

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة امحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences
Département de Biologie



Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique

Thème :

Validation interne du kit GlobalFiler™ sur l'analyseur génétique
3500xL™ pour l'établissement des profils génétiques

Présenté par :

AZAIZIA Selma

Soutenu le **09/07/2019** devant le Jury composé de :

Président :	M ^{me} BENHABYLES Narimen	Maitre de Conférences	UMBB
Promoteur :	M ^r HAMADOUCHE Tarik	Maitre de Conférences	UMBB
Co-promoteur:	M ^r LAZREG Samir	Expert MSF, INCC	GN
Examineur :	M ^{me} MAHIDDINE Leila	Maître Assistante	UMBB

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة امحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences
Département de Biologie



Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique

Thème :

Validation interne du kit GlobalFiler™ sur l'analyseur génétique
3500xL™ pour l'établissement des profils génétiques

Présenté par :

AZAIZIA Selma

Soutenu le **09/07/2019** devant le Jury composé de :

Président :	M ^{me} BENHABYLES Narimen	Maitre de Conférences	UMBB
Promoteur :	M ^r HAMADOUCHE Tarik	Maitre de Conférences	UMBB
Co-promoteur:	M ^r LAZREG Samir	Expert MSF, INCC	GN
Examineur :	M ^{me} MAHIDDINE Leila	Maître Assistante	UMBB

Remerciements

Mes remerciements les plus distingués à Mr le Directeur Général de l'INCC de m'avoir ouvert les portes de son Institut. Ainsi qu'à toute la merveilleuse équipe de l'INCC pour l'agréable environnement de travail fourni et pour l'accueil chaleureux chaque matin.

A mes chers encadreurs Mr. LAZREG Samir et Mr. AGGOUNE Abdennacer, dont je ne sais plus pour quels motifs vous remercier ? Alors, je me contenterais de vous exprimer ma reconnaissance ETERNELLE pour votre plus grande contribution dans ce manuscrit.

Je voudrais remercier, mon promoteur Mr HAMADOUCHE Tarik, d'avoir accepté de m'encadrer.

Mes remerciements les plus sincères également à KEROUGHLLAINE Sara de pour son soutien, son écoute et son accompagnement.

- M. BENHASSOUNE Narimen pour avoir accepté de présider ce jury

- Mme MAHIDDINE Leila pour avoir bien voulu examiner ce travail

A mes enseignantes : AZZOUG Lamia, BENSOUNA Selma pour qui aucun mot ne serait assez puissant pour les remercier.

Je tiens à adresser également mes remerciements les plus sincères au Meilleur Professeur de Chimie, LEKBIR Choukri.

Et parce qu'il est souvent très difficile de cheminer sans boussole, je voudrais exprimer ma gratitude à mon cher "Madani" pour sa présence entière, ses orientations, son appui au quotidien et pour toutes les astuces que je n'aurais pu apprendre nulle part.

Pour clore ces remerciements, je souhaiterais exprimer ma Reconnaissance ETERNELLE à l'origine de cette merveilleuse et unique aventure, à la clé qui m'a ouvert cette magnifique porte, un merci éternel à mon Cher Hamid pour les encouragements, les conseils et surtout l'accompagnement tout au long de ce PFE.

Dédicaces

Tout comme un édifice, rien ne pourra avoir lieu sans une pierre angulaire, j'ouvre alors le bal par l'architecte de ma vie "mon cher papa" d'avoir toujours été là pour moi, d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui et surtout de m'avoir appris de transformer le négatif en positif.

Avoir une tendre maman est une bénédiction, en avoir deux est une chance unique, à toi Chère artiste de mon parcours "Sawsen" avec ta touche spéciale à chaque phase, voilà aujourd'hui la fin de ton parcours aussi. À la frangine "Iman" la plus cool la plus gentille, à l'amie à la confidente, merci pour le soutien et l'amour inconditionnel.

Au plus tendre grand frère au monde Salim , ainsi que ma très chère Lina pour l'appui quotidien, pour nos moments de folie, pour tous les encouragements et surtout les conseils si utiles.

Au petit frangin "Haithem" qui se prend toujours plus grand que moi ! pour la récurrente question "quand est-ce que tu soutiens ce PFE ?" bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'a toujours permis de ne jamais dévier de mon objectif final.

À l'unique au monde qui m'a accompagné durant toute la rédaction même en dormant, difficile à croire mais tellement vrai ! Merci pour toute les ondes positives que tu m'a avait transmises ma petite princesse d'amour : Elyana Rovane. À mon petits prince d'amour : Adam et Askim d'avoir contribué à la réalisation de ce manuscrit à leur petite façon toute adorable.

À mes tendres tantes pour leurs prières, leur amour et leur soutien inconditionnel tout au long de ces années, sans omettre de citer le meilleur team au monde : Haïfa, Isra et Raid.

À toutes mes amis : Ahlem, Lola, Tina, Dounia, Ichrak, khadija, Sihem et Nawel Lamia.AZ, Selma.BEN, Brahim (surtout pour la fameuse phrase : courage c'est le dernier tournant).

À mon bras droit "Yasmine". À mon effaceur d'obstacles, à celle dont sa présence seule est une véritable thérapie.

Et pour conclure en beauté, je dédie ce travail à celle sans qui aucun projet n'aurait pu voir jour, à celle dont je suis un pur produit de ses sacrifices infinis, et puisque aucun mot n'est assez fort pour te remercier pour tout chère "Maman" je me contenterai de te dire je t'aime Éternellement en attendant qu'un mot assez puissant soit créé !

Selma.

Table des matières

Remerciements	i
Dédicaces	ii
Table des matières	iii
Liste des abréviations :	vii
Introduction générale	viii

Recherche bibliographique

1 L'ADN plan directeur de la vie	1
1.1 L'ADN humain	1
1.2 Le polymorphisme génétique	2
1.2.1 Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)	3
1.2.2 Le polymorphisme de répétition	3
1.2.3 Le polymorphisme d'une séquence unique (SNP)	4
1.2.4 L'analyse des chromosomes X et Y	4
2 Méthodes d'analyse d'ADN	5
2.1 Les sources biologiques d'ADN utilisées pour la validation	5
2.2 Démarches d'établissement d'un profil génétique	6
2.2.1 Extraction de l'ADN	6
2.2.2 Quantification de l'ADN par Real Time-PCR	7
2.2.3 Amplification d'ADN par PCR	7
2.2.4 Électrophorèse capillaire	8
2.2.5 L'interprétation des résultats	8
3 Validation du kit GlobalFiler™	9
3.1 Le kit GlobalFiler™	9

3.2	La validation des méthodes d'analyse	10
3.2.1	Principe de la validation	10
3.2.2	La validation interne	10
3.3	Les critères de validation	11
3.3.1	Seuil analytique	11
3.3.2	Sensibilité	11
3.3.3	Répétabilité	11
3.3.4	Reproductibilité	11
3.3.5	Étude de mélange	12

Matériel et Méthodes

4	Matériels et Méthodes	13
4.1	Matériel biologique	13
4.2	Méthodes	13
4.2.1	Extraction de l'ADN au chelex® 100	13
4.2.2	Quantification de l'ADN par la Real Time-PCR	14
4.2.3	Amplification par PCR multiplex	15
4.2.4	Électrophorèse capillaire (post-amplification)	17
4.3	La validation du kit d'amplification GlobalFiler™	18
4.3.1	Le seuil analytique	18
4.3.2	Sensibilité et limite stochastique et détermination du PHR :	19
4.3.3	Répétabilité et reproductibilité	19
4.3.4	Étude de mélange d'ADN	20

Résultats et interprétations

5	Résultats et interprétations	22
5.1	Résultat de la quantification	22
5.2	Résultats de l'analyse génétique	23
5.3	Résultats des paramètres de validation du kit GlobalFiler™	25
5.3.1	Étude de sensibilité et détermination de la limite stochastique et Peak Heigh Ratio	29
5.3.2	Répétabilité et reproductibilité	31
5.3.3	Étude du mélange	34

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives	43
----------------------------	----

Bibliographie	45
---------------	----

Liste des tableaux

Tableau 1.	Préparation de la gamme de standards pour la quantification d'ADN. . . .	13
Tableau 2.	Ajustement de concentration des échantillons d'ADN.	15
Tableau 3.	Tableau récapitulatif des volumes réactionnels pour l'ensemble des paramètres de validation pour l'étape d'amplification et post-amplification. . .	17
Tableau 4.	Préparation du mélange d'ADN.	19
Tableau 5.	Résultats de la quantification des extractums d'ADN	20
Tableau 6.	Tableau récapitulatif des systèmes hétérozygotes, homozygotes et leur taux d'hétérozygotie	23
Tableau 7.	Résultats du seuil analytique obtenus pour les échantillons de témoins négatifs	24
Tableau 8.	Résultats du seuil analytique obtenus pour les échantillons de contrôles positifs.	24
Tableau 9.	Résultats du calcul du seuil analytique selon les trois équations pour les contrôles négatifs.	25
Tableau 10.	Résultats du calcul du seuil analytique selon les trois équations pour les contrôles positifs.	25
Tableau 11.	Tableau résumant les valeurs des PHR obtenus pour les trois répliques . . .	28
Tableau 12.	Tableau récapitulatif des résultats de répétabilité.	30
Tableau 13.	Tableau récapitulatif des résultats de reproductibilité	31
Tableau 14.	Proportion du contributeur majeur dans le mélange du premier réplica. . .	33
Tableau 15.	Proportion du contributeur majeur dans le mélange du second réplica. . . .	34
Tableau 16.	Proportion du contributeur majeur dans le mélange du troisième réplica. . .	34
Tableau 17.	Tableau Récapitulatif des moyennes du contributeur majeur	35
Tableau 18.	PHR du mélange du premier réplica	36
Tableau 19.	PHR du mélange du second réplica	37
Tableau 20.	PHR du mélange du troisième réplica.	38
Tableau 21.	Combinaisons possibles en cas de mélange à 3 allèles.	39

Table des figures

Figure 1.	Les deux types d'ADN contenus dans le génome humain	2
Figure 2.	Étapes de réalisation d'une empreinte génétique	6
Figure 3.	Représentation schématique des marqueurs présents dans le kit GlobalFiler™ . .	10
Figure 4.	Électrophorégramme de l'ADN contrôle 007 du kit GlobalFiler™	22
Figure 5.	Étude de sensibilité de l'ADN contrôle 007 démontrant la qualité des profils génétiques obtenus avec les différentes dilutions	27
Figure 6.	Cas de mélange avec système à 3 allèles	39

Liste des abréviations :

A : Adénine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

C : Cytosine

CODIS : Combined DNA Index System

ESSL : European Standard Set of Loci

G : Guanine

InDels : Insertion Deletion Polymorphisms

IPC : Internal PCR Control

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemists

ISO : International Standardization Organization

Kb : kilo base

MP : Mixture proportion

Pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PHR : Peak Height Ratio

PK : Protéine Kinase

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RFU : Relative Fluorescence Unit

rmp : Rotations par minute

RT-PCR : Real Time Polymerase Chain Reaction

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SSR : Simple Sequence Repeat

STR : Short Tandem Repeat

SWGDM : Scientific Working Group on DNA Analysis Methods

T : Thymine

VNTR : Variable Number of Tandem Repeats

Introduction générale

A une vitesse folle, l'ADN est devenu un fétiche, un symbole chargé d'une force presque divine. Le système judiciaire, n'a pas échappé à ses charmes. En effet, la preuve par l'ADN a créé un bouleversement important au sein des milieux scientifique et judiciaire, en faisant en sorte que l'identification génétique soit possible autrement que par des tests sanguins conventionnels.

Les techniques d'analyse de l'ADN se sont peaufinées au point de permettre l'obtention de résultats concluants à partir d'un infime échantillon d'ADN. Pour démontrer le haut degré de fiabilité des méthodes qu'ils utilisent, les laboratoires ont recours à des kits commerciaux, dont l'un des bénéfices de leur utilisation est celui de pouvoir établir avec davantage de précision des profils génétiques.

Pour effectuer ces empreintes génétiques, de nouveaux kits ont été mis au point pour être utilisés dans ce domaine. GlobalFiler™ est l'un des plus utilisés actuellement, s'agissant d'un kit de 6 colorants qui permet l'amplification directe de 24 loci dont 21 autosomiques, un locus InDel, un locus Y-STR et l'amélogénine en une seule réaction PCR.

Dans le but d'étudier le potentiel et les limites de ce kit récent, nous avons effectué une étude de validation interne du kit GlobalFiler™ sur l'analyseur génétique 3500xLTM au sein du Laboratoire d'Identification Génétique au niveau de l'Institut National de Criminologie et de Criminalistique de la Gendarmerie Nationale (INCC). Cette étude de validation consistait à valider un ensemble de paramètres dictés par la méthode employée et exigée par des comités scientifiques selon les directives de la norme ISO17025, à savoir : le seuil analytique, l'étude de sensibilité tout en déterminant la zone stochastique ainsi que le PHR, la reproductibilité, la répétabilité, et l'étude de mélanges.

Recherche bibliographique

L'ADN plan directeur de la vie

“L’analyse de l’ADN est pour la justice ce que le télescope est pour les étoiles ; pas une leçon de biochimie, pas une démonstration des merveilles de la loupe, mais une façon de voir les choses telles qu’elles sont réellement”.

(Barry Scheck and Peter Neufeld, Actual Innocence).

1.1 L'ADN humain

Tout commence dans le noyau des cellules de notre organisme. Dans chacune de ces cellules comporte un noyau renfermant le plan détaillé de notre information génétique, ce support universel est organisé en molécules d’acide désoxyribonucléique (ADN).

Décrite pour la première fois en 1953 par Watson et Crick , cette double hélice de L’ADN antiparallèle chargée négativement est composée de deux brins composés par des nucléotides, ces derniers diffèrent les uns des autres seulement dans le type de base, et donc ils peuvent être abrégés en A (Adénine), T (Thymine), G (Guanine) et C (Cytosine), (Redmayne et al. (2011)).

On distingue deux types d’ADN : (qui sont représentés dans la figure 1). D’une part, l’ADN nucléaire, présent au sein de chaque cellule nucléée conditionné en 46 chromosomes : dont 22 paires d’autosomes et 2 gonosomes, transmis selon le mode mendélien où le patrimoine génétique est hérité pour moitié de la mère et l’autre moitié provenant du père (Goodwin et al. (2011), Redmayne et al. (2011)).

D’autre part on distingue l’ADN mitochondrial (ADNmt), une petite partie de l’ADN extranucléaire présente dans un organelle cellulaire appelé mitochondrie, consiste en une molécule circulaire à double brin avec une longueur aux alentours de 16 569 pb (Butler (2005)).

L'ADNmt ainsi que le chromosome Y font un état d'exception avec un mode de de transmission uni-parental, dont on différencié l'hérédité exclusivement maternelle pour l'ADNmt et une hérédité purement paternelle pour le chromosome Y (Butler (2005)).

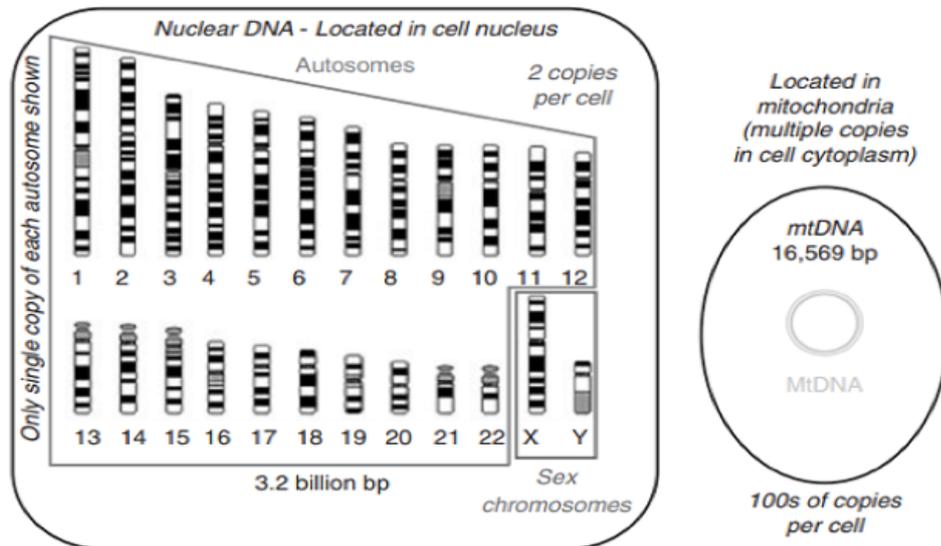


FIGURE 1 – Les deux types d'ADN contenus dans le génome humain (Butler (2005)).

