors d'une catastrophe de masse. Mais aussi en médecine légale pour déterminer la filiation entre les individus. **(Loistron, 2009)**.

Avec les progrès des techniques de biologie moléculaire, il est maintenant possible d'analyser n'importe quelle région dans les 3,2 milliards de bases qui composent le génome. Locus d'ADN qui doivent être utilisés pour la génétique médico-légale devrait avoir quelques propriétés clés, ils devraient idéalement: être fortement polymorphique (variant largement entre les individus); donner

des profils simples à interpréter et faciles à comparer entre laboratoires; avoir un faible taux de mutation (**Goodwin et al, 2007**).

## **I.2 Polymorphisme génétique**

Le génome de chaque personne contient une grande quantité d'ADN non codants, qui est une cible potentielle pour Profilage de l'ADN. La sélection de la région particulière de l'ADN polymorphe à analyser peut changer avec le cas individuel et aussi la technologie qui est disponible. Plusieurs types de polymorphismes de l'ADN ont été utilisés comme marqueurs de la génétique, chacun révélant un niveau différent de variabilité (**Goodwin et al., 2007**).

### **I.2.1 Polymorphisme de longueur « RFLP »**

Les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) apparaissent à la suite de mutations. Leur détection repose sur les différences éventuelles de la longueur des fragments obtenus après digestion de l'ADN génomique par une enzyme de restriction à l'aide d'une sonde monoclonale, conduisant à des variations, entre les individus (**Lodish et al, 2005**).

### **I.2.2 Polymorphisme de répétition**

Ce sont des séquences plus ou moins longues, répétées en tandem dans le génome qui représentent environ 50%. (**Lander et al., 2001**). Ces séquences sont présentées à différents loci connus sur les chromosomes et sont donc recherchées lors de la réalisation d'une empreinte génétique ; on distingue deux catégories importantes de répétition en tandem : les minisatellites (VNTR) et les microsatellites (STR).

#### **I.2.2.A Les minisatellites « VNTR »**

Les minisatellites ou VNTR (Variable Number Tandem Repeat) sont des régions qui contiennent un si haut degré de polymorphisme. Ils se trouvent plus fréquemment dans les régions proches des télomères mais ils peuvent être aussi présents sur d'autres sites chromosomiques (**Petkovski, 2006**). Ils sont instables et composés de séquences de 6 à 100 nucléotides répétées en tandem (**Forster et al ; 2002**) (**figure 2**).

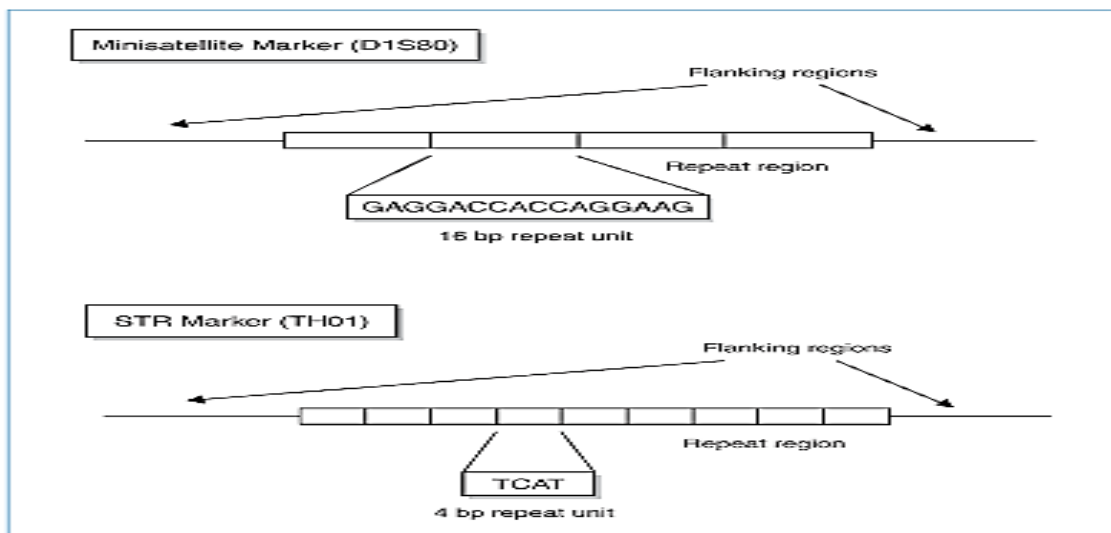
Les VNTRs ont été les marqueurs génétiques les plus utilisés dans le traitement des dossiers médico-légaux et ont connu un très grand succès durant plusieurs années ; mais leur utilisation était

limitée car ils présentaient un inconvénient majeur qui est la nécessité d'avoir de grandes quantités d'ADN de bonne qualité (Mansuet-Lupo *et al* ; 2007).

### I.2.2.B Les microsatellites « STR »

L'ADN humain contient un très grand nombre de STR (Short Tandem Repeats), ce sont des séquences courtes qui sont distribuées principalement dans les régions terminales des chromosomes humains, d'une longueur de 2 à 6 paires de bases, répétées entre 20 et 50 fois à chaque locus, ce qui crée des allèles de taille variable (entre 50 et 500 paires de base) (Petkovski, 2006) (figure 2).

La facilité, la rapidité et la fiabilité des réactions PCR pour les microsatellites STR, ainsi que la faisabilité de ces derniers sur absolument toutes sortes de taches ou de traces biologique, les STR sont devenus l'outil standard de tous les laboratoires de criminalistique dans le monde.

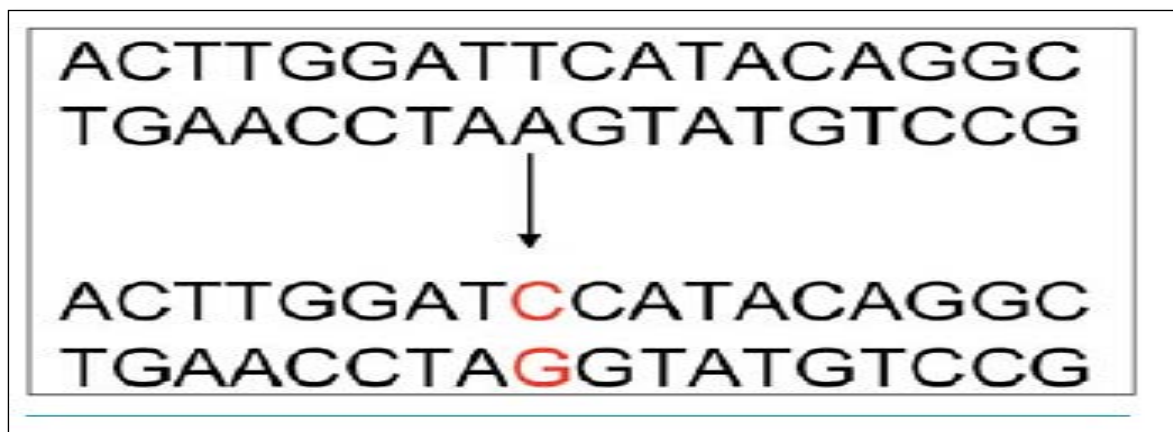


**Figure 2 :** Schémas de marqueurs d'ADN minisatellite et microsatellite. (Bulter, 2001).

### **I.2.3 Polymorphisme d'un seul nucléotide « SNP »**

Les polymorphismes d'un seul nucléotide SNP (Single Nucleotide polymorphisms) correspondant à la substitution d'un seul nucléotide à une position spécifique dans le génome, ce qui crée des allèles différents. (Loistron, 2009) (Figure 3).

Ces marqueurs se révèlent intéressants pour l'analyse de prélèvements biologiques dégradés dans le domaine médico-légal (Keyser et Petkovski, 2006).



**Figure 3** : Les SNP sont des substitutions, insertions ou délétions de nucléotides qui surviennent à des positions uniques dans le génome (keyser et Petkovski, 2006).

## **I.3 Traces biologiques d'ADN et empreinte génétique**

### **I.3.1 Source d'ADN**

En criminalistique, 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 (Sozer, 2014). L'ADN peut être extrait de n'importe quelle partie du corps humain. Souvent, les sources les plus communes étant les échantillons de sang ou de tissus mous du corps, les os, cheveux, la salive, les ongles, le sperme... (Taupin et Cwiklik, 2011).

#### **I.3.1.1 Trace du sang**

Le sang est l'un des indices retrouvés sur une scène de crime qui apporte le plus d'éléments utiles à l'enquête. Il porte en effet de l'ADN, pouvant appartenir au criminel ou à sa victime

**(peltier, 2011)**. Il est considéré comme la trace biologique traditionnelle par excellence pour son accessibilité à l'extraction de l'ADN **(Coquoz, 2013)**.

### **I.3.1.2 Traces de contact**

La sensibilité des analyses d'ADN utilisant la PCR a permis d'envisager, d'exploiter toutes les traces laissées par le contact sur des objets. Ce contact est susceptible de permettre le transfert de quelques cellules. Cette famille de traces est extrêmement vaste, mégotes de cigarettes, combiné de téléphone, chapeaux, vêtements. Elles sont devenues banales et les traces les plus souvent utilisées **(Coquoz, 2013)**.

### **I.3.1.3 La salive**

Au cours des dernières années la salive est devenue une très importante trace biologique pour les chercheurs du domaine forensique. Ce fluide corporel a gagné une popularité dans l'enquête médico-légale et judiciaire en raison de sa collection et sa manipulation facile **(Pereira, 2014)**. L'ADN génomique peut être extrait à partir de la salive trouvée sur les surfaces du chewing-gum, des mégots de cigarettes, et des timbres-poste, comme il est facile d'être transféré au moment où un individu parle, sur les objets placés proche de la bouche (téléphone, micro, vêtements) **(Coquoz et Taroni, 2006)**.

### **I.3.1.4 Les cheveux et poils**

Les cheveux et les poils sont une catégorie d'échantillons qui a été exploitée de l'introduction de la microscopie en police scientifique **(Coquoz, 2013)**. Un cheveu est composé d'un bulbe pileux et d'une tige (de cheveu). Ce sont surtout les bulbes pileux arrachés qui permettent de fournir une bonne analyse ADN, soit d'ADN nucléaire, soit mitochondrial.

### **I.3.1.5 Les ongles**

Les ongles sont de bonnes sources d'ADN, qu'on les retrouve en fait rarement comme trace. Ils contiennent une bonne quantité d'ADN et peuvent donc être utilisés pour l'identification des personnes. On peut retrouver des cellules d'un agresseur sous les ongles d'une victime, dans les cas où la victime a essayé de griffer son agresseur, mais on peut difficilement espérer extraire l'ADN étranger sans extraire en même temps l'ADN des ongles pour obtenir un profil d'ADN **(Coquoz, 2013)**.



### **I.3.1.6 Le sperme**

Le sperme est en général une bonne source d'ADN, sauf si le sperme contient peu ou pas de spermatozoïdes. Pour la recherche des traces de sperme, la simple observation à l'œil nu est évidemment indispensable. Néanmoins, le sperme n'étant pas coloré, il est peu détectable. Une tache de sperme peut être repérée, sur certains supports, par sa luminescence à l'aide d'une lampe UV de moyenne puissance. On peut aussi détecter la présence de certaines substances qui ne se rencontrent quasiment que dans le sperme avec des tests simples (**Koehler et al., 2010**).

## **I.4 Méthodes d'analyse génétique en criminalistique**

### **Analyse d'ADN**

Au cours de ces dernières années, les analyses d'ADN utilisées par la justice ont connu de nombreux développements : réduction du nombre des cellules nécessaires à l'analyse, méthodes d'extraction et de purification plus efficaces, méthodes de génotypage plus rapides. Elle est basée sur quatre étapes successives, commençant par l'extraction d'ADN, puis la quantification, ensuite l'amplification de l'ADN par PCR, terminant par la séparation et la détection des produits amplifiés par électrophorèse capillaire, générant un profil génétique (**Doutremepuich, 2012**).

#### **I.4.1 Extraction de l'ADN**

Il existe de nombreuses méthodes disponibles pour extraire l'ADN. L'utilisation dépend d'un certain nombre de facteurs, y compris le type et la quantité de l'échantillon dans certains cas, la capacité d'automatiser la procédure d'extraction (**Goodwin et al, 2007**).

##### **I.4.1.1. Méthode d'extraction organique « phénol-chloroforme »**

La méthode au phénol-chloroforme a été largement utilisée en biologie moléculaire mais été progressivement abandonnée depuis le milieu des années 1990, en grande partie à cause de la nature toxique du phénol ainsi que la méthode prend beaucoup de temps. Il est encore utilisé dans certains laboratoires de médecine légale; en particulier il est encore largement utilisé pour l'extraction de l'ADN des échantillons osseux et des sols.

La méthode produit ADN propre mais à quelques inconvénients: en plus de la nature toxique du phénol, elle nécessite de multiples transferts d'échantillon entre les tubes ainsi qu'une étape de

précipitation finale, augmentant le risque de contamination et confusion des échantillons (**Goodwin et al, 2007**).

#### **I.4.1.1. Méthode d'extraction inorganique « CHELEX »**

Des procédures utilisant la résine chélatante Chelex100 ont été développées pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons de type médico-légal à utiliser avec la PCR. Les procédures sont simples, rapides, prenant environ 1 heure, n'impliquent pas de solvants organiques et ne nécessitent pas de transferts de tubes multiples pour la plupart des types d'échantillons. Le procédé nécessite moins d'étapes, ce qui minimise les risques de contamination (**Walsh, 1991**).

#### **I.4.1.1. L'extraction en phase solide**

Le kit QIAamp DNA Mini est un système qui utilise la technologie à membrane de silice (technologie QIAamp) pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons biologiques pour une PCR fiable et Southern Blotting (**QIAamp DNA Mini Kit, 2012**).

#### **I.4.1.1. L'extraction semi-automatique par l'automate MAXWELL® 16 promega**

Le domaine de la médecine légale présente des défis particuliers en raison des types d'échantillons traités en routine. En outre, le nombre d'échantillons à traiter continue à augmenter, ce qui nécessite des options à plus haut débit.

L'appareil Maxwell® 16 pour la médecine légale élimine plusieurs étapes manuelles et exigeantes en main d'œuvre des méthodes actuelles d'extraction de l'ADN. Il contient des méthodes préprogrammées de purification et est conçu pour être utilisé avec des cartouches de réactifs pré-remplies. Cet appareil peut traiter jusqu'à 16 échantillons en environ 30 minutes. L'ADN purifié peut être utilisé directement dans les réactions d'amplification STR, ou quantifié avant l'amplification STR des échantillons d'études de cas. (**Manuel technique de l'appareil Maxwell® 16 pour la médecine légale, 2015**)

Le kit Pro Case DNA IQ™ pour Maxwell® 16 utilise la résine DNA IQ™ pour purifier l'ADN, maximisant le rendement et la pureté de l'ADN pour une analyse STR. La méthodologie basée sur les particules paramagnétiques évite les problèmes courants rencontrés avec d'autres systèmes automatisés, tels que les bouts bouchés ou les transferts partiels de réactifs, qui peuvent

conduire à une purification d'ADN sous-optimale (DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16, 2014).

#### **I.4.2 Quantification de l'ADN par la PCR en temps réel**

Une fois l'ADN extrait, il est important de quantifier l'ADN avec précision pour une analyse ultérieure. La PCR en temps réel (RT-PCR) est une variante de la technique PCR standard couramment utilisée pour quantifier l'ADN ou l'ARN dans un échantillon (Elyes, 2002).

##### **I.4.2.1 Principe de la RT-PCR**

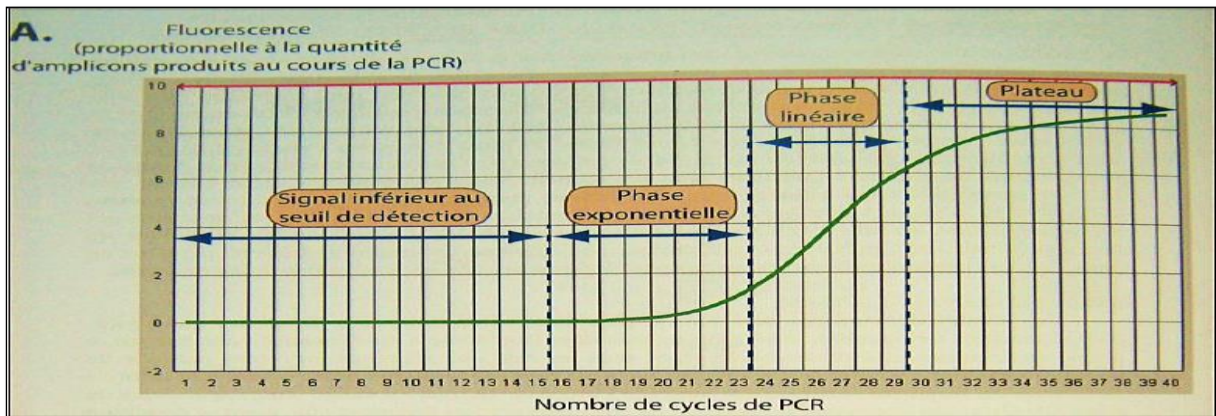
La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps «en temps réel» le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant, générant une courbe de PCR pour chaque échantillon (Elyse, 2002).

##### **I.4.2.2 Les étapes de RT-PCR**

**1-La phase exponentielle** : C'est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR. Une fluorescence est détectée et son augmentation est proportionnelle à l'augmentation du produit PCR. (Dougoud, 2008).

**2-La phase linéaire** : Après la phase exponentielle, la réaction d'amplification entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable, même au niveau de replica d'un même échantillon (Goodwin et al, 2007).

**3-La phase plateau** : le signal émis et le taux d'amplification décroît générant très peu d'amplicons et reste constant (Goodwin, 2007).

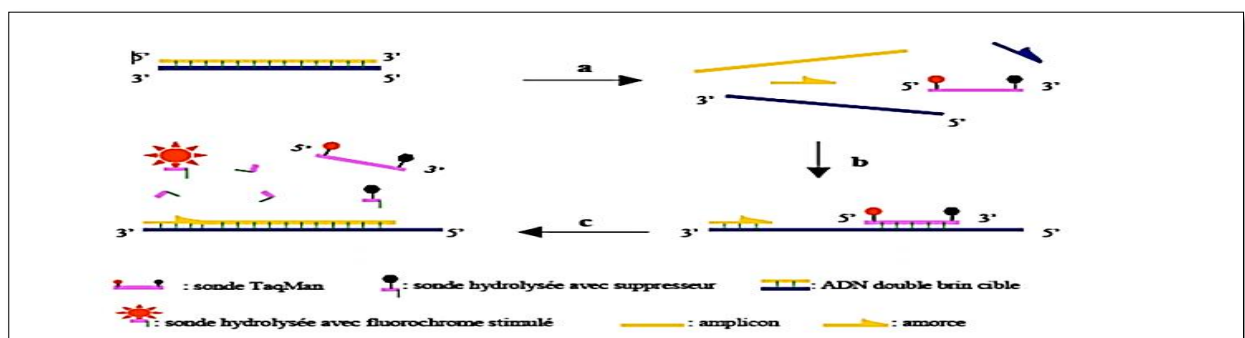


**Figure 6 :** Evolution de la quantité d'amplicons en fonction du nombre de cycles de PCR présentée en échelle linéaire (Pascal, 2007).

### I.4.2.3 Principe de la sonde Taqman

La TaqMan® est une sonde oligonucléotidique complémentaire d'un fragment de la séquence à amplifier et quantifier est mise en présence de l'extrait d'ADN avec la Taq ADN polymérase et les amorces de PCR. (Livak *et al*, 1995).

La fluorescence de R (reporter) ne peut être émise lorsque la sonde est intacte, du fait de la proximité du second marqueur fluorescent Q (quencher). Lors de l'élongation, l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq ADN polymérase assure le clivage de la sonde, puis la séparation des fragments clivés de la matrice, libérant ainsi le marqueur R de l'influence du quencher. La fluorescence du marqueur R peut alors être émise (Figure 7). Ce phénomène se reproduit à chaque cycle d'amplification (Dougoud, 2008).



