



**HAL**  
open science

# Mise en place d'une prestation en routine au sein d'un CRB : génotypage par l'étude de SNP d'une collection biologique issue de la recherche clinique

Catherine Delmau-Laffargue

## ► To cite this version:

Catherine Delmau-Laffargue. Mise en place d'une prestation en routine au sein d'un CRB : génotypage par l'étude de SNP d'une collection biologique issue de la recherche clinique. Biologie cellulaire. 2015. dumas-01543318

**HAL Id: dumas-01543318**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01543318>**

Submitted on 20 Jun 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.



CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS  
DE PARIS

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention

du DIPLOME d'INGENIEUR CNAM

Spécialité : Sciences et techniques du vivant

Option : génie biologique

Par

Catherine DELMAU-LAFFARGUE

**Mise en place d'une prestation en routine au sein d'un  
CRB : génotypage par l'étude de SNP d'une collection  
biologique issue de la recherche clinique.**

Soutenu le 10 novembre 2015 devant le jury composé de :

***Présidente :***

Dr Antonia SUAU-PERNET (CNAM Paris)

***Membres :***

Pr Olivier HENNEBERT (Tuteur CNAM Paris)

Mme Vanina JODON (Tuteur CRB HUEP-UPMC, Paris)

Dr Georges UZAN (INSERM U1197, Villejuif)

Mr Bruno DELORME (Macopharma, Mouvaux)

# Remerciements

---

Voilà le point final à ces 8 années de formation au CNAM Paris. Cet important travail n'aurait pas pu aboutir sans l'aide et le soutien précieux de toutes les personnes que je tiens à remercier :

En premier lieu j'adresse mes remerciements au Pr Tabassome Simon et au Dr Jacques Weissenburger pour leur accueil au sein du CRB HUEP-UPMC et pour m'avoir permis de réaliser ce stage en parallèle de mon activité professionnelle.

Merci également aux membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Ensuite je remercie :

Toutes les personnes qui à leur manière, par un simple geste ou un petit service m'ont aidée à mener à bien ce projet,

Mes collègues TEC du CRB HUEP-UPMC, Hélène Bertrand, Bader Grana et Juliette Vouigny pour leur aide et coups de main précieux dans la réalisation des manips,

Mes ancien(ne)s collègues et néanmoins ami(e)s, Mélanie, Julie, Juliette, Sandra, Fida, Orit, Dridri, Fabien, Bénédicte pour leur soutien régulier et leurs encouragements sincères,

Avec un merci tout particulier à Valérie pour m'avoir accompagnée à ma 1<sup>ère</sup> visite au CNAM, celle qui a tout déclenché, c'était en 2007 et je n'ai pas oublié,

Ainsi qu'à Oriane pour son soutien moral indispensable dans les moments difficiles, sa disponibilité à toutes épreuves et son amitié précieuse,

Sans oublier l'investigateur, celui qui m'a convaincue au bout de 2 ans d'acharnement de suivre ce cursus, mon premier supporter qui m'a aussi offert ma première expérience professionnelle, le Dr George Uzan. Un immense merci à toi GU !

Mes beaux-parents pour leur soutien sans faille,

Ma famille et plus particulièrement mes parents pour m'avoir encouragée et soutenue d'année en année pour ne pas lâcher avant la fin,

Ma tutrice, ma responsable, mon modèle mais aussi et surtout mon amie Vanina pour ces précieux conseils avisés et toutes ces « heures sup » de discussion et de réflexion qui ont permis d'aboutir à un travail dont je suis très fière. MERCI DE TOUT CŒUR.

Enfin, mon cher et tendre, ma moitié, ma raison de vivre, mon mari Nicolas. Merci pour avoir supporté et subi ce rythme pendant 8 ans avec ces innombrables aller retours à la gare tard le soir pour me ramener à la maison, les nombreux diners en célibataire, les sorties nocturnes de Flamby et les sacrifices réalisés, le tout sans jamais te plaindre ! Je suis et je le serai toujours reconnaissante pour ta compréhension et ta patience inestimable. MERCI. Je t'aime mon ange et je te promets que désormais L'AVENIR EST A NOUS !



# Table des matières

---

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>Liste des abréviations par ordre alphabétique .....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>Liste des figures et tables.....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>I/ LES CENTRES DE RESSOURCES BIOLOGIQUES.....</b>	<b>- 14 -</b>
a) <i>Définition et cadres normatifs.....</i>	<i>- 14 -</i>
b) <i>Activité de collections biologiques et cadres réglementaires .....</i>	<i>- 17 -</i>
c) <i>Le CRB HUEP-UPMC : bilan d'activité (BA) de mise en collection .....</i>	<i>- 21 -</i>
<b>II/ L'ETUDE FAST-MI.....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>III/ LE GENOTYPAGE.....</b>	<b>- 25 -</b>
a) <i>Historique .....</i>	<i>- 25 -</i>
b) <i>Le polymorphisme génétique.....</i>	<i>- 26 -</i>
c) <i>Principe et méthodes du génotypage.....</i>	<i>- 30 -</i>
1- <i>Les puces à ADN.....</i>	<i>- 30 -</i>
2- <i>La PCR en temps réel .....</i>	<i>- 31 -</i>
3- <i>Le séquençage haut débit.....</i>	<i>- 33 -</i>
d) <i>Applications générales.....</i>	<i>- 34 -</i>
e) <i>Applications dans le cadre du protocole FAST-MI .....</i>	<i>- 36 -</i>
<b>MATERIEL &amp; METHODES.....</b>	<b>- 40 -</b>
La cohorte FAST-MI .....	- 41 -
Réception des prélèvements et extractions d'ADN .....	- 42 -
Contrôle qualité .....	- 44 -
Mise en plaque 96 puits des ADN conformes .....	- 44 -

Génotypage par RT-PCR .....	- 45 -
Méthode d'analyse statistique .....	- 49 -
<b>RESULTATS.....</b>	<b>- 50 -</b>
Extractions d'ADN et Contrôle Qualité .....	- 51 -
Aliquotage en plaque 96 puits.....	- 55 -
Génotypage : Validation de la méthode de dilution des plaques.....	- 58 -
Génotypage : Validation du protocole de RT-PCR.....	- 60 -
Génotypage de la cohorte FAST-MI 2005 .....	- 70 -
Génotypage : étude de l'association des rs3803800 et 11552708.....	- 73 -
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>- 74 -</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>- 87 -</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>- 90 -</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>- 94 -</b>

# Abstract

---

Biobanks have been created and defined in order to recollect with high controlled procedures samples from clinical research protocol. These organizations are part of rigorous quality process required by NF S96-900 and ISO 9001 norms. They allow the research field and industrial to get access to high standard and tracked resources. In this context, in 2005 CRB HUEP-UPMC recollected human blood samples from a clinical protocol in order to demonstrate a link between specific gene polymorphism and the morbidity/mortality of patients included in this project.

To answer to their objective, a genotyping method which is Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) technique has been selected and should be validated by the CRB. This new analysis process is considered as a routine performance which required specific conditions for the handling samples according to their origins; DNA extracted by the CRB HUEP-UPMC or by the user himself.

The development of the technique allowed to genotype 1929 patients and to validate the SNP genotyping method. Several blood samples storage conditions, DNA extraction and storage conditions were tested and analyzed by DNA quality controls. The results demonstrated that genotyping is reliable if DNA is compliant (meaning DNA concentration  $>50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ,  $1.7 < \text{DO } 260/280 \text{ nm} < 2$ ,  $\text{DO } 260/230 \text{ nm} > 1.8$ ), regardless of blood conservation and DNA extraction methods. By contrast, DNA storage process is the most critical step which requires to be conditioned in cryovial and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in the long term.

This information is crucial to provide quality service to external users even for which we have no view of the pre-analytical phase.

Keywords: Biobank, Clinical research, DNA, genotyping, SNP, quality control.

# Liste des abréviations par ordre alphabétique

---

A : Adénine

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine

ADN: Acide désoxyribonucléique

AN: Acide nucléique

ANSM: Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ARN: Acide ribonucléique

BA : Bilan d'activité

BPC : Bonnes pratiques cliniques

C : Cytosine

CCTIRS: Comité Consultatif en matière de Traitement de l'Information dans la Recherche en Santé

CNIL: Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés

COPIL : Comité de Pilotage

CRB: Centre de ressources biologiques

CPP: Comité de protection des personnes

CSP: Code de la Santé publique

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

FAST-MI: Registre Français des syndromes coronaires Aigus avec ou sans sus-décalage du segment ST

G : Guanine

GHUEP : Groupe hospitalo-universitaire de l'est parisien

HUEP: Hôpitaux universitaires de l'est parisien

IDM : Infarctus du myocarde

Indel : Polymorphisme d'insertion-délétion

ISO: Organisation internationale de normalisation

MESR: Ministère de l'enseignement et de la recherche

miARN : micro Acide ribonucléique

MOD : Mode opératoire

NGS : Next-Generation Sequencing

NTC : No Template Control (contrôle négatif de PCR)

OCDE: Organisation de coopération et de développement économique

OGM : Organisme génétiquement modifié

PBMC : Cellules mononucléées de sang périphérique

PCR: Réaction de polymérisation en chaîne

RBM: Recherche biomédicale

RI : Recherche interventionnelle

RNI: Recherche non interventionnelle

Rs : Reference SNP number

RT-PCR : PCR en temps réel

SCA : Syndrome coronaire aigu

SFC : Société française de cardiologie

SLE : Syndrome du lupus érythémateux

SMQ : Système de management de la qualité

SNP: Single Nucléotide Polymorphisms

T: Thymine

UPMC: Université Pierre et marie Curie

URC : Unité de recherche clinique

USIC : Unité de soins intensifs coronaires

# Liste des Figures et Tables

---

<u>FIGURE 1</u> : LOGO DE LA NORME NF S96-900 POUR LES CRB. ....	- 15 -
<u>FIGURE 2</u> : CLASSIFICATION DE LA RECHERCHE CLINIQUE .....	- 18 -
<u>FIGURE 3</u> : REPRESENTATION SIMPLIFIEE ET OBSERVATION DE MICROSATELLITES.....	- 28 -
<u>FIGURE 4</u> : RELATIONS DE TRANSITION ET DE TRANSVERSION ENTRE LES QUATRE BASES CONSTITUTIVES DE L'ADN : A, T, G, C. ....	- 29 -
<u>FIGURE 5</u> : PRINCIPE DES PUCES A ADN. ....	- 31 -
<u>FIGURE 6</u> : PRINCIPES ET ACTEURS DE LA PCR EN TEMPS REEL. ....	- 32 -
<u>FIGURE 7</u> : STRUCTURE SCHEMATISEE DU GENE HUMAIN APRIL ET LOCALISATION DES 2 SNP CIBLES. ....	- 38 -
<u>FIGURE 8</u> : CHRONOLOGIE DES DIFFERENTES ETAPES DE GESTION DES PRELEVEMENTS SANGUINS DESTINES A LA DNATHEQUE. ....	- 43 -
<u>FIGURE 9</u> : ILLUSTRATION D'UNE PLAQUE 96 PUIITS (A GAUCHE) ET D'UN PORTOIR DE 96 TUBES (TUBE PLATE, A DROITE). ....	- 44 -
<u>FIGURE 10</u> : PARAMETRES DU VIIA7 POUR LE GENOTYPAGE EN PLAQUE 384 PUIITS.....	- 47 -
<u>FIGURE 11</u> : PROFIL THERMIQUE PAR DEFAUT POUR UN GENOTYPAGE EN RT-PCR AVEC LE VIIA7. ....	- 48 -
<u>FIGURE 12</u> : REPRESENTATION D'UN RESULTAT TYPE DE DISCRIMINATION ALLELIQUE POUR UN SNP DONNE. ....	- 49 -
<u>FIGURE 13</u> : COMPARAISON DES CONCENTRATIONS D'ADN DES POPULATIONS EXTRAITES EN 2005 ET 2012 ET DOSEES JUSTE APRES EXTRACTION. ....	- 52 -
<u>FIGURE 14</u> : RENDEMENTS D'ADN DE MEMES PRELEVEMENTS COMPARES A 3 TEMPS D'EXTRACTION DIFFERENTS.....	- 53 -
<u>FIGURE 15</u> : ANALYSE DE LA QUANTITE D'ADN NON DEGRADE APRES EXTRACTION ET CONSERVATION A -20°C. ....	- 54 -
<u>FIGURE 16</u> : COMPARAISON DE LA QUALITE DES ADN SM 2005 APRES CONSERVATION A -20°C PENDANT 9 ANS A CONCENTRATION FIXE DANS DIFFERENTS CONDITIONNEMENTS. ....	- 56 -
<u>FIGURE 17</u> : CONTROLE DE LA QUALITE DES ADN SM 2005 APRES CONSERVATION A -20°C PENDANT 9 ANS EN PLAQUE 96 PUIITS SOUS FORME DE CULOTS D'ADN SECS.....	- 57 -
<u>FIGURE 18</u> : CONTROLE DE LA QUALITE DES ADN SM 2012 APRES LA MISE EN PLAQUE 96 PUIITS A CONCENTRATION FIXE ET LA CONSERVATION A -20°C PENDANT PLUSIEURS MOIS. ..	- 58 -
<u>FIGURE 19</u> : CONTROLE DE LA CONCENTRATION DES ADN DES PLAQUES FILLES A 10 NG/ $\mu$ L APRES DILUTION. ....	- 59 -
<u>FIGURE 20</u> : DISCRIMINATION ALLELIQUE DES ECHANTILLONS GENOTYPES LORS DU TEST N°1 POUR CHACUN DES 3 SNP.....	- 61 -
<u>FIGURE 21</u> : DISCRIMINATION ALLELIQUE DES ECHANTILLONS GENOTYPES AVEC LE RS6608 LORS DU TEST N°4. ....	- 62 -
<u>FIGURE 22</u> : DISCRIMINATION ALLELIQUE DES ECHANTILLONS DE LA PLAQUE FILLE N°1 ANALYSES AVEC LE RS6608 LORS DU TEST N°6.....	- 63 -
<u>FIGURE 23</u> : DISCRIMINATION ALLELIQUE DES 117 ECHANTILLONS ANALYSES AVEC LE RS6608 AFIN DE CONFIRMER LES CONDITIONS DU MOD.....	- 65 -
<u>FIGURE 24</u> : EXEMPLE DE SIGNAUX DE FLUORESCENCE OBTENUS POUR UN ECHANTILLON HOMOZYGOTE CC AYANT SUBIS DES DILUTIONS SUCCESSIVES.....	- 66 -
<u>FIGURE 25</u> : GENOTYPAGE D'ADN DE 3 POPULATIONS REPENDANT A DES CONDITIONS D'EXTRACTION ET DE CONSERVATION DIFFERENTES. ....	- 67 -
<u>FIGURE 26</u> : NOMBRE DE CYCLES A PARTIR DUQUEL LE SIGNAL DE FLUORESCENCE DE CHAQUE SONDE SNP EST DETECTE LORS DU GENOTYPAGE DES ADN MESURES AU FLUOROMETRE. ....	- 69 -

<u>FIGURE 27</u> : REPARTITION DES GENOTYPES OBTENUS AVEC LE RS6608 SUR LA COHORTE FAST-MI DE 1929 PATIENTS.....	- 70 -
<u>FIGURE 28</u> : REPARTITION DES GENOTYPES OBTENUS AVEC LE RS3803800 SUR LA COHORTE FAST-MI DE 1929 PATIENTS.....	- 71 -
<u>FIGURE 29</u> : REPARTITION DES GENOTYPES OBTENUS AVEC LE RS11552708 SUR LA COHORTE FAST-MI DE 1929 PATIENTS.....	- 72 -
<u>FIGURE 30</u> : REPARTITION CROISEE DES GENOTYPES DES RS11552708 ET RS3803800 AU SEIN DE LA COHORTE ANALYSEE.....	- 73 -

---

TABLEAU I: DEMARCHES REGLEMENTAIRES DANS LE CADRE DE L'UTILISATION A VISEE SCIENTIFIQUE D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES HUMAINS.....	- 20 -
TABLEAU II : BILAN D'ACTIVITE DU CRB HUEP-UPMC SUR L'ANNEE 2013-2014.....	- 22 -
TABLEAU III : CARACTERISTIQUES DES SNP UTILISES (LIFE TECHNOLOGIES) POUR LE GENOTYPAGE DU GENE APRIL.....	- 46 -
TABLEAU IV : PARAMETRES ET RESULTATS DES TESTS PRELIMINAIRES POUR L'ETABLISSEMENT DU MOD.....	- 64 -

# OBJECTIFS



Un Centre de Ressources Biologiques (CRB) est une structure d'aide à la recherche, qui au minimum réceptionne, conserve et met à disposition des ressources biologiques (matériel biologique et données associées) de manière sécurisée et avec une traçabilité optimale.

Le CRB dans lequel j'ai effectué mon stage d'ingénieur appartient au groupe des Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien (HUEP). Il est situé sur le site de l'hôpital Saint Antoine dans le 12<sup>e</sup> arrondissement de Paris et occupe des locaux de la faculté de médecine Pierre et Marie Curie (UPMC). J'y exerce actuellement en tant que technicienne d'études cliniques sénior.

A mon arrivée au sein du service en Janvier 2014, les seules prestations effectuées par le CRB HUEP-UPMC étaient des extractions d'acides nucléiques (AN) automatisées (ADN, ARN, miARN), des préparations de plasma et sérum ainsi que la mise en collection d'échantillons biologiques variés (dérivés sanguins, AN, placenta, lait maternel).

Parmi les collections détenues par ce CRB, deux cohortes imposantes (plus de 2000 patients) relatives au domaine de la cardiologie et issues de la recherche clinique nécessitaient, au sein de la structure, la mise en place de nouvelles techniques d'analyse afin de répondre aux demandes des initiateurs du projet baptisé FAST-MI ; dont le Pr Simon, responsable de la structure.

La demande consistait à déterminer le génotype des patients pour un gène cible impliqué dans la pathologie étudiée dans ce projet.

Avant mon arrivée, l'ADN des deux cohortes réceptionnées au CRB en 2005 et 2010 a été extrait et stocké à -20°C pour de futures analyses moléculaires. De plus, des prestations externes de génotypage par l'étude de « Single Nucléotide Polymorphismes » (SNP) avaient déjà été pratiquées sur ces cohortes. Pour faire suite à ces premiers résultats, il a donc été envisagé de réaliser des analyses complémentaires en étudiant de nouveaux SNP, mais cette fois en interne.

De ce fait, la mission qui m'a été confiée était de mettre en place, au sein même du CRB, la technique permettant de déterminer le génotype des patients de la cohorte FAST-MI 2005 pour trois SNP sélectionnés. Etant donné que la cohorte FAST-MI 2010 devra également être génotypée, que l'arrivée d'une troisième cohorte FAST-MI est prévue pour fin 2015 et surtout que cette technique de génotypage par l'étude de SNP est très demandée, il semblait judicieux de l'envisager comme une prestation pouvant être effectuée en routine afin de répondre rapidement et efficacement aux éventuelles futures demandes. C'est pourquoi mon rôle était

également de mettre au point les conditions optimales de réalisation d'une telle prestation dans le but d'assurer aux futurs utilisateurs un résultat fiable et reproductible.

L'aspect routinier de la prestation implique donc une réalisation dans le respect des normes qualité du CRB HUEP-UPMC (NF S96-900 et ISO 9001:2008) avec notamment l'aménagement des locaux pour la réalisation de la PCR (délimitation de zones), l'écriture de l'ensemble de la documentation associée (mode opératoire, inventaire des consommables, entretien des appareils, gestion des flux,...), une validation de méthode, la formation du personnel, ainsi qu'une étude de faisabilité en routine et une tarification par rapport aux exigences définies par les parties intéressées (CRB, utilisateur, hôpital, université).

Mais plusieurs questions d'une importance non négligeable se posent pour la réalisation de la prestation de génotypage dans les meilleures conditions en fonction des spécificités de la demande. Sur quels critères de qualité de l'ADN peut-on assurer un génotypage fiable ? Peut-on s'engager à réaliser un génotypage sur des échantillons d'ADN fournis par l'utilisateur, c'est-à-dire sans regard ni traçabilité sur l'extraction et la conservation ? Autant de questions auxquelles je vais tenter de répondre à travers ce mémoire.

# INTRODUCTION

## I/ Les centres de ressources biologiques

### *a) Définition et cadres normatifs*

Vu l'essor des biotechnologies dans les domaines scientifiques et industriels durant les trente dernières années, ainsi que l'évolution des considérations éthiques dans la disposition des prélèvements humains, il a fallu reconnaître l'importance prise par l'impact économique du vivant.

C'est donc en 1999 que l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) prend l'initiative de définir et de mettre en place un nouveau concept qui permettrait d'assurer l'accès de la recherche et de l'industrie à des ressources de qualité dans des conditions et des facilités garanties. C'est ainsi que sont définis les Centres de Ressources Biologiques (CRB) ou biobanques. Un extrait du rapport de l'OCDE de 2001 [1] précise que « Ces structures transversales sont un élément essentiel de l'infrastructure sur laquelle s'appuient les biotechnologies et les sciences de la vie. Ils se composent de prestataires de services et de centres de conservation ». Les CRB peuvent détenir des collections d'organismes cultivables (micro-organismes, cellules végétales, animales et humaines), de parties répliquables de ces organismes (génomomes, plasmides, virus, ADNc,...), de cellules et de tissus. Ces échantillons biologiques collectionnés s'accompagnent d'informations moléculaires, physiologiques et structurelles contenues dans des bases de données. L'échantillon et ses données associées constituent ce que l'on appelle une ressource biologique.

Du fait de ses responsabilités, un CRB doit pouvoir satisfaire aux critères élevés de qualité et d'expertise exigés par la communauté internationale des chercheurs et des industriels concernant la diffusion d'information et de matériel biologique, et pouvoir tenir à jour un catalogue de ce qui est mis à disposition. Comme les lignes directives de l'OCDE l'ont décrit, le rôle primordial des CRB est donc « d'assurer l'accès aux ressources biologiques dont dépendent la recherche et développement en sciences de la vie et les progrès des biotechnologies ». Cette mission principale englobe plusieurs activités telles que la réception, la préparation, la conservation et la mise à disposition de ces diverses ressources biologiques.

A l'heure actuelle, la mise en collection et le stockage d'échantillons biologiques jouent un rôle central en recherche fondamentale, clinique et translationnelle. La recherche

translationnelle est une composante majeure de la recherche biomédicale. C'est l'expression d'un besoin essentiel d'accélérer la valorisation d'une découverte scientifique en application concrète et rapide au bénéfice des malades. La recherche translationnelle est la passerelle entre recherche fondamentale et recherche appliquée.

C'est pour cette raison que plusieurs centaines de biobanques existent à travers le monde, principalement aux Etats-Unis et en Europe, différentes dans leur mode de fonctionnement, leurs buts, la nature et la taille de leurs collections. Depuis 2009, le nombre de CRB en France a plus que doublé, passant de 18 biobanques thématiques à 45 biobanques recensées en ce début 2015. Ces structures représentent 215 collections et atteindront bientôt les 1 000 000 d'échantillons de toutes natures confondues [2].

Pour reconnaître et valoriser les CRB, la France dispose d'une norme spécifique pour la certification de CRB d'origine humaine, microbienne, animale et végétale. La norme NF S96-900 voit le jour en juillet 2008, fruit de l'initiative en 2006 du ministre délégué à la recherche et aux nouvelles technologies et des professionnels du secteur. Cette certification favorise l'harmonisation des pratiques professionnelles des CRB et facilite ainsi les échanges inter CRB (Figure 1).



**Figure 1 : Logo de la norme NF S96-900 pour les CRB.**

Source : "Démarche Qualité." Plateforme de Ressources Biologiques H Mondor.  
<http://prbmondor.aphp.fr/notre-demarche-qualite/>

Son application est compatible avec les pratiques exemplaires recommandées par l'OCDE : la rigueur scientifique, la sécurité, l'exigence éthique et la régulation économique.

Les CRB peuvent également bénéficier d'une reconnaissance à l'international avec l'application des exigences de l'ISO 9001.

La famille ISO 9000 couvre les divers aspects du management de la qualité et comprend certaines des normes les plus connues de l'ISO. Elles offrent des lignes directrices et des outils aux entreprises et aux organismes qui veulent que leurs produits et services soient constamment en phase avec ce que leurs clients demandent et que la qualité ne cesse de

s'améliorer. Plus précisément, la norme ISO 9001 spécifie les exigences relatives au système de management de la qualité (SMQ). C'est la seule norme de cette famille capable de mener à la certification. Cette norme repose sur un certain nombre de principes de management de la qualité, notamment une forte orientation client, la motivation et l'engagement de la direction, l'approche processus et l'amélioration continue. L'ISO 9001 aide à s'assurer que les clients obtiennent des produits et services uniformes et de bonne qualité, avec, en retour, une favorisation des retombées commerciales. La publication d'une nouvelle version de l'ISO 9001 devrait intervenir d'ici la fin 2015. Celle-ci adoptera une structure-cadre destinée à faciliter l'utilisation conjointe de cette norme avec d'autres normes de systèmes de management, et accordera une plus grande importance au risque [3].

La plupart des biobanques européennes fonctionne donc avec un SMQ permettant d'orienter et de contrôler la qualité à tous les niveaux [4]. L'utilisation des échantillons biologiques en recherche est la finalité même de ce système qualité et représente la valorisation de tout ce travail. Cela implique donc que les échantillons biologiques mis à disposition doivent être de haute qualité afin de garantir la robustesse et la reproductibilité des résultats. C'est pourquoi il est indispensable en premier lieu de mettre en place et de respecter le cadre imposé par les normes. Ce contexte normatif insiste sur l'importance de la traçabilité des ressources biologiques. Les données associées aux échantillons doivent être traitées anonymement de façon organisée et sécurisée par une base de données dédiée tout en étant disponibles pour les investigateurs [5]. D'autre part, la rédaction d'une documentation support pour l'ensemble des processus de la structure est primordiale. Les procédures techniques doivent être claires et permettre d'appliquer une méthode standard efficace afin de limiter les risques de non-conformité. La conservation des échantillons à basse température est une étape importante de la phase pré-analytique. Le système de stockage doit être fiable, sécurisé et un suivi permanent des températures ainsi que des solutions de secours doivent être mis en place. En plus de toutes ces précautions, la qualité de l'échantillon proprement dite doit être testée en amont de la mise à disposition grâce à des contrôles complets et rigoureux. Par exemple, après une extraction d'ADN, il faut mesurer au minimum sa concentration et sa pureté afin de s'assurer que celui-ci est conforme aux exigences standards de la structure ou aux exigences particulières de l'investigateur.

## b) Activité de collections biologiques et cadres réglementaires

Une collection biologique est définie par le Code de la Santé Publique (CSP) comme une « Réunion, à des fins scientifiques, de prélèvements biologiques effectués sur un groupe de personnes identifiées et sélectionnées en fonction des caractéristiques cliniques ou biologiques d'un ou plusieurs membres du groupe, ainsi que des dérivés de ces prélèvements» [6].

Une collection d'échantillons biologiques doit être cohérente et ne peut donc être constituée par la réunion d'échantillons divers et variés. Dans ce cas-là, il s'agira d'une série d'échantillons biologiques. Une collection s'inscrit toujours dans le cadre d'une finalité scientifique (recherche) et non médicale (soins). Néanmoins les collections d'échantillons biologiques humains constituent un support de nombreuses recherches pouvant mener *in fine* à des progrès diagnostiques et thérapeutiques.

Quantitativement parlant, 98% des collections détenus par les CRB sont constitués d'échantillons biologiques humains issus de la recherche clinique, incluant des ressources primaires de type fluides et tissus d'une part, mais également des dérivés issus de ces prélèvements primaires, à savoir des sérums, plasmas, acides nucléiques, cellules ou encore des protéines [2].

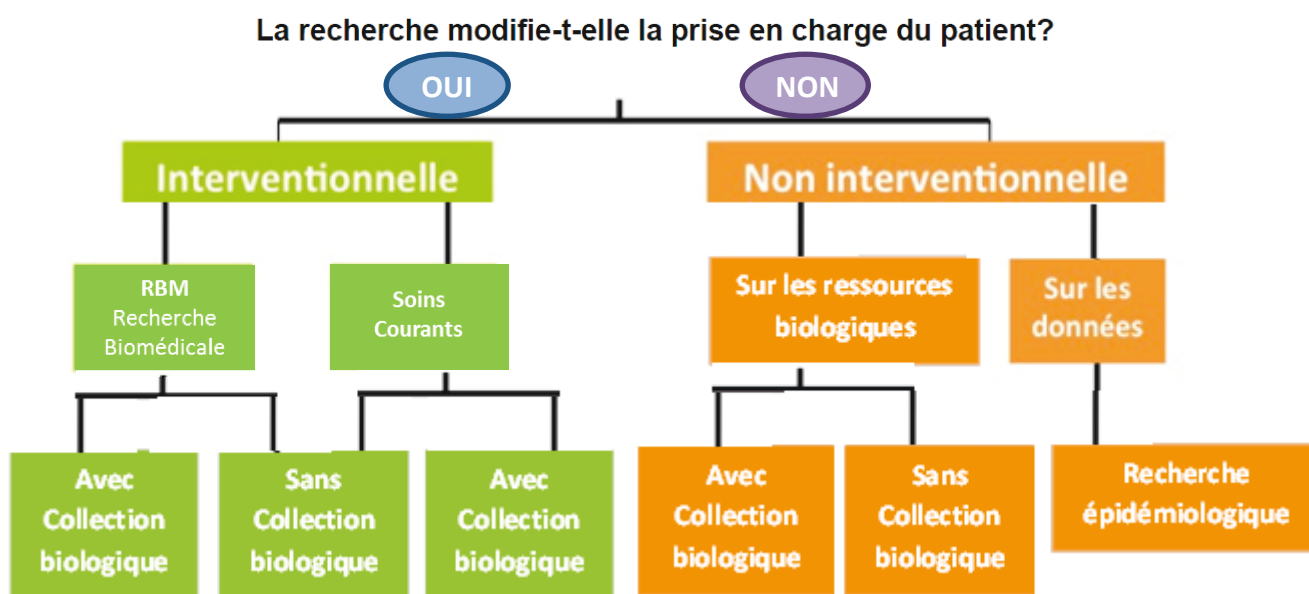
La recherche clinique est divisée en plusieurs types de recherche. Dans une **recherche clinique interventionnelle (RI)**, l'intervention est définie comme tout acte de diagnostic ou de surveillance réalisé sur la personne, non justifié par la prise en charge médicale de la personne. C'est le cas des **recherches biomédicales (RBM)** qui sont organisées et pratiquées sur l'être humain en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales (par exemple essais thérapeutiques, études physiopathologiques, dispositifs médicaux). Les RBM portent notamment sur les médicaments, les dispositifs médicaux ou les non produits de santé (art. L.5311-1 du CSP). Schématiquement, rentrent dans le cadre des RI, toutes les recherches qui impliquent une action sur la personne, malade ou non, et qui en modifie la prise en charge (administration de médicaments, implantation d'un dispositif, investigation physiologique,...), sauf si cette intervention ressort de la pratique courante.

Les **recherches soins courants**, quant à elles, consistent essentiellement à comparer des actes, des combinaisons d'actes ou des stratégies de prise en charge du patient, déjà validés et d'utilisation courante. Il s'agit de recherches comportant une intervention visant à évaluer les

soins courants, à l'exception de celles portant sur les médicaments et uniquement lorsque tous les actes sont pratiqués et les produits utilisés de manière habituelle.

D'autre part, les recherches dans lesquelles un scientifique ne fait qu'observer une population, un phénomène, sans intervenir en quoi que ce soit sur le cours naturel des choses sont soumises à la réglementation des **recherches non interventionnelles (RNI)**. Elles correspondent à des recherches dans lesquelles tous les actes et les produits sont pratiqués et utilisés de manière habituelle, sans aucune procédure supplémentaire ou inhabituelle de diagnostic ou de surveillance du patient (articles L.1121-1 alinéa 1 et R1121-2 du CSP) (Figure 2).

Ces RNI peuvent s'intéresser d'une part soit aux données seules (recherche épidémiologique) soit aux ressources biologiques (prélèvements et données associées) pouvant conduire ou non à une mise en collection. Les collections peuvent être, en plus de leur thématique, associées ou non à des données personnelles (cliniques, psychosociales, biologiques) [6] [7].