L'ADN nucléaire est constitué de deux parties distinctes : Une première partie (régions codantes) : contenant toutes les informations nécessaires pour la régulation de la synthèse protéique. Cette fraction est estimée à environ 3% du génome humain (Goodwin et al. (2011)). Une seconde partie (régions non codantes) : représentée par les 97% restants dont la fonction reste encore non élucidée, mais contenant une grosse partie d'éléments répétitifs soit en tandem soit dispersés tout au long du génome (Nordby et al. (2005)).

1.2 Le polymorphisme génétique

Bien que l'information génétique de base soit similaire chez tous les individus (plus de 99,7% de notre séquence d'ADN), elle présente certaines variations génétiques appelées polymorphisme (environ 0,3% ou 10 millions de nucléotides) faisant de l'individu un être unique, ces régions variables fournissent la capacité d'exploiter les renseignements génétiques à des fins d'identification humaine (Almeida (2014), Butler (2011)).

Cela dit, le polymorphisme se définit comme étant la coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou un locus donné (Henry (1999)), cependant on dénombre deux types de polymorphismes d'ADN :

- Le polymorphisme de séquence : sont sommairement la résultante d'une mutation ponctuelle conduisant ainsi à un changement de nucléotide.
- Le polymorphisme de longueur : correspondent au produit d'une insertion ou d'une délétion de nucléotides, apparaissant souvent répétés en tandem (Butler (2005),

Schneider (1997)).

1.2.1 Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)

RFLP pour “Restriction Fragment Length Polymorphism”, Utilisée par Alec Jeffreys à des fins de criminalistique en 1985, l’analyse RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), est un polymorphisme qui résulte de variation de localisation de sites de restriction pour une enzyme de restriction donnée, dû à des mutations (créant ou supprimant un site de restriction), les fragments de restriction étant séparés par électrophorèse sur gel d’agarose selon la technique de Southern Blot (Kobilinsky et al. (2005), Stryer (1992)).

1.2.2 Le polymorphisme de répétition

En matière d’analyse génétique, les séquences répétitives réparties tout au long du génome sont largement utilisées depuis l’avènement du typage d’ADN, on distingue :

Les minisatellites (VNTRs)

Les VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) ou les répétitions en tandem en nombre variable, sont une famille de séquences répétées en tandem localisées dans les régions sub-téломériques en majorité de cas, comme elles peuvent être présentes au sein des chromosomes, partageant un motif central commun de (8 à 100) pb. Ce qui les caractérise particulièrement est la faramineuse variabilité du nombre de répétition d’un individu à un autre est qui estimée approximativement de (0.5 à 30 kb) (Coquoz et al. (2013), Petkovski (2006)).

Toutefois, leur utilisation dans le typage d’ADN reste très limitée en raison de la nécessité d’une quantité d’ADN relativement plus importante ainsi que l’impossibilité de travailler sur de l’ADN dégradé, ces raisons citées ont menées au remplacement des VNTRs par les STRs (Coquoz et al. (2013)).

Les microsatellites (STRs)

STRs pour “Short Tandem Repeats” ou appelés encore Simple Sequence Repeats (SSRs) ,sont des courtes répétitions en tandem allant de 2 à 6 pb, uniformément répartis sur le génome (Whittaker et al. (2003)), les STRs sont hautement polymorphes en raison du brassage génétiques mais restant stables pour un même individu (Fernandez et al. (2006), Gilliquet (2009)). Les microsatellites ont été introduits dans le traitement des cas médico-légaux au milieu des années 90 et vite devenus le pilier de l’analyse génétique en raisons de leur petite taille. En outre, un bon nombre de loci STRs ont été caractérisés, mais seulement une vingtaine est utilisée à des fins d’identification génétique.

Les STRs sont répartis en diverses classes en fonction de la longueur de l’unité répétitive, on distingue : les di-nucléotides, les tri-nucléotides, les tétranucléotides, etc. (Almeida

(2014)). En revanche, en criminalistique les répétitions tétra-nucléotidiques constituent la source principale étant donné qu'elles présentent le moins d'artefacts possible (Butler (2011), Butler and Hill (2012)). Autre que le modèle répétitif, les STRs peuvent être classés en fonction de leur structure qui peut être simple ou complexe, les STRs simples montrent un taux faible de mutation contrairement aux STRs complexes qui présentent une grande variabilité et par conséquent plus informatifs (Edwards et al. (1991)). La nomenclature des STRs est en annexe 1.

Caractéristiques exigées pour l'application des STRs dans l'identification humaine :

Pour pouvoir être appliqués dans l'identification humaine les marqueurs STRs, doivent posséder plusieurs caractéristiques tel que l'absence de liaison génétique avec d'autres marqueurs sélectionnés, un pouvoir discriminant élevé, un faible taux de mutation, la possibilité d'amplification et de détection de très faibles quantités d'ADN matrice, un taux de variabilité et d'hétérozygotie élevé (Buckleton et al. (2007), Butler (2005)).

1.2.3 Le polymorphisme d'une séquence unique (SNP)

Les SNPs ou "Single Nucleotide Polymorphism" sont des variations de la séquence d'ADN ayant un seul nucléotide constituant la forme la plus fréquente des variations génétiques chez l'homme, répartis sur le génome toutes les 500 pb en moyenne (Goodwin et al. (2011)).

Ces marqueurs relèvent intéressant pour l'analyse génétique vue l'absence d'un grand polymorphisme, cependant leur principal inconvénient réside dans le nombre élevé de régions à amplifier (Goodwin et al. (2011), Petkovski (2006)).

1.2.4 L'analyse des chromosomes X et Y

A préciser que l'analyse des STR des chromosomes Y et X sont seulement utilisé dans des circonstances particulières en raison de leur discrimination (Butler and Hill (2012)). Néanmoins l'étude des chromosomes X et Y peut s'avérer utile dans des cas complexes, tels que l'absence de l'échantillon parental dans les tests de paternité, la poursuite de la lignée paternelle, ou encore dans le cas des agressions sexuelles, un autre cas également nécessite l'utilisation de ces deux marqueurs lorsqu'un profil génétique ne peut pas être obtenu (Butler (2003), Szibor et al. (2003), Thanakiatkrai et al. (2013)).

Méthodes d'analyse d'ADN

2.1 Les sources biologiques d'ADN utilisées pour la validation

De nos jours, il est tout à fait possible d'obtenir des profils génétiques à partir de la plupart des sources biologiques tels que le sang, le sperme, la salive, les cheveux et bien d'autres (Coquoz et al. (2013), Findlay et al. (1997), Fridez and Coquoz (1996), Frumkin et al. (2010)).

Types d'échantillons biologiques : Il est important de noter qu'il existe deux principales catégories d'échantillons :

Échantillons de référence : correspondent à des prélèvements sur une personne clairement identifiée dont l'identification se fait en comparant le profil génétique obtenu avec celui de l'échantillon de référence. Les échantillons peuvent être du sang, de la salive ou des cheveux.

Échantillons de traces (prélèvements de questions) : font référence à différentes substances biologiques retrouvées sur les scènes de crime et sur tout support (mégots de cigarettes, bouteilles, vêtements...) tel que le sang, la salive, le sperme, des traces de contacts, de muscle, des dents et ossement.

Afin de réaliser l'étude de validation, notre choix s'est porté sur un échantillon de référence à savoir la salive.

La salive : la Salive ou cellules buccales sont des cellules épithéliales détachées de l'intérieur des joues ou de la langue, baignant dans un liquide appelé salive (Coquoz et al. (2013)). La quantité d'ADN extrait d'un échantillon salive renferme environ 1000-10.000 ng/ml (Butler (2005)). Les avantages de l'utilisation de la salive est qu'elle

est facilement disponible, facile à avoir et nécessite un simple stockage (Aknin-Seifer et al. (2004)).

2.2 Démarches d'établissement d'un profil génétique

L'empreinte génétique de l'anglais "genetic fingerprint" jouit d'un statut hors norme en science médico-légale et cela depuis son introduction par son pionnier Alec Jeffrey en 1985, constitue la pierre angulaire de l'analyse d'ADN. Cependant l'obtention du profil génétique nécessite le passage par un ensemble d'étapes détaillées dans la figure 2.

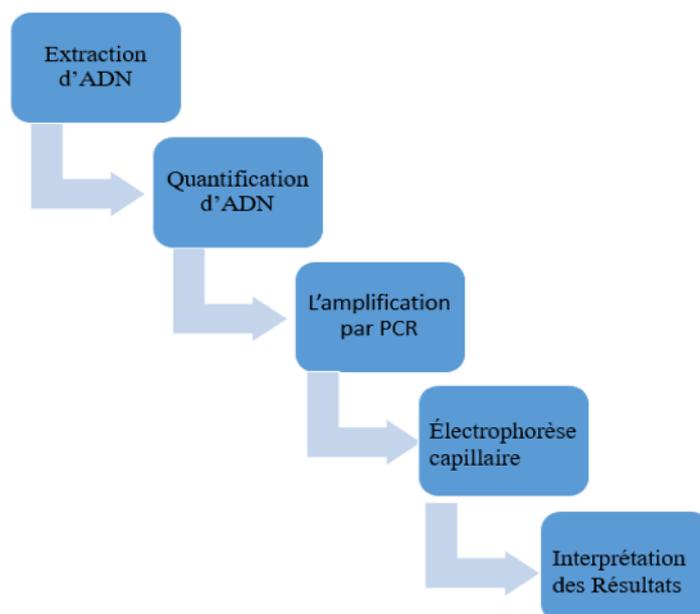


FIGURE 2 – Étapes de réalisation d'une empreinte génétique [originale]

2.2.1 Extraction de l'ADN

La première étape dans la réalisation d'une empreinte génétique est l'extraction de l'ADN pour l'analyse ultérieure. Une panoplie de méthodes est actuellement utilisée aux laboratoires d'identification humaine où le choix repose principalement sur le type et la qualité de prélèvement, les principales méthodes d'extraction sont : l'extraction organique, l'extraction Chelex (dite inorganique par résine), l'extraction en phase solide (par colonnes ou billes magnétiques), l'extraction différentielle.- A mentionner que dans notre cas, il s'agit bien de l'extraction au chelex.

L'extraction au Chelex® 100 : L'une des premières techniques d'extraction qui ont été adoptées par la communauté médico-légale, il s'agit d'une technique simple, rapide et dépourvue de toute toxicité impliquant peu d'étapes par conséquent un risque de contamination minime (Lima et al. (2010), Tringali et al. (2004)).

Le chelex[®] 100 est une résine échangeuse d'ions composée d'un polymère nommé styrène di vinylbenzène, elle se caractérise par une forte affinité avec les ions métalliques polyvalents tel que le Mg^{2+} (Goodwin et al. (2011)).

Le principe d'extraction de cette méthode est très simple, le chelex[®] 100 est rajouté à 5% de solution avec de l'eau ultra- pure et la protéine Kinase (PK) communément utilisée pour digérer les protéines membranaires assure la rupture des parois cellulaires ainsi que la dégradation de toutes les protéines donnant ainsi une solution aqueuse contenant la molécule d'ADN prête à la quantification (Goodwin et al. (2011)). Elle produit toute fois un ADN simple brin en raison du processus d'extraction.

2.2.2 Quantification de l'ADN par Real Time-PCR

Le problème typique d'une analyse ADN est la détermination de la quantité d'ADN présente dans un extractum pour effectuer la réaction PCR (Alonso et al. (2004)), une déviation de cette quantité peut altérer la qualité des profils génétiques générés menant ainsi à une amplification déséquilibrée en raison de fluctuations stochastiques surtout lors de la présence d'une quantité minime d'ADN (Fisher (2016), Swango et al. (2006)). La quantification d'ADN fait donc appel à la PCR en temps réel, cette réaction de polymérisation s'effectue en présence d'un contrôle interne de PCR (ICP) visant à détecter les inhibiteurs de la PCR et renseigne sur l'état de dégradation de l'échantillon (China et al. (2002)).

A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent (reporter) permettant de suivre la cinétique réactionnelle et permettant à l'appareil de mesurer l'intensité de la fluorescence en fonction de nombre de cycle (Mansuet-Lupo et al. (2007)).

Dans notre étude le système de RT-PCR nécessite des sondes marquées par un fluorochrome utilisant l'activité 5' nucléase de la Taq polymérase.

2.2.3 Amplification d'ADN par PCR

Décrite pour la première fois par Kary Mullis en 1985, la PCR ou la réaction de polymérisation en chaîne est largement répandue pour l'étude des profils génétiques. En effet il s'agit d'un copiage d'ADN aboutissant à des centaines voire des milliers de copies.

A l'heure actuelle la PCR multiplex est hautement employée dans d'une optique d'étude de plusieurs STRs simultanément en utilisant diverses amorces spécifiques des différentes régions d'intérêt, chacune de ces amorces étant marquée par un fluorochrome différent (Coquoz et al. (2013)).

Il y a lieu de signaler, qu'une réaction PCR puisse échouer en raison de divers facteurs, tels que : la présence d'inhibiteurs ou d'ADN hautement dégradé ou encore la combinaison des deux facteurs (Butler (2011)).

2.2.4 Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique qui permet la séparation de molécules très variées avec une excellente résolution et une grande rapidité sous l'action du champ électrique (Butler (2011)). Dans l'analyse des STR, elle est utilisée pour déterminer la taille et les numéros alléliques des fragments d'ADN marqués, obtenus après la réaction PCR multiplex (24 pour GlobalFiler™) par comparaison à un standard de taille interne (GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0) et un étalon (Allélique ladder) spécifique du kit utilisé.

2.2.5 L'interprétation des résultats

Après séparation et détection des produits PCR, un profil génétique est obtenu grâce à des logiciels d'analyse génétique tel que GeneMapper™ ID-X. ce logiciel permet de convertir les données brutes en électrophorégramme et attribue à chaque pic un numéro allélique constituant ainsi un profil génétique.

Les profils des STRs obtenus devraient être identiques indépendamment du laboratoire où l'analyse a été effectuée, de la méthodologie adoptée pour l'extraction ou la quantification (Goodwin et al. (2011)).

Validation du kit GlobalFiler™

3.1 Le kit GlobalFiler™

Le kit d'amplification PCR GlobalFiler™ est un nouveau kit multiplex STR développé par Life Technologie pour des fins d'identification humaines, commercialisé en septembre 2012. Il s'agit du premier kit à 6 colorants permettant l'amplification des 24 loci en une seule réaction.

Le kit GlobalFiler™ combine les 13 loci CODIS (Combined DNA Index System) d'origine et les 7 loci de l'extension étendue de European Standard Set of Loci (ESSL) et le locus SE33 très discriminant (Swango et al. (2006)).

Les 24 loci inclus dans ce kit sont : les 21 loci STRs, 1 locus Y-STR (DYS391), 1 locus Y de délétion d'insertion (du bras long du chromosome Y) et l'amélogénine (marqueur déterminant du sexe). Il est important à noter que tous les loci contenus dans le kit GlobalFiler™ sont des tétranucléotides sauf le D22S1045 qui est un tri-nucléotide, dont dix sont des mini-STRs (moins de 220 Pb) , la figure 3 regroupe tous les marqueurs inclus dans le kit GlobalFiler (Swango et al. (2006)).

La préservation de tous les 24 loci dans un système à 5 colorants fait face à de nombreux obstacles, tel que le manque d'espace entre les marqueurs adjacents par conséquent l'inclusion de dix mini-STRs serait donc impossible. Cela à mener à une nouvelle innovation de 6 colorants permettant une performance optimale, la récupération des données et la précision du génotypage (Almeida (2014)) pour plus de détails sur les loci inclus dans ce kit , et les colorants associés , consulter annexe 2, pour plus de détails concernant les composants du kit, voir annexe 3.

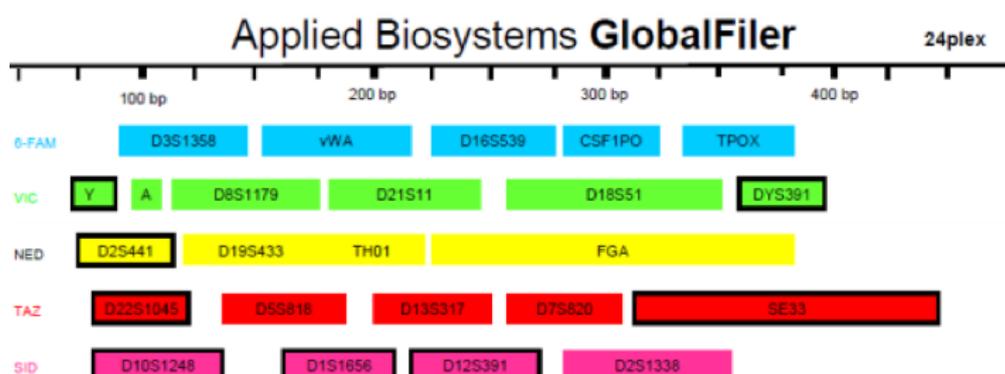


FIGURE 3 – Représentation schématique des marqueurs présents dans le kit GlobalFiler™ Almeida (2014).