**Figure 7 :** Principe de la PCR en temps réel (Dougoud, 2008).

### **I.4.3 Amplification par polymeras chain reaction (PCR)**

Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN, à partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques. Cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée. La PCR a été mise au point en 1985 par Kary Mullis qui a obtenu le prix Nobel de chimie en 1995. **(Elyes, 2002).**

#### **I.4.3.1 Principe de la PCR**

La réaction en chaîne par polymérase est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier énormément le nombre de copies d'une séquence spécifique d'ADN (l'amplicon), même si la quantité initiale est très faible. Une ADN polymérase thermostable provenant de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Taq) possède la propriété de résister à plusieurs expositions successives à hautes températures, cette technique a révolutionné tous les domaines y compris la génétique forensique. L'amplification est effectuée par la répétition de cycles de dénaturation/ hybridation/extension qui assure une duplication exponentielle de chaque brin. **(Goodwin et al, 2007).**

Les acteurs de la PCR sont: l'extrait d'ADN (ADN matriciel), la Taq polymérase, le cofacteur  $Mg^{2+}$ , les amorces et les quatre désoxyribo Nucléosides Triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon.

#### **I.4.3.2 Les étapes de la PCR**

La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. Chaque cycle contient trois étapes (**Figure 8**):

**1/ Dénaturation** : Dans la première étape l'ADN est dénaturé à haute température (de 90 à 95 degrés Celsius).

**2/ Hybridation** : les amorces s'hybrident aux brins du modèle d'ADN pour amorcer l'extension.

**3/ élongation** : 72 °C l'extension se produit à la fin des amorces recuites pour créer un brin de copie complémentaire de l'ADN. Cela double efficacement la quantité d'ADN à travers les troisièmes étapes du cycle de PCR **(Mohin ; Deshpande, 2010).**

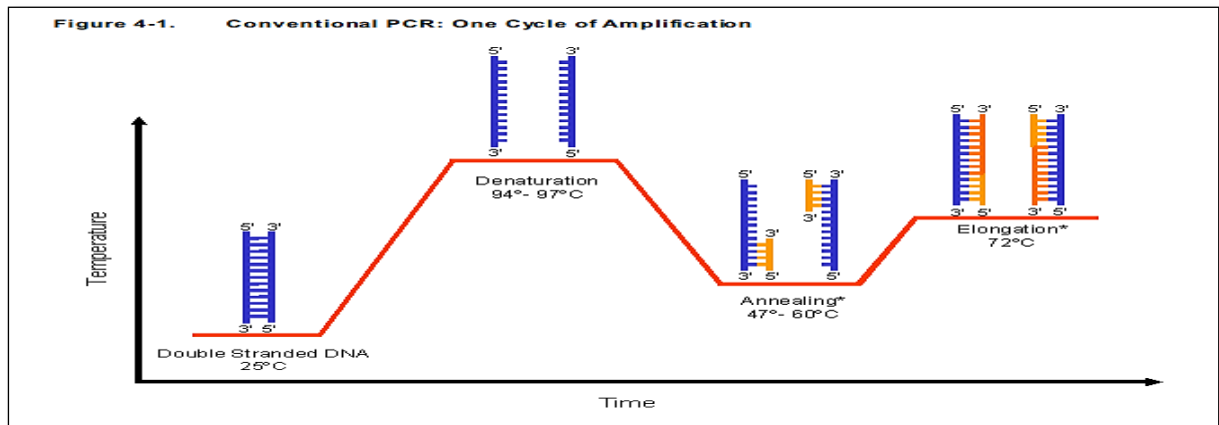


Figure 8 : Les étapes de la PCR (EPA, 2004).

#### I.4.3.3 Les inhibiteurs de la PCR

Depuis que les scientifiques ont utilisé la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), les inhibiteurs de la PCR ont été un obstacle au succès. Le processus d'amplification par PCR peut être affecté ou empêché par des inhibiteurs (Bessetti, 2007) (Tableau I).

Tableau I : Les inhibiteurs de la PCR (Somma).

Inhibiteur	Concentration inhibitrice
SDS	> 0,005%
Phénol	> 0,2%
Éthanol	> 1%
Isopropanol	> 1%
Acétate de sodium	> 5 mM
Chlorure de sodium	> 25 mM
EDTA	> 0,5 mM
Hémoglobine	> 1 mg/ml
Héparine	> 0,15 i.m/ml
Urée	> 20 mM
Mélange de réactifs	> 15%

#### I.4.4 Séparation et détection des produits de la PCR par Electrophorèse capillaire

Les plus grands progrès des dernières décennies en biologie moléculaire ont été obtenus par l'analyse et la manipulation des macromolécules, l'ADN en particulier. Bien que la séquence des acides nucléiques détermine ses fonctions biologiques, la longueur de ces polymères constitue leur propriété physique la plus utile.

Parmi les techniques les plus utilisées pour la séparation des acides nucléiques selon leur taille est l'électrophorèse. L'électrophorèse capillaire n'apparaît sur la scène analytique que beaucoup plus tard. En effet, c'est Hjerten qui, en 1967, décrit le premier système d'analyse par électrophorèse capillaire (Cerdon, 1997).

##### Principe :

L'électrophorèse capillaire est une microtechnique destinée à l'analyse qualitative et quantitative de solutions complexes, à partir d'échantillons de très faible volume. Elle est effectuée dans un tube capillaire isolant de très faible diamètre (25 à 100  $\mu\text{m}$ ) et en utilisant des tensions de plusieurs dizaines de milliers de volts. Elle permet la séparation de courts fragments d'ADN et par conséquent pour le génotypage (Le Carrer et Kalyane, 2004).

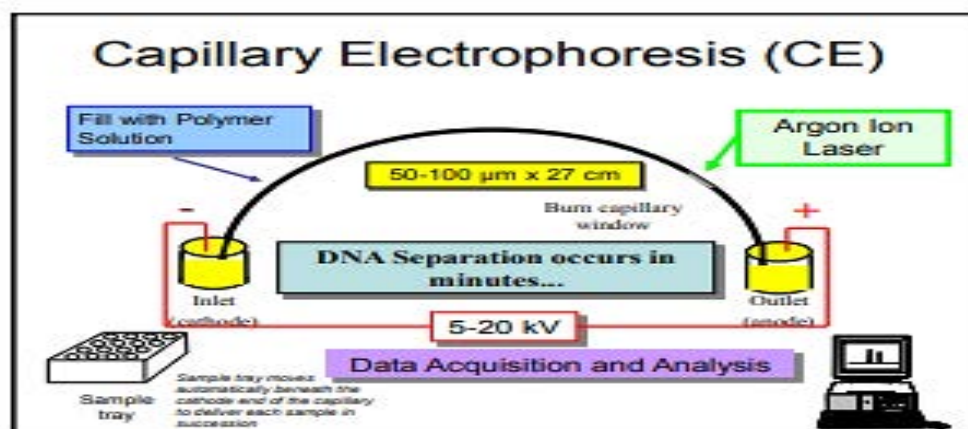
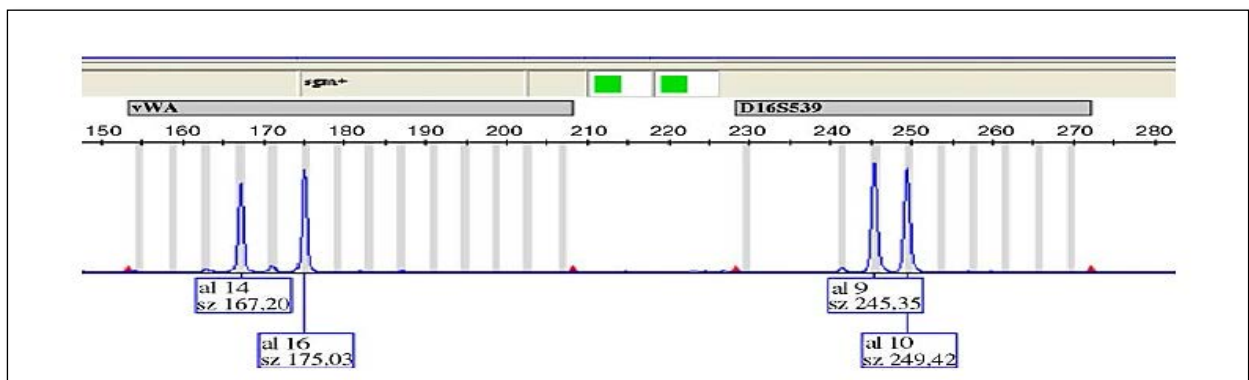


Figure 9 : l'électrophorèse capillaire (Butler, 2011).

### I.5 Etablissement des profils génétiques

Après séparation et détection des produits de la PCR obtenus, un profil d'ADN est établi. Ces profils s'affichent sous forme d'électrophorégramme dans lequel différents allèles sont représentés sous forme de pics ou sont visualisés sous forme de bandes (**Bulter, 2005**) (**Figure 10**).

L'analyse des profils génétiques (identification unique d'une personne) est devenue un élément clé dans le domaine de la criminalistique qui les utilise comme preuve judiciaire scientifique.



**Figure 10** : Exemple d'un profil génétique étudiant le polymorphisme des STRs des autosomes sur deux loci vWA et D16S539. (**Mansuet-Lupo et al., 2007**).

### I.6 La validation d'une méthode

#### Définition et principe

Les Laboratoires en sciences médico-légales font un usage important de coffrets réactifs et des instruments qui leur sont associés. Avant de mettre en œuvre un système d'extraction d'ADN automatisé (une combinaison de robot et chimie de l'extraction) à utiliser avec des échantillons de cas, chaque laboratoire doit compléter une étude de validation interne du système automatisé.

Cette "validation" s'inscrit alors dans une vérification des performances annoncées par le fabricant ou souhaitées par le laboratoire, lors de la mise en application des méthodes d'analyses dans son laboratoire, afin de correspondre aux besoins de ses clients. Il n'est en effet pas demandé aux laboratoires d'effectuer de nouveau l'évaluation des méthodes ou des automates, études qui ont déjà été réalisées par le fournisseur ou le fabricant, qui eux ne connaissent pas ces besoins (**Comité Français d'Accréditation, 2011**).



### **I.6.1 Les critères de validation :**

Chaque méthode d'analyse possède un certain nombre de propriétés caractéristiques, critères qui qualifient les performances de la méthode.

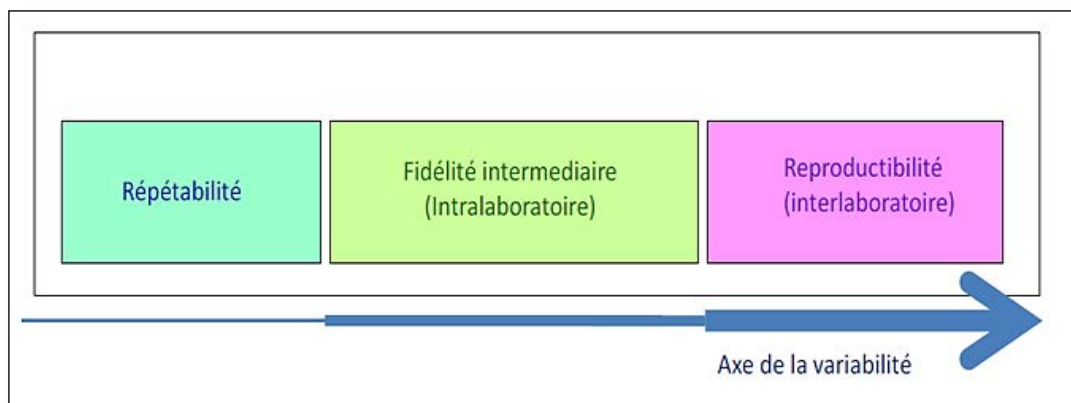
L'évaluation de ces caractéristiques ne se fait pas systématiquement, mais une sélection est réalisée en fonction du besoin et de l'analyse du processus de mesure. Toutefois, les caractéristiques qui sont souvent présentes: La répétabilité, la fidélité intermédiaire, et la reproductibilité, qui se regroupent sous le nom de la fidélité (**Amarouche, 2010**). On peut les définir comme suit :

#### **I.6.1.1 La fidélité :**

##### **Définition**

C'est "l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre les valeurs mesurées obtenues par des mesures répétées du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées" (**ISO/IEC, 2007**).

La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra laboratoire) et la reproductibilité (inter laboratoire) (**Figure 11**).



**Figure 11** : composantes croissantes de la variabilité (fidélité) (**Laurentie, 2015**).

##### **1.6.1.1.1 Répétabilité**

##### **Définition**

C'est "la fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité et qui représente l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'essais indépendants obtenus avec la même procédure opératoire, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de

fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesures répétées sur le même objet ou des objets similaires dans un court intervalle de temps". (ISO/IEC, 2007).

**Principe :**

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne ( $\bar{x}$ ), l'écart-type ( $s$ ) et le Coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

$$\text{CV en \%} = 100 \frac{s}{\bar{x}}$$

Le CV représentera la répétabilité de la méthode en %. Calculé est comparé au CV limite d'acceptabilité préalablement choisi (Comité Français d'Accréditation, 2011).

Il est nécessaire d'avoir des répétitions par niveau pour identifier et quantifier les sources d'erreur. Le nombre de répétitions minimal par niveau est de 2, mais il peut être porté à 3 si le nombre de niveaux étudiés est faible.

**I.6.1.1.2 Fidélités intermédiaires**

**Définition**

C'est "la fidélité de mesure selon un ensemble de conditions où les résultats sont obtenus par la même procédure opératoire, le même lieu et des mesures répétées sur le même objet ou des objets similaires pendant une période de temps étendue, mais pouvant comprendre d'autres conditions que l'on fait varier" (ISO/IEC, 2007).

**Principe**

Les modalités de calcul sont identiques à celles de la répétabilité, avec calcul de la moyenne ( $\bar{x}$ ), de l'écart-type ( $s$ ) et du coefficient de variation (CV) sur les valeurs expérimentales de chaque série (Comité Français d'Accréditation, 2011).

### **I.6.1.1.3 Reproductibilités**

#### **Définition**

La reproductibilité qui, à la différence de la répétabilité, considère les résultats obtenus avec une même méthode et sur un même échantillon homogène, mais dans des laboratoires différents et par différents opérateurs utilisant différents équipements. Des études collaboratives – encore appelées analyses inter-laboratoires ou circuit d’analyses permettent d’évaluer cette reproductibilité.

On donnera aussi parfois un sens restreint à cette notion de reproductibilité, en considérant par exemple, dans un même laboratoire, différents opérateurs utilisant le même matériel ou un même opérateur qui exécute la même analyse mais à des dates très éloignées les unes des autres, etc. (**Feinberg, 2010**).

## *Chapitre II*

### *Matériels & Méthodes*

## **Cadre d'études**

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'identification génétique, au sein de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie (INCC) de la gendarmerie nationale (GN) à Bouchaoui, Alger, pendant une période de trois mois (d'Avril à Juin).

Son objectif consiste à :

- Evaluer la performance de la méthode d'extraction de l'ADN en utilisant l'automate Maxwell® 16 promega et le kit DNA IQ™ casework pro (PROMEGA), à partir de différents supports tels que : sang, salive, sperme, cheveux, ongles et traces de contact, en déterminant la qualité de cet ADN en vue de son utilisation pour l'établissement de profils génétiques.
- Obtenir des quantités d'ADN amplifiables supérieures au seuil recommandé par le fabricant du kit d'amplification (PROMEGA) à partir des quantités initiales indéterminées.

## **Matériels et Méthodes :**

### **I. Matériels non biologiques (Annexe partie équipements utilisés)**

La réalisation de notre travail a nécessité l'équipement suivant :

- Maxwell®16 (PROMEGA)
- PCR en temps réel
- Thermocycleur
- Electrophorèse capillaire
- Centrifugeuse
- Cross Linker
- Incubateur
- Vortex

### **II. Matériels biologiques**

#### **II.1 Prélèvement biologique**

Notre étude a consisté à valider la technique d'extraction d'ADN par maxwell 16, à cet effet, nous avons effectué plusieurs prélèvements de six supports prélevés d'une personne connue : Cheveux, ongles, salive, sang, sperme et traces de contact.

## **II.2 Préparation des échantillons à partir de différents supports biologiques**

Durant la préparation des supports qui portent le matériel biologique une attention particulière a été prise en considération pour éviter tout type de contamination, afin d'atteindre cet objectif ; des gants, des masques (bavettes) et des charlottes stérilisés ont été utilisés durant toute la manipulation.

Avant de procéder aux prélèvements d'échantillons de chaque support, la hotte, le matériel du travail et le consommable (les microtubes) ont été nettoyés et décontaminés par des rayons UV.

- **Préparation des échantillons à partir des cheveux**

Nous avons introduit dans cinq (5) microtubes de 1.5ml des échantillons de trois cheveux à partir d'un volontaire connu. Ces cheveux arrachés de la racine dont le bulbe pileux sensé fournir une bonne quantité de l'ADN.

- **Préparation des échantillons à partir des ongles**

A l'aide d'un bistouri stérilisé, on a coupé des ongles en copeaux minuscules, que nous avons introduits dans cinq (5) des microtubes de 1.5ml.

- **Préparation des échantillons à partir de la salive**

La salive a été prélevée à partir des cellules buccales imbibant un écouvillon qui est frottis sur la surface intérieur de la joue d'un volontaire connu.

Couper et placer la tige de chaque écouvillon des échantillons prélevés dans cinq (5) des microtubes de 1.5 ml.

- **Préparation des échantillons à partir du sang**

Le participant a été piqué à l'aide d'une aiguille stérilisée et à l'aide d'un écouvillon, on a pris des échantillons de sang que nous avons introduits dans cinq (5) microtubes de 1.5ml différents.

- **Préparation des échantillons à partir du sperme**

A l'aide des écouvillons, on a prélevé cinq fois des échantillons de spermes et on les a placés dans cinq (5) des microtubes de 1.5ml.

- **Préparation des échantillons à partir des traces de contact**

A l'aide d'un écouvillon imbibé d'eau pure, on a frotté la surface d'un ordinateur et d'un portemonnaie pour récupérer le maximum de cellules déposées. Ces écouvillons ont été placés dans cinq (5) microtube de 1.5ml.

### **III. Critères de la validation**

Pour évaluer les critères de la validation, nous avons effectué deux séries de prélèvements de six supports biologiques, (voir Annexe 02).

La première série englobe 30 échantillons, dont 5 échantillons pour chaque support et qui a pour but de tester la Répétabilité de notre technique (**Tableau II**).

Ce test a été effectué avec la même procédure opératoire, le même opérateur, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu dans un court intervalle de temps.

**Tableau II** : Série 01 de la répétabilité des supports pour l'extraction de l'ADN

<b>Cheveux</b>	<b>Ongle</b>	<b>Salive</b>	<b>Sang</b>	<b>Sperme</b>	<b>Trace de contact</b>
Ch1.I	Og1.I	SL1.I	Sg1.I	Sp1.I	Tc1.I
Ch2.I	Og2.I	SL2.I	Sg2.I	Sp2.I	Tc2.I
Ch3.I	Og3.I	SL3.I	Sg3.I	Sp3.I	Tc3.I
Ch4.I	Og4.I	SL4.I	Sg4.I	Sp4.I	Tc4.I
Ch5.I	Og5.I	SL5.I	Sg5.I	Sp5.I	Tc5.I
Témoin négatif (Tex01)			Témoin négatif (Tex02)		

La deuxième série qui a pour but de tester la reproductibilité a nécessité les mêmes paramètres de la répétabilité (la même procédure opératoire, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu dans un court intervalle de temps), mais on a changé le manipulateur. (**Tableau III**).

**Tableau III** : Série 02 de la reproductibilité des supports pour l'extraction de l'ADN

<b>Cheveux</b>	<b>Ongle</b>	<b>Salive</b>	<b>Sang</b>	<b>Sperme</b>	<b>Trace de contact</b>
Ch1.II	Og1.II	SL1.II	Sg1.II	Sp1.II	Tc1.II
Ch2.II	Og2.II	SL2.II	Sg2.II	Sp2.II	Tc2.II
Ch3.II	Og3.II	SL3.II	Sg3.II	Sp3.II	Tc3.II
Ch4.II	Og4.II	SL4.II	Sg4.II	Sp4.II	Tc4.II
Ch5.II	Og5.II	SL5.II	Sg5.II	Sp5.II	Tc5.II
Témoin négatif (Tex03)			Témoin négatif (Tex04)		

Il faut noter que chaque série a été divisée en deux, chacune d'elles renferme 3 supports analysés ensemble le jour même étant donné que l'automate Maxwell 16 ne peut traiter que 16 échantillons à la fois.