**Figure 2 : Classification de la recherche clinique**

Selon la typologie de la recherche, les formalités administratives de déclaration et d'autorisation sont légèrement différentes. Les recherches de type RBM sont soumises à autorisation auprès de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) (Annexe 1) ainsi qu'à l'avis d'un Comité de Protection des Personnes (CPP). Le rôle du CPP est de s'assurer que tout projet de recherche sur l'être humain mené en France respecte diverses mesures (médicales, éthiques et juridiques) visant à assurer la protection des



personnes qui participeront à cette recherche. Si, à l'issue de la recherche les prélèvements sont voués à être conservés, ils seront considérés comme une collection biologique. Dans ce cas particulier, si une telle option est prévue initialement, un formulaire supplémentaire doit accompagner la demande d'autorisation auprès de l'ANSM. Néanmoins, la collection devra également être déclarée au Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (MESR) comme le sont toutes les collections biologiques (Tableau I).

Dans tous les autres cadres de recherches, les activités de collections biologiques doivent faire d'emblée l'objet d'une déclaration auprès du MESR et d'un avis auprès du CPP. De plus, si des cessions à un tiers non impliqué dans le protocole de recherche initial sont prévues, celles-ci sont soumises à une autorisation délivrée par le MESR [8] (Tableau I).

Ces démarches entrent dans les cadres réglementaire, éthique et juridique régissant l'activité de collection des CRB. La législation en vigueur dans notre pays exige que l'utilisation de matériels biologiques et des données qui leur sont associées doivent respecter le cadre imposé par la loi Huriet-Sérusclat, la loi de bioéthique et la loi informatique et liberté. La **loi Huriet-Sérusclat** identifiée sous la loi n° **88-1138 du 20 décembre 1988** réglemente pour la première fois l'organisation de la recherche en France et la protection des personnes se prêtant à des recherches biomédicales. Elle vise également à réglementer certains aspects relatifs à la bioéthique. Cette dernière concerne les limites de l'intervention de la médecine sur le corps humain en garantissant le respect de la dignité de la personne et a pour objectif d'éviter toute forme d'exploitation dérivée de la médecine. Cette **loi de bioéthique n° 94-654** a donc été promulguée initialement **le 29 juillet 1994** puis révisée en 2004 et 2011. Depuis 2004, la législation française impose, avant toute utilisation biologique, d'informer le patient sur l'intérêt scientifique de la recherche, le but et les modalités de prélèvement, le lieu de conservation et le responsable de la collection ainsi que sur une éventuelle utilisation ultérieure. Mais surtout, la loi ordonne d'offrir au patient la possibilité à tout moment de s'opposer à l'usage ou la conservation de ses échantillons biologiques et de ses données médicales à des fins de recherche. Ceci est réalisé grâce à l'obtention d'une non-opposition ou d'un consentement écrit du patient selon les cas. Il est notamment exigé un consentement exprès écrit et éclairé lorsque la recherche porte sur les caractéristiques génétiques du patient (Tableau I).

Puisque la mise en collection d'échantillons biologiques s'accompagne d'informations relatives au patient, qui constituent les données associées et qui vont être conservées dans des bases de données dédiées ; il est indéniable de respecter le cadre de la **loi Informatique et**

**Liberté.** Cette loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 traitant de l'informatique des fichiers et des libertés définit les principes à respecter lors de la collecte, du traitement et de la conservation des données personnelles. Cette loi est régie de manière générale par la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) ainsi que par le Comité Consultatif en matière de Traitement de l'Information dans la Recherche en Santé (CCTIRS). Ils se chargent de veiller à ce que l'informatique soit au service du citoyen et qu'elle ne porte atteinte ni à l'identité humaine, ni aux droits de l'homme, ni à la vie privée, ni aux libertés individuelles ou publiques. C'est pourquoi les données à caractère personnel sont systématiquement traitées de façon anonymisée [8].

**Tableau I: Démarches réglementaires dans le cadre de l'utilisation à visée scientifique d'échantillons biologiques humains.**

\*Affsaps est l'ancien nom de l'ANSM.

Source: [8]

	<b>Recherche biomédicale (RBM)</b>	<b>Recherche en soins courants</b>	<b>Recherche non interventionnelle</b>	
Type de recherche	Recherche interventionnelle sur Médicament / Dispositif médical ou sans produits de santé	Recherche interventionnelle Actes et produits habituels (hors médicaments)	Recherche utilisant une collection préexistante avec changement de finalité	Recherche ne comportant qu'une prise de sang afin de constituer une collection
Autorité compétente	Afssaps* Demande autorisation pour la recherche Déclaration d'activité pour la collection	MESR	MESR	MESR
Rôle du CPP	Avis pour la recherche	Avis pour la recherche Avis spécifique pour collection	Avis pour la déclaration de la collection	Avis pour la déclaration de la collection
Consentement	Consentement écrit + consentement exprès si examen des caractéristiques génétiques	Information et non-opposition + consentement exprès si examen des caractéristiques génétiques	Information et non-opposition + consentement exprès si examen des caractéristiques génétiques	Consentement écrit + consentement exprès si examen des caractéristiques génétiques
CNIL/CCTIRS	Déclaration simplifiée MR001 Demande d'autorisation si examen des caractéristiques génétiques	Demande d'autorisation		

De manière générale, il est possible de ré-utiliser des éléments biologiques à des fins différentes de celles qui ont justifié le prélèvement (programmes de recherche différents ou changement de lieu de conservation de la collection par exemple). C'est ce qu'on appelle un changement de finalité de la collection. Cette nouvelle utilisation n'est donc plus conforme à la déclaration faite au ministère de la recherche au début du projet ni en accord avec le consentement initialement donné. C'est pourquoi dans ce cas il est nécessaire d'en informer le patient et de recueillir à nouveau sa non-opposition ou son consentement selon les analyses envisagées (Tableau I).

### **c) Le CRB HUEP-UPMC : bilan d'activité (BA) de mise en collection**

Créé en 2010, le CRB HUEP-UPMC est une structure transversale mise à la disposition de l'ensemble des cliniciens et chercheurs du groupe hospitalo-universitaire de l'est parisien (GHUEP) participant à des recherches avec constitution de collections d'échantillons biologiques. Il assure la réception, la préparation, le stockage et la mise à disposition de collections biologiques issues de protocoles cliniques.

Le CRB HUEP-UPMC a d'abord obtenu le label Ibis en 2011 avant d'être certifié NF S96-900 depuis septembre 2011 et ISO 9001 : 2008 depuis décembre 2014.

Au sein du GH, le CRB HUEP-UPMC travaille en collaboration avec les services de Pneumologie (cancérologie, sommeil), Hépatogastroentérologie, Gynécologie Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Psychiatrie, Radiothérapie, Cardiologie, Lactariums, Rhumatologie, Endocrinologie, Neurologie et Médecine interne. Le CRB HUEP-UPMC est aussi une plateforme scientifique de l'UPMC, intégrée dans l'unité mixte de service (UMS029) autour de la thématique « Omique ». De plus, il fait également parti de différents réseaux de plateformes dont le but est de créer une nouvelle dynamique au niveau des plateformes d'analyse moléculaire, d'améliorer la visibilité de l'offre de service et de pouvoir répondre plus facilement à des appels d'offres nationaux et internationaux.

Le CRB HUEP-UPMC est aussi représenté au sein de réseaux de CRB comme le club 3CR et l'Infrastructure BIOBANQUES. Depuis sa création en 2006, la philosophie du Club 3CR est basée sur l'écoute des besoins des CRB pour développer des actions pertinentes et pragmatiques. Parmi ces actions, le Cahier 3CR, bimestriel, permet de connaître toute l'actualité des CRB (législation, actualité CRB, éthique, gestion des échantillons, gestion des données associées, qualité). Il s'inscrit dans la réalisation d'une veille réglementaire imposée aux CRB par les normes [9].

L'Infrastructure BIOBANQUES est une structure nationale dédiée à la recherche médicale utilisant les échantillons biologiques et les ressources biomoléculaires. Elle mobilise les acteurs français des biobanques, des tumorothèques et des centres de ressources microbiologiques. Ce réseau implique l'ensemble des acteurs de la recherche : chercheurs des laboratoires académiques et privés utilisant les collections d'échantillons biologiques, centres hospitaliers universitaires, universités, instituts de recherche, institutions responsables de l'organisation et du développement stratégique de la recherche, pôles de compétitivité. La gouvernance de ce réseau est certifiée selon la norme ISO 9001 et a pour objectif stratégique

principal de participer au renforcement des plateformes pluridisciplinaires d'excellence, qui permettent de mutualiser les moyens et les compétences, d'accroître les investissements dans les secteurs prioritaires pour la santé publique et pour le développement économique. D'autre part, elle souhaite favoriser le partenariat public-privé pour renforcer les développements technologiques innovants et la recherche translationnelle [10].

Le CRB HUEP-UPMC réalise également des prestations de service (réception, préparation, expédition) pour des industriels dans le domaine biomédical.

Depuis sa création, le CRB HUEP-UPMC a réceptionné 14367 prélèvements de nature variée (sang, salive, urine, tissu adipeux, lait maternel, placenta) provenant de 11843 patients ; ce qui représente plus de 290 000 échantillons.

Actuellement, 270238 échantillons sont conservés au CRB HUEP-UPMC à basse température. Ces échantillons se répartissent en DNathèque, RNathèque, Séro/Plasmathèque et tissuthèque. De plus, en 4 ans, 6473 échantillons ont été cédés par le CRB-HUEP-UPMC.

Depuis Juillet 2013, 24 collections au total ont été gérées par le CRB HUEP-UPMC dont 18 sont toujours en cours. Les différentes données relatives au BA entre Juillet 2013 et Juillet 2014 sont regroupées dans le Tableau II.

D'autre part, comme exigé par les lignes directives de l'OCDE, le CRB HUEP-UPMC possède un catalogue dans lequel figure deux collections mise à la disposition des utilisateurs. Ce catalogue est visible sur le site <https://www.i3crb.fr/>.

**Tableau II : Bilan d'activité du CRB HUEP-UPMC sur l'année 2013-2014.**

Les données présentées concernent tous les protocoles confondus. Elles sont généralement comparées à l'année précédente afin d'établir un constat concernant l'activité du CRB.

BA de 07/2013 à 07/2014	Nombre
Patients inclus	3785
Prélèvements réceptionnés	4072
Echantillons préparés	8132
Echantillons créés (totaux)	8938
Echantillons stockés	155109
Echantillons cédés	2615

## II/ L'étude FAST-MI

L'infarctus du myocarde (IDM) et plus généralement les syndromes coronaires aigus (SCA) restent encore des pathologies fréquentes et graves. Pourtant, au cours des deux dernières décennies, des progrès considérables ont été accomplis dans la prise en charge des SCA, à la fois lors de la phase aiguë et dans le suivi au-delà de la phase hospitalière [11] [12].

Le SCA est une insuffisance coronarienne engendrée par une ou plusieurs artères coronaires obstruées créant une ischémie myocardique aiguë. Il inclut plusieurs formes cliniques dont l'IDM sans élévation du segment ST et l'IDM avec élévation du segment ST. En présence d'une symptomatologie évocatrice de SCA, en l'occurrence une douleur thoracique, la réalisation de l'électrocardiogramme permet d'identifier les patients devant, à l'évidence, bénéficier en urgence d'une revascularisation coronaire, par angioplastie ou fibrinolyse, c'est-à-dire les patients avec un sus-décalage du segment ST. Les autres patients sont inclus dans le groupe des SCA sans sus-décalage du segment ST.

Cependant, l'évolution des pratiques réelles et leur impact sur le pronostic à moyen et long terme des patients admis en unité de soins intensifs coronaires (USIC) pour un SCA demeurent relativement peu étudiés de façon exhaustive.

Le protocole baptisé FAST-MI pour Observatoire Français des Syndromes Coronaires Aigus avec ou sans sus-décalage du segment ST est une étude prospective (porte sur une population définie suivie dans le temps), multicentrique et observationnelle (dans la mesure où la prise en charge des patients n'est pas modifiée).

Elle entre dans le cadre d'une RNI avec constitution d'une collection biologique. Ce projet est soutenu et financé par la Société Française de Cardiologie (SFC).

L'objectif principal est donc d'apprécier les pratiques concernant la prise en charge de l'IDM dans la réalité et de mesurer leur impact sur le pronostic à court, moyen et long terme des patients admis en USIC et ce sur une cohorte de 3500 patients prévus initialement. Des objectifs secondaires ont également été établis. Ils explicitent la raison même de la mise en collection associée à ce protocole. Ces objectifs secondaires s'intéressent particulièrement à l'impact des polymorphismes génétiques sur la morbi-mortalité des patients (taux de mortalité pour une maladie donnée). L'étude associée des caractéristiques cliniques, biologiques et génétiques des patients et de leurs conditions de prise en charge permettront à la fois d'identifier les patients à risque de morbi-mortalité accrue et servir de base à la réalisation ultérieure d'études spécifiques sur la prise en charge thérapeutique optimale en fonction des

différents profils de risque. Ce registre a également pour ambition, à travers une photographie « grandeur nature » des pratiques en France actuellement, de s'assurer de la constance de la qualité de la prise en charge des malades hospitalisés pour un infarctus. L'enquête permettra d'insister sur les points forts et les points faibles de notre système de santé qu'il conviendra alors d'améliorer. Enfin, l'observation d'une large population du monde réel donnera la possibilité d'évaluer les interactions entre les différents types de traitements utilisés et de vérifier leur synergie ou leurs incompatibilités éventuelles.

Pour la mise en collection, des quantités additionnelles de sang sont prélevées lors du prélèvement sanguin réalisé à l'admission du patient afin de constituer une DNAtèque, une sérothèque/plasmathèque, une RNAtèque et une cellulothèque.

Le CRB HUEP-UPMC est chargé de réceptionner et de transformer les échantillons sanguins pour la DNAtèque, la RNAtèque et la cellulothèque (extraction d'AN et purification de cellules mononucléées du sang (PBMC)). Les échantillons de sérum et plasma sont acheminés au CRB HUEP-UPMC pour préparation (aliquotage) et conservation à basse température.

Actuellement, le CRB HUEP-UPMC détient deux collections relatives au protocole FAST-MI selon l'année d'inclusion des patients (2005 ou 2010). La collection originelle de 2005 dans son intégralité a été réalisée à partir de l'inclusion initiale de 3670 patients. Au final, 17 patients inclus définitivement ont uniquement des échantillons de sérum et plasma, 1427 patients sont inclus uniquement dans la DNAtèque et 1044 patients sont présents à la fois dans la sérothèque/plasmathèque et dans la DNAtèque. Ce qui conduit à 2471 patients possédant de l'ADN et 1061 patients avec des échantillons de sérum et plasma.

La cohorte 2010 vient compléter celle de 2005 par ses nouveaux patients inclus selon les mêmes critères ; ce qui a pour but de renforcer la puissance des potentiels résultats. La collection 2010 regroupe quant à elle 1926 inclus définitivement. En plus de la sérothèque/plasmathèque (1366 patients) et de la DNAtèque (1946 patients), la collection se compose d'une RNAtèque (1833 patients) et d'une cellulothèque (1300 patients). A l'heure actuelle, les échantillons de PBMC préparés au CRB HUEP-UPMC n'y sont plus stockés puisqu'ils ont été cédés au service de cardiologie associé au projet.

## III/ Le génotypage

### a) Historique

Tout commence en 1913 lorsque l'américain T. Morgan découvre que les chromosomes portent les gènes. Trente ans plus tard, en 1944, le New-Yorkais O. Avery démontre que l'ADN, molécule universelle dans le monde vivant, est le support de l'information génétique. Puis, le 25 avril 1953, un article des britanniques J. Watson et F. Crick, paru dans la revue Nature, décrit pour la première fois la structure tridimensionnelle en double hélice de l'ADN [13]. Celle-ci, véritable « mémoire » du vivant, renferme sous une forme chimique l'ensemble des instructions élémentaires ou gènes nécessaires aux activités et au maintien de l'intégrité d'une cellule ou d'un organisme. La connaissance de ces instructions et surtout de leur combinatoire d'usage est indispensable à la compréhension des phénomènes biologiques au niveau cellulaire et moléculaire. Ce n'est pourtant qu'en 1964 que des travaux ont démontré comment l'enchaînement des quatre constituants de base de l'ADN peut déterminer la synthèse et surtout la structure d'une protéine. S'en suit la découverte de tout un ensemble de protéines impliquées dans toutes les opérations moléculaires gravitant autour de l'ADN. Ces révélations mènent naturellement à l'idée d'appréhender complètement toute information contenue dans l'ADN. Ceci est d'abord réalisé par une méthode de déchiffrement chimique de l'enchaînement linéaire des quatre molécules de base qui constituent la double hélice (adénine (A), thymine (T), cytosine (C) et guanine (G)). Ces premières techniques dites de séquençage datent de la fin des années 1970. Et ce n'est que vers la fin des années 80 que ces pratiques commencent à être automatisées. Avec ces techniques, la biologie voit émerger une science nouvelle qui consiste à étudier l'ensemble des informations génétiques d'un être vivant : la génomique. Mais en vérité, les chercheurs ne perçoivent pas encore les mutations profondes qui commencent à ébranler la recherche en biologie.

Le développement même des techniques de biologie a permis la mise en évidence d'une très importante variabilité de l'ADN appelée polymorphisme génétique. Le polymorphisme génétique a été défini comme l'existence, dans un même génome, d'un gène sous deux ou plusieurs formes alléliques. Le polymorphisme peut être généré par des mutations ponctuelles, des délétions et duplications, l'insertion de séquences mobiles, l'excision de boucles chromatiniennes ou des recombinaisons. Cette « nouvelle dimension » démontre ce que nous savons intuitivement, que nous sommes tous inégaux face à la maladie. Aujourd'hui, nous

savons de manière certaine que dans toutes les pathologies, humaines notamment, une composante génétique explique, en partie, notre inégalité face à ces pathologies et leur traitement. C'est le cas par exemple du polymorphisme du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE). Une étude a mis en évidence que le génotype homozygote pour une délétion est associé d'une part à un niveau plus important d'ACE circulante que les autres génotypes mais aussi qu'il est significativement plus fréquemment retrouvé chez les patients atteints d'IDM que chez les sujets contrôles. Ce polymorphisme semble donc pouvoir être interprété comme un facteur de risque des maladies coronariennes [14]. D'autre part, une analyse à partir de plusieurs études menées sur des patients souffrants de SCA et deux populations contrôles d'ethnies différentes (européens et asiatiques) suggère une association entre la variabilité génétique du gène codant pour le récepteur de l'interleukine 6 et le risque de survenue d'un SCA. En effet, la présence de l'allèle « C » contribuerait fortement à réduire le risque d'apparition de la maladie et notamment chez les européens [15].

C'est pourquoi l'évolution des procédés de biologie moléculaire offre une nouvelle dimension de l'homme qui substitue à la médecine symptomatique une médecine individualisée ou l'étude du génome de l'individu permettra à la fois une prise en charge beaucoup plus spécifique du malade et un accroissement de l'efficacité du traitement chez des patients atteints du même type de lésions. Les chercheurs ont alors tenté d'établir des corrélations entre la présence dans le génome de différents individus de certains allotypes, c'est-à-dire de certains allèles de gènes, à des endroits déterminés par rapport à la fréquence d'une pathologie donnée. C'est la naissance des techniques de génotypage [16].

## **b) Le polymorphisme génétique**

Dans deux génomes humains tirés au hasard, 99,9% de la séquence d'ADN est identique. Les 0,1% restants contiennent des variations de séquence qui se résument à trois types de différences entre individus : des insertions-délétions de segments plus ou moins longs, allant d'une base à plusieurs mégabases appelées « Insertion-Deletion Polymorphisms » (Indels), des variations dans le nombre de séquences répétées en tandem appelées microsatellites (Figure 3a), et des substitutions nucléotidiques à un locus donné, que l'on appelle « Single Nucleotide Polymorphisms » (SNP). Par conséquent, les techniques moléculaires utilisées pour le génotypage seront adaptées au type de variation ainsi qu'à l'échelle et au débit souhaité [17].



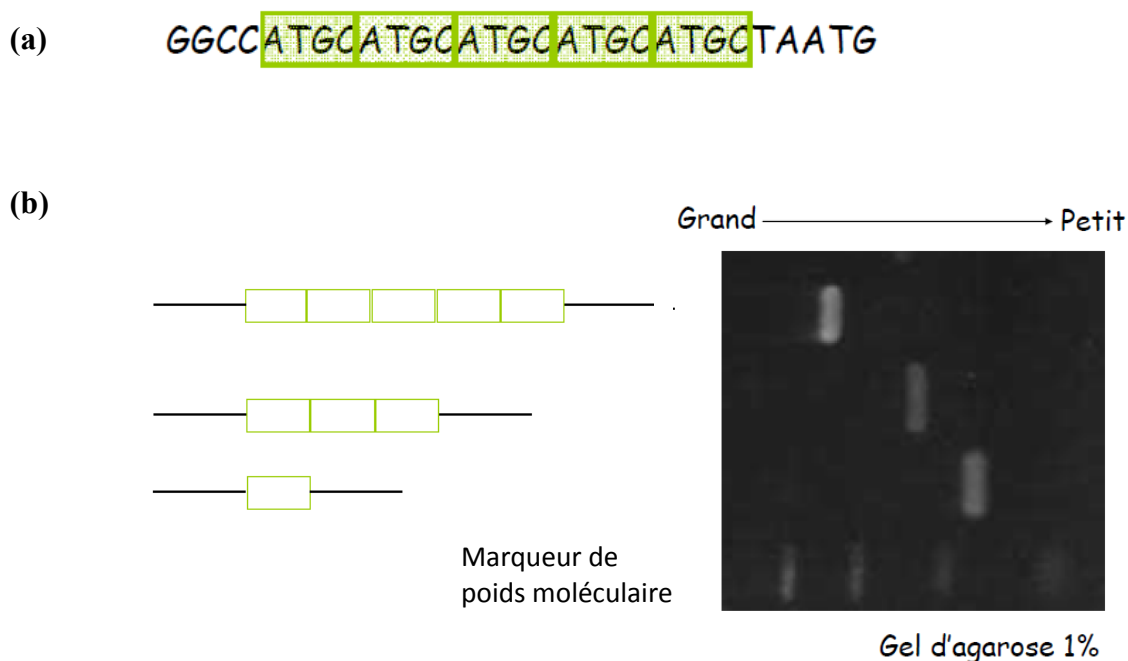
Les **Indels**, moins communes que les SNP, représentent au total 3 millions des 15 millions de variants génétiques connus [18]. La présence ou l'absence d'une séquence nucléotidique dans la région codante d'un gène peut altérer la structure et/ou la fonction de la protéine. Pour des segments non multiples de trois nucléotides, cela peut engendrer des mutations de type décalage du cadre de lecture lors de la traduction ou bien un arrêt prématuré de la traduction par l'apparition d'un codon stop. Si l'Indel implique une séquence multiple de trois nucléotides, la chaîne protéique obtenue peut présenter soit un surplus d'acides aminés dans le cas d'une insertion, soit une perte d'acides aminés dans le cas d'une délétion ; mais le reste de l'enchaînement de la chaîne n'est pas touché. Citons pour exemple la mucoviscidose : cette maladie génétique la plus fréquente en Europe est causée par le gène CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) dont un des allèles affiche une délétion de trois paires de bases. Cette variation mène à la perte d'un acide aminé au niveau de la protéine, qui sous cette forme entraîne la maladie [19]. A l'inverse, le syndrome du X fragile, pathologie génétique entraînant, le plus souvent, un déficit intellectuel, des troubles du comportement et des anomalies physiques est causée par l'insertion dans l'ADN de la répétition du tri-nucléotide CGG situé en amont du gène FMR1 (Fragile X mental retardation 1) sur le chromosome X [20]. De plus, l'intégration d'éléments génétiques transposables dans le génome peut également être à l'origine de maladie génétique. C'est le cas notamment des transposons L1, SVA et Alu qui viennent perturber la fonction primaire du gène par insertion et causer des maladies telles que l'hémophilie ou la dystrophie musculaire [21].

Lors du génotypage d'un Indel, un allèle correspondra donc à une séquence de longueur variable, pouvant être caractérisé par sa taille.

Les **microsatellites** sont utilisés depuis des décennies comme marqueurs en génétique moléculaire chez l'humain et l'animal. En effet, ce type de polymorphisme a déjà démontré son association avec certaines pathologies comme par exemple le cancer de la prostate. Dans ce cas précis, le microsatellite est représenté par une répétition du codon CAG au sein du gène codant pour le récepteur aux androgènes (AR). Cette courte séquence répétée entraîne la synthèse d'une chaîne polypeptidique supplémentaire au niveau de la partie N terminale du gène AR, constituée uniquement de l'acide aminé glutamine. Des recherches ont d'ailleurs suggéré que des hommes avec un nombre de répétitions CAG inférieur à 22 ont un risque plus important de développer un cancer de la prostate que ceux présentant des variants plus longs [22]. De plus, parmi les populations étudiées, ce sont les américains de type africain qui

apparaissent avoir une fréquence de courtes répétitions la plus élevée et donc le plus de risque.

L'intérêt des microsatellites réside notamment dans leur aspect multi-allélique co-dominant et dans la simplicité de la méthode utilisée pour observer ces variations. En effet, tout comme les Indels, une simple réaction de polymérisation en chaîne (PCR) suivie d'une migration sur gel de polyacrylamide permet de déterminer la taille des allèles (Figure 3). Il s'agit d'ailleurs d'une méthode standard qui se différencie peu d'un laboratoire à l'autre, la seule exception réside dans l'utilisation ou non d'un automate séquenceur pour la détermination de la taille des allèles [17].



**Figure 3 : Représentation simplifiée et observation de microsatellites**

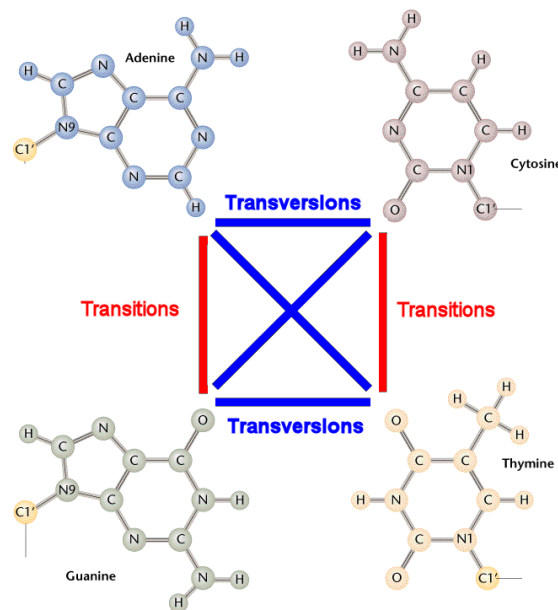
(a) Exemple schématique d'un microsatellite composé de 5 répétitions en tandem de la séquence ATGC. (b) Un simple gel d'agarose permet d'observer et d'identifier les différents microsatellites du fait de leur taille.

Source : <https://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-00002g-001>

Cependant, ces dix dernières années, les **SNP** ont pris la domination en génotypage du fait de nouveaux besoins en marqueurs génétiques pour l'étude des maladies multifactorielles, ainsi que l'évolution des techniques de biologie moléculaire. Il est vrai que les SNP constituent la forme la plus abondante de variations génétiques dans le génome humain. Ils représentent plus de 90% de toutes les différences entre individus. Ils sont stables, très abondants et distribués uniformément dans tout le génome. Ils apparaissent tous les 100 à 1000 nucléotides

en moyenne, ce qui explique la présence de 10 millions de SNP dans le génome humain. Toutefois, pour qu'un SNP soit identifiable, sa fréquence dans la population doit être au minimum égale à 1% [23].

Les substitutions nucléotidiques composant les SNP peuvent être de deux types : on parle de **transition** lorsque le changement s'effectue entre deux bases de même nature, soit deux purines (A ↔ G) ou deux pyrimidines (C ↔ T) ; et on appelle **transversion** le remplacement d'une base par une base de nature différente. Bien qu'il y ait deux fois plus de possibilités de transversions, les transitions sont plus fréquentes (Figure 4).



**Figure 4 :** Relations de transition et de transversion entre les quatre bases constitutives de l'ADN : A, T, G, C.

Source : [http://www.mun.ca/biology/scarr/Transitions\\_vs\\_Transversions.html](http://www.mun.ca/biology/scarr/Transitions_vs_Transversions.html)

Les SNP peuvent être intragéniques ou intergéniques. Lorsqu'ils sont situés dans la région codante d'un gène, ils peuvent être soit de type synonyme, c'est-à-dire que leur présence n'entraîne aucune modification dans la protéine finale du fait de la redondance du code génétique, soit de type non synonyme car créant une modification lors de la traduction. De ce fait, les SNP peuvent être responsables d'effets biologiques, comme être la cause directe d'une maladie telle que la drépanocytose ou la thrombophilie. Dans le cas de la thrombophilie par mutation du facteur V, le syndrome est causé par un SNP situé au niveau de l'exon 10 du gène F5 sur le chromosome 1 [24]. La substitution d'une base azotée G en A (avec une fréquence minimale de 1%) entraîne le remplacement d'un acide aminé arginine par une glutamine. Cette modification d'acide aminé va empêcher l'inactivation du facteur V et conduire à une coagulation excessive.

Les SNP connus sont regroupés dans une base de données dédiée (dbSNP) dans laquelle chaque SNP possède un identifiant unique appelé référence SNP number (rs). Dans le cas d'un SNP, pour géotyper un individu, il s'agit de déterminer quel est le nucléotide présent à une position bien précise du génome.

### **c) Principe et méthodes du géotypage**

Le géotypage est donc un ensemble de techniques moléculaires permettant d'effectuer l'identification et le typage génétique d'un organisme vivant. Il permet de mettre en évidence un éventuel polymorphisme de séquence de l'ADN et d'étudier les relations entre un géotype particulier et une maladie par exemple.

Pour cibler une analyse sur un endroit particulier du génome, il faut utiliser la propriété qu'a l'ADN de créer des liaisons très solides entre brins de séquences complémentaires. Ce principe d'hybridation des brins complémentaires permet par exemple de fixer une sonde d'ADN marquée complémentaire de la séquence du locus à cibler sur le point du génome où un polymorphisme souhaite être révélé. Quelle que soit la technique, une méthode de marquage doit satisfaire deux objectifs : (1) cibler une ou plusieurs positions sur le génome, à laquelle on souhaite détecter le polymorphisme, c'est ce que l'on peut appeler la spécificité de locus, et (2) pouvoir ensuite distinguer les différentes séquences qui caractérisent les allèles à ce locus chez différents individus.

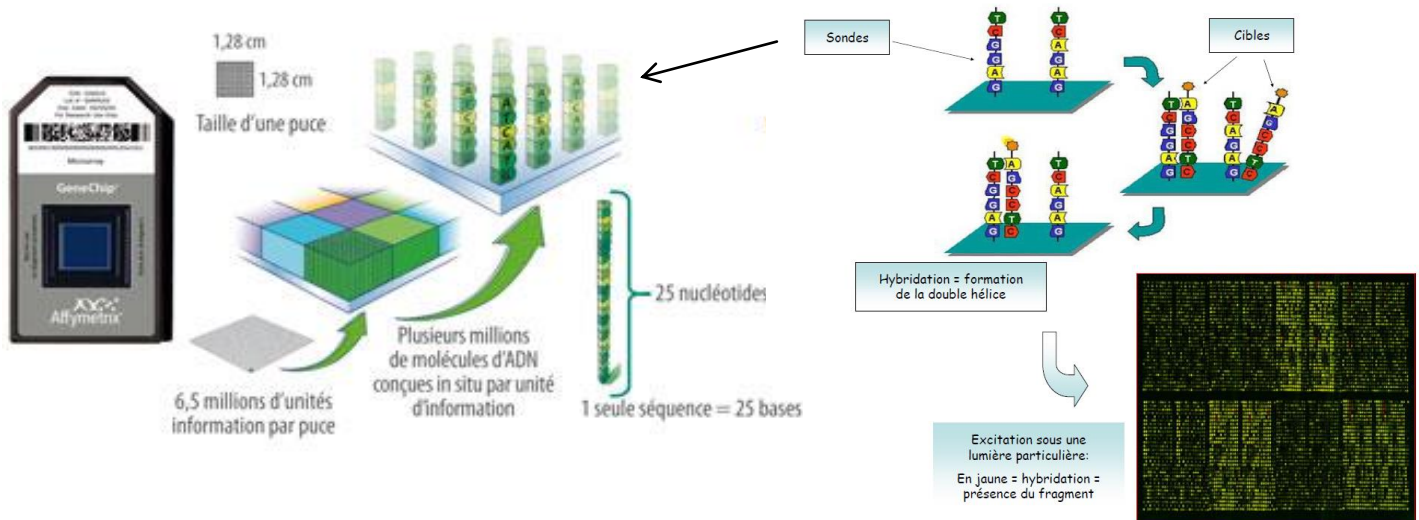
Cette capacité d'hybridation, caractéristique des premières générations de marqueurs moléculaires, est aujourd'hui utilisée dans beaucoup de techniques de biologie moléculaire et particulièrement en géotypage.