3.2 La validation des méthodes d'analyse

De nos jours, la mise en œuvre de toute nouvelle technique est conditionnée par une étude de validation interne permettant la vérification des paramètres donnés par le fabricant. Les résultats de cette étude sont cruciaux pour mettre en évidence les performances, les limites et le potentiel de cette nouvelle méthode (Almeida (2014)).

De façon assez claire, le contenu des exigences de la norme ISO 17025, définissent les prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais (OIN (2005)). Le travail effectué s'appuie entièrement sur les exigences de cette norme.

3.2.1 Principe de la validation

Selon SWGDAM "Scientific Working Group on DNA Analysis Methods", la validation est un processus par lequel une procédure est évaluée pour être opérationnelle, elle consiste à valider l'ensemble des paramètres fournissant une preuve de la validité des résultats obtenus (Butler (2011), Dineon et al. (2005), Guideline).

3.2.2 La validation interne

La validation interne correspond à une étude supplémentaire effectuée par le personnel du laboratoire pour démontrer que les méthodes et les procédures établies fonctionnent comme prévu, le SWGDAM préconise la validation interne pour tout laboratoire d'analyse d'ADN, montrant ainsi la fiabilité et les limites de la procédure (Butler (2005), Guideline).

3.3 Les critères de validation

L'analyse de toute méthode de mesure et des besoins du laboratoire se traduit par un certain nombre de critères à étudier. Ces derniers font partie d'une étape nommée « caractérisation intra-laboratoire » dans le processus de validation.

Plusieurs critères de validation existent, cependant une sélection de ces derniers doit s'imposer en fonction de la méthode utilisée (Martin P (2014)). Ainsi dans ce travail, pour la validation de l'amplification et de l'électrophorèse capillaire, nous avons retenu les paramètres suivants ; seuil analytique, sensibilité, répétabilité, reproductibilité et étude de mélange et qui sont définis comme suit :

3.3.1 Seuil analytique

Le seuil analytique ou la ligne de base correspond à la hauteur minimale requise à partir de laquelle les pics détectés peuvent être distingués de manière fiable du bruit de fond (Guideline).

3.3.2 Sensibilité

La capacité d'obtenir des résultats fiables à partir d'une gamme de quantités d'ADN, y compris les limites supérieure et inférieure de l'essai (Guideline).

Pour ce paramètre nous avons déterminé d'une part la zone stochastique qui est défini comme étant la valeur de la hauteur de pic en dessous de laquelle un allèle jumeau d'une paire hétérozygote peut être perdu (Guideline).

D'autres parts, nous sommes intéressés également au Peak Height Ratio (PHR) faisant référence à la hauteur de pic d'un allèle ayant une valeur en RFU inférieure par la hauteur de pic d'un allèle ayant une valeur en RFU supérieure, le PHR s'avère intéressant dans le cas d'un mélange d'ADN (Guideline).

3.3.3 Répétabilité

La répétabilité est l'accord entre les résultats des mesurages successifs du même mesurande dans des conditions identiques, soit un même opérateur, même lot de réactifs en utilisant le même équipement sur un intervalle de temps court (Dingeon et al. (2005), Group et al. (2010)).

3.3.4 Reproductibilité

La reproductibilité est l'accord entre les résultats des mesurages successifs du même mesurande en faisant varier l'opérateur, tout en gardant les mêmes conditions, soit le même lot de réactifs en utilisant le même équipement sur un intervalle de temps plus au moins étendu (Dingeon et al. (2005), Group et al. (2010)).

3.3.5 Étude de mélange

La capacité d'obtenir des résultats fiables à partir d'échantillons de sources mixtes devrait être déterminée (Guideline).

Matériel et Méthodes

Matériels et Méthodes

4.1 Matériel biologique

Un total de 15 échantillons d'ADN de référence a été prélevé appartenant à 5 individus dont 3 de sexe féminin et 2 de sexe masculin, afin de réaliser le prélèvement des cellules épithéliales un écouvillon stérile avec tige en bois cassable a été placé sous la langue. Par la suite, la partie de la tige portant le coton a été coupée et mise dans des micro-tubes de 1.5 ml, pour finaliser le prélèvement les micro-tubes ont été codifiés.

A noter que plusieurs étapes ont été accomplies, chacune de ses étapes varie selon les équipements, le consommable, ainsi que les réactifs utilisés et qui sont présenté en annexe 4.

4.2 Méthodes

4.2.1 Extraction de l'ADN au chelex[®] 100

Principe

L'extraction au chelex[®]100 est une technique rapide et efficace impliquant peu d'étapes, en effet il s'agit d'une résine échangeuse d'ions composée de polymères de divinylbenzène contenant les ions qui agissent comme des groupes chélateurs de Mg²⁺ permettant ainsi l'inactivation des nucléases et donc protection de l'ADN, la présence de la protéinase Kinase(PK) dans le processus permet de rompre la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire (Butler (2011)).

Mode opératoire

- Déposer 400 μl du chelex[®] 100 à 5% et 20 μl de PK dans les 16 micro-tubes préidentifiés dont 15 contiennent les échantillons d'ADN et 1 correspond au témoin négatif ;
- Vortexer pendant 30 secondes ensuite Incuber à 56° pendant au minimum 30 minutes ;
- Vortexer de nouveau pendant 30 secondes et ré-incuber de nouveau à 100° pendant 8 minutes
- Agiter pendant 10 secondes et centrifuger pendant 3 minutes à 13000 rpm ;
- Récupérer le surnageant et aliquoter 3 μl d'ADN pour la quantification.

4.2.2 Quantification de l'ADN par la Real Time-PCR

Principe

La quantification permet d'estimer la quantité d'ADN présente dans les extractums des échantillons et renseigne également sur son état de dégradation ainsi que sur la présence éventuelle d'inhibiteurs de la PCR tels que :(l'hémoglobine, les acides, urée....etc).

Mode opératoire

Préparation de la gamme de standard

Tout d'abord une gamme de standard est préparée selon le tableau 1 :

Tableau 1 – Préparation de la gamme de standards pour la quantification d'ADN.

10	FD	Dilution		CF [ng/ μl]
		EUP (μl)	STD (μl)	
STD 1	1/4	30	10 (Solution mère à 200 ng/ μl)	50
STD 2	1/3	20	10 (STD 1)	16,7
STD 3			10 (STD 2)	5,56
STD 4			10 (STD 3)	1,85
STD 5			10 (STD 4)	0,62
STD 6			10 (STD 5)	0,21
STD 7			10 (STD 6)	0,068
STD 8			10 (STD 7)	0,023

où :

FD désigne : Facteur de dilution,

EUP désigne : l'eau ultra pure,

CF désigne : concentration finale.

Préparation du Mélange réactionnel

- Préparer un mélange réactionnel pour un total d'échantillons de 33, dont 15 échantillons correspondent aux extractums d'échantillons, 16 à la gamme de standards et 2 contrôles (un témoin négatif et un témoin d'extraction); le volume réactionnel se calcule selon la formule suivante : $12,5 \mu\text{l}$ Reaction mix \times n + $10,5 \mu\text{l}$ Primer Mix \times n tel que n est le nombre total d'échantillons, ce qui donne alors $412,5 \mu\text{l}$ du Quantifiler[®] PCR Reaction Mix avec $346,5 \mu\text{l}$ Quantifiler[®] Human Primer Mix (Il est recommandé d'inclure le volume pour les réactions supplémentaires afin d'obtenir un volume excédentaire pour la perte qui se produit pendant les transferts de réactifs);
- Vortexer le mélange réactionnel pendant 3s;
 - Déposer dans chaque puits de la plaque à 96 puits, $23 \mu\text{l}$ du mélange réactionnel
 - Déposer $2 \mu\text{l}$ de standard dans les puits correspondent à la gamme de standard après une agitation brève avant chaque prélèvement ; dans les 15 puits correspondent aux échantillons d'ADN déposer $2 \mu\text{l}$ d'ADN ;
 - Déposer $2 \mu\text{l}$ d'eau ultra pure correspond au contrôle négatif;
 - Sceller la plaque avec un film adhésif transparent afin d'éviter toute évaporation puis lancer un quick spin à 3000 rpm pour récupérer les gouttelettes collées à la paroi et donc faire descendre le contenu ;
 - Placer la plaque dans «ABI[™] 7500 Real-Time PCR System». Le plan de plaque détaillé pour le total d'échantillons quantifiés figure dans l'annexe 5.

4.2.3 Amplification par PCR multiplex

Principe

La PCR multiplex consiste à amplifier simultanément un grand nombre de STR en une seule réaction en utilisant plusieurs amorces spécifiques dans différentes régions d'intérêt.

Le kit GlobalFiler[™] à 6 fluorophores permet d'amplifier 24 marqueurs STR qui sont ciblés par des amorces spécifiques.

Mode opératoire

Pour cette étape, un seul échantillon d'ADN pour chaque individu a été retenu à savoir : AS3, BER1, CO2, HF1 et KA2 en se basant sur la concentration la plus élevée pour chaque échantillon (voir résultats quantification partie résultats et interprétations). Ces derniers ont été amplifiés par le kit d'amplification GlobalFiler[™] en suivant les recommandations du fournisseur : 29 cycles pour une concentration de $1 \text{ ng} / 15 \mu\text{l}$ ce qui a nécessité la dilution de l'ADN à $0,0667 \text{ ng} / \mu\text{l}$.

La réaction PCR est réalisée dans un volume total de $25 \mu\text{l}$ comprenant $15 \mu\text{l}$ d'ADN, $7,5 \mu\text{l}$ de « GlobalFiler[™] Master Mix » et $2,5 \mu\text{l}$ de « GlobalFiler[™] Primer Set » pour se faire :

- Préparer un mélange réactionnel pour 7 échantillons (5 correspondent aux échantillons d'ADN et 2 témoins de contrôle); selon la formule suivante : $7,5 \mu\text{l}$ Master mix \times n + $2,5 \mu\text{l}$ Primer set \times n) et donc un volume de : $52,5 \mu\text{l}$ Master mix + $17,5 \mu\text{l}$ Primer set;

— Vortexer le mélange réactionnel pendant quelques secondes.

Étant donné que les échantillons d'ADN ont une concentration différente, un ajustement de concentration est nécessaire pour atteindre une concentration finale de 0.0667 ng/ μ l d'ADN et cela en rajoutant de l'eau ultra pure selon le tableau 2 :

Tableau 2 – Ajustement de concentration des échantillons d'ADN.

ADN	CI d'ADN (ng/ μ l)	CFC d'ADN (ng/ μ l)	VI (μ l)	VF (μ l)	Volume d'eau à rajouter (μ l)
AS3	6.19	0.0667	1	93	92
BER1	1.40			21	20
CO2	7.26			109	108
HF1	5.48			82	81
KA2	5.27			79	78
Contrôle 007	0.1		10	15	5

où :

CI : Concentration initiale,

CFC : Concentration Finale (ciblée),

VI : Volume Initial,

VF : Volume Final.

- Prélever 10 μ l du mélange réactionnel et 15 μ l d'ADN de chacun des échantillons dilués et les déposer dans les tubes ;
- Pour le contrôle négatif, déposer de 15 μ l d'eau ultra-pure, tandis que pour le contrôle positif, dépôt de 10 μ l du mélange réactionnel et 15 μ l de l'ADN contrôle 007 ;
- Pour le contrôle négatif, déposer de 15 μ l d'eau ultra-pure, tandis que pour le contrôle positif, dépôt de 10 μ l du mélange réactionnel et 15 μ l de l'ADN contrôle 007 ;
- Lancer un quick spin à 3000 rpm pendant 15 s ;
- Charger les tubes-PCR dans la plaque du thermocycleur «Veriti™ 96-Well Thermal Cycler» ;
- Fermer le couvercle chauffant, puis commencer le run, après 1h15minutes Récupérer les produits PCR. Pour consulter le programme PCR par le kit GlobalFiler™ voir annexe 6.

4.2.4 Électrophorèse capillaire (post-amplification)

Principe

Durant l'électrophorèse capillaire, les produits d'amplification sont injectés dans un capillaire contenant le polymère POP4 (Performance optimized polymer 4). Les fragments d'ADN sous l'action d'un champ électrique migrent vers les électrodes qui sont connectées à une alimentation électrique de haute tension (un laser et une caméra CCD). Le faisceau laser à argon vient exciter les fluorochromes qui vont ré-émettre une fluorescence spécifique (Gilder JR (2007)).

Mode opératoire :

- Préparer un mélange réactionnel pour un total de 9 échantillons (5 échantillons d'ADN, 2 témoins de contrôle de l'amplification, et un témoin de contrôle post-amplification et un ladder). Ce mélange contient 86,4 μl de formamide et 3,6 μl de standard de taille (la formule pour un seul échantillon : 0,4 μl standard de taille +9,6 μl de formamide) ;
- Vortexer le mélange réactionnel pendant quelques secondes, puis déposer dans chaque puit de la plaque de réaction à 96 puits 10 μl du mélange réactionnel, 1 μl du produit PCR aux puits correspondant et enfin 1 μl ABI™ GlobalFiler™ Allelic Ladder (plan de plaque, annexe 7) ;
- Sceller la plaque de réaction avec un feuillet de silicone «96-Well Silicone Septa Mat» ;
- Centrifuger la plaque pour s'assurer que le contenu de chaque puits est bien mélangé pendant 15 secondes à 3000 rpm ;
- Chauffer la plaque de réaction dans un bloc chauffant à 95°C pendant 3 minutes, puis placer immédiatement la plaque dans un bloc froid pendant 3 minutes ;
- Placer la plaque dans le séquenceur après fermeture avec du plastique solide.

Les données brutes collectées de l'électrophorèse capillaire seront analysées par le logiciel "Gene Mapper™ ID-X v5.1".

4.3 La validation du kit d'amplification GlobalFiler™

Afin de valider le kit d'amplification Globalfiler™ objet de ce manuscrit, un ensemble de paramètres ont été validés en s'appuyant sur les directives du SWGDAM. Pour cette étape seulement deux échantillons ont été analysés à savoir KA2 (échantillon masculin) et CO2 (échantillon féminin) en fonction du taux élevé d'hétérozygotie et l'absence d'allèles chevauchants, tous les paramètres de validation testés suivent le même mode opératoire cité précédemment pour les étapes d'amplification et électrophorèse capillaire, seul le nombre d'échantillons, le volume réactionnel ainsi que les opérateurs (pour reproductibilité) qui change, et qui sont résumés dans le tableau 3 :

Tableau 3 – Tableau récapitulatif des volumes réactionnels pour l'ensemble des paramètres de validation pour l'étape d'amplification et post-amplification.

Etapas	Réactif/Volume par réaction	Paramètres de validation				
		SA μ l	S μ l	R μ l	Rep μ l	EM μ l
Amplification	-Master,mix :7,5 μ l.	172,5	210	52.5	52.5	172.5
	-Primer set :2,5 μ l	57,5	70	17.5	17.5	57.5
Post-amplif	-Standard detaille : 0,4 μ l.	10,4	12.4	3.6	3.6	10.4
	Formamide : 9, 6 μ l.	249.6	297.6	86.4	86.4	49.6

où,

SA : désigne le Seuil Analytique,

S : désigne la Sensibilité,

R : désigne la Répétabilité,

Rep : désigne la Reproductibilité,

EM : désigne l'Étude de Mélange.

4.3.1 Le seuil analytique

But

Le seuil analytique se définit comme étant la hauteur minimale requise au-dessus de laquelle les pics détectés peuvent être distingués de manière fiable du bruit de fond (Gilder JR (2007)).

Mode opératoire

Pour valider ce paramètre, l'ADN contrôle a été utilisé suite à l'ajustement de la concentration d'ADN initiale estimée à 0.1 ng/ μ l, un total de 23 échantillons ont été analysé dont 16 correspondent au (Témoin-) c'est-à-dire des échantillons contenant de l'eau ultra-pure, 7 échantillons du contrôle positif. (Plan de plaque du paramètre : seuil analytique, voir annexe 8).

