

MISE EN PLACE D'UNE CHAINE DE PRODUCTION POUR L'EXPERTISE GENETIQUE EN GRAND NOMBRE DES DOSSIERS DE PETITES ET MOYENNES DELINQUANCES

Mathieu Artier

▶ **To cite this version:**

Mathieu Artier. MISE EN PLACE D'UNE CHAINE DE PRODUCTION POUR L'EXPERTISE GENETIQUE EN GRAND NOMBRE DES DOSSIERS DE PETITES ET MOYENNES DELINQUANCES. Génétique. 2017. hal-01656741

HAL Id: hal-01656741

https://ephe.hal.science/hal-01656741

Submitted on 12 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

ARTIER Mathieu

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

MISE EN PLACE D'UNE CHAINE DE PRODUCTION POUR L'EXPERTISE GENETIQUE EN GRAND NOMBRE DES DOSSIERS DE PETITES ET MOYENNES DELINQUANCES

soutenu le 29 novembre 2017 devant le jury suivant :

GARDIE Betty (MC, EPHE)	**– Président**
PASCAL Olivier (Dr, I.F.E.G.)	**– Tuteur scientifique**
NEILDEZ Thi My Anh (MC, EPHE)	**– Tuteur pédagogique**
HUMBERT Marc	**– Rapporteur**
BARTHOLINI Claire	**– Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de :
Dr PASCAL Olivier
Institut Français des Empreintes Génétiques, NANTES
Président : *Dr PASCAL Olivier*

et de

Dr. NEILDEZ Thi My Anh
INSERM UMR S951, EPHE, Généthon, EVRY
Directeur : *GALY Anne*
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS **7**

RÉSUMÉ **8**

1. INTRODUCTION **9**
1.1. Les enquêtes judiciaires **9**
1.1.1. Les délits et les crimes 9
1.1.2. L'enquête préliminaire 9
1.1.3. L'ouverture de l'instruction 10
1.2. Le Travail de Police Technique et Scientifique (PTS) **10**
1.2.1. Les premières constatations 10
1.2.2. L'analyses des indices découverts sur une scène de crime 10
1.2.3. Les sciences utilisées dans un contexte judiciaire 10
1.3. Le laboratoire IFEG **11**
1.3.1. Historique 11
1.3.2. Sa mission 12
1.3.3. Les analyses proposées par le laboratoire 12
1.4. Le projet de mise en place d'une chaine automatisée **13**
1.4.1. Les affaires de PMD (Petites et Moyennes Délinquances) 13
1.4.2. Le contexte administratif 14
1.4.3. Mes objectifs 14
1.4.4. Les paramètres de l'appel d'offre 15

2. MATERIELS ET METHODES **18**
2.1. L'élaboration du processus analytique **18**
2.1.1. Les prélèvements 18
1. Principe 18
2. La méthodologie actuelle 19
3. Les points de difficultés 21
4. Les modifications apportées à la méthodologie 21
2.1.2. L'extraction de l'ADN 26
1. Principe 26
2. La méthodologie actuelle 26
3. Les points de difficultés 27
4. Les modifications apportées à la méthodologie 29
2.1.3. La quantification de l'ADN 30
1. Principe 30
2. La méthodologie actuelle 31
3. Les points de difficultés 34
4. Les modifications apportées à la méthodologie 34
2.1.4. Amplification de l'ADN par PCR 35
1. Principe 35
2. La méthodologie actuelle 36
3. Les points de difficultés 37
4. Les modifications apportées à la méthodologie 38
2.1.5. Electrophorèse capillaire des produits de PCR 38
1. Principe 38
2. La méthodologie actuelle 38
3. Les points de difficultés 40
4. Les modifications apportées à la méthodologie 41
2.1.6. Production des résultats 42
2.1.7. Dépôts d'extraits d'ADN et destruction 46

2.2. Les besoins en équipements 47
2.2.1. Matériels nécessaire à l'extraction 47
2.2.2. Matériels nécessaire à la quantification 48
2.2.3. Matériels nécessaire à l'amplification par PCR 49
2.2.4. Matériels nécessaire à l'électrophorèse capillaire 50
2.3. Les Ressources Humaines 51
2.3.1. Les besoins en personnel 51
2.3.2. La formation du nouveau personnel 53
2.3.3. La gestion des absences 57
2.3.4. L'analyses des coûts 58
2.4. Organisation du travail au quotidien 60
2.4.1. Le système existant 60
2.4.2. Le système spécifique à une chaine automatisée 61
2.5. Intégration dans le Système Qualité de la chaine automatisée 63
2.5.1. Pourquoi s'intégrer dans une démarche qualité ? 63
2.5.2. Comment faire rentrer ce nouveau processus dans l'accréditation COFRAC déjà en place au laboratoire ? 65
2.6. L'outil informatique (LIMS) 66
3. RESULTATS 69
3.1. Variation du nombre de dossier à traiter 69
3.2. Le processus analytique 70
3.2.1. La validation de la nouvelle technique d'extraction de l'ADN 70
1 Limite de détection en PCR de nos échantillons 70
2 Sensibilité 71
3 Répétabilité 74
4 Reproductibilité 75
5 Contamination entre les échantillons 77
6 Validation sur des échantillons de Traces 80
3.2.2. L'adaptation des techniques déjà en place 88
3.3. Les ressources 90
3.3.1. Optimisation des espaces de travail 91
3.3.2. L'utilisation de matériel en commun avec le reste de la production 93
3.3.3. Continuité des formations du personnel 95
3.4. Quelques statistiques de rendu de résultat 96
4. DISCUSSIONS, PERSPECTIVES 98
5. BIBLIOGRAPHIE 102
6. ANNEXES 103

FIGURES

Figure 1 : les étapes du prélèvement..... 19
Figure 2 : L'enregistrement des prélèvements dans le LIMS Technique..... 20
Figure 3 : Organisation d'une journée typique d'extraction d'ADN à l'aide du kit DNA IQ™ Casework Pro et de l'automate Maxwell® 16 Forensic Instrument 30
Figure 4 : Principe de la quantification de l'ADN par PCR en temps réel 33
Figure 5 : Principe de l'amplification de l'ADN par PCR 35
Figure 6 : Exemples de résultats : 42
Figure 7 : Schéma de production des rapports d'expertises..... 45
Figure 8 : Plan de plaque d'une quantification..... 48
Figure 9 : Plan de plaque d'une amplification de l'ADN par PCR 50
Figure 10 : Module « Cahier de Laboratoire du LIMS Technique..... 68
Figure 11 : arrivés des dossiers par jour durant le mois de Mai 2012..... 69
Figure 12 : Test de Sensibilité – cellules épithéliales : Profil obtenu à la dilution 1/80 72
Figure 13 : Test de Sensibilité – cellules épithéliales : Profil obtenu à la dilution 1/100 73
Figure 14 : Test de contamination intra run –Electrophorégramme de l'essai 42 80
Figure 15 : Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – Profil montrant un mélange d'ADN 82
Figure 16 : Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – profils montrant des pics surnuméraires (échantillon TR9)..... 83
Figure 17 : Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme - Intensités moyennes des profils 84
Figure 18 : Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – Profils de l'échantillon TR2 85
Figure 19 : Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – Profils de l'échantillon TR3 85
Figure 20 : Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – Profils de l'échantillon TR10 86
Figure 21 : Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – Profils de l'échantillon TR5 87
Figure 22 : Schéma d'organisation de la pièce « PRET2 » 92
Figure 23 : Schéma d'organisation de la pièce « PRET1 » 93
Figure 24 : Synoptique d'une journée du poste QPCR/PCR/Génotypage..... 94
Figure 25 : Nombre d'analyses réalisées par mois en fonction du type de scellés (EC/Objets)..... 96

TABLEAUX

Tableau 1 : Répartition du nombre d'échantillon à traiter quotidiennement..... 15
Tableau 2 : Liste des locus à analyser dans le cadre du Marché..... 16
Tableau 3 : Prélèvements PMD à effectuer selon le type de support..... 24
Tableau 4 : Phrases type pour le descriptif du prélèvement selon le type de support 25
Tableau 5 : Comparaison entre les 2 méthodes d'extraction 27
Tableau 6 : Comparaison entre les différentes techniques de quantification de l'ADN 32
Tableau 7 : Liste des locus du kit PowerPlex®16 HS 36
Tableau 8 : Recommandations pour l'interprétation des électrophorégrammes 46
Tableau 9 : Mesure du temps pris par un technicien pour chacune des étapes du processus analytique 52
Tableau 10 : Critères d'habilitation des Techniciens 57
Tableau 11 : Coûts des différentes étapes du processus analytique 59
Tableau 12 : Définition du nombre minimum d'échantillon pour permettre la réalisation de la manipulation 59
Tableau 13 : Nombre d'entrées durant les 6 premiers mois du Marché..... 69
Tableau 14 : Test de Reproductibilité – principe des conditions de variations 76
Tableau 15 : Test de contamination intra-run – préparations des essais..... 78
Tableau 16 : Test de contamination intra-run – Résultats de la quantification..... 79
Tableau 17 : Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – Liste des prélèvements..... 81
Tableau 18 : Pourcentages de résultats positifs par type de scellés et par mois 97

ANNEXES

Annexe 1 : Modèle d'un rapport d'expertise 103
Annexe 2 : Résultat du Tests sur la Limite de Détection..... 104
Annexe 3 : Test de Sensibilité – Dilutions réalisées par matrice..... 106
Annexe 4 : Test de Sensibilité – Résultat Génotypage pour le sang..... 106
Annexe 5 : Test de Sensibilité – Résultat Génotypage pour les cellules épithéliales 107
Annexe 6 : Test de Répétabilité – Dilutions réalisées par matrice 108
Annexe 7 : Test de Répétabilité – Quantité d'ADN pour le sang..... 108
Annexe 8 : Test de Répétabilité – Quantité d'ADN pour les cellules épithéliales... 108
Annexe 9 : Test de Reproductibilité –Résultats de la quantification pour les 2 matrices analysées..... 109
Annexe 10 : Contamination intra-run – Profils obtenus après la PCR, suivi de l'électrophorèse capillaire 110

Liste des abréviations :

ADN : Acide Désoxyribonucléique

BTS : Brevet de Technicien supérieur

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CQI : Contrôle Qualité Interne

DUT : Diplôme Universitaire de Technologie

Eau ppi : Eau pour préparation injectable

EPI : Équipement de protection individuelle

FL : Fluorescéine

FNAEG : Fichier National Automatisé des Empreintes Génétiques

FTA : Fast Technology for Analysis

GAV : Garde A Vue

IFEG : Institut Français des Empreintes Génétiques

LIMS : Laboratory Information Management System

MAL : Marqueur allélique

NHEK : Normal Human Epidermal Keratinocyte

NTC : Negative Template Control

Op. : Opérateur

PB : Paire(s) de base(s)

PCR : Réaction de Polymérisation en chaîne

PMD : Petites et Moyennes Délinquances

PTS : Police Technique et Scientifique

QPCR : PCR Quantitative

Qt. : Quantité

RFU : Unité de fluorescence relative

SCPPB : Service Central de Préservation des Prélèvements Biologiques

STR : Séquence Répétée en Tandem

TGI : Tribunal de Grande Instance

TMR : Tamra

UV : Ultra-Violet

VS. : Versus

REMERCIEMENTS

Tout d’abord je tiens à remercier ma direction, de m’avoir fait suffisamment confiance pour me confier cette tâche et pour m’avoir épaulé dans les moments de difficultés.

Je remercie également le Dr NEILDEZ pour sa patience à mon égard et pour m’avoir guidé ces dernières années afin que je puisse présenter et soutenir ce mémoire.

Enfin, je remercie ma famille, pour m’avoir soutenu tout au long de ces années.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

MISE EN PLACE D'UNE CHAINE DE PRODUCTION POUR L'ANALYSE EN GRAND NOMBRE DES DOSSIERS DE PETITES ET MOYENNES DELINQUANCES

ARTIER Mathieu

RÉSUMÉ

L'Institut Français des Empreintes Génétiques est un laboratoire qui réalise des expertises génétiques à la demande du Ministère de la Justice. Depuis sa création, le laboratoire s'est spécialisé dans l'analyse d'affaires criminelles comme des homicides. Ce type d'affaires nécessite la mise en œuvre de tous les moyens possible à sa disposition, pour faire avancer l'enquête ; d'autres types d'affaires, les affaires délictuelles, de gravité moindre que les crimes, peuvent pour des raisons financières ne pas pouvoir bénéficier des mêmes services. D'autant que les délits représentent un plus grand nombre d'affaires que celui des crimes. Pour ces raisons financières, les expertises ADN (Acide Désoxyribonucléique) dans le cadre des délits ne sont, soit non effectuées, soit effectuées par les laboratoires de Police ou celui de la Gendarmerie. En conséquence de cela, ces laboratoires sont saturés et accumulent du retard dans leurs analyses. Le Ministère de la Justice décide alors d'établir un appel d'offre afin de réaliser des analyses ADN pour ces dossiers, permettant ainsi de soulager les laboratoires de la Police et de la Gendarmerie, et espère ainsi diminuer le coût ainsi que le délai de réalisation de ces analyses.

Pour répondre à cet Appel d'offre, notre laboratoire a dû remettre en question son processus analytique, car celui qui est en place, l'a été pour traiter avec le plus grand soin un nombre modéré d'analyses. Le traitement en masse dans notre processus actuel ne pouvait répondre aux critères de l'Appel d'offre, aussi bien en terme de délai qu'en terme de coût. Le laboratoire décida alors de définir et de mettre en place une chaine automatisée dont le but sera de traiter la masse importante d'échantillons.

Dans ce contexte, le laboratoire me confia la responsabilité de la mise en place de la partie technique de cette chaine automatisée, avec pour but de définir le processus analytique, les ressources en matériels et en personnel nécessaire, de définir l'organisation spécifique à cette chaine et d'intégrer cette chaine dans notre système qualité. Puis dans le cas de l'obtention d'un des lots, de m'assurer que les analyses se dérouleront dans les conditions déterminées, afin de rendre les résultats selon les engagements du laboratoire en terme de qualité des analyses, ainsi qu'en terme de délais impartis.

MOTS-CLÉS : Affaires criminelles, Délits, Appel d'Offre, Chaine automatisée, Empreintes Génétiques, Analyse en masse

1. Introduction

1.1. Les enquêtes judiciaires

1.1.1. Les délits et les crimes

Une enquête judiciaire est ouverte lorsqu'une infraction(1) à la Loi est constatée. Les infractions peuvent être de trois types : Les contraventions, les délits et les crimes. Le premier de ces types, les contraventions étant des infractions mineures, leurs auteurs n'encourent pas de peine de prison et ne nécessite pas d'effectuer des analyses ADN, contrairement aux 2 autres types d'infractions. Les délits sont des infractions d'importance intermédiaire entre les contraventions et les crimes, l'auteur d'un délit peut encourir jusqu'à 10 ans d'emprisonnement. Les crimes sont les infractions les plus graves, dont leurs auteurs peuvent encourir la réclusion à perpétuité.

Que ce soit pour des délits ou des crimes, la gravité des infractions et les peines encourues par les auteurs, nécessite que notre système judiciaire mette tout en son pouvoir pour permettre de rendre son verdict avec la plus grande exactitude, quant à la culpabilité ou non de ou des auteurs présumés.

1.1.2. L'enquête préliminaire

L'ouverture d'une enquête préliminaire fait suite à la confirmation qu'une infraction a bien été commise, elle permet aux services de Police ou de Gendarmerie d'effectuer toutes les recherches d'indices de la culpabilité d'une personne vis-à-vis de l'infraction constatée. Cette enquête est sous le contrôle d'un Procureur de la République. Lors de l'enquête, le Procureur de la République peut faire réaliser les expertises qui lui semblent nécessaire, comme les expertises génétiques. Les services de Police ou de la Gendarmerie, sous le contrôle du Procureur de la République, missionnent alors les services d'un laboratoire ou d'un expert par le biais d'une Réquisition judiciaire.

1.1.3. L’ouverture de l’instruction

Lorsque l’infraction est d’une grande gravité ou que l’enquête est devenue complexe, le Procureur de la République confie l’enquête à un Juge d’instruction : c’est l’ouverture de l’instruction. Le Juge d’instruction dirige alors l’enquête en coopération avec les services de Police ou de la Gendarmerie. De la même manière que le Procureur de la République, le Juge d’instruction peut demander différentes expertises pouvant lui permettre d’avancer dans son travail d’enquête, il va alors missionner un laboratoire ou expert pour effectuer l’expertise souhaitée, par le biais d’une Ordonnance de commission d’expert.

1.2. Le Travail de Police Technique et Scientifique (PTS)

1.2.1. Les premières constatations

Les constatations sont effectuées dans le cadre d’une enquête judiciaire et ont pour but de recueillir le maximum d’éléments matériels ayant un lien avec l’enquête en cours. Ces éléments matériels sont mis sous scellés afin de servir d’élément de preuve, et sont alors appelé « scellés ». La mise sous scellé d’un élément matériel correspond à sa mise sous protection, une fiche de scellé est ajoutée afin de tracer les premières informations concernant l’élément matériel (comme la nature du scellé, le lieu de découverte, le numéro de l’affaire à laquelle il est associé, le nom du service d’enquête, etc.).

1.2.2. L’analyses des indices découverts sur une scène de crime

Les analyses de scellés sont effectuées sur autorisation d’un Procureur de la République ou d’un juge d’instruction. Ces analyses doivent toujours être réalisées avec le plus grand soin, car elles vont aboutir à prouver la culpabilité ou au contraire innocenter un suspect.

1.2.3. Les sciences utilisées dans un contexte judiciaire

De nombreuses disciplines scientifiques permettent d’aider les services d’enquêtes dans leurs enquêtes, des disciplines anciennes comme la médecine légale ou l’analyse des empreintes digitales, à des disciplines plus récentes comme les analyses génétiques. Toutes ces disciplines ont un même but, utiliser des méthodes scientifiques pour analyser les indices recueillis lors des constations.

L'expertise d'une unique discipline ne doit pas être utilisée seule pour démontrer la culpabilité ou non d'une personne pour une infraction. Le fait de trouver sur une scène de crime, comme par exemple un homicide dans un magasin, l'empreinte digitale ou bien même l'empreinte génétique d'une personne, démontrera uniquement que la personne s'est déjà rendu à l'endroit du crime, mais ne prouvera en aucun cas que c'est bien cette personne qui a commis le crime. D'où l'importance que les services d'enquêtes aient accès à de nombreuses disciplines, qui leurs donneront chacune des nombreux indices, qu'ils pourront mettre en corrélation avec leur propre enquête (enquête de voisinage, vérification des alibis et interrogatoires des personnes suspectées) et ainsi obtenir une multitude de faits qui permettront d'affirmer la culpabilité, ou non, d'un individu vis-à-vis d'une infraction.

En ce qui concerne les expertises génétiques, comme son nom l'indique, cette discipline de PTS recherche à identifier des individus par leur ADN. Même si une majorité de notre ADN est identique entre tous les individus d'une même espèce, il est reconnu que de certaines régions de l'ADN sont propre à chacun des individus de l'espèce. C'est l'analyse de ces régions variables (Cf. 3.1.4. Amplification de l'ADN par PCR) d'un individu à l'autre, qui est donc intéressante dans le cas des expertises génétiques.

1.3. Le laboratoire IFEG

1.3.1. Historique

L'Institut Français des Empreintes Génétiques (IFEG) est né à Nantes, à la fin de l'année 2005, par la collaboration entre deux experts en empreintes génétiques que sont les Dr PASCAL et le Dr SCHLENCK avec un grand groupe de laboratoire en biotechnologie, le groupe EUROFINS(2), dont l'activité première est d'effectuer des analyses nutritionnelles.

En 2008, l'IFEG ouvre 2 nouveaux laboratoires, l'un près de Strasbourg et l'autre à Aix en Provence, dans le but de mieux répondre aux demandes des enquêteurs, notamment en terme de relationnel, par une proximité et donc une disponibilité des experts pour répondre à leurs questions.

1.3.2. Sa mission

L'IFEG est un laboratoire dont l'unique vocation est d'être un auxiliaire de justice, et en tant que tel le laboratoire va effectuer l'ensemble des expertises génétiques que le ministère de la justice lui confie. Depuis sa création, le ministère de la Justice à confier à l'IFEG principalement des expertises génétiques dans le cadre d'affaires criminels (homicides, agressions sexuelles, terrorismes, etc…), il s'agit donc d'infractions graves justifiant que le système judiciaire, par le biais des Procureurs de la République ou des Juges d'instructions, aient recours à nos expertises malgré le coût engendré par ces analyses, coût restant inférieur au préjudice subi par les victimes ou les familles des victimes.

1.3.3. Les analyses proposées par le laboratoire

Le laboratoire propose d'effectuer l'analyse des indices matériels mis sous scellés par les services d'enquêtes.il peut s'agir aussi bien de scellés dit de Traces, comme de scellés dit de Références. Les scellés dits de Références sont des prélèvements de matériels biologiques de personnes dont l'état civil est connu, il peut s'agir d'une victime, de témoins ou de personne mise en cause. Les matériels biologiques des Références sont généralement effectués à partir de prélèvements de salive. Les scellés dits de Traces sont les objets prélevés sur les scènes d'infractions, pour lesquels le travail du laboratoire est d'en faire ressortir des empreintes génétiques qui pourront être ensuite comparées à celles des scellés de Références. Par exemple dans le cas d'un homicide, l'expertise génétique de l'arme du crime supposée peut permettre d'affirmer que la substance rougeâtre se trouvant dessus correspond à du sang et que l'ADN extrait de ce sang est celui de la victime.

Même si le laboratoire peut effectuer des expertises génétiques pour tout type d'affaires judiciaires, dans les faits, le coût que représentent ces analyses pour le Ministère de la justice, entraine la réalisation de ces expertises uniquement dans les infractions les plus graves, soit les crimes. Ainsi le laboratoire effectue la grande majorité de ces expertises dans le cadre d'affaires d'homicide, d'agressions sexuelles, d'actes de terrorisme, de trafics de stupéfiants. Au laboratoire, les dossiers à traiter provenant de crimes sont appelés dossier de Production

1.4. Le projet de mise en place d'une chaine automatisée

1.4.1. Les affaires de PMD (Petites et Moyennes Délinquances)

Les infractions de type délit, de moins grande gravité que les crimes, représentent un très grand nombre d'affaires. Réaliser des expertises génétiques pour ces affaires entrainerait un coût très important pour le ministère de la justice, c'est la raison pour laquelle il y a peu d'affaire où une expertise génétique est réalisée par des laboratoires privés. Ces expertises sont alors réalisées par des laboratoires de la Police ou de la Gendarmerie, cependant, la quantité d'affaires de ce type étant très importante, les délais de traitement de ces analyses par les laboratoires de Police ou de Gendarmerie ont augmentés avec le temps, et peuvent prendre jusqu'à une année. L'augmentation du délai de réalisation de ces analyses engendre l'augmentation du délai du jugement de ces affaires dans les tribunaux. Le ministère de la justice décida alors d'effectuer un appel d'offre pour la réalisation d'un grand nombre d'expertises génétiques dans le cadre de ces infractions de type délit. Les objectifs de cet appel d'offre étant de réduire le délai de traitement de ces expertises, tout en induisant un coût d'analyse le plus faible possible. La diminution du prix de facturation de l'analyse entraine la nécessité d'optimiser au maximum chacune des manipulations réalisées, notamment en effectuant des plaques les plus complètes possible. Cette optimisation de nos plaques de manipulations n'est que rarement possible dans le cadre des analyses habituelles du laboratoire de par leur degré d'urgence. Les analyses réalisées en production, en plus de leurs tarifs facturés, entraine régulièrement des changements d'organisation afin de respecter les degrés d'urgences de chacun des dossiers, alors que pour les dossiers de PMD, l'analyse des dossiers devra se faire selon l'ordre d'arrivée au laboratoire, ainsi que de leur conformité (présence de l'ensemble des documents nous autorisant à effectuer les analyses) ou de leur remise en conformité, permettant ainsi le traitement en masse de ces échantillons.

L'appel d'offre est divisé en 3 lots, dont les quantités d'analyses sont différentes. La quantité d'analyses de chaque lot est fonction de la quantité d'affaires délictuelles traitée dans la zone géographique correspondante, ainsi le lot n° 3, correspondant au Sud-Est de la France et des DOM-TOM est établit pour l'analyses de 36 000 scellés sur une période de 18 mois.

1.4.2. Le contexte administratif

La grande quantité d'affaires visée par cette appel d'offre, nécessite un système administratif le plus simple possible, afin d'en réduire le coût. Ainsi le laboratoire sélectionné par le ministère de la justice pourra effectuer des analyses dans le cadre du Marché, si les conditions suivantes sont respectées (conditions déterminées dans les paramètres du marché public) :

- La nature de l'infraction doit correspondre à une infraction délictuelle (à l'exception des délits sexuels ou de terrorisme), infractions prévues par l'article 706-55 du code de procédure pénale
- L'infraction doit dépendre d'un Tribunal de Grandes Instances (TGI) se trouvant dans la zone géographique du lot obtenu.
- La demande d'analyse doit être accompagnée d'une Réquisition ou d'une Ordonnance et d'un Bon de commande

1.4.3. Mes objectifs

Les analyses du laboratoire étant principalement associés aux affaires criminelles, le laboratoire a pour objectif de développer une ligne de production permettant de traiter un grand nombre d'échantillons à moindre coût et donc de pouvoir répondre à la demande du Ministère de la Justice. Dans ce contexte, Le laboratoire m'a confié les missions suivantes :

- Définition du processus analytique, soit définir pour chacune des étapes, allant du prélèvement à l'obtention des électrophorégrammes, la méthodologie ou la technique qui sera la plus adaptée à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Les techniques utilisées jusqu'à présent devront être repensées, sont-elles compatibles avec une plus grande quantité d'analyses quotidiennes.
- Participer au recrutement du personnel technique en collaboration avec la responsable du projet.
- Gérer la formation du personnel technique afin qu'il soit opérationnel rapidement.

- Suivre quotidiennement l'état d'avancement des analyses, afin de garantir le respect du délai et la qualité des analyses.
- Adapter les ressources matérielles et humaines en fonction du flux d'entrée des analyses.
- Faire rentrer la chaine nouvellement en place dans le processus qualité du laboratoire
- Participer à la rédaction des rapports d'expertises.

1.4.4. Les paramètres de l'appel d'offre

L'Appel d'offre est défini afin de pouvoir effectuer l'analyse de traces biologiques, relatives à des scènes d'infractions délictuelles (à l'exception des délits d'ordre sexuel et des actes de terrorisme), aux fins d'identification de profils génétiques et d'alimentation du Fichier National Automatisé des Empreintes Génétiques (FNAEG).
Le lot obtenu par l'IFEG est le lot n°3, ce lot correspond à la zone Géographique des Cours d'Appel du Sud-Est de la France ainsi que des DOM/TOM. Il a été défini pour permettre l'analyse de 36 000 échantillons sur 18 mois
Le nombre quotidien d'échantillon à traiter par jour est calculé en partant du principe que le flux d'analyse sera constant au cours du temps.

Tableau 1 : *Répartition du nombre d'échantillon à traiter quotidiennement*

	Lot n° 3
Nombre d'échantillons sur 18 mois	36000
Nombre moyen d'échantillon par jour*	100

* : Le nombre moyen d'échantillons à traiter par jour est calculé en prenant en compte qu'il y a en moyenne 4 semaines de 5 jours ouvrés par mois.

Le délai nécessaire aux analyses est fixé à 20 jours calendaires. Le délai débute à la réception de l'ensemble des documents Administratifs, soit un bon de commande, la mission et les scellés. Il se termine à la date d'envoi du ou des profils génétiques au FNAEG). Tout retard dans le délai de traitement des analyses pourra entrainer des indemnités de retard comme il est stipulé dans l'article 3 du Marché.
L'article 4 du Marché défini qu'un dossier ne pourra contenir plus de 3 scellés, devant contenir qu'un seul objet, qui engendrera un unique prélèvement. Cet article défini également les différents locus que nos analyses doivent comporter (Cf. Tableau 2).

Un locus est une région d'un chromosome. Dans le domaine de la médecine légale et plus particulièrement des expertises ADN, les analyses portent sur certaines de ces régions de l'ADN. Ces régions dites locus, doivent avoir une séquence répétée en tandem (STR), c'est-à-dire un motif de plusieurs nucléotides qui va se répéter un certain nombre de fois, et pour lequel chez les individus d'une même espèce, une variation de ce nombre de répétition est relevée.

Tableau 2 : *Liste des locus à analyser dans le cadre du Marché*

Locus obligatoire	Locus Facultatif *	Locus optionnel
D3S1358	D2S1338	SE33
VWA	D19S433	
D8S1179	PentaE	
D21S11	PentaD	
D18S51		
TH01		
FGA		
D16S539		
D5S818		
D13S317		
D7S820		
CSF1PO		
TPOX		
Amélogénine		

* : L'analyse effectuée par le laboratoire doit inclure 2 des 4 locus facultatifs.

Le processus analytique du laboratoire doit comporter les étapes suivantes :

- Extraction de l'ADN
- Quantification de l'ADN
- Eventuellement la dilution ou la concentration de l'ADN
- Une amplification d'ADN à l'aide d'un kit de Génotypage dans le respect des consignes données par le fournisseur pour l'emploi de son kit, ou en démontrant que les conditions utilisés par le laboratoire ne modifie pas les performances attendues lors d'un usage normal du kit.

Dans le cas de la détermination d'une empreinte génétique, le laboratoire doit transmettre le résultat pour enregistrement au FNAEG et également de faire parvenir le scellé au Service Central de Préservation des Prélèvements Biologiques (SCPPB) ainsi que l'extrait d'ADN correspondant au prélèvement ayant permis la détermination d'une empreinte génétique.

Dans le cas où le prélèvement ne permet pas la caractérisation d'une empreinte génétique, le résultat doit être également transmis au FNAEG sous forme de fichier XML ou de fiche profil vide, tandis que le scellé est renvoyé au requérant.

2. Matériels et Méthodes

2.1. L'élaboration du processus analytique

2.1.1. Les prélèvements

1. Principe

L'enregistrement d'un dossier par l'équipe du secrétariat permet l'attribution d'un numéro de dossier qui est unique L'enregistrement s'effectue dans un premier LIMS (Laboratory Information Management System), dit LIMS Administratif (Cf. §2.6 L'outil Informatique (LIMS)). L'enregistrement dans le LIMS terminé, l'équipe du secrétariat génère un « enregistrement » papier. Cet enregistrement papier contient trois documents, pouvant être renseigné ou non selon le type de dossier. Le premier document indique le numéro du dossier, sa provenance, l'expert responsable du dossier, les analyses à effectuer et une case commentaire permettant d'indiquer les points particuliers du dossier. Le second document est une liste de tous les scellés faisant partis du dossier. Et le troisième indique la localisation du scellé et son statut. Pour chaque scellé on indique sa localisation dans la pièce a scellés, afin de pouvoir le retrouver facilement. Le statut quant à lui précise si les scellés sont analysables ou si ils sont en « conservatoire » (dans certains cas les requérants envoient des scellés qui ne sont pas visés par la mission).

Contrairement aux dossiers que nous recevions jusqu'à présent où les scellés peuvent être de tout type, dans le cadre de l'appel d'offre, le type de scellé est défini, cela ne peut être que soit des écouvillons, soit des objets de petite taille, tels que notamment : mégots, chewing-gums, vêtements de type cagoules, gants ou bonnets. La réalisation des prélèvements ne peut s'automatiser, principalement, du fait de la diversité des types de scellés, car la réflexion sur le prélèvement à effectuer est obligatoire quel que soit le support transmis.

L'enregistrement en possession du technicien, il va pouvoir procéder aux prélèvements des scellés de ce dossier. L'étape des prélèvements est une étape essentielle de nos analyses, du prélèvement réalisé dépendra fortement le résultat de l'expertise. Les informations relatives au prélèvement, sont toutes aussi importantes que le prélèvement lui-même, puisqu'elles permettront d'indiquer la zone prélevée, de décrire le support (qui doit corréler avec celui présent sur la fiche de scellé), d'ajouter les résultats éventuels de tests d'orientation.

Chaque série de prélèvements doit contenir un minimum d'un témoin d'extraction (lorsque la série de prélèvements s'effectue sur plus d'une journée, un témoin d'extraction par journée de prélèvement doit être ajouté à la série), ces témoins serviront à montrer que l'ensemble des réactifs utilisé pour réaliser l'étape d'extraction ne sont pas contaminé par de l'ADN Humain et par conséquent que les profils génétiques obtenus sont uniquement dus à nos prélèvements.