#### **IV. Techniques moléculaires**

Les échantillons des deux séries ont été soumis à la même procédure d'analyse dont les détails seront démontrés ci-dessous

##### **IV.1 Extraction de l'ADN par l'automate Maxwell® 16 promega**

###### **IV.1.1 Prétraitement des échantillons**

- **Matériels**

Le matériel utilisé pour réaliser ce travail est répertorié dans l'Annexe II.

- **Réactifs**

Kit DNA Casework (Voir Annexe II).

Tampon de lyse

Tampon d'éluion



• **Méthodes**

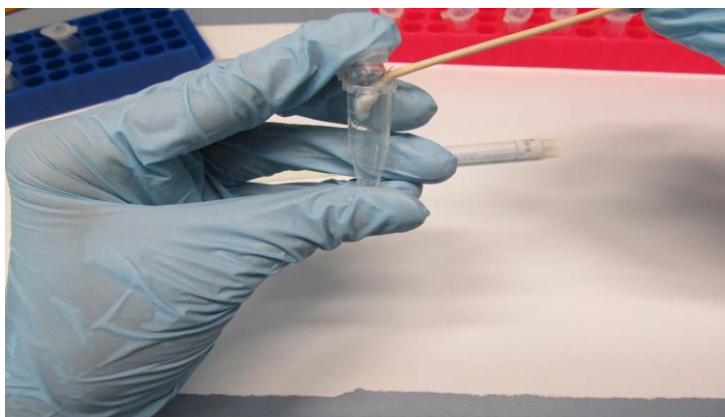
a. Préparation de la solution de la Protéinase K

- ❖ Ajouter 556µl de l'eau sans nucléase à un tube de PK (lyophilisée), inverser doucement pour se dissoudre.
- ❖ La concentration finale de la PK sera 18mg/ml ; Stockera à 20°C.

b. Préparation de l'extrait :

Tous les échantillons des deux séries ont subi la même procédure :

- Placer l'extrémité de l'écouvillon (substrat solide) au fond de microtube 1.5ml.

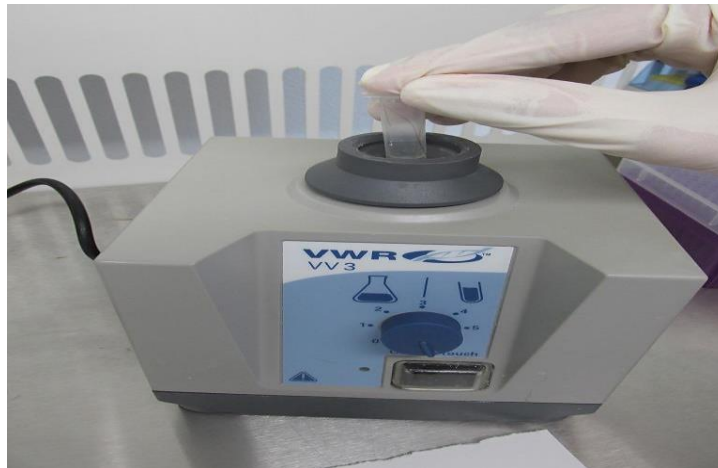


**Figure 10 :** Introduction de l'extrémité d'un écouvillon dans un microtube

- Un blanc de manipulation doit être préparé (contenant que les réactifs sans l'échantillon).
- Ajouter le volume final de chaque réactif :

<b>Kit DNA casework</b>		
Casework extraction buffer	386µl	400µl
Proteinase K	10µl	
Thioglycérol	04µl	

- mélanger brièvement le mix des réactifs et distribuer un volume de 400µl dans chaque microtube d'un substrat solide.



**Figure 11 : Mélange du Mix des réactifs**

- mélanger les échantillons à une grande vitesse pendant 5 secondes et les incuber à 56° pendant 30min.



**Figure 12 : Incubation des échantillons**

- Placer des spins basket DNA IQ dans des microtubes 1.5ml, transférer les échantillons dans les spins DNA IQ avec des aiguilles et orienter les écouvillons vers le bas des spins basket.
- A l'aide d'une micropipette transférer les échantillons dans des microtubes contenant des spins basket.



**Figure 13 : microtube contenant un spin basket**

- Centrifuger à température ambiante pendant 2min/13000rpm (tour par minute) dans une micro centrifugeuse.
- Retirer les spins basket.
- Ajouter 200µl de tampon de lyse au tube contenant l'extrait.
- Fermer les couvercles des tubes et mélanger à nouveau les échantillons pendant 5 à 10sec.
- Les échantillons sont maintenant prêts pour l'extraction automatisée d'ADN par l'automate Maxwell® 16 LEV.

**Note :** Ajouter le blanc pour vérifier s'il y a une contamination au niveau des réactifs.

#### **IV.1.2 Préparation d'échantillons pour les cartouches Maxwell®16 LEV**

Le matériel utilisé pour réaliser ce travail est répertorié dans l'Annexe III.

- ✓ Placer les cartouches à utiliser dans le rack de cartouches Maxwell®16 LEV.
- ✓ Placer chaque cartouche dans le rack, face à l'étiquette tournée vers loin des tubes d'élution.
- ✓ Décoller délicatement le joint pour que tout le plastique sorte du haut de la cartouche.
- ✓ Assurer que tout le ruban d'étanchéité et tout adhésif résiduel sont retirés avant de placer les cartouches dans l'instrument.
- ✓ Ajouter l'échantillon de lysat au puits 1. Le puits n°1 est le plus éloigné du tube d'élution.
- ✓ Répéter pour tous les échantillons.
- ✓ placer un piston LEV dans le puits 8 de chaque cartouche. Le puits n°8 est le plus proche du tube d'élution.
- ✓ Placer les tubes d'élution à l'avant du rack de cartouches Maxwell®16 LEV.
- ✓ Ajouter 50µl de tampon d'élution au fond de chaque tube d'élution.

#### **IV.1.3 Configuration de l'automate**

1. Allumer l'instrument Maxwell®16.
2. Décontaminer l'instrument par l'UV.
3. Vérifier que l'écran d'accueil indique « LEV » et que le matériel LEV est présent. Appuyer sur « Exécuter » pour continuer.
4. Sur l'écran suivant, vérifier que la méthode et l'utilisateur corrects ont été choisis. Sélectionner « Run / Stop » pour continuer.
5. Ouvrir la porte lorsque vous y êtes invités à l'écran, puis sélectionner « Run / Stop ».

6. Retirer le rack de la plateforme vers le plan de travail, puis placer les cartouches et les tubes d'élution comme il est mentionné ci-dessus.
7. Transférer le rack contenant les cartouches à la plateforme Maxwell®16.  
Assurer que le rack est placé dans l'instrument Maxwell® 16 on mettant les tubes d'élution proches de la porte. Le rack ne peut tenir dans l'instrument que dans cette orientation.



**Figure 14 :** Rack contenant les cartouches placé à la plateforme Maxwell®16

8. Appuyer sur le bouton Run / Stop. La plateforme se rétractera. Fermer la porte.

**Note :** Tenir le rack des cartouches Maxwell®16 par les côtés pour éviter délogement les cartouches du rack.

L'instrument Maxwell®16 commencera immédiatement la purification. L'écran affichera les étapes effectuées et l'heure approximative restante.

9. Lorsque le cycle de purification automatique est terminé, suivre les instructions sur l'écran pour le transfert de données.
10. Suivre les instructions à l'écran à la fin de la méthode pour ouvrir la porte.
11. Appuyer sur le bouton Run / Stop pour sortir la plateforme de l'instrument.
12. Retirer le rack de cartouches Maxwell®16 LEV de l'instrument et faire sortir les tubes d'élution contenant de l'ADN.
13. Retirer les cartouches et les pistons du panier à cartouches et jeter les déchets. Ne pas réutiliser les cartouches de réactif, les pistons LEV ou tubes d'élution.

#### **IV.1.4 Les étapes d'extraction de l'automate**

L'écran de l'instrument affiche les étapes effectuées lors de la purification de l'ADN, et qui sont comme suite :

- **Resuspension :** le mix des réactifs et les échantillons sont mélangé à nouveau.

- **Lyse d'échantillon** : les échantillons sont lysés en présence de détergent (PK-DTT).
- **Liaison** : les acides nucléiques vont se lier aux particules de silice magnétisées dans le 1<sup>er</sup> puit d'une cartouche pré remplie.
- **Capture particules** : l'ADN est capturé sur des particules magnétiques et purifié à travers une série de lavage et de libération avant l'élution finale. L'utilisation d'un moteur de particules signifie moins de pannes, de bouchons et de gouttes entraînant une contamination croisée.
- **Lavage** : Une étape de lavage des particules liées à l'ADN est nécessaire de manière à éliminer les autres composants cellulaires.
- **Séchage** : Evaporation des tampons afin de garder que l'ADN fixé sur les particules.
- **Elution** : l'élution des acides nucléiques dans un tampon d'élution pouvant être directement ajouté à une PCR standard.
- **Retrait des particules** : les aimants dispose remettent les particules paramagnétiques à leur puit initiale

## IV.2. Quantification de l'ADN

- **Matériels**

Le matériel utilisé pour réaliser ce travail est répertorié dans l'Annexe IV.

- **Réactifs**

Quantifiler Humain H : il est composé de

- ADN standard (la solution mère avec une concentration de 200ng/μl)
- Primer Mix
- Reaction Mix

### 1. Préparation de la gamme standard

Avant d'entamer la quantification, une série de 08 dilutions a été préparée à partir de la solution mère dont la concentration de départ de l'ADN standard est de 200 ng/μl. Cette série standard a été préparée selon les recommandations du fournisseur de kit (voir annexe V). Elle a pour but d'établir une courbe d'étalonnage, qui est utilisée comme une référence à partir de laquelle le logiciel SDS calcule la concentration d'ADN dans chaque échantillon.

## 2. Préparation du Master Mix de RT-PCR

Quantifiler Humain H	
Reaction Mix	12.5µl par réaction
Primer Mix	10.5µl par réaction

(Le nombre des échantillons + 16 STD) × volume des réactifs = volume Total

Dans notre cas  $(32 + 16) \times 12.5 = 600$   
 $(32 + 16) \times 10.5 = 504$  } Pour chaque série

### Plan de la plaque :

- Mettre la plaque 96 puits sur un support de plaque en respectant l'orientation.



Figure 15: Plaque 96 puits.

- Les deux premières rangées ont été réservées pour le dépôt des solutions standards, les restantes pour le dépôt des échantillons (Voir tableau IV ; V).
- la solution master mix a été ajoutée à 2µl de chaque échantillon d'ADN extrait et à 2µl d'ADN standard de chaque dilution dans les puits correspondants

Quantifiler Humain Y	
Master Mix	23µl
ADN / Standard	02µl

- Le dernier puits de la plaque 96 a été réservé pour le témoin négatif de la quantification (ne contenant que le master mix et l'eau ultra pure). Le témoin négatif a été traité de la même façon qu'un échantillon ADN.
- Bien sceller la plaque avec un film optique adhésif transparent approprié afin d'éviter toute évaporation

- Cette dernière est placée dans la centrifugeuse à 3000 rpm pendant quelque secondes pour récupérer les gouttelettes collées à la paroi.
- La plaque a été placée dans la machine RT-PCR pour entamer la quantification d'ADN.

**Tableau IV** : Plan de la plaque de quantification de la série 01

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std.1	Std.1	Sg1.I	Og4.I	SL1.I	Sp4.I						
B	Std.2	Std.2	Sg2.I	Og5.I	SL2.I	Sp5.I						
C	Std.3	Std.3	Sg3.I	Ch1.I	SL3.I	Tc1.I						
D	Std.4	Std.4	Sg4.I	Ch2.I	SL4.I	Tc2.I						
E	Std.5	Std.5	Sg5.I	Ch3.I	SL5.I	Tc3.I						
F	Std.6	Std.6	Og1.I	Ch4.I	Sp1.I	Tc4.I						
G	Std.7	Std.7	Og2.I	Ch5.I	Sp2.I	Tc5.I						
H	Std.8	Std.8	Og3.I	Tex01	Sp3.I	Tex02						

**Tableau V** : Plan de la plaque de quantification de la série 02

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std.1	Std.1	Sg1.II	Og4.II	SL1.II	Sp4.II						
B	Std.2	Std.2	Sg2.II	Og5.II	SL2.II	Sp5.II						
C	Std.3	Std.3	Sg3.II	Ch1.II	SL3.II	Tc1.II						
D	Std.4	Std.4	Sg4.II	Ch2.II	SL4.II	Tc2.II						
E	Std.5	Std.5	Sg5.II	Ch3.II	SL5.II	Tc3.II						
F	Std.6	Std.6	Og1.II	Ch4.II	Sp1.II	Tc4.II						
G	Std.7	Std.7	Og2.II	Ch5.II	Sp2.II	Tc5.II						
H	Std.8	Std.8	Og3.II	Tex03	Sp3.II	Tex04						

### IV.3. Amplification d'ADN

- **Matériels**

Le matériel utilisé pour réaliser ce travail est répertorié dans l'Annexe VI.

- **Réactifs**

Kit PowerPlex® ESI 16 : il est composé de

- Master Mix
- Primer Mix
- Contrôle positif

**Préparation du Master Mix de l'Amplification**

<b>PowerPlex® ESI 16</b>	
Master Mix	02µl
Primer Mix	01µl

**(Le nombre des échantillons + 1 control positif/négatif) × volume des réactifs = volume Total**

**Dans notre cas**  $(25 + 2) \times 2 = 54$

$(25 + 2) \times 1 = 27$

- **Méthode**

La quantité utilisée d'ADN peut aussi influencer sur le résultat d'amplification, une quantité insuffisante d'ADN ne permet pas d'obtenir une bonne amplification, alors qu'une quantité trop importante d'ADN peut inhiber la réaction la PCR.

Pour cet effet, une étape de dilution des échantillons quantifiés est nécessaire afin d'avoir la concentration d'ADN optimum nécessaire pour établir un profil génétique exploitable.

Le rapport de dilution déterminant le volume d'eau ultra pure à ajouter à chaque échantillon est calculé automatiquement par le logiciel SDS pilotant le système RT PCR. Ce calcul est basé sur la concentration optimale (0.1ng/µl) d'ADN à amplifier.

En conséquence, Nous avons donc testé deux quantités d'ADN (la plus élevée et la plus faible) de chaque échantillon des deux séries. Le succès de la procédure d'amplification a été vérifié par l'amplification d'un control positif (ADN contrôle) avec les échantillons dans la série d'amplification et un témoin négatif pour éviter toute sorte de contamination. Ces derniers ont été traités de la même manière que les échantillons d'ADN extraits.



**Note :** Les échantillons ayant une concentration d'ADN inférieure à la concentration optimum ont été amplifiés directement sans avoir été dilués.

**Plan de la plaque :**

- L'amplification a été réalisée dans des tubes de volume appropriés pré-identifiés correspondant à chaque échantillon (**Tableau VI**).
- la solution master mix a été ajoutée à 3µl de chaque échantillon d'ADN extrait et à 3µl des témoins.

<b>PowerPlex® ESI 16</b>	
Reaction Mix	03µl
ADN/ T±amp	07µl

- Deux tubes ont été réservés pour le témoin positif (T+amp) et le témoin négatif (T-amp) d'amplification. Le témoin négatif qui ne contient que le reaction mix et l'eau ultra pure a été traité de la même façon qu'un échantillon ADN.
- Fermer le couvercle des tubes et placer ces derniers dans la centrifugeuse à 3000 rpm pendant quelque secondes pour récupérer les gouttelettes collées à la paroi.
- Les tubes ont été placés dans le thermocycleur pour entamer l'amplification d'ADN.

**Tableau VI :** Plan de la plaque d'amplification d'ADN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sg2.I	Sp5.I	Ch1.II	Tc2.II								
B	Sg5.I	Sp3.I	Ch5.II	T+ amp								
C	Og1.I	Tc4.I	SL1.II	T- amp								
D	Og2.I	Tc2.I	SL2.II									
E	Ch5.I	Sg2.II	Sp2.II									
F	Ch1.I	Sg1.II	Sp3.II									
G	SL1.I	Og5.II	Tc5.II									
H	SL4.I	Og1.II	Tc1.II									

#### IV.4. Electrophorèse capillaire (Post amplification)

- **Matériels**

Le matériel utilisé pour réaliser ce travail est répertorié dans l'Annexe VII.

- **Réactifs**

Kit PowerPlex® ESI Fast 16: il est composé

- Formamide Hi-Di
- Standard de taille
- Echelle allélique (Lader) : Produits pré amplifié du kit contenant tous les allèles possible pour les 16 marqueurs).
- 

##### 1. Préparation du Reaction Mix d'électrophorèse capillaire

<b>Master Mix</b>	
Formamide Hi-Di	9.5µl
Standard de taille	0.5µl

<b>Le nombre des échantillons × volume des réactifs = volume Total</b>
--

**Dans notre cas**  $30 \times 9.5 = 285$

$$30 \times 0.5 = 15$$

##### **Plan de la plaque :**

- La post amplification a été réalisé dans une plaque de 96 puits.
- Mettre la plaque 96 puits sur un support de plaque en respectant l'orientation,
- Après chaque 15 échantillon, le puit suivant est réservé pour une échelle allélique (Ladder) (**Tableau VII**).
- Un Post- qui contient le mix et l'eau est ajouté pour vérifier s'il y a une contamination au niveau des réactifs.
- la solution mix a été ajoutée à 1µl de chaque échantillon amplifié et à 1µl de Ladder /témoin négatif (Post-) dans les puits correspondants.

<b>PowerPlex® ESI 16</b>	
Mix (Formamide/STD de taille)	10µl
ADN / Leader	01µl

- Bien sceller la plaque avec un septa spécifique afin d'éviter toute évaporation
- Cette dernière est placée dans la centrifugeuse à 3000 rpm pendant quelque secondes pour récupérer les gouttelettes collées à la paroi.
- Chauffer dans un bain à sec pendant 3 min à 95 ° C.
- Placez immédiatement la plaque dans un cryobloc pendant 3 minutes. Cette étape est importante pour garder les échantillons d'ADN amplifiés sous forme « mono brins».
- la plaque a été placée dans le séquenceur pour lancer l'analyse (l'analyse de run dure 45 min).

**Tableau VII :** plan de la plaque de post amplification d'ADN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sg2.I	Sp5.I	Og5.II	Tc5.II								
B	Sg5.I	Sp3.I	Og1.II	Tc1.II								
C	Og1.I	Tc4.I	Ch1.II	Tc2.II								
D	Og2.I	Tc2.I	Ch5.II	T+ amp								
E	Ch5.I	Sg2.II	SL1.II	T- amp								
F	Ch1.I	Sg1.II	SL2.II	Post-								
G	SL1.I	Eau pure	Sp2.II	Eau Pure								
H	SL4.I	LAD	Sp3.II	LAD								

## V. Lecture des profils génétiques

Le séquenceur est relié à un ordinateur dans lequel sont transférés les données brutes de l'électrophorèse capillaire qui seront analysées et validées, pour l'obtention d'un bon profil génétique.

Ces données brutes sont traitées par le logiciel Gene Mapper ID qui attribue à chaque fragment d'ADN d'intérêt (STR) :

- ❖ Assemblage des données.
- ❖ Identification des pics :
  - Un numéro allélique en le comparant avec une échelle allélique.
  - Une intensité de fluorescences émise par chaque marqueur (STR)
- ❖ Validation des profils obtenus par un analyste.

## VI. Extraction d'ADN par Chelex

On a effectué cette méthode classique adoptée par le laboratoire afin de comparer et renforcer les résultats obtenus par notre méthode à valider.

A cet effet, on a testé un échantillon de chaque support biologique mentionné ci-dessus.