4.3.2 Sensibilité et limite stochastique et détermination du PHR :

But

Ce paramètre permet de déterminer la capacité d'obtenir des résultats fiables à partir d'une gamme de quantités d'ADN, en prenant en considération les bornes supérieures et inférieures de la gamme et donc déterminer la quantité minimale d'ADN requise pour l'obtention de profils génétiques (Group et al. (2010)).

Mode opératoire

Dans l'étude de sensibilité l'ADN contrôle 007 (9 échantillons ont été lancés en 3 réplicas) du kit a été utilisé et dilué selon la gamme de dilution (annexe 9).

Pour l'étape d'amplification, 28 puits ont été utilisés : 27 pour la gamme de dilution, 1 pour le contrôle négatif, tandis que pour la post-amplif, au-delà de ceux cités on rajoute un pour le témoin- et 1 pour ladder ,plan de plaque (annexe 10).

4.3.3 Répétabilité et reproductibilité

But

Pour le paramètre de répétabilité, l'objectif est de prouver l'accord entre les résultats d'essai effectués sur un même échantillon, même lot de réactif, même instrument via même opérateur. Alors que la reproductibilité vise à prouver l'accord entre les résultats dans les mêmes conditions par un second opérateur et travailler sur un intervalle de temps plus ou moins étendu.

Mode opératoire

Pour ces deux paramètres, le même échantillon KA2 a été utilisé, 5 échantillons pour

la répétabilité, 5 pour la reproductibilité et donc 14 puits de la plaque ont été utilisés et qui sont détaillés dans le plan de plaque de ce paramètre dans l'annexe 11.

4.3.4 Étude de mélange d'ADN

But

Le but étant d'évaluer la performance du kit à séparer les mélanges d'ADN de deux ou plusieurs personnes avec un pourcentage de contribution (majoritaire/ minoritaire) et à partir de quel ratio peut-on séparer ce mélange.

Mode opératoire

Pour cette étude de mélange à 4 allèles, deux échantillons ont été analysés (CO2 et l'ADN contrôle du kit GlobalFiler™) à une concentration finale de 0.0667 ng/ μ l, dans un premier temps, une série de mélange d'ADN a été préparé en 3 répliques, et qui ont été préparés selon le tableau 4.

Tableau 4 – Préparation du mélange d'ADN.

Echantillon	Ratio : M : F	Volume M	Volume F
M1	1 :1	25	25
M2	1 :2	16.5	33.5
M3	1 :3	12.5	37.5
M4	1 :4	10	40
M5	1 :5	8.5	41.5
M6	1 :10	5	45
M7	1 :20	2.5	47.5

- Pour l'étape d'amplification, préparer 24 tubes : 21 pour les 3 répliques de mélange, 1 pour témoin(-) et 1 pour témoin(+);
- Pour l'étape de post-amplification, préparer 26 tubes : 21 pour les 3 répliques de mélange, 1 pour témoin(-) et 1 pour témoin(+), 1 pour post-amplification(-) et 2 pour le ladder.

— Le plan de plaque de la post-amplification est présenté en annexe 12.

Résultats et interprétations

Résultats et interprétations

5.1 Résultat de la quantification

Tableau 5– Résultats de la quantification des extractums d'ADN

Echantillons d'ADN	Concentration ng/ μ L	Echantillons d'ADN	Concentration ng/ μ L
AS1	0.39	CO3	0.49
AS2	1.34	HF1	5.48
AS3	6.19	HF2	3.47
BER1	1.40	HF3	4.22
BER2	1.23	KA1	0.98
BER3	0.13	KA2	5.27
CO1	0.5	KA3	1.43
CO2	7.26	Contrôle-, Contrôle Extraction	00

Tous les échantillons sélectionnés lors de la validation interne, et qui sont AS3, BER1, CO2, HF1, KA2 présentent des quantités d'ADN supérieures à celle préconisée pour l'amplification par PCR, par conséquent des dilutions ont été nécessaires puisque la

quantité soumise à la PCR entre 0.5 ng et 1 ng selon les recommandations du fournisseur.

5.2 Résultats de l'analyse génétique

Les données générées à l'aide du kit GlobalFiler™ après l'électrophorèse capillaire étaient traitées par le logiciel « GeneMapper™ ID-X Software v1.5 ». De multiples étapes ont été effectuées durant l'analyse génétique par ce logiciel afin d'obtenir un profil génétique ou encore électrophorégramme, où chaque ligne de ce dernier correspond à une couleur de pic relative à un des six fluorochromes différents (Rouge, Orange, Vert, Noir, Bleu et Violet).

Chaque pic représente un marqueur STR caractérisé par une hauteur de pic permettant de se renseigner sur l'unité de fluorescence relative « RFU » ainsi que la taille des motifs répétés exprimée en paires de bases par comparaison à un standard de taille. Les traits qui apparaissent en gris sont appelés « Bins » et ont pour but d'attribuer à chaque fragment d'ADN d'intérêt ou STR un numéro allélique, chaque marqueur symbolise par une forme allélique dans le cas d'un sujet homozygote héritant le même allèle avec un nombre identique de STR ou deux formes alléliques indiquant la présence d'une personne hétérozygote avec un nombre variable de répétitions hérités de ses parents. Les électrophorégrammes obtenus pour les échantillons sélectionnés sont représenté en figure 4 et en annexes de 13 à 17.



FIGURE 4– Électrophorégramme de l’ADN contrôle 007 du kit GlobalFiler™.

Le pourcentage élevé de l’hétérozygotie et l’absence des allèles en commun entre les échantillons KA2 et CO2 ainsi que le contrôle d’ADN 007 ont mené à leur sélection pour l’étude de la validation interne. Le pourcentage d’hétérozygotie des échantillons est calculé

Tableau 6 – Tableau récapitulatif des systèmes hétérozygotes, homozygotes et leur taux d'hétérozygotie

Echantillon	Nombre de système hétérozygote	Nombre de système homozygote	Taux d'hétérozygotie en%	Nombre de système total
ADN contrôle 007	18	4	81.82%	22
AS3	14	8	63.64	22
BER1	18	4	81.82%	22
CO2	15	7	68.18 %	22
HF1	14	8	63.64%	22
KA2	19	3	86.36%	22

comme suit :

$$\frac{\text{nombre de systèmes hétérozygote}}{\text{nombre de systèmes total}} \times 100$$

5.3 Résultats des paramètres de validation du kit GlobalFiler™

Le seuil analytique

Pour l'étude de la ligne de base ou le seuil analytique, 23 échantillons, dont 17 correspondent aux témoins négatifs et 6 aux contrôles positifs (ADN contrôle 007). Tous les échantillons ont été analysés via le logiciel « GeneMapper™ ID-X Software v1.5 » à 1 RFU, afin de s'assurer que le seuil d'analytique n'aurait pas besoin d'être abaissé pour les échantillons à faible quantité d'ADN et apte de fournir une bonne évaluation des artefacts qui peuvent être obtenus ou non autour du seuil analytique (Group et al. (2010)).

Afin de pouvoir déterminer la hauteur minimale requise à partir de laquelle les pics détectés peuvent être distingués de manière fiable du bruit de fond, nous avons déterminé les valeurs maximales pour chaque couleur et cela pour tous les témoins négatifs accompagnés de leur moyenne. Les valeurs des limites analytiques en (RFUs) obtenues ont été calculées selon 3 équations différentes, dont la première est suggérée par SWGDAM et qui est la suivante (Martin P (2014)) :

$$\text{Seuil analytique} = 2 \times (\text{Maximum Peak Height} - \text{Minimum Peak Height})$$

Tandis que la seconde (équation 3) est proposée par International Union of Pure and Applied Chemists (l'IUPAC). L'IUPAC définit la limite de détection étant la plus petite mesure capable d'être détectée avec une certitude raisonnable.

$$\text{Limite de détection} = \text{moyenne Peak Height} + (3 \times \text{Standard de deviation du Peak Height}) \quad (5.1)$$

Une troisième équation utilisée au niveau de l'INCC (Gilder JR (2007)) est la suivante :

$$\text{Seuil analytique} = 3 \times (\text{Maximum Peak Height})$$

Les résultats obtenus pour les échantillons de témoins négatifs ainsi que les contrôles positifs sont résumés dans les tableaux 7,8,9 et 10 :

Tableau 7 – Résultats du seuil analytique obtenus pour les échantillons de témoins négatifs

C /T(-)	Bleu	Vert	Noir	Rouge	Violet	C /T(-)	Bleu	Vert	Noir	Rouge	Violet
T(-) 1	6	7	4	8	7	T(-) 10	6	9	7	10	7
T(-) 2	6	7	5	8	8	T(-) 11	6	9	6	9	10
T(-) 3	8	10	7	9	10	T(-) 12	6	8	5	10	10
T(-) 4	10	12	8	9	13	T(-) 13	9	9	7	11	8
T(-) 5	12	10	10	10	9	T(-) 14	5	8	7	10	8
T(-) 6	8	11	7	10	9	T(-) 15	5	9	6	9	8
T(-) 7	8	9	4	9	8	T(-) 16	7	7	4	8	9
T(-) 8	7	7	5	8	8	T(-) 17	11	10	5	8	6
T(-) 9	7	10	4	9	8						

où :

C désigne le Colorant,

T désigne le Témoin.

Tableau 8 – Résultats du seuil analytique obtenus pour les échantillons de contrôles positifs.

Colorant Contrôle positif	Bleu	Vert	Noir	Rouge	Violet
T(+) 1	15	20	16	10	12
T(+) 2	10	16	13	10	20
T(+) 3	10	10	8	9	11
T(+) 4	8	10	7	10	12
T(+) 5	19	16	17	16	12
T(+) 6	15	10	13	15	12

Tableau 9– Résultats du calcul du seuil analytique selon les trois équations pour les contrôles négatifs.

Colorant	Max	Min	Moyenne	2*(max-min)	Average+ (3*SD)	3*Max
Bleu	12	5	7,47	14	13,57	36
Vert	12	7	8,94	10	13,37	36
Noir	10	4	5,94	12	10,97	30
Rouge	11	8	9,19	6	11,92	33
Violet	13	6	8,75	14	13,20	39

Tableau 10 – Résultats du calcul du seuil analytique selon les trois équations pour les contrôles positifs.

Colorant	Max	Min	Moyenne	2*(max-min)	Average+ (3*SD)	3*Max
Bleu	19	8	13,14	22	24,84	57
Vert	20	10	13,14	20	25,56	60
Noir	17	7	12,43	20	23,63	51
Rouge	16	9	12,14	14	21,21	48
Violet	20	11	13,00	18	22,33	60

Selon l'équation proposée par SWGDAM nous avons obtenu les résultats suivants pour les contrôles témoins : 14 RFU pour le bleu et violet, 10 RFU pour le vert, 12 RFU pour

le noir, 6 RFU pour le rouge, cependant avec la seconde formule proposée (équation 3) par l'IUPAC a généré les valeurs suivantes : 13,57 RFU pour le bleu, 13,37 RFU pour le vert, 10,97 RFU pour le noir, 11,92 RFU pour le rouge et enfin 13, 20 RFU pour le violet. Pour celle utilisée à l'INCC les résultats obtenus sont les suivants : 36 RFU pour le bleu et le vert, 30 RFU pour le noir, 33 RFU pour le rouge et enfin 39 RFU pour le violet.

En ce qui concerne les contrôles positifs, leur calcul a généré les quotients d'après : On distingue les valeurs de 22 RFU pour le bleu, 20 RFU pour le vert ainsi que le noir, 14 RFU pour le rouge et 18 RFU pour le violet et cela en calculant le seuil analytique via la première équation. Ou moment où la seconde équation a fourni les valeurs suivantes 24,84 RFU pour le bleu, 25,56 RFU pour le vert, 23,63 pour le noir, 21,21 RFU pour le rouge et 22,33 RFU pour le violet. Et enfin selon l'équation utilisée à l'INCC les valeurs sont comme suit : 57 RFU pour le bleu, 60 RFU pour le vert et le violet, 51 RFU pour le noir, 48 RFU pour le rouge.

On constate que les valeurs obtenues par la troisième équation sont élevées par rapport à la première et deuxième équation, il convient donc de mentionner que la formule suggérée par SWGDAM est dédiée à 'analyse des données provenant d'électrophorèse capillaire en criminalistique, alors que l'équation proposée par l'IUPAC constitue approche mathématique soutenue pour n'importe quelle procédure analytique. En effet, on s'appuyant sur la définition de la limite de détection , les deux équations ont été utilisées pour calculer la limite de détection ainsi que l'équation suggérée par l'INCC ont généré de divers résultats, tel le cas pour les valeurs des contrôles positifs qui sont plus élevés que celles obtenues pour les témoins négatifs, de même la troisième formule a généré des valeurs exaltées.

En se référant aux résultats obtenus et pour rester plus conservateur tout en prenant en considérations les concentrations d'ADN des échantillons analysés, seules les valeurs des contrôles positifs ont été retenus, fixant ainsi le seuil analytique à 60 RFU pour le kit GlobalFiler™ et tous les paramètres suivants seront analysés à 60 RFU comme ligne de base.

5.3.1 Étude de sensibilité et détermination de la limite stochastique et Peak Heigh Ratio

Étude de sensibilité

L'étude de la sensibilité permet d'évaluer la capacité du kit GlobalFiler™ à détecter la quantité d'ADN amplifiable en vue d'obtenir des profils génétiques exploitables. Des quantités d'ADN allant de 1 ng à 3.90 pg ont été analysées à 60 RFU en réalisant trois répliques, il convient de noter que nous nous sommes limités à la neuvième dilution (1/256) soit la concentration de 0.00026 ng/ μ l. Nous avons ainsi pu observer des profils génétiques complets, caractérisés par la présence de tous les allèles tout à fait interprétables et exploitables et cela jusqu'à une concentration de 0.125 ng/ μ l, soit un facteur de dilution de (1/8) et qui correspond à la quatrième dilution, tandis que les profils obtenus à partir de la concentration 0.062 ng/ μ l qui correspondent à la cinquième et sixième dilutions montrent clairement la baisse de sensibilité et par conséquent les génotypes obtenus sont partiels, mais restant tout de même exploitables. Cette diminution est due au phénomène du drop-out ou la perte des allèles qui peut être expliquée est la baisse de la quantité d'ADN aboutissant ainsi à des profils partiels. Cependant les génotypes obtenus à partir de la septième dilution deviennent totalement inexploitables en raison de la perte importante en matière de marqueurs STRs.

Détermination de la limite stochastique

Le code couleur adopté a été le suivant : Vert indique l'amplification des deux allèles. Blanc : un seul allèle a été amplifié. Rouge : aucun allèle observé.

Selon les résultats de sensibilités atteints et en s'appuyant sur la figure en haut de l'ADN contrôle 007 on a déterminé le seuil stochastique à 230 RFU ce qui correspond la valeur de la hauteur de pic en dessous de laquelle un allèle jumeau d'une paire hétérozygote peut avoir été perdu. Pour conclure, on peut affirmer donc que la quantité minimale requise pour générer un profil complet et interprétable doit être supérieure de 125 pg (figure 5).

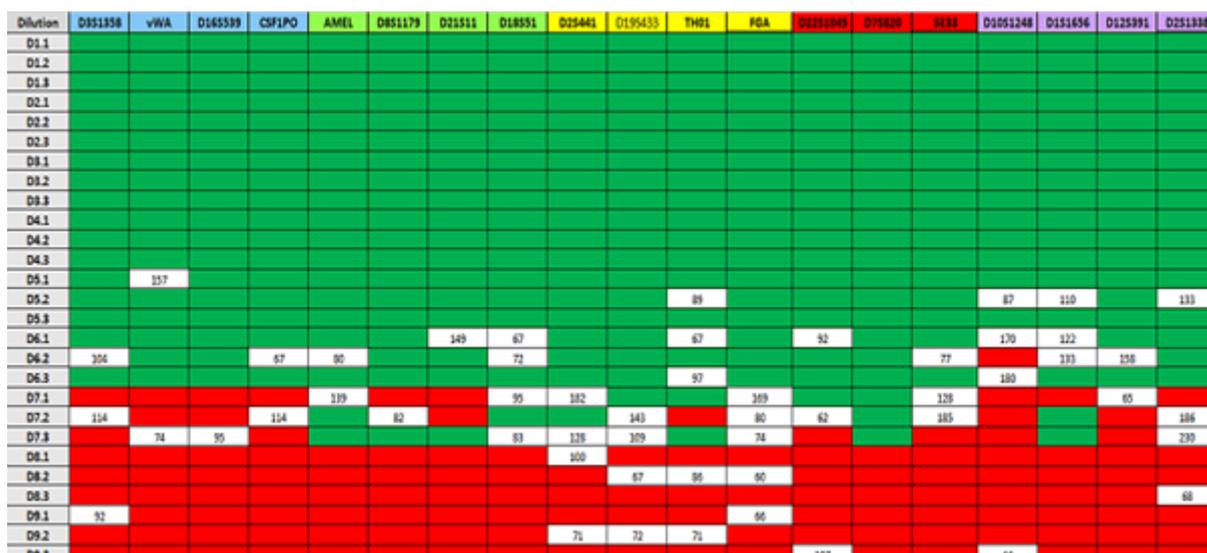


FIGURE 5 – Étude de sensibilité de l’ADN contrôle 007 démontrant la qualité des profils génétiques obtenus avec les différentes dilutions

Peak Height Ratio (PHR)

Les rapports de hauteur de pic intra-locus (PHR) peuvent être calculés pour un locus donné en divisant la hauteur de pic d’un allèle ayant une valeur en RFU inférieure par la hauteur de pic d’un allèle ayant une valeur en RFU supérieure, et peuvent être exprimés sous forme de pourcentage. Le PHR se calcule selon l’équation suivante :

$$\text{Peak Height Ratio (en \%)} = \frac{\text{Hauteur du petit pic (en rfu)}}{\text{Hauteur du grand pic (en rfu)}} \times 100 \text{ [26]}$$

Le tableau 11 représente les valeurs minimales des PHR obtenus.