2. La méthodologie actuelle

L'enregistrement d'un dossier a pour but l'attribution d'un numéro de dossier unique, de retranscrire les informations manuscrites se trouvant sur les fiches de chacun des scellés que constitue le dossier et la création de ce dossier dans le LIMS Technique.
Les prélèvements se décomposent en plusieurs étapes, comme le décrit la Figure 1

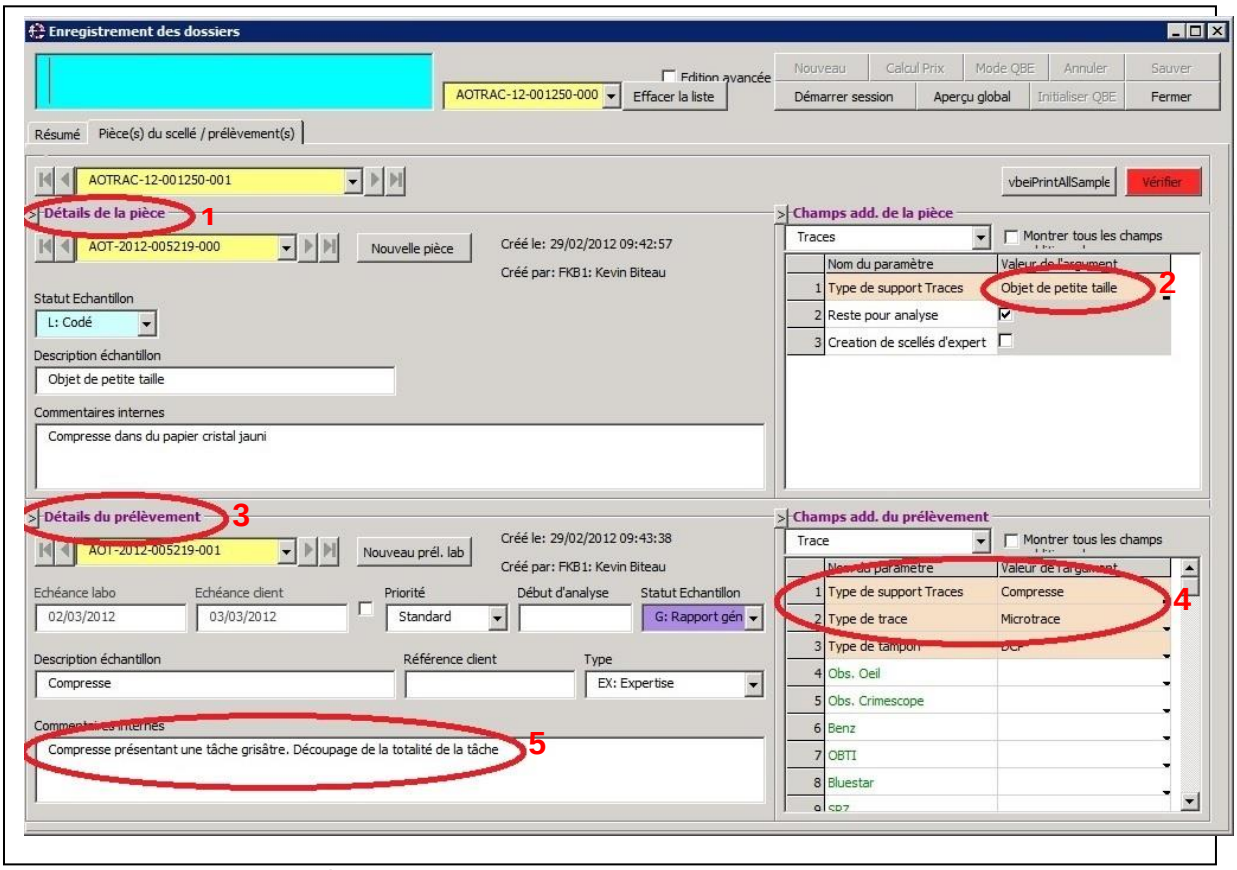
Figure 1 : *les étapes du prélèvement*

1.	Vérification des données Administratives
2.	Bris du scellé et vérification de son contenu
3.	Réalisation du prélèvement
4.	Enregistrement du prélèvement réalisé dans le LIMS

Les vérifications des données administratives permettent de garantir qu'il s'agit bien d'un scellé à analyser (scellé visé par la mission, comparaison du nom du scellé avec celui de la mission, correspondance du code barre FNAEG entre la fiche de scellé, l'enregistrement et celui présent sur la mission).
Le bris du scellé et la vérification de son contenu, permet de constater la corrélation de celui-ci avec le descriptif du scellé indiqué par le requérant sur la fiche de scellé.
Lorsque toutes ces vérifications sont faites et qu'elles ne montrent pas d'anomalie, alors le prélèvement est réalisé selon le type de support et en fonction des indications données par l'expert en charge du dossier (nombre de prélèvements à réaliser, zones particulières du scellé à prélever, tests d'orientations éventuels à réaliser, etc.).

Le technicien doit enregistrer dans le LIMS Technique toute les informations relatives à son prélèvement (Cf. Figure 2). L'enregistrement du prélèvement doit contenir au minimum les informations relatives au descriptif du prélèvement (celui doit indiquer si le prélèvement a été effectuer par écouvillonnage ou découpe, indiquer tout ce qui peut identifier de manière la plus précise l'objet en indiquant la marque ou la couleur ou reporter les annotations inscrites sur les étuis des écouvillons), le ou les résultats des tests d'orientation, l'indication s'il reste ou non du scellé après la réalisation du prélèvement. Dans le cas des écouvillons, le scellé étant utilisé en totalité et pour ne perdre aucune information le technicien doit retranscrire mot pour mot les inscriptions écrites sur l'étui de celui-ci

Figure 2 : *L'enregistrement des prélèvements dans le LIMS Technique*



1 : Zone des informations du scellé

2 : Nature du scellé => « Ecouvillon » ou « objet de petite taille »

3 : Zone des informations du prélèvement

4 : Détail du type de support

5 : Descriptif du prélèvement réalisé par le Technicien

3. Les points de difficultés

La retranscription mot pour mot de tous les descriptifs des scellés va nécessiter un temps important à l'équipe du secrétariat

La création du dossier dans le LIMS Technique à partir de l'enregistrement papier et la création des numéros de scellés est une part importante du temps nécessaire à l'enregistrement par l'équipe du secrétariat.

Le temps de réflexion nécessaire à la réalisation du prélèvement est une part importante du temps total de l'étape de prélèvement, et au vu du nombre d'échantillons quotidien (estimé à 100 prélèvements) à traiter, ce temps nécessitera des ressources humaines importantes.

A la demande du Ministère de l'intérieur, le laboratoire devra fournir mensuellement un état des analyses effectuées. Les données qui leurs seront transmises doivent leur indiquer le nombre d'analyses effectuées durant le mois et ceux par TGI, le nombre de résultats positifs par rapport au négatifs L'utilisation de la même nomenclature pour l'attribution des numéros de dossiers de l'appel d'offre rendrait difficile ces analyses statistiques devant être effectuées pendant l'appel d'offre, du fait de l'amalgame entre les dossiers du Marché et les autres.

4. Les modifications apportées à la méthodologie

La réalisation des expertises des dossiers de production, peuvent sur demande des juges, entrainer l'intervention de l'expert afin de soutenir son expertise lors du procès en cours d'assises. Lors de ces procès en cours d'assises, il est plus aisé pour l'expert d'avoir le descriptif exacte du contenu de chacun des scellés dans son rapport d'expertise. Contrairement aux dossiers de production, les dossiers entrant dans le cadre de l'appel d'offre, au vu de la nature de l'infraction, n'entrainera pas de procès en cours d'assises, et comme la fiche de scellé est scannée lors de l'enregistrement et que ce scan est enregistré dans le LIMS Administratif, la retranscription mot pour mot du descriptif du scellé dans le LIMS Administratif n'est donc pas nécessaire, ce qui va permettre de réduire le temps d'enregistrement. On notera dans la case « Type de scellé » que le scellé est soit du type « écouvillon » soit du type « Objet de petite taille » (ce qui permettra également de connaitre le taux de réception d'écouvillons par rapport aux objets de petites tailles).

L'enregistrement des dossiers de production se termine par la création du dossier dans le LIMS Technique, ce qui permet l'attribution pour chaque pièce de scellé d'un

numéro ADN unique pour chacune d'elle. La réalisation de cette étape par le secrétariat permet de garantir l'attribution de numéro ADN successif au sein d'un dossier. Dans le cadre du traitement des dossiers de PMD, la création du dossier dans le LIMS Technique par le technicien est rendue possible du fait du nombre maximum de scellé du dossier, nombre ne pouvant excéder 3 scellés contenant chacun un unique objet. Ce nombre maximum de scellé étant faible, cela nous assure que l'ensemble du dossier sera prélevé dans un temps court et donc que le technicien peut avoir la charge de la création du dossier dans le LIMS Technique, et ainsi permet de réduire encore le temps d'enregistrement d'un dossier par le secrétariat.

La quantité journalière de prélèvements à effectuer pour l'appel d'offre étant plus importante que celle que nous avions à traiter pour nos dossiers de Production, il nous faut simplifier cette étape de réalisation du prélèvement, d'autant plus que le personnel Technique qui va devoir effectuer cette tache sortira à peine de sa formation. Comme l'indique les paramètres du Marché, le type de scellé est restreint par rapport à nos dossiers de production, et le nombre de prélèvement à réaliser pour un scellé est systématiquement de un. Dans ce contexte j'ai établi, en accord avec nos experts, des prélèvements types que le technicien pourra appliquer pour prélever les dossiers de PMD, prélèvements types indiqués dans le Tableau 3. Je défini ces prélèvements types à partir des prélèvements réalisés dans le cadre de nos dossiers de production, pour les écouvillons le prélèvement étant déjà simplifié, je reprends la même méthodologie. Pour ce qui est des objets de petites tailles, nous devons ne faire qu'un seul prélèvement par objet, comme le défini les paramètres du marché, ainsi pour un gant, par exemple, nous faisons 2 prélèvements en production, l'un par écouvillonnage et l'autre par découpage, je choisi d'effectuer l'unique prélèvement en PMD par la réalisation d'un écouvillonnage de l'intérieur du gant et de la découpe interdigitale (s'il le type de gant le permet). Les prélèvements à réaliser sur les différents supports, que nous pourrons rencontrer étant ainsi établis, je rédige le protocole spécifique à ces prélèvements PMD. Ces prélèvements types permettent donc au technicien de prendre moins de temps de réflexion sur le prélèvement à effectuer, et en cas de particularité ou d'incertitude du technicien quant au prélèvement à effectuer, il contactera son ingénieur production qui l'orientera sur le prélèvement à réaliser. Enfin pour aider le technicien dans la saisie du descriptif de son prélèvement dans le LIMS Technique, j'élabore des phrases types pour chacun des types de scellés les plus fréquemment rencontrés (Cf.

Tableau 4). Dans la même perspective, pour chaque type de prélèvement j'indique si le prélèvement sera du type microtrace ou macrotrace (Cf. Tableau 3).

Afin que les dossiers entrant dans la chaine automatisée PMD soient clairement identifiés par rapport aux autres dossiers, il est décidé d'utiliser une seconde nomenclature qui ne s'appliquera qu'aux dossiers PMD. Cette nouvelle nomenclature est similaire à la nomenclature actuelle mais nous remplaçons le préfix du dossier « EUIFEG » par le préfixe « AOTRAC ». Ainsi il nous sera plus aisé d'effectuer les bilans mensuels demandés par le ministère de la Justice.

Tableau 3 : Prélèvements PMD à effectuer selon le type de support

Type de support	Tests d'orientation	Conditions particulière aux tests d'orientation	Prélèvements type	Type de Traces
Écouvillons	-	-	Casser l'extrémité	Microtrace
	Benzidine -	Si écouvillon avec une coloration rougeâtre ou désignation par le requérant comme étant rougeâtre ou étant du sang.		Microtrace
	Benzidine +			Macrotrace
Mégots	-	Fumé	Découpe d'un morceau d'environ 0.5cm du papier filtre	Macrotrace
	-	Non fumé	Ecouvillonnage de toute la surface du papier filtre	Microtrace
Chewing-gum	-	-	Si sec, mettre totalement dans le tube ou un morceau si trop imposant. Si non sec, écouvillonnage de toute sa surface.	Macrotrace
Outils	-	-	Écouvillonnage de la surface de la zone de prise en main	Microtrace
Paire de gants (tissu)	-	-	Découpe possible : Découpe de la zone interdigitale pouce/index du gants droit et écouvillonnage de l'intérieur du gant gauche Pas de découpe possible : écouvillonnage de l'intérieur du gant droit	Microtrace
Paire de gants (plastique)	-	-	Écouvillonnage de l'intérieur et de l'extérieur d'un des deux gants	Microtrace
Cagoule	Crimescope*	Sur demande de l'ingénieur production uniquement	Si présence de tache : Découpe de la tâche et écouvillonnage face intérieure de la partie en contact avec le visage Si pas de tache visible : écouvillonnage de la face intérieure	Microtrace
Bonnet	Crimescope	Sur demande de l'ingénieur production uniquement	Si présence de tache : Découpe de la tâche et écouvillonnage face intérieure de la partie en contact avec le contour du crâne Si pas de tache visible : écouvillonnage de la face intérieure	Microtrace
T-shirt, Polo, veste (Porteur)	Crimescope	Sur demande de l'ingénieur production uniquement	Si présence de tache : Découpe de la tache Si pas de tache visible : écouvillonnage du col, des aisselles et des poignets	Microtrace
T-shirt, Polo, veste (Contact)	Crimescope	Sur demande de l'ingénieur production uniquement	Selon instructions du requérant uniquement	Microtrace
Pantalon, short, jupe (Porteur)	Crimescope	Sur demande de l'ingénieur production uniquement	Si présence de tache : Découpe de la tache Si pas de tache visible : écouvillonnage de la ceinture face intérieure et des systèmes de fermetures	Microtrace
Pantalon, short, jupe (Contact)	Crimescope	Sur demande de l'ingénieur production uniquement	Selon instructions du requérant uniquement	Microtrace
Autres	Selon les cas		A voir avec l'ingénieur Production ou un expert	Selon les cas

Crimescope : appareil émettant une lumière dont la longueur d'ondes peut être sélectionnée via un jeu de filtres et qui va permettre l'observation et la localisation de matériel biologique sur un scellé, comme la sueur ou le sperme.

Tableau 4 : Phrases type pour le descriptif du prélèvement selon le type de support

Type de support		Description dans la colonne « Prélèvements »
Écouvillon		Prélèvement de la totalité de l'écouvillon [Coloration de l'écouvillon] *Remarque : s'il n'est pas coloré, ne pas mettre d'indication*
Mégot		Découpe d'environ [x] cm du papier filtre côté bouche d'un mégot de cigarette [marque/marque illisible] + indication si la cigarette n'a pas été fumée + indication s'il s'agit d'une cigarette de type artisanale *Remarque : attention à la concordance avec ce qui est noté sur la fiche de scellé*
Compresse		Découpe de la zone d'essuyage de la compresse (partie grisâtre)
Gant		Découpe interdigitale entre le pouce et l'index
EP	Prélevé en totalité	Prélèvement de la totalité de l'élément pileux d'environ [x] cm, [présentant/ ne présentant pas de bulbe]
	Découpé	Découpe d'environ [x] cm de l'élément pileux d'environ [x] cm, [côté bulbe/ ne présentant pas de bulbe]
Objet divers	Écouvillonnage	Écouvillonnage de [description de la zone] *Remarque : la description du scellé n'est pas visible sur le rapport, il faut donc* ***reprendre les termes présents dans la fiche de scellé pour décrire l'objet*** Exemple « Écouvillonnage de la surface extérieure du sac poubelle » et non « Écouvillonnage de la surface extérieure »
	Découpe	Découpe de [description + localisation] *Remarque : la description du scellé n'est pas visible sur le rapport, il faut donc* ***reprendre les termes présents dans la fiche de scellé pour décrire l'objet*** Exemple « Découpe d'une partie de tache réagissant au Crimescope située au niveau de l'aisselle droite du T-shirt » et non « Découpe d'une partie de tache réagissant au Crimescope située au niveau de l'aisselle droite »

EP : élément pileux

Les prélèvements sont répartis en deux catégories, la première sont les « microtraces » qui sont des prélèvements où le technicien juge qu'il y aura peu d'ADN (il s'agit principalement de traces de contact) et la seconde sont les « Macrotraces » où la quantité d'ADN présumé est plus importante (comme à partir d'une trace de sang ou d'un mégot de cigarette). Ce jugement de la quantité d'ADN présent dans notre prélèvement se fait par la réflexion du technicien à partir du contexte de l'affaire dont il traite le dossier et par son expérience. Les techniciens de la chaine PMD ayant peu d'expérience, j'ajoute pour chaque prélèvement type, la catégorie auquel le prélèvement sera associé (Cf. Tableau 3).

Chaque série de prélèvements doivent contenir un minimum d'un témoin d'extraction, ces témoins serviront à montrer que l'ensemble des réactifs utilisés pour réaliser

l'étape d'extraction ne sont pas contaminé par de l'ADN Humain et par conséquent que les profils génétiques obtenus sont uniquement dus à nos prélèvements.

2.1.2. L'extraction de l'ADN

1. Principe

L'objectif de l'extraction est d'isoler l'ADN des cellules. L'extraction se décompose en deux étapes : La lyse cellulaire et la purification. La lyse cellulaire permet de libérer l'ADN en cassant les membranes cellulaires, la purification consiste à éliminer les protéines et autres constituants cellulaires pour ainsi permettre la conservation de l'ADN.

2. La méthodologie actuelle

La lyse cellulaire s'effectue à l'aide d'un tampon de lyse préparé par le laboratoire (des techniques particulières de lyses peuvent être utilisées dans le cadre de dossier de viol ou pour l'analyse d'éléments pileux)

La Lyse terminée, nous effectuons un essorage de notre support de prélèvement afin de ne conserver qu'un milieu liquide. Nous ajoutons alors au lysat un volume équivalent de Phénol/Chloroforme (500µL, correspondant au volume de tampon de lyse mis en contact avec le prélèvement). Suite au vortexage du mélange suivi de sa centrifugation, le Phénol/Chloroforme a permis de séparer l'ADN (solubilisé dans le milieu aqueux, correspondant au volume de tampon de lyse) des débris cellulaires et des protéines (qui ont une plus grande affinité pour la phase organique (correspondant au volume de Phénol/Chloroforme). Vient alors l'étape la plus délicate de l'extraction, le technicien doit prélever le maximum de la phase aqueuse, sans prélever de Phénol, ni de la galette protéique se trouvant piégée entre les deux phases. La phase aqueuse qu'il prélève est déposée dans un nouveau tube, dans lequel nous allons ajouter un volume (500µL) de Chloroforme. Le tube subit un vortexage suivi d'une centrifugation, puis la phase aqueuse est de nouveau isolée et transférée sur une unité de filtration, qui va permettre la purification de l'ADN en éliminant les molécules dont la taille molécule est inférieure à 50kDa. Cette dernière étape de l'extraction permet d'éliminer en totalité ou partiellement certains inhibiteurs de PCR (Réaction de Polymérisation en chaîne). La purification terminée, l'ADN restant sur la membrane de l'unité de filtration est récupérée en solubilisant de nouveau l'ADN avec un tampon d'élution. L'extrait d'ADN ainsi réalisé est déposé

dans un nouveau tube sur lequel sont indiqués le numéro d'ADN et le numéro de dossier correspondant à cet extrait.
Pour finir nous terminons la purification par une étape de passage sur une unité de filtration avec membrane filtrante.

3. Les points de difficultés

Comme le montre le Tableau 5, l'extraction d'ADN à l'aide du Phénol/Chloroforme est un procédé relativement long, employant des réactifs chimiques dont la dangerosité est avérée. Cette méthode d'extraction est de plus difficilement automatisable, car l'automate devrait pouvoir détecter la séparation entre les phases aqueuse et organique et ne pas aspirer la galette protéique se trouvant entre les deux phases.

Tableau 5 : Comparaison entre les 2 méthodes d'extraction

	Phénol/Chloroforme	Maxwell et DNA IQ Casework Pro
Tampons de lyses	Multiples	Unique
Temps technicien	1heure30	30 min
Temps automate	nul	30 min
Dangerosité	Importante (Phénol)	Faible
Automatisable	Non	Oui
Coût Réactif	Moins de 1€	3,60€
Coût Technicien	Important	Faible
Rendement d'extraction	Excellent	A définir
Temps de la formation	6 mois	1 semaine
Estimation du nombre d'échantillons pouvant être extrait par journée	96	160

Les temps sont estimés pour une série de 18 prélèvements pour l'extraction Maxwell, tandis qu'ils sont estimés pour une série de 24 prélèvements pour le Phénol/Chloroforme.

Conserver la méthode d'extraction par Phénol / Chloroforme, pour le traitement en grand nombre d'échantillons, entraînerait donc une occupation importante de temps des techniciens par rapport au nombre d'échantillons pouvant être traités (une estimation du nombre d'échantillons pouvant être traité en une journée de travail par un technicien a été établie à environ 96 prélèvements), or l'estimation de la quantité d'échantillons à extraire quotidiennement est d'environ 100. Ces valeurs sont

proches l'une de l'autre, mais ne s'agissant que d'une estimation, nous n'aurons aucune souplesse dans le traitement des extractions en optant pour la méthode au Phénol/Chloroforme. De plus, conserver l'extraction au Phénol/Chloroforme risquerait de soumettre le technicien à des quantités importantes de vapeur de produits chimique malgré le travail sous hottes chimiques. C'est pourquoi j'ai choisi de remettre en question ce type d'extraction dans le cadre de traitement en masse d'échantillons.

Je me suis donc rapprocher de notre fournisseur principal, et décida de tester l'extraction de l'ADN à l'aide du kit DNA IQ™ Casework Pro[3] de chez PROMEGA et de l'automate Maxwell® 16 Forensic Instrument du même fournisseur. Le principe de fonctionnement de ce kit, qui utilise des billes magnétiques supportant des groupements chimiques qui vont être chargés en fonction du pH du milieu dans lesquelles elles se trouvent, est déjà connu du laboratoire puisque nous utilisons ce principe pour l'extraction de l'ADN pour nos échantillons de Références (prélèvements salivaires effectués sur des individus dont l'état civil est connu, il s'agit principalement des victimes, de témoins ou des suspects de l'affaire). Cette méthode d'extraction est facilement automatisable à l'aide de l'automate Maxwell® 16 Forensic Instrument. De plus cet automate, permet le passage de série de petites tailles (jusqu'à 16 échantillons par série d'extraction), ce qui nous permettra une flexibilité d'organisation, chaque série débutée sera amenée à son terme par un même technicien, réduisant ainsi les risques d'erreur lié à des changements d'opérateur.

Afin de s'assurer que le kit d'extraction est compatible avec les différents supports de scellés visés par l'appel d'offre, je mets en place un projet de Recherches et Développement. Ce projet a pour objectif d'analyser les critères suivants :

- Limite de détection
- Sensibilité
- Répétabilité
- Reproductibilité
- Contamination entre les échantillons
- Validation sur des échantillons de Traces

Les résultats de ces tests sont indiqués dans le paragraphe 3.2.1.

4. Les modifications apportées à la méthodologie

Au-delà de ce projet de Recherches qui vise à montrer une efficacité d'extraction similaire à celle de l'extraction à l'aide du Phénol/Chloroforme, j'ai dû me poser la question de l'organisation de ces extractions si elles devaient être réalisées à l'aide du kit DNA IQ^{TM} Casework Pro et de l'automate Maxwell® 16 Forensic Instrument. L'automate ne pouvant contenir plus de 16 échantillons à la fois, nos séries de prélèvements ne pourront donc contenir plus de 15 prélèvements auxquels sera ajouté le témoin négatif d'extraction. Afin de pouvoir extraire l'ensemble des échantillons quotidien, nous devons donc réaliser en moyenne 9 séries d'extraction par jour.

L'extraction d'ADN par le kit DNA IQ^{TM} Casework Pro et de l'automate Maxwell® 16 Forensic Instrument, malgré son automatisation, requiert une partie de travail technique en amont de son passage de l'appareil. La première étape à réaliser est la mise en lyse de nos échantillons, ensuite viens l'étape d'essorage du support du prélèvement à l'aide des DNA IQ™ Spin Basket de chez PROMEGA et son dépôt dans une cartouche du kit DNA IQ^{TM} Casework Pro, enfin une fois l'ensemble des échantillons d'une série déposé dans leur cartouche, la série peut alors être mise dans l'appareil et ainsi réaliser l'extraction des ADN.

Le Technicien étant posté, son rôle durant sa journée de travail, ne sera que d'effectuer les extractions de l'ADN, pour cette raison j'ai dû réfléchir à l'élaboration d'une séquence organisationnelle, qui lui permettra de réaliser le maximum d'extraction (Cf. Figure 3).

Figure 3 : *Organisation d'une journée typique d'extraction d'ADN à l'aide du kit DNA IQ™ Casework Pro et de l'automate Maxwell® 16 Forensic Instrument*

n° d'étape	Temps	descriptif de l'étape
1	t=0	Préparation des tampons de lyses et mise en lyse des séries n°1 à 4
2	t=0h15	Préparation des tampons de lyses des séries n°5 à 10
3	t=1h	Fin de la lyse des séries n°1 à 4 Mise en lyse des séries n°5 à 8 Réalisation des Spin baskets des séries n°1 à 2
4	t=1h30	Lancement des runs d'extraction des séries n°1 à 2
5	t=1h45	Réalisation des Spin baskets des séries n°3 et 4
6	t=2h	Fin de l'extraction des séries n°1 et 2
7	t=2h15	Lancement des runs d'extraction des séries n°3 à 4 Fin de la lyse des séries n°5 à 8 Mise en lyse des séries n°9 à 10 Réalisation des Spin baskets des séries n°5 à 6
8	t=3h	Fin de l'extraction des séries n°3 et 4
9	t=3h15	Lancement des runs d'extraction des séries n°5 à 6 Fin de la lyse des séries n°9 à 10
10	t=3h30	Réalisation des Spin baskets des séries n°7 à 8
11	t=4h	Fin de l'extraction des séries n°5 et 6
		Pause Déjeuner
12	t=4h45	Lancement des runs d'extraction des séries n°7 à 8
13	t=5h30	Fin de l'extraction des séries n°7 et 8
14	t=5h45	Réalisation des Spin baskets des séries n°9 à 10
15	t=6h15	Lancement des runs d'extraction des séries n°9 à 10
16	t=7h00	Fin de l'extraction des séries n°9 et 10 Préparation des consommables et kits pour la journée suivantes

2.1.3. La quantification de l'ADN

1. Principe

L'étape de quantification de notre processus analytique a pour but d'évaluer de manière semi-quantitative la quantité d'ADN Humain présent dans nos extraits, afin d'optimiser au maximum l'étape de l'amplification de l'ADN par PCR. En effet pour cette étape et selon le kit d'amplification utilisé, le fabricant du kit préconise l'ajout d'une certaine quantité d'ADN pour que l'amplification soit la plus efficace possible et que les profils obtenus par électrophorèse capillaires puissent être interprétés. Généralement le fabricant préconise l'ajout d'1ng d'ADN dans le milieu réactionnel de la PCR.

2. La méthodologie actuelle

Plusieurs techniques permettent cette quantification de l'ADN, les différentes méthodes de quantification de l'ADN ci-dessous furent comparées les unes aux autres, lors de la définition du processus analytique à la création du laboratoire.

- La lecture de densité optique (D.O.) avec le calcul du rapport entre l'absorbance à 260nm et celle à 280nm,
- L'électrophorèse en gel d'agarose avec l'utilisation d'un agent intercalant de l'ADN comme le Bromure d'Ethidium visible sous UV (Ultra-Violet) et qui par comparaison à une gamme étalon permet l'estimation de la quantité d'ADN d'un échantillon,
- Le Dot blot qui consiste à hybrider une sonde spécifique de l'ADN Humain avec une séquence d'ADN, le complexe ainsi formé pourra être révélé, soit par colorimétrie (comme par exemple en utilisant un complexe Streptavidine/Biotine) soit par la radioactivité
- La PCR en temps réel se basant sur le principe de la PCR auquel s'ajoute une sonde marquée par un fluorochrome permettant ainsi de suivre cycle de PCR après cycle de PCR l'évolution de la quantité de fluorescence alors proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans l'extrait.

Afin de sélectionner la méthode que nous allions appliquer, nous avions comparé ces différentes techniques les unes aux autres, vis-à-vis de critères qui nous semblaient les plus importants (Cf. Tableau 6).

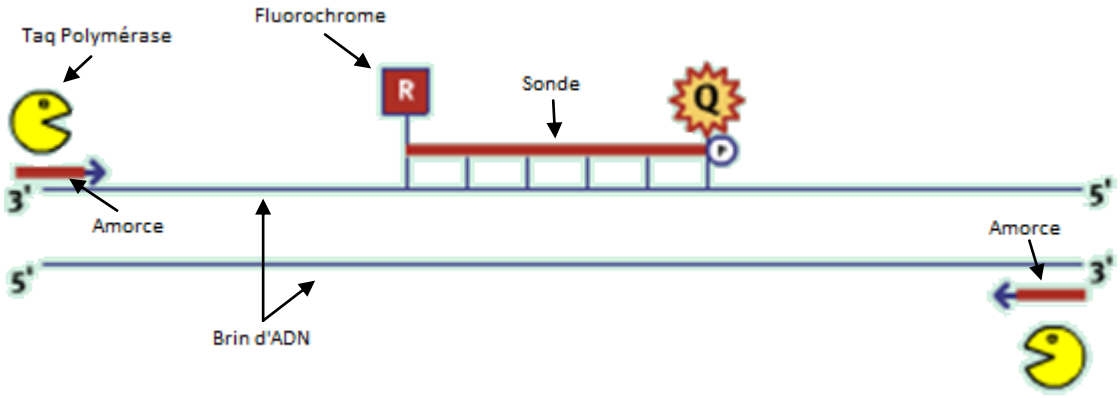
Tableau 6 : Comparaison entre les différentes techniques de quantification de l'ADN

	D.O.	**Gel d'agarose**	**Quantiblot**	**PCR en temps réel**
Sensibilité	Peu sensible (de l'ordre du µg)	Peu sensible	Moyennement Sensible (jusqu'à 0.15ng)	Sensible (de l'ordre du pg)
Mise en œuvre	1 minute	6 minutes	1 à 2 heures	1 heure + 2h de run
Détection de la Présence d'inhibiteur	-	-	-	+
Spécifique à l'ADN Humain	-	-	+	+

Parmi ces méthodes et au vu des critères de spécificité avec l'ADN Humain et l'obtention d'une information sur la présence éventuelle d'inhibiteur de PCR. La méthode de quantification de l'ADN par PCR en temps réel a été mise en place.

Cette Technique fonctionne sur le principe de l'amplification de l'ADN par PCR (Cf. §2.1.4 L'amplification de l'ADN par PCR), auquel est ajouter un système de lecture de fluorescence qui va permettre l'évolution de la fluorescence au fur et à mesure des cycles de la PCR. La fluorescence mesurée est issue d'un complexe Sonde / Fluorochrome, ce complexe va s'hybrider à notre ADN cible dans le même temps que les amorces (phase d'hybridation de la PCR), puis lors de la phase d'élongation, la Taq Polymérase va hydrolyser les sondes qui auront été hybridées, ce qui aura pour conséquence la libération du Fluorochrome qui pourra alors émettre une fluorescence pouvant être captée par l'appareil. Le niveau de Fluorescence sera donc proportionnel à la quantité d'ADN (Cf. Figure 4)

Figure 4 : Principe de la quantification de l'ADN par PCR en temps réel



En cas de présence d'ADN dans nos extraits, la fluorescence va croitre au fur et à mesure des cycles de l'amplification et ainsi être mesurée et comparée avec les intensités de fluorescence de la gamme étalon (gamme constituée de 8 points de gamme dont les concentrations varient entre 0,023ng/µL et 50ng/µL), ce qui va permettre d'obtenir la concentration en ADN de nos échantillons.

Le kit que nous utilisons au laboratoire est un kit commercial de la société Life Technologies, le kit Quantifiler® Human DNA[(4)], qui utilise une sonde de type Taqman®. Les plaques préparées à l'aide de ce kit sont placées dans un thermocycleur ayant un système de lecture de fluorescence (nous utilisons un appareil de la société AGILENT, le MX3000P).

Le Kit est également doté d'un système de contrôle interne, il est composé d'un ADN de synthèse, d'un couple de Primers spécifique de cet ADN de synthèse, d'une sonde marquée par le fluorochrome « VIC » également spécifique à l'ADN de synthèse. Tous les composants nécessaires à la réalisation de l'amplification et à la mesure de cette amplification de cet ADN se trouvent dans les 2 réactifs du kit. Ce qui signifie que lors de la réaction l'ADN de synthèse doit s'amplifier et l'appareil doit détecter une augmentation de la fluorescence spécifique de cet ADN (Fluorochrome « VIC »). Dans le cas où cette fluorescence n'augmenterai pas au fur et à mesure des cycles de la réaction, cela signifierai la présence d'inhibiteurs de PCR, qui ne peuvent provenir que de l'extrait ADN déposé. C'est donc ce système de contrôle interne qui nous permet de détecter la présence éventuelle d'inhibiteur dans les extraits ADN de nos échantillons.

Chaque échantillon amplifié par PCR en temps réel, est déposé à la dilution « pur » mais également après avoir été dilué au 1/20°. Cette dilution est établie afin de résoudre 2 cas éventuels :

- La concentration en ADN de notre extrait est supérieure à la concentration maximale de la gamme étalon (50 ng/µL). Dans ce cas en le diluant au 1/20°, cela nous permet d'obtenir une concentration comprise entre les différentes valeurs de la gamme.
- La présence d'inhibiteur de PCR. En cas de présence d'inhibiteur détectée dans notre extrait déposé au pur, la dilution au 1/20° nous permet de déterminer si le fait de diluer l'extrait permet d'annuler les effets des inhibiteurs et de savoir si de l'ADN est présent en suffisamment grande quantité pour être détecté malgré la dilution au 1/20°.

3. Les points de difficultés

L'utilisation de la quantification de l'ADN par PCR en temps réel, pour nos échantillons issus des dossiers de PMD, ne présente pas de point de blocage majeur, seul la quantité de plaques quotidiennes supplémentaires que cela va engendrer pourrait être problématique. La quantité d'analyses quotidiennes que la PMD va engendrer étant de 100 (Cf. Tableau 1), cela signifie que 3 plaques seront à effectuer par jour. Le laboratoire possédant 2 appareils pour effectuer le traitement de ces plaques, nous auront donc par jour et par appareil, 1 à 2 plaques supplémentaires à passer. L'utilisation de ces appareils pour l'analyse des échantillons des dossiers de production n'occupant pas les appareils à 100% (chaque appareil pouvant permettre le passage jusqu'à 5 plaques par jour), l'ajout des plaques pour l'analyses des échantillons des dossiers de PMD est donc possible.