Effectivement, les principales techniques utilisées en géotypage, qui sont les puces à ADN, la PCR en temps réel (RT-PCR) et le séquençage, mettent en jeu l'hybridation de l'ADN.

#### **1- Les puces à ADN**

Les puces à ADN consistent en un support solide sur lequel des milliers de fragments d'ADN sont déposés de façon géométrique à l'aide d'une micropipette robotisée. Grâce à cette technique, chacun des fragments d'ADN est représenté par un point sur le support (ou puce). Ces fragments d'ADN servent de sondes pour fixer de façon très spécifique les fragments de gènes complémentaires (cibles), présents dans les échantillons biologiques à tester : leur mise

en contact permet de reconstituer la double hélice d'ADN par hybridation de séquences complémentaires. Un système de marquage avec des molécules excitables sous une certaine longueur d'onde permet de quantifier et d'identifier les fragments de gènes reconnus (Figure 5).



**Figure 5 : Principe des puces à ADN.**

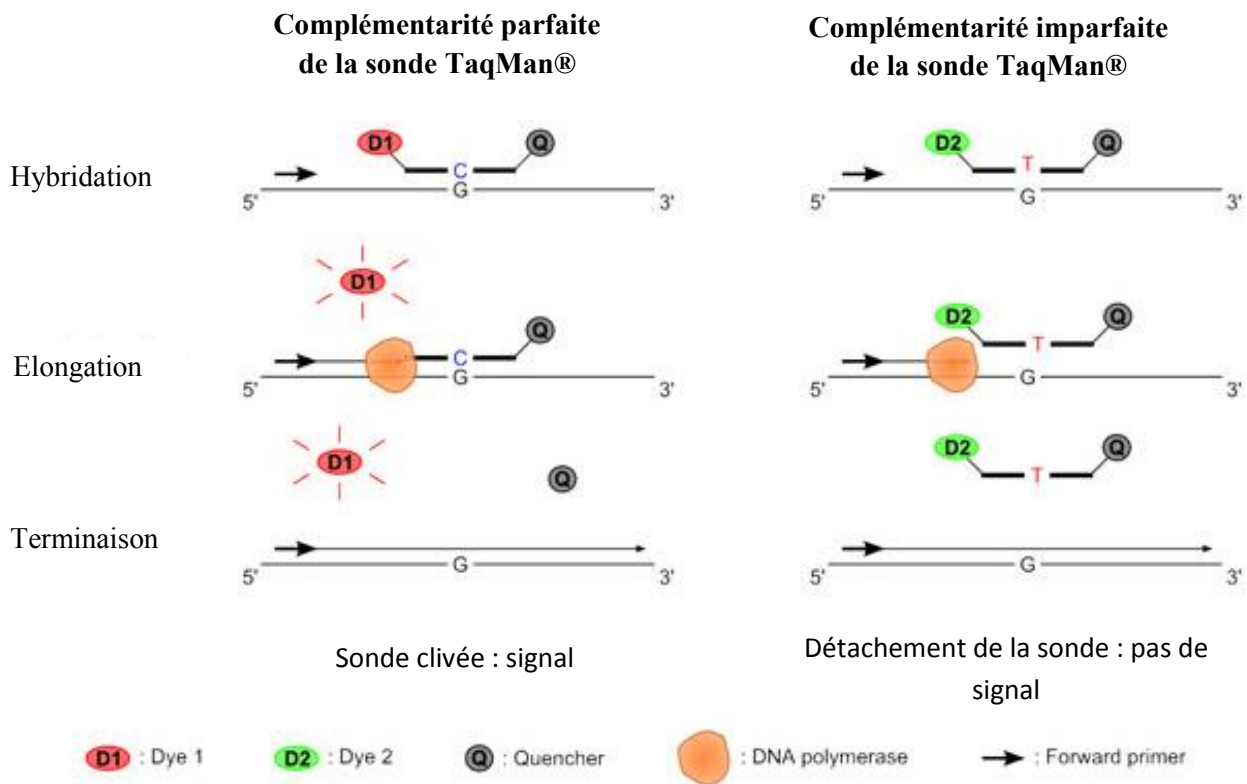
Source : <https://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-00002g-001>

Cette technique permet d'établir une cartographie précise des loci associés à une maladie ou un type de maladie sur de grande cohorte, à des coûts réduits. Des résultats de 2012 ont mis en évidence de nouveaux loci en lien avec plusieurs maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et la cirrhose biliaire primaire [25] [26] [27]. De plus, à l'aide de cette méthode, une étude récente d'association génomique a permis d'identifier un nouveau locus associé à la colite ulcéreuse [28]. En général, dans la littérature les premiers résultats de génotypage obtenus par la technique des puces à ADN sont confirmés par une autre méthode comme par exemple la PCR en temps réel.

## 2- La PCR en temps réel

La technique de PCR a révolutionné le domaine de la biologie moléculaire. En effet, la PCR permet de synthétiser *in vitro* des millions de copies d'un fragment d'ADN situé entre deux séquences connues d'une vingtaine de bases chacune. Deux oligonucléotides appelés amorces, correspondant à ces deux régions, permettent ainsi de localiser le locus d'intérêt parmi le génome tout entier, et de l'amplifier. Cette méthode a d'ailleurs permis de faire évoluer les diagnostics prénataux de la drépanocytose avec des tests plus rapides et beaucoup

plus sensibles [29]. L'aspect « temps réel » est apporté par la génération d'un signal fluorescent qui est capté à chaque fin de cycle de PCR. En génotypage, cette méthode est utilisée pour la détection des SNP. Parmi ces méthodes de discrimination moléculaire par PCR en temps réel (RT-PCR), la première à avoir été introduite est la méthode TaqMan® ou 5'nucléase [30]. C'est également la plus utilisée pour ce type d'application. Il s'agit de réaliser une amplification par PCR d'une séquence d'ADN contenant le SNP à génotyper, en ajoutant une courte sonde spécifique qui se fixe au niveau du SNP. Cette sonde est marquée de chaque côté par un fluorochrome (rapporteur et quencher), de sorte que le rapporteur n'est fluorescent que lorsqu'il est séparé physiquement du quencher. Lors de sa progression le long de la matrice pendant la phase d'élongation de la PCR, la Taq polymérase dégrade l'extrémité 5' de la sonde lorsqu'elle la rencontre. Cela libère le rapporteur, qui devient alors fluorescent. Si l'allèle du SNP ne correspond pas au nucléotide présent sur la sonde, celle-ci n'est pas complètement hybridée, et n'est donc pas dégradée (Figure 6). En pratique, cette technique utilise un mélange de deux sondes, marquées avec des fluorochromes émettant dans des longueurs d'onde différentes, et qui sont chacune complémentaire de l'un des allèles attendus du SNP. C'est le rapport des intensités de fluorescence aux deux longueurs d'onde qui permet d'effectuer la discrimination allélique et donc de déterminer le génotype de l'échantillon.



**Figure 6 : Principes et acteurs de la PCR en temps réel.**

Source : <http://download.applied-maths.com/sites/default/img/snpcalling1.jpg>

L'avantage de cette technologie est qu'il s'agit d'une détection séquence allélique spécifique. Cela permet d'éviter toute ambiguïté de détection des séquences cibles ainsi que les contaminations de signaux pouvant provenir de dimères d'amorces ou de produits de PCR non spécifiques [31].

### 3- Le séquençage haut débit

D'autre part, les cinq dernières années ont été marquées par l'émergence de technologies de séquençage totalement différentes de celle d'origine (la méthode de Sanger) ; qui ouvrent de réelles perspectives en matière de génotypage pour les applications où un génotypage haut-débit est utile. Connues sous le nom générique de « Next-Generation Sequencing » (NGS), ces méthodes changent drastiquement les perspectives du séquençage en terme de réduction du coût par rapport au séquençage « première génération » d'une part mais aussi par rapport aux autres techniques de génotypage. En revanche, du fait de la génération d'un énorme volume de données, la difficulté de l'exploitation bioinformatique de ces données est très fortement augmentée.

Les NGS se divisent en deux groupes : les méthodes mettant en œuvre un clonage par PCR, et celles qui séquent des molécules uniques d'ADN.

Toutes ces méthodes peuvent donc s'appliquer à la détection des trois types de polymorphismes déjà cités. Globalement, le choix de la technique de génotypage la plus adaptée va dépendre à la fois du nombre de sujets, du nombre de gènes et de locus étudiés, du coût et du temps à consacrer.

Il faut savoir que dans le cadre d'étude d'association génétique, pour la plupart des maladies mendéliennes, les variants génétiques bi-alléliques (tels que les SNP et les indels) sont de bons prédictors cliniques ; mais lorsqu'il s'agit de pathologies plus complexes, la prédiction de pronostiques cliniques et thérapeutiques peut s'avérer plus difficile du fait de la complexité des mécanismes génétiques. Le séquençage haut débit a tout de même permis de découvrir d'autres mutations génétiques à l'origine de nouvelles relations génotype-phénotype. Par exemple, le NGS a révélé l'existence de plus de treize mutations supplémentaires augmentant le risque de fractures des patients souffrants d'une ostéogenèse imparfaite [32]. Cependant, le NGS s'avère rentable uniquement dans le cas d'un génotypage à grande échelle (soit par rapport au nombre de sujets, soit en rapport avec le nombre de gènes/allèles étudiés) [33]. Il

ne vient donc pas remplacer les « anciennes » méthodes. Car à plus petite échelle, et lorsque les cibles sont connues d'avance, la technique de RT-PCR en TaqMan® a déjà prouvé son efficacité en termes de temps, de coût et de résultats.

#### **d) Applications générales**

Le génotypage présente de multiples applications et son utilisation continue de s'élargir grâce notamment aux évolutions dans les domaines agroalimentaire, biomédical ou clinique.

En agronomie, la traçabilité des organismes génétiquement modifiés (OGM) est réalisée par génotypage. Elle permet de démontrer scientifiquement et sans ambiguïté la correspondance entre un morceau de viande et l'animal dont il est issu, et donc de valider l'origine du produit. Cette technique permet également de contrôler et de valider la fiabilité des systèmes de traçabilité déclarés dans la filière, de la naissance jusqu'à l'abattage de l'animal, puis pendant toutes les étapes ultérieures jusqu'à la consommation. Cette démarche peut également être utilisée pour protéger les viandes de qualité label des contrefaçons. La traçabilité de l'identité, de l'origine ou de caractéristiques spécifiques répond à une exigence des consommateurs et constitue pour les intervenants de la filière un véritable support de différenciation des produits dans un environnement concurrentiel. De plus, en dehors des OGM, le génotypage est utilisé pour la recherche d'organismes spécifiques dans un aliment, dans le cadre de la validation de sa composition et la recherche d'allergènes [34].

Le génotypage s'applique également au domaine de la médecine légale. Ces analyses génétiques permettent aujourd'hui d'identifier rapidement des traces biologiques sur une scène criminelle ou délictuelle (tache de sang, de sperme, présence de cellules épithéliales) ou même un corps. Le génotypage est aussi utilisé dans les recherches de paternité où il permet d'établir une filiation avec une probabilité de 99,999% [35].

Dans le domaine judiciaire, les variations génétiques, et plus particulièrement les SNP, sont un outil majeur pour l'estimation de l'origine ethnique et la détermination d'apparences morphologiques. Ces analyses génotypiques représentent des aides à l'enquête car elles peuvent prédire la couleur de la peau, la couleur des yeux, la couleur des cheveux, ... [35].

La détermination des variations génétiques dues au polymorphisme de l'ADN peut également servir à un dépistage systématique d'une maladie ou à l'établissement de diagnostics menant à la mise en place d'une thérapie. C'est le cas notamment lorsque le polymorphisme touche la



partie codante d'un gène (exon). La présence d'une variation au sein d'un exon peut expliquer le développement d'une maladie ou bien un changement dans la réponse à une drogue ou une toxine environnementale ; ou encore être interprétée comme un facteur de risque. C'est pourquoi, d'ailleurs, ces variations telles que les SNP sont utilisées en tant que marqueurs moléculaires dans beaucoup de maladies génétiques et d'études pharmacogénomiques. Ils permettent d'établir une relation entre un génotype spécifique et un phénotype, caractérisant ainsi les gènes responsables de la pathologie ou de la réponse à la molécule/substance étudiée. Pour aller plus loin, ils peuvent également servir de marqueurs pour suivre l'éventuelle transmission héréditaire de gènes pathologiques au sein d'une famille [36]. C'est le cas par exemple des gènes Breast Cancer 1 (BRCA1) et Breast Cancer 2 (BRCA2), gènes de susceptibilité au cancer du sein [37]. En effet, une ou des mutations de type polymorphisme touchant l'un de ces deux gènes accroissent singulièrement le risque de développer un cancer du sein [38]. Ces mutations sont présentes dans toutes les cellules de l'organisme et peuvent être transmises de génération en génération. C'est pourquoi la détection de ces mutations est un outil de prédiction important, en particulier chez les femmes possédant des prédispositions génétiques familiales.

De plus, la forte demande d'une médecine personnalisée met en lumière l'utilisation du génotypage dans l'individualisation des thérapies avec la prescription d'agents thérapeutiques adaptés non seulement au traitement de la pathologie mais également au patient lui-même. Cet aspect permet de faire face à des problèmes thérapeutiques et médicaux majeurs, fréquents et parfois mortels [36]. Effectivement, un des succès de la médecine personnalisée est le cancer du sein. Environ un quart des patientes atteintes de cancer du sein ont une mutation génétique qui entraîne une surproduction de la protéine HER2 dans les cellules tumorales. Ce type de cancer du sein, dit HER2+, est particulièrement agressif. Pour ces patientes, et uniquement pour elles, il existe une substance efficace qui lie la protéine HER2 et ralentit ou stoppe ainsi la maladie.

Egalement, dans le cas des cancers colorectaux, des chercheurs ont développé un test sanguin, "Intplex", qui permet de détecter des mutations à partir des ADN tumoraux circulants avec la technique de RT-PCR [39]. Ce test permet notamment de détecter des mutations prédictives d'une résistance à la thérapie ciblée anti-EGFR utilisée normalement pour traiter des patients atteints de cancer colorectal métastatique.

## e) Applications dans le cadre du protocole FAST-MI

Les SNP sont un type de polymorphisme très représenté au sein du monde vivant. Depuis leur découverte ils ont fait l'objet de nombreuses études afin de les identifier parmi le génome humain et animal. Des recherches biomédicales ont alors révélé des associations de SNP avec certaines maladies. C'est le cas notamment du SNP rs2234237 localisé sur le gène TREM-1 codant pour un récepteur présent sur les cellules myéloïdes et qui est associé au pronostic d'une septicémie [40]. Egalement identifiée, une corrélation entre les SNP du gène de l'enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (rs1799983 et rs2070744) et l'augmentation de la sensibilité aux maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension, l'infarctus du myocarde ou l'artériosclérose [41].

Face à ces constats scientifiques, dans le cadre du projet FAST-MI, certains SNP associés à l'IDM ont préalablement été étudiés. En 2009, des travaux ont ciblé des patients atteints d'IDM et recevant une thérapie à base de clopidogrel (médicament antiagrégant plaquettaire) [42]. Il a été mis en évidence que ces patients porteurs de l'allèle responsable de la perte de fonctionnalité du gène CYP2C19 impliqué dans l'activation métabolique du médicament, présentaient un risque plus élevé de développer un évènement cardiovasculaire ultérieur. [43] De plus, sur ce même type de patients. Il s'agit du gène ABCB1 codant une protéine de la superfamille des transporteurs ABC. Les individus affichant le génotype homozygote mutant présentent une inhibition plaquettaire réduite ainsi qu'un risque élevé d'évènement ischémique lors du traitement au clopidogrel. D'autre part, si les variants des gènes ABCB1 et CYP2C19 sont étudiés ensemble, près de la moitié de la population porte un génotype associé à une augmentation du risque de survenue d'évènements cardiovasculaires majeurs avec des doses standards de clopidogrel [44]. Ces recherches démontrent bien l'importance de la prise en charge du patient et de la personnalisation du traitement. Ce qui justifie et explique l'évolution des thérapies médicales vers l'individualisation des traitements.

D'autres travaux ont également démontré le rôle d'un autre gène dans une maladie cardiovasculaire : l'athérosclérose [45]. Cette pathologie se caractérise par le dépôt d'une plaque lipidique sur la paroi interne des artères. A terme, ces plaques peuvent entraîner la lésion de la paroi artérielle (sclérose), conduire à l'obstruction du vaisseau, ou encore se rompre, avec des conséquences souvent dramatiques. La rupture d'une plaque peut notamment provoquer un IDM lorsque l'athérome est localisé au niveau d'une artère coronaire.

Le gène d'intérêt étudié lors de ces recherches code la protéine APRIL, un ligand de la superfamille des facteurs de nécrose tumorale (TNF). Il s'avère que ce gène est davantage exprimé chez des patients souffrants d'athérosclérose. Cela se traduit par une concentration plasmatique plus élevée de la protéine APRIL chez ces patients par rapport aux sujets contrôles. De plus, les auteurs ont détecté la présence de la protéine APRIL au sein des agrégats plaquettaires de la zone de rupture de l'athérome chez des patients atteints d'IDM. Ces observations suggèrent l'implication de la protéine APRIL dans l'athérogenèse, et donc dans la survenue éventuelle d'un IDM.

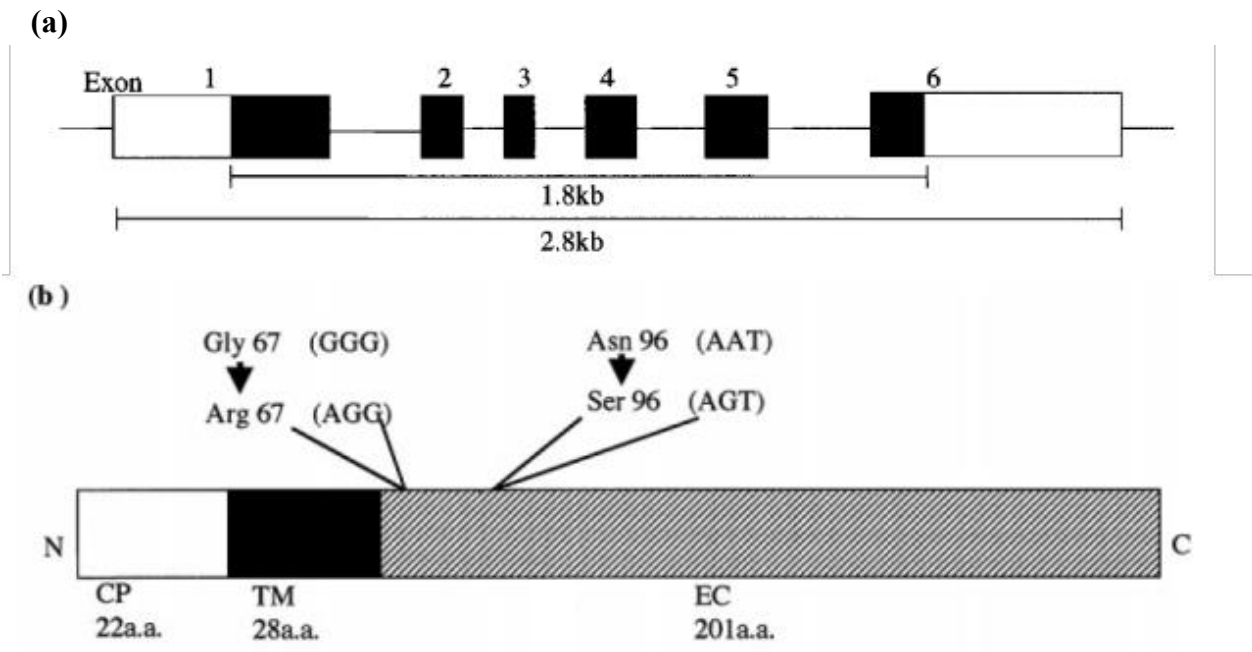
D'autres travaux sur cette protéine viennent argumenter le fait qu'elle soit impliquée dans plusieurs processus pathologiques. Les niveaux sériques de la protéine APRIL sous forme soluble (sAPRIL) sont corrélés avec la sclérose systémique, la pemphigoïde bulleuse (affection dermatologique) et les maladies auto-immunes de la thyroïde [46].

Le gène APRIL est situé sur le chromosome humain 17. Il se compose de six exons et cinq introns (Figure 7a). L'épissage alternatif de l'ARNm de ce gène conduit à l'obtention de quatre transcrits différents. Le gène est exprimée par les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et T, les neutrophiles, les ostéoclastes ainsi que par les cellules épithéliales intestinales et les tissus tumoraux. La protéine APRIL aussi appelée TNFSF13 ou CD256, est un ligand induisant la prolifération cellulaire. C'est une protéine sécrétée exerçant son action paracrine, autocrine ou endocrine sous forme soluble (sAPRIL). Avant sa libération, APRIL subit un clivage dans l'appareil de golgi assuré par une proprotéine convertase. Cette étape permet d'activer la protéine APRIL et d'enclencher sa sécrétion. APRIL se lie aux récepteurs des TNF, et peut interagir avec les protéoglycanes. Les rôles d'APRIL dans le développement tumoral, l'activation des cellules immunitaires (Lymphocytes T et B) et dans l'auto-immunité ont déjà été démontrés [47] [48].

L'existence prouvée d'un polymorphisme de type SNP pour le gène APRIL ainsi que les premiers résultats d'APRIL dans de nombreux travaux ont poussé les membres du projet FAST-MI à étudier de plus près l'impact du polymorphisme génétique du gène APRIL sur la morbi-mortalité des patients atteints de SCA.

En 2003, une équipe japonaise publie la découverte de deux nouveaux SNP exoniques situés sur le domaine extracellulaire de la protéine APRIL [49]. Le premier identifié dans la base de données des SNP (dbSNP) sous le numéro rs11552708 se situe sur le codon 67 de l'exon 1. La substitution de la guanine (G) du premier nucléotide du codon GGG par une adénine (A)

entraîne la modification de l'acide aminé glycine (Gly) par une arginine (Arg). Le second SNP est situé sur le codon 96 de l'exon 2. Ici c'est le second nucléotide du codon AAT qui est remplacé par une guanine (G). L'acide aminé asparagine (Asn) de la chaîne polypeptidique est remplacé par une serine (Ser). Ce second SNP est référencé sous le numéro rs3803800 (Figure 7).



**Figure 7 : Structure schématisée du gène humain APRIL et localisation des 2 SNP ciblés.**

(a) Les exons sont représentés par des boîtes fermées. Les introns sont schématisés par des lignes entre les boîtes.

(b) Sur le codon 67 de l'exon 1 se situe le rs11552708 et sur le codon 96 de l'exon 2, le rs3803800.

CP : Domaine cytoplasmique, TM : domaine transmembranaire, EC : domaine extracellulaire.

Source : [49]

Au fil des années, a été mis en évidence l'association de ces deux SNP avec divers processus biologiques comme le SLE, la régulation de la production d'immunoglobulines (IgG, IgA et IgM) et l'immunodéficience commune variable (caractérisée par un trouble de la différenciation des lymphocytes B et un déficit en immunoglobulines) [50] [51] [52] [53].

Bien que la dbSNP recense et référence 280 SNP connus du gène APRIL, le choix des SNP à cibler dans le cadre des objectifs secondaires du protocole FAST-MI, qui a été réalisé avant mon arrivée, s'est basé sur les aspects communs et connus des rs11552708 et rs3803800 dans des pathologies. La proximité de ces deux SNP sur le gène APRIL (seulement 141 paires de

bases les séparent) pouvait s'avérer intéressante pour l'analyse et l'association éventuelle du polymorphisme et de la morbi-mortalité.

Un troisième SNP est venu compléter l'étude. Il s'agit du rs6608 [54]. Il est situé sur l'exon 6 et se caractérise par la substitution d'une cytosine (C) par une thymine (T) en position 7464413 (nombre de bases) sur le chromosome 17. Le choix de ce SNP a été fait à partir de sa fréquence allélique minoritaire d'une part (MAF=13,6%) ; elle ne doit pas être trop faible car l'intérêt réside dans le fait de pouvoir observer des individus hétérozygotes voire homozygotes pour cet allèle. D'autre part, sa position éloignée des deux autres SNP semblait intéressante. Enfin, la répartition des génotypes dans des populations déjà étudiées dans le cadre du projet HapMap et qui donne une piste sur les résultats attendus a été également été un critère de choix (Tableau III, p 46).

Le projet international HapMap est une initiative visant à relever et à cataloguer les similitudes et les différences génétiques entre les humains. Les connaissances acquises dans le cadre du projet HapMap permettront aux chercheurs de découvrir les gènes qui jouent un rôle dans la santé, la maladie et la réponse des individus aux médicaments et aux facteurs environnementaux. Le projet est le fruit d'une collaboration entre des chercheurs et des organismes de financement du Japon, du Royaume-Uni, du Canada, de la Chine, du Nigeria et des États-Unis. Toute l'information générée par le projet est dans le domaine public [23].

# MATERIEL & METHODES

## La cohorte FAST-MI

Le projet FAST-MI voit le jour en 2005. Il s'agit d'une étude prospective et multicentrique impliquant 223 centres préleveurs. Préalablement, une demande d'autorisation a été réalisée auprès de la CNIL dont la réponse favorable a été émise en juillet 2004 sous le numéro d'autorisation 04-1244 (Annexe 2). D'autre part, un avis du CPP a été émis en juin 2005 précisant que ce projet entre dans le cadre d'une RNI (Annexe 3). A la suite de cet avis, une déclaration de mise en collection a été faite auprès du MESR. Les premières inclusions ont débuté en octobre 2005 pour se terminer en décembre 2005. La date de fin de l'étude est prévue pour le 31/12/2015.

Les patients ont été inclus selon les critères suivants :

- 1) Homme ou femme âgé(e) de plus de 18 ans.
- 2) Patient admis dans les 48 heures suivant le début des symptômes dans une USIC pour un SCA défini par un IDM, caractérisé par l'élévation et la chute typique de la troponine ou CPK Mb (marqueurs biologiques de l'IDM) associées à au moins un des éléments suivants :
  - symptômes compatibles avec une ischémie myocardique
  - apparition d'ondes Q pathologiques dans l'ECG
  - troubles de la repolarisation en rapport avec une ischémie (sus ou sous décalage du segment ST, inversion de l'onde T)
- 3) Et ayant donné son consentement pour participer à l'étude.

En revanche, n'ont pu être inclus les patients présentant au moins un des critères ci-dessous :

- Refus de consentement
- IDM survenant dans les 48 heures après une intervention thérapeutique (pontage ou angioplastie coronaire ou autre intervention chirurgicale)
- Diagnostic de SCA infirmé au profit d'un autre diagnostic

Le nombre initial souhaité de patients à inclure était de 3500 pour une durée de participation de 10 ans. Concrètement, 3748 patients ont été inclus initialement, dont 78 patients exclus soit **3670 patients inclus au total**. Finalement, après des étapes d'exclusion *a posteriori* en fonction de critères précis, sont comptabilisés pour la DNAtèque 2519 patients inclus parmi lesquels 2453 qui seront génotypés (appelés inclus bio). Les inclus bio comprennent 32 doublons et 1 triplon ; c'est-à-dire que 16 patients possèdent 2 échantillons et 1 patient présente 3 échantillons identifiés différemment par le CRB. Ces échantillons serviront de contrôles internes puisque les doublons et le triplon doivent donner le même génotype.

Les patients inclus dans l'étude ont été au préalable informés via un formulaire afin de comprendre le but de cette étude, ainsi que ses contraintes et l'intérêt qu'elle peut présenter pour eux. A la suite de quoi ils ont signé un consentement de participation (Annexe 4). Dans le cas où le patient se trouve dans l'incapacité de lire, de comprendre ou de signer ces documents, un membre de la famille ou une personne de confiance désigné par le patient peut avoir accès à ces documents et les signer (Annexe 4bis).

Les données associées aux prélèvements sanguins sont anonymisées. Le service de cardiologie identifie le patient par un numéro SFC à partir du numéro 1. L'incrémentation est réalisée par ordre d'inclusion et de réception du prélèvement d'un patient inclus. Cet identifiant SFC est en relation avec les données cliniques du patient, ces données étant regroupées dans une base gérée par le personnel technique de l'Unité de Recherche Clinique (URC). De plus, le CRB HUEP-UPMC attribue également un numéro dit d'anonymisation à chaque patient sous la forme « code centre – n° inclusion dans le centre ». Au sein du CRB, ce numéro se rapporte uniquement aux données biologiques et phénotypiques du patient contenues dans la base de données. De ce fait toutes les données des deux bases sont traitées de façon anonymisée. En 2005, les données ont d'abord été conservées dans un logiciel Access classique avant d'être transférées dans deux bases de données dédiées pour finalement être réconciliées au sein de l'URC (le CRB n'a pas accès aux données cliniques).

Toutes les étapes, de la pratique du prélèvement (Annexe 5) au traitement des données, sont réalisées dans le cadre des Bonnes Pratiques Cliniques (BPC).

« Les BPC constituent un ensemble d'exigences de qualité dans les domaines éthique et scientifique, reconnues au plan international, devant être respectées lors de la planification, la mise en œuvre, la conduite, le suivi, le contrôle de qualité, l'audit, le recueil des données, l'analyse et l'expression des résultats des recherches biomédicales ».

Au sein du CRB, les Bonnes Pratiques de Laboratoire en termes d'hygiène et sécurité sont également respectées.

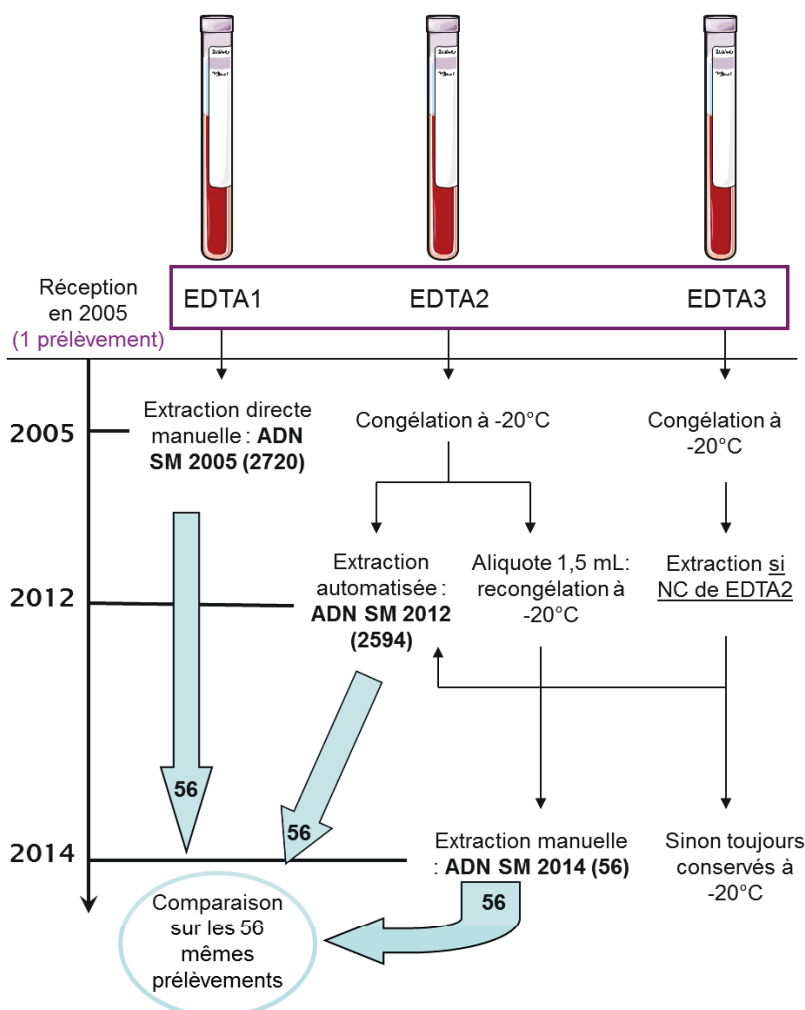
### **Réception des prélèvements et extractions d'ADN**

Chaque prélèvement arrivant au CRB est accompagné de sa feuille de route sur laquelle figure l'identification du centre préleveur, les données minimales relatives au patient ainsi que des informations concernant le prélèvement (date et heure de prélèvement, type et nombre de tube) (Annexe 6). Les données minimales sont les initiales du patient, sa date de naissance et son numéro d'anonymisation. Les consentements signés des patients sont conservés à la SFC.



De ce fait, pour contrôler l'existence et la conformité de ces documents, le CRB se base sur des rapports de monitoring réalisés par un attaché de recherche clinique habilité.