Tableau 11 – Tableau résumant les valeurs des PHR obtenus pour les trois répliques

Dilution(D)	Replica1	Replica2	Replica3
	PHR1(RFU)	PHR2(RFU)	PHR3(RFU)
D1	75	74	69
D2	64	64	71
D3	62	63	64
D4	41	49	47

Les valeurs minimales pour le PHR des 3 répliquas dédiées aux quatre premières dilutions sont de l'ordre de de 75 RFU pour le répliqua 1, 74 RFU pour le répliqua 2 et 69 pour le répliqua 3, alors que pour la seconde dilution (D2) elle était 64 RFU pour le répliqua 1, 64 RFU pour le répliqua 2 et 71 pour le répliqua 3, tandis que le PHR pour la troisième dilution était de 62 RFU pour le répliqua 1, 63 RFU pour le répliqua 2 et 64 pour le répliqua 3. Pour les trois premières dilutions (D1, D2 et D3) le PHR dépasse les 60% tout en constatant une perpétuelle régression du PHR alors qu'au niveau de la quatrième dilution le pourcentage du PHR tourne autour de 40% lorsque la quantité d'ADN est inférieure du seuil recommandé soit 125 pg.

Vue l'absence du drop-out et donc obtention d'un profil entier (100% de sensibilité) au niveau de la quatrième dilution nous avons retenus le minimum PHR de l'ordre de 41% pour les concentrations d'ADN supérieures à 125 pg.

5.3.2 Répétabilité et reproductibilité

Les essais ont été exécutés sur le même échantillon "KA2" à une concentration finale de 0,0667 ng/ μ l en utilisant le même lot de réactif ainsi qu'un opérateur identique et cela dans un délai de temps le plus court possible, tandis que pour la reproductibilité un autre opérateur avait effectué l'analyse sur un intervalle plus au moins étendu. Les cinq échantillons, suite à leur analyse par le logiciel GeneMapper™ ID-X Software v1.5" sur l'analyseur génétique 3500xL ont généré des profils génétiques complets indiquant la présence de 24 marqueurs génétiques, les profils obtenus sont de bonne qualité et exploitables avec une hauteur de pics approximatifs proches offrant ainsi une bonne possibilité d'interprétation des profils génétiques. En comparant les profils obtenus (représentés en tableaux 12 et 13) pour le test de répétabilité ceux générés par différents manipulateurs pour le test de reproductibilité on constate que le génotypage de l'ADN offre des résultats similaires avec l'absence de discordance, ces résultats démontrent clairement la répétabilité et la reproductibilité du kit d'amplification GlobalFiler™.

Tableau 12 – Tableau récapitulatif des résultats de répétabilité.

Marqueur	Allèle	RB1	RB2	RB3	RB4	RB5	Moyenne
D3S1358	16	16009	9500	9206	8649	12457	11164,2
vWA	14	5228	3415	3524	1939	4817	3784,6
	16	5931	3498	4518	2369	4667	4196,6
D16S539	9	4245	2460	3135	1954	3402	3039,2
	13	3804	2214	2123	1551	2755	2489,4
CSF1PO	10	7041	4172	3670	3408	5754	4809
TPOX	8	2702	1542	1889	1329	1676	1827,6
	9	2466	1270	1436	945	2007	1624,8
Yindel	2	18516	7013	7979	5965	11812	10257
AMEL	X	13682	8374	10701	6729	10999	10097
	Y	13410	7218	8637	5726	10326	9063,4
D8S1179	11	10131	7933	7317	6217	8804	8080,4
	13	10594	6545	7716	5372	8244	7694,2
D21S11	29	7417	3606	4455	2806	5365	4729,8
	30	7357	3381	3712	2563	6140	4630,6
D18S51	16	5262	3015	3649	2401	4614	3788,2
	18	5901	2796	3924	2338	3453	3682,4
DYS391	9	4911	3110	5026	2747	4562	4071,2
D2S441	11	7162	7210	6793	5993	5661	6563,8
	13	7321	6532	6430	6237	5825	6469
D19S433	15	4423	5235	5275	4636	3761	4666
	15,2	4074	5194	4441	4519	4203	4486,2
TH01	6	3550	3793	3620	4060	3218	3648,2
	8	3844	3581	4496	3447	3139	3701,4
FGA	20	4085	4339	4949	4291	4689	4470,6
	24	3807	5339	4475	3829	3578	4205,6
D22S1045	11	8815	3908	5606	3193	8448	5994
	14	7717	4820	4803	3892	6389	5524,2
D5S818	11	9068	4566	6529	4942	8399	6700,8
	13	9362	5157	6512	4468	7810	6661,8
D13S317	12	16789	8130	10932	8708	14710	11853,8
D7S820	9	7644	3426	5954	3460	5917	5280,2
	12	6219	3410	4283	2924	5842	4535,6
SE33	18	4765	3711	3875	2880	4813	4008,8
	30,2	4464	2347	3211	2657	4183	3372,4
D10S1248	14	14768	5896	7933	4849	11438	8976,8
	15	11560	4926	6529	4448	10576	7607,8
D1S1656	15	9644	4828	6064	3767	7646	6389,8
	16	8936	4626	4701	3079	6470	5562,4
D12S391	17	6109	2536	2904	2671	4353	3714,6
	23	6513	1924	3242	1776	4644	3619,8
D2S1338	19	5619	3060	3840	3398	4284	4040,2
	25	5704	3122	2617	3351	2754	3509,6

Tableau 13 – Tableau récapitulatif des résultats de reproductibilité

Marqueur	Allèle	RD1	RD2	RD3	RD4	RD5	Moyenne
D3S1358	16	6413	5185	8656	4763	6715	6346,4
vWA	14	2169	1666	2330	1296	1848	1861,8
	16	2580	2377	2552	1671	2435	2323
D16S539	9	1786	1454	1738	1335	1677	1598
	13	1192	1160	1506	1077	1461	1279,2
CSF1PO	10	3388	2981	2957	1782	2929	2807,4
TPOX	8	1127	850	863	707	940	897,4
	9	1056	712	1197	562	982	901,8
Yindel	2	5737	3410	5768	3142	4696	4550,6
AMEL	X	6497	5277	5778	3578	5560	5338
	Y	4365	5277	5577	3443	5280	4788,4
D8S1179	11	5253	5136	5946	3872	4885	5018,4
	13	5923	5433	6607	3786	4447	5239,2
D21S11	29	3258	2537	3162	1570	1887	2482,8
	30	2489	2615	2710	1774	2416	2400,8
D18S51	16	2005	1866	2468	1425	1877	1928,2
	18	2428	1582	2362	1950	2214	2107,2
DYS391	9	3455	2784	2569	1950	2701	2691,8
D2S441	11	7124	5278	6869	5234	5377	5976,4
	13	6110	5628	7635	4503	5394	5854
D19S433	15	5560	4211	4744	3563	3832	4382
	15,2	4841	4103	4538	3918	3794	4238,8
TH01	6	3605	3268	3050	3417	3560	3380
	8	4212	3491	3170	3037	3218	3425,6
FGA	20	5722	4503	4246	3069	4052	4318,4
	24	3650	4044	4750	3210	3668	3864,4
D22S1045	11	3545	2887	3650	2097	2991	3034
	14	3015	2371	3485	1944	2658	2694,6
D5S818	11	4512	2490	4269	2703	3271	3449
	13	4109	3486	4398	2382	3685	3612
D13S317	12	6490	5390	7848	4396	6580	6140,8
D7S820	9	3373	2677	3036	1804	2754	2728,8
	12	2090	2258	1911	1738	2368	2073
SE33	18	2636	2196	2344	1795	2227	2239,6
	30,2	2028	1791	2113	1418	2276	1925,2
D10S1248	14	3625	3084	4312	2770	3655	3489,2
	15	3584	3094	4239	2605	4028	3510
D1S1656	15	3199	2625	3297	2013	2813	2789,4
	16	2374	2236	2914	1867	2807	2439,6
D12S391	17	1790	1564	2497	1097	1589	1707,4
	23	1738	1390	1930	1304	1629	1598,2

5.3.3 Étude du mélange

L'étude du mélange s'est portée sur l'ADN contrôle 007 étant un contributeur mineur et l'échantillon féminin CO2 comme contributeur majeur selon les ratios 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5, 1 : 10 et 1 : 20 , en réalisant 3 réplicas avec une quantité d'ADN initiale de 1 ng comme indiqué précédemment. Le choix de ces échantillons est basé sur le taux d'hétérozygotie élevé par rapport à l'ensemble des échantillons analysés et qui est estimé à 68,18% pour l'échantillon CO2 et à 81,82% pour le contrôle positif du kit ADN 007. Un autre critère de sélection est l'absence des allèles chevauchants « overlapping allele » entre les échantillons sélectionnés. Un mélange d'ADN peut contenir au minimum 1 allèle et maximum 4 allèles dans un seul locus, plusieurs combinaisons sont possibles selon la présence ou l'absence d'un allèle chevauchant :

- Hétérozygote+ Hétérozygote (pas d'allèle chevauchant)= 4 allèles (pics)
- Hétérozygote+ Hétérozygote (avec un allèle chevauchant)= 3 allèles (pics)
- Hétérozygote+ Hétérozygote (avec 2 allèles chevauchants)= 2 allèles (pics)
- Hétérozygote+ Homozygote (pas d'allèle chevauchant)= 3 allèles (pics)
- Hétérozygote+ Homozygote (avec un allèle chevauchant)= 2 allèles (pics)
- Homozygote + Homozygote (pas d'allèle chevauchant)= 2 allèles (pics)
- Homozygote + Homozygote (avec allèle chevauchant)= 1 allèle (pic)

Le mélange d'ADN a été analysé à 60 RFU (seuil analytique limité auparavant), et suite à cela on a observé la génération de mélange de profils complet, pour les ratios allant de 1 :1 à 1 :5, bien que les ratios 1 :10 et 1 :20 ont conduit à un mélange de profil avec disparition de quelques allèles du profil minoritaire.

Pour le réplica II 1 :20 l'absence des résultats est due à une erreur de manipulation et par conséquent aucun profil génétique n'a été obtenu, pour le réplica III 1 :4 l'absence du profil est dû à un défaut de migration du standard de taille.

L'analyse du mélange consiste à étudier deux paramètres essentiels : Mixture proportion et Peak Height Ratio (PHR)

Proportion du mélange

Afin d'estimer la proportion de chaque contributeur dans le mélange, la formule suivante est utilisée (Butler (2011)) :

$$\text{Proportion du mixte} = \frac{\text{somme des RFU des allèles du contributeur majoritaire}}{\text{Somme totale des RFU des allèles du locus}} \times 100$$

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 14, 15, 16 et 17 :

Tableau 14 – Proportion du contributeur majeur dans le mélange du premier réplica.

Marqueurs	Ratios						
	I 1 :1	I 1 : 2	I 1 : 3	I 1 : 4	I 1 : 5	I 1 :10	I 1 :20
D3S1358	58,98	73,47	76,83	84,11	84,60	89,82	92,43
D16S539	55,91	71,07	78,22	82,91	77,30	89,17	97,61
D8S1179	59,83	76,37	83,06	83,31	83,90	92,82	97,10
D2S441	58,92	74,00	86,96	86,03	88,20	94,32	97,1
TH01	65,81	80,68	75,26	87,31	86,70	94,09	95,86
SE33	52,50	74,55	75,26	84,17	81,80	89,75	97,36
D10S1248	58,55	74,04	78,83	83,29	84,50	91,13	97,68
D1S1656	59,10	78,29	85,70	84,15	87,60	91,92	94,56
D2S1338	51,70	72,32	79,43	86,09	85,30	88,63	96,69
Moyenne R1	57,92	74,98	79,95	84,6	84,44	91,29	96,26

Tableau 15 – Proportion du contributeur majeur dans le mélange du second réplica.

Marqueurs	Ratios						
	II 1 : 1	II 1 : 2	II 1 : 3	II 1 : 4	II 1 : 5	II 1 : 10	II 1 : 20
D3S1358	59,36	76,19	83,30	81,57	84,42	97,40	//
D16S539	52,06	70,69	72,80	83,31	81,93	87,80	//
D8S1179	61,01	72,14	78,30	83,27	86,46	93,20	//
D2S441	69,01	76,31	80,40	86,64	89,53	94,10	//
TH01	61,49	76,55	81,10	83,87	81,90	91,90	//
SE33	54,85	69,19	77,70	81,65	80,99	90,70	//
D10S1248	63,36	78,48	74,70	84,11	86,33	90,10	//
D1S1656	61,94	73,77	83,10	89,06	76,50	90,50	//
D2S1338	70,95	75,00	76,60	82,77	83,01	89,70	//
Moyenne R2	61,56	74,26	78,70	84,03	83,45	91,70	//

Tableau 16 – Proportion du contributeur majeur dans le mélange du troisième réplica.

Marqueurs	Ratios						
	III 1.1	III 1.2	III 1.3	III 1.4	III 1.5	III 1.10	III 1.20
D3S1358	57,20	74,53	77,60	//	88,00	90,50	98,50
D16S539	56,50	65,04	78,62	//	79,30	90,80	97,40
D8S1179	63,00	75,90	82,95	//	84,70	92,10	97,40
D2S441	61,10	75,90	84,85	//	88,30	93,70	97,40
TH01	61,70	76,43	83,53	//	87,00	92,20	97,10
SE33	52,50	70,63	91,07	//	79,70	89,00	98,90
D10S1248	64,80	73,23	79,13	//	85,00	92,40	98,70
D1S1656	65,10	75,87	83,69	//	87,60	91,80	96,40
D2S1338	61,30	74,21	81,39	//	84,50	91,20	91,40
Moyenne R3	60,40	73,53	82,54	//	84,90	91,50	97,00

Tableau 17 – Tableau Récapitulatif des moyennes du contributeur majeur

Moyenne	Ratios						
	1 :1	1 :2	1 :3	1 :4	1 :5	1 :10	1 :20
Moyenne R1	57,92	74,98	79,95	84,6	84,44	91,29	96,26
Moyenne R2	61,56	74,26	78,7	84,03	83,45	91,7	//
Moyenne R3	60,4	73,53	82,54	//	84,9	91,5	97
Moyenne générale	59,96	74,25	80,39	84,31	84,26	91,49	96,63

Pour le ratio 1 :1 la valeur proportionnelle pour chaque contributeur est estimée à 50%, tandis que les valeurs calculées sont comprises entre 52% et 70% avec une moyenne totale de 59,96% pour les trois répliques, soit avec une différence aux alentours de 9% par rapport à la valeur estimée.

Pour le ratio 1 :2 la valeur théorique estimée est de l'ordre de 66,66% pour le contributeur majeur, les calculs ont montré que cette valeur correspond à une moyenne totale de 74,25% avec une différence de 7,59%. Pour le ratio 1 :3 un pourcentage de 75% est dédié au contributeur majeur, et un pourcentage de 25% pour le contributeur mineur, alors que la moyenne des trois répliques pour ce ratio est de 80,39%, et donc une différence de 5,39%. Pour le ratio 1 :4 80% de pourcentage théorique est destinée au contributeur majeur et 20% au contributeur mineur, avec une moyenne calculée totale de 84,31% soit une différence de 4,31%.