### • Réactifs

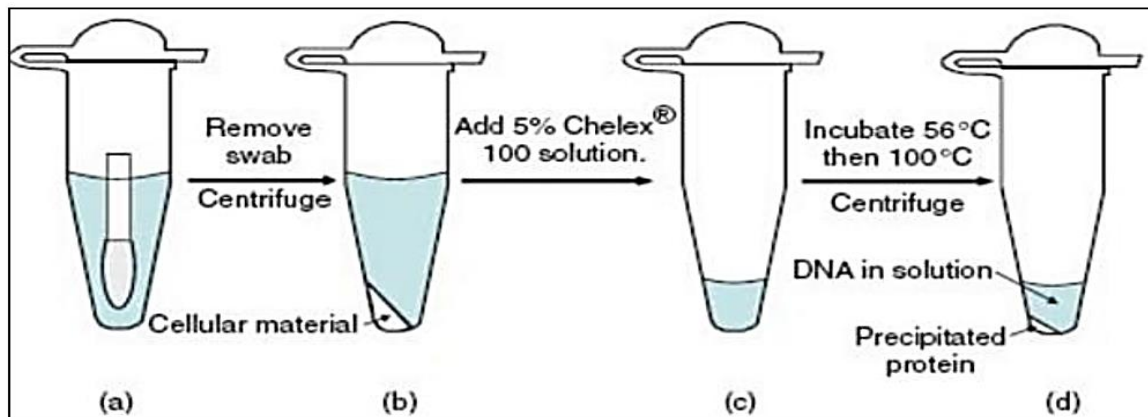
	<b>Chelex 5%</b>	<b>PK</b>	<b>DTT</b>
<b>Sang</b>	200µl	02 µl	/
<b>Salive/ Trace de contact</b>		10 µl	/
<b>Cheveux/ongle/sperme</b>		02 µl	07 µl

### • Méthode

La procédure d'extraction est très simple, La résine de Chelex®, qui est fournie sous forme de billes, est transformée en suspension à 5% avec de l'eau pure. Il est chargé négativement. Le matériel cellulaire est incubé avec le Chelex® en suspension à 56 ° C pendant 30 minutes maximum (sauf pour les cheveux, ongles et sperme l'incubation est à 6 heures au minimum ou over night). La protéinase K, qui digère la plupart des protéines cellulaires, est souvent ajoutée à ce

stade. Cette incubation est suivie de 8 à 10 minutes à 100 ° C pour s'assurer que toutes les cellules se sont rompues et que la protéine est dénaturée. Le tube est ensuite simplement centrifugé pour sédimenter la résine de Chelex® résine et la protéine dénaturée au fond du tube, laissant la solution aqueuse contenant l'ADN.

**Note :** L'extraction Chelex à partir du sang nécessite une étape supplémentaire de lavage avec l'eau pure.



**Figure 16 :** Présentation schématique des étapes de l'extraction Chelex.

**(Goodwin *et al.*, 2007).**

**Note :** Les échantillons de cette méthode d'extraction ont été soumis à la même procédure d'analyse que la méthode précédente (quantification, amplification, post-amplification et lecture des profils) dont les détails sont démontrés ci-dessus.

*Chapitre III*  
*Résultats et Discussions*

La méthode d'extraction d'ADN par l'automate maxwell 16 consistait à obtenir un ADN pur avec de bonne quantité par l'utilisation des kits de quantification et amplification pour établir des profils génétiques exploitables à partir de quantités préalablement inconnues.

### I. Quantification de l'ADN

L'ADN extrait des différents échantillons a été quantifié par un RT-PCR ce qui nous a permis d'obtenir des quantités d'ADN qui sont illustrées dans le tableau VIII.

**Tableau VIII** : les quantités d'ADN, la moyenne, l'écart type et les coefficients de variation de la série 01.

support	Nom d'éch	Concentration d'ADN (ng.µL-1)	Moyenne ( $\bar{x}$ ) de Concentration d'ADN (ng.µL-1)	Ecart-type (s)	Coefficient de variation CV (%)
<b>Sang</b>	Sg 1	2,16	2.27	0.321	14.18
	Sg 2	2,62			
	Sg 3	2,07			
	Sg 4	2,59			
	Sg 5	1,90			
<b>Ongle</b>	Og1	0,429	0.246	0.103	42.23
	Og2	0,173			
	Og3	0,223			
	Og4	0,193			
	Og5	0,213			
<b>Cheveux</b>	Ch1	0,105	0.289	0.150	52.15
	Ch2	0,384			
	Ch3	0,152			
	Ch4	0,359			
	Ch5	0,445			
<b>Salive</b>	SL1	36,03	29.85	6.130	20.53
	SL2	24,43			
	SL3	35,23			
	SL4	22,6			
	SL5	30,96			
<b>Sperme</b>	Sp1	15,6	9.19	6.354	69.14
	Sp2	4,33			
	Sp3	1,96			
	Sp4	8,26			
	Sp5	15,8			
<b>Trace de contact</b>	Tc1	0,187	0.225	0.048	21.65
	Tc2	0,198			
	Tc3	0,222			
	Tc4	0,309			
	Tc5	0,209			

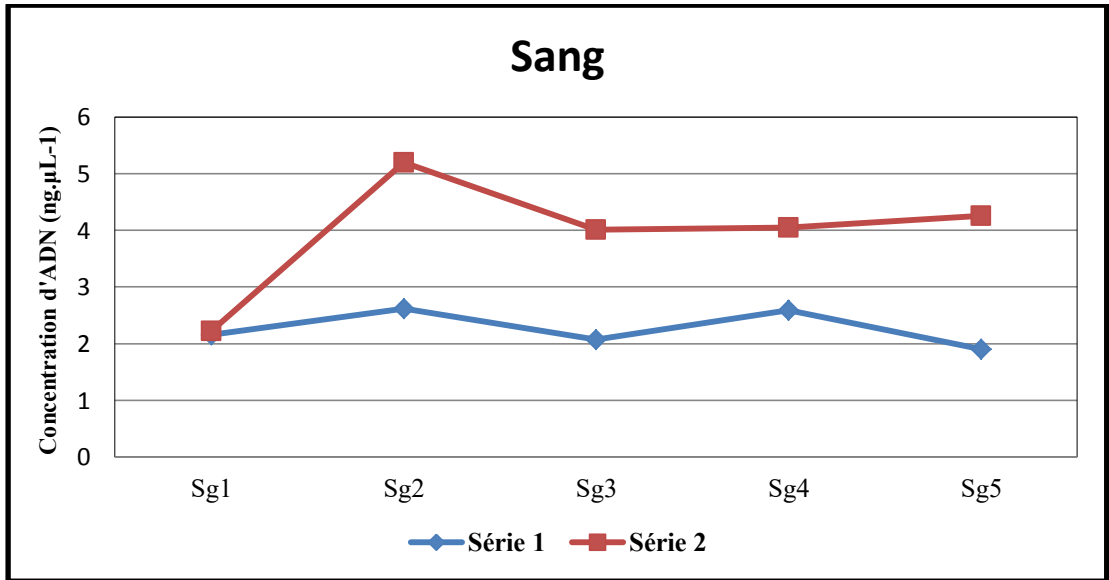
**Tableau XI** : les quantités d'ADN, la moyenne, l'écart type et les coefficients de variation de la série 02.

<b>support</b>	<b>Nom d'éch</b>	<b>Concentration d'ADN (ng.µL-1)</b>	<b>Moyenne (<math>\bar{x}</math>) de Concentration d'ADN (ng.µL-1)</b>	<b>Ecart-type (s)</b>	<b>Coefficient de variation CV (%)</b>
<b>Sang</b>	Sg 1	2,22	3.948	1.079	27.35
	Sg 2	5,20			
	Sg 3	4,01			
	Sg 4	4,05			
	Sg 5	4,26			
<b>Ongle</b>	Og1	0,953	3.134	2.237	71.39
	Og2	1,16			
	Og3	4,47			
	Og4	2,87			
	Og5	6,22			
<b>Cheveux</b>	Ch1	3,86	2.516	1.116	44.37
	Ch2	1,73			
	Ch3	2,95			
	Ch4	2,99			
	Ch5	1,05			
<b>Salive</b>	SL1	33,29	20.196	8.549	42.33
	SL2	12,02			
	SL3	13,04			
	SL4	20,89			
	SL5	21.74			
<b>Sperme</b>	Sp1	27,32	25.47	10.86	42.66
	Sp2	43,28			
	Sp3	16,46			
	Sp4	22,78			
	Sp5	17.51			
<b>Trace de contact</b>	Tc1	0,0138	0.465	0.453	97.23
	Tc2	0,0281			
	Tc3	0,608			
	Tc4	0,590			
	Tc5	1.090			

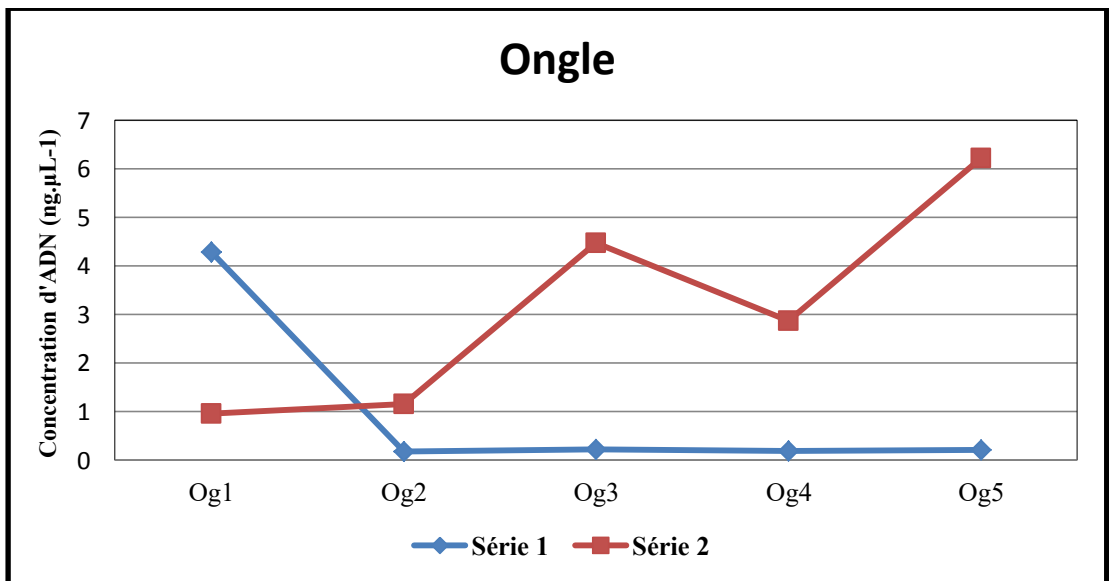
Les concentrations d'ADN des deux séries sont visualisées sous formes de courbes, qui sont montrées au dessous :



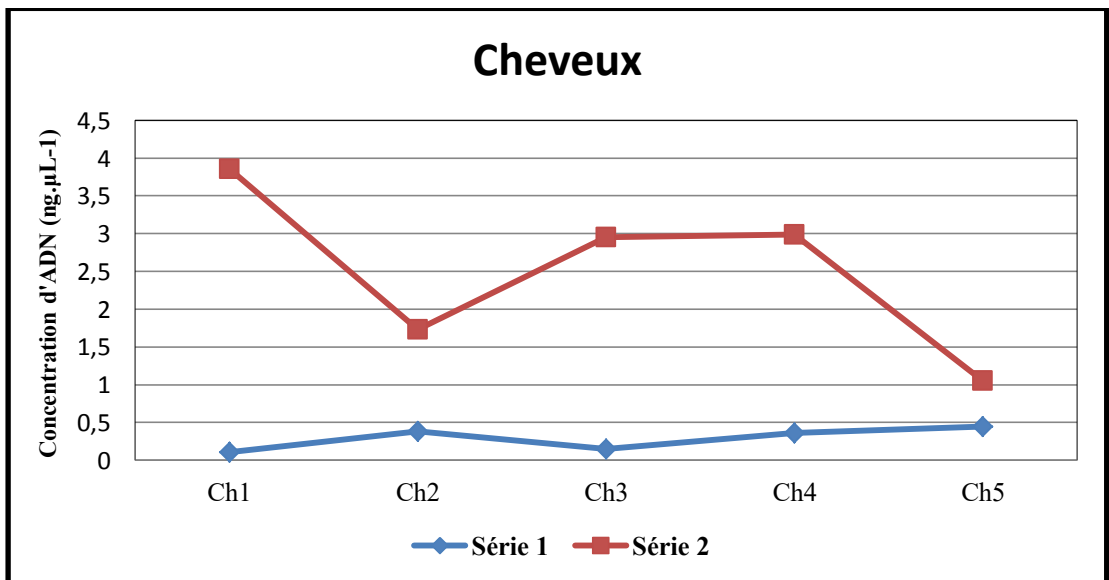
A



B



C



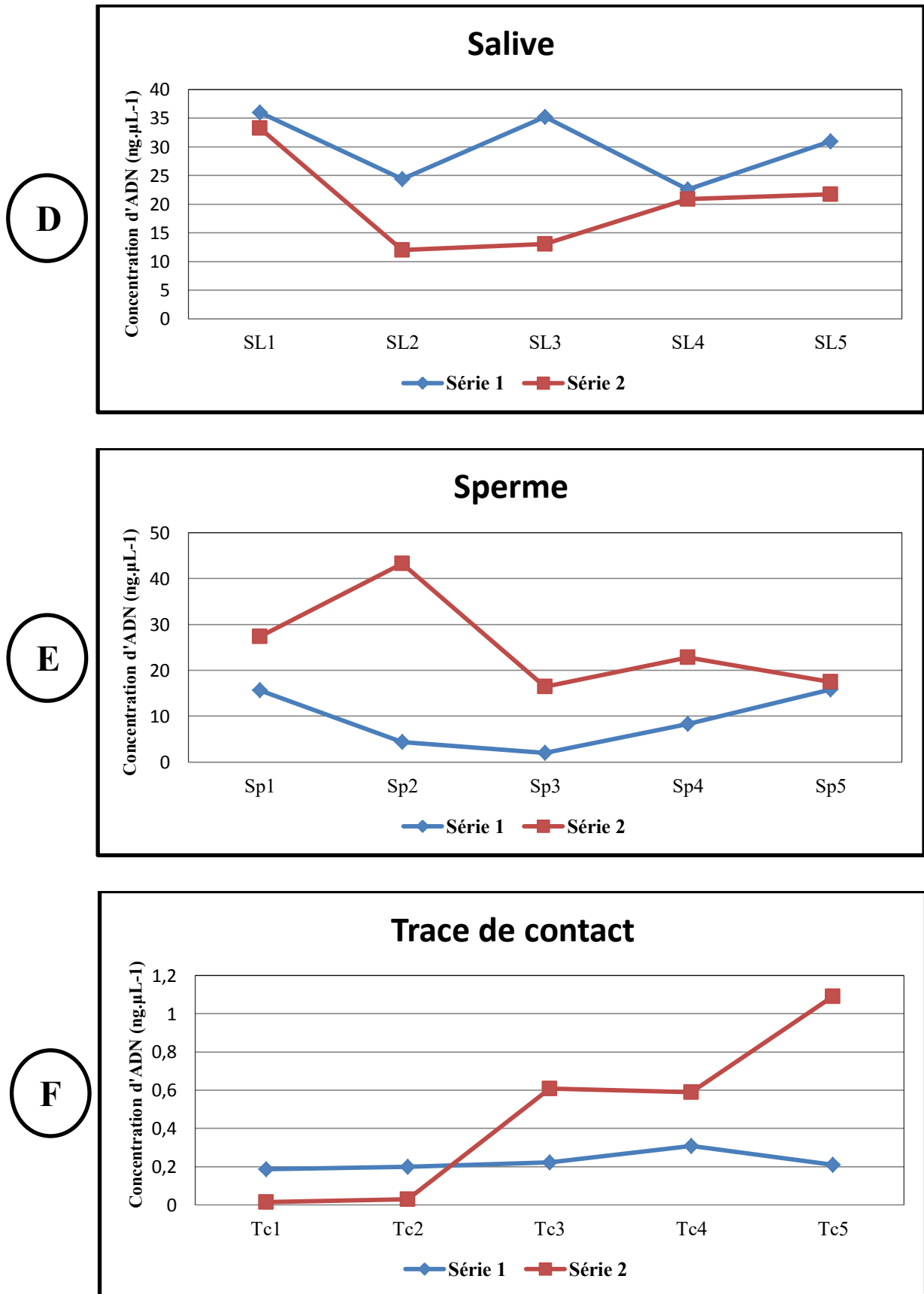


Figure 17(A, B, C, D, E, F) : Les concentrations d'ADN en ng/µL1 des 05 mesures des différents supports de la série 01 et la séries 02.

La figure 17 montre les courbes des différentes concentrations d'ADN des supports de la série 01 et série 02.

Nous avons obtenu de différentes quantités d'ADN pour les 06 supports biologiques qu'on a traité, dont les quantités d'ADN du sang varient entre 1.9 et 2.62 ng/μl pour la série 01 et entre 2.22 et 5.20 ng/μl pour la deuxième série.

Pour les ongles, nous avons remarqué que les quantités d'ADN sont comprises entre 0.173 et 0.429 ng/μl pour la première série et entre 0.953 et 6.22 ng/μl pour la série 02.

Les cheveux ont donné pour la série 01 des quantités allant de 0.105 jusqu'à 0.445 ng/μl ; alors que pour la deuxième série, ils ont donné des quantités qui vont de 1.05 à 3.86 ng/μl.

En revanche, nous avons obtenu pour la salive et le sperme des quantités qui varient entre 22.6 et 36.03 ng/μl, 1.96 et 15.8 ng/μl ; 12.02 et 33.29 ng/μl, 17.5 et 43.28 ng/μl pour la 1<sup>ère</sup> série et la 2<sup>ème</sup> série respectivement.

Tandis que pour les traces de contact, les quantités d'ADN de la série 01 sont comprises entre 0.198 et 0.309 ng/μl et pour la série 02 nous avons remarqué que les quantités vont de 0.0138 jusqu'à 1.09 ng/μl.

Toutes ces quantités d'ADN obtenues confinent dans un même intervalle de (0.03 à 45 ng/μl), ce qui les rends amplifiables, c'est-à-dire supérieures au seuil recommandé par le fabricant du kit d'amplification promega (0.5ng).