Dans le cadre du projet, au cours du prélèvement sanguin habituel effectué lors de l'admission du patient en USIC, une quantité additionnelle de 3 x 10 mL est prélevée dans des tubes avec anticoagulant, l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA, bouchon violet), pour la constitution d'une DNAtèque. Ils ont ensuite été transportés jusqu'au CRB en respectant le délai d'acheminement exigé qui est de 12 heures maximum pour un prélèvement sanguin destiné à la DNAtèque. Les tubes ont été nommés EDTA1, EDTA2 et EDTA3 par le CRB (Figure 8). Dès réception, les tubes EDTA1 ont été utilisés pour l'extraction manuelle d'ADN. En 2005, l'ADN a donc été extrait sur sang frais avant d'être conservé à -20°C. Les tubes EDTA2 et EDTA3 ont quant à eux été stockés à -20°C après réception. Une deuxième série d'extractions a été réalisée en 2012 à partir des tubes EDTA2 et EDTA3 (si nécessaire) décongelés. L'extraction a été réalisée de manière automatisée à l'aide de l'appareil Autopure LS® (Qiagen) (Annexe 7). Cependant, une petite quantité de sang du tube EDTA2 a été aliquotée et recongelée à -20°C. Enfin, en 2014, cet aliquote de sang a été extrait manuellement (Annexe 8 et Figure 8).



**Figure 8 :** Chronologie des différentes étapes de gestion des prélèvements sanguins destinés à la DNAtèque.

Les 3 temps d'extraction fournissent 3 populations d'ADN nommées ADN SM 2005, ADN SM 2012 et ADN SM 2014.

NC : non-conformité

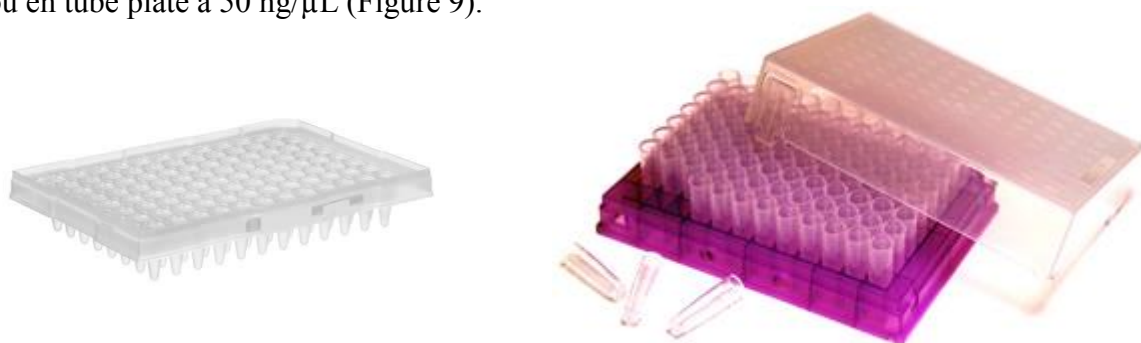
### Contrôle qualité

La qualité des ADN obtenus a été contrôlée par dosage au spectrophotomètre (Nanodrop 8000, Thermo Scientific). Cet appareil est capable de détecter l'ADN à partir de 2,5 ng/μL et peut mesurer jusqu'à 3700 ng/μL, sachant que la reproductibilité est garantie pour un intervalle de 2,5 à 100 ng/μL. Au-delà de 100 ng/μL, les résultats peuvent varier de plus ou moins 2,5% (Annexe 9). La charte qualité du CRB impose des exigences de conformité des ADN extraits en interne. Elles s'inspirent de l'état de l'art en biologie moléculaire. Un ADN est considéré comme conforme s'il répond à ces exigences, à savoir : (1) une concentration supérieure ou égale à 50 ng/μL et (2) un ratio d'absorbance à 260 et 280 nm compris entre 1,7 et 2. Les dosages sont réalisés en moyenne 7 jours après l'extraction pour laisser le temps à l'ADN de se réhydrater convenablement et assurer l'homogénéité de la solution.

Certains échantillons d'ADN ont également été quantifiés avec un fluoromètre (Qubit®, Life technologies). La haute sensibilité de cet appareil ainsi que la technique spécifique de détection par fluorescence permettent de mesurer avec précision la quantité d'ADN non dégradé (ADN double brin) contenue dans l'échantillon testé. Contrairement au spectrophotomètre qui détecte le moindre fragment d'ADN, qu'il soit double ou simple brin, le fluoromètre apporte une information supplémentaire sur l'intégrité de l'ADN non négligeable lorsqu'une analyse par PCR est envisagée.

### Mise en plaque 96 puits des ADN conformes

Dans le but d'une utilisation en géotypage, les ADN extraits en 2005 et 2012 et conformes ont été aliquotés en plaque 96 puits. Dans un premier temps, en 2005 les ADN ont été aliquotés à l'aide d'un automate (Epmotion, Eppendorf) et conservés dans des plaques 96 puits à une concentration de 50 ng/μL dans 50 μL, conditionnés à 100 ng/puit en culots secs ou en tube plate à 50 ng/μL (Figure 9).



**Figure 9:** Illustration d'une plaque 96 puits (à gauche) et d'un portoir de 96 tubes (Tube plate, à droite).

Les plaques ont été scellées manuellement avec un film aluminium adhésif et stockées à -20°C. L'aliquotage des ADN SM 2012 a été réalisé en 2014, de façon manuelle à une concentration de 100 ng/μL ou 50 ng/μL dans un volume de 100 μL. Les plaques ont été scellées avec un scelleur de plaque semi-automatique (4S3, 4titude) et des films aluminium conçus pour le stockage à long terme, puis stockées à -20°C. Dans le cas des ADN de 2012, ces plaques servent de plaques dites STOCK. En effet, à partir de ces plaques à 100 et 50 ng/μL, une plaque fille à 10 ng/μL est réalisée en diluant l'ADN directement dans la nouvelle plaque. L'aliquotage est pratiqué manuellement à la pipette multicanaux. Avant le scellage et la congélation, la concentration des puits de la plaque fille a été contrôlée par dosage au spectrophotomètre. Effectivement, pour optimiser les réactions de RT-PCR, il faut que la concentration des ADN soit comprise entre 1 et 20 ng/μL. Ces plaques filles seront donc dédiées à un usage plus « quotidien » afin d'éviter les cycles de congélation-décongélation de la plaque stock.

Pour les quelques ADN de la population SM ADN 2014 qui ont été génotypés pour analyse comparative, les solutions mères utilisées ont été directement mises en puits à 10 ng/μL sans passer par une concentration intermédiaire. Les dilutions ont été réalisées la veille de la manipulation et la plaque a été conservée à 4°C.

### **Génotypage par RT-PCR**

Le génotypage de la cohorte FAST-MI 2005 a été réalisé par RT-PCR avec la technique TaqMan® à l'aide du ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life technologies). Les réactifs utilisés sont le TaqMan® Genotyping Master Mix (réf 4371357, Life Technologies) et le TaqMan® Genotyping assay mix (Life Technologies). Les fluorochromes sont le VIC pour l'allèle 1 et le 5-carboxyfluorescein (FAM) pour l'allèle 2. Les sondes SNP contenues dans les assay mix sont le rs6608, le rs3803800 et le rs11552708. Les caractéristiques de ces trois SNP sont présentées dans le tableau III.

Dès réception, les solutions contenant les sondes SNP ont été diluées à la concentration d'usage puis aliquotées sous 50 μL. Les aliquotes sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation et ont subi au maximum trois décongélation.

Les plaques 384 puits (4titude) sont préparées manuellement à l'aide d'une pipette multicanaux 0,5-10 μL et de pointes stériles à filtres de faible rétention de liquide. La précision et la concentration sont de rigueur pour ce genre de manipulation.

Au moins deux contrôles négatifs sans ADN (NTC) sont inclus dans chaque plaque 384 puits, mais aucun contrôle positif n'était disponible.

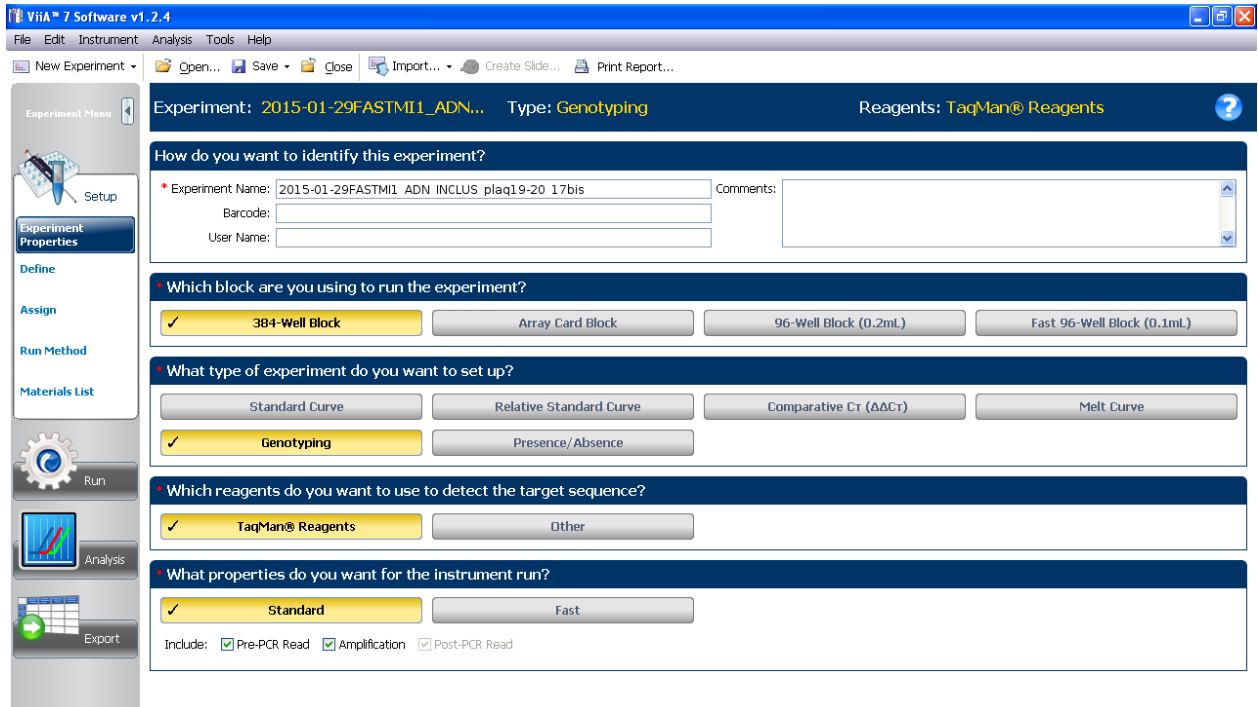
**Tableau III : Caractéristiques des SNP utilisés (Life technologies) pour le génotypage du gène APRIL.**

La position sur le chromosome 17 est le numéro de la base comptabilisée à partir de l'extrémité 5'. Les populations étudiées sont les caucasiens (CEPH), les africains (YRI), les japonais (JPT) et les chinois (CHB) Source : [23].

SNP	position sur le chr 17	séquence	Allèle minoritaire	Fréquence de l'allèle minoritaire en % (MAF)	répartition au seins des populations			
					CEPH	YCI	JPT	CHB
rs6608	7464413	GCGGGGGACGGGCGCCAGGCATTGT[C/T]CAGACCTGGTCGGGGCCCACTGGAA	T	13,6				
rs3803800	7462969	TCCGATGCCCTGGAAGCCTGGGAGA[A/G]TGGGGAGAGATCCCGAAAAGGAGA	A	44				
rs11552708	7462555	CAGGAGAGAGGTGAGCCGGCTCAG[A/G]GGACAGGAGGCCCTCCAGAATGG	A	13,78				

La mise en place de cette technique a nécessité une organisation des locaux et une gestion des flux. Tout d'abord, il faut savoir que la réalisation de la PCR ne doit pas se faire dans la même pièce que l'extraction d'ADN. Dans notre cas, une de nos pièces est consacrée exclusivement à l'extraction automatisée d'ADN. Ensuite, idéalement, il est conseillé de répartir les différentes étapes de la RT-PCR en quatre pièces ou quatre zones distinctes. En effet, la préparation et la distribution du mix réactionnel (constitué du Master mix et du Assay mix) dans la plaque 384 puits ne doit pas être effectuée à l'endroit où de l'ADN est manipulé. Cela pour éviter toute contamination de nos réactifs par de l'ADN. C'est pourquoi, pour l'instant nous avons physiquement séparé les étapes impliquant le mix de celles utilisant les échantillons d'ADN en deux pièces distinctes. De plus, les étapes de mix sont réalisées sous une station de travail à filtre UV car celle-ci est installée dans la pièce d'extraction d'ARN. D'autre part, il est préférable de délimiter une zone réservée au lancement de la PCR avec l'automate et la poubelle à déchets après-PCR afin d'éviter les contaminations de nos échantillons et réactifs par des produits de PCR potentiellement volatiles. Actuellement, l'automate et la poubelle sont installés dans la pièce où est pratiquée la distribution des échantillons d'ADN, faute de place. Néanmoins, deux zones distinctes ont été créées et identifiées afin de limiter au mieux les contaminations.

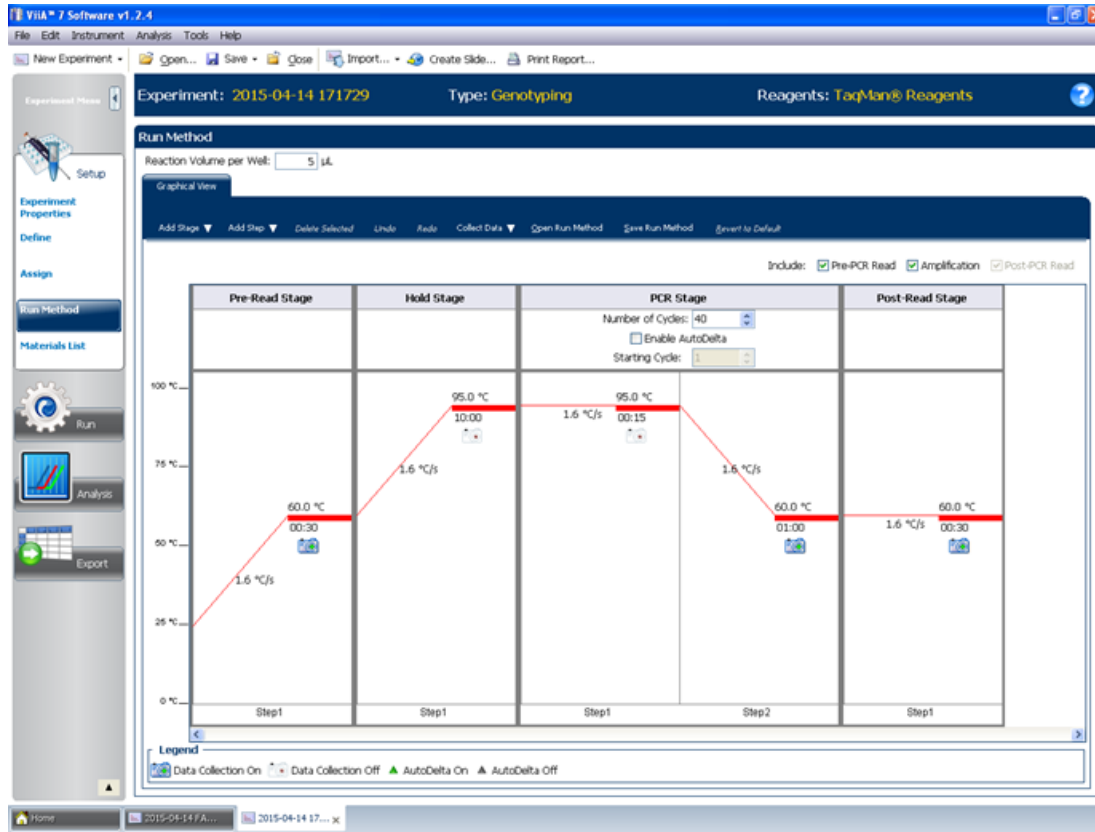
Le logiciel fourni avec l'automate est le Viia7 Software. Pour cette étude, j'ai utilisé le programme de génotypage adapté aux plaques 384 puits en technologie TaqMan® et en mode standard (Figure 10).



**Figure 10** : Paramètres du Viia7 pour le génotypage en plaque 384 puits.

Le logiciel utilisé est le Viia7 Software version 1.2.4 (Life technologies).

Initialement, tous les paramètres du profil thermique de PCR ont été conservés par défaut ; à savoir une activation de la Taq polymérase et une dénaturation de l'ADN à 95°C, une amplification de 40 cycles à 95°C pendant 15 secondes et à 60°C pendant 1 minute puis enfin une étape après-PCR à 60°C durant laquelle s'effectue la lecture de fluorescence (Figure 11).



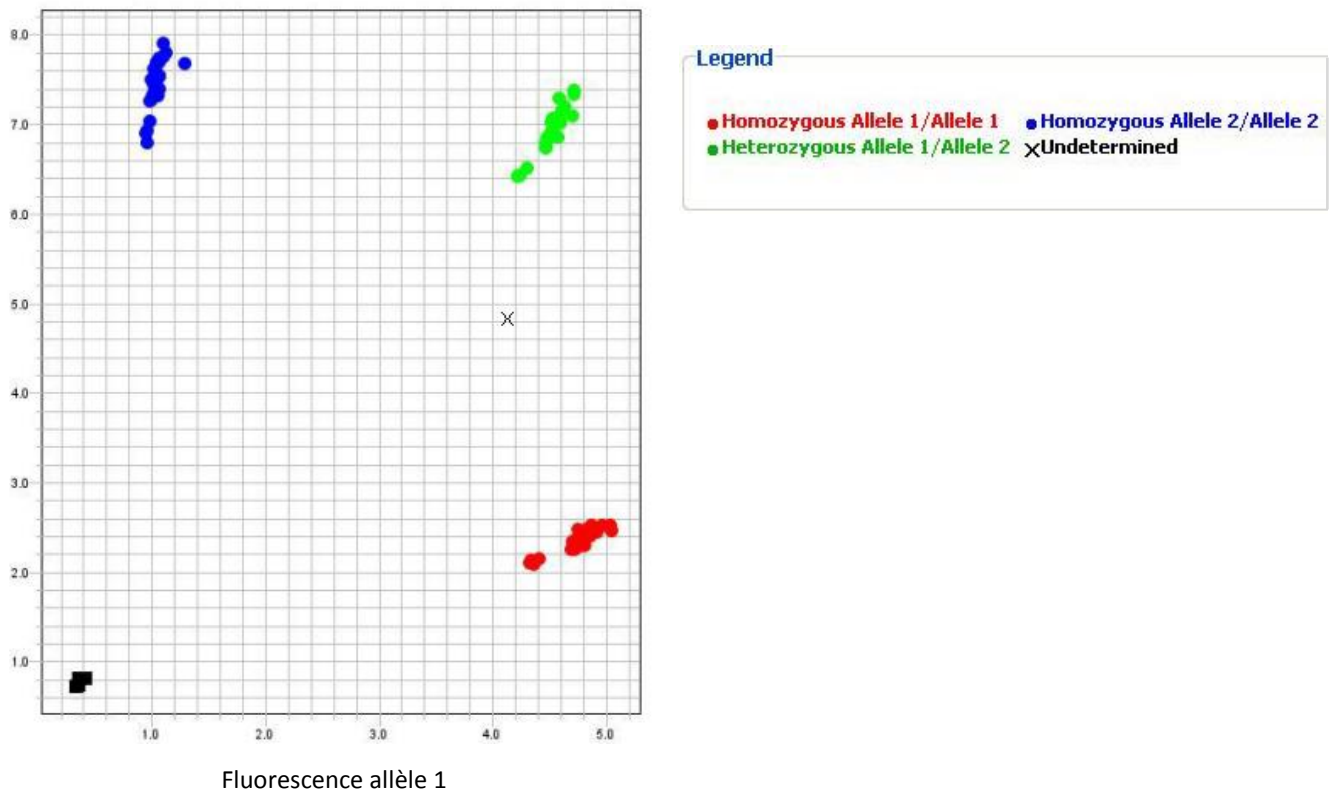
**Figure 11** : Profil thermique par défaut pour un génotypage en RT-PCR avec le Viia7.

Cette lecture est donc réalisée en point final (phase plateau de la courbe d'amplification) et mesure la fluorescence émise par les fluorochromes FAM et VIC. Ces deux molécules émettant dans des longueurs d'onde différentes, leurs signaux de fluorescence permettent d'obtenir la discrimination allélique. Par défaut sont également réalisées des lectures en étape de pré-PCR et lors de l'amplification (à la fin de chaque cycle).

Les résultats enregistrés par l'appareil sont présentés sous forme de graphique de discrimination allélique (Figure 12). L'analyse est réalisée à l'aide du Viia7 Software et confirmée par un logiciel utilisant un logarithme différent, en accès libre sur Internet aux personnes enregistrées sur le site Life Technologies.

(<https://www.lifetechnologies.com/fr/en/home/cloud.html>)

Fluorescence allèle 2



**Figure 12** : Représentation d'un résultat type de discrimination allélique pour un SNP donné. Les carrés noirs sont les contrôles négatifs et déterminent l'origine du graphique.

### Méthode d'analyse statistique

Les différentes conditions d'extraction des ADN ont été analysées en comparant les données de concentration et de ratio obtenues à l'aide des tests statistiques non paramétriques de Mann Whitney, Friedman en données répétées ou Kruskal-Wallis selon les cas, complétés du post test de Dunn (comparaison multiple). Les analyses ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5 version 5.2. Une valeur de p value inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

Le génotypage tel que nous le réalisons ici ne nécessite pas d'analyse statistique à notre niveau. Les résultats seront directement transmis aux biostatisticiens de l'URC qui les confronteront avec les données cliniques des patients. Les analyses de corrélation entre le génotype obtenu et les données phénotypiques seront réalisées à l'aide du logiciel SAS version 8.2.

# RESULTATS



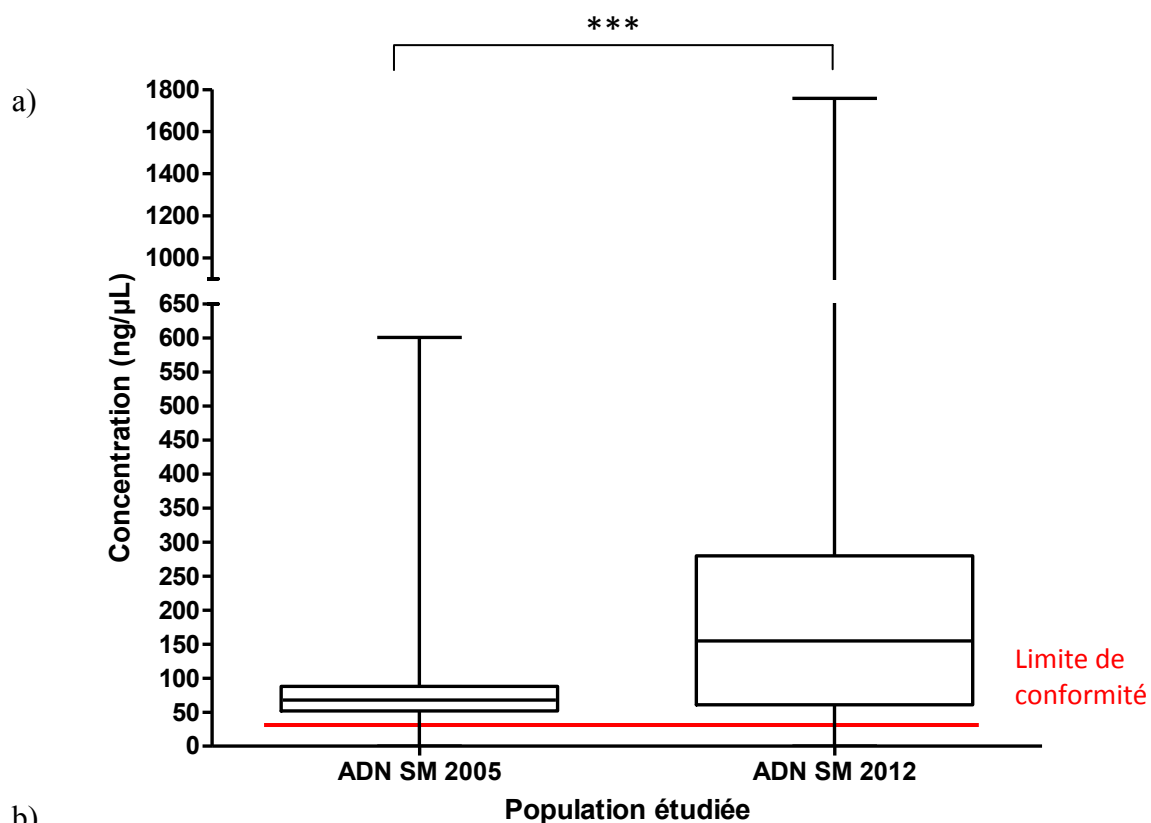
## Extractions d'ADN et Contrôle Qualité

Les extractions initiales d'ADN ont été réalisées en 2005 à partir de 2720 échantillons sanguins frais de 7 mL provenant de patients inclus et exclus (l'exclusion ayant eu lieu *a posteriori*). Ces échantillons constituent la population **ADN SM 2005**. En 2012, les tubes complémentaires EDTA2 (et EDTA3 en cas de non-conformité de l'ADN extrait à partir de l'EDTA2) conservés à -20°C depuis la réception en 2005, ont permis de pratiquer 2594 extractions avec l'Autopure LS<sup>®</sup> et de définir la population **ADN SM 2012**. Enfin en 2014, des ADN jugés non conformes ont été ré extraits à partir de 56 échantillons de 1,5 mL de sang préparés lors de la décongélation de 2012 puis stockés à basse température. Ils sont regroupés dans la population **ADN SM 2014** (Figure 8, p43). Les données recueillies nous informent sur la concentration des ADN obtenus ainsi que leur pureté grâce aux valeurs des rapports d'absorbance à 260 nm et 280 nm.

De manière générale, l'analyse statistique révèle que les concentrations d'ADN obtenues en 2012 sont supérieures à celles de 2005 (Figure 13). Néanmoins, les pourcentages d'échantillons ayant une concentration conforme (>50 ng/μL) sont équivalents avec 79% pour la population ADN SM 2005 et 78% pour la population ADN SM 2012. La représentation graphique met également en lumière le fait que 50% des concentrations de la population ADN SM 2005 sont comprises entre 52 et 88 ng/μL alors que pour la population ADN SM 2012 la moitié des données de concentrations d'ADN se répartissent entre 61 et 280 ng/μL. D'autre part, l'étendue des concentrations de la population ADN SM 2012 étant plus importante, cela suggère une variabilité plus forte au sein de cette population.

La conformité d'un ADN s'évalue aussi à partir du ratio d'absorbance à 260/280 nm. Celui-ci doit être compris entre 1,7 et 2. Les valeurs de ratio de la population ADN SM 2005 n'ont pas été mesurées. En revanche, celles de la population ADN SM 2012 viennent renforcer le pourcentage de conformité des ADN déterminé précédemment à partir de la concentration. En effet, si les deux critères de conformité normalement exigés considérés, 77% de la population respecte cette double condition.

Par conséquent, ces premiers résultats ont permis de valider la technique d'extraction automatique sur sang congelé à l'aide de l'Autopure LS<sup>®</sup> (en termes de conformité). Cependant une certaine hétérogénéité des concentrations est observable contrairement aux résultats de l'extraction manuelle. Ce qui, d'une part, permet d'exclure le fait que les prélèvements initiaux soient responsables de la variabilité des résultats et d'autre part suggère que la méthode automatisée est moins reproductible. Les autres facteurs pouvant agir sur l'hétérogénéité des résultats sont donc soit la méthode d'extraction soit l'étape de congélation.



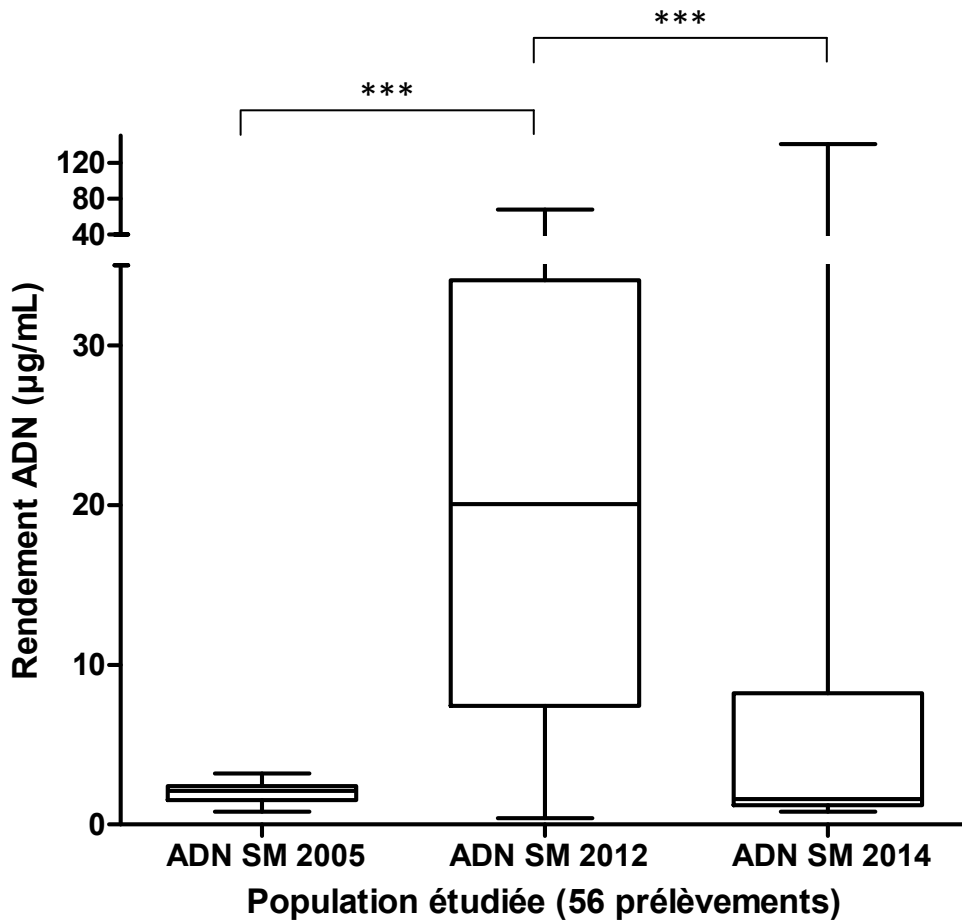
b)

population	Technique utilisée	T°C de stockage	Durée de stockage (année)	volume de sang de départ (ml)	Nombre d'ADN extraits	médiane	minimum	maximum	1er quartile	3è quartile
ADN SM 2005	Manuelle	NA	NA	7	2720	68	0	601	52	88
ADN SM 2012	Automatique	-20°C	7	7	2594	155	0	1758	61	280

**Figure 13 :** Comparaison des concentrations d'ADN des populations extraites en 2005 et 2012 et dosées juste après extraction.

(a) La concentration de l'ADN est le premier critère de conformité. La limite de conformité se situe à 50 ng/μL. Un ADN avec une concentration inférieure à 50 ng/μL n'est pas conforme. (b) Dans le tableau sont regroupées les données relatives aux deux populations considérées. \*\*\* p<0,001 (Test de Mann-Whitney). Le nombre d'ADN conforme est respectivement de 2159 (79% ADN SM 2005) contre 2032 (78% ADN SM 2012).

La comparaison des rendements d'extraction (quantité d'ADN extraite à partir d'1 mL de sang) des 56 patients de la population ADN SM 2014 avec les données de ces mêmes patients relatives aux populations ADN SM 2005 et ADN SM 2012, démontre que le rendement est significativement plus important lorsque l'extraction est pratiquée avec l'Autopure LS® (ADN SM 2012). A noter tout de même une plus grande dispersion des données, ce qui rejoint l'observation faite précédemment au sujet des concentrations. De plus, malgré le fait que les rendements de 2005 et 2014 soient équivalents, l'hétérogénéité des échantillons de 2014 n'est pas négligeable (Figure 14).