Pour le ratio 1 :5 la valeur estimée est de 83% pour le contributeur majeur et 17% pour le contributeur mineur. La valeur calculée pour la moyenne totale est de 84,26% ce qui donne une différence de 1,36%.

Pour le ratio 1 :10, les deux contributeurs contribuent avec des pourcentages de 91,1% et 8,9% respectivement, la moyenne totale calculée est de 91,50% et donc une différence de 0,4%. Pour le ratio 1 :20 le pourcentage de contribution est de 95,24% pour le contributeur majeur, la moyenne totale associée à ce ratio est de 96,63% pour les trois répliques ce qui génère une différence de 1,38%.

Vu les résultats obtenus, un intervalle de différence est toujours observé entre les valeurs théoriques des ratios et les valeurs calculées. Cet intervalle varie entre 0,4% et 9%

dépendant de la valeur du ratio, cette différence peut être due à un ensemble de paramètres tels que : les erreurs de manipulation tel que le pipetage et la préparation de dilution ou encore au phénomène de l'amplification préférentielle.

Peak Heigh Ratio

L'évaluation du PHR peut être utilisée pour établir les éventuelles attentes en matière d'appariement d'allèles afin de définir les génotypes pour les échantillons mixtes (Group et al. (2010)). Le PHR se calcule selon la formule suivante :

$$\text{Peak Height Ratio} = \frac{\text{le plus grand pic du minoritaire}}{\text{le plus petit pic du majoritaire}} \times 100$$

Le calcul du PHR a généré les résultats résumés dans les tableaux 18, 19 et 20 :

Tableau 18 – PHR du mélange du premier réplica

Marqueurs	Ratios						
	I 1 : 1	I 1 : 2	I 1 : 3	I 1 : 4	I 1 : 5	I 1 : 10	I 1 : 20
D3S1358	77,75	36,86	33,06	23,08	20,37	15,24	15,08
D16S539	94,92	46,65	31,48	20,99	38,16	15,77	4,946
D8S1179	79,44	37,12	21,03	23,02	20,85	8,431	4,316
D2S441	71,84	39,12	18,15	17,80	17,10	7,694	3,769
TH01	52,91	26,76	27,93	19,85	16,36	8,503	6,629
SE33	98,41	36,94	34,42	25,30	25,90	13,01	3,88
D10S1248	81,54	39,70	35,75	22,15	22,93	15,13	4,78
D1S1656	74,15	31,04	19,80	21,08	15,37	12,24	8,13
D2S1338	94,93	42,64	35,42	24,51	21,09	15,17	6,85
Moyenne	80,66	37,43	28,56	21,98	22,02	12,35	6,48
Max	98,41	46,65	35,75	25,30	38,16	15,77	15,08
Min	52,91	26,76	18,15	17,80	15,37	7,69	3,76

Tableau 19 – PHR du mélange du second réplica

Marqueurs	Ratios						
	II 1 : 1	II 1 : 2	II 1 : 3	II 1 : 4	II 1 : 5	II 1 : 10	II 1 : 20
D3S1358	75,75	38,41	26,14	26,75	22,75	5,71	//
D16S539	99,20	42,39	43,86	23,39	28,25	16,82	//
D8S1179	73,61	48,97	30,94	25,74	21,94	7,66	//
D2S441	46,53	32,27	28,75	17,10	13,82	8,83	//
TH01	66,46	36,04	27,59	22,42	24,70	10,70	//
SE33	98,95	49,33	31,63	23,83	26,34	13,32	//
D10S1248	71,09	31,12	41,99	22,87	18,26	17,02	//
D1S1656	73,74	40,44	22,04	13,86	21,92	15,97	//
D2S1338	60,95	37,38	41,60	24,13	23,32	14,64	//
Moyenne	74,03	39,60	32,73	22,23	22,37	12,30	//
Max	99,20	49,33	43,86	26,75	28,25	17,02	//
Min	46,53	31,12	22,04	13,86	13,82	5,71	//

Tableau 20 – PHR du mélange du troisième réplica.

Marqueurs	Ratios						
	III 1 : 1	III 1 : 2	III 1 : 3	III 1 : 4	III 1 : 5	III 1 :10	III 1 :20
D3S1358	86,96	38,98	34,51	//	15,60	14,30	3,36
D16S539	90,31	59,86	33,13	//	32,03	12,33	5,76
D8S1179	69,00	44,88	25,17	//	18,65	9,79	3,48
D2S441	76,82	37,78	18,90	//	16,52	7,23	4,02
TH01	71,72	40,96	23,35	//	16,85	9,69	6,10
SE33	86,83	49,94	32,37	//	29,83	13,5	2,42
D10S1248	57,18	40,21	34,45	//	20,53	12,72	2,81
D1S1656	65,79	40,90	22,32	//	16,09	10,84	4,40
D2S1338	77,15	43,69	31,58	//	22,54	12,20	13,17
Moyenne	75,75	44,13	28,42	//	20,96	11,40	5,06
Min	57,18	37,78	18,90	//	15,60	7,23	2,42
Max	90,31	59,86	34,51	//	32,03	14,30	13,17

En se basant sur le calcul du PHR pour les trois réplicas nous avons constaté les résultats suivants :

Pour les trois réplicas du le ratio 1 :1, le PHR est compris entre [46,53% et 99,20%] d'où il est impossible de distinguer entre les deux contributeurs du mélange étant donné que la limite du PHR a été fixée à 41% Pour le second et troisième ratio, le PHR est compris entre [26,76% et 59,86%] et [18,15% à 43,86%] respectivement, cette variation entre les PHR ne permet de distinguer aucune conclusion, quant à la séparation entre les deux contributeurs de ce mélange.

Pour le reste des ratios, 1 :4 à 1 :20, l'analyse du PHR a donné les pourcentages allant de [2,42% à 38,16%] dont inférieur à 41% ce qui permet de conclure qu'à partir du ratio 1 :4, une séparation complète entre les deux contributeurs avec un profil majoritaire et un autre minoritaire.

De manière sommaire, et à la lumière des résultats obtenus, on déduit que le kit GlobalFile™ permet de distinguer entre les deux contributeurs du mélange à partir du

ratio 1 :4 et cela pour les trois répliquas, cependant il est impossible de séparer entre les contributeurs du mélange lors du ratio 1 :1, tandis que pour les ratios 1 :2 et 1 :3 aucune conclusion ne peut être fournie.

Exemple : Calcul des proportions de mélange et PHR dans le cas d'un système de 3 allèles

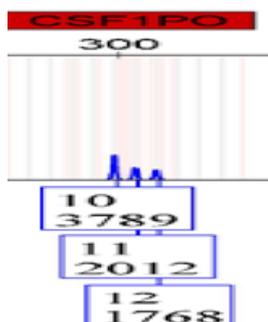


FIGURE 6 – Cas de mélange avec système à 3 allèles

Lors de l'étude d'un mélange de deux contributeurs (à ratio 1 :1) dans le cas d'un système de 3 allèles, on distingue les deux possibilités suivantes :

- Hétérozygote+ Hétérozygote avec un allèle chevauchant,
- Hétérozygote+ Homozygote sans allèle chevauchant.

Tableau 21 – Combinaisons possibles en cas de mélange à 3 allèles.

Combinaisons possibles	Contributeur 1		Contributeur 2			
		PHR	MP		PHR	MP
1	10	//	50,06	11 ; 12	87,87	49,94
2	11	//	26,58	10 ; 12	46,66	73,42
3	12	//	23,36	10 ; 11	53,10	76,64
4	10 ; 11	94,16	51,61	10 ; 12	93,32	48,39
5	10 ; 11	26,55	63,35	11 ; 12	56,90	36,65
6	10 :12	23,33	61,74	11 ; 12	43,94	38,26

D'après les résultats obtenus du PHR et MP, on peut remarquer qu'uniquement deux

combinaisons sont acceptées, il s'agit des combinaisons 1 et 4 car les proportions du mélange sont aux alentours de 50% avec des PHR supérieurs à 41%.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Notre travail s'est porté sur la validation interne du kit GlobalFiler™ sur l'analyseur génétique 3500xL pour l'établissement de profils génétiques, expériences qui se sont déroulées en deux étapes : d'abord l'établissement de profils génétiques de prélèvements de référence de salive pour une sélection des échantillons à analyser, puis une seconde phase proprement dédiée à la validation interne en nous intéressant aux différents paramètres retenus pour la validation, en l'occurrence la répétabilité, la reproductibilité, la détermination du seuil analytique, la sensibilité et l'étude de mélanges. Nous avons ainsi fixé le seuil analytique à 60 RFU en s'appuyant la valeur maximale des RFU observés des contrôles positifs et négatifs, et l'avons par la suite utilisé pour l'évaluation de tous les paramètres.

Nous avons ensuite pu démontrer que le kit était sensible jusqu'à une concentration d'ADN de 125 pg/ μ l, et pouvait donner des profils génétiques partiels exploitables jusqu'à une concentration de 32 pg/ μ l.

Nous nous sommes par ailleurs intéressés à l'étude de la reproductibilité et de la répétabilité de ce kit, où nous avons pu obtenir des profils complets, de bonne qualité et totalement exploitables.

Pour achever les travaux expérimentaux, nous avons étudié le cas d'un mélange d'ADN afin de s'assurer que le kit pouvait être utilisé en cas de présence de plus d'un contributeur, les résultats obtenus ayant démontré qu'il était possible de distinguer entre les contributeurs du mélange à partir d'un ratio de (1 :4) en utilisant un PHR de 41%.

Sur la base de tous les résultats accumulés durant cette étude, le kit GlobalFiler™ s'est avéré extrêmement fiable, génère des profils génétiques de très bonne qualité sur l'analyseur génétique 3500xL, et ce en analysant des ADN provenant d'échantillons de salive.

En perspectives, étant donné que le Département de Biologie de l'INCC utilise surtout

des cartes de prélèvement de salive sur carte FTA®, il serait souhaitable de reprendre cette validation sur ce type d'échantillons, tout en y intégrant d'autres paramètres à tester et à optimiser, telle la possibilité d'utilisation d'un volume réactionnel réduit (7.5 μ l, 5 μ l, voire même 2.5 μ l), en vue de maximiser la rentabilité du kit et ainsi diminuer les coûts et augmenter le nombre de profils pouvant être effectués.

Bibliographie

Bibliographie

- I Aknin-Seifer, R-L Touraine, H Lejeune, J-L Laurent, B Lauras, and R Levy. Évaluation d'une technique simple et rapide de détection de microdélétions du bras long du chromosome y. *Gynécologie obstétrique & fertilité*, 32(1) :34–41, 2004.
- Carina Ema Silva Almeida. *Genetic characterization of the South Portugal population with GlobalFiler™ Express kit-internal validation and forensic applications*. PhD thesis, 2014.
- Antonio Alonso, Pablo Martín, Cristina Albarrán, Pilar García, Oscar García, Lourdes Fernández de Simón, Julia García-Hirschfeld, Manuel Sancho, Concepción de la Rúa, and Jose Fernández-Piqueras. Real-time pcr designs to estimate nuclear and mitochondrial dna copy number in forensic and ancient dna studies. *Forensic Science International*, 139(2-3) :141–149, 2004.
- John S Buckleton, James M Curran, and Peter Gill. Towards understanding the effect of uncertainty in the number of contributors to dna stains. *Forensic Science International : Genetics*, 1(1) :20–28, 2007.
- JM Butler. Recent developments in y-short tandem repeat and y-single nucleotide polymorphism analysis. *Forensic Science Review*, 15(2) :91–114, 2003.
- John M Butler. *Forensic DNA typing : biology, technology, and genetics of STR markers*. Elsevier, 2005.
- John M Butler. *Advanced topics in forensic DNA typing : methodology*. Academic Press, 2011.

-
- John M Butler and CAROLYN R Hill. *Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis*. CRC press, 2012.
- B China, Y Ghafir, and G Daube. Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vét*, 147 : 99–109, 2002.
- Raphaël Coquoz, Jennifer Comte, Diana Hall, Tacha Hicks, and Franco Taroni. *Preuve par l'ADN : la génétique au service de la justice*. PPUR Presses polytechniques, 2013.
- Bernard Dingeon, Marie-Françoise Dreyfuss, Yvan Gaillard, Anne Le Bouil, Michel Lhermitte, Stéphanie Mazzega, Mustapha Moulisma, Gilbert Pépin, Martine Perrin, Jocelyne Plesse, et al. Aide à la validation des méthodes en toxicologie et suivi thérapeutique pharmacologique. In *Annales de Toxicologie Analytique*, volume 17, pages 1–20. EDP Sciences, 2005.
- Albert Edwards, Andrew Civitello, Holly A Hammond, and C Thomas Caskey. Dna typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American journal of human genetics*, 49(4) :746, 1991.
- Frédéric Fernandez, Anne Schneider, Marie-Pierre Gaub, Véronique Lindner, Pierre Oodet, Hervé Lang, Christian Saussine, and Didier Jacqmin. Intérêt de l'analyse des microsatellites urinaires dans le diagnostic du cancer du rein. *Progrès en urologie*, 16(4) :429–434, 2006.
- I Findlay, A Taylor, P Quirke, R Frazier, and A Urquhart. Dna fingerprinting from single cells. *Nature*, 389(6651) :555, 1997.
- Thermo Fisher. Globalfiler™ pcr amplification kit user guide scientific. 2016.
- Françoise Fridez and Raphaël Coquoz. Pcr dna typing of stamps : evaluation of the dna extraction. *Forensic science international*, 78(2) :103–110, 1996.
- Dan Frumkin, Adam Wasserstrom, Ariane Davidson, and Arnon Graft. Authentication of forensic dna samples. *Forensic science international : genetics*, 4(2) :95–103, 2010.

- Inman K et Krane DE Gilder JR, Doom TE. Limites spécifique de la détection et la quantification pour les tests d'adn basés sur les str. *J Forensic Sci*, 52 :97–101, 2007.
- Véronique Gilliquet. *Biologie 6e-Manuel : Sciences générales (2 pér./sem.)*. De Boeck, 2009.
- William Goodwin, Adrian Linacre, and Sibte Hadi. *An introduction to forensic genetics*, volume 2. John Wiley & Sons, 2011.
- ENFSI DNA Working Group et al. Recommended minimum criteria for the validation of various aspects of the dna profiling process, 2010.
- Revised Validation Guideline. Scientific working group on dna analysis methods (swgdam). *Forensic Science Communications*, 6(3).
- Jean-Pierre Henry. *Précis de génétique des populations*. Dunod, 1999.
- Lawrence F Kobilinsky, Thomas F Liotti, Jamel Oeser-Sweat, et al. *DNA : Forensic and legal applications*. Wiley Online Library, 2005.
- Daniela Pereira Lima, Diego Garcia Diniz, Suzely Adas Saliba Moimaz, Doris Hissako Sumida, and Ana Claudia Okamoto. Saliva : reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(3) :e184–e188, 2010.
- A Mansuet-Lupo, P Rouger, and V Van Huffel. Les empreintes génétiques : état de l'art en 2007, techniques, applications et législation. *Transfusion clinique et biologique*, 14 (3) :334–342, 2007.
- Luque G Farfan MJ et Alsoso A Martin P, De Sinon LF. Amélioration de l'échange de données adn. etude de validation sur un seul kit str à 6 colorants comprenant 24 loci. *Forensic Suiter Genet*, 13 :67–78, 2014.
- Jon J Nordby, Stuart H James, and JJ Nordby. *Forensic Science : An Introduction to Scientific and Investigative Techniques*. CRC Press, 2005.

- OIN. Iso/iec 17025 : 2005, exigences générales concernant les compétences des laboratoires d'étalonnages et d'essais. <https://www.iso.org/fr/standard/39883.html>, page consulté le 12/02/2019, 2005.
- Elizabet Petkovski. *Polymorphismes ponctuels de séquence et identification génétique : Etude par spectrométrie de masse MALDI-TOF*. PhD thesis, Strasbourg 1, 2006.
- Mike Redmayne, Paul Roberts, Colin Aitken, and Graham Jackson. Forensic science evidence in question. *Criminal Law*, 2011.
- Peter M Schneider. Basic issues in forensic dna typing. *Forensic science international*, 88 (1) :17–22, 1997.
- L Stryer. *Biochimie*. Freeman and company, New York, Stanford University, 1992.
- Katie L Swango, Mark D Timken, Mavis Date Chong, and Martin R Buoncristiani. A quantitative pcr assay for the assessment of dna degradation in forensic samples. *Forensic science international*, 158(1) :14–26, 2006.
- R Szibor, M Krawczak, S Hering, J Edelmann, E Kuhlisch, and D Krause. Use of x-linked markers for forensic purposes. *International journal of legal medicine*, 117(2) :67–74, 2003.
- Phuvadol Thanakiatkrai, Thitika Kitpipit, Rockey Gupta, Susheel Sharma, Ilknur Babahan, Esin Poyrazoglu Coban, Halil Biyik, Khoshnood Alizadeh, Jaime A Teixeira da Silva, Ales Babnik, et al. Current str-based techniques in forensic science. *Maejo Int. J. Sci. Technol*, 7 :1–15, 2013.
- G Tringali, A Barbaro, E Insirello, P Cormaci, and AM Roccazzello. Rapid and efficacious real-time quantitative pcr assay for quantitation of human dna in forensic samples. *Forensic science international*, 146 :S177–S181, 2004.
- John C Whittaker, Roger M Harbord, Nicola Boxall, Ian Mackay, Gary Dawson, and Richard M Sibly. Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics*, 164(2) :781–787, 2003.