II. Répétabilité et Reproductibilité de la méthode d'extraction d'ADN par maxwell® 16 :

Les résultats de répétabilité et la reproductibilité des deux séries sont représentés sous forme de graphe (figures 18/19)

Série 1

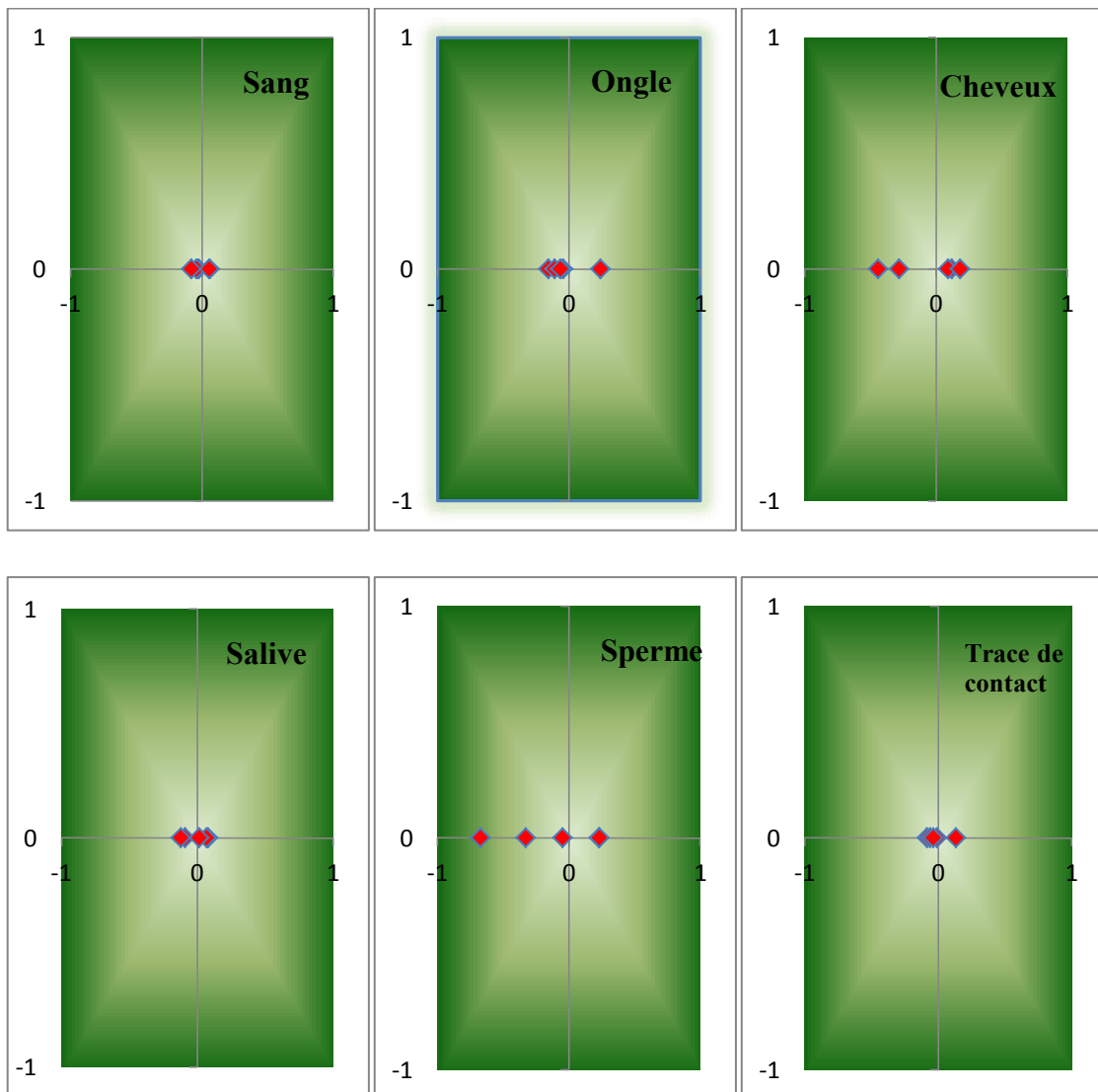
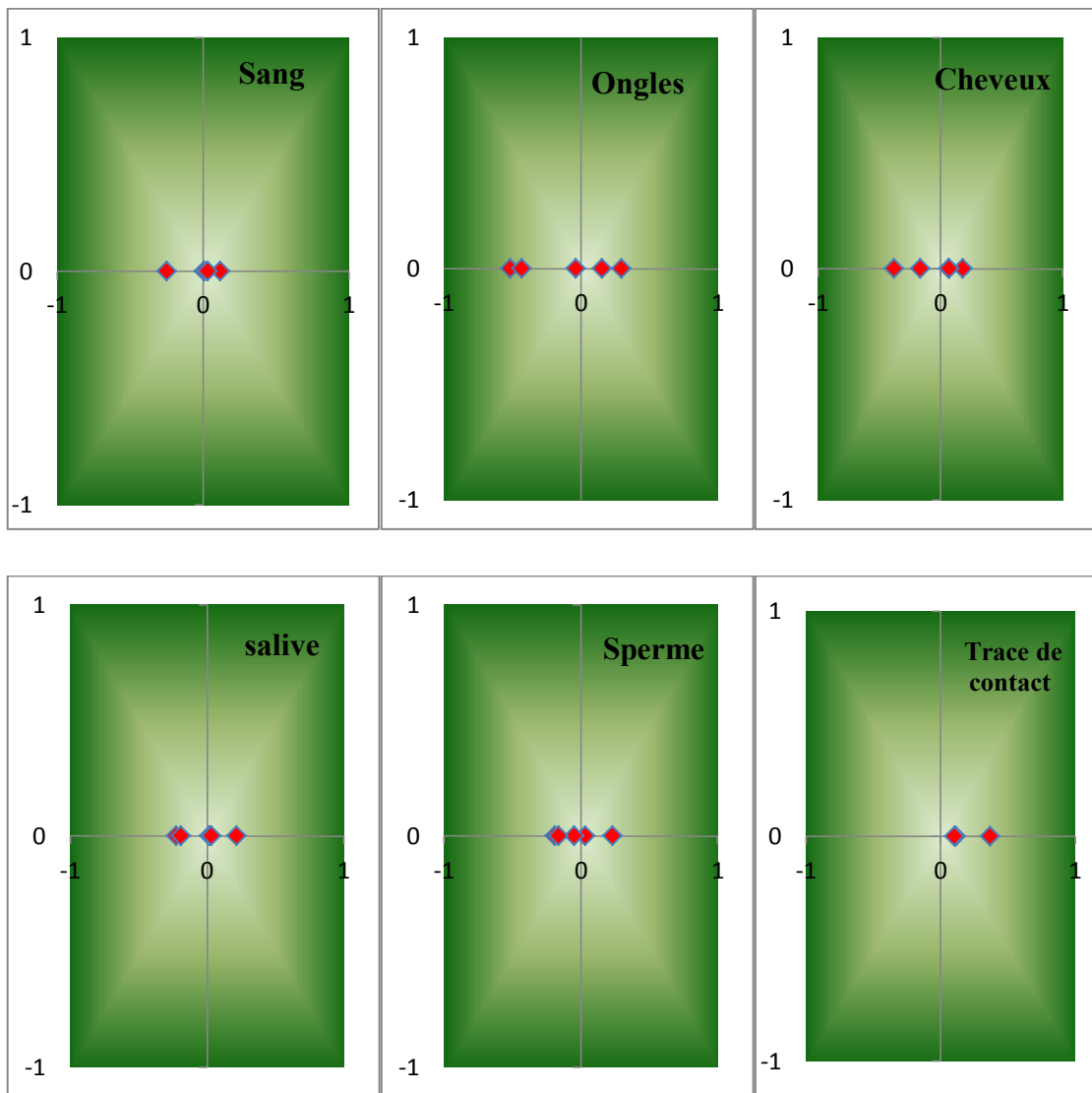


Figure 18 : Illustration de la dispersion des résultats expérimentaux autour de leur moyenne lors de l'étude de la répétabilité.

Série 2



**Figure 19 :** Illustration de la dispersion des résultats expérimentaux autour de leur moyenne lors de l'étude de la reproductibilité.

**Discussion :** Tout point de ce graphe représente l'écart de mesure des quantités d'ADN par rapport à la moyenne.

**Répétabilité (Série 01) :**

D'après les coefficients de variation de répétabilité qu'on a calculé et qui reflètent la fidélité intra-jour, nous avons observé que certains CV s'échelonnent de 14.18 % jusqu'à 21.65 % (Sang, salive, traces de contact respectivement), ce qui nous a permis de noter que la dispersion des résultats expérimentaux lors des mesures répétées était étroitement regroupée autour de leur moyenne.

Dans le cas où on a obtenu des CV moyens compris entre 42.23 % et 52.15 %, nous avons observé une variation entre les valeurs de concentrations d'ADN, mais qui restent toujours à voisine de leur moyenne (Ongles, cheveux respectivement)

En revanche, un CV égale à 69.14 % dû à une variation des valeurs des concentrations d'ADN du sperme, permettant une dispersion faiblement agglutiné autour de leur moyenne (**Figure 17**).

**Reproductibilité (Série 02) :**

En ce qui concerne reproductibilité qui reflètent la fidélité inter-jour, nous avons obtenu des coefficients de variation de 27.35 %, ce qui nous a permis de noter que la dispersion des résultats expérimentaux était étroitement regroupée autour de leur moyenne (Sang).

Dans le cas où on a obtenu des CV moyens compris 42.33 % et 44.37 %, nous avons observé une variation entre les valeurs de concentrations d'ADN, mais qui restent toujours à voisine de leur moyenne (Salive, sperme et cheveux respectivement).

Par contre, certains supports ont donné un CV élevé allant jusqu'à 97.23 %, ce qui montre dans le graphe que les valeurs s'écartent de leur moyenne. Alors, la dispersion des résultats expérimentaux était faiblement agglutinée autour de leur moyenne pour les ongles et traces de contact. (**Figure 18**).

Nous observons que les CV pour les deux séries se diffèrent. Cette différence est due aux variations des quantités d'ADN initiales des supports qui sont indéterminées.

Une variété remarquable dans les quantités d'ADN obtenues à partir des ongles et trace de contact avec un CV allant jusqu'à 71.39 % et 97.23 % respectivement. Cette variation est due au procédé de prélèvement pour les deux supports, qui a été effectué sur le même endroit pour les traces, ce qui a diminué la quantité d'ADN trouvée après chaque opération de prélèvement de ces derniers et la différence du poids pour les ongles.

### **III. Décèlement d'une contamination :**

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). Pour cet effet, Les laboratoires pratiquant la biologie moléculaire devraient analyser des contrôles de qualité positifs et négatifs en routine pour s'assurer de la performance de leurs méthodes.

Le témoin négatif d'extraction par le maxwell® 16 n'a donné aucune quantité d'ADN ce qui prouve qu'il n'y a pas eu de contamination lors de notre analyse.

Ce qui nous a permis par la suite de passer à l'étape de quantification, suivi d'une amplification et post amplification, conformément à ce qui a été dit auparavant dans le chapitre matériels et méthodes, afin d'établir un profil génétique.

### **IV. Etablissement d'un profil génétique :**

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 (16 marqueurs 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) (Annexe VIII) (**Figures des profils de 20 à 25**).

Série 1



Série 2

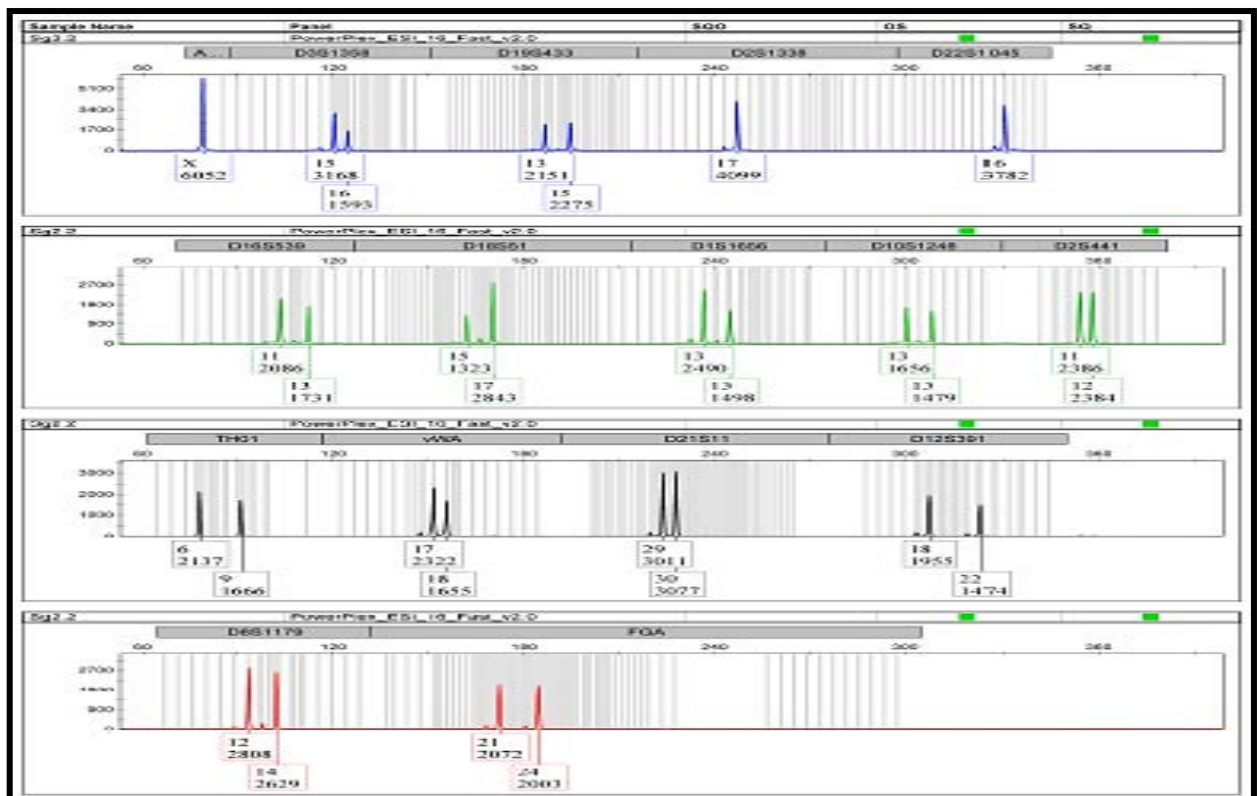
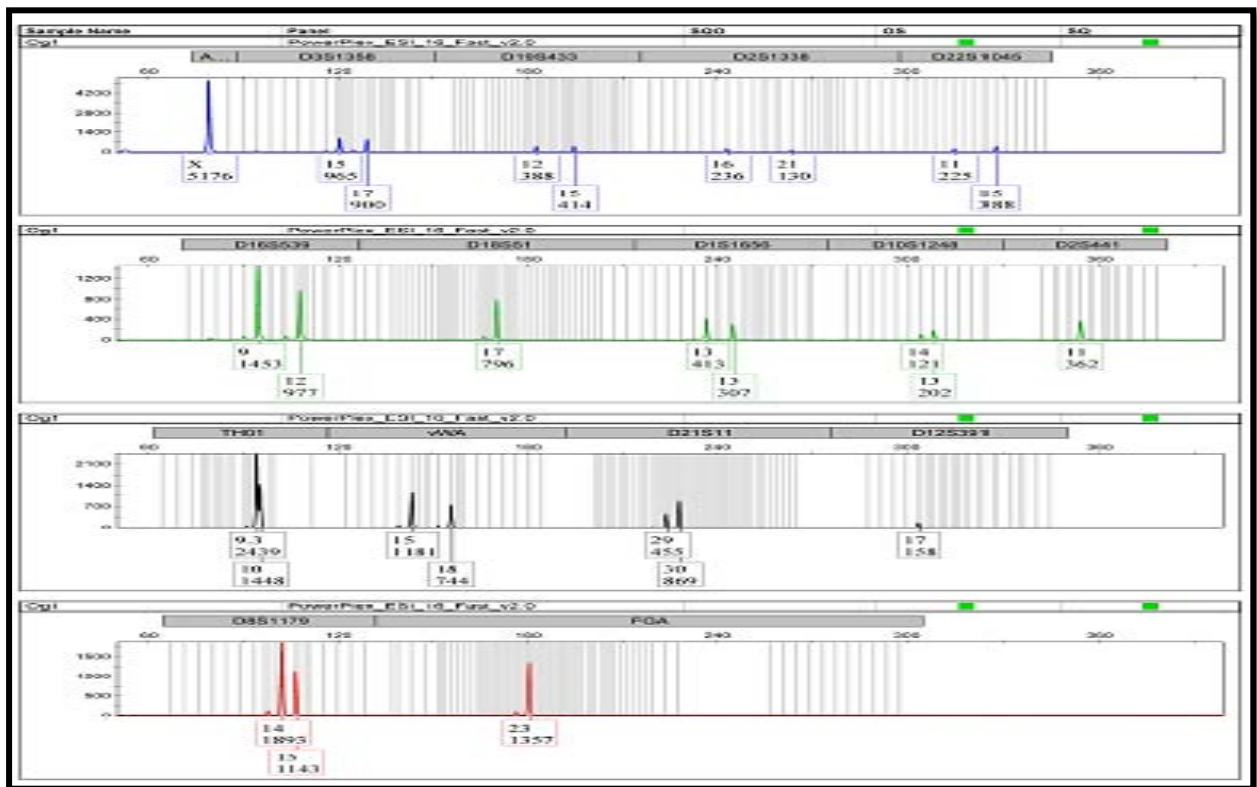


Figure 20 : Profil génétique complet obtenu à partir des séries 01 et 02 du sang.



Série 1



Série 2

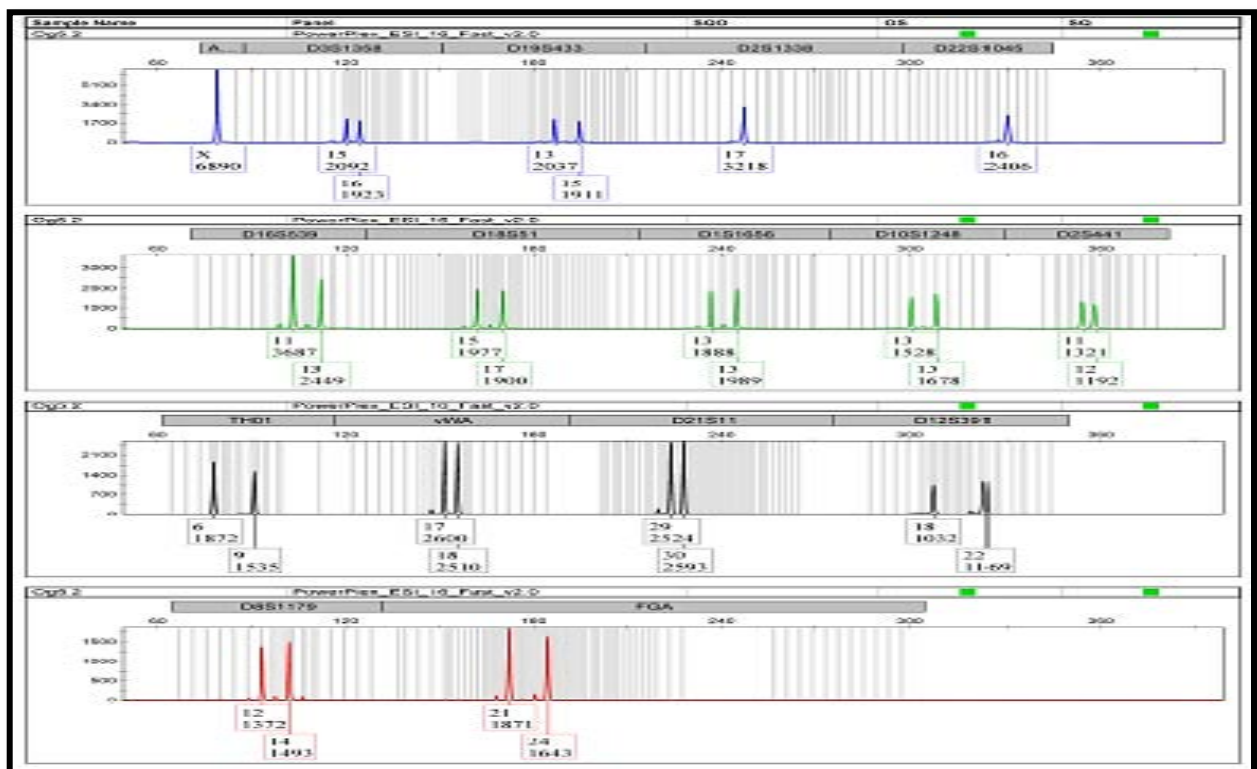
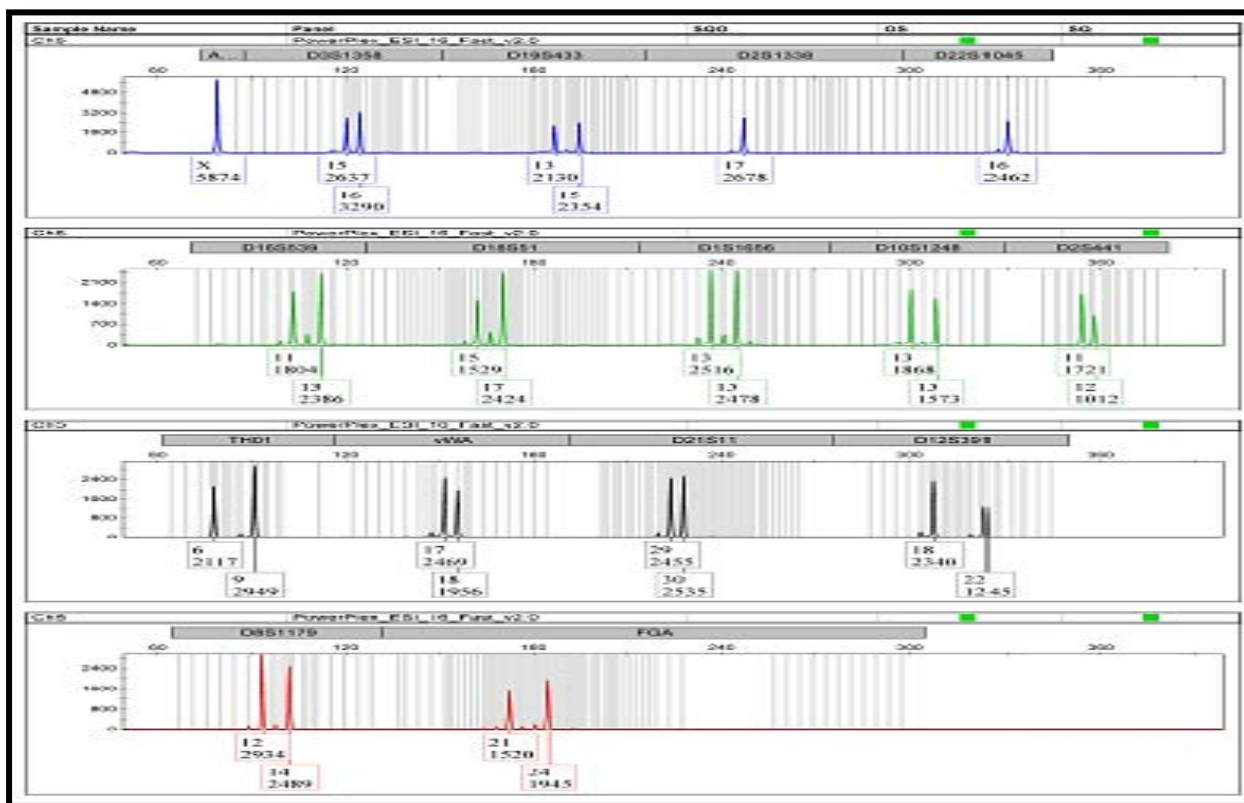


Figure 21 : Profil génétique complet obtenu à partir des séries 01 et 02 des ongles.