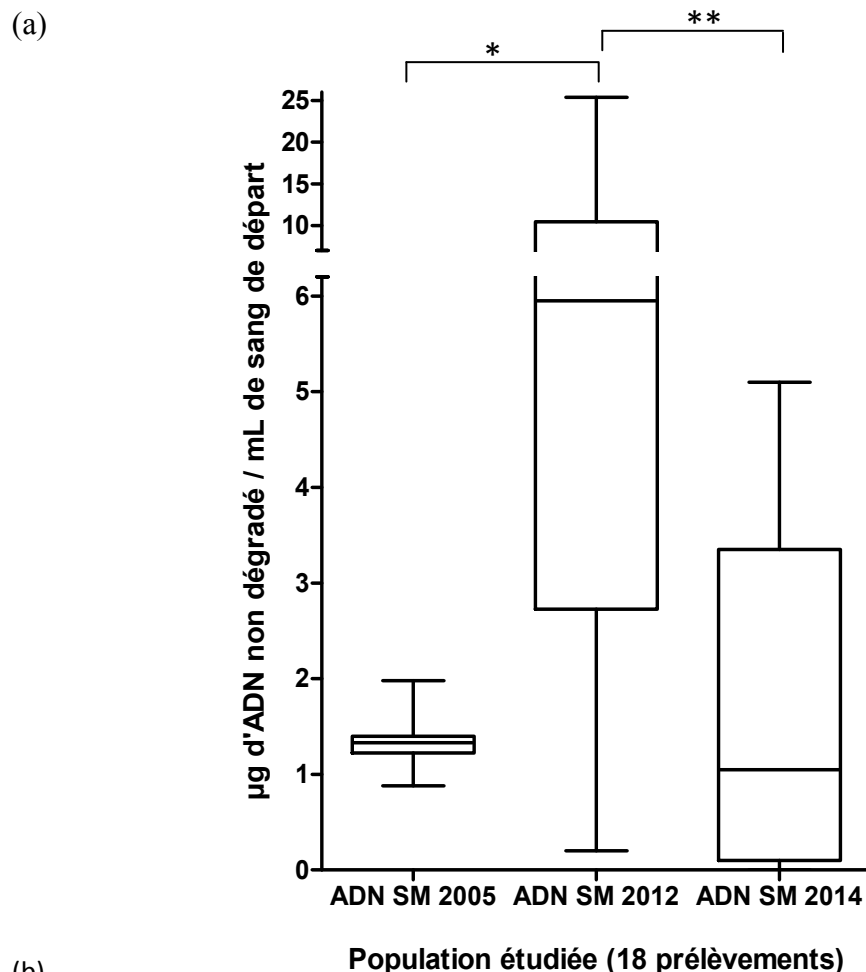
**Figure 14 :** Rendements d'ADN de mêmes prélèvements comparés à 3 temps d'extraction différents.

Le rendement correspond à la quantité d'ADN en  $\mu\text{g}$  extraite par millilitre de sang. Les 56 mêmes prélèvements ont été extraits en 2005 (2,1 [0,8 ; 3,2]), puis en 2012 (20,05 [0,4 ; 67,9]) et enfin en 2014 (1,6 [0,8 ; 140,7]). \*\*\*  $p < 0,001$  (Test de Friedman et post test de Dunn)

A première vue, l'extraction automatisée donne les meilleurs rendements alors que l'extraction manuelle est plus reproductible (Figure 14). Toutefois, nous confirmons avec ces résultats que l'hétérogénéité des rendements obtenus par extraction automatique n'est pas causée par les prélèvements initiaux eux-mêmes puisqu'en 2005 les extractions réalisées directement sur sang frais dès réception donnent des rendements très homogènes. D'autre part, même avec une extraction manuelle, l'hétérogénéité est observable (ADN SM 2014). L'automate n'est donc pas le seul paramètre favorisant l'hétérogénéité; l'autre facteur potentiel est la conservation du sang à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Une analyse plus poussée de la qualité des ADN avec le fluoromètre nous renseigne sur la quantité précise d'ADN non dégradé (ADN double brin) provenant de 18 prélèvements ayant

donné trois ADN extraits à trois temps différents. Les 18 échantillons d'ADN de chacune des populations ADN SM 2012 et ADN SM 2014 proviennent du même tube de sang de départ (Figure 8, p43). Après extraction, tous les ADN ont été stocké à -20°C. Les échantillons d'ADN de la population ADN SM 2005 sont donc restés 10 ans à -20°C, ceux de la population ADN SM 2012 sont restés 3 ans à -20°C et les ADN de la population ADN SM 2014 extraits début 2014 ont été conservés à -20°C pendant 1 an (Figure 15b).



Population	Tube de sang de départ	Statut du sang extrait	Technique d'extraction	Stockage de l'ADN	Durée de stockage de l'ADN
ADN SM 2005	EDTA 1	Frais	manuelle	-20°C	10 ans
ADN SM 2012	EDTA 2	Congelé	automatisée	-20°C	3 ans
ADN SM 2014	EDTA 2	Congelé (2 fois)	manuelle	-20°C	1 an

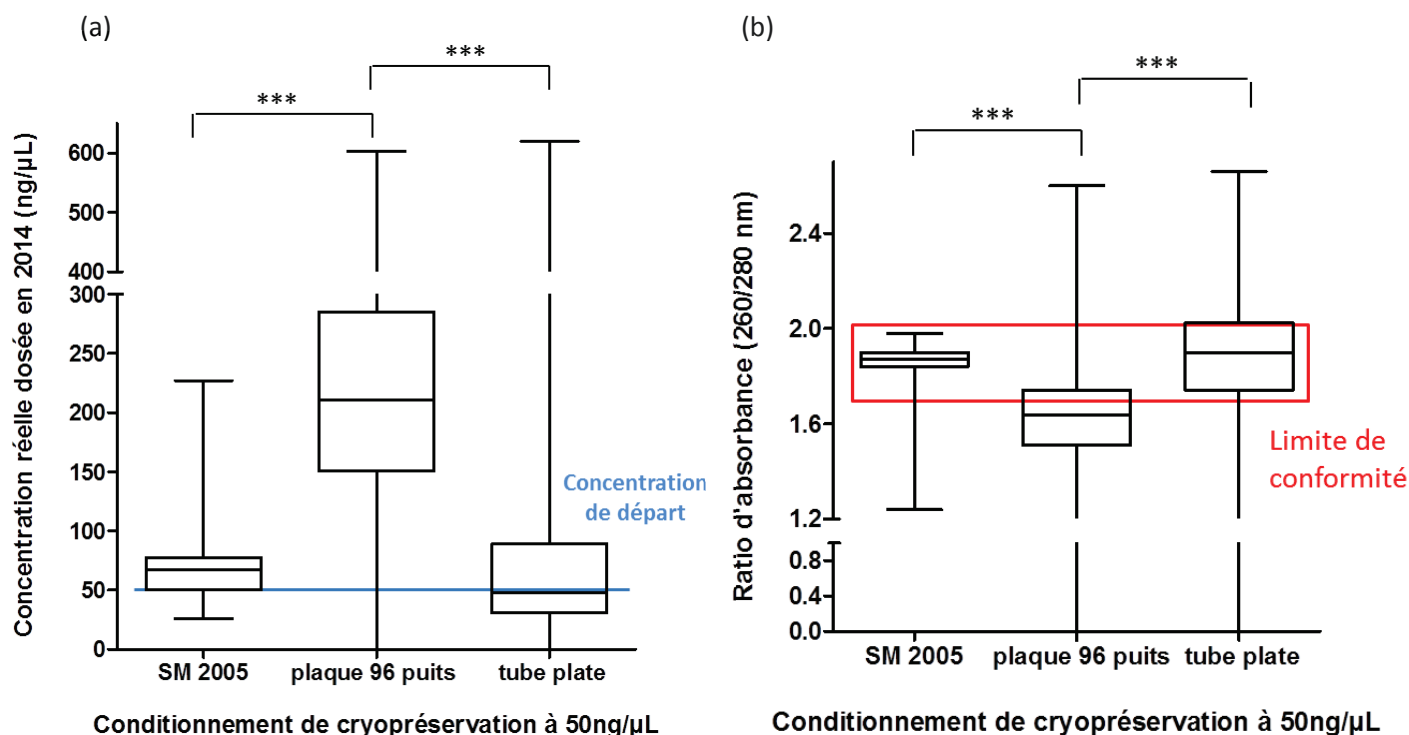
**Figure 15** : Analyse de la quantité d'ADN non dégradé après extraction et conservation à -20°C. (a) Les 18 ADN ont été dosés en même temps en 2015 avec le Qubit® (Life technologies). Les concentrations mesurées ont été rapportées au volume de sang de départ. (b) Les 3 populations étudiées respectent des conditions d'obtention et de conservation des ADN différentes illustrées dans le tableau. Les médianes ont été comparées avec un test de Friedman (1,33 vs 5,95 vs 1,05) et un post test de Dunn. \*p < 0,05 et \*\*p < 0,01.

L'analyse récente de ces échantillons d'ADN démontre que la plus importante quantité d'ADN non dégradé par millilitre de sang est obtenue pour les ADN extraits plus tardivement par rapport à la période de réception des prélèvements (ADN SM 2012). En effet, l'extraction manuelle directe sur sang frais ne permet d'obtenir, après conservation à long terme de l'ADN (ADN SM 2005), qu'une quantité d'ADN non dégradé limitée même si, comme observé précédemment, les données semblent reproductibles. D'autre part, bien que l'extraction soit très récente et donc l'ADN conservé moins longtemps, la technique d'extraction manuelle à partir d'un échantillon de sang congelé deux fois, ne semble pas permettre l'obtention d'une plus grande quantité d'ADN non dégradée (ADN SM 2014) (Figure 15).

### **Aliquotage en plaque 96 puits**

La population ADN SM 2005 a été aliquotée sous différentes conditions. Ces aliquotages automatisés visaient des plaques 96 puits à 50 ng/ $\mu$ L, des plaques 96 puits à 100 ng d'ADN en culots secs et des portoirs de 96 tubes équivalents à une plaque à 50 ng/ $\mu$ L appelés Tube plate (Figure 9, p 44). Ces conditions ont été comparées au tube mère (SM 2005) où la concentration était égale à 50 ng/ $\mu$ L. Les dosages de ces différents conditionnements ont été pratiqués en 2014 après conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 9 ans. Les culots secs ont été réhydratés dans un volume de 50  $\mu$ L permettant d'obtenir une concentration à 20 ng/ $\mu$ L. Il s'agissait de vérifier la qualité de ces ADN pour une possible utilisation en génotypage et d'apprécier la meilleure condition de conservation.

En termes de concentration et de ratio, le conditionnement des ADN en tube mère (non aliquotés) semble être le plus stable avec tout de même 1/4 des échantillons sous le seuil de concentration initiale (Figure 16). Les ADN aliquotés en plaque 96 puits présentent des concentrations très nettement supérieures à celles attendues ; ce qui suggère soit que les concentrations de départ n'étaient pas exactes soit que le scellage et/ou le film de la plaque n'était pas assez hermétique, entraînant l'évaporation du liquide et l'augmentation de la concentration des échantillons (Figure 16a). Néanmoins, sauf exception (2 puits secs), il n'y a pas eu de perte de matériel. En Tube plate, le constat n'est pas le même puisque 50% des échantillons ont une concentration inférieure à 50 ng/ $\mu$ L. Contrairement à ceux de la plaque 96 puits, les ratios des tubes plate sont majoritairement conformes (52%) (Figure 16b).

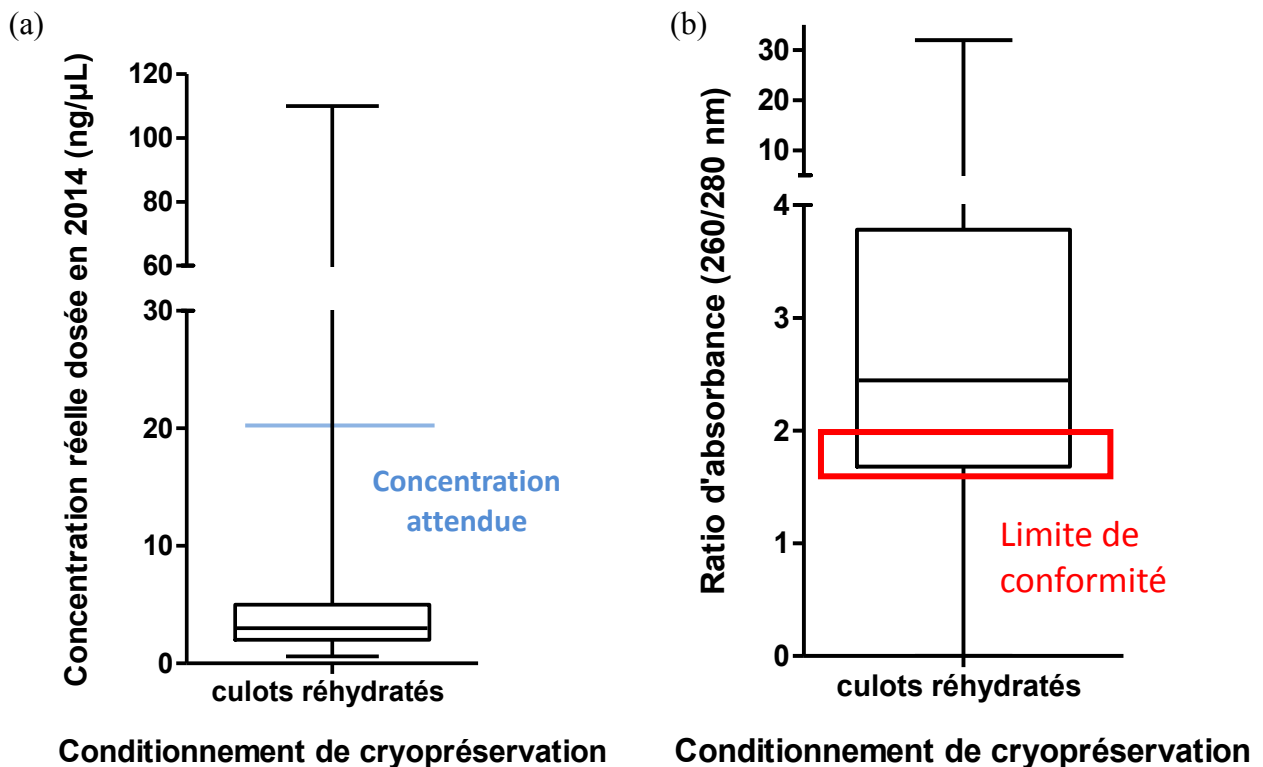


**Figure 16** : Comparaison de la qualité des ADN SM 2005 après conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 9 ans à concentration fixe dans différents conditionnements.

Les concentrations des 58 échantillons d'ADN congelés en 2005, ont été mesurées en 2014. Les tubes mères (SM 2005) sont ceux ayant été en partie aliquotés dans les différents supports. La qualité des ADN est analysée selon deux critères : la concentration (a) et le ratio d'absorbance à 260/280 nm (b). La conformité du ratio d'absorbance à 260/280 nm est comprise entre 1,7 et 2.

Ces ADN ont également été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 9 ans sous la forme de culots séchés en plaque 96 puits. Les résultats des dosages au spectrophotomètre réalisés en 2014 après réhydratation des culots d'ADN dans  $50\ \mu\text{L}$ , sont tels que 98% des échantillons ont une concentration inférieure à celle attendue ( $20\ \text{ng}/\mu\text{L}$ ). De plus, seuls 7% des ADN analysés présentent un ratio d'absorbance conforme (Figure 17).

Par conséquent, il est clair que le conditionnement en culots secs n'est pas conseillé pour un stockage à long terme surtout lorsque les ADN sont voués à être analysés par PCR. La conservation en tubes plates quant à elle peut entraîner une perte de matériel. En revanche, la cryoconservation en tube mère semble être la meilleure solution sur le long terme, même si le conditionnement en plaque 96 puits semble nécessaire sur du court terme si une analyse PCR en plaque multipuits (96 ou 384 puits) est envisagée.



**Figure 17 : Contrôle de la qualité des ADN SM 2005 après conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 9 ans en plaque 96 puits sous forme de culots d'ADN secs.**

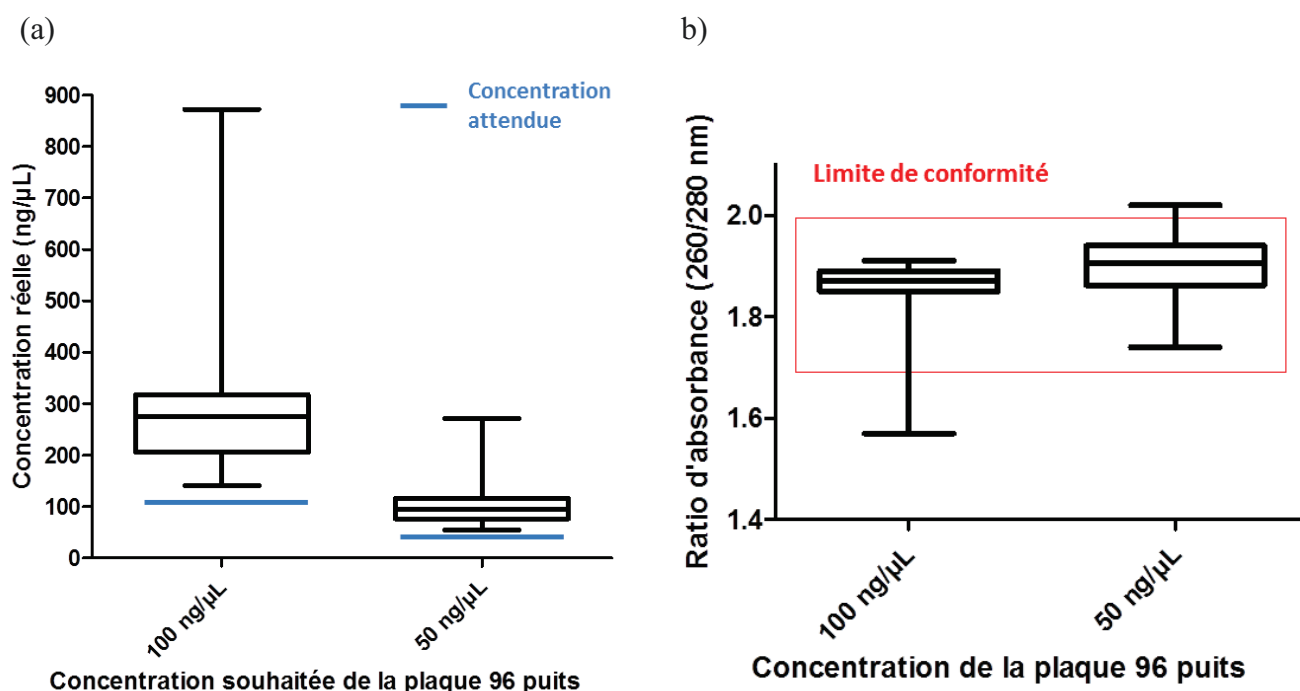
La quantité initiale d'ADN était de 100 ng. En 2014, les culots ont été réhydratés dans un volume de 50  $\mu\text{L}$  pour être analysés. (a) La concentration attendue est donc de 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . (b) La conformité du ratio d'absorbance à 260/280 nm est comprise entre 1,7 et 2.

Globalement, les ADN de la population ADN SM 2005 analysés ici n'ont pas les critères de conformité exigés pour une utilisation en génotypage.

C'est pourquoi, suite à ces constatations, et pour une question de praticité quant à la future mise en plaque 384 puits, l'aliquotage initial en plaques STOCK des 1954 ADN conformes de patients inclus de la population ADN SM 2012 a été réalisé manuellement en plaque 96 puits à une concentration fixe de 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  ou 50  $\text{ng}/\mu\text{L}$  dans un volume de 100  $\mu\text{L}$ /puits. Une amélioration y a été apportée, à savoir le scellage semi-automatique des plaques à l'aide de film adapté au stockage à long terme. Les concentrations et les ratios ont été contrôlés par dosage aléatoire sur quelques plaques après plusieurs mois de conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figure 18).

Le contrôle en random des 40 puits testés pour chacune des conditions de concentrations a permis d'illustrer la validation de la technique de mise en plaque et le conditionnement de stockage puisqu'aucun des échantillons n'a une concentration en dessous du seuil attendu.

D'autre part la qualité de ces ADN pour une utilisation en génotypage est confirmée par la mesure des ratios d'absorbance ; en effet 97,5% et 95% des ratios mesurés sont conformes.



**Figure 18 : Contrôle de la qualité des ADN SM 2012 après la mise en plaque 96 puits à concentration fixe et la conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant plusieurs mois.**

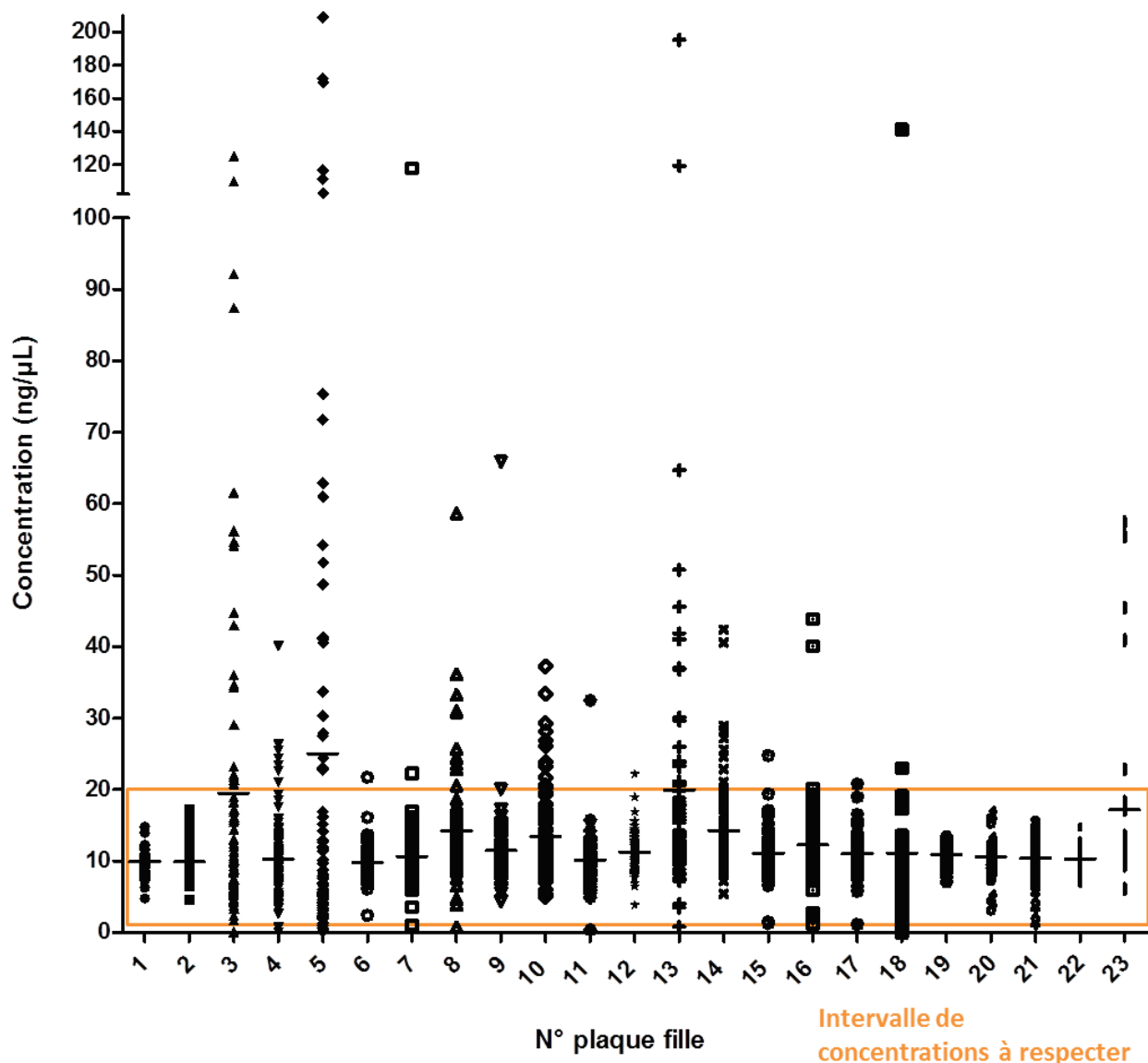
La qualité des ADN a été mesurée par deux critères, la concentration (a) et le ratio d'absorbance 260/280 nm (b). La conformité du ratio d'absorbance à 260/280 nm est comprise entre 1,7 et 2.

Il est donc possible d'envisager un génotypage avec ces échantillons.

### Génotypage : Validation de la méthode de dilution des plaques

Pour éviter que les 23 plaques STOCK conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  subissent trop de cycles de congélation-décongélation, il a été envisagé de créer 23 plaques filles à  $10\text{ ng}/\mu\text{L}$  par simple dilution. Après réalisation de la plaque fille, les concentrations nécessaires pour la RT-PCR ont été vérifiées afin de s'assurer qu'elles soient comprises entre 1 et  $20\text{ ng}/\mu\text{L}$  comme attendu (Figure 19).





**Figure 19 : Contrôle de la concentration des ADN des plaques filles à 10 ng/μL après dilution.**

Les 23 plaques filles sont une réplique des 23 plaques STOCK diluées au 1/10 ou au 1/5 selon la concentration de la plaque considérée. La concentration attendue est de 10 ng/μL mais l'intervalle de concentration accepté est compris entre 1 et 20 ng/μL.

Le dosage de la totalité des puits indique pour certaines plaques une variabilité intra-plaque importante avec des concentrations très élevées (plaques 3, 5, 13 et 23). Cependant, globalement la majorité des puits de chaque plaque se situent dans l'intervalle de concentrations désiré. Pour ceux affichant une concentration inférieure à 1 ng/μL ou supérieure à 20 ng/μL, un ajustement a été réalisé afin d'obtenir des plaques validées pour l'analyse par PCR. La technique de dilution utilisée (voir matériel et méthodes) est donc validée même s'il peut s'avérer plus prudent de faire quelques contrôles aléatoires sur

quelques puits de la plaque considérée afin de s'assurer de sa potentielle utilisation pour la PCR.

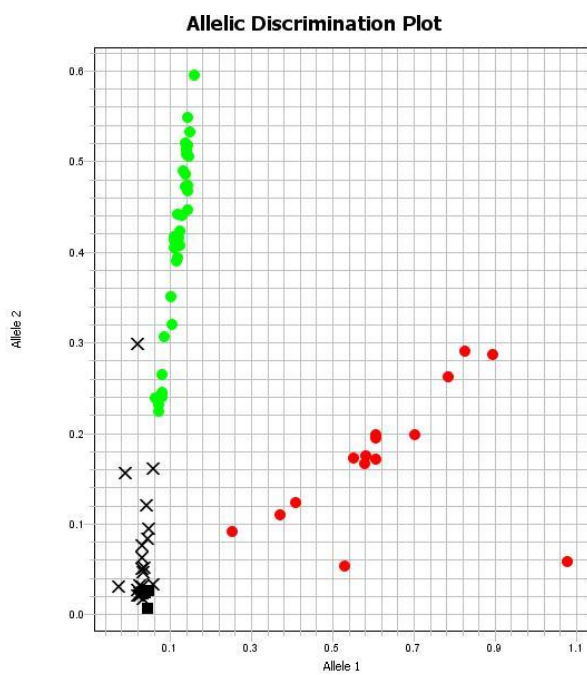
### **Génotypage : Validation du protocole de RT-PCR**

Des premiers tests de génotypage par RT-PCR pour permettre d'établir le mode opératoire (MOD) ont été réalisés sur des ADN de la population ADN SM 2005 qui ont été exclus *a posteriori*. La première plaque envisagée devait permettre de tester les trois SNP à partir d'une plaque 96 puits composée de 78 échantillons à une concentration de 10 ng/μL. Le protocole suivi s'est calqué sur les recommandations d'utilisation fournies par Life Technologies, fournisseurs des réactifs : déposer H<sub>2</sub>O dans les puits, puis le mix et enfin l'ADN à une concentration comprise en 1 et 20 ng/μL. Des problèmes de pipetage lors de la distribution du mix n'ont pas permis au final d'analyser les 78 échantillons lors de ce premier test mais seulement 73 échantillons pour le rs11552708, 54 échantillons pour le rs3803800 et 56 échantillons pour le rs6608. De plus, après préparation de la plaque 384, un délai d'attente de 24-48 heures à 4°C est intervenu avant le lancement de la réaction (le temps d'effectuer les calibrations nécessaires). Le résultat fut globalement mitigé du fait d'un nombre important d'échantillons non amplifiés (12%) ainsi qu'une analyse de la discrimination allélique difficile à cause de l'importante dispersion des points et de certains axes de population non respectés (Figure 20). Ce premier résultat remet en question le stockage de la plaque à 4°C avant son lancement. D'autre part, le fait que chacun des SNP ne réagissent pas tout à fait de la même façon implique une éventuelle mise au point particulière pour chacun. Cependant, l'expérience précédente a été reproduite à la différence près de lancer la plaque immédiatement après préparation.

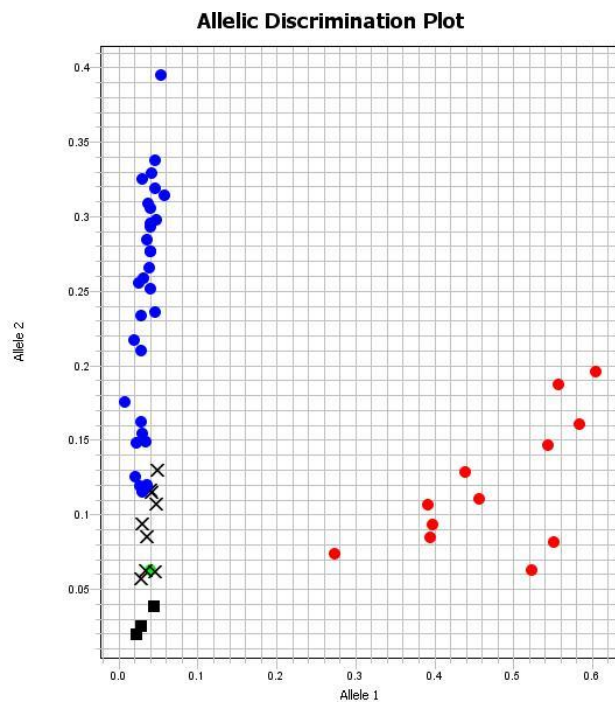
Un second test sur ces mêmes échantillons a donc été réalisé. Des problèmes de pipetage lors de la distribution du mix ont limité l'analyse à 43 échantillons avec le rs11552708 uniquement. Les autres mix n'ayant pas servi ont été congelés. Au vu des résultats la constatation fut la même que précédemment (données non montrées). Cette fois, la dispersion des points a mis en évidence une variation des concentrations des échantillons à tester. De ce fait, les échantillons analysés lors de ce second test ont été dosés. Parmi eux, 4 échantillons avec une concentration supérieure à 20 ng/μL et 13 échantillons situés dans la fourchette requise ont été sélectionnés pour un troisième test. Les 4 ADN concentrés ont subi des dilutions successives (1, 1/2, 1/4, 1/20 et 1/40 pour certains) afin de réaliser une gamme étalon. Lors de ce troisième test, le reliquat de mix congelé du rs11552708 a été distribué en

dernier dans la plaque (après l'ADN). Le résultat n'a pas permis de mettre en évidence un lien logique entre la concentration et l'intensité du signal de discrimination. Il faudrait probablement augmenter le nombre d'échantillons. En revanche, ce test a permis d'obtenir un meilleur taux d'échantillons amplifiés (94%), des contrôles négatifs (NTC pour No Template Control) corrects, des nuages de points correctement axés, des réplicats de dilution avec le même génotype et des proportions génotypiques globales respectées (données non montrées).