Annexes

Annexe 1 : Tableau illustrant un exemple de nomenclature des STRs.

Nomenclature des STRs faisant partie de la région génique (D5S818)	Nomenclature des STRs faisant partie de la région non génique (TH01)
-D : l'ADN ; - 5 : chromosome 5 ; - S : est dédié à séquence d'ADN unique ; -818 : caractère unique au locus.	-TH : tyrosine hydroxylase humaine ; -01 : la région de répétition en question est située à l'intérieur de l'intron 1.

Annexe 2 : Tableau descriptif des marqueurs STRs inclus dans le kit GlobalFiler™, leur localisation chromosomique, colorant associé et la couleur émise par le colorant.

Marqueur STR	Localisation chromosomique	Colorant associé	Couleur émise par le colorant
D3S1358	2p21.31	6-FAM™	Bleu
vWA	12p13.31		
D16S539	16q24.1		
CSF1PO	5q33.3-34		
TPOX	2p23-2per		
Y indel	Yq11.221	VIC™	Vert
Amélogénine	X : p22.1-22.3, Y : p11.2		
D8S1179	8q24.13		
D21S11	21q11.2.2-q21		
D18S51	18q21.33		
DYS391	Yq11.21	NED™	Jaune
D2S441	2p14		
D19S433	19q12		
TH01	11q15.5		
FGA	4q28		
D22S1045	22q13.3	TAZ™	Rouge
D5S818	5q21-31		
D13S317	13q22-31		
D7S820	7q11.21-22		
SE33	6q14		
D10S1248	10q26.3	SID™	Violet
D1S1656	1q42.2		
D12S391	12p13.2		
D2S1338	2q35		

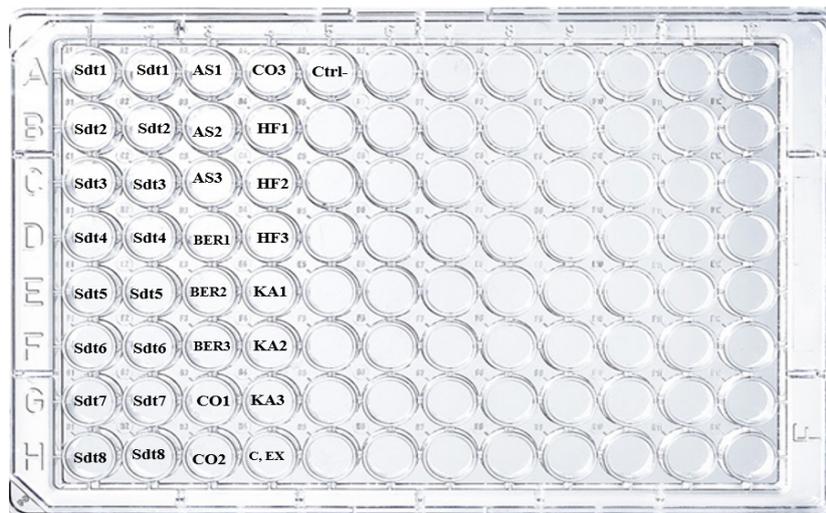
Annexe 3 : Tableau descriptif des composants du kit Globalfiler™.

Composants du kit	Composition
<i>GlobalFiler™ Master Mix</i>	une enzyme, des sels, des dNTP, du sérum albumine du bovine, une enzyme et de l'acide de sodium à 0,05% dans du tampon et du sel.
<i>GlobalFiler™ Primer Set</i>	contient les amorces forward et reverse pour l'amplification des cibles de l'ADN humain.
<i>GlobalFiler™ Allelic Ladder</i>	contient des allèles amplifiés.
<i>DNA Control 007</i>	Contient 0,1 ng/μL d'ADN génomique masculin et humain de la lignée cellulaire dans 0,05% d'azoture de sodium et un tampon.

Annexe 4 : Tableau récapitulatifs des équipements, réactifs et consommables utilisés dans chaque étape.

Etapes	Equipements	Réactifs et solutions	Consommables
Extraction	-Centrifugeuse Heraeus™ Pico ; -Bloc chauffant Grant Instruments™ ; - Vortex VWR™ ; - Portoirs.	- Protéinase K à 20% ; - Chelex à 5%.	
Quantification	- ABI™ 7500 Real-Time PCR System ; - Vortex VWR™ ; - Centrifugeuse pour plaques Heraeus™ Labofuge™ ; - Portoirs.	Kit ABI™ Quantifiler™ Human composé de : - ABI™ Quantifiler™ Human Primer Mix ; - ABI™ Quantifiler™ PCR Reaction Mix ; - ABI™ Quantifiler™ Human DNA Standard ; -Eau ultra pure.	-Gants ; -Charlottes ; -Bavettes ; -Micro-tubes « Eppendorff » (1.5ml, 0.6ml, 0.2ml) ; -Tips « Eppendorff » (1ml, 0.2ml, 0.1ml, 0.01ml) ; -Plaque RT-PCR à 96 puits ; -Film adhésif spécial pour recouvrir la plaque RT-PCR.
Amplification	- Thermocycler ABI™ Veriti™ 96-Well; -Centrifugeuse Heraeus™ Labofuge™; - Vortex VWR™ ; - Portoirs.	Kit ABI™ GlobalFiler™ PCR Amplification Kit composé de : - ABI™ GlobalFiler™ Master Mix; - ABI™ GlobalFiler™ Primer Set; - ABI™ DNA Control 007 ; -Eau ultra pure.	
Electrophorèse capillaire	- Séquenceur génétique ABI™ 3500xL Genetic Analyzer ; - Logiciel Gene Mapper™ ID-X v1.5; -Thermocycleur ABI™ Veriti 96well thermal cyler. - Bain à sec chauffant QBD2 Grant ; - Bloc refroidisseur SUB28 Grant ; - 96-Well Silicone Septa Mat.	- ABI™ GlobalFiler™ Allelic Ladder; -GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0; -Hi-Di™ Formamide.	

Annexe 5 : Plan de la plaque RT-PCR pour la quantification d'ADN



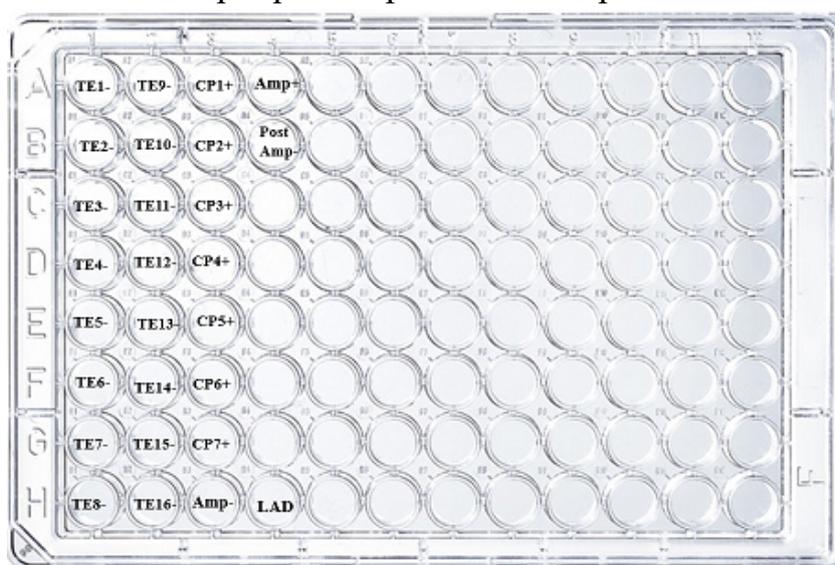
Annexe 6 : Tableau représentant le programme d'amplification par PCR

Phase d'incubation initiale	29 Cycles		Extension finale
	Dénaturation	Extension	
95 °C, 1 Minute	94°C, 10 Secondes	59°C, 90 Secondes	60 °C, 10 minutes

Annexe 7 : Plan de la plaque des produits PCR des échantillons sélectionnés.



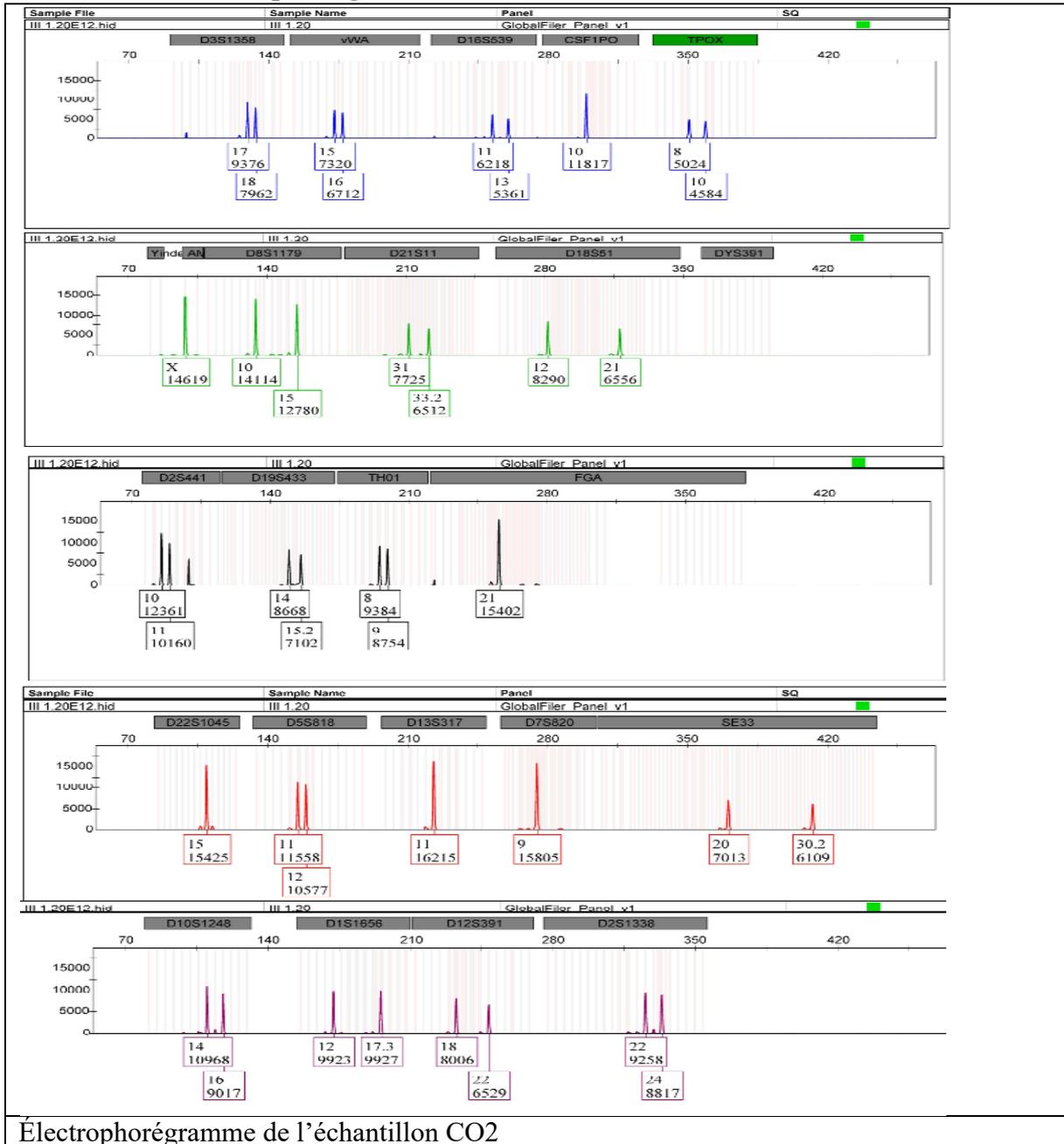
Annexe 8 : Plan de la plaque des produits PCR pour le seuil analytique.



Annexe 9 : Tableau représentant les dilutions d'ADN pour le paramètre sensibilité.

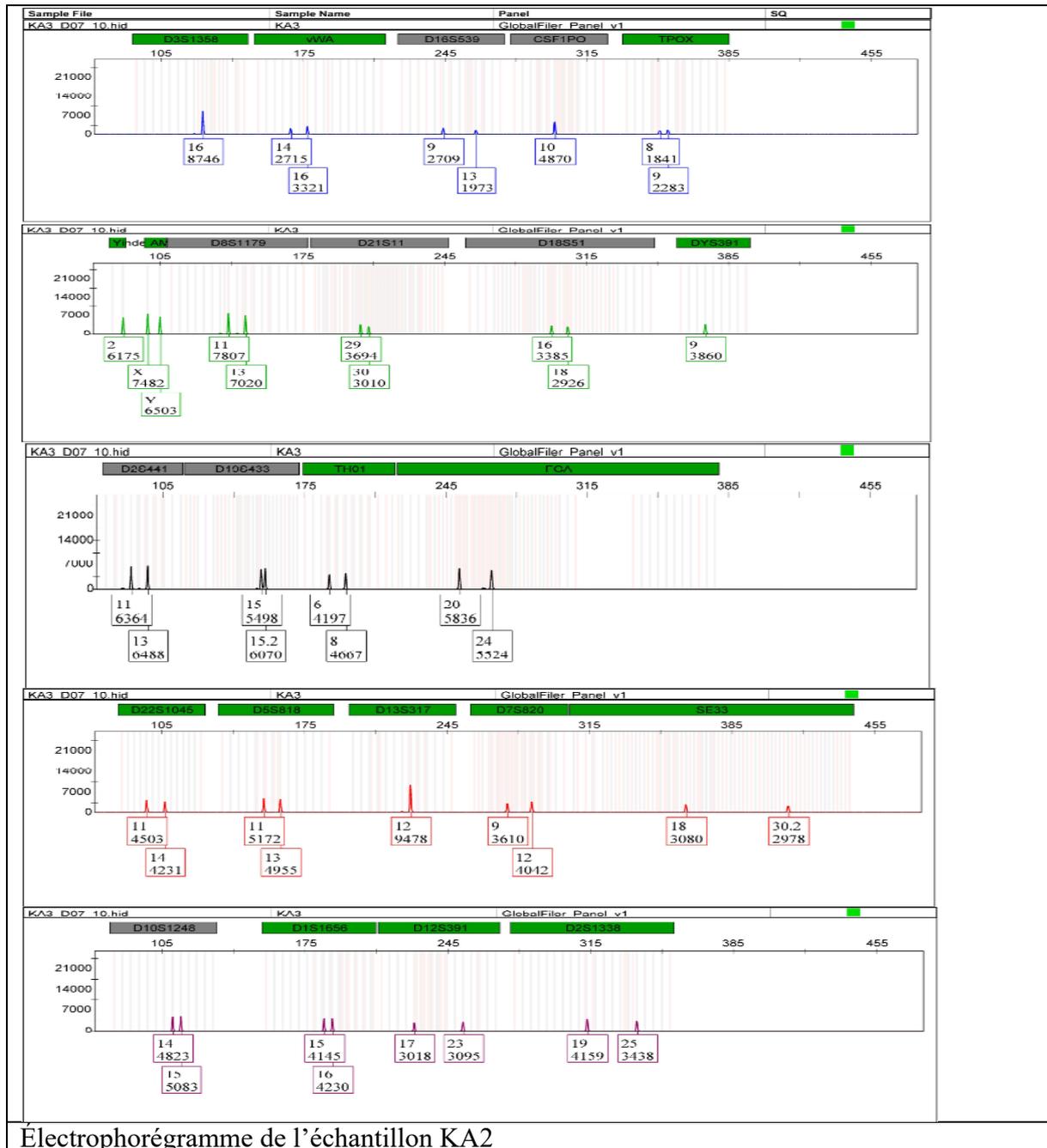
Echantillon	Dilution	Concentration finale ng/ μ l.	Facteur de dilution
D1	66 μ l ADN contrôle +33 μ l d'eau ultra- pure	0,06667	2/3
D2	50 μ l eau ultra-pure +50 μ l D1	0,03334	1/2
D3	50 μ l eau ultra-pure +50 μ l D2	0,01667	1/2
D4	50 μ l eau ultra-pure +50 μ l D3	0,00833	1/2
D5	50 μ l eau ultra-pure +50 μ l D4	0,00417	1/2
D6	50 μ l eau ultra-pure +50 μ l D5	0,00208	1/2
D7	50 μ l eau ultra-pure +50 μ l D6	0,00104	1/2
D8	50 μ l eau ultra-pure +50 μ l D7	0,00052	1/2
D9	50 μ l eau ultra-pure +50 μ l D8	0,00026	1/2

Annexe 13 : Électrophorégramme de l'échantillon CO2.