4. Les modifications apportées à la méthodologie

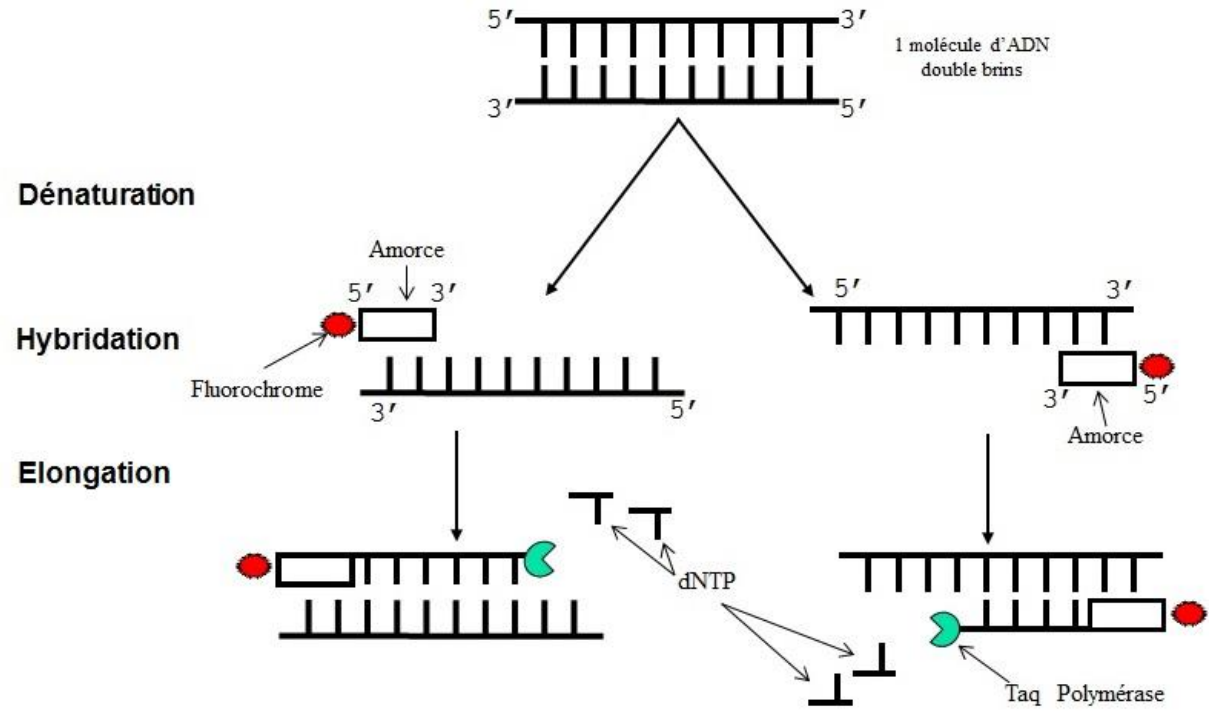
Au vu du nombre de plaques estimées à effectuer quotidiennement dans le cadre du traitement des dossiers de PMD, j'estime qu'aucune modification à la méthodologie actuelle n'est nécessaire.

2.1.4. Amplification de l'ADN par PCR

1. Principe

L'amplification de l'ADN par PCR consiste à multiplier de façon exponentielle la quantité de molécule d'ADN. La réaction de polymérisation en chaine de l'ADN utilise les fonctions d'une enzyme thermo résistante appelée Taq Polymérase, cette enzyme permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire au brin d'ADN lui servant de modèle. Pour fonctionner ainsi, la Taq Polymérase a besoin notamment d'un couple d'amorces spécifique permettant de borner le locus recherché, de dNTP et de Chlorure de Magnésium (MgCl2). Comme le montre la Figure 5, lors d'un cycle de PCR, une molécule d'ADN double brins est dénaturée à forte température (généralement réalisé à 95°C), viennent ensuite se fixer les amorces (l'hybridation des amorces se fait à une température aux alentours de 60°C, qui dépend de la séquence des amorces), La Taq Polymérase peut alors polymériser l'ADN de manière complémentaire au brin matrice (étape réalisé à 72°C, température où l'enzyme est à son maximum d'efficacité). Ainsi à partir d'une molécule d'ADN double brins, au bout d'un cycle de PCR, nous obtenons 2 molécules d'ADN double brins

Figure 5 : Principe de l'amplification de l'ADN par PCR



Comme l'indique la Figure 5, ce sont les couples d'amorces qui sont marqués à l'aide d'un fluorochromes (les amorces d'un même couple sont marquées par un même fluorochromes, mais les différents couples d'amorces peuvent être marqués par des

fluorochromes différents). C'est ce marquage des amorces par les fluorochromes qui permettra la détection des fragments d'ADN lors de l'électrophorèse capillaire.

En règle générale, l'ensemble du génome n'est pas amplifié, mais seulement certains locus définis le sont. Dans le domaine Médico-Légal, les locus qui nous intéressent sont des locus qui présentent des séquences répétées en tandem (STR) et notamment des microsatellites (séquences répétées d'un motif allant de 2 à 6 paires de bases). Les microsatellites les plus souvent analysés dans notre domaine de par leur polymorphisme important et leur stabilité dans le temps, sont des tétranucléotides (STR ayant un motif à 4 paires de bases).

C'est à partir des connaissances sur ces microsatellites, que les fabricants de kits d'amplification de l'ADN ont travaillé afin de mettre au point des kits permettant maintenant l'amplification simultanée de 16 locus différents. Locus ayant été choisi notamment pour leur polymorphisme important.

2. La méthodologie actuelle

Le kit commercial fournit par la société PROMEGA que nous utilisons principalement au laboratoire est le Kit PowerPlex®16 HS[(5)], permet l'amplification simultanée de 16 locus différents (Cf. Tableau 7).

Tableau 7 : *Liste des locus du kit PowerPlex®16 HS*

Locus	Localisation chromosomique	Fluorochrome associé	Allèles de la 2800M
D3S1358	3p	FL	17-18
TH01	11p15.5	FL	6-9.3
D21S11	21q1-21q21	FL	29-31.2
D18S51	18q21.3	FL	16-18
Penta E	15q	FL	7-14
D5S818	5q23.3-32	JOE	12-12
D13S317	13q22-q31	JOE	9-11
D7S820	7q11.21-22	JOE	8-11
D16S539	16q24.1	JOE	9-13
CSF1PO	5q33.3-34	JOE	12-12
Penta D	21q	JOE	12-13
Amélogénine	Xp22.1-22.3 et Y	TMR	X-Y
D8S1179	8q24.13	TMR	14-15
vWA	12p13.31	TMR	16-19
TPOX	2p24-2pter	TMR	11-11
FGA	4q28	TMR	20-23

FL : Fluorescéine, TMR : Tamra

Le kit PowerPlex®16 HS ayant fait l'objet d'un dossier de validation pour permettre son utilisation sous notre accréditation COFRAC (Comité Français d'Accréditation) pour l'analyse de nos échantillons de production, permettant également de répondre aux exigences de la loi et de l'appel d'offre qui précise les locus devant être analysés par nos analyses (Cf. Tableau 2).et enfin pour des raisons économiques (l'augmentation du nombre de réactions que nous réaliserons nous permettant de diminuer le coût d'achat d'un kit), le choix est fait d'utiliser ce kit dans les cadres des analyses de l'appel d'offre.

Dans une plaque de PCR (plaque de 96 puits), deux puits de la plaque sont réservés aux dépôts d'un Témoin positif de PCR (l'ADN témoin est fourni dans le kit PowerPlex®16 HS, il s'agit du « 2800 M »), et un troisième puits est réservé pour le Blanc de PCR. Le témoin positif permet de vérifier à la fois que l'amplification s'est bien déroulée mais également que l'assignation des pics de fluorescence permet d'obtenir le profil génétique attendu, les allèles pour chacun des 16 locus du kit ont été définis par le fabricant (Cf. Tableau 3). Le Blanc de PCR permet de vérifier, quant à lui, que les réactifs du kit de PCR ne soient pas contaminés. L'ensemble de ces contrôles permettra au final de valider les profils génétiques que nous aurons obtenus.

Le temps de réalisation technique pour préparer une plaque complète est estimé à environ 1 heure et demie et son temps de run sur thermocycleur est d'environ 3 heures.

3. Les points de difficultés

Seule la quantité journalière de plaque de PCR à effectuer par jour dans le cadre des dossiers de PMD pourrait être une problématique pour le fonctionnement du laboratoire. La quantité journalière d'échantillons de PMD à analyser par jour étant estimée à 100 échantillons et sachant que nous pouvons intégrer 86 échantillons dans une plaque 96 puits (9 puits étant utilisés pour les contrôles nécessaires à la validation de la plaque), 2 plaques de PCR seront à réaliser quotidiennement.

Le laboratoire possède 5 appareils de types Thermocycleurs sur lesquels les programmes de PCR peuvent être appliqués, et sachant que le temps de run est d'approximativement 3 heures, il nous est possible d'effectuer jusqu'à 15 PCR lors d'une journée de travail. Au vu de l'occupation des appareils pour les dossiers de Production, l'ajout des 2 plaques de PCR reste possible.

4. Les modifications apportées à la méthodologie

Au vu du nombre de plaques estimées à effectuer quotidiennement dans le cadre du traitement des dossiers de PMD, j'ai estimé qu'aucune modification à la méthodologie actuelle n'est nécessaire.

2.1.5. Electrophorèse capillaire des produits de PCR

1. Principe

L'électrophorèse capillaire est la dernière étape du processus analytique, elle consiste à faire migrer les produits de PCR dans un capillaire contenant un polymère, cela grâce à un courant électrique. Les différents fragments d'ADN sont alors séparés par la taille (les fragments les plus petits migrent plus rapidement que les fragments de plus grandes tailles). Les fragments d'ADN passent au niveau d'une cellule de détection (les plus petits fragments passent les premiers au niveau de la cellule de détection), un laser permet l'excitation des fluorochromes, qui émettent alors une fluorescence captée par l'appareil. En fonction du fluorochrome associé au couple d'amorce d'un locus donné, il est possible de différencier plusieurs locus dont la taille des fragments serait proche. Nous avons donc une séparation des fragments d'ADN par leur taille, mais également par les fluorochromes utilisés.
Le jeu de 16 capillaires est rempli par un polymère de polyacrylamide fournit par la société Life Technologies. Ce polymère est renouvelé à chaque run de l'appareil (est appelé un « run » l'analyse par l'appareil de 16 échantillons migrant simultanément à travers le jeu de 16 capillaires).

2. La méthodologie actuelle

L'électrophorèse capillaire consiste simplement à prendre les produits de PCR afin d'effectuer une dénaturation de ceux-ci, dénaturation indispensable à la détection de l'ADN par le séquenceur.
La préparation de la plaque de PCR pour son passage dans le séquenceur est estimé à 15 minutes, ce temps est cours car le plan de plaque est identique à celui de la PCR, il suffit simplement au technicien de pipeter 1µL des produits de PCR et de les mettre dans une nouvelle plaque contenant un mélange de Formamide et du Standard de taille du kit. Le transfert des 1µL de produits de PCR est fait à l'aide

d’une pipette multicanaux, 8 canaux correspondant aux 8 puits d’une colonne de la plaque 96 puits, ainsi le transfert s’effectue par 12 pipetages au lieu de 96 lorsque la plaque est complète. La plaque est alors chauffée à 95°C pendant 3 minutes afin de dénaturer les doubles brins d’ADN.

Le temps que met l’appareil pour faire migrer les échantillons d’un run est d’environ 45 minutes, .ce temps est lié au paramètre du run qui est défini en respectant les consignes du fabricant du kit et qui permet la détection de l’ensemble des fragments d’ADN de nos échantillons dont les tailles peuvent atteindre environ 500 paires de bases. Il faut donc environ 4 heures et demie (6 runs de 45 minutes chacun) pour que le séquenceur puisse analyser l’ensemble des échantillons d’une même plaque.

Une fois l'électrophorèse capillaire terminée, les résultats sont à traiter avec le logiciel d'analyse GeneMapper® ID v3.2. Le logiciel traite les données de fluorescence et nous montre, échantillon par échantillon, les résultats sous forme d'électrophorégrammes.

Le technicien analysant les résultats doit vérifier les points suivants. Tout d'abord la conformité des Standard de Tailles avec celui attendu, il doit comprendre l’ensemble des 22 fragments de taille allant de 60 paires de base (pb) à 600 pb, et l'intensité de fluorescence ne devant pas être inférieur à 500 RFU (Relative Fluorescence Unit). Une chute du signal lorsque la taille des fragments augmente pourrait indiquer un problème d'injection et nécessite la relance du run pour l’échantillon concerné. Le Standard de taille a pour rôle de faire le lien entre les échantillons et le marqueur allélique (MAL) d'un même run.

Le MAL est le répertoire des allèles les plus fréquents d’un locus donné, que le fabricant du kit a constaté lorsqu’il a effectué une étude de population. Ces MAL vont donc permettre de faire le lien entre la taille d’un pic de fluorescence obtenu sur nos échantillons et son numéro allélique.

Ensuite ils doivent vérifier les MAL, il y en a un par run. Le MAL correspond aux différents allèles les plus fréquemment retrouvés par le fabricant du kit, lorsqu'il effectua une analyse de population des marqueurs génétiques qu'il a sélectionnés pour un kit. Le technicien vérifie donc la présence de chacun des allèles répertorié pour chacun des locus analysé, ainsi que l'intensité de fluorescence moyenne de chacun des MAL.

Les Standards de tailles et les MAL vérifiés, le technicien vérifie l'ensemble des témoins se trouvant sur la plaque de PCR. Il doit constater l'absence d'amplification

pour les témoins d'extraction ainsi que pour le Blanc de PCR. Il doit également constater que le profil génétique du témoin positif de la PCR (2800M) correspond avec les allèles déterminés par le fabricant.
Tous les contrôles ayant été vérifiés, le technicien effectue alors le « nettoyage » des profils obtenus. Ceci consiste à supprimer les pics parasites, pics qui ne correspondent pas un allèle répertorié dans le MAL et donc l'aspect diffère de celui d'un pic correspondant à un véritable allèle.
Ensuite il effectue la recherche de contaminations en comparant chaque profil obtenu avec les autres profils de la même PCR (recherche de contamination entre le co-amplicons) et les compare également aux profils du personnel du laboratoire. La comparaison entre les profils obtenus sur une même PCR a pour but de s'assurer que les dépôts d'ADN dans la plaque de MIX n'ont pas contaminé un autre puits de la plaque que celui dans lequel il est déposé. La comparaison de ces profils avec ceux du Personnel du laboratoire permet de s'assurer qu'un personnel n'aurait pas contaminé l'extrait d'ADN (pendant les étapes de prélèvements ou d'extraction de l'ADN).
Le projet d'analyse ainsi terminé est exporté sur le réseau informatique afin d'être disponible aux experts qui devront réaliser l'interprétation des profils.

3. Les points de difficultés

Le point qui pourrait être bloquant est l'occupation des appareils afin que l'ensemble des runs journaliers puisse avoir été effectué. Le nombre de plaques à passer sur les appareils correspondant au nombre de plaques de PCR réalisées, 2 plaques quotidiennes seront donc à faire migrer sur nos séquenceurs. Ces 2 plaques représentent 12 runs de 45 minutes, soit 9 heures d'occupation d'un appareil. Les analyses, une fois paramétrées et démarrées sur le séquenceur, celles-ci peuvent se déroulées sans avoir besoin d'une intervention ou d'une surveillance par un technicien, les runs peuvent donc avoir durant la nuit. Le nombre de plaques spécifiques des dossiers de PMD peut, au regard du nombre d'appareil et de leur taux d'occupation par les dossiers de Production, s'insérer dans le flux quotidien des analyses. Toutefois occuper un appareil durant les heures d'ouverture du laboratoire, pouvant rendre difficile le passage des runs associés aux urgences, les runs des dossiers de PMD devront débuter préférentiellement en toute fin de journée et s'étendre durant la nuit.

4. Les modifications apportées à la méthodologie

Notre système Qualité ainsi que les paramètres du Marché précisant que les analyses doivent s'effectuer dans les conditions prescrites par le fabricant du kit, ou qu'en cas de modifications décidées par le laboratoire, celui-ci doit démontrer que les résultats qu'il obtient sont les mêmes qu'en respectant les conditions du fournisseur du kit. Notre laboratoire décide de conserver tous les paramètres déjà utilisés pour les dossiers de Productions et qui correspondent également aux recommandations du fabricant du kit de PCR.

Une seule et unique modification est apportée par rapport à l'analyse des dossiers de Production. Cette modification concerne les paramètres d'analyses par le logiciel Genemapper, et plus particulièrement il concerne le seuil d'assignation des allèles. En effet pour l'analyse de nos dossiers de Production, le Technicien utilise un « Analysis Method » (l' « Analysis Method » dans le logiciel Genemapper indique pour chaque échantillon certains paramètres d'analyses comme l'intensité de fluorescence minimale à partir de laquelle un pic est alors considéré comme un allèle, ou bien encore les bornes de la fenêtre de lecture) qui définit que tout pic de fluorescence supérieur à 50 RFU est considéré comme un allèle et permet donc son assignation. Le nombre de plaque à analyser étant plus important que pour nos dossiers de production, je propose de modifier ce seuil d'assignation des pics à partir de 100 RFU au lieu des 50 RFU. Cette modification limite l'assignation de pic de faible intensité, pouvant correspondre à du bruit de fond et donc réduis le temps nécessaire au technicien pour réaliser le « nettoyage » des profils obtenus et de diminuer également les risques d'erreur d'interprétation par le rédacteur du rapport d'expertises. L'augmentation du seuil d'assignation augmente cependant le risque de ne pas tenir compte d'un ADN présent en faible quantité dans l'extrait, mais l'interprétation de profils de faibles intensités ne permettant que rarement d'obtenir les 6 locus interprétables pour pouvoir transmettre au FNAEG l'empreinte génétique, le risque est donc faible par rapport au gain de temps que la modification de l'« Analyse Method » apporte. Dans le cas où un profil, présenterai des pics de faibles intensités, seul un expert pourra valider la caractérisation de l'empreinte génétique

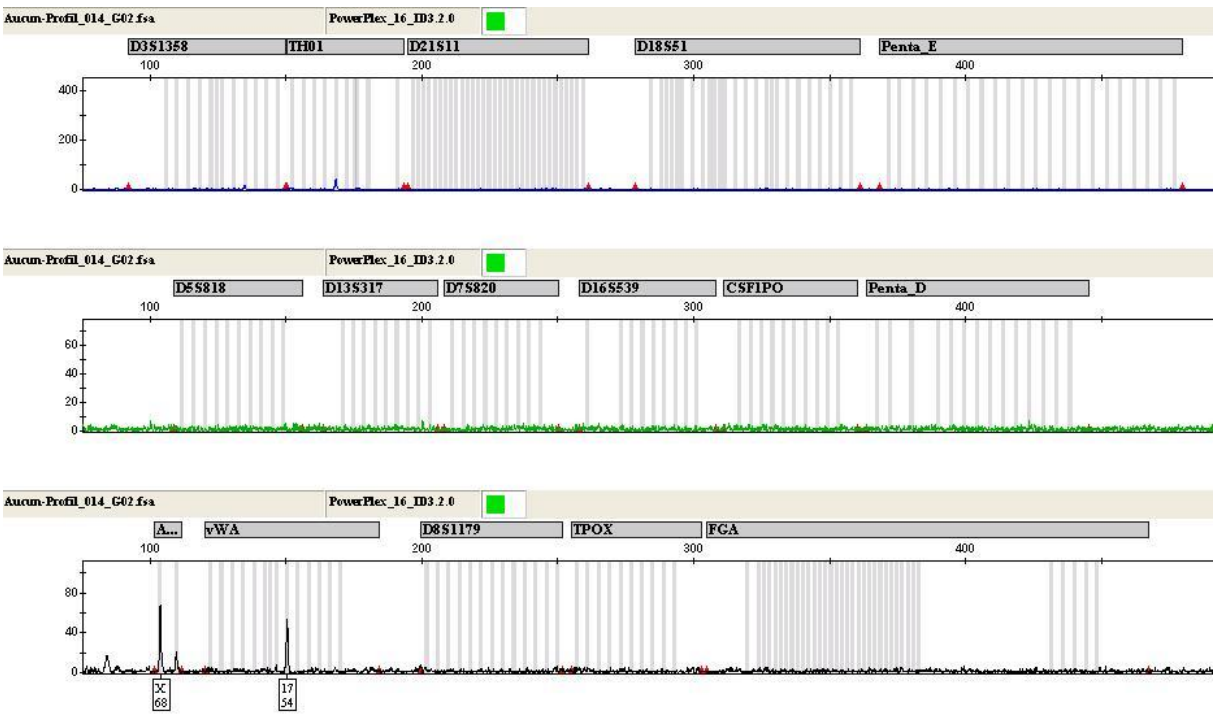
2.1.6. Production des résultats

Dans le cadre des dossiers de Production, les électrophorégrammes sont interprétés par l'expert en charge du dossier qui rédige son rapport d'expertise. De ces interprétations il va ensuite rédiger le rapport d'expertise ainsi que générer les fiches FNAEG qui permettront l'enregistrement des empreintes génétiques dans la base de données du FNAEG.

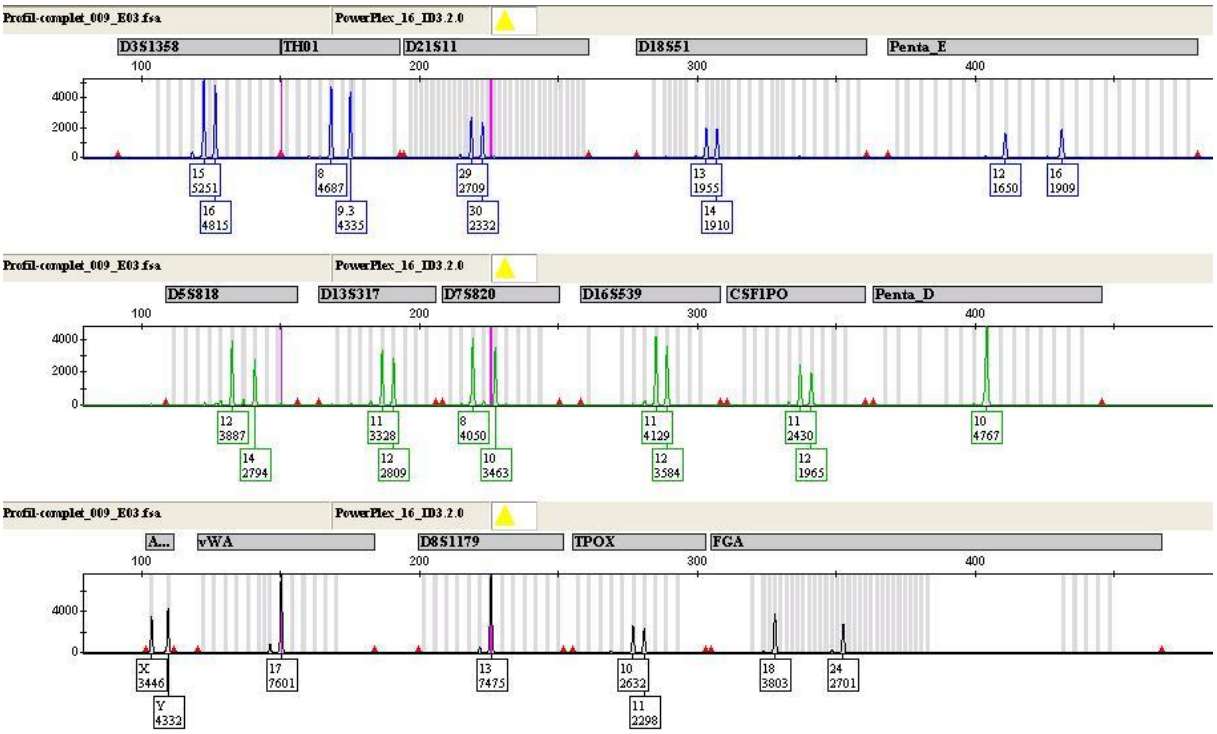
Le coût d'une analyse PMD étant beaucoup plus faible que celle d'un dossier de production (76€ pour la PMD contre 180€ pour des dossiers sans urgences particulières), il a fallu que je mette en place des solutions pour réduire le coût de reviens de ces analyses. Le coût du Personnel étant une grande partie du coût total des analyses, et notamment celui associé aux temps passé par l'expert, il nous fallait donc réduire au maximum le temps qu'un expert aura à consacrer aux dossiers. Pour cela le laboratoire décide de confier l'interprétation des électrophorégrammes et la rédaction des rapports d'expertises à l'ingénieur Production en charge de la PMD et à son assistant ingénieur. Cependant en cas d'interprétation de profils complexes (mélanges interprétables ou profils partiels (Cf. Figure 6a à 6f), celles-ci seront soumises à validation par un expert (Cf. Figure 7)

Figure 6 : *Exemples de résultats :*

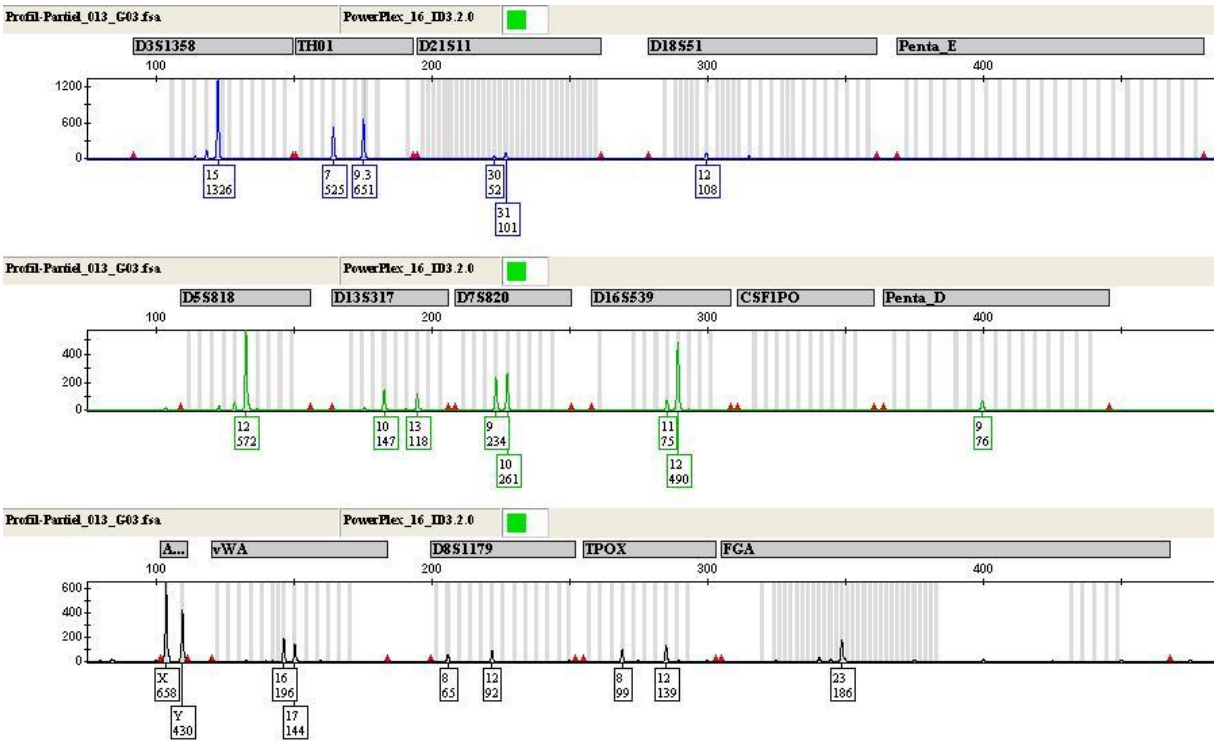
a) Aucun Profil



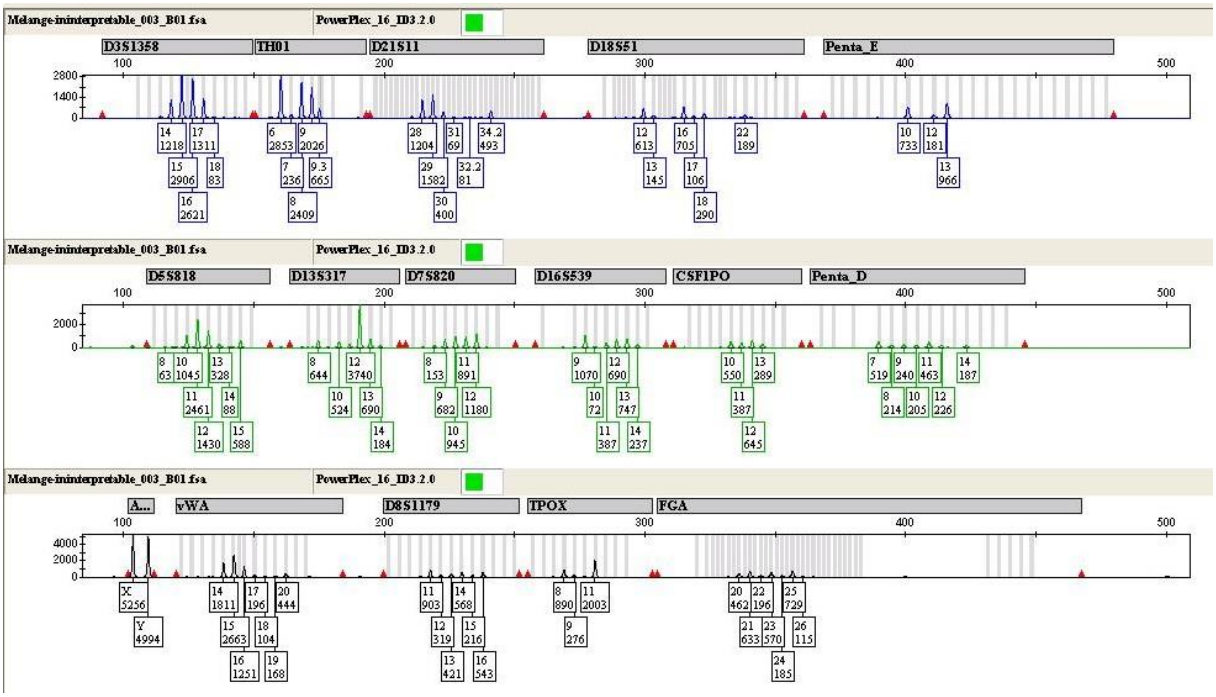
b) Profil complet



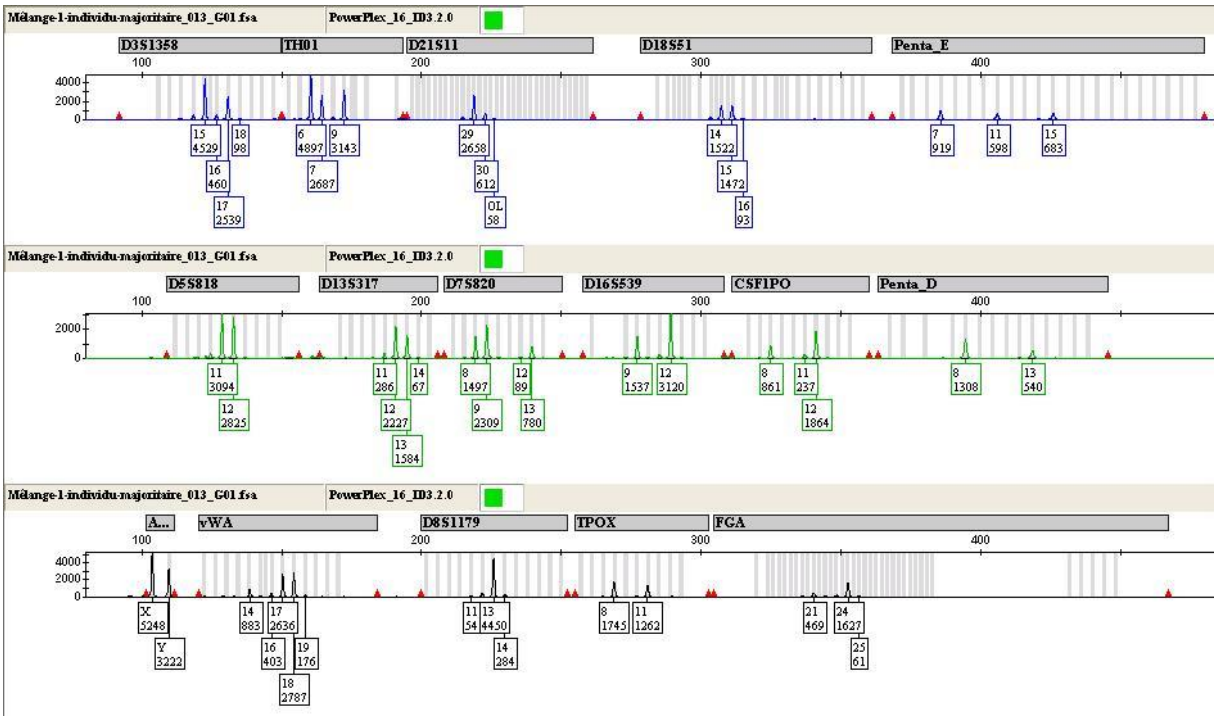
c) Profil Partiel



d) Mélange ininterprétable



e) Mélange dont une empreinte génétique majoritaire



f) Mélange de 2 individus

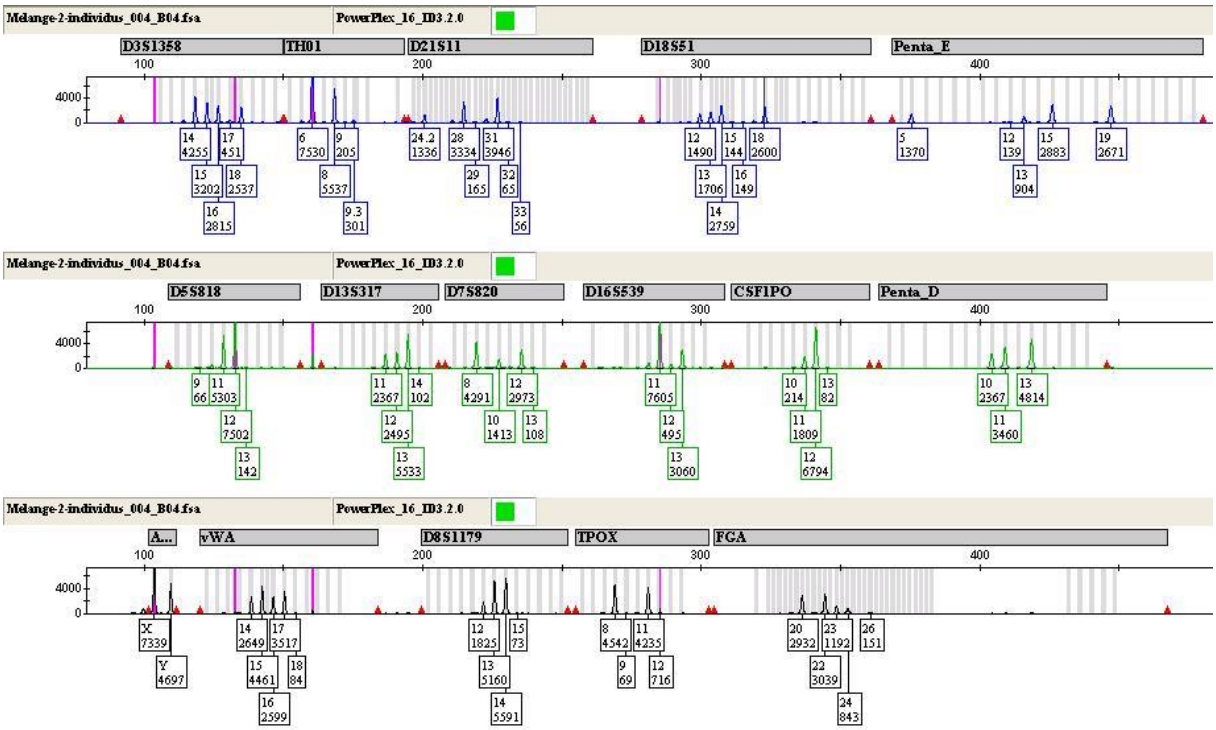
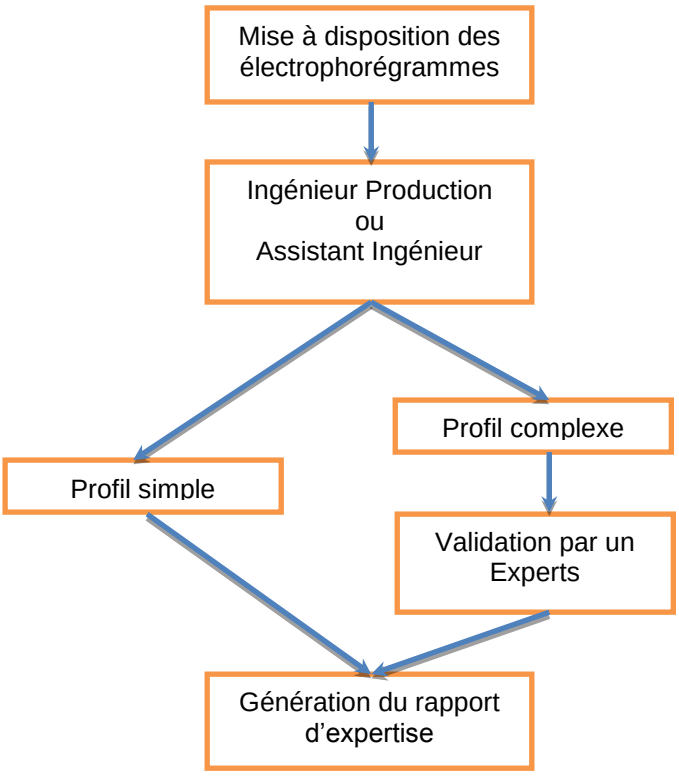


Figure 7 : *Schéma de production des rapports d'expertises*



Pour aider à l'interprétation des électrophorégrammes des règles simples ont été définies par les experts (Cf. Tableau 8)

Tableau 8 : *Recommandations pour l'interprétation des électrophorégrammes*

• Intensités des allèles supérieures à 100 RFU
• Stutter au maximum à 10% de l'allèle
• 2 allèles au maximum par locus
• Rapport d'hétérozygotie entre deux allèles du même locus supérieur à 0,5
• 6 locus au minimum déterminés pour 2 allèles pour valider une empreinte génétique

Stutter : Phénomène lié à une erreur de lecture par la Taq Polymérase entrainant l'obtention d'un fragment plus court d'un motif répété

L'ensemble des électrophorégrammes d'un dossier interprétés, le rapport peut être rédigé par l'ingénieur production ou l'assistant ingénieur. Le modèle de rapport a été simplifié par les experts et se résume en 2 parties, la première partie étant administrative (désignation de l'expert et rappel de l'ensemble des informations permettant au requérant de rattacher notre rapport à sa procédure, et une seconde partie technique se résumant en 2 tableaux (Cf. Annexe 1). Le premier tableau récapitule les différents scellés et leurs prélèvements et donne les résultats obtenus pour chacun d'entre eux (en précisant le cas échéant le résultat d'une recherche de sang et la fréquence du profil dans la population). Le second tableau indique pour chacun de ces mêmes scellés, les conditions quant à l'envoi au FNAEG d'une empreinte génétique et à l'envoi d'un scellé et/ou de l'extrait ADN associé au SCPPB.