Série 1



Série 2

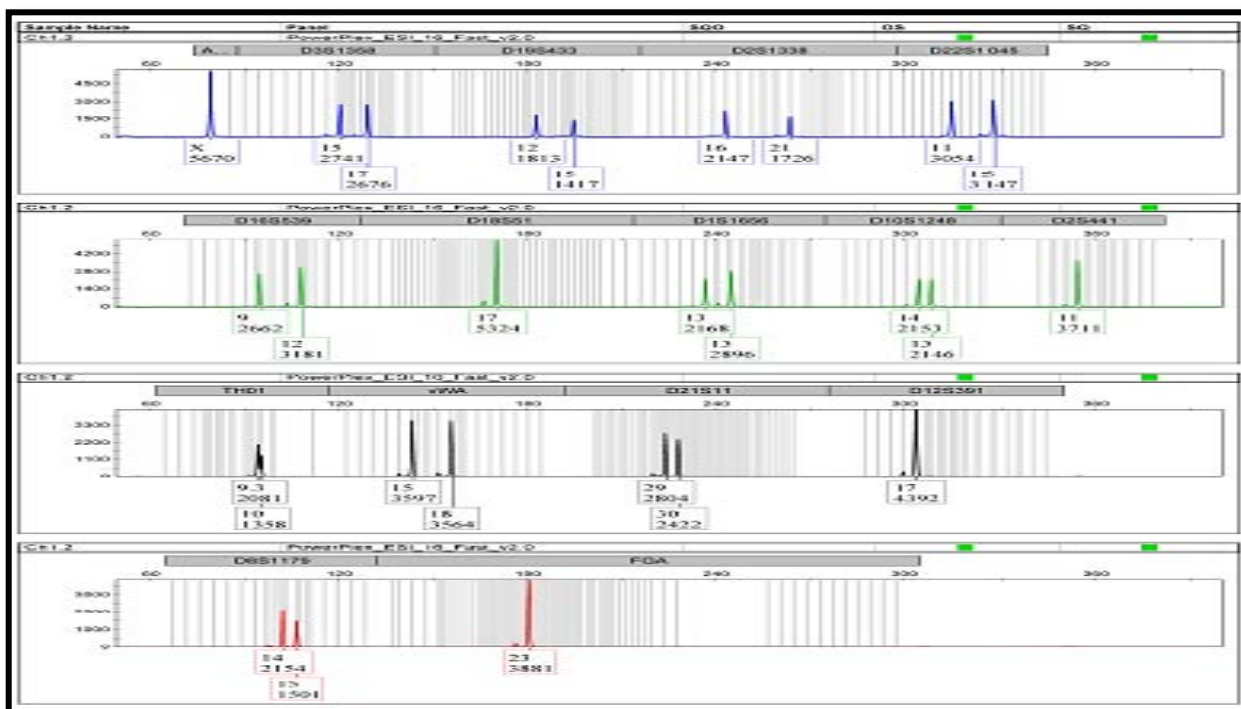
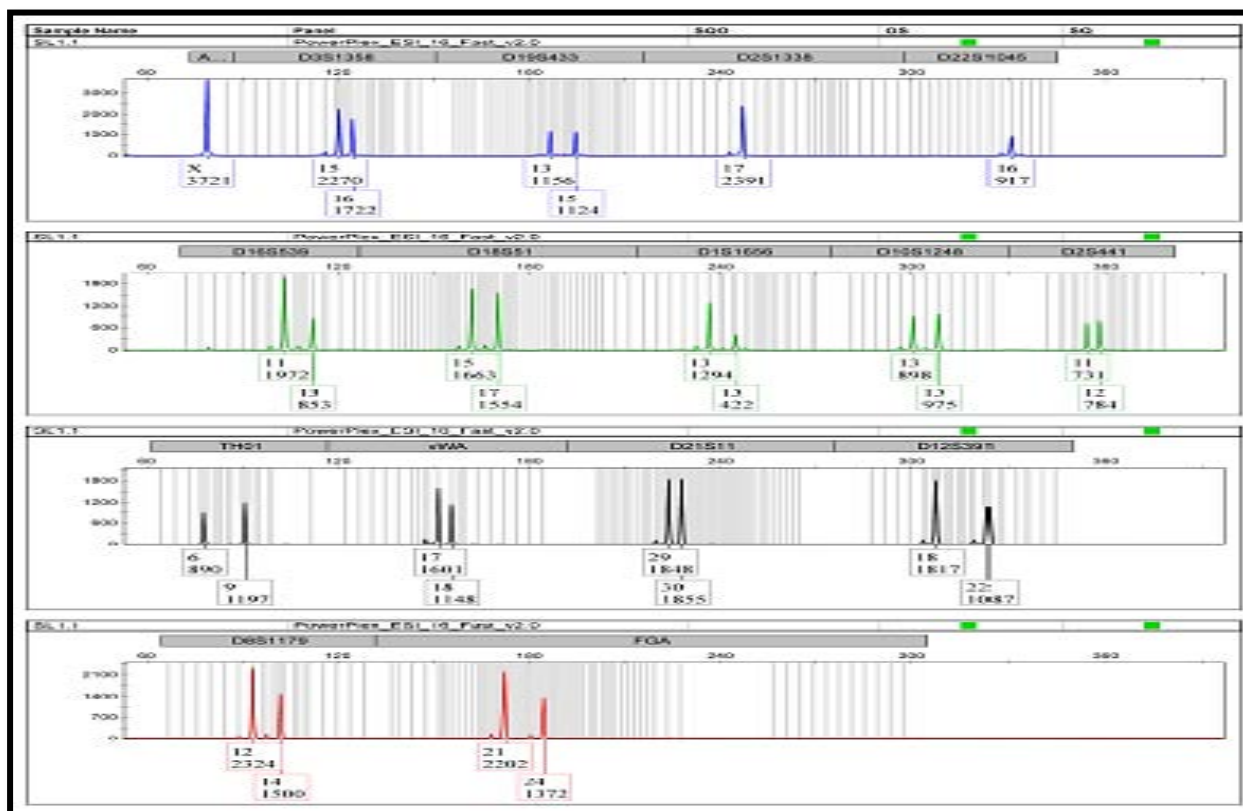


Figure 22 : Profil génétique complet obtenu à partir des séries 01 et 02 des cheveux.

Série 1



Série 2

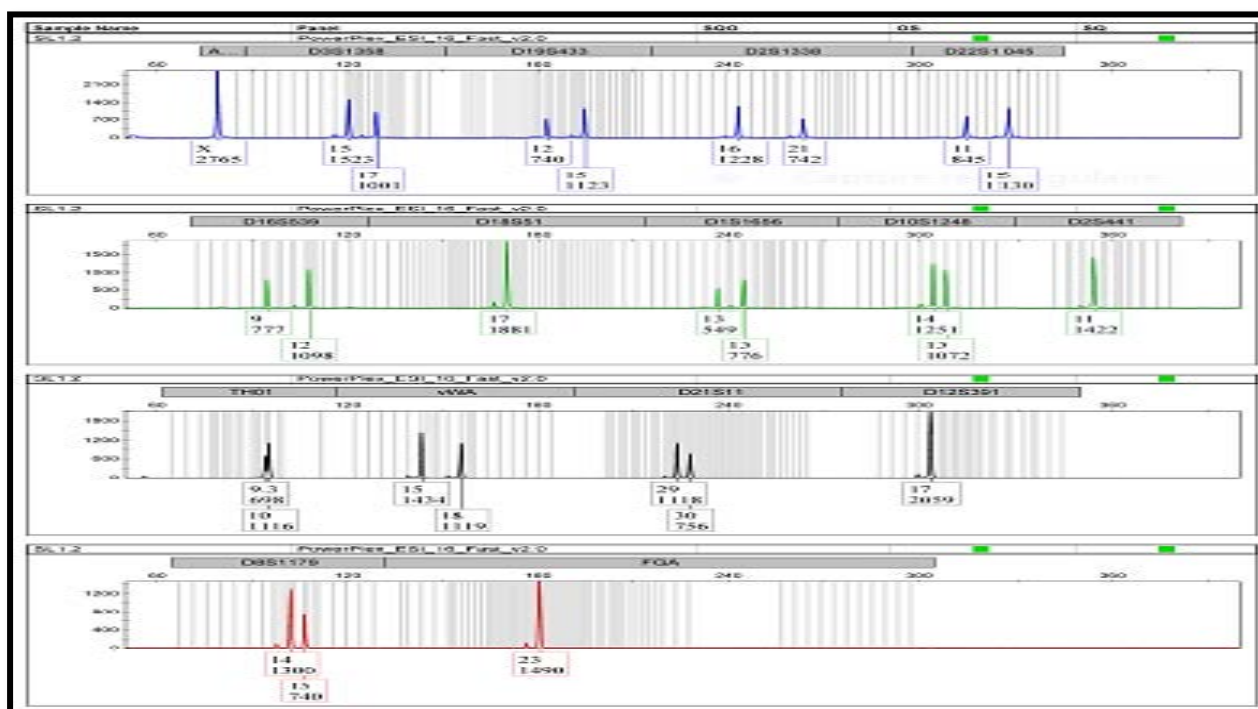
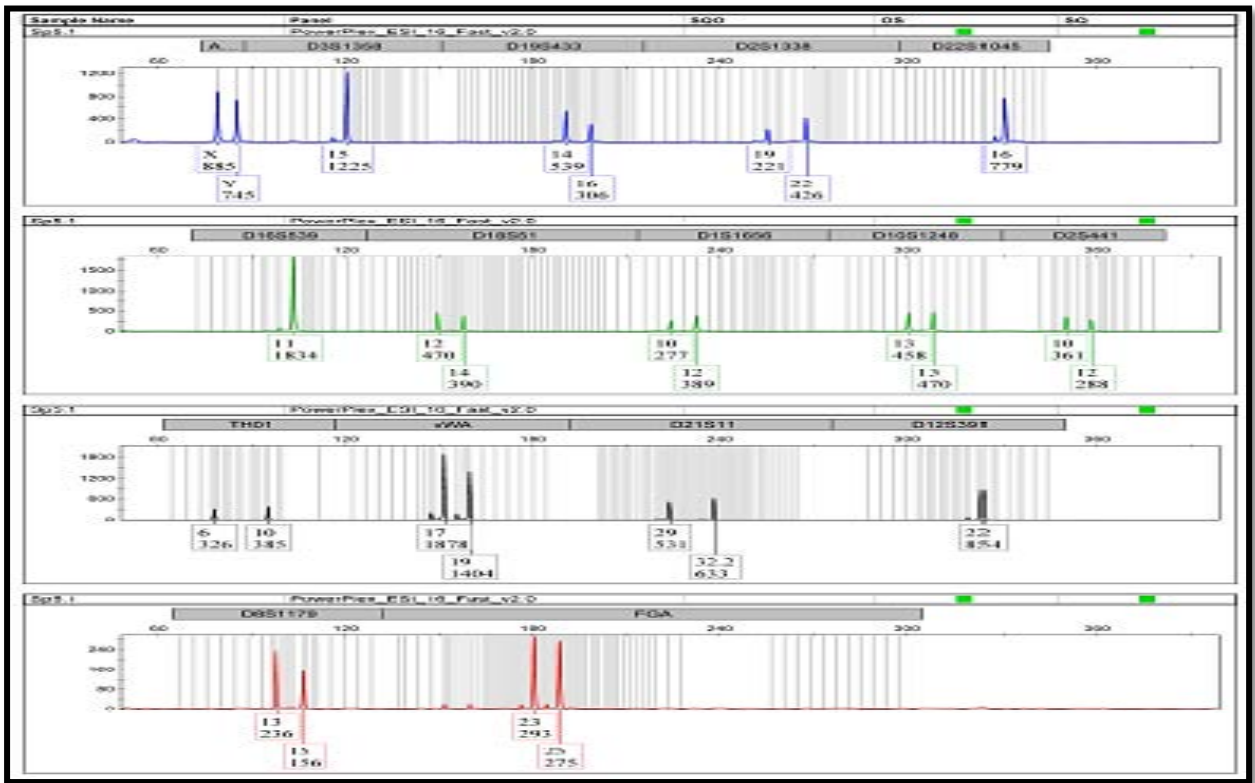


Figure 23 : Profil génétique complet obtenu à partir des séries 01 et 02 de la salive.

Série 1



Série 2

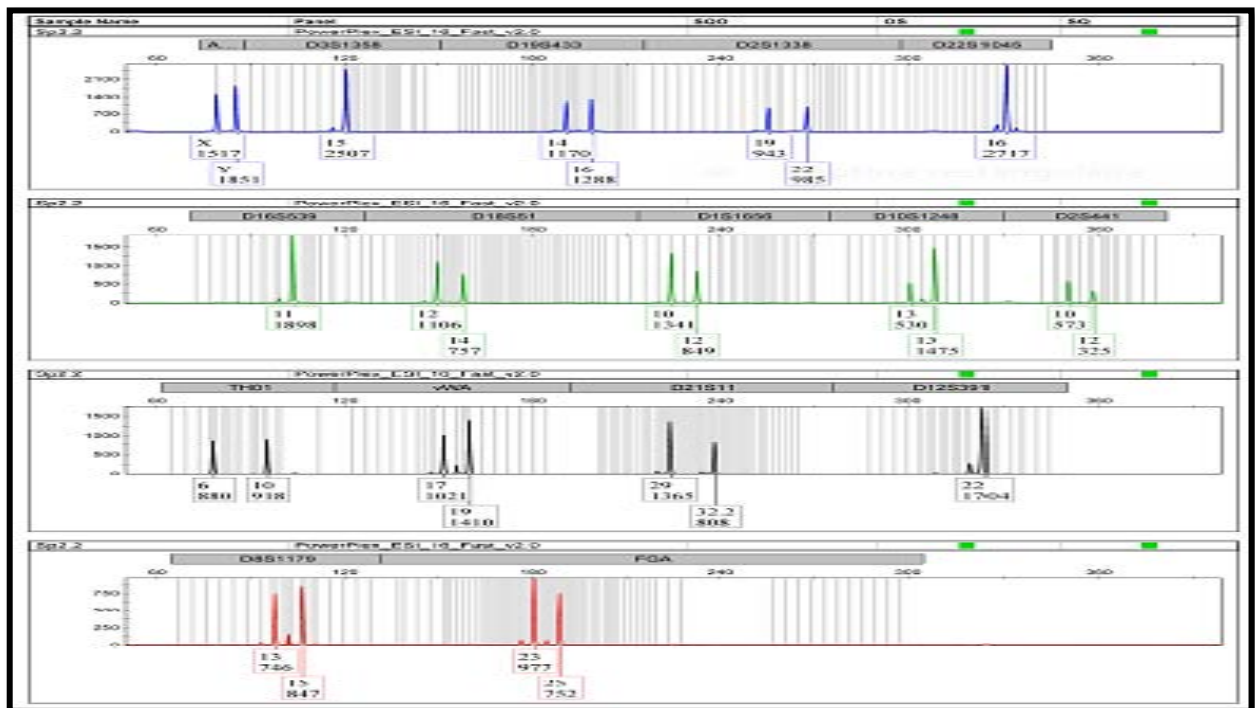
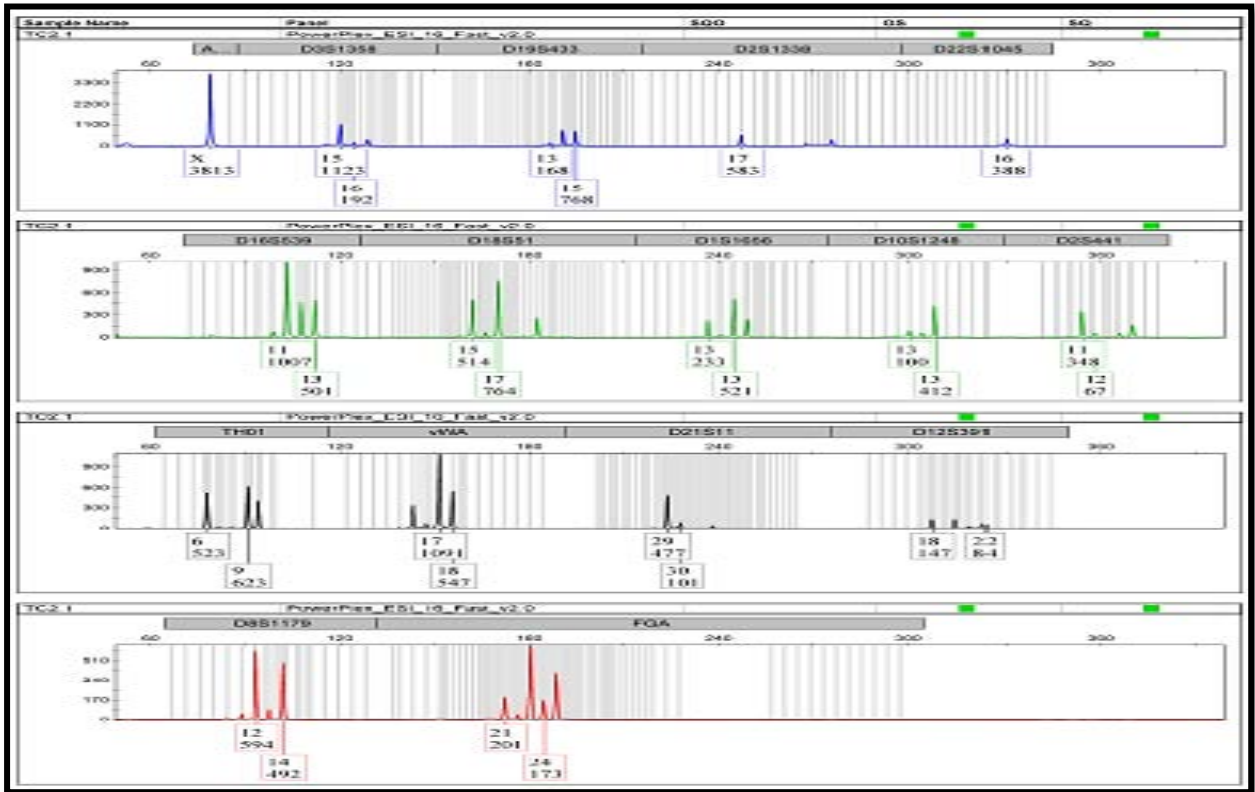


Figure 24 : Profil génétique complet obtenu à partir des séries 01 et 02 du sperme.