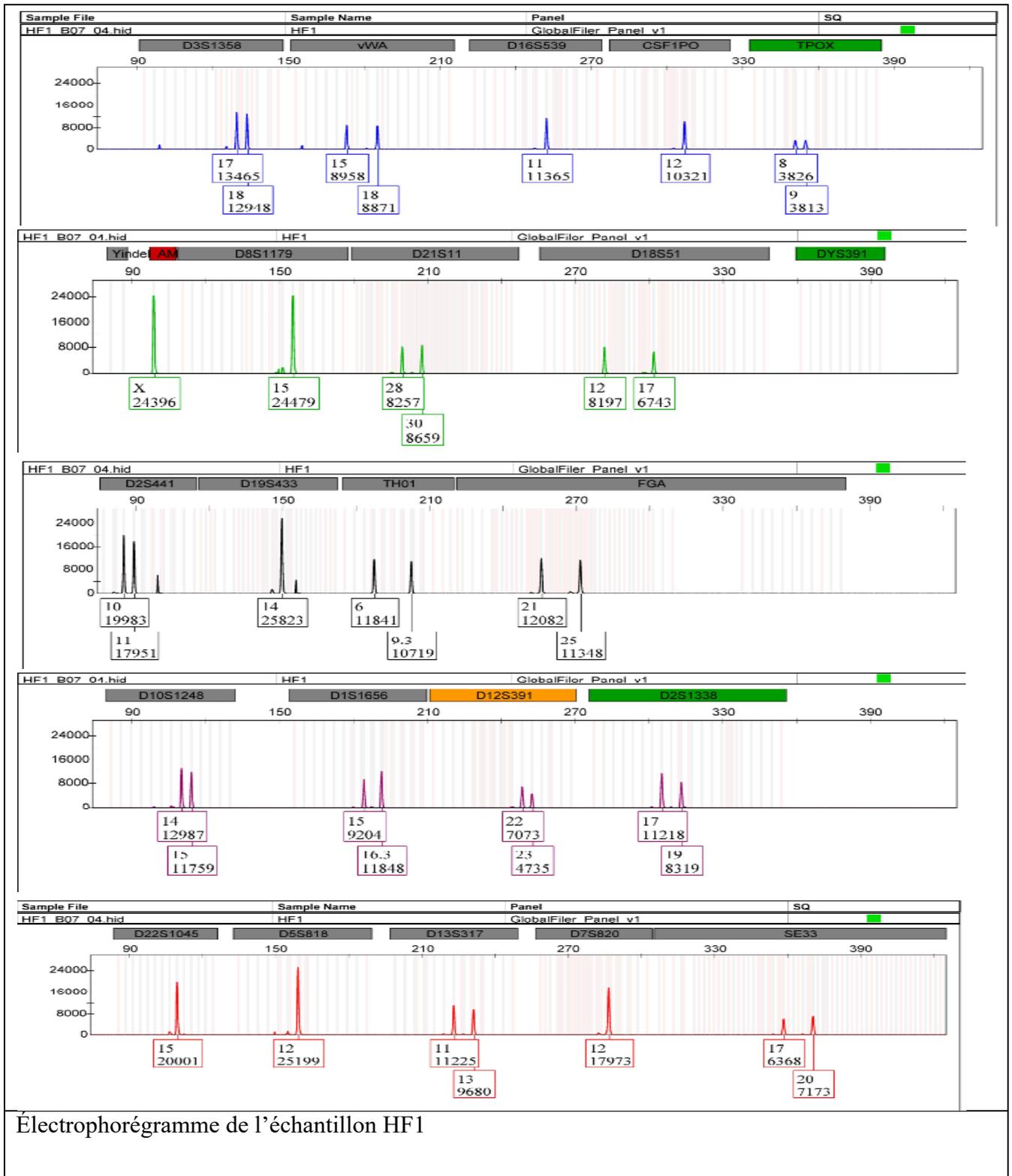
Electrophorégramme de l'échantillon CO2

Annexe 14 : Électrophorégramme de l'échantillon KA2.

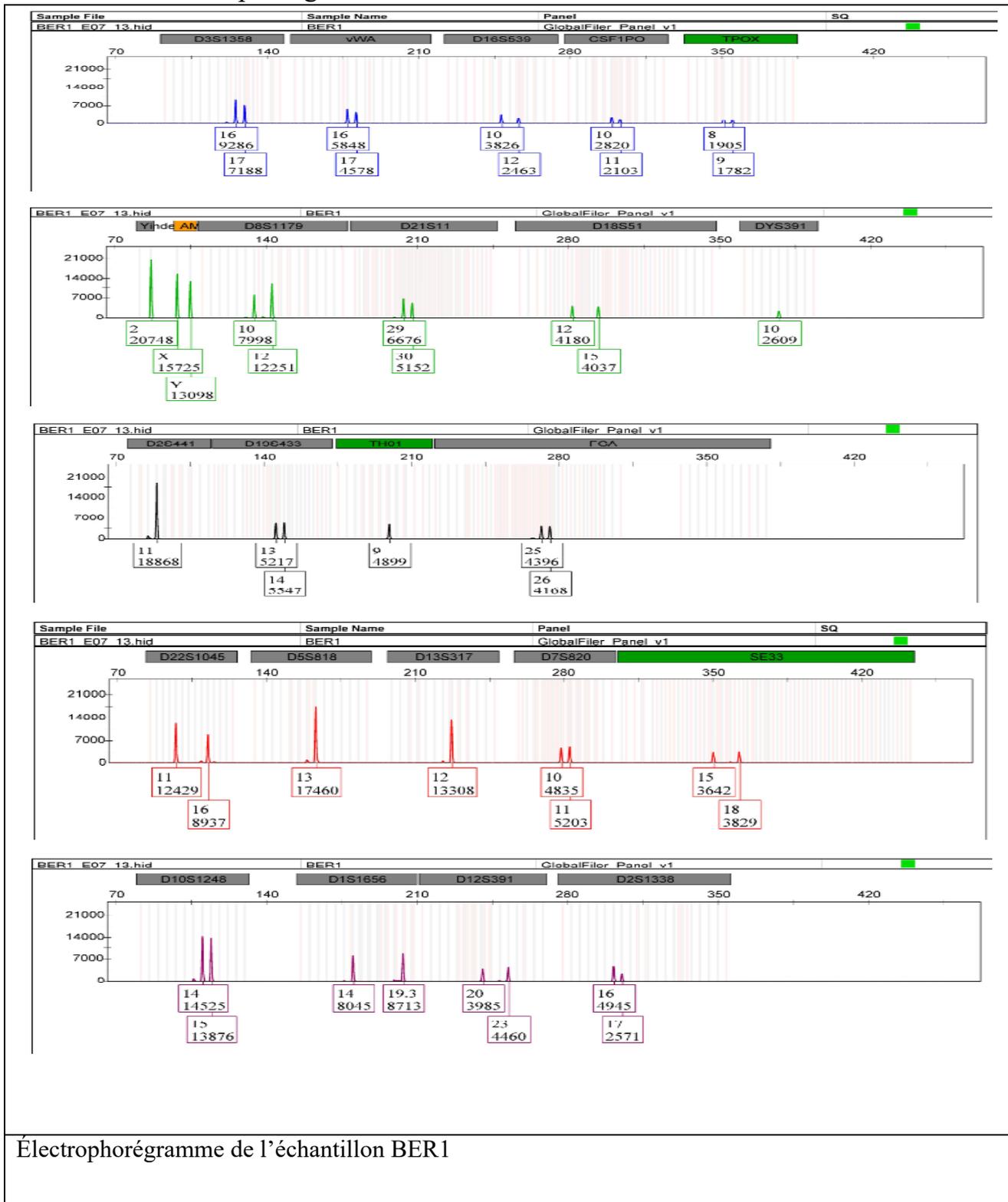


Électrophorégramme de l'échantillon KA2

Annexe 15 : Électrophorégramme de l'échantillon HF1.

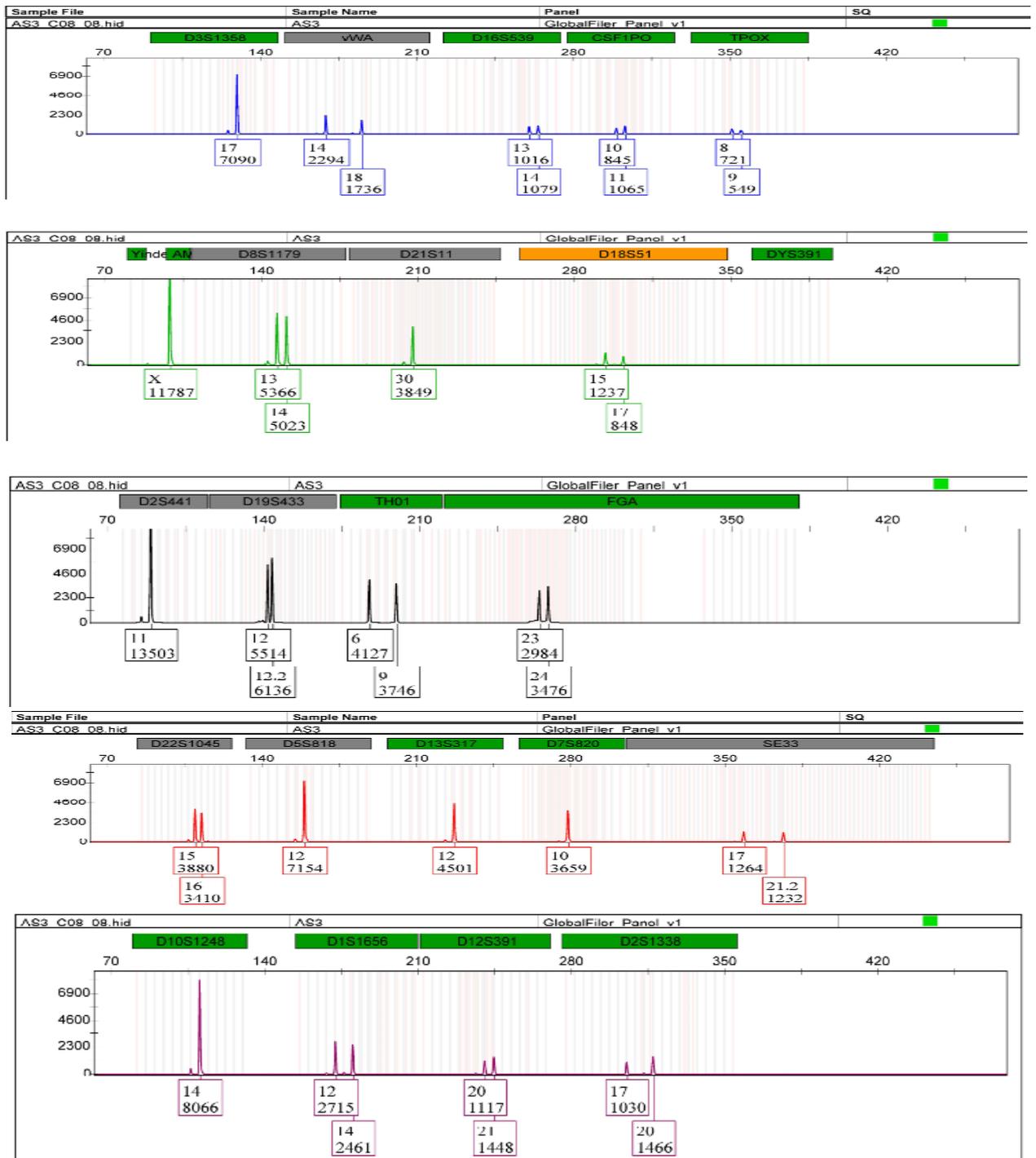


Annexe 16 : Électrophorégramme de l'échantillon BER1.



Électrophorégramme de l'échantillon BER1

Annexe 17 : Électrophorégramme de l'échantillon AS3.



Électrophorégramme de l'échantillon AS3

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تلبية متطلبات معيار ISO 17025 لاستخدام مجموعات التضخيم الجديدة، وهي مجموعة التضخيم البشري *GlobalFiler™* التي تتكون من 24 موضعاً (تضخيم واحد في 80 دقيقة، في 29 دورة وفقاً لتوصيات المورد)، باستخدام محلل جيني 3500xL. للقيام بذلك، تم تقييم العديد من المعايير ذات الصلة، تم الوصول إلى النتائج التالية: العتبة التحليلية المحددة في RFU60، مكنت دراسة الحساسية من الحصول على بصمة وراثية كاملة إلى غاية كمية حمض النووي مقدر بـ 125 بيكوغرام، مع منطقة العشوائية التي تقدر بـ RFU230، ونسبة علو المنحنيات (PHR) بـ 41٪ باعتباره معيار مهم للغاية في حالة دراسة مزيج الحمض النووي والذي يشكل واحد من المعايير المتحقق من صحتها. في الأخير، فإن إمكانية فصل مزيج من الحمض النووي إلى مساهم بنسبة عالية ومساهم بنسبة قليلة لن يكون ممكناً إلا انطلاقاً من نسبة 1:4. في الختام، وبناءً على النتائج المستخلصة بالإضافة إلى جودة البصمات الوراثية التي تم الحصول عليها من خلال دراسة التحقق، فإننا نستنتج أن هذه المجموعة ذات جودة عالية.

كلمات مفتاحية: مجموعة التضخيم البشري *GlobalFiler™*، محلل جيني 3500xL™، الوحدات القصيرة المتكررة بانتظام (STR)، دراسة التحقق، البصمة الوراثية.

Résumé

Cette étude de validation avait pour but de répondre aux exigences de la norme ISO 17025 en ce qui concerne l'utilisation de nouveaux kits d'amplification, à savoir le kit d'amplification humaine *GlobalFiler™* en une seule amplification PCR de 24 loci selon les recommandations du fournisseur, en employant l'analyseur génétique 3500xL™. Pour valider ce kit, plusieurs critères pertinents ont été évalués, générant des résultats importants : un seuil analytique fixé à 60 RFU, une étude de sensibilité permettant l'obtention de profils génétiques complet jusqu'à une quantité d'ADN de 125 pg, en sus d'une zone stochastique estimée à 230 RFU et un PHR à 41%, qui se sont avérés intéressants dans le cas d'étude de mélanges d'ADN, qui constituait aussi l'un des paramètres validés. Il a d'ailleurs pu être montré qu'il n'était possible d'individualiser un mélange d'ADN en contributeur majoritaire et contributeur minoritaire qu'à partir du ratio 1:4. Toutes ces données soulignent donc les excellentes performances du kit *GlobalFiler™*.

Mots-clés : Kit *GlobalFiler™*, Analyseur génétique 3500xL™, Short Tandem Repeats, Validation interne, Profils génétiques.

Summary

The purpose of this validation study was to meet the requirements of ISO 17025 for the use of new amplification kits, namely the *GlobalFiler™* human amplification kit in a single PCR amplification of 24 loci according to the supplier's recommendations, using the 3500xL™ genetic analyzer. To validate this kit, several relevant criteria were evaluated, generating important results : an analytical threshold set at 60 RFU, a sensitivity study allowing to obtain complete genetic profiles up to a quantity of DNA of 125 pg, as well as a stochastic zone estimated at 230 RFU and a PHR at 41%, which proved interesting in the case of study of DNA mixtures, which was also one of the validated parameters. Thus, it has been shown that it was possible to individualize a mixture of DNA, as major contributor and minor contributor only from the ratio 1:4. All these data highlight the excellent performance of the *GlobalFiler™* kit.

Keywords : *GlobalFiler™* kit, 3500xL™ genetic analyzer, Short Tandem Repeats, Internal validation, Genetic profiles.