Le rapport écrit est alors imprimé puis communiqué au secrétariat afin que celui-ci soit complété avec les informations administratives et envoyé au requérant

2.1.7. Dépôts d'extraits d'ADN et destruction

Le rapport d'expertise rédigé, les extraits d'ADN sont soit détruits, soit déposés sur une carte FTA® (Fast Technology for Analysis) afin de permettre leurs envois au Service Central de préservation des prélèvements biologiques (SCPPB).

Tous les extraits d'ADN n'ayant pas permis de déterminer une empreinte génétique sont détruits à l'issue des analyses. Lorsqu'une empreinte génétique est caractérisée, le ou l'un des extraits d'ADN l'ayant permis est déposé sur la carte FTA®. Dans le cas où plusieurs prélèvements ont permis la caractérisation de la

même empreinte génétique, l'extrait d'ADN où l'empreinte est la plus complète est déposée (si plusieurs prélèvements ont permis l'obtention du profil complet, c'est l'extrait d'ADN dont le facteur de dilution appliqué pour la PCR est le plus important qui doit être déposé). Les autres extraits d'ADN qui ont permis la caractérisation de la même empreinte génétique seront détruits à l'issue des analyses.

Pour chaque dépôt réalisé, soit il reste l'objet du scellé, auquel cas le dépôt FTA est placé à l'intérieur du scellé et l'ensemble est transmis au SCPPB, soit le scellé a été utilisé dans sa totalité pour les besoins des analyses (cas des écouvillons réalisés par les enquêteurs) et auquel cas le dépôt FTA est mis sous scellé d'expert et envoyé au SCPPB.

Pour réaliser les dépôts sur carte FTA®, le technicien récupère auprès des rédacteurs des dossiers de PMD, les formulaires sur lesquels sont indiqués les dépôts à réaliser (le numéro de dossier, le numéro de l'extrait d'ADN à déposer, le numéro de scellé associé, le numéro de la PCR sur laquelle l'échantillon a été amplifié et le fait que le dépôt sera ou non un scellé d'expert, sont indiqués et des étiquettes correspondant au code à barres du FNAEG sont imprimées en trois exemplaires (le premier pour le formulaire, le second sera mis sur la carte FTA® et le troisième sera collé sur l'enveloppe qui contient la carte FTA® ainsi qu'une étiquette avec le numéro du scellé si le dépôt FTA correspond à un scellé d'expert (dans les cas où les scellés ont été utilisé en totalité pour les raisons d'analyse).

2.2. Les besoins en équipements

2.2.1. Matériels nécessaire à l'extraction

L'extraction de l'ADN à l'aide du kit DNA IQ^{TM} Casework Pro est effectuée par un automate de chez PROMEGA, le Maxwell® 16 Forensic Instrument. Cet appareil permet l'extraction de 16 échantillons simultanément. Le programme d'extraction de l'ADN par l'automate dure environ 30 minutes, auquel il faut ajouter 15 minutes de fonctionnement de la lampe UV, servant à décontaminer l'intérieur de l'enceinte de l'appareil. Le lot que nous avons obtenu entraine le passage quotidien d'environ 130 échantillons en extraction, soit en moyenne 8 séries à extraire par jour. Au vu du temps pour chaque série auquel il faut ajouter le temps de préparation (notamment l'heure de lyse) et le temps nécessaire en fin de journée afin de préparer le matériel

pour la journée suivante, j'ai estimé que le besoin en automate serait de deux appareils.

Afin de garantir leur fonctionnement durant toute la période de l'appel d'offre, les deux appareils font l'objet d'un contrat de maintenance qui permettra une intervention rapide de PROMEGA pour remettre l'appareil en état de fonctionner. Les contrats de maintenance de ces appareils prévoient un contrôle annuel de chacun des appareils par des techniciens du fabricant, ce contrôle annuel permet la mise à jour éventuelle du logiciel et également la vérification du calibrage (alignement du jeu de barres aimantées) et du bon fonctionnement de l'appareil.

Seront également nécessaire les équipements suivants : Deux vortex, deux centrifugeuses avec rotor pour 24 microtubes de 1,5 ml (Centrifugeuse EPPENDORF modèle 5424), deux stérilisateurs à billes.

2.2.2. Matériels nécessaire à la quantification

Nos appareils de QPCR (PCR Quantitative) de la marque STRATAGENE modèle MX3000P, sont déjà en place. Comme le montre la Figure 8, une plaque 96 puits contient déjà 20 puits rempli par la gamme étalon et des contrôles, il reste donc 76 puits pouvant contenir nos échantillons et sachant que pour chaque échantillon nous utilisons 2 puits (un pour l'extrait d'ADN au pur et un second pour sa dilution au 1/20^{e}), une plaque 96 puits nous permets donc de passer 38 échantillons.

Figure 8 : *Plan de plaque d'une quantification*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50ng/µL	50ng/µL	NTC	NTC	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°
B	16.667ng/µL	16.667ng/µL	CQI	CQI	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°
C	5.556ng/µL	5.556ng/µL	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°
D	1.852ng/µL	1.852ng/µL	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°
E	0.617ng/µL	0.617ng/µL	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°
F	0.206ng/µL	0.206ng/µL	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°
G	0.069ng/µL	0.069ng/µL	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°
H	0.023ng/µL	0.023ng/µL	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°	Echantillon PUR	Echantillon 1/20°

NTC : contrôle négatif – CQI : Contrôle Qualité Interne

Le nombre d'échantillons à traiter par jour étant estimé en moyenne à 100 (Cf. Tableau 1), il faudrait donc réaliser 3 plaques par jour.

Le laboratoire possédant deux appareils, la quantité quotidienne de plaques de quantification reste compatible avec leur occupation actuelle (les deux appareils pouvant permettre d'effectuer environ 10 plaques de QPCR par jour).en cas de

panne de l'un ou l'autre de nos appareils la quantité journalière de QPCR à réaliser serait toujours possible (3 plaques quotidiennes pour la PMD, alors qu'un seul appareil permet d'en réaliser 5 par jour). Cependant la quantité à réaliser par jour dans le cadre des dossiers de production étant aléatoire et sujette notamment à des urgences, la panne d'un des 2 appareils pourrait néanmoins retarder la réalisation de certaines plaques d'échantillons de PMD. Dans ce cas, il nous sera possible d'élargir momentanément l'amplitude horaire des techniciens et ainsi permettre la réalisation de l'ensemble des plaques quotidiennes.

Tout comme les automates Maxwell® 16 Forensic Instrument, nos appareils de PCR en temps réel sont sous contrat de maintenance, nous garantissant ainsi une intervention rapide en cas de panne de l'un des appareils (envoi de l'appareil de prêt dans un délai de 24h maximum). Le contrat de maintenance prévoit également un contrôle annuel de l'appareil par le fabricant, contrôle s'effectuant par le passage d'une plaque test dont les résultats leurs sont transmis pour validation. Dans le cas où la plaque test montrerait des résultats anormaux, l'appareil est récupéré par leur Service Après-Vente (SAV) afin de le remettre en état. La périodicité des contrôles étant prévu par le fabricant dans le cas d'une utilisation importante, la périodicité des contrôles n'est donc pas remise en question par l'augmentation du nombre de plaque réalisée liée au traitement des dossiers de PMD.

2.2.3. Matériels nécessaire à l'amplification par PCR

Le nombre d'échantillons à passer en PCR dépend du résultat de la quantification de l'ADN dans les extraits d'ADN. Un échantillon dont la quantification aurait déterminé l'absence d'ADN, ne sera pas amplifier par PCR, mais un échantillon dont la quantification déterminera une concentration en ADN faible (inférieure à 0,020 ng/µL), sera amplifié deux fois par PCR. Ce doublement de l'amplification en cas de concentration en ADN de notre extrait inférieure à 0,020ng/µL, est dû au fait qu'à ces niveaux de concentration les profils obtenus présentent des défauts de reproductibilité. La double amplification permettra donc de rendre les allèles d'un locus se retrouvant sur chacune des 2 amplifications. Sur une plaque de 96 puits, une fois les contrôles mis en place (Témoins positifs, Blanc de PCR et MAL), il reste 87 puits libre pour nos échantillons (Cf. Figure 9).

Figure 9 : *Plan de plaque d'une amplification de l'ADN par PCR*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**2800M**	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	**2800M**	Echantillon	Echantillon	Echantillon	**MAL**	Echantillon
B	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon
C	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon
D	Echantillon	Echantillon	Echantillon	**MAL**	**MAL**	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon
E	Echantillon	**BLANC**	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon
F	Echantillon	**MAL**	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	**MAL**	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon
G	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon
H	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	**MAL**	Echantillon	Echantillon

2800M : contrôle positif – MAL : Marqueur Allélique

Donc à raison de 95 échantillons quotidiens, la réalisation de deux Plaque de PCR doit suffire à traiter les échantillons quotidiens.

Le laboratoire possède 4 Thermocycleurs modèle 9700 de chez Life Technologies, le passage de deux PCR par jour reste compatible avec le nombre d'appareil et les analyses autres que celles de l'appel d'offre.

Chacun de ces Thermocycleurs est sous contrat de maintenance avec le fabricant. Cela permet, de la même manière que pour les appareils de PCR en temps réel, d'obtenir une intervention rapide en cas de panne de l'un des appareils. Le contrat de maintenance prévoit également un contrôle annuel, permettant la vérification du fonctionnement global du Thermocycleur et un contrôle métrologique (contrôles des températures appliquées par le bloc chauffant) qui garantit les conditions de l'amplification de l'ADN par PCR. La périodicité des contrôles étant prévu par le fabricant dans le cas d'une utilisation importante, la périodicité des contrôles n'est donc pas remise en question par l'augmentation du nombre de plaque réalisée liée au traitement des dossiers de PMD.

2.2.4. Matériels nécessaire à l'électrophorèse capillaire

La réalisation des électrophorèses capillaire nécessite l'accès à des appareils de types Séquenceurs. Le laboratoire possède trois appareils de modèle 3130xl de chez Life Technologies. Les deux plaques de PCR quotidienne représentent 12 runs (6 runs par plaque de 96 puits) à faire passer sur les séquenceurs, sachant qu'un run a

une durée d'environ 45 minutes, l'appel d'offre occupera donc les appareils à raison de 9 h par jour. Cependant les appareils pouvant accepter deux plaques simultanément, qui seront traitées l'une après l'autre, et sachant que les runs peuvent s'effectuer la nuit sans le besoin d'avoir un technicien durant les runs, le passage des deux plaques par jour reste donc possible.

Chaque Séquenceurs est sous contrat de maintenance, afin d'obtenir une intervention rapide en cas de panne (l'intervention doit avoir lieu dans les 48h qui suive la prise de contact avec leur SAV pour décrire la panne). Le contrat de maintenance prévoit l'intervention sur site de l'un de leur technicien et le remplacement de toutes pièces défectueuses. Une visite annuelle est également prévue dans le contrat de maintenance, afin de contrôler l'état général de l'appareil et de vérifier plus précisément le réglage de l'optique. Le réglage de l'optique est essentiel afin d'obtenir des résultats homogènes entre les différents capillaires, il permet de vérifier et d'ajuster si nécessaire les optiques afin que chacun des 16 capillaires soit balayé par la même quantité d'énergie lumineuse. Ce contrôle annuel étant prévu dans les contrats de maintenance, même en cas d'utilisation importante de l'appareil, nous ne remettons pas en question la périodicité de ces contrôles.

2.3. Les Ressources Humaines

2.3.1. Les besoins en personnel

Les Ressources Humaines sont une part importante dans le calcul du coût de l'analyse, la difficulté principale pour prévoir le personnel nécessaire à l'appel d'offre réside sur le flux journalier d'arrivé des analyses qui risque d'être irrégulier. Le transport des scellés étant à la charge des enquêteurs, contrairement à nos dossiers de production dont le transport des scellés est préparé par notre secrétariat, il nous est impossible de connaitre avec précision la quantité journalière d'analyse qui nous arrive au laboratoire dans le cadre de la PMD. La quantité de personnels recrutée pour traiter les analyses de l'appel d'offre doit être la plus juste possible, ni trop peu ce qui pourrait entrainer une prise de retard dans nos analyses, ni trop importante ce qui provoquerait une baisse du bénéfice, voire de générer une perte financière pour le laboratoire.

Afin de déterminer la quantité de ressources humaines nécessaire au traitement du Marché, j'ai examiné à partir de nos dossiers de production, le temps moyen que nous prends chacune des étapes du processus analytique (Cf. Tableau 9), j'en déduis ainsi le temps qu'il sera nécessaire pour traiter la quantité d'analyses moyenne quotidienne, si je choisissais de conserver le fonctionnement pratiqué pour nos dossiers de production.

Tableau 9 : *Mesure du temps pris par un technicien pour chacune des étapes du processus analytique*

Etape du processus	Temps mesuré	Temps nécessaire à l'absorption du flux quotidien (100 prélèvements / jour)
Prélèvements	1 heure pour 10 prélèvements	10 heures
Extraction de l'ADN*	7 heures pour 4 séries de 15 échantillons	2 jours
Quantification (préparation de la plaque et analyses des données)	2 heures pour 1 plaque 96 puits	6 heures
Amplification de l'ADN par PCR	1 heure pour réaliser 1 plaque 96 puits	2 heures
Electrophorèse capillaire (réalisation de la dénaturation)	20 minutes pour 1 plaque 96 puits	40 minutes
Analyses des données brutes	1 heure pour 1 plaque 96 puits	2 heures

* : extraction réalisée par la Méthode du Phénol / Chloroforme

Contrairement à notre fonctionnement habituel, au vu de cette masse d'échantillon quotidien à traiter, ainsi que du faible coût à laquelle est facturé l'analyse PMD, j'envisage que les techniciens soient postés à une tache précise durant une période donnée. Cette méthodologie tirée du monde de la grande industrie (« rotating system »), va nous permettre de former chaque technicien, pour débuter le Marché, que sur une des manipulations du processus analytique au lieu de l'ensemble des techniques du processus. Ainsi le temps de formation pour qu'un technicien soit opérationnel est réduit de façon considérable, puisqu'il ne sera habilité que pour la manipulation du poste qu'il va occuper dans un premier temps. Les postes seront les suivants : Prélèvements, Extraction, Quantification / PCR / électrophorèse capillaire et Analyses des données brutes. Les ressources humaines sont limitées par les places disponibles dans les pièces de manipulations, toutefois en cas d'augmentation importante de la quantité d'analyses à effectuer quotidiennement, le

laboratoire prévoit l'augmentation de sa plage horaire d'ouverture pour les postes qui le nécessite, voire pour l'ensemble des postes.

Des offres d'emplois sont donc mises en circulation, afin de percevoir des candidatures. Afin d'avoir un maximum de flexibilité avec l'ensemble des personnels qui travailleront dans l'équipe de l'analyse des dossiers de PMD, nous précisons dans notre proposition de recrutement que le personnel sera amené à effectuer les taches techniques comme les tâches administratives (effectuer les enregistrements des dossiers ou bien effectuer le renvoi du rapport d'expertise au requérant), cette polyvalence a pour but de prévoir les absences pour congés ou pour d'autres motifs. Les entretiens d'embauches sont réalisés par le chef de projet et par moi-même quand il s'agit de personne à compétences techniques (quelques personnels ont été recrutés uniquement avec des compétences administratives pour assurer une équipe administrative minimale). Nous avons définis des critères de sélection, le critère principal étant le diplôme en possession du candidat, il doit avoir au minimum un BTS (Brevet de Technicien Supérieur) ou un DUT (Diplôme Universitaire de Technologie) en relation avec le travail en laboratoire. Même si les personnes venant d'obtenir leur diplôme sont acceptées, il sera nécessaire que leur expériences professionnelles (pouvant donc être limitée à leur stage de fin d'études) leurs est permis d'acquérir rigueur et gestion des risques de contamination. Le fait qu'un candidat montre des connaissances en terme d'Assurance Qualité et d'utilisation d'un LIMS sera un plus.

2.3.2. La formation du nouveau personnel

Les besoins en formations sont de type : théorique ou pratique. Les formations théoriques ont pour rôle d'apporter ou rappeler les connaissances de bases et de décrire comment fonctionne chacune des étapes du processus analytique, tandis que les formations pratique permettent, d'une part, que les techniciens se familiarisent avec leurs pièces de travail, et d'autre part de s'assurer que le technicien effectuera les analyses qui lui seront attribuées de la manière souhaitée par le laboratoire.

Les personnels techniques recrutés ayant des niveaux d'études et d'expériences différents, les formations seront à adapter à chacun d'entre eux, en effet nous avons recruté des techniciens de niveau d'études diverses (sortant de leur BTS / DUT ou ayant un MASTER) avec pour certain et quel que soit leur niveau d'études, de

l’expérience professionnelle ou une expérience se limitant à leurs stages de fin d’études. Quelque soit leur niveau de départ, le temps pour leur formation est limité par l’arrivée des premiers scellés à analyser dans la chaîne PMD, temps se limitant à environ 4 semaines. Ce laps de temps doit nous permettre de faire acquérir à chaque technicien les notions d’Assurance Qualité et notamment la notions de traçabilité de nos analyses, ainsi que de le rendre opérationnel sur l’une des étapes du processus analytique.

Une première formation générale et succincte (formation se déroulant sur une demie journée), présentant le laboratoire et les analyses qui seront à effectuées, est donc faite à l'ensemble du personnel recruté durant les premiers jours de leur contrat à l'IFEG par la Responsable de la chaîne PMD (pour la partie présentation du laboratoire) et de l’ingénieur production en charge de la PMD (pour la partie décrivant le processus analytique). Cette formation a pour but de leur donner ou redonner les bases de la Biologie Moléculaire qui leurs serviront à réaliser et comprendre les analyses qu'ils devront effectuer. Pour compléter cette formation générale et afin que le nouveau personnel appréhende mieux la manière de travailler du laboratoire, une formation sur l’assurance qualité (formation se déroulant sur une demie journée) leur ai faite par la Responsable de l’assurance qualité du laboratoire. Cette formation leur décrit la politique qualité du laboratoire, le système documentaire, la traçabilité des échantillons, le système de gestion des problèmes rencontrés.

A la sortie des formations générales, chaque membre du personnel embauché dans le cadre de l'appel d'offre, s’est vu attribuer une première tâche. Une partie du personnel technique, sera assigné au secrétariat (Cf. §2.3.3 la gestion des absences), mais restera du personnel ayant la possibilité de passer en technique (sous réserve de formation à l’une des étapes du processus analytique). Le reste du personnel est alors assigné à la technique et je leur attribue leur premier poste, en fonction de leur compétence et de leur expérience pour les différentes étapes du processus analytique. Les techniciens ayant déjà une expérience en quantification par PCR en temps réels ainsi qu'en PCR et électrophorèse capillaire sont positionnés sur ce poste, leurs expériences devant leur permettre d'intégrer plus facilement la formation théorique et leur autonomie au poste devant donc être plus rapide. J’ai estimé le temps pour former un technicien sur ce poste entre 1 à 2 semaines. A contrario, les techniciens ayant pas ou peu d'expérience en laboratoire sont placés

sur les postes de prélèvements et d'extractions de l'ADN. Le temps de formation estimé pour ces 2 étapes du processus analytiques étant plus court que celui du poste des QPCR, PCR et des électrophorèses capillaires. En effet j'ai estimé le temps de formation au poste d'extraction d'ADN avec le Maxwell® 16 Forensic Instrument à environ 1 semaine et pour la réalisation des prélèvements à partir d'un écouvillon réalisé par les services d'enquêtes à une journée. Le temps de formation prévu est plus court que les autres étapes, étant donné le type d'échantillons à prélever (principalement des écouvillons) et la méthode d'extraction à l'aide du kit DNAIQ Casework Pro et de l'automate Maxwell® 16 Forensic Instrument, dont la difficulté technique est plus faible que celle de l'extraction de l'ADN par la méthode du Phénol/Chloroforme, car elle ne nécessite pas de séparation de phases comme le nécessite l'extraction par la méthode du Phénol/Chloroforme.

Suite à l'attribution de leur poste, je réalise les formations théoriques spécifiques à leur poste. Pour les prélèvements PMD, je n'effectue pas de formation théorique spécifique au vu de la simplification de l'étape de prélèvements, d'une part par les paramètres même du marché (un seul prélèvement par scellé et principalement des écouvillons, et d'autre part par les évolutions que j'ai apportées à notre procédure de prélèvements (mise à disposition des prélèvements type selon le support et mise à disposition de phrases types pour décrire le prélèvement réalisé). Seule la formation pratique est suffisante pour que les techniciens appréhendent cette étape du processus.

Une formation spécifique à l'extraction d'ADN à l'aide du kit DNA IQ^{TM} Casework Pro est effectuée, afin que les techniciens comprennent chaque geste qu'ils effectueront et de savoir ce qu'il se passe dans l'automate.

Je réalise également la formation théorique regroupant la quantification, la PCR et l'électrophorèse capillaire, réalisée afin de détailler les bases de ces différentes techniques et de décrire les kits utilisés.

Enfin comme pour les prélèvements, l'analyse des données brutes à l'aide du logiciel d'analyse ne requiert aucune formation théorique, seule la formation pratique est réalisée, le but n'étant pas d'interpréter les résultats, mais uniquement de préparer les données brutes sortant des séquenceurs afin qu'elles soient plus facilement interprétables par les experts.

Afin que chacun puisse avancer à la fois dans sa formation pratique et théorique, les formations théoriques sont faites individuellement ou par binôme en fonction du premier poste qu'ils occupent. La possibilité qu'un technicien soit formé sur un second poste ne pourra s'effectuer uniquement lorsque le technicien aura montré son autonomie sur son poste actuel

Les formations pratiques se déroulent en 3 phases : Observation, Réalisation de manipulation sous tutorat et Habilitation. La première phase, la phase d'observation, doit permettre au technicien en formation de se familiariser avec la pièce, le matériel, les réactifs et les consommables mais surtout avec le protocole et les différents contrôles définis par le laboratoire qui permettent de garantir une fiabilité de résultats maximale. Dans ce but, il va donc suivre un technicien réaliser la technique pour laquelle il doit être habilité, le technicien qu'il va suivre est nécessairement un technicien ayant obtenu son habilitation pour cette manipulation, afin de garantir la bonne maitrise de la technique et permettre la transmission dans les meilleures conditions. Cette phase d'observation peut être très rapide, notamment si la personne à former possède déjà une expérience du travail au laboratoire. Les formations pratiques commençant avant l'arrivée des premiers échantillons à analyser dans le cadre de la PMD, les formations pratiques se font à l'aide des manipulations réalisées pour nos dossiers de production. Ainsi, dès qu'un technicien de l'équipe de Production ira effectuer une manipulation, le technicien de l'équipe PMD, qui aura la charge de cette manipulation dans le cadre de l'appel d'offre, le suivra.

La seconde phase, phase de réalisation des manipulations sous tutorat, permet au technicien de mettre en pratique ce qu'il a observé, sous le contrôle d'un tuteur, le tuteur étant un technicien ayant son habilitation pour la manipulation réalisée. Nous inversons donc les rôles par rapport à la phase d'observation, c'est le technicien en cours de formation qui réalisera la manipulation tout en étant sous la surveillance du technicien de l'équipe de Production. Le nombre de manipulations qu'il devra ainsi effectuer sous la tutelle d'un technicien de l'équipe de Production dépend de l'étape du processus analytique (Cf. Tableau 10). Enfin une fois le nombre de manipulation minimum atteint et après que j'ai pu discuter avec le technicien en formation et son tuteur, je décide soit de faire poursuivre la phase de réalisation sous tutorat soit de passer à la dernière phase, la phase d'habilitation.

Cette phase d'habilitation se fait lorsque moi ou mon assistant ingénieur va observer le technicien à habiliter réaliser sa manipulation. L'ingénieur production va ainsi s'assurer que le technicien réalise la technique en respectant le protocole de la technique d'une part, montre ces bonnes pratiques en terme d'Assurance Qualité (gestion de risques de contamination par l'utilisation des protections individuelles à sa disposition, et par les différents autocontrôles mis en place par le laboratoire selon la manipulation à réaliser). L'ingénieur Production conclut soit par la nécessité de poursuivre la formation, dans le cas où le technicien n'aura pas été jugé apte à effectuer la technique seul, soit par l'habilitation signifiant que le technicien est apte à réaliser les manipulations de manière autonome en respectant les règles définies par le laboratoire.

Tableau 10 : *Critères d'habilitation des Techniciens*

COMPETENCE(S)		CRITERES D'HABILITATION INITIALE		CRITERES DE REHABILITATION		CRITERE DE MAINTIEN TECH
Prélèvement des traces	Ecouvillons	10 pièces de scellés		5 pièces de scellés		33 prélèvements / trimestre
	Vêtements (porteur et/ou contact)	5 pièces de scellés		2 pièces de scellés		
	Objets divers ①	10 pièces de scellés		5 pièces de scellés		
	EP	3 pièces de scellés		2 pièces de scellés		
Tests d'orientation	Benzidine	2 manip.	sous tutelle	1 manip.	sous tutelle	1 éch. / 6 mois
	Crimescope	5 manip.	sous tutelle	2 à 3 manip.	sous tutelle	1 éch. / trimestre
Extraction Maxwell (PMD)		2 manip.	sous tutelle	1 manip.	sous tutelle	1 manip./ trimestre
Quantification de l'ADN par PCR en temps réel sur MX3000P		3 manip.	sous tutelle	1 manip.	sous tutelle	38 éch. / trimestre
Purification des extraits d'ADN par MinElute		2 manip.	sous tutelle	1 manip.	sous tutelle	1 éch. / trimestre
PCR (ADN autosomal & ADN chromosome Y)		3 manip.	sous tutelle	1 manip.	sous tutelle	5 manip. / trimestre
Electrophorèse (ADN autosomal & ADN chromosome Y)		3 manip.	sous tutelle	1 manip.	sous tutelle	5 manip. / trimestre
Exploitation des résultats de génotypage (GeneMapper)		3 manip.	sous tutelle	1 manip.	sous tutelle	5 projets genemapper / trimestre
①	Concernant les objets, pour ceux qui ne seront pas réalisés dans le cadre de l'habilitation, le technicien devra prendre conseil auprès de l'ingénieur pour réaliser son premier prélèvement.					
Légende :	manip. : abréviation du mot manipulation					

Pour les formations à un second poste, la formation s'effectuera de la même manière, soit tout d'abord par de l'observation, ensuite la réalisation de manipulations sous tutelle et pour terminer l'habilitation. Cependant l'équipe de technicien de Production ayant une charge de travail importante, ce sont les techniciens de l'équipe PMD ayant obtenu leur habilitation sur le poste qui auront la charge de montrer puis surveiller le technicien en formation. L'habilitation est validée par moi-même ou l'assistant ingénieur lorsque leur formation pratique aura atteint les minimums requis.

2.3.3. La gestion des absences

Les techniciens étant formés dans un premier temps à un et unique poste, l'absence de l'un d'entre eux pourrait engendrer une perturbation dans le flux quotidien des analyses. Il sera donc nécessaire d'effectuer, le plus rapidement possible, une rotation de poste, afin que chacun puisse être opérationnel sur un second poste, et

ainsi nous permettre de mettre chaque jour les ressources humaines sur les postes où la quantité de travail est la plus importante. Cette possibilité de rotation de poste dépendra principalement du temps que les techniciens mettront à être autonome sur leurs postes actuels.

Lors de la préparation de la réponse du laboratoire à l'appel d'offre du ministère, nous avons prévu qu'une partie du personnel embauchée pour effectuer les tâches administratives devra être du personnel ayant une qualification technique. Ainsi en cas de besoin (absences pour maladies ou congés, fluctuation de l'arrivée des échantillons, etc.), il nous sera possible d'allouer le personnel en fonction des besoins du secrétariat ou de la technique.

2.3.4. L'analyses des coûts

Dès la diffusion de l'appel d'offre, nous nous sommes penchés sur le calcul du coût des analyses afin de déterminer le prix que nous pourrions proposer au ministère. Le prix facturé pour notre analyse doit tenir compte de 3 facteurs, le coût en réactifs et consommables, le coût en ressources humaines et le coût de gestion du laboratoire.

Le coût de gestion du laboratoire est relatif aux frais engendrés par l'utilisation de ressources du groupe dont notre laboratoire fait partie. Les ressources utilisées du groupe sont diverses, il s'agit du service social, de la comptabilité, du service informatique ou bien encore des services généraux. A cela, il faut ajouter les frais d'entretien de nos locaux (loyers et charges), dépenses principalement liées à la surface de locaux allouée à notre laboratoire ainsi qu'au nombre de salariés. Ces dépenses sont calculées par le responsable de la chaine automatisée.

Pour ma part, j'effectue l'analyse du coût en ressources humaines de la partie technique. Ce coût est calculé pour chaque étape du processus analytique en fonction du temps moyen estimé pour qu'un technicien effectue la manipulation, et le coût en réactifs et consommables est calculé, également pour chaque étape du processus analytique, selon les prix pratiqués par nos différents fournisseurs. Pour le calcul de ces deux coûts, je tiens compte de l'ensemble des contrôles nécessaires à la validation de nos résultats (témoin d'extraction, gamme étalon, ou bien encore le blanc ou les témoins positifs de PCR), la quantité de témoin par série ou plaque étant

clairement définie, plus la série ou la plaque est complète, plus le coût total (coût réactif + coût en ressources humaines) par échantillon est faible (Cf. Tableau 11).

Tableau 11 : *Coûts des différentes étapes du processus analytique*

	Série ou plaque avec 1 seul échantillon	Série complète
Extraction Maxwell *(Série maximale = 15 échantillons)*	16,71€ / échantillon	6,46€ / échantillon
Quantification par PCR en temps réel *(Série maximale = 37 échantillons)*	89,60€ / échantillon	8,82€ / échantillon
Amplification de l'ADN par PCR *(Série maximale = 81 échantillons)*	60,89€ / échantillon	10,50€ / échantillon
Electrophorèse capillaire *(Série maximale = 87 échantillons)*	14,59€ / échantillon	0,74€ / échantillon

Le Tableau 11 montre que le coût par échantillon peut varier fortement si la série ou si la plaque est préparée avec une faible quantité d'échantillon.

L'analyse du coût d'analyse de nos échantillons nous permet donc de définir un tarif attractif pour le ministère de la Justice, mais également il nous permet de définir pour chacune des étapes du processus un nombre minimum d'échantillon à avoir pour permettre de réaliser la manipulation (Cf. Tableau 12). Le nombre minimum d'échantillon permettant d'effectuer la manipulation est défini lorsque le coût par échantillon de la manipulation avec ce nombre minimum n'engendre pas une augmentation du coût de plus de 10% par rapport au coût par échantillon pour une série complète.