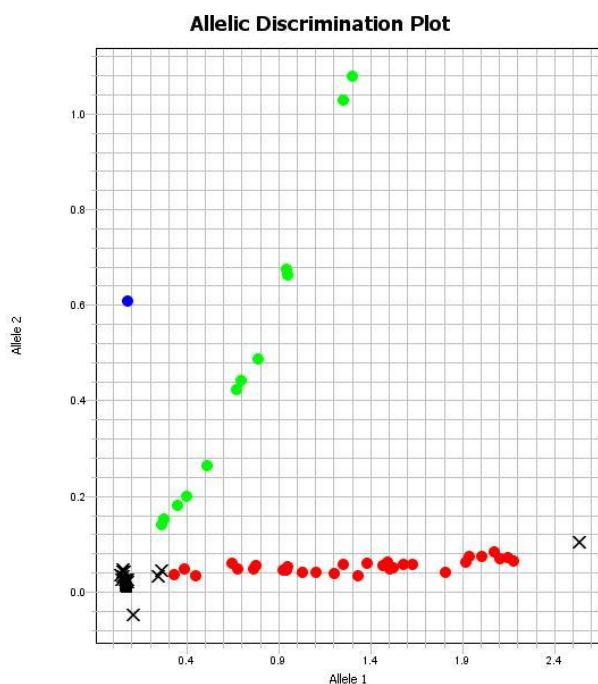
(a) rs115527058



(b) rs3803800



(c) rs6608

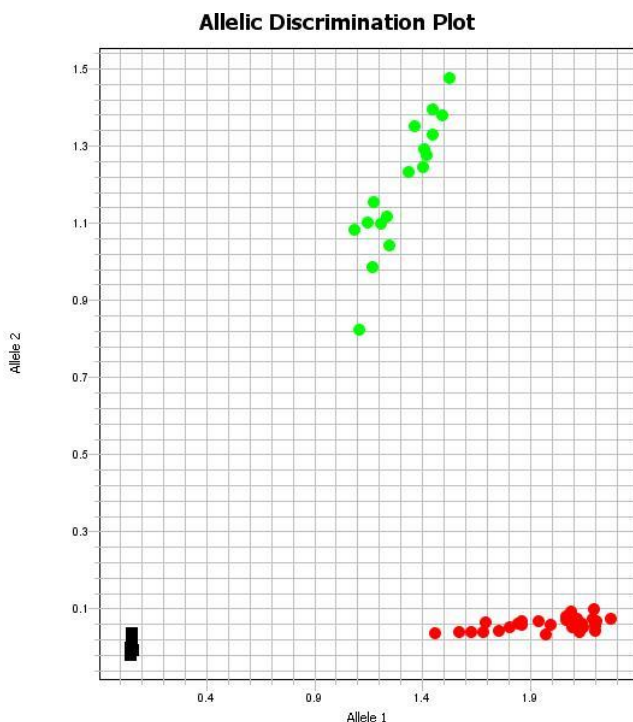


**Figure 20 : Discrimination allélique des échantillons génotypés lors du test n°1 pour chacun des 3 SNP.**

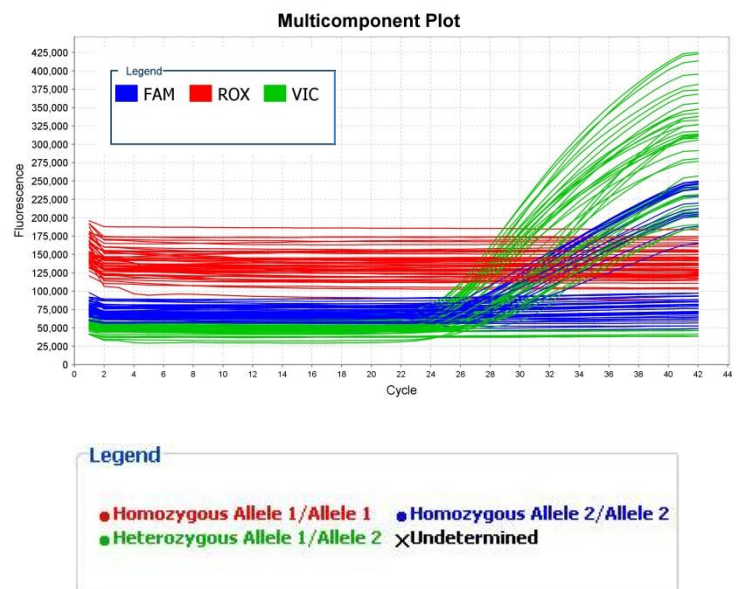
73 échantillons pour le rs11552708, 54 échantillons pour le rs3803800 et 56 échantillons pour le rs6608. En abscisse est représentée la fluorescence de l'allèle 1 et en ordonnée la fluorescence de l'allèle 2. Les croix représentent les échantillons non amplifiés ou indéterminés.

Tout en conservant la méthode précédente, une quatrième plaque a été testée avec le rs6608. Cette analyse incluait 16 ADN de 2005 testés avec un mix fraîchement préparé (condition 1), et 10 ADN de la population ADN SM 2012 testés avec le mix congelé lors de l'essai n°2 (condition 2). Ce test avait pour objectif, d'une part, de démontrer un éventuel effet de la congélation du mix avec des conditions optimales d'ADN (ADN récents, conformes et en quantité correcte, points ayant été réalisés en triplicats) (condition 2) ; et d'autre part de confirmer que le génotypage est possible avec des ADN conservés très longtemps à -20 °C en solution mère (condition 1). Ce test a permis une discrimination allélique pour tous les échantillons, avec des triplicats cohérents, des NTC validés, des nuages de points bien axés et des points moins dispersés (Figure 21a). Le changement dans l'ordre de distribution des réactifs (H2O, ADN, mix) se traduit par une bonne homogénéité du ROX sur la totalité des puits analysés. Le ROX est la référence passive de fluorescence et permet de contrôler la reproductibilité des réactions. Il est contenu dans le Master Mix et doit être constant tout au long de la réaction et surtout être équivalent d'un puit à l'autre (Figure 21b).

(a)



(b)



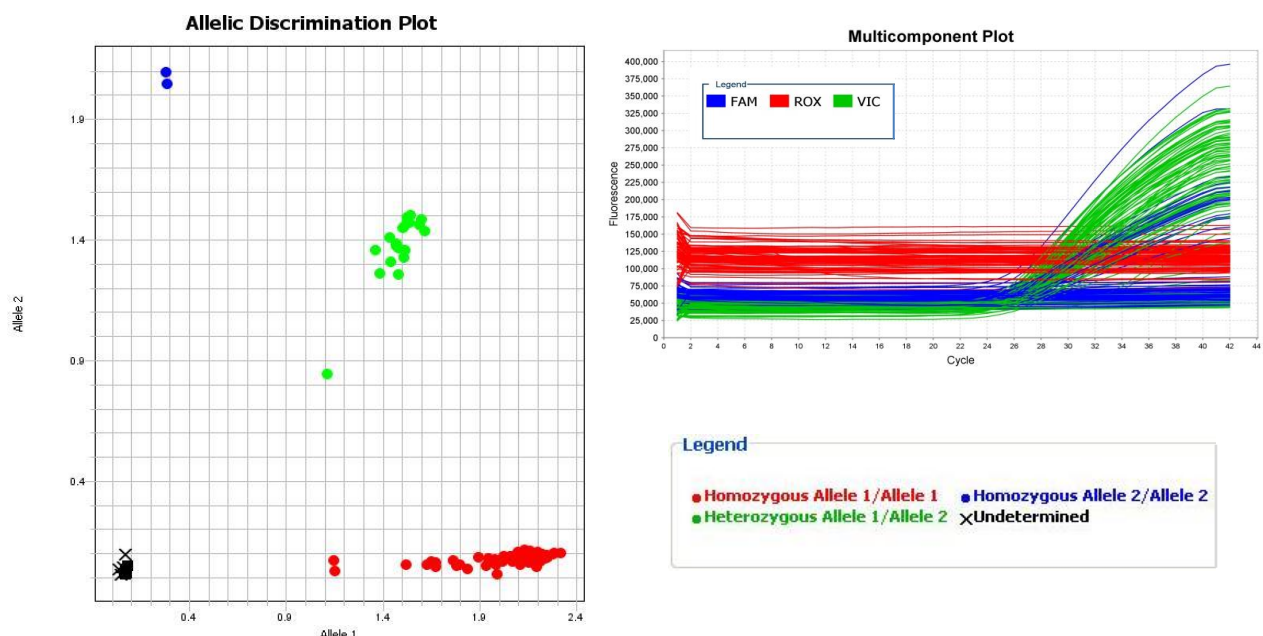
**Figure 21 : Discrimination allélique des échantillons génotypés avec le rs6608 lors du test n°4.**

(a) Les contrôles négatifs déterminent l'origine du graphique (carrés noirs). Les échantillons analysés se répartissent en deux populations : homozygotes C/C (points rouges) et hétérozygotes C/T (points verts). (b) Les signaux émis par les fluorochromes sont analysés dans le multicomponent plot. En ordonnée est représentée l'intensité de fluorescence et en abscisse le nombre de cycles. Le ROX est la référence passive.

De plus, les 16 échantillons de la condition 1 avaient également été testés lors du premier test. Contrairement au premier test, les ADN ont tous été amplifiés ; et pour ceux ayant été génotypés pour le rs6608 lors du premier test, le résultat du génotypage est identique à celui généré par ce quatrième test (duplicats inter-manip). Cette manipulation est donc validée pour les 2 conditions. Ce résultat indique qu'il est possible en cas de besoin de congeler le mix déjà préparé, et de l'utiliser plus tard sur des ADN de bonne qualité (contrôlés en termes de concentration et de ratio). Il semble également possible de génotyper des ADN conservés très longtemps à -20°C avec un mix préparé le jour même. Toutefois, ce constat réalisé avec le rs6608 n'est peut-être pas à généraliser pour tous les SNP.

C'est pourquoi, le même test a été reproduit avec le rs3803800. Les résultats obtenus sont tout aussi concluants que pour le SNP précédent avec 100% d'amplification. En effet, les triplicats et les contrôles négatifs sont validés et tous les axes sont bien respectés. Ce résultat renforce le fait de pouvoir utiliser un mix conservé à -20°C et confirme la possible utilisation d'ADN conservés très longtemps à -20°C pour un génotypage (données non montrées).

Un test supplémentaire (test n°6) a été réalisé avec le rs6608 afin de confirmer la méthode à utiliser pour la suite du génotypage de la cohorte. Il a été pratiqué sur la première plaque fille à 10 ng/μL soit 88 échantillons d'ADN supplémentés de 6 NTC (Figure 22).



**Figure 22 : Discrimination allélique des échantillons de la plaque fille n°1 analysés avec le rs6608 lors du test n°6.**

(a) Pour le rs6608 l'allèle 1 contient la base C et l'allèle 2 contient la base T. Les échantillons analysés se répartissent en trois populations : homozygotes CC, hétérozygotes CT et homozygotes TT. 4 échantillons sur 88 n'ont pas été amplifiés. (b) L'intensité de fluorescence du ROX est globalement homogène et comprise entre 75 000 et 160 000.

Une modification supplémentaire a été apportée au protocole de préparation du mix réactionnel concernant l'ordre d'ajout des réactifs : les volumes de mix et d'H<sub>2</sub>O nécessaires pour la réaction sont d'abord mélangés ensemble avant d'être déposés dans la plaque 384 puits. La dilution du mix a pour effet de diminuer l'aspect visqueux de celui-ci et de faciliter le pipetage (suite aux problèmes rencontrés lors des premiers tests). L'analyse ayant donné des résultats concluants, cette méthode de préparation a donc été retenue (Figure 22).

Suite au constat issu de ces résultats préliminaires (Tableau IV), une proposition de MOD a été rédigée par mes soins et sera soumise à la validation du comité de pilotage (COPIL) avant la diffusion du MOD au personnel du CRB.

Ce MOD détaille les différentes étapes à suivre pour réaliser la RT-PCR et explique également les points de vérification du bon déroulement de la réaction ainsi que la méthode d'analyse des résultats (Annexe 10).

#### **Tableau IV : Paramètres et résultats des tests préliminaires pour l'établissement du MOD.**

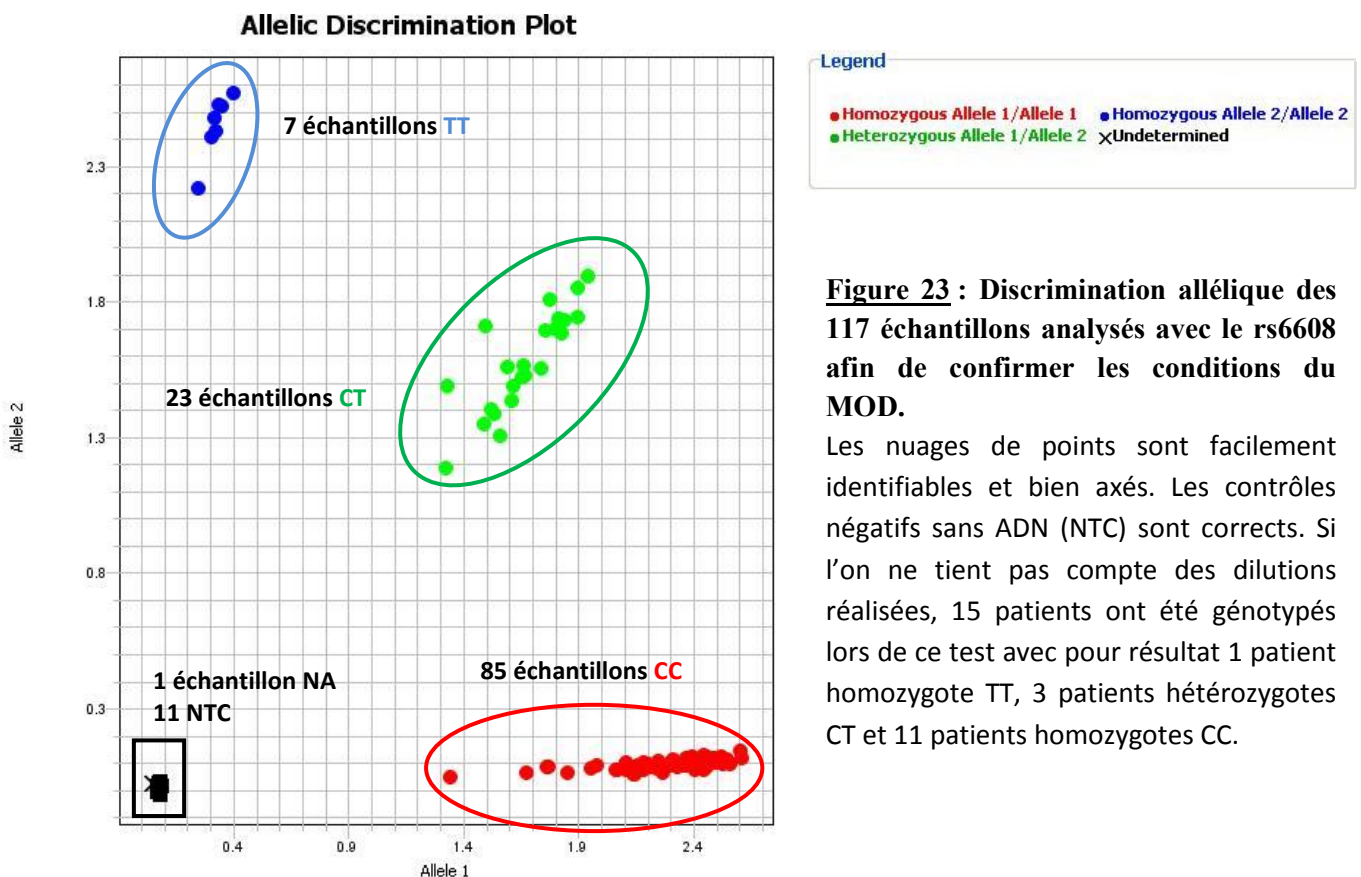
En rouge, les éléments et conditions retenus pour l'élaboration du MOD. Le test n°7 est venu confirmer les conditions du MOD déjà établies.

N° test	nombre d'échantillons	SNP analysé(s)	ordre de distribution des réactifs	Conditions spéciales	problème(s) rencontré(s)	resultat : amplification	resultat: discrimination allélique	resultat: ROX
1	56	rs6608	H2O, mix, ADN		pipetage, attente de la plaque	88%	points dispersés, axes respectés	signaux très hétérogènes (100 000- 375 000)
	54	rs3803800					points dispersés, axes assez corrects	signaux hétérogènes (120 000- 250 000)
	73	rs11552708					points dispersés, axes non respectés	signaux hétérogènes (100 000- 275 000)
2	43	rs11552708	H2O, mix, ADN	ne pas faire attendre la plaque	pipetage	77%	points dispersés, axes non respectés	signaux très hétérogènes (20 000- 200 000)
3	17	rs11552708	H2O, ADN, mix	utilisation reliquat de mix conservé congelé, dilutions successives pour 4 échantillons	ADN sous station de travail	94%	axes corrects, réplicats identiques, proportions génotypiques respectées	signaux hétérogènes (100 000- 200 000)
4	16	rs6608	H2O, ADN, mix	ADN 2005, mix préparé extemporanément	ADN sous station de travail	100%	points regroupés, axes respectés, triplicas cohérents	signaux homogènes (100 000-180 000)
	10	rs6608	H2O, ADN, mix	ADN 2012 en triplicas, mix conservé congelé		100%		
5	15	rs3803800	H2O, ADN, mix	ADN 2005, mix préparé extemporanément	ADN sous station de travail	100%	points regroupés, axes respectés, triplicas cohérents	hétérogènes (90 000-145 000)
	10	rs3803800	H2O, ADN, mix	ADN 2012 en triplicas, mix conservé congelé		100%		
6	88	rs6608	H2O+mix, ADN	1ère plaque filles à 10ng/ul		96%	points regroupés, axes respectés	signaux homogènes (75 000-160 000)
7	117	rs6608	H2O+mix, ADN	gamme de concentrations(dilutions successives), 3 population testées (ADN SM 2005, ADN SM 2012, ADN SM 2014)		99%	axes respectés, points regroupés, réplicats de dilution cohérents, proportions génotypiques respectées	signaux homogènes (100 000-160 000)



Avec ce MOD, une expérience supplémentaire sur des ADN de nos trois populations (SM 2005, SM 2012 et SM 2014) a été réalisée avec le rs6608 (test n°7). L'analyse a été réalisée à partir des solutions mères concentrées et après dilutions successives. Ceci dans le but de tester des gammes de concentrations. Ce test consistait d'une part à tester les conditions de réalisation du génotypage établies précédemment et à confirmer la fourchette convenable de concentrations pour un génotypage. Et par la même occasion, de confirmer la possibilité de génotyper des ADN ayant subi des conditions différentes d'extraction et de conservation (Figures 23, 24 et 25).

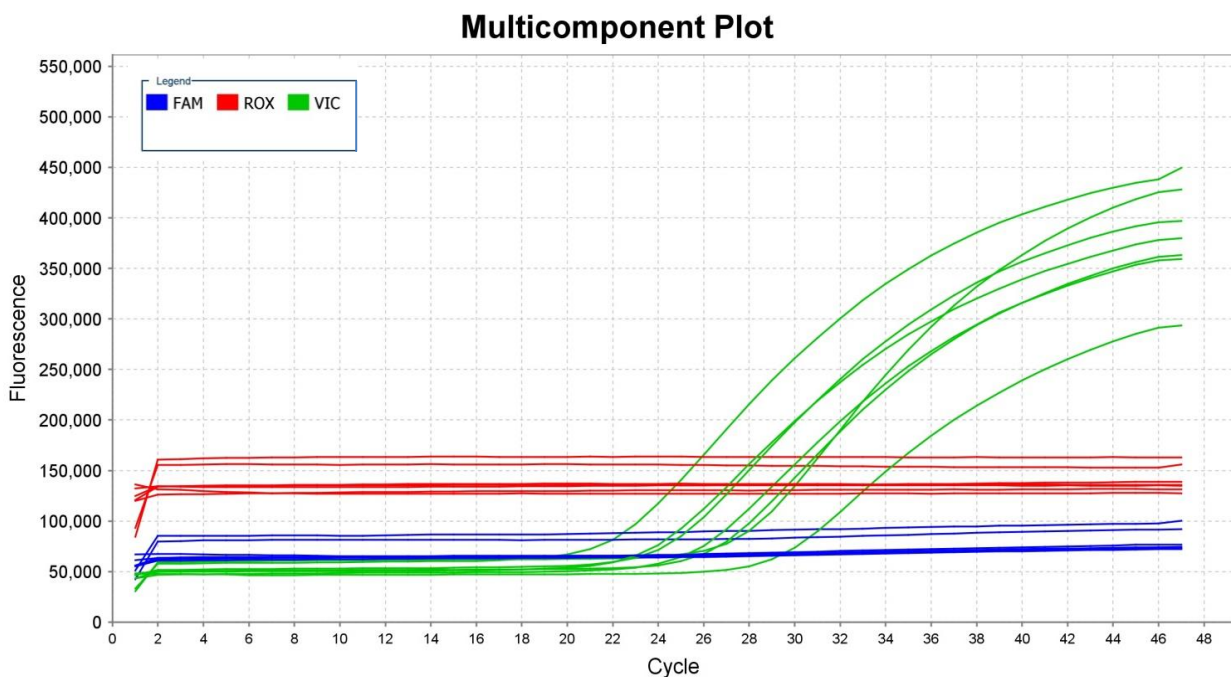
Au total 117 puits ont été analysés lors de cette 7<sup>ème</sup> réaction. Parmi eux, un seul échantillon n'a pas été amplifié. Les signaux du ROX sont constants et homogènes ce qui traduit une distribution des réactifs de façon reproductible. La discrimination allélique est cohérente avec la répartition générale des allèles dans la population (allèle 2 (T) est minoritaire) puisque les pourcentages obtenus se répartissent en 74% de CC, 20% de CT et 6% de TT. Les duplicats dilués ont des génotypes identiques. Ils proviennent de 15 patients dont le génotypage a donné comme résultat 1 patient homozygote TT, 3 patients hétérozygotes CT et 11 patients homozygotes CC. Ce résultat global confirme les conditions techniques établies dans le MOD (Figure 23).



**Figure 23 : Discrimination allélique des 117 échantillons analysés avec le rs6608 afin de confirmer les conditions du MOD.**

Les nuages de points sont facilement identifiables et bien axés. Les contrôles négatifs sans ADN (NTC) sont corrects. Si l'on ne tient pas compte des dilutions réalisées, 15 patients ont été génotypés lors de ce test avec pour résultat 1 patient homozygote TT, 3 patients hétérozygotes CT et 11 patients homozygotes CC.

Ensuite, lors de ce test a été détectée une tendance de la concentration sur l'intensité du signal de fluorescence. De manière générale, plus l'échantillon était dilué, plus le signal de l'allèle présent était faible. Une constatation observée sur la totalité des échantillons avec en plus pour certains un signal faible également pour les tubes mères non dilués (concentration trop forte) (Figure 24). Ce résultat a donc permis de réévaluer la fourchette optimale de concentrations d'ADN pour une utilisation en génotypage de SNP avec la technique TaqMan®. La tendance générale est telle que le minimum requis est 3 ng/μL et le maximum de 50 ng/μL. Il n'est donc plus obligatoire de réajuster la concentration des ADN si dans les plaques filles celle-ci dépasse 20 ng/μL.



**Figure 24:** Exemple de signaux de fluorescence obtenus pour un échantillon homozygote CC ayant subi des dilutions successives.

7 conditions de dilutions ont été testées (1 ; 1/2 ; 1/4 ; 1/8 ; 1/16 ; 1/32 et 1/128) soit 7 concentrations différentes pour un même échantillon. Les courbes 1 à 7 correspondent respectivement aux concentrations 100 ng/μL, 3 ng/μL, 28 ng/μL, 49 ng/μL, 14 et 7 ng/μL, 1 ng/μL.

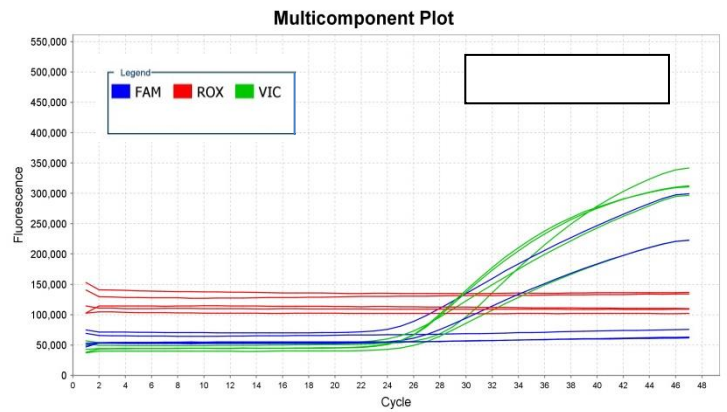
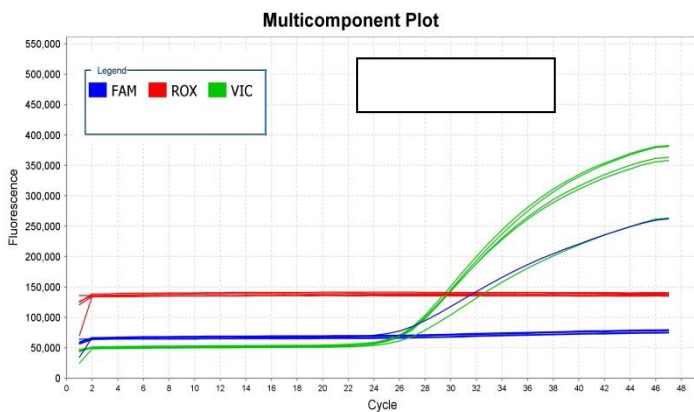
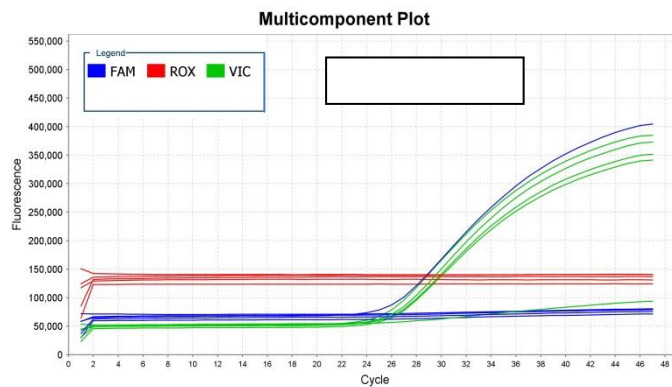
Puis, pour comparer l'amplification et la discrimination des ADN de nos 3 populations, il faut s'intéresser au graphique des intensités de fluorescence (multicomponent plot). 5 échantillons par population ont été analysés. Les concentrations des ADN dans chaque puits analysé étaient comprises entre 1 et 20 ng/μL et plus précisément entre 4 et 13 ng/μL.

Dans un premier temps, il faut noter que les profils d'amplification de chaque échantillon considéré sont tout à fait corrects.



Ensuite, les signaux de fluorescence émis par les allèles exprimés sortent au 25<sup>ème</sup> cycle, quel que soit l'ADN considéré. D'autre part, pour l'intensité de fluorescence du VIC plus particulièrement (dans le cas d'un génotype homozygote allèle 1), l'intervalle d'intensité est plus faible pour les ADN de la population ADN SM 2014 (300 000-340 000). Concernant les deux autres populations, les intensités sont très proches et atteignent 340 000 à 380 000. De plus, les signaux VIC-FAM des génotypes hétérozygotes présents parmi les populations ADN SM 2012 et ADN SM 2014, ont une intensité comparable qui se situe dans une fourchette de [220 000-300 000] (Figure 25).

(a)



(b)

Population	Tube de sang de départ	Statut du sang extrait	Technique d'extraction	Stockage de l'ADN	Durée de stockage de l'ADN
ADN SM 2005	EDTA 1	Frais	manuelle	-20°C	10 ans
ADN SM 2012	EDTA 2	Congelé	automatisée	-20°C	3 ans
ADN SM 2014	EDTA 2	Congelé (2 fois)	manuelle	-20°C	1 an

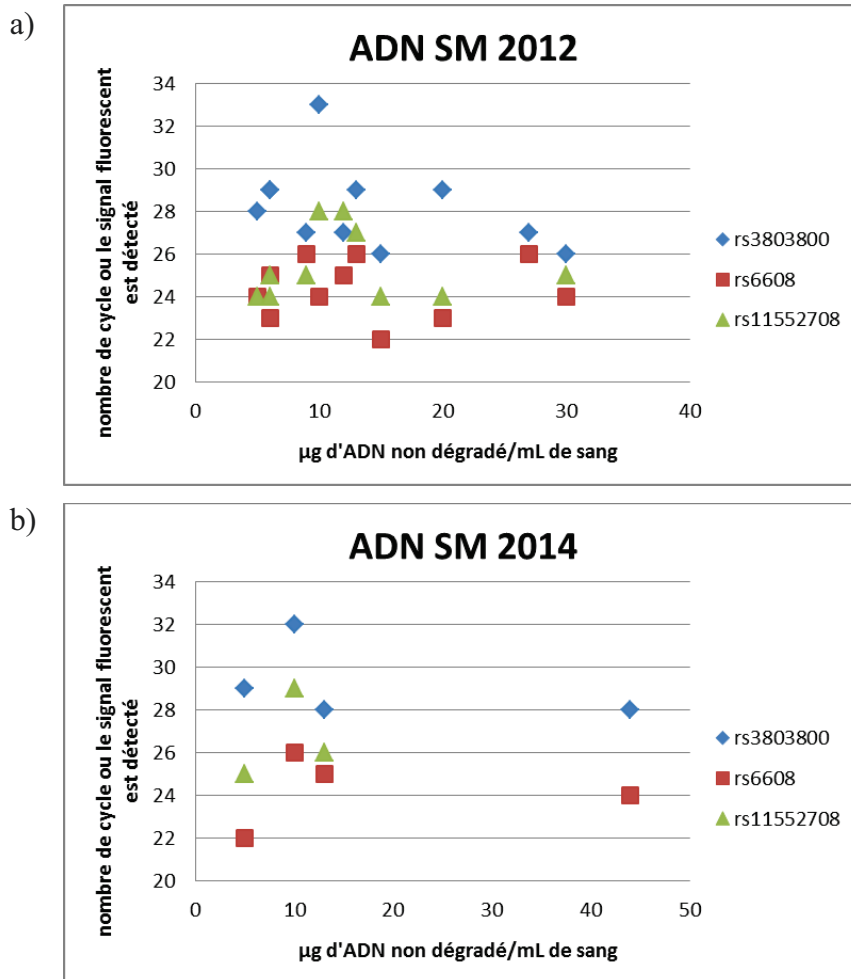
**Figure 25 : Génotypage d'ADN de 3 populations répondant à des conditions d'extraction et de conservation différentes.**

(a) 5 échantillons par population ont été analysés. Les concentrations d'ADN de chaque puits étaient comprises entre 4 et 13 ng/μL. (b) Rappel des conditions d'extraction et de conservation de chaque population.

Ces résultats confirment que l'amplification par PCR et l'analyse de SNP par génotypage est possible sur un ADN extrait sur sang frais ou congelé et conservé plusieurs années à -20°C en solution mère. De plus, même si les signaux sont inférieurs aux autres conditions, la double congélation subie par les ADN SM 2014 n'empêche pas l'obtention d'un résultat de génotypage.

Enfin, 15 échantillons d'ADN mesurés par fluorométrie (parmi les populations ADM SM 2012 et ADN SM 2014) ont été analysés en génotypage avec les 3 SNP. Parmi cette sélection, les quantités d'ADN non dégradé obtenues par millilitre de sang de départ étaient comprises entre 5 et 30 µg/mL pour la population ADN SM2012 et entre 5 et 44 µg/mL pour la population ADN SM 2014. L'analyse des profils d'amplification suggère une amplification correcte pour chaque échantillon analysé. La discrimination allélique a pu être réalisée même si certaines intensités de fluorescence étaient faibles. Cependant aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la quantité d'ADN non dégradé dans l'échantillon et les caractéristiques du résultat de génotypage, à savoir les intensités de fluorescence et le nombre de cycle au bout duquel le signal est détecté. Et ce, quelle que soit la population (Figure 26).

En l'occurrence, à partir de ces résultats, il n'est pas possible de suggérer une éventuelle exigence à laquelle il serait favorable voire optimale de répondre afin d'assurer la fiabilité du génotypage. De plus, en comparant les concentrations mesurées au fluoromètre avec celles du spectrophomètre pour les mêmes échantillons, on obtient des rendements de 30 à 50% avec le Qubit® pour des concentrations Nanodrop supérieures à 20 ng/µL (toutes populations confondues). En dessous de 20 ng/µL, la mesure de fluorométrie est quasi nulle. Par conséquent, un ADN avec une concentration de 50 ng/µL mesurée au spectrophotomètre donnerait 15 à 25 ng/µL au fluoromètre, quantité suffisante pour être génotypé. Ayant connaissance de ce fait, il semble que les mesures du Qubit® ne soit pas des données critiques à connaître pour réaliser un génotypage sur des ADN conformes extraits en interne.



**Figure 26** : Nombre de cycles à partir duquel le signal de fluorescence de chaque sonde SNP est détecté lors du génotypage des ADN mesurés au fluoromètre.

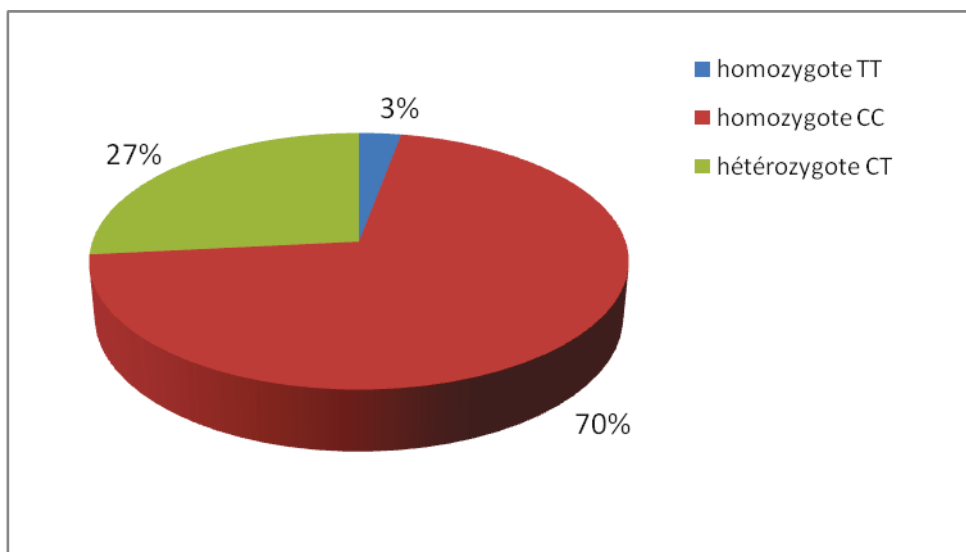
15 échantillons au total ont été analysés avec les 3 SNP. Le nombre de cycles à considérer n'est pas équivalent pour chaque sonde SNP. Pour un SNP considéré, plus le nombre de cycle est faible, plus l'amplification est précoce et importante. (a) 11 échantillons de la population ADN SM 2012 et (b) 4 échantillons de la population ADN SM 2014.