Série 1



Série 2

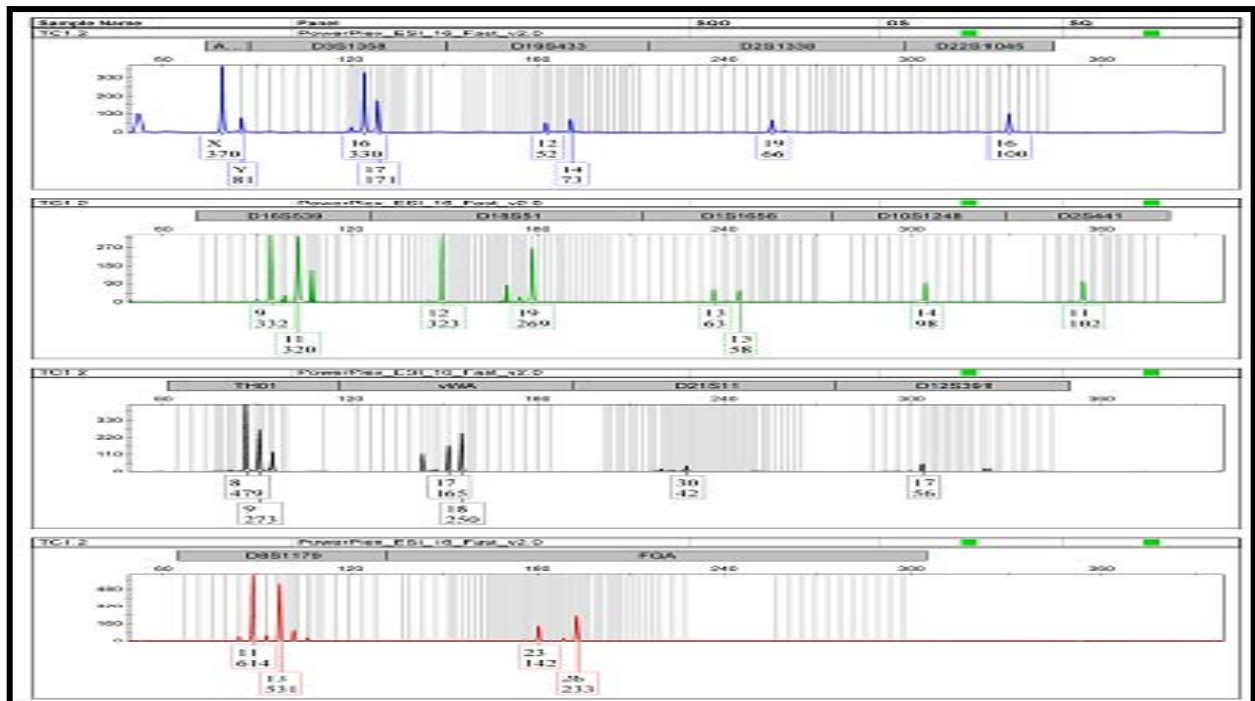


Figure 25 : Profil génétique complet obtenu à partir des séries 01 et 02 des traces de contact.



Les résultats obtenus sont satisfaisant, car nous avons obtenu des quantités d'ADN exploitables générant des profils génétiques complets et interprétables, avec une absence de contamination. Ces derniers nous ont permis de confirmer que l'ADN obtenu après cette méthode d'extraction est un ADN pur et de bonne qualité.

**V. Vérification de la qualité de l'ADN obtenu par la méthode Maxwell® 16**

Nous avons étudié une méthode classique des laboratoires accrédités, c'est l'extraction Chelex, afin de vérifier l'efficacité de la méthode d'extraction par le Maxwell® 16.



**Figure 26 :** la résine Chelex 100 (à gauche) / l'automate Maxwell® 16 (à droite).

Nous comparons les valeurs de quantité minimales obtenues pour le maxwell® 16 avec celle de Chelex qui sont illustrées dans le tableau suivant :

**Tableau X :** Comparaison entre les concentrations D'ADN, cycle seuil des méthodes d'extraction par le Maxwell®16 et la résine Chelex.

support	Nom d'échantillon	Concentration d'ADN (ng/µL) par maxwell 16		CT IPC		Concentration d'ADN (ng/µL) par Chelex	CT IPC
		Série 01	Série 02	Série 01	Série 02		
Sang	Sg 1	2,16	2.22	27,36	27,18	0,588	Indéterminé
	Sg 2	2,62	5.20	27,09	27,09		
	Sg 3	2,07	4.01	27,06	27,00		
	Sg 4	2,59	4.05	27,00	26,93		
	Sg 5	1,90	4.26	27,05	26,95		
Ongle	Og1	0,429	0.953	27,07	27,05	0.0048	27.95
	Og2	0,173	1.16	27,08	27,09		
	Og3	0,223	4.47	27,20	27,25		
	Og4	0,193	2.87	30,91	27,83		
	Og5	0,213	6.22	30,76	26,76		
Cheveux	Ch1	0,105	3.86	31,78	27,43	0.020	Indéterminé
	Ch2	0,384	1.73	29,93	28,54		
	Ch3	0,152	2.95	31,25	27,80		
	Ch4	0,359	2.99	30,02	27,78		
	Ch5	0,445	1.05	29,72	29,23		
Salive	SL1	36,03	33.29	28,08	24,96	5.50	29.90
	SL2	24,43	12.02	27,61	27,43		
	SL3	35,23	13.04	27,60	27,39		
	SL4	22,6	20.89	27,24	27,56		
	SL5	30,96	21.74	27,30	27,47		
Sperme	Sp1	15,6	27.74	27,09	27,68	3.55	28.12
	Sp2	4,33	43.28	27,05	28,28		
	Sp3	1,96	16.46	27,26	27,70		
	Sp4	8,26	22.78	25,84	24,96		
	Sp5	15,8	17.57	24,97	27,43		
Trace de contact	Tc1	0,187	0.0138	31,54	27,39	0.016	27.49
	Tc2	0,198	0.0281	31,23	27,56		
	Tc3	0,222	0.608	31,57	27,47		
	Tc4	0,309	0.590	30,46	27,68		
	Tc5	0,209	1.090	31,30	28,28		

Nous avons remarqué que le sang, a donné une quantité minimale de 1.9 ng/µl (série 01) et 2.22 ng/µl (série 02) pour le Maxwell®16 et 0.588 ng/µl pour le Chelex.

Et pour les ongles, la quantité d'ADN obtenue à partir de maxwell® 16 est égale à 0.173 ng/μl et 0.953 ng/μl respectivement pour la série 01 et la série 02 et pour le chelex est de 0.0048 ng/μl.

En ce qui concerne la salive, nous avons obtenu une quantité de 22.6 ng/μl (série 01) et 22.6 ng/μl (série 02) pour le Maxwell®16 et 5.50 ng/μ pour le Chelex.

La quantité minimale d'ADN des cheveux obtenue par Maxwell®16 est de (0.10, et 0.02 ng/μl), dont celle du Chelex est de 3.55 ng/μl.

En outre, le sperme et les traces de contact ont donné des quantités d'ADN (1.96 et 0.0187 ng/μl) pour la première série et (16.46 et 0.0138 ng/μl) pour la deuxième série pour le Maxwell®16 et 0.016 ng/μl pour le Chelex.

Nous comparons les valeurs de quantité d'ADN et de Ct pour les deux méthodes. L'ADN a été correctement extrait et quantifié par Maxwell® plutôt que par Chelex, car le Maxwell® 16 a donné un cycle seuil (CT) qui est compris entre 24 et 31 cycles ; par contre, le Chelex n'a donné aucun CT pour certains supports (Sang, cheveux), il pourrait en effet s'agir de débris d'hémoglobines restants après l'étape de lavage pour les échantillons du sang ou la suspension chelex elle-même sédimentée et qui peut être récupérée avec le surnageant contenant l'ADN. Cette résine est considérée comme inhibiteur pour la PCR.

Et de cela, Nous pouvons noter que l'automate Maxwell®16 a donné de bons résultats et de bonnes quantités d'ADN dans une courte durée par rapport au Chelex qui nécessite des étapes supplémentaires.

Donc, Maxwell®16 semble être meilleur que Chelex car l'extraction d'ADN par cet automate permet une analyse d'ADN fiable et rapide.



***Conclusion***

Ce présent travail a consisté à valider la méthode d'extraction de l'ADN par l'utilisation de l'automate Maxwell®16 et les kits DNA IQ™ pro (PROMEGA) à partir de différents supports biologiques. Cet instrument peut accueillir jusqu'à 16 échantillons simultanément et les traitant en pureté en moins d'une heure, avec avantages d'élimination des étapes de préparations du réactif, de pipetage et de centrifugation dans le cadre du flux de travail ordinaire avec un risque minimal de contamination.

Au cours de cette étude, nous avons tenté de vérifier la fiabilité du protocole de l'extraction de l'ADN par le maxwell®16 à partir de différents supports biologiques susceptibles d'être soumis à des analyses à des fins judiciaires. Ce protocole peut présenter des avantages par rapport au protocole d'extraction déjà utilisé au niveau du laboratoire (résine d'extraction Chelex), il est nécessaire d'atteindre l'objectif tout en produisant des quantités d'ADN et des profils génétiques comparables à ceux obtenus en utilisant la résine d'extraction Chelex.

La validation de notre méthode d'extraction a été basée sur une étude intra laboratoire des critères de répétabilité et reproductibilité. Cette dernière a démontré que cette méthode présente une bonne répétabilité et une reproductibilité satisfaisante par rapport aux besoins du laboratoire au terme de quantité d'ADN exigée par le fabricant du kit d'amplification Powerplex ESI 16(PROMEGA) utilisé au niveau de laboratoire.

Au vue de ces résultats, cette étude pourrait servir de guide pour valider d'autres protocoles d'extraction d'ADN (Extraction différentiel et extraction sur support liquide) par l'automate Maxwell16 promega et ses kits.

Aussi, Nous espérons que cet instrument soit validé pour l'extraction d'ADN à partir des échantillons dégradés, inhibés et à faibles quantités d'ADN qui se trouvent sur les scènes de crime.

Ainsi, à la base de notre étude, il est recommandé d'intégrer le protocole de cet instrument dans la chaîne analytique de ce laboratoire.

*Références  
Bibliographiques*

Amrouche, 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).

Aouf, A., (2015). Cours biologie moléculaire et génie génétique destiné aux étudiants de 3e année Licence de Microbiologie 2015-2016. Université Ferhat Abbas-Sétif 1, p98.

Bessetti, J., (2007). An introduction to PCR inhibitors. Profiles in DNA, 10(1), 9–10.

Bourgoin S., (2000). Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en biophysique par protocoles rapides pour la réparation d'ADN à partir d'échantillons caractéristiques de la biologie judiciaire. Université du Québec à Trois-Rivières, p.04

Bulter, J., (2001). Forensic DNA typing, Biology&technology behind STR Markers. Second edition, P.86

Butler, J., (2005). Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. (2nd Ed.). Elsevier AcademicPress, p3-15.

Butler, J., (2011). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. (1st Ed.). Elsevier AcademicPress, p 32-33-142-143

Cerdan, C., (1997). Apport de l'électrophorèse capillaire à l'étude des flavonoïdes. Ecole nationale supérieur des sciences de l'informatique et des bibliothèques. P.18

Comité Français d'Accréditation (COFRAC), (2011). GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE. SH GTA 04. Révision 00 ; Accès : [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Coquoz, R., Taroni, F., (2006). Preuve par l'ADN : La génétique au service de la justice « concepts génétiques de base » (2nd, Ed).

Coquoz, R., (2013). Preuve par l'ADN, la génétique au service de la justice. 3eme édition. P203-210.

DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16, (2014), p.3; Access: [www.promega.com](http://www.promega.com)

Dossier didactique meurtre, (2006). Muséum des sciences naturelles. Ed. resp. C. Pissani, Bruxelles

- Dougoud, N., (2008). Comparaison de deux protocoles d'extraction dans le cadre d'un contrôle de qualité sur les affaires de mœurs ; Institut universitaire de médecine légale ; Laboratoire de génétique forensique ; p.14.
- Doutremepuich, C., (2012). Les empreintes génétiques en pratique judiciaire. Bull. Acad. Natle Méd. 196, no 6, 1117-1130.
- Elyse,P., Alain, H., (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. Reviews in Biology and Biotechnology. Vol.2, Canada .p2-11.
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency), (2004). Quality Assurance/Quality Control Guidance for Laboratories Performing PCR Analyses on Environmental Samples, EPA/815/B-04/001. Office of Water. P.21
- Ferinbreg Max., (2010). Mise en œuvre du profil d'exactitude in Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Cahier des techniques de l'INRA. p.27-44.
- Forster, L., et al. (2002) Natural radioactivity and human mitochondrial DNA mutations. Proceeding of the national academy of science of the united states of America 99, 13950-139540.
- Goodwin,W., Linacre, A., Hadi, S., (2007). An Introduction to Forensic Genetics, Hoboken, New Jersey ; John Wiley & Sons Ltd, New Jersey, USA. P17-42.
- Groupe de travail "Accréditation" de la Société Française de Toxicologie Analytique, (2005). Laboratoire de Biochimie-Toxicologie, Centre Hospitalier. Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacol, Annales de Toxicologie Analytique, vol. xvii, n° 3, supplément 1, 2005 ; P.2
- Guide QIAGEN (2012). QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. Sample and Assay Technologies, Third Edition; Access: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)
- Hanquet, G., Vink, I., Thiry N., (2018). Séquençage du génome complet : défis et pistes d'organisation pour le système belge-Synthèse. Health Service Research (HSR). Bruxelles : Centre Fédéral d'Expertise des Soins de Santé (KCE). P5.
- ISO, (2007). Guide ISO/IEC 99 Vocabulaire international de métrologie –concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM), ISO, Genève.
- Keyser, C., Petrovki, E., (2006). Utilisation des SNP pour l'identification humaine. Spectra Analyse, n° 249, p 24–25.
- Koehler A., Moore P., Owen D.,(2010). La police scientifique, mène à l'enquête. Ed. DUNOD ; p.176

- Lander, E., S., Linton, L.M., Birren, B., et al ., (2001). Initial sequencing and analysis of the humain genome, *Nature* 409. (860-921).
- Laurentie M., (2015). Guide de validation des méthodes d'analyses. ANSES/PR3/7/01-01 [version a] ; p.24
- Le Carrer, D., Kalyane, B.N., (2004). L'électrophorèse capillaire automatisée en biologie clinique ; Colloque du SNBH ; p.47
- Les techniques de la police scientifique. [Page Web] Accès : <http://techniques-police-scientifique.e-monsite.com/pages/1-1.html>
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4(6):357–362.
- Lodish, H., Berk, A., Mostudaira , P., Darnell, J., (2005). Biologie moléculaire « Identifie et localiser des gènes dans des maladies humaines ».
- Loistron, S., (2009). Les empreintes génétiques en médecine légale : réalisation, législation. Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes. p 18-27.
- Mader, S., (2010). Biologie humain. (1er Ed). Rue des Minimes 39, Bruxelles. p 378-379.
- Manuel technique de l'appareil Maxwell® 16 pour la médecine légale, (2015) ; p.1-6 ; Accès : [www.promega.com](http://www.promega.com)
- Mansuet-Lupo, A., Rouger, P., Van Huffel, V., (2007). Les empreintes génétiques : état de l'art en 2007, techniques, applications et législation. *Transfusion Clinique et Biologique*, 14(3) :334–342.
- Mohini J., Deshpande J.D., (2010) Polymerase chaine reaction : Methods, Principales and Application ; p2-3.
- Pascal, M., (2007). La PCR en temps réel, choix d'amorces et analyse des résultats. Laboratoire de pharmacologie-Toxicologie, INRA, Toulouse.
- Peltier, C., (2011). Dossier Police Scientifique : les varies méthodes d'investigation, Future-sciences.

Pereira, C., (2014). The medico-legal importance and saliva criminalistics: systematization of its application in forensic science. Portuguese magazine of Stomatology, Dentistry and Maxillofacial Surgery. Vol 55, n° 1, P 3-6.

Petkovski, E., (2006). Polymorphismes ponctuels de séquence et identification génétique. Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I. p 1-114.

QIAamp DNA Mini Kit: For DNA Purification from Lymphocytes, (2012), p. 1-4-5.

Somma, M. Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. Extraction et purification de l'ADN. Institute for health and consumer protection, p.3

Sozer A.C., (2014). DNA Analysis for Missing Person Identification in Mass Fatalities. CRC Press, Taylor & Francis Group, London, pp. 1-11.

Taupin, J.M., Cwiklik, C., (2011). Scientific Protocols for Forensic Examination of Clothing. CRC Press, Taylor & Francis Group, London, p. 123.

Walsh, P. S., et al., (1991). Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. BioTechniques, 10, pp.134.

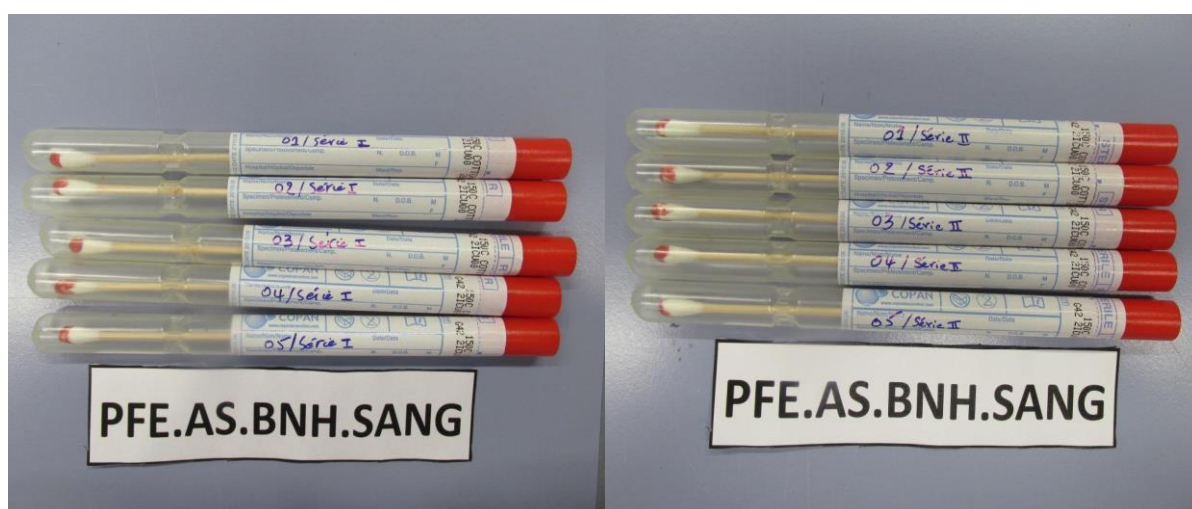
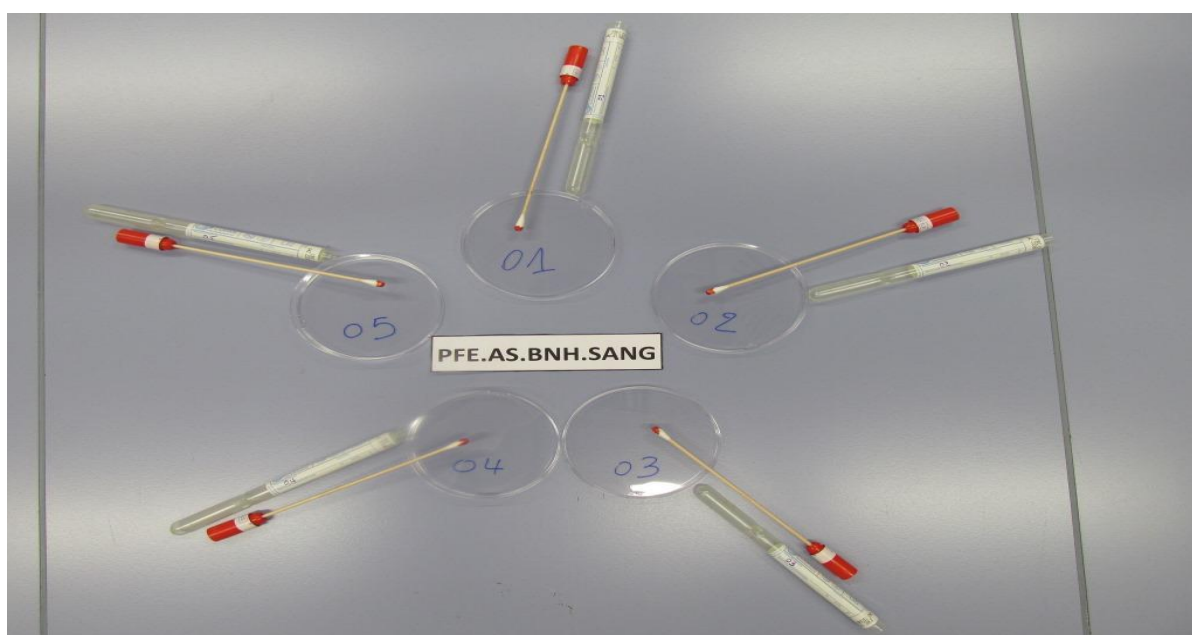
Watson, J.D., Crick, F.H.C., (1953) Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Nature 171, 964-967.