Tableau 12 : *Définition du nombre minimum d'échantillon pour permettre la réalisation de la manipulation*

	Nombre minimum d'échantillon	Coûts par échantillon au nombre minimum d'échantillon
Extraction Maxwell *(Série maximale = 15 échantillons)*	8	7,10€ / échantillon
Quantification par PCR en temps réel *(Série maximale = 37 échantillons)*	27	9.65€ / échantillon
Amplification de l'ADN par PCR *(Série maximale = 81 échantillons)*	41	10,99€ / échantillon
Electrophorèse capillaire *(Série maximale = 87 échantillons)*	44*	1€ / échantillon

* : *Le nombre minimum d'échantillon devant être déposés sur la plaque passant en électrophorèse capillaire correspond à celui du nombre minimum d'échantillons devant être sur une plaque de PCR auquel s'ajoute un dépôt de MAL par run.*

2.4. Organisation du travail au quotidien

2.4.1. Le système existant

La réception d'un dossier par le secrétariat aboutit à son enregistrement. Cette enregistrement est transmis par un expert à l'ingénieur production, l'expert transmet alors l'ensemble des informations (type d'affaire, contenu des scellés, appartenance à la victime ou à l'auteur des faits, etc.) à l'ingénieur production permettant ainsi de maximiser nos chances d'obtenir des résultats qui pourront aider le requérant à avancer dans son enquête. Le rôle de l'ingénieur production est de s'assurer du bon fonctionnement du processus analytique, de gérer l'ensemble des analyses, de les répartir entre les différents techniciens selon leurs charges de dossiers en cours, mais également selon leur délai de rendu de résultats indiqués par l'expert. Le dossier lui ayant été communiqué est donc transmis à l'un des techniciens ainsi que l'ensemble des informations transmises par l'expert (les informations sont notées sur l'enregistrement, afin d'assurer leur prise en compte par le technicien).

Le technicien a alors la charge de le traiter à partir des prélèvements jusqu'au rendu des résultats à l'expert. Lorsque le technicien prend en charge le dossier, il lit la mission d'expertises Cette lecture, associée aux informations transmis par l'expert, va permettre au technicien d'appréhender le contexte de l'affaire et d'avoir une idée sur les objets qu'il va devoir prélever et comment orienter ces prélèvements. Ainsi le technicien part réaliser les prélèvements du dossier avec le maximum d'informations, ce qui lui permet d'augmenter les chances d'obtention de profils génétiques.

Les analyses des dossiers de production peuvent s'étaler sur plusieurs semaines, soit pour des raisons de quantités de scellés à analyser, soit parce que de nouveaux dossiers dont le délai de rendu de résultats est urgent, obligent un technicien à interrompre ces analyses en cours au profit d'un autre dossier. Pour traiter les dossiers les plus urgents, nécessitant, la plupart du temps, d'analyser ce dossier individuellement afin de le traiter dans le délai imparti (comme par exemple une GAV (Garde A Vue), dont les délais sont généralement de 24 heures après l'interpellation du suspect), le laboratoire dispose d'un système d'astreinte à la semaine. Le système de l'astreinte se compose d'un expert et d'un technicien, qui pourront répondre à toute heure de la journée et durant n'importe quel jour de la semaine aux demandes des requérants. Sauf pour le technicien d'astreinte, chaque technicien fait

avancer les analyses des dossiers qui lui ont été attribués en fonction des postes de travail disponibles ou de l'occupation des appareils, certaines analyses peuvent être mise en attente afin que d'autres puissent débuter et en rejoindre d'autres, cela lui permet d'optimiser ces plaques autant que de possible.

Chaque dossier traité par un technicien fait l'objet d'un établissement d'un « dossier Technique » qui consiste à joindre dans un même porte-documents l'ensemble des documents associés à chacune des étapes du processus d'analyses que le technicien aura fait subir aux échantillons du dossier, des prélèvements réalisés à l'obtention des électrophorégrammes (liste des prélèvements, formulaire d'extraction, formulaire de QPCR et ces résultats, formulaire de PCR et impression des électrophorégrammes, etc.). L'ensemble de ces documents doit permettre à l'expert qui aura la charge de la rédaction du rapport d'expertise de pouvoir effectuer son interprétation.

Régulièrement les techniciens font un bilan de leurs analyses en cours auprès de leur ingénieur production, permettant ainsi à celui-ci d'estimer la charge de travail restant au technicien et de lui communiquer si nécessaire de nouveaux dossiers.

2.4.2. Le système spécifique à une chaine automatisée

Le tarif facturé pour l'analyse d'un scellé en PMD étant de 76€, montant faible par rapport à nos analyses de production, me pose la problématique principale de mettre en place un système qui va permettre d'effectuer les analyses tout en diminuant le coût de revient de celle-ci. L'optimisation du processus analytique doit nous permettre de diminuer le temps nécessaire à la réalisation de l'analyse des scellés de PMD, ainsi en diminuant ce temps, nous diminuons le coût en Personnel et améliorons la rentabilité de la chaine automatisée. Notre méthodologie actuelle ne permettant donc pas de réguler avec précision le déroulement de notre processus analytique, nous n'avons pas d'autre choix que de prendre une autre organisation, celle se basant sur le « rotating system ». Cette organisation, bien connue des industries, a pour principe la division du processus analytique en plusieurs postes et que pour chacun des postes, un opérateur différent réalise la tâche. L'atout de cette organisation réside dans la création d'un flux continu des analyses et la maitrise du délai, que notre organisation actuelle ne permet pas d'avoir aussi précise (la vitesse d'avancée des dossiers de production dépendant du technicien et de l'ensemble des

taches qu'ils doivent réaliser). Le découpage du processus analytique par manipulation nous semble le plus évident et le plus simple à mettre en place, un technicien sera ainsi mis en place pour effectuer une étape du processus analytique, les échantillons ainsi traités sont mis à disposition d'un autre technicien qui effectuera l'étape suivante du processus et cela jusqu'à la mise à disposition des électrophorégrammes aux experts.

Le simple fait d'attribuer un technicien à un poste donné qu'il doit effectuer sur toute la durée de sa journée de travail, permet d'éviter des changements de pièces où sont réalisées les manipulations et ainsi de limiter le temps nécessaire au technicien de s'équiper pour accéder à la pièce, du temps nécessaire pour installer son poste de travail et également celui nécessaire au rangement et à la décontamination à la fin de sa manipulation. Toujours afin de réduire le temps nécessaire au technicien pour effectuer la tâche qui lui a été impartie, chaque étape du processus a été modifié (voir les § 2.1 de chacune des étapes du processus). J'ai pu déterminer ainsi une séquence de passage des étapes du processus analytique suivante :

- A J 0 : Jour d'enregistrement des analyses
- A J+1 : Réalisation des prélèvements
- A J+2 : Réalisation des extractions ADN
- A J+ 3 Réalisations des QPCR, PCR et électrophorèses capillaires
- A J+4 : Réalisation des dernières électrophorèses capillaires (si elles n'ont pas toute été faite à J+3) et Analyses des données brutes.

Il faut donc 4 journées de travail complètes en Technique afin de mettre à disposition les résultats aux experts.

En plus de la question du coût des analyses PMD, le système doit permettre le rendu des résultats dans un délai de 20 jours calendaires (les jours non ouvrés, weekend et jours fériés, comptant dans le délai), le délai débute dès réception de l'ensemble des documents (mission, scellés et bon de commande) par le secrétariat et prendra fin à la date d'envoi au FNAEG des profils génétiques. Ce délai prend en compte la réception des analyses et leurs enregistrements par l'équipe du secrétariat, la réalisation des analyses techniques par l'équipe technique, la rédaction du rapport d'expertise, et l'envoi au FNAEG des profils génétiques. Seul le renvoi du rapport au

requérant et des scellés par l'équipe du secrétariat n'est pas pris en compte dans le délai. Ce délai de 20 jours a été déterminé par notre laboratoire en fonction du temps estimé pour chacune des étapes de l'analyses (temps nécessaire à l'enregistrement des dossiers, temps nécessaire à la réalisation du processus analytique, le temps nécessaire à l'interprétation des résultats et à l'élaboration du rapport d'expertise, puis enfin le temps nécessaire à l'envoi des profils génétiques au FNAEG), plus une marge de quelques jours qui permettra de traiter des journées où le nombre de dossiers reçu sera plus important que celui envisagé, ou de permettre un ralentissement de la chaine dû à des absences de personnel.

L'élaboration du « dossier Technique » consomme du temps aux techniciens et l'ensemble des informations contenu dans les documents le sont également dans notre LIMS technique. Afin d'optimiser le temps en personnel et ainsi baisser le coût de revient de notre analyse, je décide de supprimer l'établissement du « dossier technique » pour les dossiers de PMD. La transmission des informations pour permettre à un technicien de connaitre avec précisions les échantillons qu'il doit traiter et de le faire dans l'ordre d'arrivée des dossiers, se faisant toujours par le biais des formulaires imprimés mais seul l'original est mis à disposition du technicien dans une bannette spécifique de l'étape du processus qui le concerne. Ainsi le formulaire d'une série de prélèvement est mis dans la bannette des analyses en attente d'extraction, les formulaires d'extractions sont mis dans la bannette des analyses en attente de quantification et ainsi de suite jusqu'à la mise à disposition des électrophorégrammes aux rédacteurs des rapports d'expertises. L'ordre de passage des différentes séries est déterminé par le numéro unique attribué à chaque série et qui s'incrémente au fur et à mesure, ainsi la série qui a le numéro le plus faible devra être traitée en première.

2.5. Intégration dans le Système Qualité de la chaine automatisée

2.5.1. Pourquoi s'intégrer dans une démarche qualité ?

La loi Européenne préconise aux Etats membres que les laboratoires effectuant les expertises ADN dans le cadre judiciaire soient accrédités, cependant la loi Française ne l'oblige pas à ce jour. Pourtant depuis sa création, l'IFEG c'est toujours inscrit dans une démarche qualité, créer un système qualité, c'est permettre à ses clients

de garantir des conditions de travail et de résultats optimums. Le laboratoire suit la norme ISO 17025 (Normes relative aux laboratoires d'essais et de mesure). L'accréditation est une démarche qui permet à un laboratoire de montrer sa compétence en terme de système qualité (certification selon norme ISO 9001 : 2000) mais également de sa compétence technique.

La mise en place d'un système qualité doit permettre la traçabilité de l'ensemble des informations relatives aux traitements de nos échantillons. Cette traçabilité s'effectue par l'intermédiaire de documents, notre système qualité comporte plusieurs types de documents : Procédure, Protocole, Formulaire et Consigne. Les documents de type Procédure décrivent un processus dans sa globalité et fait appel aux Protocoles qui lui sont associés (par exemple la procédure d'analyse des scellés de PMD). Les Protocoles ont pour objectif de décrire la méthodologie à suivre pour qu'une étape soit réalisée dans les conditions définies (par exemple le Protocole de réalisations des prélèvements des scellés de PMD), les Protocoles font appels aux Formulaires et Consignes qui leur sont associé. Les Formulaires sont les documents faisant office d'enregistrement de chaque manipulation réalisée (par exemple le formulaire de réalisation d'une PCR). Enfin les consignes sont des documents qui sont affichés et dans les pièces afin d'aider le personnel sur une tache précise (par exemple la Consigne de réalisation des dilutions). L'ensemble de ces documents sont régulièrement revu par le Responsable Qualité en collaboration des différents responsables concernés par chacun des documents revus. La révision des documents permet d'assurer la bonne adéquation entre les documents et la manipulation à laquelle ils sont destinés. C'est principalement cette gestion documentaire (en coopération avec notre LIMS, Cf. § 2.6) et notamment l'utilisation des Formulaires à chaque étape, qui nous permet d'effectuer une traçabilité de nos échantillons, permettant de savoir quels échantillons ont été traité ensemble, quels lots de réactifs ont été utilisé pour ces échantillons. Cela nous permets de remonter le processus étape par étape, par exemple lorsque nous nous questionnons sur des résultats obtenus.

L'accréditation permet également d'établir une compétence technique du laboratoire, l'organisme accréditeur (le COFRAC en ce qui concerne la France) évaluant ainsi chaque étape du processus analytique en terme de validation de la méthode choisie et également de sa réalisation au quotidien par le personnel. La réalisation d'un

dossier de validation pour chaque étape du processus permet de montrer notre connaissance de la technique sur différents points importants (points qui dépendent de l'étape en question), comme par exemple la sensibilité ou bien encore la reproductibilité. Sont également pris en compte les moyens mis en œuvre pour s'assurer que nos échantillons ne soient pas contaminés, et contaminent les autres échantillons de la manipulation ou bien soient contaminés par des réactifs utilisés, ce qui consiste à vérifier notre gestion des contrôles comme la présence de témoins négatifs, ou bien encore de vérifier notre méthode de dépôts des échantillons à l'emplacement prévu sur notre feuille de travail.

L'intégration dans notre système qualité, de la chaine automatisée pour le traitement des analyses de l'appel d'offre PMD rentre donc dans la continuité de notre système qualité en cours.

2.5.2. Comment faire rentrer ce nouveau processus dans l'accréditation COFRAC déjà en place au laboratoire ?

Pour faire rentrer ce nouveau processus dans notre portée d'accréditation du laboratoire, j'ai dû m'assurer que, premièrement, pour l'ensemble des étapes dont j'ai conservé la technique utilisée en production, les modifications que j'ai apporté en terme d'organisation, d'aspect technique, ne modifient pas l'aspect qualité et deuxièmement, que pour les étapes dont la technique choisie pour la chaine automatisée n'était pas utilisée au laboratoire auparavant, il me faut réaliser un dossier de validation de cette nouvelle technique, afin d'en maitriser les limites.

En prélèvement, la méthodologie est la même que pour celle utilisé en production, seul le nombre de prélèvement et par conséquent le type de prélèvement réalisé qui peuvent être différents. Du point de vue de notre système qualité, l'ensemble des informations relatives aux prélèvements étant enregistré de la même manière que pour l'analyse des scellés de production (utilisation du LIMS avec attribution d'un numéro unique pour chaque prélèvement), cette étape du processus analytique de la chaine PMD reste donc dans notre portée d'accréditation.

L'extraction de l'ADN se faisant à partir d'une technique nouvellement mise en place, la réalisation d'un dossier de validation est donc nécessaire pour pouvoir être entrée dans notre portée d'accréditation (Cf. § 3.2.1 validation de la nouvelle technique d'extraction).

La quantification de l'ADN par PCR en temps réel, l'amplification de l'ADN par PCR et l'électrophorèse capillaire ne subissent aucune modification par rapport à notre processus analytique de production. Ces étapes s'incluent donc toujours dans notre portée d'accréditation.

L'analyse des données brutes à l'aide du logiciel Genemapper subit une seule modification qui concerne l' « Analysis method » (Cf. § 2.1.5 Electrophorèse capillaire des produits de PCR). Cette modification n'entrainant pas de modification du profil par rapport à l' « Analyse method » utilisé en production (les pics de fluorescences détectés sont toujours présents, mais ne sont pas assigné d'un numéro allélique par le logiciel), leur interprétation est donc toujours possible (sous réserve d'une validation par un expert, Cf. § 2.1.6 Production des résultats). D'un point de vue de notre système qualité cette modification reste compatible avec notre portée d'accréditation.

2.6. L'outil informatique (LIMS)

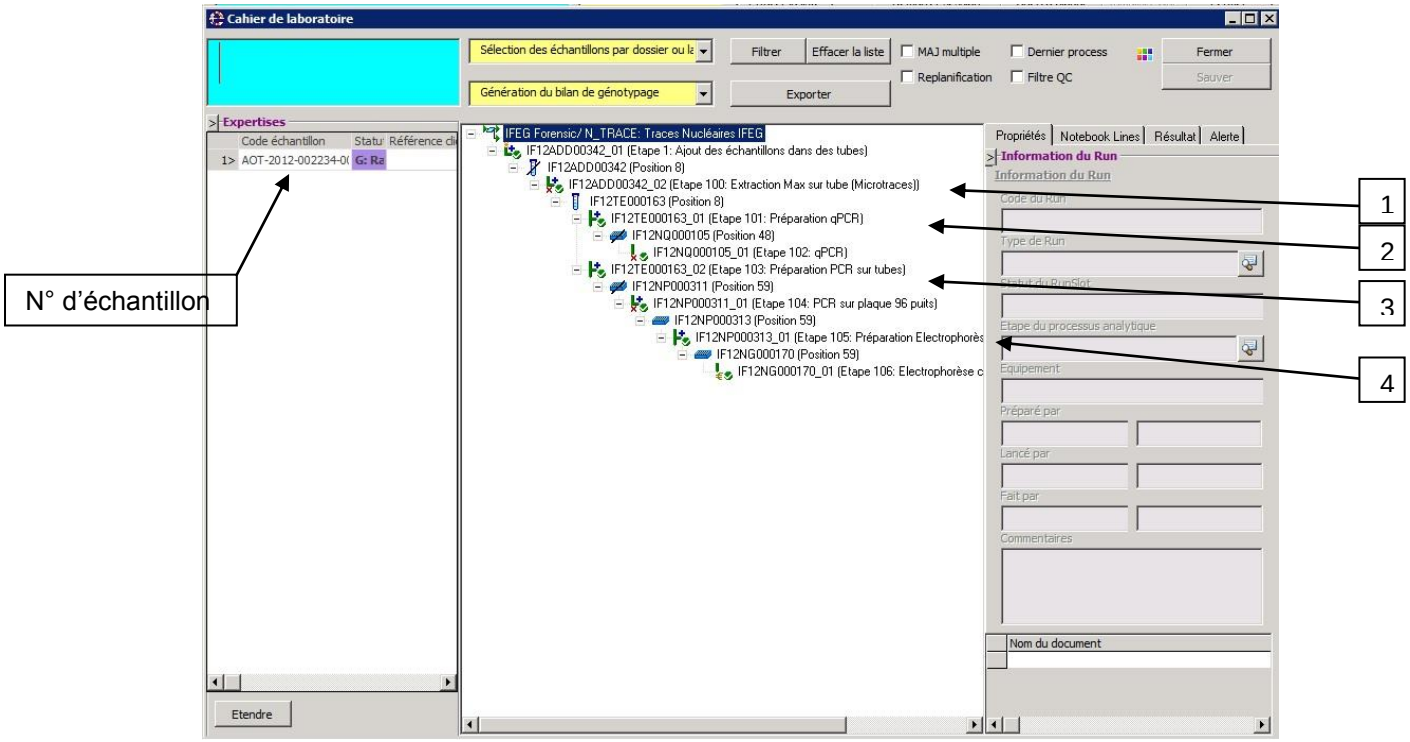
Le LIMS (Laboratory Information Management System) est l'outil informatique qui nous permet de garantir une traçabilité de nos échantillons à partir de la réception du scellé au laboratoire jusqu'au rendu du résultat au requérant. Le Laboratoire, pour des raisons de sécurité, à choisit d'utilisé 2 LIMS, l'un pour toute la partie Administrative, l'autre pour tout ce qui concerne la partie Technique. L'objectif du LIMS est de pouvoir dire, à tout moment, où nous en sommes dans l'analyse d'un scellé et de ressortir les informations des étapes du processus analytique qui ont déjà été réalisées pour ce scellé.

Dans notre LIMS Technique, 3 modules sont principalement utilisés. Le premier est le module « Enregistrement des prélèvements labo », va permettre au sein d'un dossier PMD, la création des prélèvements que nous aurons effectués pour chacun des scellés de ce dossier (Cf. §2.1.1). Le second module, le module « Session d'analyse » va nous permettre d'ajouter nos prélèvements à une session d'analyse débutant de l'étape de l'extraction de l'ADN, jusqu'à l'obtention des électrophorégrammes. Pour chacune des étapes du processus analytique définit pour traiter les échantillons du Marché, le LIMS enregistrera l'ensemble des informations associés à cette étape (numéro de la série ou de la plaque, date de réalisation de celle-ci, technicien l'ayant effectuée, ainsi que les numéros de lot des

réactifs utilisé). Le dernier module est le « Cahier de Laboratoire », il nous permet de visualiser les différentes étapes réalisées ou bien les étapes en cours de réalisation (Cf. Figure 10). L'ensemble des informations enregistrées durant l'avancement du processus analytique dans le module « Session d'analyse » est consultable dans le « Cahier de Laboratoire ». C'est également dans le module « Cahier de Laboratoire » que le technicien pourra replanifier un échantillon ou une série d'échantillon pour une des étapes du processus analytique (comme cela peut être le cas, lorsque des inhibiteurs de PCR sont détectés lors de la quantification de l'ADN par PCR en temps réel et que nous devons alors effectuer une Purification de l'ADN).

La génération des rapports d'expertises se faisant par le LIMS Technique, il est impératif que l'ensemble des étapes soient retranscrite dans ce LIMS et ainsi permettre l'importation des tables de résultats provenant du logiciel d'analyse Genemapper. Une panne de courant ou une panne informatique pourrait donc entrainer un arrêt de la chaine de production, c'est pourquoi l'ensemble du laboratoire est secouru par un groupe électrogène, qui a pour fonction de prendre le relais en cas de panne d'électricité. Les salles de serveurs du service informatique n'étant pas secourue, le risque d'une perte d'accès à nos LIMS est donc possible, dans ce cas les techniciens disposent de formulaires papiers pour chacune des étapes du processus analytique, qui leur permettront de tracer leurs opérations. Cela nécessitera cependant une prise importante de temps, car l'ensemble de ces informations devra être remise à jour dans le LIMS dès qu'ils seront de nouveau accessibles.

Figure 10 : *Module « Cahier de Laboratoire du LIMS Technique*



1 : Etape d'extraction de l'ADN
2 : Etape de Quantification de l'ADN par PCR en temps réel
3 : Etape d'amplification de l'ADN par PCR
4 : Etape d'électrophorèse capillaire

L'obtention d'un lot du Marché pour l'analyse de Traces dans le cadre de dossier de PMD, et la nécessité d'effectuer un bilan mensuel à transmettre au Ministère de la Justice, a induit la dissociation de ces dossiers avec nos dossiers de Production. Cette dissociation se traduit notamment par le numéro de dossier que notre laboratoire attribue, nom qui devait être différent (Cf. §2.1.1). Ce besoin de dissocier nos analyses, a entrainé également, la création d'une nouvelle ligne de Production dans notre LIMS Technique pour l'analyse de nos dossiers PMD spécifiquement. Cette nouvelle ligne de Production se basant sur le même schéma que la ligne de Production déjà existante, mais pour laquelle nous avons adapté notamment l'étape d'extraction de l'ADN, conséquence du choix d'utiliser une méthode d'extraction différente de la méthode d'extraction utilisée pour nos échantillons de Production.

3. Résultats

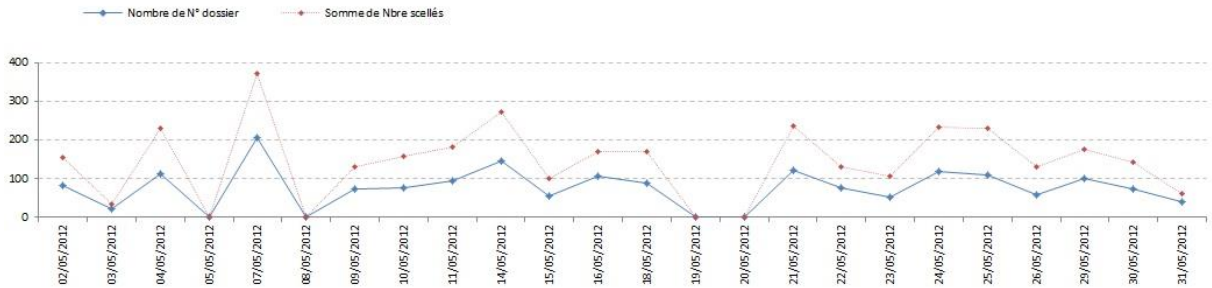
3.1. Variation du nombre de dossier à traiter

Parmi les complexités que ce Marché a entrainées, la variation du nombre de dossiers est probablement l'une des principales. L'organisation que j'ai mise en place, ayant été pensée à partir d'un nombre moyen régulier d'entrées par jour, une entrée plus importante pourrait amener un retard dans le rendu des résultats. Or un retard dans le rendu des résultats exposerait le laboratoire à des pénalités de retard, comme le prévoit l'article 11 du Marché conclut avec le Ministère de la Justice. Le Tableau 13 nous montre l'évolution des entrées durant les 6 premiers mois de l'Appel d'offre, on peut noter l'augmentation du nombre de scellés moyen reçu par jour qui correspondait à notre estimation pour le mois de janvier, mais qui est supérieure pour les mois qui ont suivi atteignant jusqu'à 166 scellés par jour.

Tableau 13 : *Nombre d'entrées durant les 6 premiers mois du Marché*

Mois	Nombre de scellés reçus dans le mois	Nombre de jours ouvrés	Nombre de scellés reçu en moyenne par jour
Janvier 2012	2114	22	96
Février 2012	2427	21	115
Mars 2012	3068	22	139
Avril 2012	2941	20	147
Mai 2012	3150	19	166
Juin 2012	3344	21	159

Figure 11 : *arrivés des dossiers par jour durant le mois de Mai 2012*



En plus de cette augmentation du nombre de scellés que nous avons reçus par mois, j'ai pu constater une fluctuation des entrées en fonction des jours de la semaine (Cf. figure 11), les 3 jours du mois de mai 2012 où nous avons eu le nombre d'entrées le plus important (les 07/05/2012, 14/05/2012 et 21/05/2012) sont des lundis (le dernier lundi du mois de mai ayant été un jour férié), pouvant aller jusqu'à 2 fois plus de scellés à analyser (pour le lundi 07/05/2012).

L'envoi des dossiers à analyser se faisant à l'initiative des services d'enquêtes, sans avoir besoin de contacter le laboratoire au préalable, le nombre de dossiers arrivant au laboratoire ne peut être déterminé à l'avance et nous permettre d'anticiper nos besoins en personnel pour effectuer les enregistrements (tache réalisée par l'équipe du secrétariat), cependant le temps mis pour enregistrer l'ensemble des dossiers d'une journée, fait qu'ils nous est possible en technique d'affecter plus de ressources au postes des prélèvements (ce qui se fait au détriment d'un autre poste). Ainsi le lendemain de ces journées d'entrées importantes, j'affecte plus de techniciens au poste des prélèvements, ce qui doit permettre de résorber l'ensemble des prélèvements à réaliser. Cette quantité de prélèvements entrainant un plus grand nombre de séries en attente d'extraction, le jour suivant j'affecte alors plus de personne sur le poste d'extraction.

3.2. Le processus analytique

3.2.1. La validation de la nouvelle technique d'extraction de l'ADN

Pour réaliser l'ensemble de nos tests permettant d'aboutir à la validation de la méthode d'extraction de l'ADN à l'aide du kit DNA IQTM Casework Pro et du Maxwell® 16 Forensic Instrument, j'ai choisi d'utiliser 2 matrices différentes : du Sang et des cellules NHEK (cellules épithéliales obtenues d'une lignée cellulaire de Kératinocyte), matrices ayant été choisies car elles représentent nos principaux prélèvements, les cellules épithéliales étant les cellules dont nous pouvons extraire l'ADN lorsque nous effectuons un prélèvement de contact.

1 Limite de détection en PCR de nos échantillons

La limite de détection, consiste à définir le seuil de fluorescence au-dessus duquel une fluorescence détectée sera associée à l'échantillon analysé et non à du bruit de

fond. Afin de déterminer cette limite de détection, j'analyse les résultats obtenus pour 100 témoins négatifs d'extractions (Tube de prélèvement exempt de prélèvement, mais suivant les mêmes analyses que nos prélèvements). Afin de traiter un grand nombre d'échantillons de ce type, j'ai choisi d'utiliser l'ensemble des témoins négatifs extrait à l'aide du kit DNA IQTM Casework Pro et du Maxwell® 16 Forensic Instrument, que j'ai pu analyser pour les différents tests effectués dans le but de valider cette technique d'extraction, plutôt que d'effectuer un test spécifique qui nous limiterions à quelques échantillons pour une raison de coûts engendrés par le test. Pour chacun des témoins négatifs analysés j'ai calculé la moyenne d'intensité de tous les pics dont la fluorescence est supérieure ou égale à 1 RFU et leur écart-type (Cf. Annexe 2). La limite de détection (LD) est obtenue en fonction de la Moyenne (M) d'intensité du signal et de l'écart-type (S), selon la formule suivante : LD = M + (3S). A l'issue de l'analyse de ces 100 témoins négatifs j'ai donc obtenu une limite de détection d'environ 15 RFU. Cette intensité de 15 RFU étant 3 fois plus faible que le seuil de positivité (intensité de fluorescence à partir de laquelle le pic est assigné) utilisé en pratique (fixé à 50 RFU), la limite de détection déterminée est donc validée et adaptée à l'analyse de nos échantillons à l'aide du kit DNA IQTM Casework Pro et du Maxwell® 16 Forensic Instrument.

2 Sensibilité

La limite de sensibilité de la méthode correspond à la plus faible concentration en ADN qui permet d'obtenir un profil génétique pouvant être enregistré au FNAEG.

Pour réaliser ce test j'ai utilisé des dilutions dans du sérum physiologique de sang et de cellules épithéliales (cellules NHEK) déposées sur écouvillons (Cf. Annexe 3). Pour chaque niveau de dilutions je fais effectuer 6 prélèvements (dépôts de 10µl de la dilution sur un écouvillon).

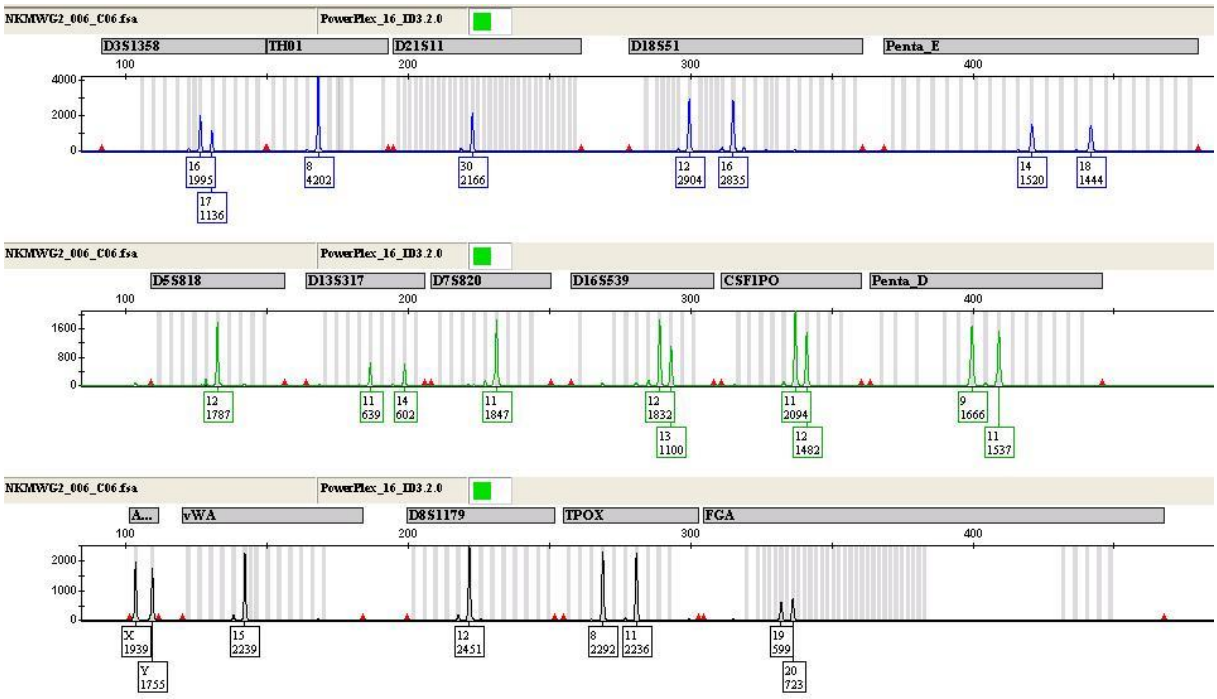
La moitié des prélèvements de chaque niveau subit une extraction d'ADN à l'aide du kit DNA IQ^{TM} Casework et de l'automate Maxwell® 16 Forensic Instrument, tandis que l'autre moitié subit une extraction par la méthode du Phénol/Chloroforme. Chaque extrait d'ADN ainsi obtenu est alors quantifié, amplifié par PCR puis migré en électrophorèse capillaire.

Pour la matrice sang, l'ensemble des prélèvements extraits obtenus par le Maxwell® 16 Forensic Instrument jusqu'au niveau de dilution 1/150^{e}, présentent des profils génétiques dont la totalité des allèles attendus sont assignés. Tandis que pour les

extraits obtenus par Phénol/Chloroforme nous avons obtenus des profils génétiques dont l'ensemble des allèles attendus sont assigné, jusqu'au niveau de dilution 1/300^{e}. Le niveau le plus faible testé (1/1000^{e}) a permis d'obtenir 100% de profils exploitables, qui permettrait de rendre au moins 6 loci plus l'Amélogénine au FNAEG, aussi bien pour les essais obtenus avec le Maxwell® 16 Forensic Instrument comme pour ceux obtenus par Phénol/Chloroforme (Cf. Annexe 4).