Avant de réaliser le génotypage de la cohorte complète, il a fallu réfléchir au rapport entre le taux d'erreur, le temps de manipulation et le nombre d'échantillons et de SNP par plaque. Les différents tests, la praticité de la préparation ainsi que la constatation d'un potentiel comportement différent pour chaque SNP a permis d'instaurer de manière générale les conditions suivantes : (1) 1 SNP par plaque au profit du nombre de patient, (2) 176 patients (2 plaques 96 puits comprenant 88 patients) en moyenne par plaque 384 pour limiter le temps de préparation à une demi-journée et éviter des erreurs entraînées par la fatigue, la déconcentration... et (3) au vue de la qualité variable des résultats obtenus pour chacun des SNP lors de ces PCR préliminaires, un génotypage SNP par SNP de la cohorte a été envisagé, plutôt que de génotyper les 3 SNP patient par patient.

## Génotypage de la cohorte FAST-MI 2005

Après validation de la conformité des solutions mères d'ADN extraits en 2012, la cohorte à analyser était constituée de 1954 ADN issus de 1929 patients (présence de 23 doublons et 1 triplon). Les doublons et triplons portent le même numéro d'identification SFC mais pas le même numéro d'identification donné par le CRB. C'est pourquoi l'analyse peut être considérée comme ayant été réalisée en aveugle par rapport à ce fait là. La vérification de la bonne correspondance des génotypes obtenus pour les échantillons en doublon ou triplon constitue donc une étape de contrôle permettant de valider l'analyse avec le SNP considéré.

Le génotypage de la cohorte a donc démarré avec l'analyse du rs6608 sur les 22 plaques filles restantes (la plaque 1 ayant été génotypée lors du test n°6). La répartition des génotypes est corrélée avec les observations faites par le projet HapMap à savoir notamment que l'allèle T est très minoritaire. Les génotypes de doublons et triplon ont été vérifiés et validés pour ce SNP puisque identiques. Au niveau de l'échantillon, les résultats se répartissent de la façon suivante : 1361 ADN génotypés CC, 536 ADN génotypés CT et 57 ADN génotypés TT. En termes de patients, cela revient à 1354 patients homozygotes CC (70%), 518 patients hétérozygotes CT (27%) et 57 patients homozygotes TT (3%) (Figure 27).



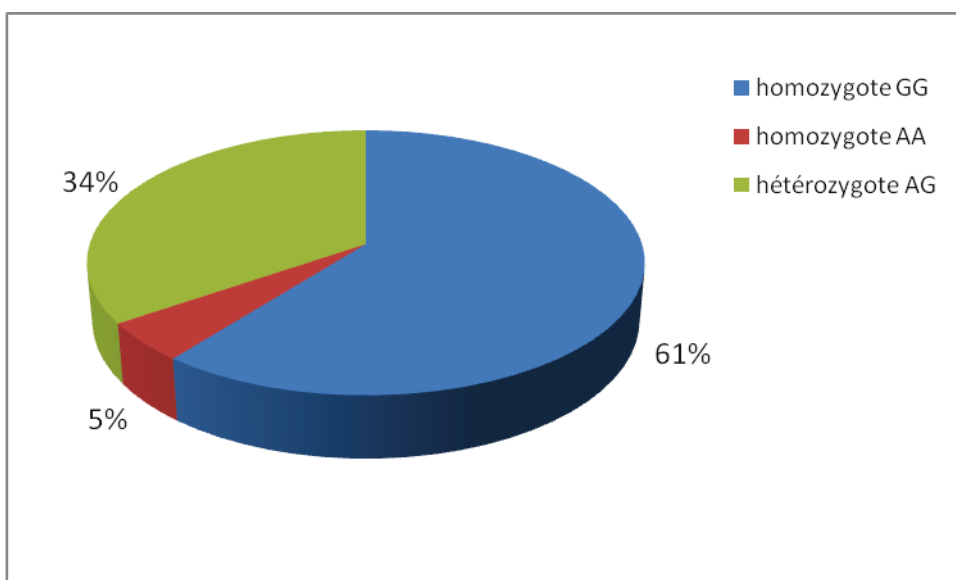
**Figure 27** : Répartition des génotypes obtenus avec le rs6608 sur la cohorte FAST-MI de 1929 patients.

Suite à ces résultats, la mission s'est ensuite poursuivie avec l'analyse du rs3803800 sur les 23 plaques filles et dans les mêmes conditions que le rs6608, c'est-à-dire, celles établies dans le MOD. Le rs3803800 n'était pas aussi performant que le rs6608 en ce qui concerne

l'intensité de fluorescence des marqueurs VIC et FAM. En effet, après une amplification de 40 cycles, la discrimination allélique était difficile voire aberrante du fait de la faiblesse des signaux. L'augmentation du nombre de cycles pour améliorer la discrimination allélique et obtenir des résultats plus satisfaisants a été testée. Cette adaptation du MOD a bien permis d'augmenter les intensités des signaux de fluorescence mais pas toujours suffisamment pour permettre une discrimination correcte. C'est pourquoi une analyse a été réalisée en parallèle avec un algorithme différent via le ThermoFischer cloud sur le site de Life Technologies.

Suite à ces adaptations, la cohorte complète a pu être génotypée avec le rs3803800. La répartition des génotypes est telle que les hétérozygotes AA sont minoritaires dans cette population, ce qui est en accord avec l'information fournie par le projet HapMap comme quoi l'allèle A est la moins fréquente. La vérification des doublons et triplon a permis de détecter une incohérence de génotypage au sein d'un doublon. Cette absence de similitude a été écartée suite à une nouvelle analyse à partir des solutions mères de 2005. Cela a permis de mettre en évidence un problème avec le puits correspondant à l'un des doublons dans la plaque fille analysée (erreur d'échantillon possible).

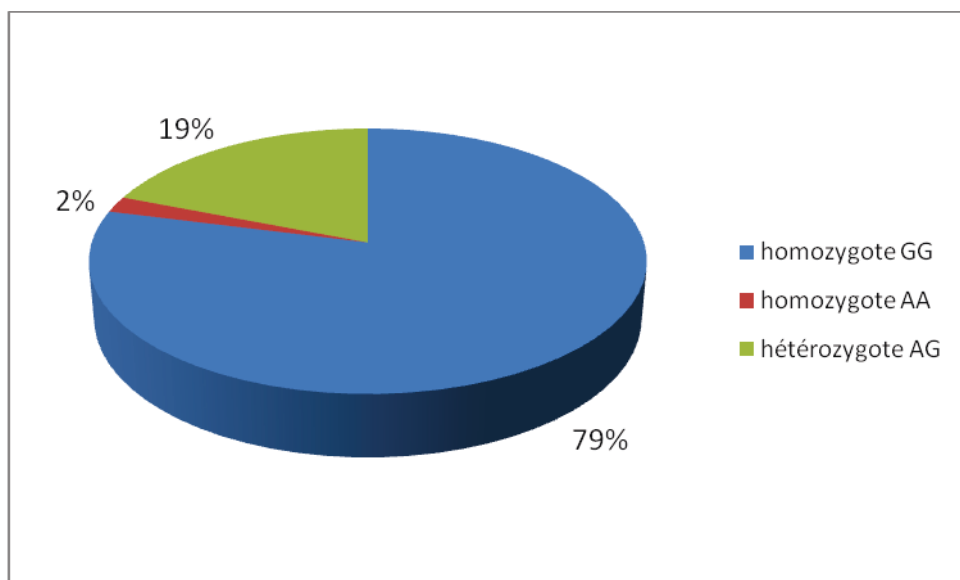
Les résultats de chaque puits analysés se répartissent de la manière suivante : 1185 ADN génotypés GG, 675 ADN génotypés AG et 94 ADN génotypés AA. En termes de patients, cela revient à 1170 patients homozygotes GG (61%), 666 patients hétérozygotes AG (34%) et 93 patients homozygotes AA (5%) (Figure 28).



**Figure 28 :** Répartition des génotypes obtenus avec le rs3803800 sur la cohorte FAST-MI de 1929 patients.

Enfin, le génotypage de la cohorte avec le dernier SNP, le rs1155270, a été réalisé. Les conditions appliquées ont été celles du MOD même si l'intensité des signaux était un peu plus faible que le rs6608. Cependant, il n'a pas été nécessaire d'adapter les conditions du fait que l'analyse avec le cloud était concluante.

Le résultat de la discrimination allélique de la cohorte étudiée avec le rs11552708 a donné une grande majorité d'homozygotes GG, ce à quoi nous nous attendions du fait que l'allèle A est minoritaire. Le contrôle des doublons et triplon n'a révélé aucune incohérence. Les génotypes obtenus se répartissent donc de la manière suivante : 1542 ADN génotypés GG, 374 ADN génotypés AG et 38 ADN génotypés AA. En termes de patients, cela se traduit par 1523 patients homozygotes GG (79%), 368 patients hétérozygotes AG (19%) et 38 patients homozygotes AA (2%) (Figure 29).



**Figure 29 : Répartition des génotypes obtenus avec le rs11552708 sur la cohorte FAST-MI de 1929 patients.**

Le déroulement de cette mission de génotypage a permis de se rendre compte de l'importance de tester chaque nouveau lot de sondes SNP avant toute utilisation afin de valider sa performance même si celui-ci a été préalablement testé voire validé par le fabricant. Des paramètres comme la spécificité des sondes et l'intensité des signaux émis par les fluorochromes sont importants pour que l'automate puisse effectuer une discrimination allélique correcte. Généralement un signal acceptable doit être supérieur à 1 mais comme dans le cas du rs11552708, un signal inférieur n'entraîne pas forcément un résultat erroné. Il peut s'avérer utile d'avoir différents logiciels d'analyse pour confirmer ou infirmer les résultats

obtenus, notamment en période de test de SNP. Le MOD de base doit pouvoir être adapté au SNP considéré même si cela n'est pas systématique.

### Génotypage : étude de l'association des rs3803800 et 11552708

La proximité des rs3803800 et 11552708 au sein du gène APRIL suggère une analyse croisée des génotypes obtenus avec chacun de ces SNP. En effet, en reprenant les résultats de génotypage des 1954 ADN analysés, il s'avère que certains génotypes sont plus fréquemment associés au sein de notre cohorte (Figure 30).

		rs11552708		
		AA	AG	GG
rs3803800	AA	0	0,1	4,7
	AG	0,05	4,7	30
	GG	1,9	14	44

**Figure 30** : Répartition croisée des génotypes des rs11552708 et rs3803800 au sein de la cohorte analysée.

Les chiffres sont exprimés en pourcentage et traduisent la fréquence d'association des deux génotypes considérés.

Il est vrai que les résultats de cette analyse vont dans le sens que l'allèle G étant majoritaire pour les deux SNP, on s'attend logiquement à ce que le génotype GG soit le plus fréquent. Cependant, ce double génotype GG/GG n'apparaît que dans 44% des cas étudiés, et un autre résultat associe le génotype GG du rs11552708 avec le génotype AG du 3803800 chez 30% des sujets analysés.

Il sera très intéressant ensuite de confronter ces résultats aux données cliniques des patients pour éventuellement mettre en évidence une association entre ces doubles génotypes et la morbi-mortalité des sujets atteints de SCA.

# DISCUSSION



La méthode d'analyse de SNP par RT-PCR testée et mise au point à travers ce travail a permis de réaliser l'analyse génotypique de 1954 échantillons avec 3 SNP du gène APRIL. Les échantillons d'ADN sélectionnés pour le génotypage ont été ceux extraits de façon automatisée car malgré l'hétérogénéité des résultats d'extraction, les rendements étaient meilleurs (en terme de concentration au Nanodrop ou de données du Qubit) et la double conformité respectée.

Nous avons également mis en évidence que pour conserver au mieux l'ADN, celui-ci doit être conditionné en cryotube de solution mère à -20°C et que la mise en plaque ne doit pas être faite trop précocement par rapport au génotypage. La technique de mise en plaque et dilution des plaques validée par dosage des concentrations des puits au spectrophotomètre, a permis de réaliser le génotypage dans son intégralité. Des expériences préliminaires de test des sondes SNP ont permis de définir les conditions de réalisation de la RT-PCR et de mettre au point un MOD, mais aussi de souligner la problématique de comportement de chaque sonde SNP et le besoin d'adaptabilité du MOD. De plus, il a été démontré que les ADN appartenant aux différentes populations étudiées ont pu être génotypés par cette méthode, et que finalement les conditions d'extraction et de conservation du sang et des ADN ne sont pas des étapes critiques pour le génotypage par la technique des SNP. Néanmoins, il a été démontré que certains paramètres concernant la qualité et la quantité de l'ADN doivent être respectés pour assurer la faisabilité de l'expérience.

La comparaison des différentes techniques d'extraction pratiquées au sein du CRB lors du projet FAST-MI a révélé une variabilité importante parmi la population des ADN extraits sur l'automate. En effet, bien que les rendements soient meilleurs qu'avec l'extraction manuelle, les concentrations des ADN obtenus sont très hétérogènes. Toutefois, les critères de conformité étant respectés, cela n'a pas posé de problème lors du génotypage de la cohorte. Effectivement, tous les échantillons ont été analysés et ont fourni un génotypage. Néanmoins, il est important de rappeler quelles sont les conditions relatives à l'extraction d'un ADN destiné à une utilisation en analyse biomoléculaire.

Tout d'abord, le sang total est une source répandue d'ADN génomique réputé pour sa qualité et sa quantité. Mais pour optimiser l'obtention d'un ADN de qualité afin d'assurer son utilisation en analyse moléculaire, les étapes de la phase pré-analytique sont primordiales. Le premier niveau réside dans l'acte de prélèvement lui-même. Des règles précises doivent être respectées notamment concernant le type de tubes, l'ordre de remplissage de ces tubes et l'homogénéisation. Les échantillons de sang à partir desquels seront extraits des acides

nucléiques doivent être prélevés sur un anticoagulant dont les éventuelles traces résiduelles n'interféreront pas avec les enzymes utilisées en biologie moléculaire. L'anticoagulant recommandé est l'EDTA. L'héparine (héparinate de lithium) doit être évitée du fait de son pouvoir inhibiteur sur les ADN polymérase utilisées pour la PCR [55]. L'homogénéisation des tubes doit se faire avec douceur par retournement, environ 8 à 10 fois. Il est important de réaliser correctement cette action car elle permet de bien mélanger le sang et l'anticoagulant présent afin d'empêcher tout le sang de coaguler et de favoriser sa conservation (Annexe 5).

Lorsque le délai d'acheminement du tube de sang est rapide, il est conseillé de l'utiliser immédiatement pour l'extraction. Sinon, jusqu'à récemment, la conservation du sang à température ambiante ne pouvait excéder 7 jours, sans entraîner une diminution du rendement d'ADN [56]. Mais en 2014, une équipe américaine est parvenue à obtenir un ADN de qualité à partir de sang total conservé à température ambiante sous conditions protectrices pendant 6 semaines (technologie de biostabilisation) [57]. En revanche, sans protection le sang peut être conservé à +4°C pendant maximum 24h [58], ou être stocké à basse température. L'état de l'art impose que la conservation à basse température se fasse à -80°C pour du long terme et à -20°C pour du court terme.

Dans notre étude, les tubes de sang ont été congelés à -20°C pendant 7 à 9 ans avant d'en extraire l'ADN. Nous l'avons vu, les résultats obtenus (que ce soit en extraction automatique ou manuelle) présentent une hétérogénéité notable en comparaison avec l'extraction sur sang frais. Après avoir exclu la variabilité du prélèvement d'un patient à l'autre et l'extraction automatisée comme facteurs responsables de cette disparité, l'autre facteur pouvant l'expliquer est la conservation du prélèvement sanguin à -20°C. Effectivement, s'agissant d'une conservation longue durée, la température de -20°C n'était pas adaptée. En fait, la conservation à long terme est d'autant meilleure que la température est basse. Elle doit se faire impérativement en dessous de -70°C pour les cellules et tissus, car les ribonucléases (RNAses) sont actives aux températures supérieures à -70°C et dégradent les prélèvements à long terme [55]. Cependant cela n'a pas empêché d'obtenir des ADN répondant au double critère de conformité (concentration >50 ng/μL et  $1,7 < DO_{260/280} < 2$ ) et qui ont pu être analysés.

Les expériences présentées ont donc démontré qu'un génotypage par l'étude de SNP est possible avec de l'ADN extrait à partir de sang prélevé sur EDTA et conservé plusieurs années à -20°C même si cette condition de conservation n'est pas la plus propice. Pour aller même plus loin, les quelques échantillons d'ADN traités dont le sang a subi deux cycles de congélation-décongélation à -20°C (population ADN SM 2014) ont permis d'obtenir un

génomé. Il est bien connu que les cycles de congélation-décongélation sont nuisibles à la qualité d'un échantillon biologique. Concernant le sang, il a été prouvé que la dégradation de l'ADN due aux cycles de congélation-décongélation du sang n'est observable qu'à partir de 4 cycles [59].

Certes, certaines de ces conditions ne sont pas optimales, mais la simple connaissance de ces faits permet d'ouvrir la prestation à des utilisateurs fournissant directement des ADN dont nous ne connaissons pas forcément les critères de conservation du sang et d'extraction. En revanche, au sein de notre structure, pour les projets et prestations nécessitant une extraction d'ADN en interne, le sang doit être obligatoirement prélevé sur EDTA et le système qualité impose que la conservation du sang suive l'état de l'art, c'est-à-dire -80°C, et quand cela est possible l'extraction automatique sur sang frais est privilégiée afin de favoriser le rendement.

D'autre part, l'hétérogénéité des résultats d'extraction automatisée n'a probablement pas eu d'impact sur le génomé car les extractions réalisées en 2012 avec l'Autopure LS<sup>®</sup> de Qiagen ont généré une grande majorité d'ADN conformes. Ces résultats ont d'ailleurs permis de valider la technique d'extraction automatisée au sein de notre structure. Même si l'extraction pratiquée manuellement est reconnue comme une technique fiable et efficace lorsqu'elle est bien réalisée (elle est même considérée comme la technique de référence), dans le cadre d'une biobanque pratiquant une activité d'extraction en routine et qui doit gérer des centaines d'échantillons d'ADN, il devient rapidement nécessaire d'envisager l'automatisation de la technique. Toutefois, la conformité des ADN n'étant pas systématique et pouvant dépendre de la technique utilisée, il paraît essentiel de réaliser une validation de méthode avant de pouvoir l'appliquer. De plus, il faut tout de même rester vigilant quant à la méthode automatique car comme toute machine, l'apparition d'un dysfonctionnement n'est pas exclue. Contrairement à la méthode manuelle où c'est assez rare, dans le cas d'un dysfonctionnement il est possible d'obtenir un rendement nul. De ce fait, l'utilisation d'un automate nécessite obligatoirement une connaissance et une maîtrise poussées de l'appareil afin de pallier aux éventuels problèmes.

Cependant, il est clair que l'extraction automatique de sang conservé plusieurs années -20°C peut fournir des ADN conformes utilisables pour un génomé par RT-PCR tout comme un ADN extrait manuellement à partir du moment où il est conforme.

Par conséquent, si finalement ni la technique d'extraction, ni la conservation du sang n'ont d'impact sur le génomé des ADN obtenus c'est que les points critiques concernent

d'autres paramètres. Ce qui signifie que le fait de ne pas connaître les conditions de stockage des tubes de sang ayant servi pour l'extraction d'ADN, ni la technique d'extraction utilisée, ne limite pas la réalisation du génotypage. En revanche, les analyses effectuées tendent à suggérer que l'assurance de pouvoir réaliser un génotypage est possible si la solution d'ADN extrait affiche une concentration minimale de 50 ng/ $\mu$ L et une pureté correcte traduite par un rapport de DO à 260 nm et 280 nm compris entre 1,7 et 2. En effet, tous les ADN analysés dans cette étude et ayant conduit à l'obtention d'un génotypage respectaient ces conditions, les conditions de conformité du CRB.

Pour cela, il nous est indispensable de réaliser les analyses spectrophotométriques nécessaires afin de statuer sur la conformité ou non de l'échantillon. La double exigence citée plus haut est le minimum requis pour une utilisation de l'ADN en génotypage. D'ailleurs, il est bien connu que la contamination d'un échantillon d'ADN par des protéines ( $DO < 1,7$ ) peut nuire à la qualité des séquences.

Dans le cadre d'une prestation de routine, pour optimiser d'avantage la qualité de l'ADN, il est recommandé de considérer également le ratio d'absorbance 260/230 nm. En effet, des substances telles que les sels ou les solvants organiques (phénol, trizol, isopropanol, alcool), souvent utilisés lors de l'extraction d'ADN, peuvent interférer avec la PCR et diminuer son efficacité. Une mesure du rapport d'absorbance 260/230 nm supérieure à 1,8 est acceptable. Dans le cas contraire, l'utilisation de l'échantillon peut être compromise ou du moins les résultats obtenus pourront être remis en cause.

D'autre part, la qualité d'un ADN peut aussi être contrôlée par une électrophorèse sur gel d'agarose. Cette technique s'est avérée être un moyen efficient et efficace pour séparer des acides nucléiques et visualiser la dégradation éventuelle de l'ADN génomique. Elle permet aussi de vérifier l'absence de contaminants pouvant interférer avec la réaction de PCR (les échantillons seront retardés lors de l'entrée dans le gel) [60]. Il est d'ailleurs envisagé qu'au sein du CRB, la méthode d'électrophorèse devienne un test supplémentaire de contrôle de l'intégrité des ADN obtenus après extraction automatisée. Lors de l'extraction, l'automate génère des fragments d'ADN de taille connue (400 kb), que l'on pourrait contrôler par migration sur gel. L'intégrité des fragments d'ADN générés peut aussi être analysée au fluoromètre. En effet cet outil est capable de mesurer la concentration d'ADN double brin présent dans l'échantillon. Cela donne une information supplémentaire quant à la qualité de l'échantillon et permet également de calculer des rendements. Cependant, l'analyse des quelques échantillons de la cohorte FAST-MI mesurés puis testés en génotypage n'a pas révélé d'effet particulier ni de tendance en rapport avec la quantité d'ADN non dégradée.

Pour cette application précise qu'est le génotypage, la dégradation des fragments générés n'a pas systématiquement d'impact si elle ne touche pas la zone ciblée par la sonde SNP et les amorces. De plus, la comparaison avec les concentrations mesurées au spectrophotomètre a mis en évidence un écart récurrent d'environ 50% en faveur du spectrophotomètre. C'est pourquoi il ne semble pas nécessaire d'instaurer les mesures de fluorométrie comme un contrôle qualité de routine en interne mais plutôt comme un outil de vérification en cas de problème lors du génotypage. En revanche, dans des conditions autres que les nôtres, notamment des ADN fournis par l'extérieur, il pourrait être intéressant de vérifier les écarts de concentration entre les mesures spectrophotométriques réalisées par les utilisateurs et nos dosages au fluoromètre.

Une fois extrait et hydraté, l'ADN n'est pas obligatoirement utilisé dans l'immédiat. Par conséquent, même si l'ADN est une macromolécule très stable, il doit pouvoir être conservé dans un environnement qui va le protéger de la dégradation et de l'évaporation. La conservation de l'ADN est donc considérée comme une étape critique pour l'utilisation des ADN en analyse moléculaire. Traditionnellement, l'ADN se conserve en solution à -20°C sur du long terme [55]. La plupart du temps il est conditionné en un ou plusieurs cryotubes considérés comme la solution mère.

Les données obtenues le démontrent, pour un stockage longue durée c'est le moyen de conservation le plus stable. La concentration et la DO varient peu et l'évaporation est limitée. Mais sur du court terme, pour faciliter l'analyse génotypique, il est possible d'aliqoter les échantillons en plaque multipuits dans un volume adapté, avec un scellage de plaque thermocollant plutôt qu'adhésif pour augmenter l'étanchéité de la plaque et mieux isoler chaque puits. Le conditionnement en 96 tubes de type Tube plate n'est pas recommandé dans la mesure où nous avons démontré une éventuelle perte de matériel. Le conditionnement en culots secs n'a pas été testé sur du court terme mais au vu des données analysées suite à un stockage à long terme, il n'est pas recommandé pour envisager une analyse en PCR. Ces remarques suggèrent donc qu'il est préférable de conserver au maximum l'ADN en cryotube de solution mère et de procéder à l'aliqotage en plaque multipuits uniquement au moment où l'analyse génotypique est prête à être démarrée. Pour préserver d'autant plus les échantillons d'ADN, il serait même envisageable de réaliser directement les plaques filles à 10 ng/μL (plus précisément entre 3 et 50 ng/μL) sans passer par une plaque mère de façon à conserver le maximum d'ADN en cryotube de solution mère et à limiter la durée du stockage en plaque.

D'après ces résultats, il n'est donc plus nécessaire de considérer le temps entre l'extraction et le génotypage comme une phase critique puisque nous venons d'affirmer que l'ADN se conserve très bien à -20°C en cryotube de solution mère. En revanche, il faut éviter de multiplier les cycles de congélation – décongélation qui dégradent l'ADN, c'est d'ailleurs pour cette raison que l'ADN est généralement aliquoté.

Bien évidemment dans une structure telle qu'un CRB, la conservation des échantillons à basse température fait tout de même partie des méthodes critiques dans la mesure où il s'agit de leur principale mission et que celle-ci dépend entièrement du bon fonctionnement du matériel utilisé. C'est pourquoi il est indispensable de mettre en place un suivi des températures et d'effectuer une surveillance étroite du système électrique, de la climatisation et des conteneurs.

Sinon, pour contrecarrer le problème des cycles de congélation – décongélation et alléger le système de conservation, des recherches ont abouti à une solution alternative qui permet de conserver les acides nucléiques à température ambiante. Après la mise en évidence des facteurs responsables de la dégradation de l'ADN stocké à température ambiante [61], un système de conservation a été mis au point par la société IMAGENE afin de protéger l'ADN des effets néfastes de l'eau et de l'oxygène. Il s'agit d'une technique novatrice d'encapsulation de l'ADN (et de l'ARN) purifié et déshydraté à l'aide d'un support en acier inoxydable, anhydre, anoxique et étanche (DNAshell). Cette technique a d'ailleurs été évaluée par une équipe chinoise qui confirme l'efficacité de la capsule [62]. Selon les dires de la société IMAGENE, « les capsules DNAshell apportent les avantages décisifs attendus par rapport aux méthodes conventionnelles de conservation par le froid, en termes de stabilité, de sécurité, de traçabilité, d'espace requis, de coûts de fonctionnement et de maintenance, de transport et de distribution ». Proposée aux biobanques comme une alternative à la congélation, cette méthode reste pour le moment très onéreuse et devra encore convaincre quant à l'utilisation « quotidienne » avant d'être adoptée par la communauté des CRB.

La mise au point et la mise en place du MOD de génotypage par l'étude de SNP impliquaient beaucoup d'aspects tels que la mise en place des locaux (détermination des zones), la technique de préparation de la P384 avec le choix du nombre d'échantillons et de SNP par plaque, les concentrations et critères de qualité de l'ADN pour la PCR et la méthode d'analyse des résultats. Tous ces aspects sont indispensables au bon déroulement de la PCR permettant le génotypage des échantillons.

Il est vrai que la délimitation des zones est importante mais pas toujours réalisable dans son intégralité. Concernant les flux, en biologie moléculaire il est important de ne pas revenir en arrière au risque de contaminer les différentes zones. Lorsque plusieurs zones sont situées dans la même pièce, il est conseillé de les répartir de manière chronologique avec une progression en sens unique. C'est une condition assez difficile à mettre en place dans un laboratoire où plusieurs activités sont pratiquées mais il faut savoir s'adapter et optimiser les locaux afin de garantir la réalisation des expériences dans les meilleures conditions possibles. Une réflexion plus poussée devra être réalisée dans l'avenir en fonction de l'évolution possible des locaux afin d'assurer une meilleure répartition des zones de manipulation pour garantir une gestion de flux plus efficace. Cela peut également apparaître comme un atout face à des utilisateurs potentiellement intéressés par une prestation de génotypage. Je pense que l'essentiel est de montrer que tout est mis en œuvre pour assurer une prestation de qualité, et cela commence par une organisation des locaux.

Concernant la technique de préparation de la plaque de PCR, dans notre cas ici, les PCR ont été réalisées uniquement en P384 car cela nous paraissait plus judicieux du fait du nombre important d'échantillons, du nombre de SNP et des volumes de réactifs nécessaires. Mais il faut savoir qu'un génotypage peut aussi être envisagé en P96 et notamment en mode FAST avec le Viiia7. Le mode FAST, à la différence du mode P96 standard, consomme moins de réactifs (du fait d'un volume de puits plus petit) et réalise une réaction de RT-PCR en trois fois moins de temps (40 min versus 2 heures). L'inconvénient étant que ce mode nécessite ses propres outils et consommables [63]. En comparaison avec la méthode P384 standard, la technique de préparation de la plaque serait identique. En revanche le temps de préparation pour une réaction serait bien inférieur mais le nombre d'échantillon analysés aussi. La limite majeure du mode FAST est selon moi le fait que le nombre d'échantillons analysés par plaque est au maximum égal à 96. Dans le cas de cohorte imposante, il est recommandé de privilégier un nombre important d'échantillons analysés en même temps pour favoriser la précision et la qualité de la discrimination allélique. L'identification des clusters est facilitée et plus précise, et les échantillons posant problème sont plus facilement identifiables. De plus, la reproductibilité intra-plaque et inter-plaque est renforcée. Les volumes de réactifs sont tout de même plus importants en mode P96 FAST mais du fait du temps gagné dans la préparation et lors de la réaction, plusieurs analyses peuvent être réalisées dans la même journée.

D'autre part, nous avons également souligné l'importance de valider les sondes SNP choisies. Dans cette étude, les tests préliminaires ont été réalisés sur des ADN autres que ceux à génotyper pour d'une part valider les conditions de PCR, et d'autre part vérifier la

performance des sondes SNP. Cependant, en premier lieu nous n'avons pas remis en cause la sonde SNP mais plutôt les échantillons (il s'agissait d'ADN extraits en 2005), et nous nous sommes rendu compte des réelles différences de comportement des sondes SNP qu'une fois le génotypage de la cohorte démarré (pour les rs11552708 et rs3803800). Effectivement, nous avons mis en évidence que malgré l'utilisation des mêmes fluorochromes (VIC et FAM), les différentes sondes SNP peuvent ne pas avoir forcément la même performance en terme d'intensité de fluorescence. Cela peut rendre difficile voire incohérente la discrimination allélique par le logiciel. Nous avons d'ailleurs tenté, pour le rs3803800 dont les intensités sont les plus faibles, une réaction en doublant les volumes de réactifs et d'échantillons mais tout en conservant les proportions en supposant que doubler la quantité de sondes (entre autre) doublerait l'intensité du signal. Cependant les résultats obtenus n'allaient pas dans ce sens. Il semblerait probable que le dysfonctionnement provienne du fluorochrome mais nous n'avons pas eu de retour du fabricant. Cela dit, nous avons tout de même adapté les conditions de PCR en augmentant le nombre de cycles et inclus également une contre analyse avec un autre logiciel ; ce qui a permis d'obtenir un résultat exploitable. Afin d'éviter ce genre d'obstacle, il faut obligatoirement prévoir une période de tests de validation de n'importe quelle sonde SNP, même dans le cas de sonde SNP déjà désignées et vérifiées et/ou validées par le fabricant. En effet, nous devons nous assurer que dans nos conditions préétablies de MOD, les sondes SNP sont performantes ou bien s'il est nécessaire soit d'adapter les conditions d'origine, soit de remettre en cause le lot de sondes. Pour cela, il suffit de réaliser des gammes de concentration d'ADN, et d'analyser les résultats de discrimination allélique et leur cohérence avec les signaux de fluorescence. L'idéal serait d'utiliser pour ces tests préliminaires des ADN dont le génotype est connu pour le SNP considéré. Cependant, ce type d'échantillon n'étant pas toujours à notre portée, la validation peut être faite sur d'autres échantillons d'ADN conformes (par exemple des exclus). De plus, cette étape de validation de sondes SNP pourrait permettre de s'affranchir d'un contrôle positif lors des réactions de génotypage notamment lorsque celui-ci n'est pas disponible. Egalement, la validation des sondes SNP permettrait d'identifier un couple ADN + sonde SNP fiable qui donnerait toujours le même génotype pour chaque analyse réalisée et que l'on qualifierait de référent. Il semble effectivement intéressant d'avoir un contrôle interne que l'on pourrait suivre afin de visualiser une éventuelle déviation de la technique en observant la répétabilité.