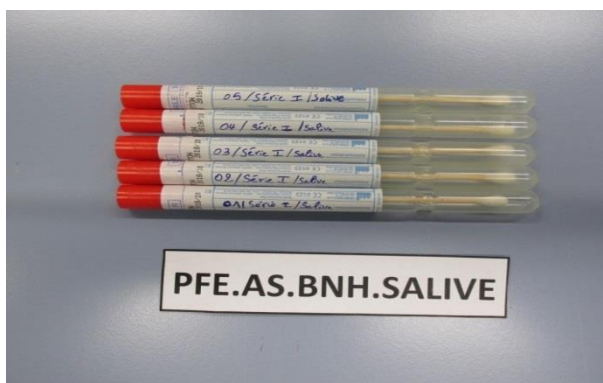
*Annexe*



## Annexe I : Matériel et équipements de la mise en tube

Equipements	Consommables
Appareil photo	Étiquettes
Cross-linker	Aiguilles
	Bistouris stériles
	Boîtes de pétri stériles
	Papier essuies tout
	Microtube 1.5 ml

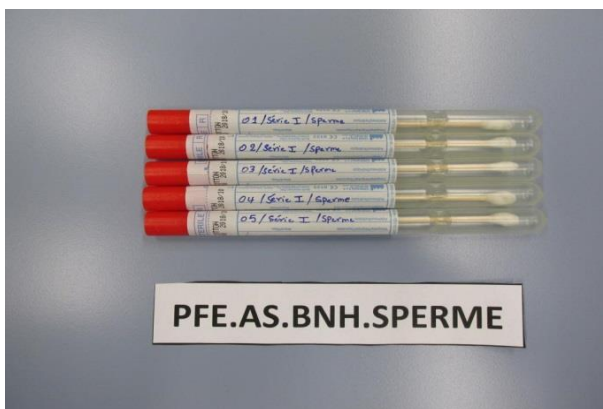




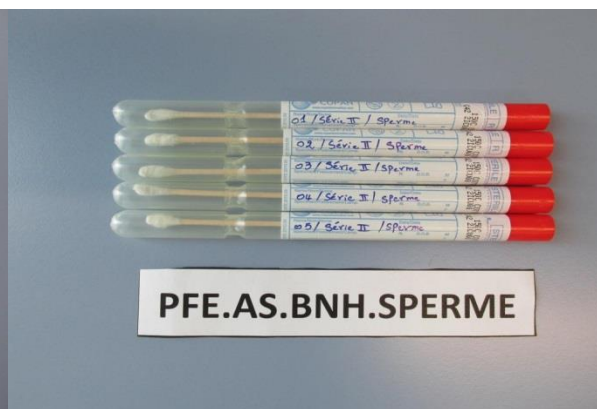
**PFE.AS.BNH.SALIVE**



**PFE.AS.BNH.SALIVE**



**PFE.AS.BNH.SPERME**



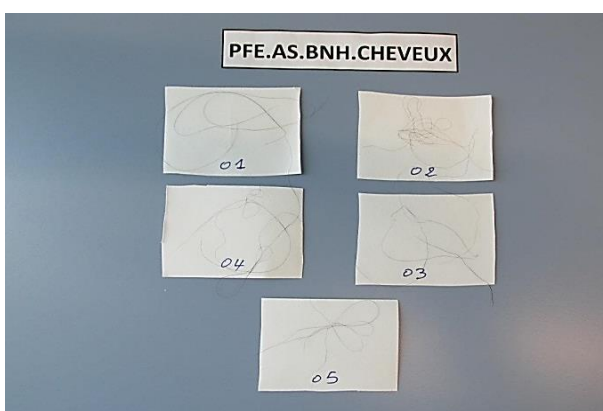
**PFE.AS.BNH.SPERME**



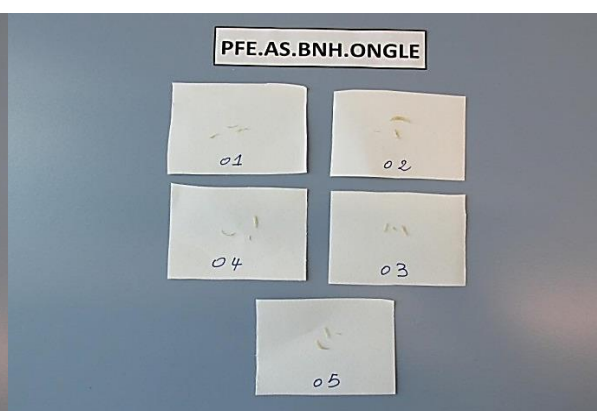
**PFE.AS.BNH.TRACE  
DE CONTACT**



**PFE.AS.BNH.TRACE  
DE CONTACT**



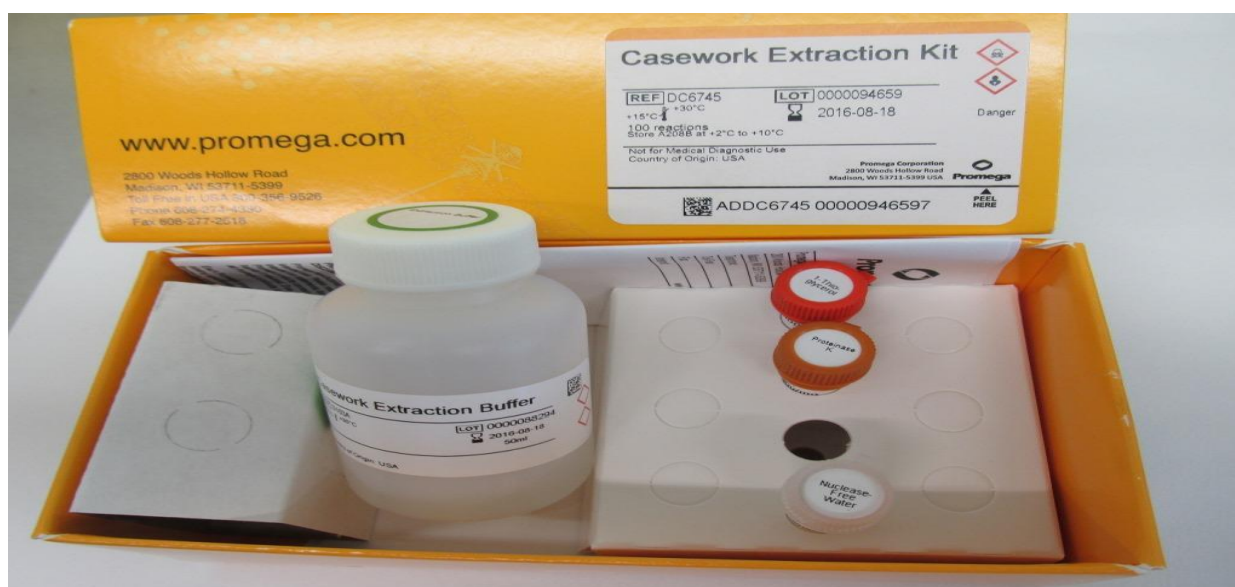
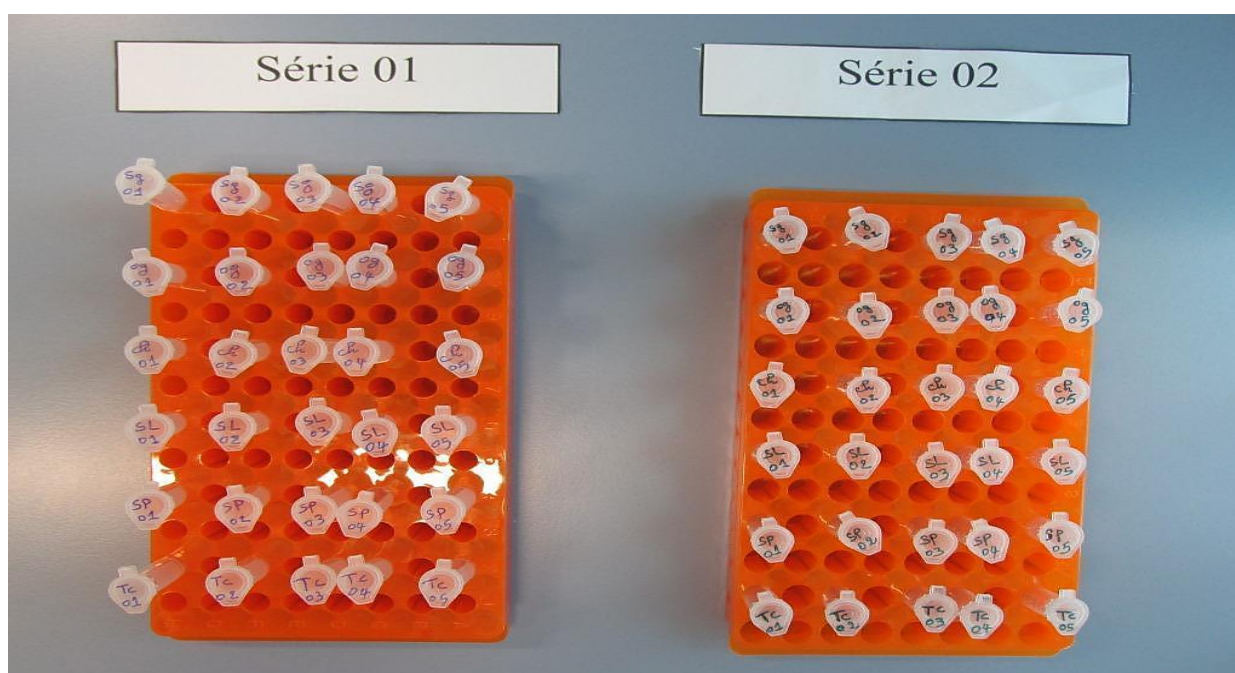
**PFE.AS.BNH.CHEVEUX**



**PFE.AS.BNH.ONGLE**

## Annexe II : Matériel et équipements d'un pré traitement des échantillons

Equipements	Consommables
Hotte	Papier de paille
Cross-linker	Microtube 1.5 ml
Micropipettes	Spin basket
Vortex	Tips
Bain marie	Aiguilles
Centrifugeuse	Kit DNA Extraction casework







**Annexe III:** Matériel et équipements de la préparation d'échantillons pour les cartouches Maxwell®16 LEV

Equipements	Consommables
Maxwell® 16	Cartouches pré remplis
Hotte	Plongeurs (pistons)
Cross-linker	Tubes d'élution
micropipettes	Tips
	Papier de paille



**Annexe IV: Matériel et équipements de quantification d'ADN**

<b>Equipements</b>	<b>Consommables</b>
Hotte	Papier de paille
Cross-linker	Microtube 0.6 ml et 2ml
Micropipettes	Plaque 96 well optique
Vortex.	Tips
Système de PCR en Temp Real (7500 Real Time PCR)	
Logiciel SDS	
Centrifugeuse	

**Annexe V: Préparation de la gamme standard de quantification**

<b>Standards</b>	<b>Volume du standard</b>	<b>Indice de dilution</b>	<b>Concentration d'ADN [ng/μl]</b>
<b>STD 1</b>	30 μl d'eau ultra pure + 10 μl de solution mère	1/4	50
<b>STD 2</b>	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 1)	1/3	16.7
<b>STD 3</b>	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 2)	1/3	5.56
<b>STD 4</b>	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 3)	1/3	1.85
<b>STD 5</b>	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 4)	1/3	0.62
<b>STD 6</b>	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 5)	1/3	0.21
<b>STD 7</b>	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 6)	1/3	0.068
<b>STD 8</b>	20 μL (eau ultra pure) + 10 μL (STD 7)	1/3	0.023

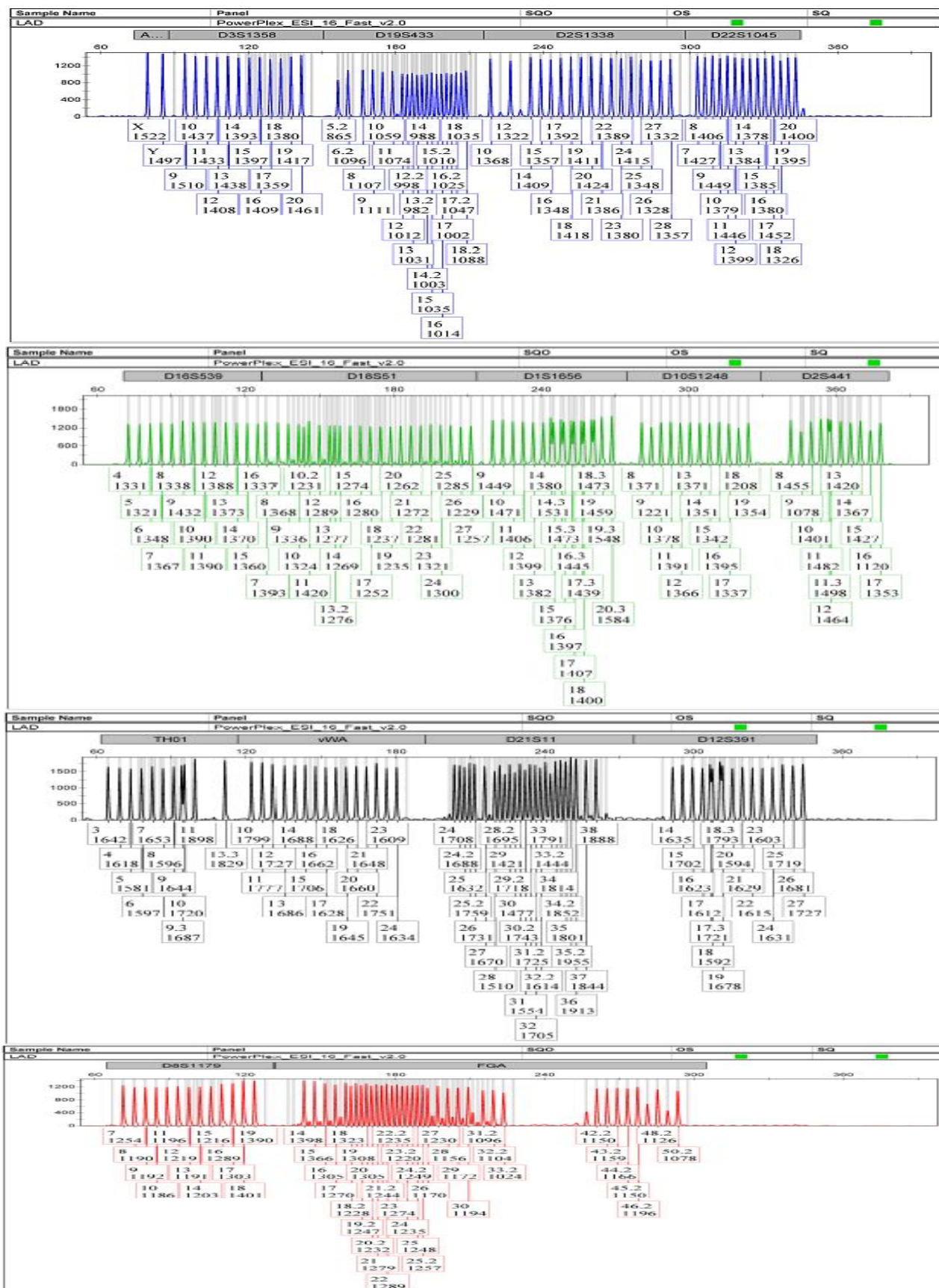
**Annexe VI : Matériel et équipements d'Amplification d'ADN**

<b>Equipements</b>	<b>Consommables</b>
Hotte	Papier de paille
Cross-linker	Microtube 0.2ml
Micropipettes	Tips
Vortex	
Centrifugeuse	
Thermocycleur	

**Annexe VII : Matériel et équipements de post Amplification d'ADN**

<b>Equipements</b>	<b>Consommables</b>
Hotte	Papier de paille
Cross-linker	Microtube 0.2ml
Micropipettes	Tips
Vortex	
Cryo bloc	
Centrifugeuse	
Bloc chauffant	
Séquenceur	

Annexe VIII : profil génétique d'allelic ladder du kit PowerPlex® ESI 16



## Les équipements utilisés



Maxwell®16 promega

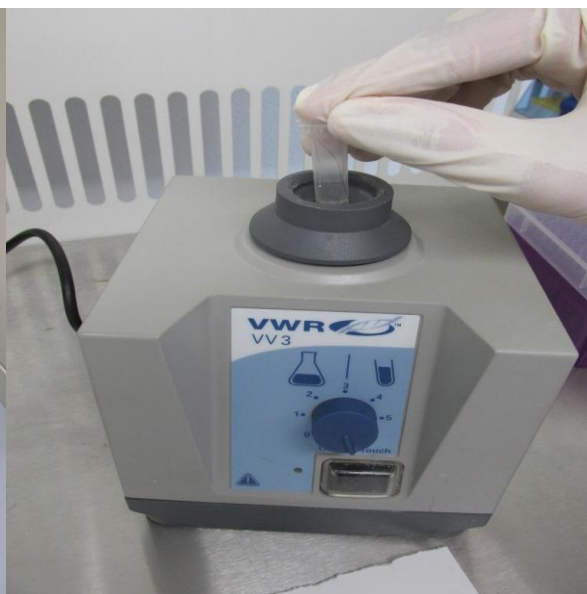


DNA IQ™ Casework kit





**Cross-linker**

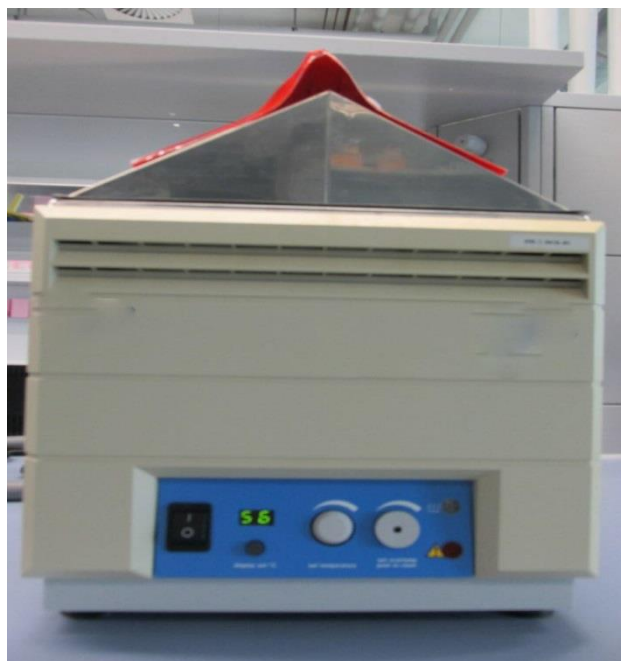


**Vortex**



**Centrifugeuse**





**Incubateur**



**RT-PCR**



**Thermocycleur**



**plateforme de séquençage**