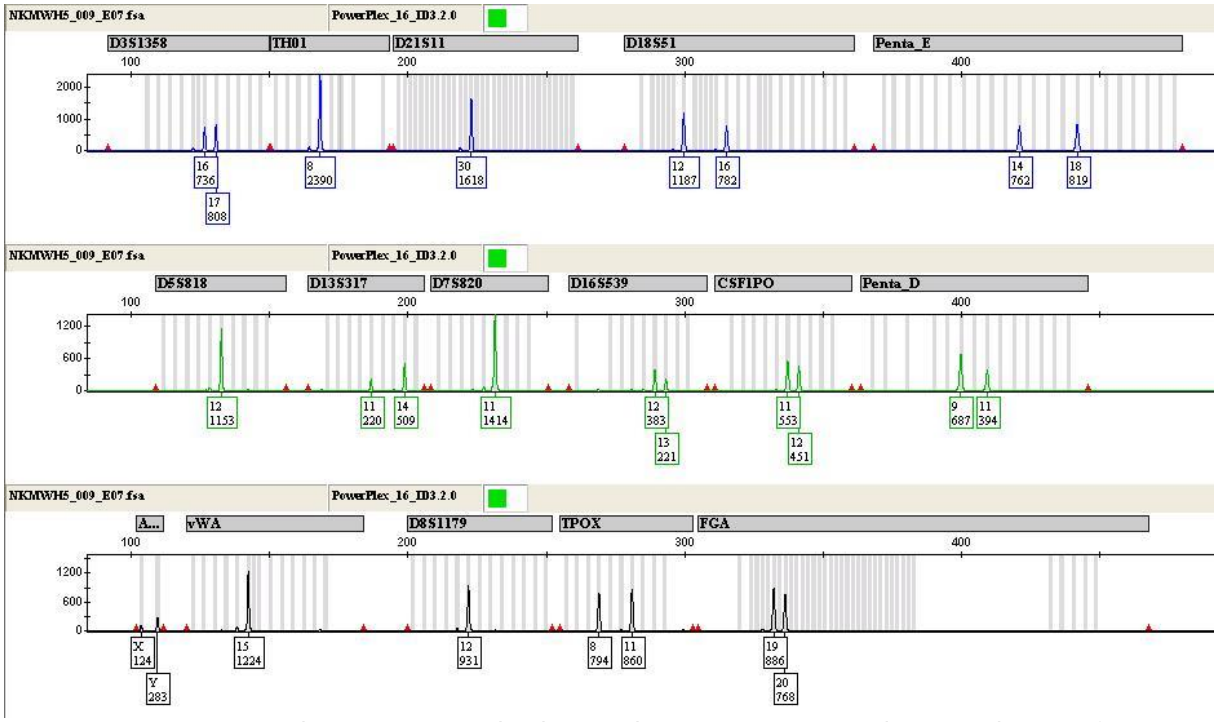
Avec les cellules épithéliales, le dernier niveau de dilution permettant de rendre 100% de profils complets est le 1/80^{e} avec le Maxwell® 16 Forensic Instrument (Cf. Figure 12) et le 1/100^{e} pour le Phénol/Chloroforme (Cf. Figure 13). Au 1/100^{e} avec le Maxwell® 16 Forensic Instrument, 100% des profils possèdent au moins 6 loci et l'Amélogénine d'interprétable et donc 100% des profils sont exploitables (Cf. Annexe 5).

Figure 12 : *Test de Sensibilité – cellules épithéliales : Profil obtenu à la dilution 1/80*



Echantillon NKMWG2 = échantillon de cellules épithéliales dilué au 1/80 et extrait par la méthode du MAXWELL

Figure 13 : Test de Sensibilité – cellules épithéliales : Profil obtenu à la dilution 1/100



Echantillon NKMWH5 = échantillon de cellules épithéliales dilué au 1/100 et extrait par la méthode du Phénol/Chloroforme

L'extraction de l'ADN par la méthode du Phénol/chloroforme a permis d'obtenir 100% de profils complets à un niveau de dilution plus important que pour la méthode du Maxwell® 16 Forensic Instrument, montrant ainsi que l'extraction par la méthode du Phénol/Chloroforme a un meilleur rendement d'extraction que celui de l'extraction par l'extraction Maxwell® 16 Forensic Instrument. Cependant, l'extraction par le Maxwell® 16 Forensic Instrument, nous a permis d'obtenir 100% de profils exploitables même au niveau de dilution le plus élevé que nous avons testé, ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec l'extraction par la méthode du Phénol/Chloroforme pour le niveau de dilution le plus faible. Ainsi pour les différents niveaux testés l'extraction par le Maxwell® 16 Forensic Instrument ne montre pas de perte totale de résultat exploitable, là où l'extraction par le Phénol/Chloroforme permettrait encore d'obtenir des profils exploitables.

En conclusion, la sensibilité de la technique d'extraction par le Maxwell® 16 Forensic Instrument à l'aide du kit DNA IQ™ Casework Pro est validée pour l'analyse des scellés Traces.

3 Répétabilité

La Répétabilité est une notion qui permet d'évaluer la fiabilité de l'analyse, un même échantillon analysé plusieurs fois, dans des conditions similaires, doit aboutir au même résultat. J'ai mesuré la répétabilité à deux dilutions différentes pour chacune des 2 matrices, une faible concentration pouvant correspondre à nos échantillons de type microtraces (niveau de dilution le plus faible permettant d'obtenir des profils complets au test de Sensibilité) et une forte concentration afin de correspondre à nos échantillons du type Macrotraces. Ces mesures ont été menées en parallèle pour l'extraction par le Maxwell® 16 Forensic Instrument et par le phénol-chloroforme. Les niveaux de dilutions pour chacune des matrices sont listés à l'annexe 6. Pour chaque niveau, je fais réaliser 20 prélèvements contenant chacun un écouvillon sur lequel il aura été déposé au préalable 10µL de la dilution.

Pour chaque matrice et niveau de dilution, 10 des 20 essais sont extraits par la méthode du Maxwell® 16 Forensic Instrument, les 10 restants le sont par la méthode du Phénol/Chloroforme. Chaque extrait d'ADN ainsi obtenu est alors quantifié, amplifié par PCR puis migré en électrophorèse capillaire.

Pour les deux matrices testées et pour chacun des niveaux de dilutions testées, la quantité d'ADN extraite par la méthode du Maxwell® 16 Forensic Instrument est plus faible que celle obtenues par la méthode du Phénol/Chloroforme (Cf. Annexe 7 et 8), la différence de concentration moyenne varie entre 15% (pour le niveau de dilution 1/300 des cellules sanguines) à 70% (pour le niveau de dilution au 1/6 des cellules épithéliales). Ce test de Répétabilité confirme les résultats obtenus pour le test de Sensibilité, indiquant que l'extraction de l'ADN par la méthode du Phénol/Chloroforme a un rendement d'extraction supérieur à celui de la méthode d'extraction à l'aide du Maxwell® 16 Forensic Instrument. Cependant on constate que les coefficients de variations sont plus faibles avec le Maxwell® 16 Forensic Instrument que ceux du Phénol/Chloroforme, la méthode d'extraction par le Maxwell® 16 Forensic Instrument

L'amplification de l'ADN par PCR à l'aide du kit PowerPlex®16 HS, suivi de l'électrophorèse capillaire sur 3130xl, sont réalisées. L'analyse des données de génotypage permet d'obtenir dans chacun des cas un profil 100% complet et correspondant au profil génétique attendu.

La répétabilité de l'extraction d'ADN à partir du kit DNA IQ™ Casework Pro et du Maxwell® 16 Forensic Instrument est validée pour l'analyse de nos échantillons Traces.

4 Reproductibilité

La reproductibilité, tout comme la répétabilité, est une notion visant à montrer la fiabilité des analyses, mais dans ce cas, au lieu d'avoir des conditions d'analyses identiques pour l'ensemble des essais, je fais varier certains des paramètres (comme le technicien réalisant la manipulation ou bien encore l'appareil sur lequel s'effectue l'étape du processus analytique). Le test ayant pour but de constater la fiabilité de la méthode d'extraction par le Maxwell® 16 Forensic instrument, les variations d'analyses seront restreintes à l'extraction par le Maxwell® 16 Forensic instrument. La reproductibilité est testée à deux niveaux de dilution différents pour chacune des matrices analysées, les matrices ainsi que les niveaux de dilutions sont les mêmes que ceux utilisés pour le test de répétabilité, je fais réaliser 8 prélèvements (dépôt de 10µl de dilution sur un écouvillon) pour chacun de ces niveaux. En réalisant 8 prélèvements par niveaux de dilution et par matrice, nous obtenons donc un total de 32 prélèvements que nous faisons effectuer à 2 techniciens différents, portant ainsi à 64 le nombre total d'échantillons à extraire. Le nombre maximum pouvant être extrait en même temps par un appareil étant de 16 échantillons, il nous faudra réaliser 4 séries d'extractions (2 par l'opérateur n°1 et 2 par l'opérateur n°2). Le principe des conditions de variations de l'extraction par le Maxwell® 16 Forensic instrument est décrit dans le Tableau 14.

Tableau 14 : *Test de Reproductibilité – principe des conditions de variations*

Essai	Lyse	Kit DNA-IQ Case work Pro	Run	Maxwell
Essais 1	Lot 1 / Op. 1	Lot n° 1	Run n° 1 Opérateur 1	Maxwell n° 2
Essais 2	Lot 1 / Op. 2			
Essais 3	Lot 1 / Op. 1	Lot n°2		
Essais 4	Lot 1 / Op. 2			
Essais 5	Lot 1 / Op. 1	Lot n° 1	Run n° 2 Opérateur 1	Maxwell n° 2
Essais 6	Lot 1 / Op. 2			
Essais 7	Lot 1 / Op. 1	Lot n°2		
Essais 8	Lot 1 / Op. 2			
Essais 9	Lot 1 / Op. 1	Lot n° 1	Run n° 3 Opérateur 2	Maxwell n° 1
Essais 10	Lot 1 / Op. 2			
Essais 11	Lot 1 / Op. 1	Lot n°2		
Essais 12	Lot 1 / Op. 2			
Essais 13	Lot 1 / Op. 1	Lot n° 1	Run n° 4 Opérateur 2	Maxwell n° 1
Essais 14	Lot 1 / Op. 2			
Essais 15	Lot 1 / Op. 1	Lot n°2		
Essais 16	Lot 1 / Op. 2			

Op. : Opérateur

Tous les extraits sont alors quantifiés par PCR en temps réel, amplifiés par PCR puis passés en électrophorèse capillaire. Ces dernières étapes étant réalisées sans variations des conditions d'analyses, afin de s'assurer que les éventuelles différences de résultats obtenus ne puissent qu'être dues à l'étape d'extraction de l'ADN.

Pour les deux matrices, aux deux niveaux de dilutions, la quantité d'ADN extraite reste cohérente avec les valeurs obtenues lors des tests de sensibilité et répétabilité (Cf. Annexe 9)

Après leur amplification par PCR et l'électrophorèse capillaire, j'ai obtenu pour les essais à partir de sang, 100% de résultats complets, que ce soit au 1/80^{e} comme au 1/300^{e}. En revanche pour les essais à partir de cellules épithéliales, j'obtiens, pour le niveau de dilution au 1/6^{e}, 94% de profils complets. Un des seize essais, présente des résultats très différents des quinze autres, en effet on note une intensité de fluorescence moyenne d'environ 150 RFU alors que pour les autres essais du même niveau de dilution j'ai une moyenne d'intensité supérieure à 1000 RFU. Pour cet échantillon plus de 6 locus sont complets, mais l'Amélogénine étant incomplète, le profil ainsi obtenu est non exploitable. Egalement pour les cellules épithéliales, mais pour le niveau de dilution au 1/80^{e}, cinq des trente essais (au vu des résultats de

quantification, certains des essais ont été amplifiés deux fois en PCR, amenant ainsi à l'obtention non pas de seize profils mais de trente) ne présentent pas un profil complet, mais permettre de rendre plus de 6 locus complets ainsi que l'Amélogénine. J'obtiens donc 100% de résultats exploitables.

A l'exclusion de l'essai atypique obtenu pour au facteur de dilution 1/6^{e} des cellules épithéliales, 100% des profils obtenus sont exploitables. La variation des conditions de réalisations de l'étape d'extraction de l'ADN ne modifie donc pas La reproductibilité de l'extraction d'ADN à partir du kit DNA IQ^{TM} Casework Pro et du Maxwell® 16 Forensic Instrument est validée pour l'analyse de nos échantillons Traces.

5 Contamination entre les échantillons

Je recherche deux types de contaminations, les contaminations entre des échantillons d'une même série d'extraction (contamination intra-run) et des contaminations entre des échantillons d'une série d'extraction par des échantillons de séries d'extractions précédentes (contamination inter-run). La contamination intra-run pourrait être due au faits que l'ensemble des consommables et réactifs sont ouverts durant tout le temps de l'extraction par l'automate. Tandis que la contamination inter-run pourrait être due à l'utilisation elle-même de l'appareil, des échantillons dont les quantités d'ADN vont variés de très faible quantité (traces de contact) à de très forte quantité (prélèvement de sang ou à partir de mégots de cigarette).

Afin de limiter ces risques de contaminations, plusieurs actions sont mises en place :

- Les consommables plastiques sont à usage unique, notamment les « plongeurs » qui sont des pièces en plastique évitant le contact direct entre les barres aimantées et les billes magnétiques utilisées pour chaque échantillon.
- La décontamination de l'intérieur de l'appareil, après chaque run effectué, à l'aide d'une lampe UV.
- La décontamination de l'appareil en fin de journée d'utilisation à l'aide d'un produit dégradant l'ADN (le DNA-ExitusPlus^{TM} de chez APPLICHEM GmbH).
- L'utilisation de plusieurs portoirs métalliques s'adaptant dans l'appareil, afin d'utiliser pour chaque run un portoir propre.

Afin d'étudier la contamination intra-run, je fais réaliser 3 séries d'extractions dans lesquelles sont alternés des échantillons fortement concentré en ADN (à partir de sang, le même qu'utilisé pour les tests précédents) avec des échantillons de type « Blanc » ne devant contenir aucun ADN (Cf. Tableau 15)

Tableau 15 : *Test de contamination intra-run – préparations des essais*

SANG	RUN 1	ESSAI 1, ESSAI 3, ESSAI 5, ESSAI 7, ESSAI 9, ESSAI 11, ESSAI 13 et ESSAI 15
	RUN 2	ESSAI 17, ESSAI 19, ESSAI 21, ESSAI 23, ESSAI 25, ESSAI 27, ESSAI 29 et ESSAI 31
	RUN 3	ESSAI 33, ESSAI 35, ESSAI 37, ESSAI 39, ESSAI 41, ESSAI 43, ESSAI 45 et ESSAI 47
BLANC	RUN 1	ESSAI 2, ESSAI 4, ESSAI 6, ESSAI 8, ESSAI 10, ESSAI 12, ESSAI 14 et ESSAI 16
	RUN 2	ESSAI 18, ESSAI 20, ESSAI 22, ESSAI 24, ESSAI 26, ESSAI 28, ESSAI 30 et ESSAI 32
	RUN 3	ESSAI 34, ESSAI 36, ESSAI 38, ESSAI 40, ESSAI 42, ESSAI 44, ESSAI 46 et ESSAI 48

Les 3 séries sont extraites l'une après l'autre sur un même appareil, puis les extraits sont quantifiés à l'aide du kit Quantifiler®. Ensuite uniquement les échantillons de type « Blanc » sont amplifiés par PCR à l'aide du kit PowerPlex®16 HS, puis passés en électrophorèse capillaire.

Pour le test de contamination inter-run, après avoir passé successivement, sur un même appareil, 4 runs de 16 échantillons fortement concentré en ADN (soit à partir de sang soit à partir des cellules épithéliales, on réalise l'extraction d'un run de 16 échantillons de type « Blanc ». L'extraction réalisée, les échantillons sont alors quantifiés à l'aide du kit Quantifiler® puis amplifiés par PCR à l'aide du kit PowerPlex®16 HS et passés en électrophorèse capillaire.

Le résultat recherché pour ces deux tests, est l'obtention de 0 profil exploitable (donc comportant moins de 6 locus et l'Amélogénine d'interprétable).

Seulement 1 des 24 essais de type « Blanc » du test pour la contamination intra-run, présente une quantité d'ADN (Essai 42), la quantité déterminée pour cet échantillon reste tout de même très faible étant de 0.15 ng d'ADN (Cf. Tableau 16). Pour la contamination inter-run, l'ensemble des 16 échantillons de type « Blanc » a donné un résultat négatif (No Ct) à la quantification.

Tableau 16 : *Test de contamination intra-run – Résultats de la quantification*

Run 1	
Essai	**quantité en ADN (ng)**
ESSAI1	204,5
ESSAI2	No Ct
ESSAI3	123
ESSAI4	No Ct
ESSAI5	149
ESSAI6	No Ct
ESSAI7	64,5
ESSAI8	No Ct
ESSAI9	101
ESSAI10	No Ct
ESSAI11	132,5
ESSAI12	No Ct
ESSAI13	85
ESSAI14	No Ct
ESSAI15	58
ESSAI16	No Ct

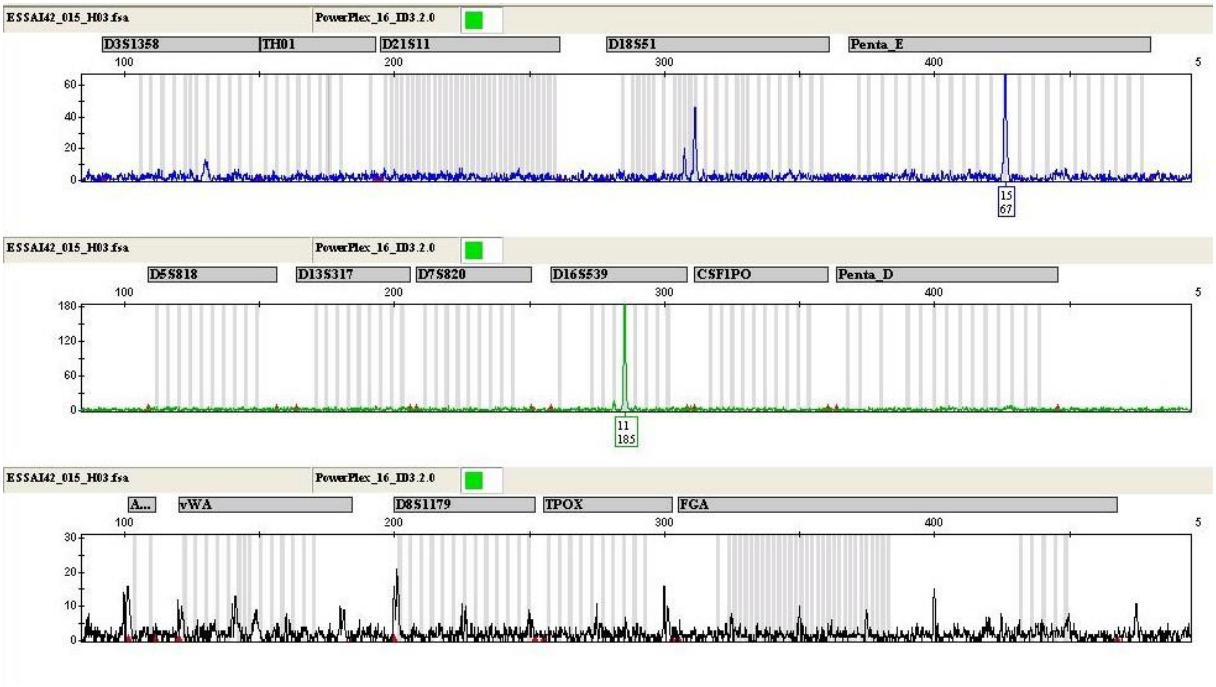
Run 2	
Essai	**quantité en ADN (ng)**
ESSAI17	193
ESSAI18	No Ct
ESSAI19	140
ESSAI20	No Ct
ESSAI21	86
ESSAI22	No Ct
ESSAI23	137
ESSAI24	No Ct
ESSAI25	67,5
ESSAI26	No Ct
ESSAI27	127
ESSAI28	No Ct
ESSAI29	147,5
ESSAI30	No Ct
ESSAI31	103,5
ESSAI32	No Ct

Run 3	
Essai	**quantité en ADN (ng)**
ESSAI33	36,85
ESSAI34	No Ct
ESSAI35	189,5
ESSAI36	No Ct
ESSAI37	132,5
ESSAI38	No Ct
ESSAI39	110
ESSAI40	No Ct
ESSAI41	113
ESSAI42	0.15
ESSAI43	95
ESSAI44	No Ct
ESSAI45	111
ESSAI46	No Ct
ESSAI47	38,15
ESSAI48	No Ct

No Ct : ADN non détecté en QPCR

Les résultats de l'amplification par PCR, suivi de l'électrophorèse capillaire sont montrés en Annexe 10 (seul les échantillons pour lesquels des pics de fluorescence ont été assignés sont listés dans le tableau). 8 des 24 échantillons de Type « Blanc » présentent au moins un pic de fluorescence. L'intensité de fluorescence ne dépasse pas 185 RFU, et aucun de ces 8 échantillons n'a plus de 6 locus et l'Amélogénine d'interprétable (Cf. figure 14). Aucun des 24 essais de type « blanc » du test de contamination intra-run et aucun des 16 essais de type « blanc » du test de contamination inter-run est exploitable.

Figure 14 : *Test de contamination intra run –Electrophorégramme de l'essai 42*



Les résultats ainsi obtenus pour les deux types de recherche des contaminations permettent de valider la maitrise des contaminations, grâce aux mesures de nettoyage des matériels utilisés pour l'extraction de l'ADN par le Maxwell® 16 Forensic Instrument, déjà mises en place.

6 Validation sur des échantillons de Traces

J'effectue un dernier test afin de pouvoir comparer les deux méthodes d'extraction dans des conditions réelles d'analyses, donc sur des échantillons de Traces fréquemment rencontrés lors de nos analyses de routine. Ce test permet d'avoir des résultats sur une plus grande diversité de supports avec une plus grande variabilité en terme de qualité et de quantité d'ADN. A contrario, ce test à pour inconvénient de ne pouvoir déterminer avec exactitude la quantité de cellules se trouvant sur nos prélèvements, ainsi pour limiter les différences, il a été décidé de diviser le prélèvement en deux (par exemple, nous avons divisé en deux le prélèvement du papier filtre d'un mégot de cigarette) ou réaliser deux prélèvements par écouvillonnage à partir d'un même support (par exemple écouvillonnage d'un gant gauche et écouvillonnage d'un gant droit).Les différents prélèvements ainsi que leurs descriptifs sont listés dans le Tableau 16.

Tableau 17 : *Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – Liste des prélèvements*

	Support	Prélèvement	Quantité d'ADN (ng)
TR1-PC	Sac de couchage	Découpe auréole C+O-, prélèvement divisé en 2	178
TR1-MW			14
TR2-PC	Mégot	Découpe papier filtre, prélèvement divisé en 2	106,5
TR2-MW			106
TR3-PC	Mégot	Découpe papier filtre, prélèvement divisé en 2	73
TR3-MW			122
TR4-PC	Paire de gants	Découpe intérieur entre pouce et index gant droit	4,2
TR4-MW		Découpe intérieur entre pouce et index gant gauche	3,9
TR5-PC	Paire de gants	Ecouvillon intérieur gant gauche	22,6
TR5-MW		Ecouvillon intérieur gant droit	14
TR6-PC	Lingette	Découpe d'une tache C+O+, prélèvement divisé en 2	1
TR6-MW			0
TR7-PC-1	Lingette	Découpe d'une tache C+O+, prélèvement divisé en 2	1,6
TR7-MW-1			0,7
TR8-PC-1	Chaussures	Découpe intérieur talon chaussure droite	0
TR8-MW-1		Découpe intérieur talon chaussure gauche	0,1
TR9-PC	T-shirt	Découpe zone C+O+ sous aisselle gauche, prélèvement divisé en 2	30,8
TR9-MW			15
TR10-PC	T-shirt	Découpe zone C+O- sous aisselle gauche, prélèvement divisé en 2	21
TR10-MW			0
TR11-PC	Caleçon boxer	Découpe zone C+O- niveau pubis, prélèvement divisé en 2	56
TR11-MW			222,5
TR12-PC	Chaussettes	Découpe niveau talon chaussette notée A	0,5
TR12-MW		Découpe niveau talon chaussette notée B	7,5
TR13-PC	Bonnet	Ecouvillon de l'intérieur du bonnet	48,6
TR13-MW		Ecouvillon de l'intérieur du bonnet (2ème éc.)	34,4
TR14-PC	Casquette	Découpe intérieur sur zone C+O+ niveau front, prélèvement divisé en 2	124
TR14-MW			119,5
TR15-PC	Echarpe	Ecouvillon de la face notée A	5,4
TR15-MW		Ecouvillon de la face notée A (2ème éc.)	10,4
TR16-PC	Echarpe	Ecouvillon de la face notée B	8
TR16-MW		Ecouvillon de la face notée B (2ème éc.)	11,1
TR17-PC	Cagoule	Découpe zone bucco-nasale, prélèvement divisé en 2	48,6
TR17-MW			40
TR18-PC	Brosse à dents	Ecouvillon de la brosse à dents	10,2
TR18-MW		Ecouvillon de la brosse à dents (2ème éc.)	7,2

C+ : Visible au Crimescope, C- : Non visible au Crimescope, O+ : Visible à l'œil nu, O- : Non visible à l'œil nu, éc : écouvillonnage.

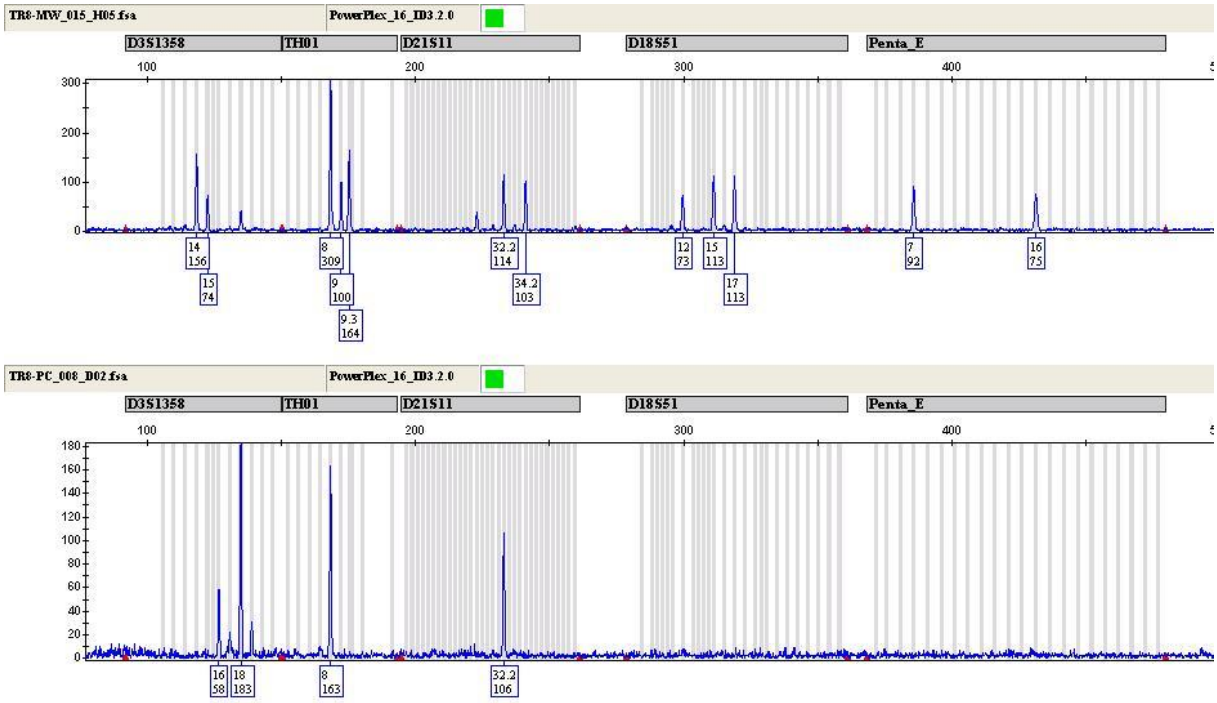
PC : Phénol/Chloroforme, MW : Maxwell

Les prélèvements ainsi réalisés sont extraits soit par la méthode au Phénol/Chloroforme soit par l'extraction par le Maxwell® 16 Forensic Instrument et le kit DNA IQ™ Casework Pro (Cf. Tableau 17). Les extraits d'ADN sont ensuite quantifiés par PCR en temps réel à l'aide du kit Quantifiler®, puis les ADN sont amplifiés par PCR à l'aide du kit PowerPlex®16 HS et migrés en électrophorèse capillaire.

Ce que je cherche à visualiser sur les prélèvements d'un même support est que l'assignation des pics de fluorescence soit la même et donc que les profils génétiques obtenus soient identiques. L'intensité moyenne de fluorescence est également comparée entre les deux prélèvements d'un même support.

Les mêmes allèles ont été validés pour les prélèvements TR1, TR2, TR3, TR11, TR13, TR14, TR16 et TR17, quel que soit la technique d'extraction. Pour les prélèvements TR6, TR7 et TR8 les intensités de fluorescence et les mélanges (Cf. Figure 15) sont trop complexes pour permettre la validation d'un profil génétique, et ceux quel que soit la méthode d'extraction.

Figure 15 : *Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – Profil montrant un mélange d'ADN*



TR8-MW avec de faibles intensités de fluorescence et en mélange ininterprétable. TR8-PC avec de faibles intensités de fluorescence

Pour les prélèvements TR10 aucun pic de fluorescence n'est visualisé avec l'extraction par le Maxwell® 16 Forensic Instrument alors que quelques allèles ont été obtenus avec l'extraction Phénol/Chloroforme, permettant la validation d'un profil partiel. Pour les prélèvements TR4, TR5, TR9 et TR15 des profils similaires ont été obtenus entre les deux types d'extractions, cependant sur certains locus, pour les extraits obtenus par le Maxwell® 16 Forensic Instrument, des pics de fluorescence différents sont présents, ces pics de fluorescence sont des pics surnuméraires (Cf.

Figure 16). Les profils obtenus par extraction Phénol/Chloroforme étant des mélanges, aucun profil génétique n'aurait pu être validé ; la présence de pics de fluorescences surnuméraires pour les extraits obtenus avec l'extraction par le Maxwell® 16 Forensic Instrument n'affecte donc pas le résultat qualitatif.

Figure 16 : *Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – profils montrant des pics surnuméraires (échantillon TR9)*



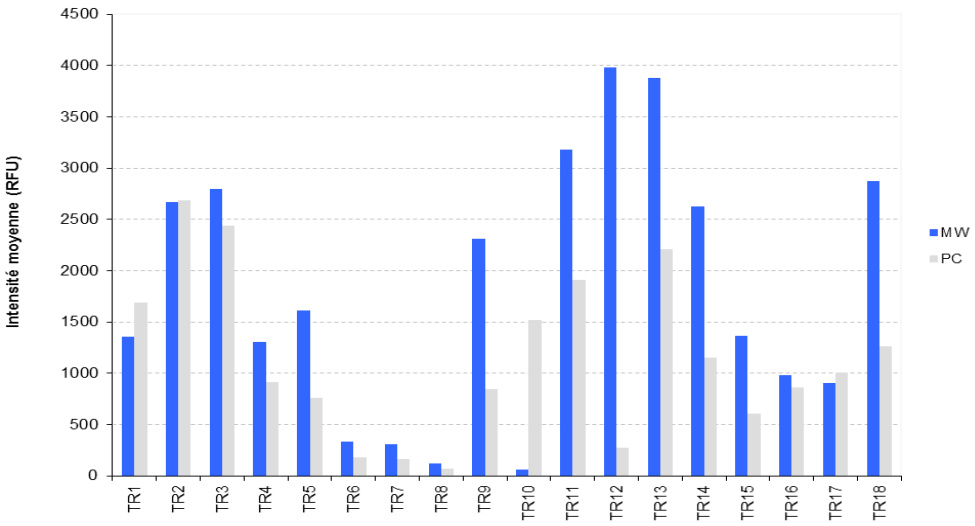
Exemple d'allèle surnuméraire : L'allèle « 12 » du locus D18S51 ne se voit que sur l'extrait obtenu par l'extraction MAXWELL

En ce qui concerne les prélèvements TR12, j'observe de nombreux pics de fluorescence, certains sont communs entre les deux méthodes d'extraction et d'autres sont différents. Je note que l'intensité des pics de fluorescence obtenue est plus forte avec l'extraction par le Maxwell® 16 Forensic Instrument. Les mélanges d'ADN, que j'observe sur les extraits de ce scellé, présentent des différences. Au regard du contexte de l'affaire dans lequel se scellé est à expertiser, les mélanges d'ADN peuvent s'expliquer de par le fait que cette paire de chaussettes aurait été portée par plusieurs individus, les différences d'allèles observées entre les deux extraits pouvant s'expliquer par le fait que nos prélèvements n'ont pas été réalisés sur la même chaussette de la paire et que les différents individus qui ont portées cette paire de chaussettes, n'auraient pas déposé la même quantité de matériel biologique dans les deux chaussettes. Enfin, pour les prélèvements TR18 les profils obtenus sont identiques à l'exception d'un locus, le locus CSF1PO pour lequel un

allèle non répertorié (allèle ne faisant pas partie des allèles contenu dans le MAL du kit PowerPlex®16 HS) est observé en plus pour l'extrait obtenu par extraction avec le Maxwell® 16 Forensic Instrument.

Afin de mieux comparer les profils obtenus entre les deux types d'extractions, j'ai effectué la comparaison uniquement à partir des allèles communs obtenus. La Figure 17 présente les intensités moyennes des profils obtenus pour chaque trace (Cf. Tableau 17), selon la méthode d'extraction utilisée.

Figure 17 : *Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme - Intensités moyennes des profils*



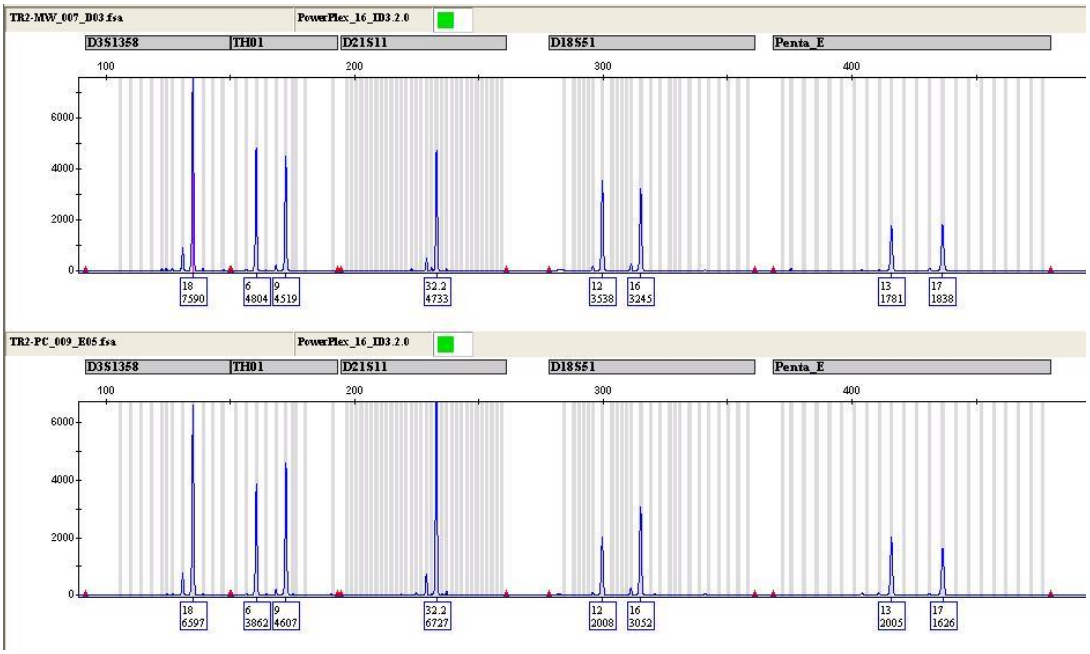
Les intensités moyennes ont été calculées à partir des intensités des allèles communs

Différentes catégories de prélèvements sont à prendre en compte :

- Prélèvements lancés dans les mêmes conditions d'amplification (même facteur de dilution)
- Prélèvement lancés dans des conditions d'amplification différentes et absence d'inhibiteur
- Prélèvement lancés dans des conditions d'amplification différentes et présence d'inhibition pour les extraits obtenus par Phénol/Chloroforme

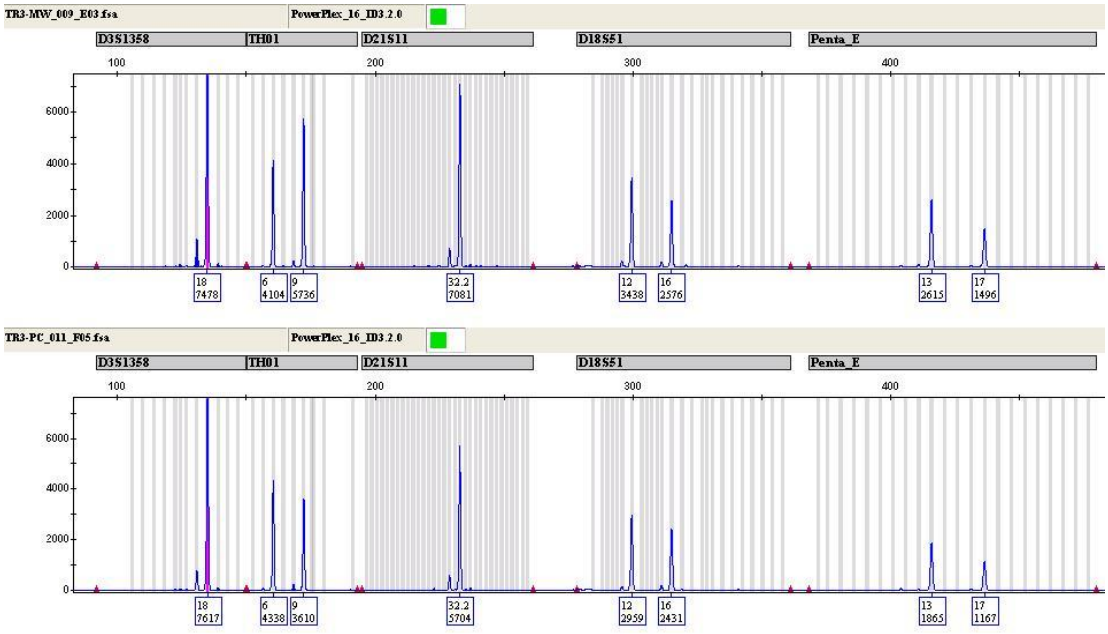
Pour ce qui est des prélèvements lancés avec un facteur de dilution identique entre l'extrait obtenu avec le Maxwell® 16 Forensic Instrument et celui obtenu par Phénol/Chloroforme, comme cela est le cas des échantillons TR2, TR4 et TR6, les profils ainsi obtenus ont des intensités moyennes de fluorescences similaires (Cf. Figure 18).

Figure 18 : *Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – Profils de l'échantillon TR2*



Pour ceux lancés avec des facteurs de dilutions différents et sans présence d'inhibiteur détecté (cas des échantillons TR3, TR7, TR9, TR11, TR13, TR14 et TR18), les intensités moyennes sont équivalentes lorsque les facteurs de dilutions sont proches comme pour les échantillons TR3 et TR7 (Cf. Figure 19).

Figure 19 : *Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – Profils de l'échantillon TR3*

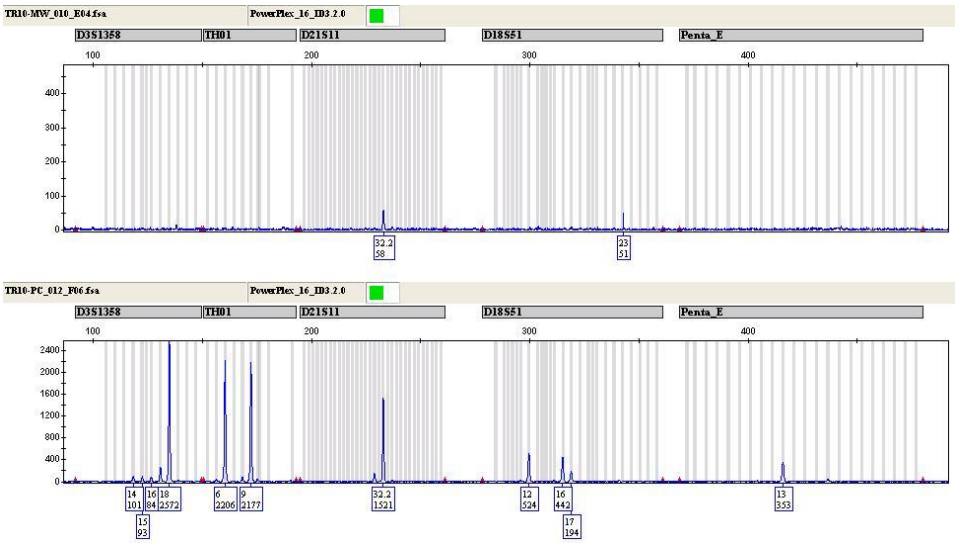


L'intensité moyenne obtenue pour les essais obtenus par le Maxwell ® 16 Forensic Instrument est plus élevée lorsque ceux-ci ont été moins dilués que celui de l'extrait obtenu par Phénol/Chloroforme comme pour les échantillons TR9, TR13, TR14 et TR18 (Cf. Figure 16 : Profil de l'échantillon TR9).

Pour l'échantillon TR11 dont l'extrait obtenu par le Maxwell® 16 Forensic Instrument a été plus dilué que l'extrait obtenu par la méthode du Phénol/Chloroforme, l'intensité moyenne de fluorescence est plus élevée pour celui obtenu par le Maxwell® 16 Forensic Instrument.

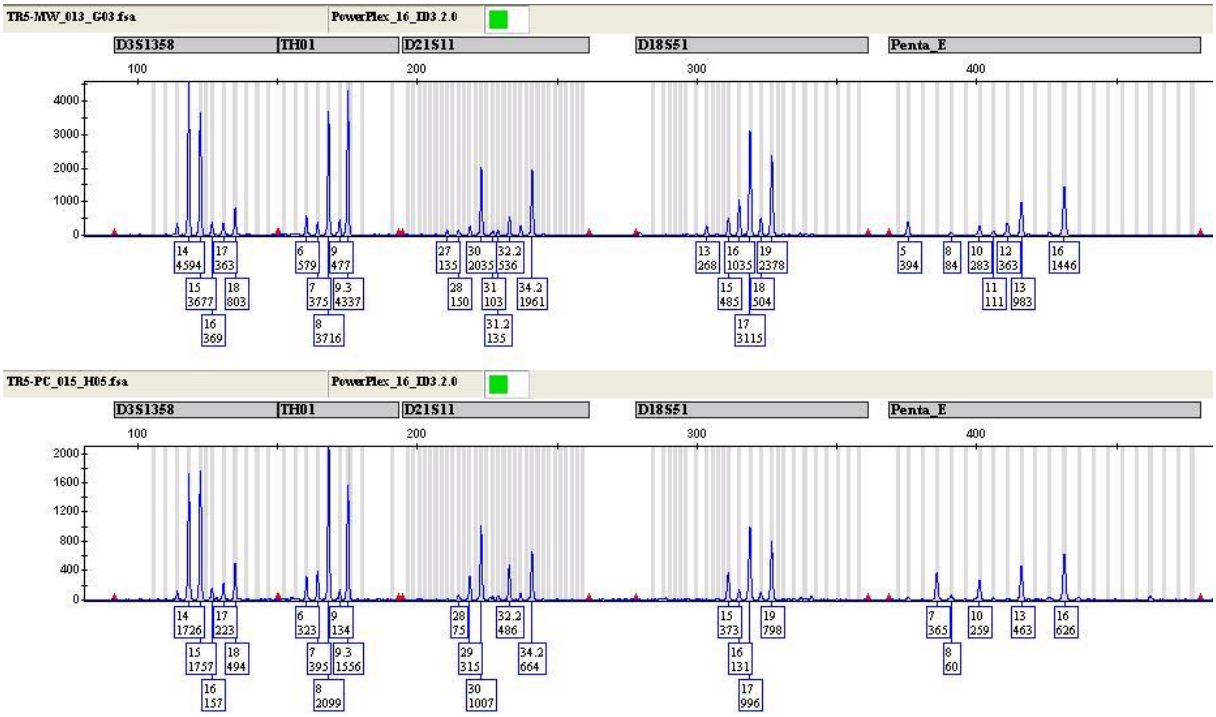
Pour les échantillons lancés avec des facteurs de dilutions différents et la présence d'inhibiteur dans les extraits obtenus par la technique du Phénol/Chloroforme (cas des échantillons TR1, TR5, TR8, TR10, TR12, TR15, TR16 et TR17). Sur ces 8 échantillons, 3 ont eu le prélèvement divisé en deux, les 5 autres ont des prélèvements distincts. Pour les 3 prélèvements divisés en deux la présence d'inhibiteurs est observée uniquement dans l'extrait obtenu par Phénol/chloroforme, On constate que pour deux des de ces trois échantillons, les échantillons TR1 et TR17, les intensités obtenues sont équivalentes, alors que pour le troisième, l'échantillon TR10, aucun profil n'est visualisé pour l'extrait obtenu par le Maxwell® 16 Forensic Instrument alors que celui obtenu par Phénol/Chloroforme est exploitable avec une intensité de fluorescence moyenne d'environ 1500 RFU (Cf. Figure 20).

Figure 20 : *Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – Profils de l'échantillon TR10*



Et pour les 5 autres prélèvements, les échantillons TR5, TR8, TR12, TR15 et TR16, dont les prélèvements ont été réalisés soit l'un après l'autre sur la même zone du support, soit sur une même localisation mais pas sur le même support (par exemple l'intérieur du gant gauche et l'intérieur du gant droit d'une paire de gants), je ne peux pas être certains que la présence d'inhibiteur sur les extraits obtenus par la technique du Phénol/Chloroforme et l'absence d'inhibiteur pour ceux obtenu à l'aide du Maxwell® 16 Forensic Instrument soit donc uniquement liée à la méthode d'extraction. Les intensités moyennes de fluorescence sont plus élevées pour les extraits obtenus par le Maxwell® 16 Forensic Instrument (Cf. figure 21).

Figure 21 : *Comparaison extraction Maxwell vs extraction Phénol/Chloroforme – Profils de l'échantillon TR5*



L'étude sur les échantillons de routine montre des résultats similaires à ceux obtenus par la méthode du Phénol/Chloroforme, de plus des inhibitions détectées uniquement sur les extraits obtenus par Phénol/Chloroforme peuvent indiquer la capacité de la méthode du Maxwell® 16 Forensic Instrument à éliminer plus efficacement les inhibiteurs, mais nous ne pouvons pas exclure qu'il ne s'agisse tout simplement de l'absence de réactifs pouvant inhiber la réaction de PCR (ce qui est le cas du Phénol).

L'ensemble de cette étude a donc permis de démontrer que l'extraction de l'ADN par le Maxwell® 16 Forensic Instrument donne des résultats similaires à ceux de la méthode du Phénol/Chloroforme. L'utilisation de la méthode d'extraction à l'aide du kit DNA-IQ Casework Pro et du Maxwell® 16 Forensic Instrument dans le cadre de la détermination d'une empreinte génétique issu de prélèvements de traces est validée et adaptée à notre application.

Cette méthode d'extraction est donc choisie comme méthode d'extraction pour le traitement des échantillons de PMD entrant dans le cadre de l'appel d'offre.

3.2.2. L'adaptation des techniques déjà en place

Le processus analytique définit pour le traitement des dossiers entrant dans la chaine automatisée, diffère principalement par l'étape d'extraction que j'ai validée, entrainant un changement de la méthode utilisée. Cependant les autres étapes ont dues subir des modifications, principalement d'ordre organisationnel, afin de mieux s'adapter au flux important d'échantillons à traiter.

L'étape du processus analytique ayant dû subir des modifications est l'étape de la Quantification par PCR en temps réel. Avec l'obtention du lot n°3 j'avais estimé la quantité quotidienne d'échantillon à 100, nombre d'échantillons entrainant la réalisation quotidienne de 3 plaques de quantification. La réalisation de ces 3 plaques quotidiennes restait techniquement réalisable d'un point de vue occupation des appareils, mais à engendrer un temps d'occupation trop important du technicien en charge de cette étape. Je me suis donc interrogé sur l'organisation de cette étape et notamment la nécessité d'effectuer, pour chaque extrait d'ADN, un double dépôt dans la plaque de mix (le premier dépôt étant l'extrait pur et le second correspondant à sa dilution au 1/20°). Le double dépôt est réalisé pour deux raisons :

- La première raison est qu'en cas de trop forte concentration en ADN nous sortons de notre échelle de concentration et donc de la gamme étalon, ce qui nous obligerait à effectuer une extrapolation de l'allure de la droite étalon au-delà des 50ng/µL, rendant alors l'estimation de la quantité d'ADN dans l'extrait moins fiable. La dilution au 1/20° permet d'obtenir alors une valeur comprise

dans notre échelle de concentration et donc d'estimer de manière plus précise la quantité d'ADN dans notre extrait initial.

- La seconde raison concerne la visualisation de la présence d'inhibiteurs dans nos extraits, si un extrait déposé au pur montre la présence d'inhibiteurs, alors sa dilution au 1/20° nous permet de visualiser si la dilution de l'extrait entraine la suppression de l'effet de ces inhibiteurs.

Dans le cadre de l'appel d'offre, certains scellés qu'il nous est susceptible de recevoir peuvent aboutir à l'obtention d'un extrait fortement concentré en ADN. La dilution au 1/20° reste donc toujours nécessaire à la bonne estimation de la quantité d'ADN se trouvant dans ces extraits. Nos échantillons dit de « Macrotraces » doivent donc toujours être lancé en quantification avec ces deux dépôts « Pur » et « 1/20° ».

En ce qui concerne la visualisation de la présence d'inhibiteurs, lors de la validation de la méthode d'extraction par le Maxwell® 16 Forensic Instrument, nous avons pu constater un plus faible taux d'inhibiteurs dans les extraits par rapport à ceux obtenus par notre méthode du Phénol/Chloroforme (Cf. point 6 du §3.2.1 Validation sur des échantillons de Traces). A ces résultats du dossier de validation de la méthode, nous avons pu constater sur les premiers échantillons entrant dans la chaine automatisée, que le taux d'échantillons présentant des inhibiteurs détectés lors de la quantification est très faible (39 échantillons ont dû être purifiés parmi 18467 extraits réalisé lors du premier semestre de l'année 2012, soit un taux de purification d'environ 0,2%).

Suite à ce constat, la réalisation de la dilution au 1/20° de l'extrait pour être déposée en quantification ne semble pas pertinente pour des échantillons dits de « microtraces » (la quantité d'ADN étant estimée comme faible par le technicien, lors du prélèvement et le taux d'extrait présentant des inhibiteurs étant très faible). Je décide donc de ne plus effectuer la dilution au 1/20° pour les échantillons de « microtraces » lors de nos quantifications. Cette décision entraine une augmentation de l'importance de l'orientation des prélèvements dans l'une de ces deux catégories. Afin d'aider les techniciens dans cette prise de décision, l'orientation a été défini pour la plupart des types de scellés nous parvenant dans le cadre de la chaine PMD (Cf. Tableau 3), et en cas de traitement d'un cas non répertorié, le technicien doit demander l'avis de son ingénieur production . Si la quantité d'ADN d'un échantillon de « microtraces » était finalement plus importante que celle de notre gamme étalon,

alors la réalisation d'une nouvelle quantification par PCR en temps réel pour l'extrait dilué au 1/20 sera réalisée.

Cette décision permet alors de déposer non plus 38 extraits sur une plaque de quantification mais jusqu'à 75 extraits par plaque. De ce fait, seul 2 plaques de quantification au lieu de 3, doivent être réalisées par jour, soit une économie d'une heure (temps nécessaire à la préparation d'une plaque, Cf. Tableau 6) auquel il faut ajouter le temps gagné à ne plus faire autant de dilutions au 1/20°.

3.3. Les ressources

D'après le temps nécessaire à chacune des étapes du processus analytique (Cf. Tableau 9), je détermine les besoins en personnels de la manière suivante :

- 2 Techniciens afin de réaliser les prélèvements
- 1 Technicien afin d'effectuer les extractions Maxwell® 16 Forensic Instrument (la quantité de séries pouvant être réalisée quotidiennement avec les Maxwell® 16 Forensic Instrument étant plus importante que celle pouvant être réalisée par Phénol / Chloroforme, Cf. Figure 3)
- 2 techniciens pour réaliser les quantifications, les PCR, les électrophorèses capillaires et l'analyses des données brutes.

Nous aurions donc besoin d'un total de 5 techniciens pour traiter les échantillons de PMD.

Le nombre de prélèvements journalier étant important quelque soit le lot, je prévois 2 techniciens à ce poste. En extraction, le temps de manipulation ayant été réduit par une partie automatisée, un technicien sera en charge de réaliser l'ensemble des extractions quotidiennes. Pour le poste ayant en charge la réalisation des quantifications, des PCR, des électrophorèses capillaires journalières, un technicien est prévu afin de pouvoir assumer. Enfin pour le dernier poste correspondant aux analyses de données brutes, un technicien est prévu afin d'assumer la quantité quotidienne.

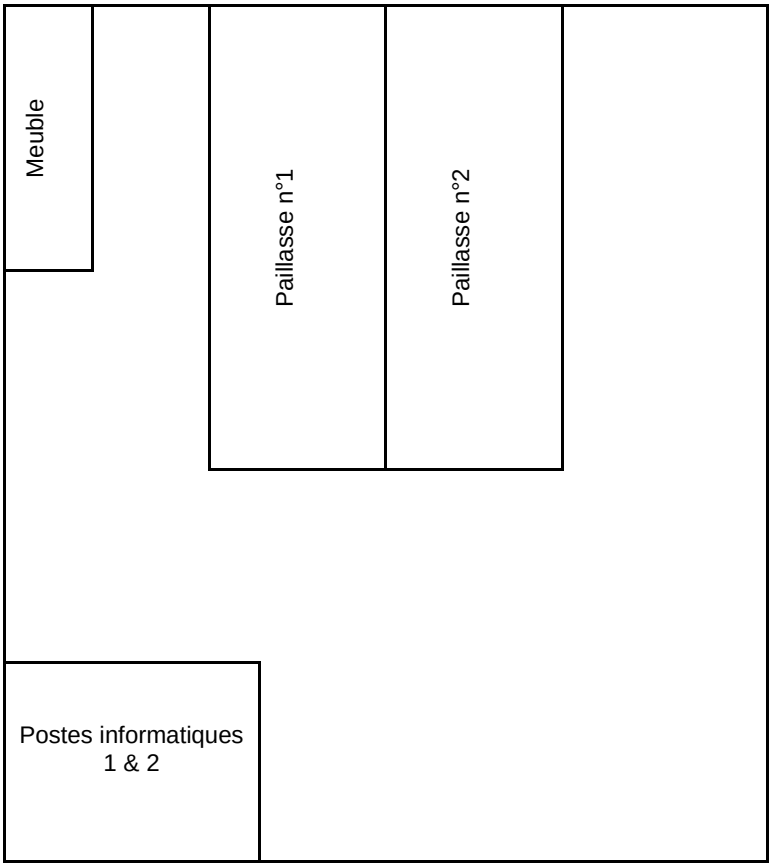
Un total de 5 personnes sera donc à recruter pour réaliser les opérations techniques.

3.3.1. Optimisation des espaces de travail

Le nombre d'échantillon à traiter dans une journée étant en plus grande quantité que ce que le laboratoire a pu avoir jusqu'à présent, certains postes de travail ont dû être pensés afin d'optimiser le travail du technicien. Il s'agit principalement des postes de prélèvements et d'extractions, pour lesquels le technicien effectuera la tache durant toute sa journée de travail alors que sur les postes de Quantification, de PCR, d'électrophorèse capillaire et d'analyses à l'aide du logiciel GeneMapper® ID v3.2, le technicien pourra effectuer tour à tour ces différentes étapes du processus analytique (Quantification puis PCR puis .électrophorèse capillaire et enfin analyses des données brutes). Les pièces de manipulations, déjà existantes et dédiées à ces étapes du processus analytique comportent chacune plusieurs postes de manipulations. Aucune modification de l'organisation dans ces pièces n'est nécessaire pour accueillir le personnel et la quantité d'analyse engendrée par l'obtention d'un des lots de l'appel d'offre.

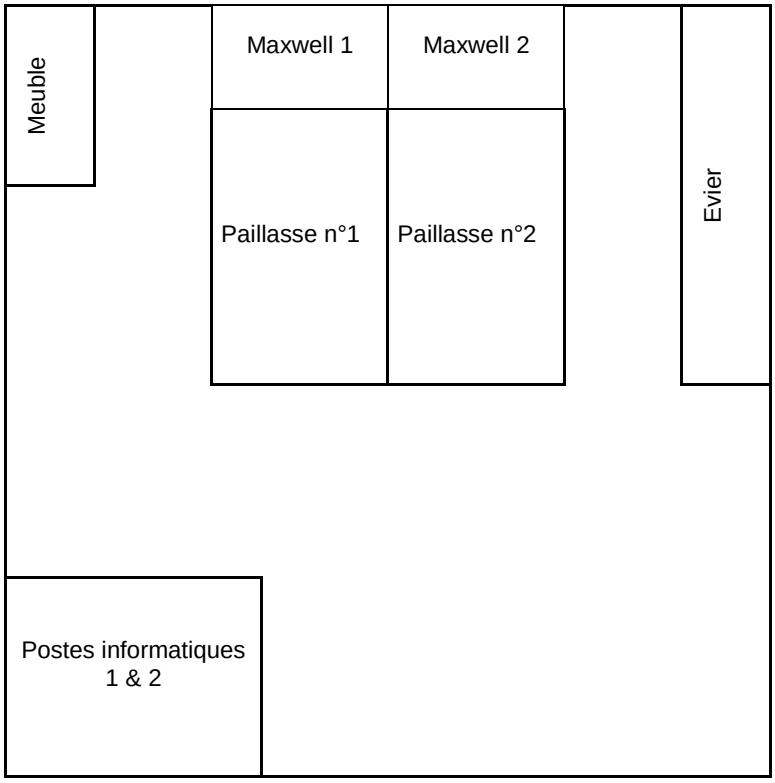
Pour le poste de prélèvements il s'agit d'avoir accès à une paillasse où se trouve à proximité un poste informatique afin d'enregistrer les prélèvements qu'il effectue dans le LIMS. Notre pièce s'appelant « Prélèvement Œil Nu 2 » ou « PRET2 » est choisie afin d'accueillir le technicien qui devra effectuer les prélèvements tout du long de sa journée. J'y installe une surface de travail de 1,5 m x 1,5 m, ce qui pourra permettre la présence de deux techniciens qui pourront effectuer des prélèvements en parallèle (les scellés rentrant dans le cadre de l'appel d'offre ne devant pas être trop volumineux, puisqu'ils doivent pouvoir rentrer dans un format A4 comme le précise les termes du marché public). La paillasse contient le matériel nécessaire à chacun des deux postes de travail, soit pour chacun, un stérilisateur à billes pour stériliser les outils (pinces brucelles, paires de ciseaux) permettant d'effectuer les prélèvements. A côtés de leur paillasse, se trouve un meuble sous paillasse qui contient tous les consommables nécessaires (Tubes, scalpels à usage unique, eau ppi (eau pour préparation injectable), papier paillasse, portoirs, etc.). Ils trouveront à proximité également de leur paillasse un poste informatique (une paillasse contenant deux postes informatiques) qui permet l'accès au LIMS (Cf. Figure 22). La paillasse 1 étant la paillasse qui sera utilisée principalement de par sa meilleure proximité au poste informatique.

Figure 22 : *Schéma d'organisation de la pièce « PRET2 »*



Pour la pièce qui accueillera l'extraction d'ADN, il est décidé de le mettre en place dans notre pièce s'appelant « Prélèvement Œil Nu 1 » ou « PRET 1 », cette pièce se trouvant accolée à celle où seront réalisés les prélèvements, les échantillons pourront donc effectuer un minimum de trajet, tout en restant dans une zone contrôlée (l'accès est réservé au personnel ayant les EPI (Equipements de protection individuelle) adéquats. Tout comme la pièce « PRET2 », la pièce « PRET1 » j'y installe une paillasse de 1,5 m x 1,5 m, qui sera également divisé en 2 postes. Chaque poste sera équipé d'un appareil Maxwell® 16 Forensic Instrument et comprendra également les autres petits appareils nécessaires à l'extraction soit une centrifugeuse de paillasse, un vortex et un stérilisateur à billes. Afin de mettre à jour directement les informations dans le LIMS, le technicien disposera également d'un poste informatique et d'un évier pour effectuer le nettoyage des portoirs (Cf. Figure 23).

Figure 23 : *Schéma d'organisation de la pièce « PRET1 »*



Les pièces de manips ainsi constituées, elles pourront accueillir deux techniciens chacune et permettront de réaliser les quantités quotidienne d'analyses à effectuer.

3.3.2. L'utilisation de matériel en commun avec le reste de la production

Une partie du matériel est spécifique de la chaine PMD, notamment tout ce qui concerne l'extraction. Ces matériels ne sont donc pas soumis à des contraintes liés aux dossiers de production, mais ceci n'est pas le cas pour les étapes du processus analytique suivant l'extraction, soit la quantification de l'ADN par PCR en temps réel, l'amplification de l'ADN par PCR, l'électrophorèse capillaire ainsi que l'analyse des données brutes à l'aide du logiciel Genemapper. Bien que j'ai estimé que le nombre d'appareils permettant d'effectuer ces manipulations sont en quantité suffisante, nous avons pu rencontrer occasionnellement des difficultés d'occupation de nos appareils, dues à nos analyses de production et notamment à l'analyse de dossiers ayant un degré d'urgence importante (dossier devant être traité en moins de 48 heures). Pour éviter au maximum cette situation, pouvant retarder l'obtention des

résultats des dossiers PMD, j'ai envisagé de définir des plages de temps où les appareils seraient en priorité utilisé pour l'analyse des dossiers de PMD (sauf nécessité pour l'analyse des urgences). Ainsi nous avons défini les conditions suivantes :

- Les appareils de PCR en temps réel permettant la réalisation des quantifications en ADN de nos extraits seront réservés à l'analyse des dossiers de PMD en début de journée (de 7h30 à environ 11h). Je fais ce choix car le traitement des dossiers urgents n'engendre que rarement des quantifications sur cette plage horaire, mais correspondant plutôt à la réalisation des prélèvements ou de la réalisation de l'extraction de ces urgences.
- Parmi les 5 thermocycleurs permettant l'amplification de l'ADN par PCR, seul 4 suffisent à traiter nos analyses de production, il en reste donc 1 que je dédie à nos analyses PMD. En cas de besoin pour la PMD et en fonction de la disponibilité des 4 thermocycleurs alloués à la production, des plaques de PCR PMD pourront être effectuées sur ces autres thermocycleurs.
- Le passage des plaques en électrophorèse capillaire devra s'effectuer préférentiellement sur la nuit afin d'éviter de gêner le passage des urgences durant la journée.

Cet établissement de règles a donc nécessité de repenser à l'organisation du poste de QPCR/PCR/Génotypage (occupé par 2 techniciens) entrainant la mise en place d'une synoptique (Cf. Figure 24) :

Figure 24 : Synoptique d'une journée du poste QPCR/PCR/Génotypage

Temps	Technicien n°	descriptif de l'étape
7h30 à 9H00	1	Réalisation de 2 QPCR
9h00	1	Lancement des runs de QPCR sur les 2 appareils
9h00 à 12h00	1	Analyse à l'aide du logiciel Genemapper des 2 plaques effectuées la veille
11h à 12h00	2	Analyses des 2 QPCR et préparations des plans de plaques des PCR
13h00 à 15h00	2	Réalisation de 2 PCR
17h30 à 18h00	2	Réalisation des dénaturations et lancement en électrophorèse capillaire

Comme le montre la figure 24, il s'agit de garantir la réalisation quotidienne d'au moins 2 plaques sur des plages horaires peu compatibles avec l'activité de production. Cette organisation laisse encore environ 2h30 pour chacun des

techniciens afin d'effectuer d'autres manipulations, restant encore au moins une plaque par jour de chacune de ces étapes à réaliser, temps restant qui permettra à ces 2 techniciens de répartir les plaques quotidiennes restant à effectuer (soit 1 plaque de QPCR et 1 plaque de PCR) selon l'occupation des appareils pour l'analyse des dossiers de production. Les techniciens s'appuieront alors sur les plannings de réservation des appareils pour permettre la réalisation de ces manipulations.

3.3.3. Continuité des formations du personnel

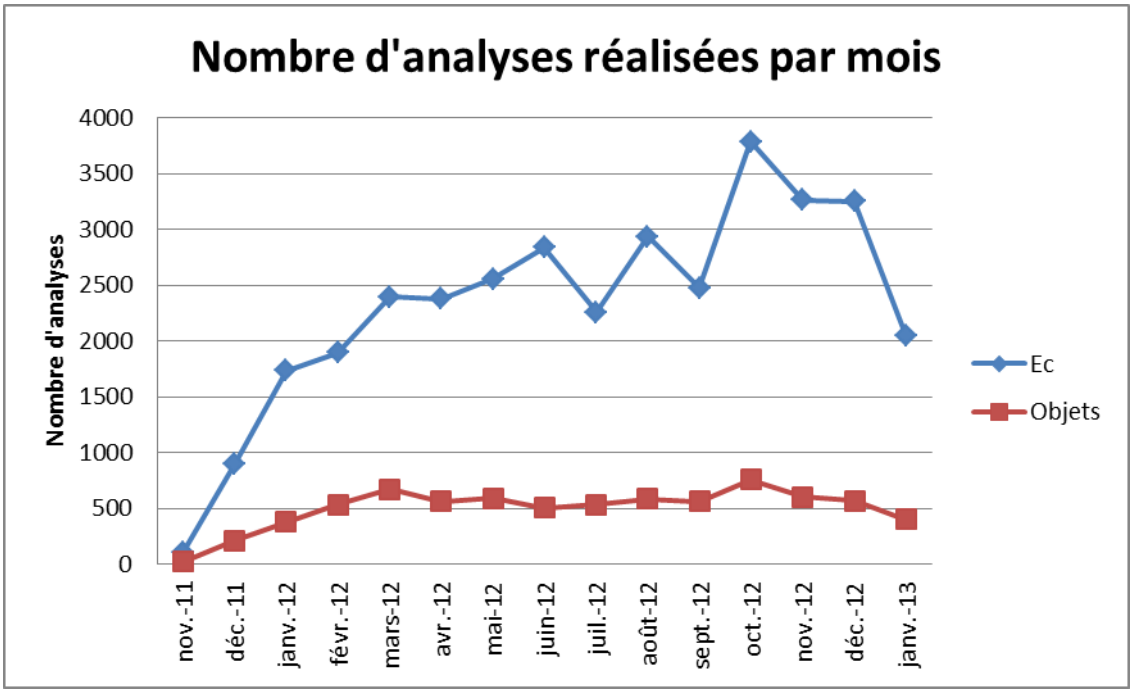
Une fois chaque technicien habilité pour un poste, permettant ainsi le traitement des premiers échantillons, je planifie de former chacun des techniciens sur un second poste. Cela a pour objectif de répondre à 3 problématiques rencontrées : La lassitude des techniciens à effectuer une même tache quotidiennement sur une longue période, la gestion des absences ou congés des techniciens et enfin de me permettre d'attribuer plus de ressources en personnel sur un poste en cas d'afflux d'analyses à effectuer.

Les formations sur un second poste vont s'effectuer selon les mêmes modalités que leur première formation, soit une phase d'observation, suivi d'une phase de réalisation sous contrôle d'un tuteur et de la phase d'habilitation par l'ingénieur production. Contrairement aux premières formations, ces nouvelles formations ont débutées alors que les analyses dans le cadre du Marché ont commencées, rendant alors plus complexe la réalisation de ces nouvelles formations, car durant le temps que doit prendre un technicien à se former, il ne peut pas être en train d'effectuer les analyses en attente au niveau du poste qui lui a été attribué initialement. Pour cette raison j'ai dû réaliser les formations d'un technicien à un second poste, un à la fois, afin de limiter leur effet sur le flux des analyses.

3.4. Quelques statistiques de rendu de résultat

Comme la figure 25 le montre, le nombre d'analyses réalisées chaque mois a fortement augmenté lors des 5 premiers mois pour atteindre un niveau moyen d'analyses réalisées autour de 2500 analyses par mois. Durant les mois d'Octobre à décembre 2012, une nouvelle hausse de la quantité d'analyses réalisées par mois est survenue. La baisse du nombre d'analyses réalisées en janvier 2013 correspond à la fin du Marché. Ces quantités d'analyses réalisées par mois ont fait que notre quota de 36 000 analyses a été atteint dès le mois de novembre 2012, soit 12 mois après le début du Marché alors que le Marché étaient prévu pour 18 mois, nous avons donc reçu en moyenne par jour 150 analyses à effectuer au lieu des 100 que nous avions envisagées. Un avenant au Marché, nous a permis de réaliser des analyses dans le cadre de ce Marché pour 6 000 échantillons supplémentaires, d'où les analyses réalisées de novembre 2012 à janvier 2013, portant ainsi le nombre d'analyses réalisées à 42 000 sur une période de 15 mois.

Figure 25 : Nombre d'analyses réalisées par mois en fonction du type de scellés (EC/Objets)



La Figure 25 nous montre également que le nombre de scellés à analyser contenant un écouvillon est beaucoup plus important que le nombre de scellés contenant un objet, sur la totalité du marché, les écouvillons ont représentés 82% des scellés

analysés (34823 écouvillons analysés sur un total de 42315 scellés). Cette proportion d'écouvillons par rapport aux objets, est un gain de temps important lors des prélèvements (Dans une journée de prélèvements de 7 heures de travail, un technicien réussissait à effectuer plus de 120 prélèvements lorsqu'il ne rencontrait que des écouvillons, tandis qu'il ne pouvait en effectuer que 80 voire 60 s'il rencontrait de nombreux objets). Cette proportion d'écouvillons par rapports aux objets nous a donc été favorables dans le maintien de notre délai 20 jours calendaires pour l'envoi des profils au FNAEG, délai sur lequel nous nous sommes engagés auprès du Ministère de la Justice.

En ce qui concerne la détermination de profil génétique, nous avons comparés la quantité de résultats positifs par rapport à la quantité de résultats négatifs pour les deux types de scellés (écouvillons et objets). Est considéré comme un résultat positif, une analyse d'un scellé ayant abouti à la caractérisation d'au moins une empreinte génétique qui est inscriptible au FNAEG, à l'inverse toute analyse ne permettant la caractérisation d'une empreinte génétique est considérée comme un résultat négatif. Les résultats de la quantité de résultats positifs par rapport au nombre de résultats négatifs sont indiqués dans le Tableau 18. L'on remarque que d'un mois à l'autre, pour un même type de scellé le pourcentage de résultats positifs varie peu, mais surtout qu'environ 1 écouvillon sur 5 permet d'obtenir un résultat positif alors qu'un objet sur 2 permet un résultat positif.

Tableau 18 : *Pourcentages de résultats positifs par type de scellés et par mois*

	nov-11	déc-11	janv-12	févr-12	mars-12	avr-12	mai-12	juin-12	juil-12	août-12	sept-12	oct-12	nov-12	déc-12	janv-13	**Moy.**	**Ecart-type**	**CV (%)**
Ec	26.9	27.5	21.6	26.7	25.1	24.0	21.9	20.8	19.3	17.1	26.2	18.0	18.2	17.9	16.8	**21.9**	**3.9**	**17.9**
Objets	42.9	53.3	46.6	54.6	51.7	52.1	49.4	48.8	48.4	50.9	59.5	43.9	47.0	44.5	40.8	**49.0**	**4.9**	**10.1**

Moy. : Moyenne. Les résultats sont exprimés en % du nombre de résultats positifs par rapport aux nombre total d'analyses effectués dans le mois, pour le type de scellés indiqués

4. Discussions, Perspectives

La réalisation de la partie technique du système de la chaine automatisée que j'ai prévu était basé sur un flux moyen de 100 analyses quotidiennes et devait permettre de pouvoir supporter qu'une légère fluctuation, la chaine se retrouvant limitée par le nombre de personnel travaillant pour cette chaine et les pièces de manipulations ne pouvant accepter plus de 2 personnes à la fois. Comme montré dans le Tableau 13 du §3.1, cette prévision a été dépassée dès le mois de Février 2012, or cette augmentation du nombre d'analyses quotidiennes dépassant les 150 analyses quotidiennes, n'a pas augmenté notre délai de traitements des dossiers qui a été de 19 jours sur la totalité du Marché (le délai sur lequel nous nous étions engagés était de 20 jours). Ce résultat n'a été possible que grâce à la flexibilité du système mis en place, notamment par l'implication du personnel lui-même qui a répondu présent lorsque nous leurs avons proposé d'effectuer des heures supplémentaires afin de traiter les grandes arrivées de scellés, mais également par les mouvements de personnels afin de mettre les ressources humaines là où cela était le plus important (si cela était nécessaire je pouvais réassigner quotidiennement les postes attribués aux personnels au lieu d'une affectation à la semaine, et ainsi augmenter le nombre de personnel affecté au poste le plus nécessitant).

Les formations du personnel de l'équipe technique ont jouées une part importante également dans le maintien du délai de traitement des dossiers de PMD. Pour la première étape de ces formations aboutissant à l'habilitation de chacun des techniciens sur un premier poste du processus analytique, celles-ci se sont réalisées de manières rapides et efficaces (entre 2 à 4 semaines). Cette efficacité a été relative sur la seconde phase devant permettre d'habiliter chaque technicien sur une seconde étape du processus analytique, du fait que le temps pris pour se former, un technicien ne le passera pas à effectuer les analyses sur le poste qui lui a été attribué. Le temps des formations s'est alors allongé jusqu'à prendre 2 mois pour le poste des QPCR, PCR et des électrophorèses capillaires. De cette expérience des formations théoriques mais surtout pratiques durant le Marché, 2 pistes d'améliorations pour réduire le temps de ces formations sont envisagées pour des formations futures. La première de ces pistes consiste à remettre en question nos critères d'habilitations (Cf. Tableau 10 du §2.3.2) et ainsi voir si pour certaines des étapes du processus nous pouvons nous permettre de diminuer le nombre de

manipulations sous tutelle devant être réalisé par le technicien à habiliter avant qu'il puisse obtenir son habilitation. En diminuant le nombre de manipulation à réaliser sous tutelle, nous diminuons le temps qu'il aura été nécessaire pour que le technicien soit prêt à être habilité. Il faudra cependant faire attention dans ce cas, à ce que la diminution du nombre de manipulation à réaliser avant d'être habilité, ne soit pas trop faible, ce qui pourrait entrainer ainsi une augmentation du risque d'erreur lié au manque d'automatismes du technicien nouvellement habilité La seconde piste pouvant être envisagée est la réalisation de ces formations sur des heures supplémentaires du technicien en formation, ainsi le technicien continuerai à effectuer ces analyses durant son temps de travail habituel et pourrait donc effectuer le nombre de manipulation requis selon l'étape du processus analytique pour laquelle il doit être formé et selon les critères d'habilitation (Cf. Tableau 10 du §2.3.2) de cette étape du processus analytique. La contrainte majeure de cette piste d'amélioration du temps de formation, lorsque le technicien est déjà habilité pour au moins un poste, est le coût financier, car cela nécessite de payer en heures supplémentaires le technicien en cours de formation. Cependant, le technicien devrait ainsi être opérationnel sur de nouveaux postes plus rapidement nous permettant alors d'augmenter notre flexibilité d'organisation de la chaine.

Le dossier de validation de l'extraction de l'ADN à l'aide du Maxwell® 16 Forensic Instrument et du kit DNA IQ™ Casework Pro a été soumis au COFRAC afin que cette méthode d'extraction puisse rentrer dans notre portée d'accréditation. Le COFRAC a statué favorablement lors de son audit du 01/02/2014, nous permettant ainsi de pouvoir à présent établir sous COFRAC des rapports d'expertises dont l'extraction de l'ADN aura été effectuée par cette nouvelle méthode. Le fait que cette technique entre dans la portée d'accréditation du laboratoire n'est pas encore une obligation d'un point de vue des lois Françaises, mais cela répond déjà aux préconisations de l'Europe vis-à-vis des analyses ADN dans le cadre judiciaire. Le laboratoire possède donc une deuxième méthode d'extraction qui peut donc être utilisée pour l'analyse de scellés Traces.

A la fin du Marché, le taux de résultats positifs est de 25 % pour l'ensemble des scellés traités (écouvillons et petits objets), si l'on regarde par type de scellé il est de 21,9 % pour les écouvillons et de 49 % pour les petits objets. Manquant de statistiques comparables pour nos analyses de production, il nous est difficile de

déterminer l'impact du choix de la méthode d'extraction pour la chaine PMD sur ce taux de résultats positifs. Si l'on se base sur le dossier de validation de la nouvelle méthode d'extraction, l'extraction par le Maxwell® 16 Forensic Instrument et du kit DNA IQ™ Casework Pro entrainerait un taux de résultats positifs plus faible que si l'extraction était réalisé avec la méthode du Phénol/Chloroforme. Mais en tenant compte du tarif facturé pour l'analyse, les taux de résultats positifs et notamment ceux obtenus pour les petits objets restent très satisfaisant.

Le Marché terminé, les dossiers d'infractions de type délits, au vu de leur nombre et des préjudices, étaient à nouveau traités uniquement par les laboratoires de la Police et de la Gendarmerie. La quantité de dossiers pour des infractions de type délits est telle que ces laboratoires se sont à nouveau retrouvés saturés, augmentant ainsi le temps de traitement des dossiers, ralentissant de nouveau le traitement de l'affaire. Fort de son expérience acquise par le traitement du Marché, le laboratoire proposa, depuis la fin de l'année 2012, aux services d'enquêtes de réaliser les analyses ADN dans le cadre de leurs dossiers de PMD selon un processus d'analyses similaire à celui du Marché. Les différences entre l'analyse nouvellement proposée et celle réalisée durant le Marché concerne :

- la limitation à 3 scellés par dossiers avec 1 unique prélèvement par scellé que nous avons retiré (l'analyse d'un dossier se fera à l'unique condition d'une acceptation d'un devis par un Procureur ou un Juge d'Instruction).

- Le délai de traitement de ces analyses passe de 20 à 30 jours calendaires, et le délai prend fin non plus lorsque l'envoi au FNAEG a été effectué, mais lorsque le rapport d'expertise a été envoyé au requérant.

- Le tarif facturé pour l'analyse de ces dossiers passe de 76€ à 79€ par analyse, du fait que le nombre de dossiers à traiter sera plus faible que lors du Marché.

L'objectif visé par le laboratoire pour ce type d'analyse est de réaliser 900 analyses par mois. Depuis que le laboratoire propose cette analyse, le nombre de dossiers et de scellés à analyser dans ce cadre n'a cessé d'augmenté, pour l'année 2015, cette analyse proposée a concerné plus de 5200 dossiers, correspondant à l'analyse de plus de 10 000 scellés, nous permettant ainsi d'atteindre l'objectif fixé. Pour l'année

2016, la quantité d'analyses effectuée a encore augmenté pour atteindre une moyenne de 1300 analyses par mois.

Ces quantités d'analyses réalisées montrent ainsi que les services d'enquêtes ont un réel besoin quant à ce type d'analyses et également montrent la satisfaction des requérants vis-à-vis de notre chaine.

5. Bibliographie

(1) LEGIFRANCE, Code pénal - Article 111-1 du 01 mars 1994

Disponible sur

« https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006070719&idArticle=LEGIARTI000006417175&dateTexte=&categorieLien=cid »

(2) Groupe EUROFINS

Disponible sur « http://www.eurofins.fr/fr-fr.aspx »

(3) DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 Technical Manual # TM332

Disponible sur « http://france.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/dna-iq-casework-pro-kit-for-maxwell-16-protocol/ »

(4) Quantifiler® Human DNA Quantification Kit and Quantifiler® Y Human Male DNA Quantification Kit User's Manual
Disponible sur
« http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041395.pdf »

(5) PowerPlex® 16 HS System Technical Manual # TMD022

Disponible sur « http://france.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-16-hs-system-protocol/ »

6. Annexes

Annexe 1 : *Modèle d'un rapport d'expertise*

Partie Administrative du rapport

AOTRAC-12-019-182		
EXPERTISE REALISEE A LA DEMANDE DE :	Nom et Prénom de l'enquêteur	Grade de l'enquêteur
	Nom et Adresse du service d'enquête	
PROCÉDURE N°	N° de la procedure	
REQUISITION EN DATE DU : *copie jointe en annexe*	Date de la Réquisition	
SCELLES PRIS EN CHARGE/REÇU LE :	Date d'arrivée des scellés	

Je soussigné Olivier Pascal, Docteur en Pharmacie, Docteur en Sciences, exerçant au sein de l'Institut Français des Empreintes Génétiques, Site de la Géraudière, rue Pierre Adolphe Bobierre à NANTES, expert inscrit sur la liste de la Cour d'Appel de Rennes, et agréé par la Cour Nationale de Cassation,

→ Ayant reçu délégation, en date du [date de la délégation], de l'Institut Français des Empreintes génétiques, expert inscrit sur la liste de la Cour d'Appel de Rennes,

→ Déclare avoir rempli la mission demandée, établi le présent rapport des constatations faites avec les conclusions qui en découlent.

→ → → → → → → → Nantes, le

Partie Technique du rapport

N° du dossier	COMPTE-RENDU

RESULTATS D'ANALYSE

Scellé	Prélèvements	Empreinte Génétique
N° du scellé Code-barres FNAEG	*N° du prélèvement* Descriptif du prélèvement réalisé	Résultat de l'analyse

FNAEG/SCPPB

Scellé	Prélèvement	Envoi FNAEG	Etat du scellé	Devenir du scellé/extrait
N° du scellé	N° du prélèvement	Absence de Profil ou Profil	Reste ou utilisé en totalité	Renvoi au requérant ou envoi au SCPPB du scellé et envoi ou destruction de l'extrait d'ADN

Je déclare avoir réalisé cette expertise personnellement.

Je certifie ce rapport sincère et véritable.

→ → → → → → → → Nantes, le [date de la rédaction]

Annexe 2 : *Résultat du Tests sur la Limite de Détection*

Témoin négatif	Moyenne (m)	Ecart-type (s)	Témoin négatif	Moyenne (m)	Ecart-type (s)
TMAX10-121220-AC	**5.87**	**2.42**	TMAX3-121227-LT	**5.41**	**2.34**
TMAX10-121224-AC	**4.39**	**2.00**	TMAX4-121220-AC	**5.00**	**2.16**
TMAX10-121226-AC	**4.06**	**2.02**	TMAX4-121220-LB	**5.84**	**2.75**
TMAX11-121219-AC	**4.17**	**1.88**	TMAX4-121221-AC	**3.96**	**1.83**
TMAX11-121220-AC	**5.02**	**2.08**	TMAX4-121221-LB	**4.40**	**1.84**
TMAX11-121226-AC	**4.79**	**2.12**	TMAX4-121224-AC	**4.63**	**2.26**
TMAX1-121220-AG	**5.31**	**6.54**	TMAX4-121226-AC	**4.83**	**3.33**
TMAX1-121220-LB	**4.88**	**2.87**	TMAX4-121226-LB	**3.97**	**1.89**
TMAX1-121220-LT	**4.46**	**2.11**	TMAX4-121227-AC	**5.29**	**2.53**
TMAX1-121221-AC	**4.50**	**2.21**	TMAX5-121220-AC	**5.10**	**2.49**
TMAX1-121221-AG	**5.34**	**2.05**	TMAX5-121220-LB	**4.97**	**2.14**
TMAX1-121221-LB	**4.90**	**2.21**	TMAX5-121220-LT	**4.92**	**2.44**
TMAX1-121221-LT	**4.90**	**2.13**	TMAX5-121221-AC	**3.81**	**1.76**
TMAX1-121226-AC	**5.09**	**5.74**	TMAX5-121221-LB	**4.85**	**3.38**
TMAX1-121226-AG	**4.45**	**2.09**	TMAX5-121221-LT	**3.94**	**1.98**
TMAX1-121226-LB	**4.33**	**2.41**	TMAX5-121224-AC	**4.57**	**2.10**
TMAX1-121227-AC	**4.60**	**1.88**	TMAX5-121226-AC	**4.76**	**2.48**
TMAX1-121227-AG	**6.30**	**2.55**	TMAX5-121226-LB	**4.73**	**2.31**
TMAX1-121227-LB	**4.99**	**2.12**	TMAX5-121227-AC	**5.04**	**1.99**
TMAX1-121227-LT	**7.15**	**3.71**	TMAX5-121227-LT	**5.32**	**4.33**
TMAX12-121220-AC	**4.64**	**2.42**	TMAX6-121219-AC	**4.28**	**2.02**
TMAX2-121220-AC	**5.36**	**7.33**	TMAX6-121220-AC	**4.60**	**2.10**
TMAX2-121220-AG	**4.34**	**1.84**	TMAX6-121220-LB	**4.57**	**2.05**
TMAX2-121220-LB	**4.41**	**2.14**	TMAX6-121220-LT	**4.08**	**2.14**
TMAX2-121220-LT	**6.13**	**2.81**	TMAX6-121221-AC	**4.21**	**1.88**
TMAX2-121221-AC	**6.51**	**2.96**	TMAX6-121221-LB	**4.17**	**1.97**
TMAX2-121221-AG	**4.60**	**1.91**	TMAX6-121224-AC	**4.65**	**1.82**
TMAX2-121221-LB	**4.29**	**1.80**	TMAX6-121226-AC	**4.43**	**3.30**
TMAX2-121221-LT	**4.08**	**2.07**	TMAX6-121226-LB	**4.73**	**2.95**
TMAX2-121224-AC	**4.85**	**2.37**	TMAX6-121227-AC	**4.72**	**2.02**
TMAX2-121226-AC	**4.02**	**2.04**	TMAX6-121227-LB	**5.27**	**2.34**
TMAX2-121226-AG	**4.27**	**2.05**	TMAX7-121219-AC	**4.96**	**3.50**
TMAX2-121226-LB	**4.04**	**1.87**	TMAX7-121220-AC	**6.47**	**6.75**
TMAX2-121227-AC	**4.68**	**2.12**	TMAX7-121220-LB	**4.97**	**3.11**
TMAX2-121227-AG	**5.57**	**3.50**	TMAX7-121220-LT	**6.18**	**2.70**
TMAX2-121227-LB	**4.89**	**2.62**	TMAX7-121221-AC	**4.35**	**1.97**
TMAX2-121227-LT	**4.81**	**1.95**	TMAX7-121224-AC	**4.56**	**2.12**
TMAX2-121231-LB	**4.74**	**2.28**	TMAX7-121226-AC	**3.87**	**1.66**
TMAX3-121220-AC	**5.14**	**2.21**	TMAX7-121227-AC	**6.48**	**2.86**
TMAX3-121220-LB	**4.90**	**2.63**	TMAX8-121220-AC	**5.91**	**2.72**
TMAX3-121220-LT	**4.62**	**2.27**	TMAX8-121220-LB	**4.96**	**2.36**
TMAX3-121221-AC	**4.41**	**2.18**	TMAX8-121221-AC	**3.98**	**2.26**
TMAX3-121221-AG	**4.59**	**2.06**	TMAX8-121224-AC	**5.05**	**2.32**
TMAX3-121221-LB	**5.44**	**6.45**	TMAX8-121226-AC	**4.24**	**2.03**
TMAX3-121221-LT	**5.54**	**2.65**	TMAX8-121227-LB	**5.40**	**3.92**
TMAX3-121224-AC	**4.07**	**1.93**	TMAX9-121219-AC	**4.60**	**2.19**
TMAX3-121226-AC	**6.73**	**12.91**	TMAX9-121220-AC	**5.24**	**5.50**
TMAX3-121226-LB	**5.82**	**2.27**	TMAX9-121224-AC	**4.10**	**2.50**
TMAX3-121227-AC	**4.38**	**1.72**	TMAX9-121226-AC	**4.55**	**2.13**
TMAX3-121227-LB	**5.12**	**2.06**	TMAX9-121227-AC	**5.21**	**7.37**
Moyenne (M) =		**4.88**	**Ecart-type (S) =**		**3.23**

La limite de détection (LD) est obtenue par la formule suivante : LD = M + (3S), ce qui nous donne une Limite de détection d'environ 15 RFU. Le seuil de détection que nous avons obtenu lors de ce test est trois moins élevé que le seuil de positivité utilisé en pratique (fixé à 50 RFU). La limite de détection déterminée est donc validée et adaptée à l'analyse de nos échantillons à l'aide du kit DNA IQ™ Casework Pro et du Maxwell® 16 Forensic Instrument.

Annexe 3 : *Test de Sensibilité – Dilutions réalisées par matrice*

	Niveaux de dilution	Volume déposé sur écouvillon	Nombre théorique de cellules
Sang	**1/20**	10 µL	2900
	1/40	10 µL	1450
	1/80	10 µL	725
	1/150	10 µL	390
	1/300	10 µL	190
	1/500	10 µL	100
	1/1000	10 µL	50
Cellules épithéliales	**Niveaux de dilution**	**Volume déposé sur écouvillon**	**Nombre théorique de cellules**
	1/3	10 µL	2013
	1/6	10 µL	1007
	1/10	10 µL	604
	1/20	10 µL	302
	1/40	10 µL	151
	1/60	10 µL	101
	1/80	10 µL	76
	1/100	10 µL	60

Annexe 4 : *Test de Sensibilité – Résultat Génotypage pour le sang*

Essais	Extraction DNA-IQ / Maxwell		Extraction Phénol / Chloroforme	
Sang au 1/150 Nombre théorique de cellules : 390	Quantité moyenne d'ADN : **0.61 ng**	4 profils génétiques sur 4 sont complets (16 loci) => dernier niveau de concentration présentant 100% de profils complets	Quantité moyenne d'ADN : **0.71 ng**	5 profils génétiques sur 5 sont complets (16 loci)
Sang au 1/300 Nombre théorique de cellules : 190	Quantité moyenne d'ADN : **0.24 ng**	5 profils génétiques sur 6 sont complets (16 loci) 1 profil génétique sur 6 est exploitable (6 loci, en plus de l'Amélogénine)	Quantité moyenne d'ADN : **0.51 ng**	6 profils génétiques sur 6 sont complets (16 loci) => dernier niveau de concentration présentant 100% de profils complets
Sang au 1/500 Nombre théorique de cellules : 100	Quantité moyenne d'ADN : **0.17 ng**	6 profils génétiques sur 6 sont complets (16 loci)	Quantité moyenne d'ADN : **0.21 ng**	5 profils génétiques sur 6 sont complets (16 loci) 1 profil génétique sur 6 est exploitable (6 loci, en plus de l'Amélogénine)
Sang au 1/1000 Nombre théorique de cellules : 50	Quantité moyenne d'ADN : **0.34 ng**	3 profils génétiques sur 6 sont complets (16 loci) 3 profils génétiques sur 6 sont exploitables (6 loci, en plus de l'Amélogénine) => dernier niveau de concentration testé présentant 100% de profils exploitables	Quantité moyenne d'ADN : **0.10 ng**	2 profils génétiques sur 6 sont complets (16 loci) 4 profils génétiques sur 6 sont exploitables (6 loci, en plus de l'Amélogénine) => dernier niveau de concentration testé présentant 100% de profils exploitables

Remarque : la différence entre le nombre de profils obtenus (de 4 à 6) et le nombre d'essais de départ (3), s'explique par notre méthodologie qui impose une double amplification pour les échantillons faiblement dosés en ADN (concentration inférieure à 0,02 ng/µl).

Annexe 5 : *Test de Sensibilité – Résultat Génotypage pour les cellules épithéliales*

CAS DES ECHANTILLONS DE CELLULES EPITHELIALES				
Essais	**Extraction DNA-IQ / Maxwell**		**Extraction Phénol / Chloroforme**	
NHEK au 1/40 Nombre théorique de cellules : 143	Quantité moyenne d'ADN : **0.67 ng**	3 profils génétiques sur 3 sont complets (16 loci)	Quantité moyenne d'ADN : **0.51 ng**	5 profils génétiques sur 5 sont complets (16 loci)
NHEK au 1/60 Nombre théorique de cellules : 95	Quantité moyenne d'ADN : **0.32 ng**	3 profils génétiques sur 3 sont complets (16 loci)	Quantité moyenne d'ADN : **0.80 ng**	4 profils génétiques sur 4 sont complets (16 loci)
NHEK au 1/80 Nombre théorique de cellules : 72	Quantité moyenne d'ADN : **0.44 ng**	6 profils génétiques sur 6 sont complets (16 loci) => dernier niveau de concentration présentant 100% de profils complets	Quantité moyenne d'ADN : **0.55 ng**	5 profils génétiques sur 6 sont complets (16 loci)
NHEK au 1/100 Nombre théorique de cellules : 57	Quantité moyenne d'ADN : **0.31 ng**	4 profils génétiques sur 5 sont complets (16 loci) 1 profil génétique sur 5 est exploitable (6 loci, en plus de l'Amélogénine) => dernier niveau de concentration testé présentant 100% de profils exploitables	Quantité moyenne d'ADN : **0.41 ng**	6 profils génétiques sur 6 sont complets (16 loci) => dernier niveau de concentration présentant 100% de profils complets

Annexe 6 : *Test de Répétabilité – Dilutions réalisées par matrice*

Sang	**Niveaux de dilution**	**Volume déposé sur écouvillon**	**Nombre théorique de cellules**
	1/80	10 µL	725
	1/300	10 µL	190
Cellules épithéliale	**Niveaux de dilution**	**Volume déposé sur écouvillon**	**Nombre théorique de cellules**
	1/6	10 µL	1007
	1/80	10 µL	76

Annexe 7 : *Test de Répétabilité – Quantité d'ADN pour le sang*

ESSAIS SANG 1/80			
Essais MW	**Qt ADN (ng)**	**Essais PC**	**Qt ADN (ng)**
Essais 1	1.58	**Essais 11**	3.59
Essais 2	1.67	**Essais 12**	2.79
Essais 3	1.67	**Essais 13**	2.86
Essais 4	1.84	**Essais 14**	2.76
Essais 5	1.63	**Essais 15**	0.76
Essais 6	2.40	**Essais 16**	1.43
Essais 7	1.72	**Essais 17**	2.76
Essais 8	1.81	**Essais 18**	1.33
Essais 9	1.49	**Essais 19**	2.52
Essais 10	2.28	**Essais 20**	4.55
M	**1.81**	**M**	**2.53**
S	0.30	**S**	1.12
CV (%)	16.4	**CV (%)**	44.1

ESSAIS SANG 1/300			
Essais MW	**Qt ADN (ng)**	**Essais PC**	**Qt ADN (ng)**
Essais 1	0.64	**Essais 11**	0.83
Essais 2	0.87	**Essais 12**	0.58
Essais 3	0.78	**Essais 13**	1.82
Essais 4	1.19	**Essais 14**	0.91
Essais 5	0.43	**Essais 15**	*No Ct*
Essais 6	0.69	**Essais 16**	0.66
Essais 7	0.84	**Essais 17**	0.37
Essais 8	0.49	**Essais 18**	0.45
Essais 9	0.58	**Essais 19**	1.45
Essais 10	0.43	**Essais 20**	0.17
M	**0.69**	**M**	**0.80**
S	0.23	**S**	0.53
CV (%)	33.7	**CV (%)**	65.9

Qt. : Quantité

Annexe 8 : *Test de Répétabilité – Quantité d'ADN pour les cellules épithéliales*

ESSAIS NHEK 1/6			
Essais MW	**Qt ADN (ng)**	**Essais PC**	**Qt ADN (ng)**
Essais 1	2.82	**Essais 11**	8.69
Essais 2	3.94	**Essais 12**	11.63
Essais 3	3.65	**Essais 13**	9.19
Essais 4	5.29	**Essais 14**	6.56
Essais 5	3.39	**Essais 15**	8.47
Essais 6	3.54	**Essais 16**	12.25
Essais 7	2.84	**Essais 17**	6.84
Essais 8	4.53	**Essais 18**	9.47
Essais 9	4.44	**Essais 19**	16.03
Essais 10	3.57	**Essais 20**	11.25
M	**3.80**	**M**	**10.04**
S	0.77	**S**	2.84
CV (%)	20.3	**CV (%)**	28.3

ESSAIS NHEK 1/80			
Essais MW	**Qt ADN (ng)**	**Essais PC**	**Qt ADN (ng)**
Essais 1	0.28	**Essais 11**	0.75
Essais 2	0.33	**Essais 12**	0.35
Essais 3	0.51	**Essais 13**	1.50
Essais 4	0.12	**Essais 14**	1.00
Essais 5	0.19	**Essais 15**	1.20
Essais 6	0.50	**Essais 16**	1.35
Essais 7	0.09	**Essais 17**	0.85
Essais 8	0.72	**Essais 18**	0.95
Essais 9	0.36	**Essais 19**	0.95
Essais 10	0.26	**Essais 20**	0.90
M	**0.34**	**M**	**0.44**
S	0.19	**S**	0.14
CV (%)	57.5	**CV (%)**	32.8

Annexe 9 : *Test de Reproductibilité –Résultats de la quantification pour les 2 matrices analysées*

ESSAIS SANG					ESSAIS NHEK			
Sang 1/80	**Qté ADN (ng)**	**Sang 1/300**	**Qté ADN (ng)**		**NHEK 1/6**	**Qté ADN (ng)**	**NHEK 1/80**	**Qté ADN (ng)**
Essais 1	1.16	**Essais 1**	0.79		**Essais 1**	3.43	**Essais 1**	*No Ct*
Essais 2	3.26	**Essais 2**	0.54		**Essais 2**	4.22	**Essais 2**	0.15
Essais 3	2.03	**Essais 3**	0.08		**Essais 3**	4.29	**Essais 3**	0.39
Essais 4	2.63	**Essais 4**	0.75		**Essais 4**	7.39	**Essais 4**	0.24
Essais 5	2.17	**Essais 5**	0.50		**Essais 5**	3.11	**Essais 5**	0.13
Essais 6	2.77	**Essais 6**	0.95		**Essais 6**	2.46	**Essais 6**	0.25
Essais 7	2.77	**Essais 7**	0.83		**Essais 7**	2.08	**Essais 7**	0.20
Essais 8	2.52	**Essais 8**	0.46		**Essais 8**	3.53	**Essais 8**	0.16
Essais 9	1.09	**Essais 9**	0.62		**Essais 9**	5.54	**Essais 9**	0.31
Essais 10	0.81	**Essais 10**	0.29		**Essais 10**	3.84	**Essais 10**	0.24
Essais 11	1.26	**Essais 11**	0.25		**Essais 11**	3.91	**Essais 11**	0.44
Essais 12	1.23	**Essais 12**	0.08		**Essais 12**	5.57	**Essais 12**	*No Ct*
Essais 13	1.40	**Essais 13**	0.58		**Essais 13**	4.28	**Essais 13**	0.61
Essais 14	1.05	**Essais 14**	0.50		**Essais 14**	4.83	**Essais 14**	0.31
Essais 15	0.88	**Essais 15**	0.08		**Essais 15**	5.03	**Essais 15**	0.14
Essais 16	1.96	**Essais 16**	0.37		**Essais 16**	3.47	**Essais 16**	0.24
MOYENNE	**1.81**	**MOYENNE**	**0.48**		**MOYENNE**	**4.19**	**MOYENNE**	**0.27**
Écart-type	0.80	**Écart-type**	0.27		**Écart-type**	1.30	**Écart-type**	0.13
CV (%)	44.0	**CV (%)**	57.0		**CV (%)**	31.1	**CV (%)**	49.5

No Ct : Aucun ADN détecté par la QPCR

Annexe 10 : *Contamination intra-run – Profils obtenus après la PCR, suivi de l'électrophorèse capillaire*

		D3S1358		TH01		D21S11		D18S51		Penta E		D5S818		D13S317		D7S820		D16S539		CSF1PO		Penta D		AMEL		vWA		D8S1179		TPOX		FGA	
Essai 2	**n° allélique**											**13**						**12**				**9**											
	intensité (RFU)											71						113				100											
Essai 12	**n° allélique**											**13**														**18**							
	intensité (RFU)											53														92							
Essai 30	**n° allélique**																															**23**	
	intensité (RFU)																															127	
Essai 36	**n° allélique**																													**11**			
	intensité (RFU)																													104			
Essai 38	**n° allélique**			**9.3**	**10**																												
	intensité (RFU)			122	114																												
Essai 40	**n° allélique**					**29**																				**16**							
	intensité (RFU)					53																				55							
Essai 42	**n° allélique**									**15**								**11**															
	intensité (RFU)									67								185															
Essai 48	**n° allélique**																							**Y**									
	intensité (RFU)																							60									

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

MISE EN PLACE D'UNE CHAINE DE PRODUCTION POUR L'ANALYSE EN GRAND NOMBRE DES DOSSIERS DE PETITES ET MOYENNES DELINQUANCES

ARTIER Mathieu

RÉSUMÉ

L'Institut Français des Empreintes Génétiques est un laboratoire qui réalise des expertises génétiques à la demande du Ministère de la Justice. Depuis sa création, le laboratoire s'est spécialisé dans l'analyse d'affaires criminelles comme des homicides. Ce type d'affaires nécessite la mise en œuvre de tous les moyens possible à sa disposition, pour faire avancer l'enquête ; d'autres types d'affaires, les affaires délictuelles, de gravité moindre que les crimes, peuvent pour des raisons financières ne pas pouvoir bénéficier des mêmes services. D'autant que les délits représentent un plus grand nombre d'affaires que celui des crimes. Pour ces raisons financières, les expertises ADN (Acide Désoxyribonucléique) dans le cadre des délits ne sont, soit non effectuées, soit effectuées par les laboratoires de Police ou celui de la Gendarmerie. En conséquence de cela, ces laboratoires sont saturés et accumulent du retard dans leurs analyses. Le Ministère de la Justice décide alors d'établir un appel d'offre afin de réaliser des analyses ADN pour ces dossiers, permettant ainsi de soulager les laboratoires de la Police et de la Gendarmerie, et espère ainsi diminuer le coût ainsi que le délai de réalisation de ces analyses.

Pour répondre à cet Appel d'offre, notre laboratoire a dû remettre en question son processus analytique, car celui qui est en place, l'a été pour traiter avec le plus grand soin un nombre modéré d'analyses. Le traitement en masse dans notre processus actuel ne pouvait répondre aux critères de l'Appel d'offre, aussi bien en terme de délai qu'en terme de coût. Le laboratoire décida alors de définir et de mettre en place une chaine automatisée dont le but sera de traiter la masse importante d'échantillons.

Dans ce contexte, le laboratoire me confia la responsabilité de la mise en place de la partie technique de cette chaine automatisée, avec pour but de définir le processus analytique, les ressources en matériels et en personnel nécessaire, de définir l'organisation spécifique à cette chaine et d'intégrer cette chaine dans notre système qualité. Puis dans le cas de l'obtention d'un des lots, de m'assurer que les analyses se dérouleront dans les conditions déterminées, afin de rendre les résultats selon les engagements du laboratoire en terme de qualité des analyses, ainsi qu'en terme de délais impartis.

MOTS-CLÉS : Affaires criminelles, Délits, Appel d'Offre, Chaine automatisée, Empreintes Génétiques, Analyse en masse