D'autre part, les différents tests pratiqués lors de la mise au point du MOD ont permis de définir les conditions minimum requises concernant l'ADN dans le but d'assurer l'obtention



d'un résultat de génotypage exploitable et fiable. De ce fait, l'échantillon d'ADN à analyser (qu'il soit extrait en interne ou fournis par l'extérieur) conditionné en tube doit avoir une concentration minimale de 50 ng/μl et un rapport de DO à 260/280 nm compris entre 1,7 et 2. Il est également recommandé de vérifier que le rapport d'absorbance 260/230 nm soit supérieur à 1,8. Pour un conditionnement en plaque, les ADN doivent être aliquotés préférentiellement en plaques 96 puits et leur concentration doit être comprise entre 3 et 50 ng/μL dans un volume minimal de 20 μL. Si possible, les plaques doivent être scellées avec des films thermocollants.

Concernant les sondes SNP, il est préférable que l'utilisateur nous les fournisse lui-même, de cette façon nous nous affranchissons de toutes responsabilités relatives à des problèmes liés aux sondes. Eventuellement, plus tard nous pourront envisager d'enrichir notre service de génotypage avec une prestation de design de sondes SNP.

Suite à l'analyse de tous les résultats et conditions de réalisation, un dossier de validation de méthode sera établi selon les critères du CRB HUEP-UPMC répondant aux exigences de la norme NF S96-900.

D'autre part, une fois validée, cette nouvelle technique sera intégrée à la cartographie des processus du CRB HUEP-UPMC. Il faudra donc définir des indicateurs afin d'effectuer un suivi permettant de statuer sur les performances et résultats de la méthode et de l'appareil utilisés. Par exemple, nous pourrions chiffrer le nombre d'échantillons génotypés par rapport au nombre d'échantillons analysés, le nombre de contrôles négatifs amplifiés (suggérant une contamination) et/ou le nombre de messages d'erreurs générés par l'automate. Un score est alors calculé permettant d'effectuer un constat sur la récurrence des éventuels soucis et envisager la mise en place d'actions correctives.

Après validation du MOD par le COPIL, celui-ci doit être mise en place tout d'abord en tant que nouvelle technique d'analyse en interne. La mise en place d'une nouvelle technique d'analyse au sein du CRB HUEP-UPMC implique systématiquement la rédaction de documents associés et la formation du personnel technique. Outre le MOD déjà cité, cette documentation comprend le MOD d'utilisation de l'automate Viia7 (Annexe 11), le MOD d'utilisation du scelleur de plaque semi-automatique (Annexe 12), les formulaires d'entretien et de maintenance du Viia7 (Annexe 15), l'inventaire des consommables relatifs à la PCR (Annexe 16), les feuilles d'enregistrements de dosages des plaques P96 (Annexe 13) ainsi que la feuille d'enregistrement support à la PCR (Annexe 14). Tous ces documents ont été créés par moi-même en respectant les normes qualités de gestion documentaire du CRB. Les

formulaire sont indispensables à la traçabilité de traitement des échantillons et d'utilisation des appareils.

D'autre part, la technique sera transmise aux techniciens par le biais d'un tutorat interne puis d'une évaluation à 3 mois comme le recommande la norme NF S96-900. Il est important que plusieurs techniciens soient habilités à réaliser cette technique avant de la proposer comme prestation. D'ailleurs le CRB HUEP-UPMC tient à mettre en avant l'interopérabilité de son personnel. Toutes ces démarches sont le début de la mise en place de la prestation en routine. En effet, si l'on propose ensuite cette prestation aux utilisateurs, la qualité et la traçabilité sont de rigueur.

Mais une prestation de qualité implique généralement la standardisation de la méthode afin de limiter la variabilité et de tendre vers la professionnalisation, une des exigences de la norme et un des objectifs stratégiques du CRB HUEP-UPMC. Dans une telle structure, bien que tout le personnel soit formé à la même technique, la standardisation passe très souvent par l'automatisation. L'extraction automatisée étant déjà pratiquée, les autres étapes automatisables concernent les mises en plaque et la préparation des plaques de PCR. Cette solution pourra être envisagée puisque le CRB possède un aliquoteur automatique (Epmotion, Eppendorf). Cependant, si l'on respecte la délimitation des zones, seules une des deux étapes entre la distribution des réactifs et la distribution des ADN sera possible avec l'automate. Et si l'automatisation des mises en plaque d'ADN est envisagée, la distribution des réactifs ne pourra pas être automatisée à moins d'investir dans un autre aliquoteur. De ce fait, une mise au point rigoureuse doit être menée pour évaluer si l'automatisation totale ou partielle de ces étapes peut réellement améliorer la technique déjà validée (gain de temps, de coût et d'erreur humaine ?). A priori, l'avantage premier de l'automatisation de la préparation des plaques serait de permettre de doubler le nombre d'échantillons à analyser par P384. En effet, une plaque P384 équivaut à 4P96 mais dans notre MOD nous avons décidé d'analyser que deux P96 dans une P384 pour les raisons exposées précédemment. Le nombre d'échantillons analysés par plaque pourrait ainsi passer de 192 (2P96) à 384 échantillons (4P96). Toutefois, même si la consommation en plaques multipuits et films serait réduite, l'automate exige des volumes de réactifs et d'échantillons plus importants. Egalement, l'analyse serait plus efficace et plus précise avec un nombre plus élevé d'échantillons par plaque. Enfin, la reproductibilité intra-plaque et inter-plaque serait d'avantage respectée. Mais tout cela implique que l'automate et la technique soient bien maîtrisés afin de garantir le bon déroulement du programme, et de parer aux éventuels problèmes.

Finalement, pour mener à bien cette prestation en routine, il faut établir des conditions de réalisation du génotypage selon les différents cas possibles. Tout d'abord, la prestation peut être incluse dès le début dans un projet où intervient le CRB et dans ce cas le CRB gère l'extraction d'ADN et le génotypage. D'autre part, la prestation de génotypage peut être proposée à des utilisateurs extérieurs fournissant les ADN à analyser.

Dans un premier temps, de manière générale, la prestation que l'on souhaite proposer n'a été validée que sur des ADN extraits à partir de sang. Toutefois, a priori il n'y a pas de raison particulière pour que des ADN issus d'autres tissus ne soient pas analysables s'ils respectent les conditions définies. Un bémol tout de même concernant la salive, car avec le recul que nous avons sur l'extraction d'ADN à partir de salive (que nous pratiquons quotidiennement), il nous semble judicieux de réaliser des tests afin de valider la méthode et les conditions de génotypage du fait de la possibilité d'extraire aussi de l'ADN non humain.

Ensuite, l'analyse des travaux réalisés permet de suggérer que dans le cas d'une prestation sur projet, l'ADN étant extrait au sein du CRB, le sang doit être prélevé sur EDTA et si nécessaire conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant extraction automatisée. La qualité de l'ADN est systématiquement contrôlée par mesure au spectrophotomètre juste après l'extraction (concentration, DO 260/280 nm et DO 260/230 nm). Pour éventuellement compléter ce contrôle qualité, il faudra évaluer si l'électrophorèse apporte une information supplémentaire qui renforcerait l'assurance d'un résultat de génotypage sûr. Une période de validation des sondes SNP sera imposée (environ une semaine). Les ADN seront directement aliquotés en plaque P96 à une concentration finale comprise entre 3 et 50 ng/ $\mu\text{L}$ . Les concentrations des plaques pourront être vérifiées au spectrophotomètre en cas de problème lors de la réaction de PCR (absence d'amplification notamment).

Pour les utilisateurs extérieurs, le fait de ne pas connaître les conditions d'extraction ni les paramètres de conservation du sang et des ADN n'empêche pas d'effectuer le génotypage. En revanche, les ADN fournis devront respecter la concentration minimum de 50 ng/ $\mu\text{L}$  pour un conditionnement en tube ou une concentration comprise entre 3 et 50 ng/ $\mu\text{L}$  pour un conditionnement en plaque, dans un volume minimal de 20 $\mu\text{L}$ . Les données des rapports de DO 260/280 nm et 260/230 nm mesurées par l'utilisateur nous seront transmises dans un fichier accompagnant les échantillons. Les solutions de sondes SNP et amorces seront également fournies.

La proposition d'une prestation doit aussi s'accompagner d'une tarification étudiée. Pour estimer le coût d'une telle prestation, j'ai calculé le montant que représentait le génotypage en

plaque 384 puits de notre cohorte de 1954 ADN pour un SNP en évaluant la consommation de consommables et réactifs utilisés (Annexe 17, Tableau I). A cela, il faut ajouter l'usure des appareils utilisés (amortissements), à savoir l'automate de RT-PCR, le scelleur de plaque, le spectrophotomètre, la station de travail et la base de données (Annexe 17, Tableau III). Enfin, dans une prestation, le temps du technicien est toujours pris en compte. Selon la manière dont est réalisé la prestation à ce stade, il faut compter 7 heures (réparties sur plusieurs jours) pour le génotypage de 192 échantillons (2P96), toutes étapes confondues (mise en plaque, dosages, préparation plaque, PCR, analyse et fichier résultats), soit 72 heures pour l'analyse de 1954 ADN (Annexe 17, Tableau II).

La tarification totale pour le génotypage de 1954 patients par la méthode des SNP s'élève donc à 13780 € HT pour un SNP.

Cette estimation donne une idée du prix de revient d'une réaction (7€ HT) lorsque les conditions demandées relatives aux échantillons sont respectées. Dans le cas contraire, une tarification à façon pourra être appliquée qui donnera suite à un accord sur la réalisation ou non de la prestation.

Pour se positionner, un exemple de coût est donné par la Plate-forme de génotypage de Clermont-Ferrand. En 2010, leur tarification d'un point de génotypage par SNP en TaqMan® (pour un minimum de 1500 points) hors amortissements était de 2€ HT. En ce qui nous concerne, le montant calculé hors amortissement revient à 3€ HT le point. En considérant une augmentation des tarifs de 5% par an, l'estimation réalisée est relativement proche des prix pratiqués pour une prestation de service en externe.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Au final, en confrontant les conditions définies à travers ce travail avec les pratiques actuelles du CRB HUEP-UPMC, des décisions vont être prises concernant la gestion des prélèvements sanguins et des échantillons d'ADN en interne en vue d'une analyse génotypique. Sachant que les prélèvements réceptionnés au CRB proviennent généralement d'études cliniques pouvant durer de 3 à 5 ans, les prélèvements sanguins seront prélevés sur EDTA et conservés à -80°C jusqu'à l'obtention d'un nombre suffisant de tubes pour la réalisation d'une extraction automatisée (16 échantillons). La conservation du sang à basse température n'est donc que de courte durée mais par précaution il a été décidé de les conserver à -80°C plutôt qu'à -20°C. Après l'extraction, les ADN sont contrôlés au spectrophotomètre et il est envisagé de mettre en place un contrôle de l'intégrité par électrophorèse. Pour une question de coût, les analyses au fluoromètre ne seront pas pratiquées sur l'ensemble des échantillons mais sur un nombre d'échantillons pris au hasard ou en fonction d'une périodicité à définir. De plus, ces tests pourront être pratiqués pour vérification des ADN en cas de besoin, à moins qu'ils ne soient exigés de manière systématique par l'investigateur du projet. Le conditionnement original des ADN extraits sera composé de deux aliquotes en cryotubes dits « solutions mères », et le stockage se fera à -20°C avec des lieux de stockages différents pour chaque aliquote. Au fur et à mesure des extractions, les ADN conformes seront aliquotés en plaque 96 puits à concentration fixe dans un volume multiple de la concentration d'utilisation. Lorsque l'ensemble des ADN de la cohorte sera obtenu et que les conditions de génotypage seront définies, les plaques 96 seront diluées à une concentration moyenne de 10 ng/μL. Ces plaques serviront ensuite pour la distribution des échantillons dans la plaque 384 puits pour la RT-PCR. Ces deux étapes, pour le moment réalisées manuellement, pourront être automatisées si cela représente un réel avantage.

A propos des décisions concernant les échantillons d'ADN provenant de l'extérieur, des tests de vérification de la conformité des ADN par rapport aux critères de qualité demandés seront réalisés au spectrophotomètre et au fluoromètre, mais seulement sur une partie des échantillons pris au hasard (10%) (concentration de la solution mère >50 ng/μL,  $1,7 < DO_{260/280 \text{ nm}} < 2$ ,  $DO_{260/230 \text{ nm}} > 1,8$ ) En cas de respect des conditions, le génotypage pourra être effectué au prix établi au départ. Dans le cas contraire, une tarification à façon pourra être envisagée d'un commun accord avec l'utilisateur.

La mission de génotypage de 1929 patients du projet FAST-MI 2005 aura permis de mettre au point cette nouvelle technique d'analyse par l'étude de SNP. Suite aux résultats obtenus, le CRB doit transmettre le fichier des génotypes à l'URC afin de faire le lien avec les données

cliniques du patient et tenter de mettre en évidence un effet du polymorphisme du gène APRIL sur la morbi-mortalité des patients atteints de CSA, un des objectifs secondaires de ce projet. De plus, la validation de la méthode d'analyse de SNP par RT-PCR en TaqMan® au CRB va permettre de l'envisager comme prestation de routine auprès des collaborateurs du CRB HUEP-UPMC. Elle pourra venir compléter l'activité déjà prise en charge par le CRB au sein des différents projets de recherche clinique. Par la suite, lorsque l'aspect routinier de la prestation sera maîtrisé, cette dernière pourra être proposée comme prestation de service aux utilisateurs.

Avec cette méthode et grâce à la miniaturisation des volumes de réactifs (utilisation des plaques 384 puits), les facteurs de réduction de coût ne sont pas négligeables par rapport aux autres techniques de génotypage. De plus, une fois la validation des sondes effectuée, le volume de données est faible et l'analyse des résultats est relativement simple. C'est pourquoi, en terme de délais, avec la méthode actuelle, il faut compter 3 semaines plus ou moins 2 semaines si la mise en plaque doit être réalisée, pour obtenir le génotypage de 2000 échantillons avec un SNP. Evidemment, pour se faire, et ce dans les meilleures conditions d'assurance d'un résultat fiable, les échantillons doivent respecter des critères qui ont été définis lors de cette phase de mise au point.

Toutefois, le choix de cette méthode s'avère être adapté à un nombre limité de marqueurs et de sujets (3000 sujets maximum et 100 SNP maximum). En effet, pour des approches de génétique d'association dont l'ambition vise à scanner le génome entier à la recherche de polymorphismes associés avec les phénotypes d'intérêt et où il est nécessaire de génotyper un très grand nombre de marqueurs, les récents progrès biotechnologiques tels que les NGS sont des compétiteurs sérieux pour les années à venir.

Après évaluation de la standardisation de la méthode actuelle, et dans l'optique de toujours enrichir notre activité et nos objectifs stratégiques, nous pourrions envisager d'étendre la méthode de génotypage à d'autres sources d'ADN comme la salive, à partir de laquelle nous pratiquons déjà des extractions d'ADN de façon automatisée. Cependant une mise au point serait également nécessaire car les quantités d'ADN sont plus faibles que dans le sang et la présence possible d'ADN d'origine non humaine pourrait fausser les résultats. Dans ce cas, l'amplification par PCR avec des amorces spécifiques d'une séquence humaine pourrait s'avérer un bon moyen de contrôler la présence d'ADN indésirable. Enfin, pour la prochaine cohorte prévue dans quelques mois (FAST-MI 2015), forts des observations et conclusions réalisées suite à ce travail, la pratique des extractions d'ADN sera envisagée de façon automatisée et préférentiellement sur sang frais afin de garantir les meilleurs rendements.

# **BIBLIOGRAPHIE**



1. OCDE, *Rapport annuel de l'OCDE 2001*. Éditions OCDE.
2. *Annuaire des Centres de Ressources Biologiques / Biobanques*. 2014 14 juin 2011; Available from: <http://annuaire.i3crb.fr/crb/annuaire.php>.
3. ISO. Available from: <http://www.iso.org/iso/fr/home.htm>.
4. Hofman, V., et al., [*Setting up indicators in biobanking: why and how?*]. *Ann Pathol*, 2012. **32**(2): p. 91-101.
5. Edwards, T., et al., *Biobanks containing clinical specimens: Defining characteristics, policies, and practices*. *Clin Biochem*, 2014. **47**(4-5): p. 245-51.
6. *Code de la santé publique - 2012*.
7. *Agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales ANRS*. Available from: <http://www.anrs.fr/>.
8. Deplanque, D., et al., [*Collection of human biological samples for scientific purposes. Why do current regulations need to be clarified?*]. *Therapie*, 2009. **64**(3): p. 215-24.
9. *3CR LE RÉSEAU POUR LES RESSOURCES BIOLOGIQUES*. Available from: <http://www.3cr-ressourcesbiologiques.com/>.
10. *BIOBANQUES*. 2015; Available from: <http://www.biobanques.eu/>.
11. Keeley, E.C., J.A. Boura, and C.L. Grines, *Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials*. *Lancet*, 2003. **361**(9351): p. 13-20.
12. Andersen, H.R., et al., *A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction*. *New England Journal of Medicine*, 2003. **349**(8): p. 733-742.
13. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. *Nature*, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
14. Cambien, F., et al., *Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction*. *Nature*, 1992. **359**(6396): p. 641-4.
15. Zhou, J., et al., *An association study between genetic polymorphism in the interleukin-6 receptor gene and coronary heart disease*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 504727.
16. Tambourin, P., « *Les grands instruments de la biologie moléculaire, prémices de la médecine de demain* ». La revue pour l'histoire du CNRS, 2005.
17. Vignal, A., et al., *A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics*. *Genet Sel Evol*, 2002. **34**(3): p. 275-305.
18. Genomes Project, C., et al., *A map of human genome variation from population-scale sequencing*. *Nature*, 2010. **467**(7319): p. 1061-73.
19. Collins, F.S., et al., *Construction of a general human chromosome jumping library, with application to cystic fibrosis*. *Science*, 1987. **235**(4792): p. 1046-9.
20. Warren, S.T., et al., *The fragile X site in somatic cell hybrids: an approach for molecular cloning of fragile sites*. *Science*, 1987. **237**(4813): p. 420-3.
21. Ostertag, E.M. and H.H. Kazazian, Jr., *Biology of mammalian L1 retrotransposons*. *Annu Rev Genet*, 2001. **35**: p. 501-38.
22. Nelson, K.A. and J.S. Witte, *Androgen receptor CAG repeats and prostate cancer*. *Am J Epidemiol*, 2002. **155**(10): p. 883-90.
23. *International HapMap project*. 29/09/2005; Available from: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.fr>.
24. Alhenc-Gelas M, A.M., Delahousse B et al, *La recherche des facteurs biologiques de risque établis de maladie thrombo-embolique veineuse : état des connaissances et conséquences pour la pratique en biologie clinique*. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 2009. **21**(n° spécial ): p. 12-39.
25. Eyre, S., et al., *High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis*. *Nat Genet*, 2012. **44**(12): p. 1336-40.
26. Tsoi, L.C., et al., *Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity*. *Nat Genet*, 2012. **44**(12): p. 1341-8.

27. Liu, J.Z., et al., *Dense fine-mapping study identifies new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis*. Nat Genet, 2012. **44**(10): p. 1137-41.
28. Julia, A., et al., *A genome-wide association study identifies a novel locus at 6q22.1 associated with ulcerative colitis*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(25): p. 6927-34.
29. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
30. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
31. Gibson, N.J., *The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis*. Clin Chim Acta, 2006. **363**(1-2): p. 32-47.
32. Lu, J.T., P.M. Campeau, and B.H. Lee, *Genotype-phenotype correlation--promiscuity in the era of next-generation sequencing*. N Engl J Med, 2014. **371**(7): p. 593-6.
33. Metzker, M.L., *Sequencing technologies - the next generation*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(1): p. 31-46.
34. Eurofins Scientific France. lundi 9 février 2015; Available from: <http://www.eurofins.fr/fr-fr/analyses/produits-alimentaires/ogm-et-genotypage.aspx>.
35. Doutremepuich, C., *[Legal implication of DNA profiling]*. Bull Acad Natl Med, 2012. **196**(6): p. 1117-29; discussion 1130.
36. Kim, S. and A. Misra, *SNP genotyping: technologies and biomedical applications*. Annu Rev Biomed Eng, 2007. **9**: p. 289-320.
37. Prosperi, M.C., et al., *Can multiple SNP testing in BRCA2 and BRCA1 female carriers be used to improve risk prediction models in conjunction with clinical assessment?* BMC Med Inform Decis Mak, 2014. **14**: p. 87.
38. Balabanski, L., et al., *Next-generation sequencing of and in breast cancer patients and control subjects*. Mol Clin Oncol, 2014. **2**(3): p. 435-439.
39. Thierry, A.R., et al., *Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA*. Nat Med, 2014. **20**(4): p. 430-5.
40. Su, L., et al., *Dynamic changes in serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) and its gene polymorphisms are associated with sepsis prognosis*. Inflammation, 2012. **35**(6): p. 1833-43.
41. Vecoli, C., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in cardiovascular disease*. Vitam Horm, 2014. **96**: p. 387-406.
42. Simon, T., et al., *Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events*. N Engl J Med, 2009. **360**(4): p. 363-75.
43. Mega, J.L., et al., *Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis*. JAMA, 2010. **304**(16): p. 1821-30.
44. Mega, J.L., et al., *Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis*. Lancet, 2010. **376**(9749): p. 1312-9.
45. Sandberg, W.J., et al., *The tumour necrosis factor superfamily ligand APRIL (TNFSF13) is released upon platelet activation and expressed in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2009. **102**(4): p. 704-10.
46. Ding, W., et al., *Serum sAPRIL: a potential tumor-associated biomarker to colorectal cancer*. Clin Biochem, 2013. **46**(15): p. 1590-4.
47. Daridon, C., P. Youinou, and J.O. Pers, *BAFF, APRIL, TWE-PRIL: who's who?* Autoimmun Rev, 2008. **7**(4): p. 267-71.
48. Zhao, J., et al., *The role of a proliferation-inducing ligand (APRIL) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Scand J Rheumatol, 2014. **43**(6): p. 462-9.
49. Koyama, T., et al., *A novel polymorphism of the human APRIL gene is associated with systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(8): p. 980-5.
50. Kawasaki, A., et al., *Role of APRIL (TNFSF13) polymorphisms in the susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(5): p. 776-82.

51. Lee, Y.H., et al., *APRIL polymorphism and systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(8): p. 1274-6.
52. Osman, W., et al., *Association of common variants in TNFRSF13B, TNFSF13, and ANXA3 with serum levels of non-albumin protein and immunoglobulin isotypes in Japanese*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e32683.
53. Yang, M., et al., *Genome-wide scan identifies variant in TNFSF13 associated with serum IgM in a healthy Chinese male population*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47990.
54. Bos, S.D., et al., *A genome-wide linkage scan reveals CD53 as an important regulator of innate TNF-alpha levels*. Eur J Hum Genet, 2010. **18**(8): p. 953-9.
55. Santé, H.A.d., *RECOMMANDATIONS DE BONNE PRATIQUE: CRYOPRÉSERVATION DE TISSUS, CELLULES ET LIQUIDES BIOLOGIQUES ISSUS DU SOIN* 2010.
56. Madisen, L., et al., *DNA banking: the effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA*. Am J Med Genet, 1987. **27**(2): p. 379-90.
57. Udtha, M., et al., *The protection and stabilization of whole blood at room temperature*. Biopreserv Biobank, 2014. **12**(5): p. 332-6.
58. Halsall, A., et al., *The quality of DNA extracted from liquid or dried blood is not adversely affected by storage at 4 degrees C for up to 24 h*. Int J Epidemiol, 2008. **37** Suppl 1: p. i7-10.
59. Lahiri, D.K. and B. Schnabel, *DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl<sub>2</sub>, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality*. Biochem Genet, 1993. **31**(7-8): p. 321-8.
60. Lee, P.Y., et al., *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments*. J Vis Exp, 2012(62).
61. Bonnet, J., et al., *Chain and conformation stability of solid-state DNA: implications for room temperature storage*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(5): p. 1531-46.
62. Liu, X., et al., *Evaluation of DNA/RNAs shells for room temperature nucleic acids storage*. Biopreserv Biobank, 2015. **13**(1): p. 49-55.
63. ginab@LIFE, *Real-time PCR : Fast versus Standard Mode?* 2014.

# ANNEXES

<b>Annexe 1 : Exemple de formulaire de déclaration ANSM : mise en collection dans le cadre d'une RBM.</b>	<b>- 96 -</b>
<b>Annexe 2 : Autorisation CNIL N°04-1244 (Projet FAST-MI 2005)</b>	<b>- 97 -</b>
<b>Annexe 3 : Avis de prise en compte du CPP</b>	<b>- 98 -</b>
<b>Annexe 4 : Formulaire d'information aux patients et consentement</b>	<b>- 98 -</b>
<b>Annexe 4bis : Formulaire d'information à un membre de la famille ou à la personne de confiance et confirmation du consentement</b>	<b>- 101 -</b>
<b>Annexe 5 : Plaquettes informatives pour les prélèvements sanguins</b>	<b>- 103 -</b>
<b>Annexe 6 : Feuille de route des prélèvements</b>	<b>- 104 -</b>
<b>Annexe 7 : MOD d'extraction d'ADN sur Autopure LS</b>	<b>- 105 -</b>
<b>Annexe 8 : MOD d'extraction manuelle d'ADN</b>	<b>- 106 -</b>
<b>Annexe 9 : MOD de dosage des AN</b>	<b>- 123 -</b>
<b>Annexe 10 : MOD de génotypage par l'étude de SNP en RT-PCR</b>	<b>- 129 -</b>
<b>Annexe 11 : MOD d'utilisation du ViiA 7</b>	<b>- 137 -</b>
<b>Annexe 12 : MOD d'utilisation du scelleur de plaque</b>	<b>- 148 -</b>
<b>Annexe 13 : Feuille d'enregistrement de dosage des ADN en plaque 96 puits</b>	<b>- 163 -</b>
<b>Annexe 14 : Feuille d'enregistrement d'un RUN de génotypage</b>	<b>- 169 -</b>
<b>Annexe 15 : Formulaire d'entretien du ViiA7</b>	<b>- 170 -</b>
<b>Annexe 16 : Inventaire des consommables de biologie moléculaire</b>	<b>- 171 -</b>
<b>Annexe 17 : Estimation de coût du génotypage de 1954 ADN (1 SNP en P384)</b>	<b>- 172 -</b>

## Annexe 1 : Exemple de formulaire de déclaration ANSM : mise en collection dans le cadre d'une RBM.



### Formulaire 8

#### **Formulaire de déclaration d'une collection d'échantillons biologiques humains au cours d'une recherche biomédicale portant sur un dispositif médical/ dispositif médical de diagnostic in vitro**

En cas de constitution de plusieurs collections d'échantillons biologiques dans le cadre d'une recherche biomédicale, il appartient au demandeur, le cas échéant, de dupliquer les sections appropriées du formulaire.

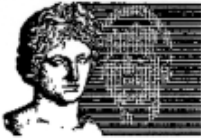
<b>Titre complet de l'essai clinique :</b>	
<b>Numéro d'enregistrement auprès de l'ANSM :</b>	
<b>Promoteur de l'essai clinique :</b>	
<b>Identification de l'organisme assurant la constitution de la collection</b>	
Organisme :	
Adresse :	
Numéro de téléphone :	
Numéro de télécopie :	
<b>Identification de la personne responsable de la collection au sein de cet organisme</b>	
Nom :	
Prénom :	
Fonction :	
Numéro de téléphone :	
Numéro de télécopie :	
Mél :	
<b>Nombre de collections :</b>	
<b>Nature des échantillons biologiques :</b>	
<b>Nom et adresse de chacun des lieux de conservation de la collection :</b>	
<b>Objectif(s) de constitution de la collection :</b>	
<b>Devenir envisagé de la collection à la fin de l'essai clinique :</b>	
<b>SIGNATURE</b>	
Par la présente, j'atteste que les informations fournies ci-dessus sont exactes.	
Nom :	
Prénom :	
Fonction :	
<b>Date :</b>	<b>Signature :</b>

Annexe 2 : Autorisation CNIL N°04-1244 (Projet FAST-MI 2005)

4. JAN. 2008 14:10

SOCIETE CARDIOLOGIE

N° 478 P. 2



Commission Nationale  
de l'Informatique et des Libertés

**REÇU**  
le 22 JUL. 2004  
Répondu le .....

PROFESSEUR NICOLAS DANCHIN  
SECRETAIRE GENERAL  
STE FRANCAISE DE CARDIOLOGIE  
15 RUE CELS  
75014 PARIS

N/Réf. : SV/JB/EM/AR041244

**DEMANDE D'AUTORISATION N° 903394 - AUTORISATION N° 04-1244**

**A rappeler dans toute correspondance,  
notamment en cas de modification ou  
de suppression du traitement.**

Paris, le 16 JUL. 2004

Vous avez saisi le 14/10/2003 la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés d'une demande d'autorisation relative à un traitement automatisé d'informations nominatives ayant pour finalité

**RECUEIL D'INFORMATIONS PERMANENT SUR LES SYNDROMES  
CORONAIRES AIGUS**  
(accès aux causes médicales de décès)

Conformément aux dispositions de l'article 40.2, dernier alinéa de la loi du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, et après réception de vos compléments, l'autorisation de la CNIL est acquise.

Toutefois, vous n'êtes pas autorisé à utiliser le numéro de sécurité sociale pour la constitution de votre base de données.

Sophie VULLIET-TAVERNIER  
Directeur des Affaires Juridiques

**Jeanne BOSSI**  
Chef de la Division  
des Affaires Publiques et Sociales  
Chef de ...  
des Affaires Publiques et Sociales

Jany. Narbonne  
- 28.69 -



### Annexe 3 : Avis de prise en compte du CPP

**COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES**  
**ILE DE FRANCE V**

Hôpital Saim-Antoine - 164 rue du Faubourg Saint-Antoine - 75012 PARIS

Président :  
V.G. LEVY  
Vice-Président :  
C. GRICOURT  
Secrétaire :  
J.L. PRUGNAUD  
F. BERGIER DESCOMBES  
Trésorier :  
S. FOUQUERAY  
Trésorier adjoint :  
G. ETIENNE

Téléphone: (33)01.49.28.20.25  
Télécopie: (33)01.49.28.20.48

Mme le Dr Tabassome SIMON Département de  
Pharmacologie Faculté de Médecine Paris VI  
Hôpital Saint-Antoine  
27, rue de Chaligny 75012 PARIS

Paris, le 7 juin 2005

Ma chère Confrère,

Le CCPPRB de Paris Saint-Antoine dans sa séance du 7 juin 2005 a pris connaissance du projet de recherche intitulé "Registre Français des syndromes coronaires aigus avec ou sans sus-décalage du segment ST (étude Fast-MI)".

Ce projet consiste à apprécier les pratiques de prises en charge des SCA dans le "monde réel" et de mesurer leur impact sur le pronostic à court terme des patients admis en unité de soins intensifs pour un syndrome coronaire aigu (SCA). Le critère de jugement principal est la mortalité durant l'hospitalisation.

Cette étude observationnelle ne modifie en rien les pratiques thérapeutiques habituelles. Aucune visite particulière n'est prévue dans le cadre de l'étude. Le seul acte lié à l'étude est la soustraction, au cours de prélèvement sanguin habituel effectué lors de la prise en charge du patient, d'une quantité additionnelle faible (15 à 50 ml) selon les centres) destinée à la constitution d'une DNAtèque (15 ml) et d'une sérothèque (35 ml).

Comme vous le savez, la mission officielle du CCPPRB est de donner des avis favorables ou défavorables sur des protocoles qui leur sont soumis et il est de la seule responsabilité d'un chercheur de soumettre ou non un protocole au CCPPRB. Ce n'est donc pas l'avis officiel d'un Comité que je transmets, mais l'impression générale des membres a été que votre recherche n'entre pas dans le cadre de la loi Hurler.

Veillez croire, ma chère Confrère, à l'assurance de mes sentiments les meilleurs.

V.G. LEVY  
Président du CCPPRB

Membres Observateurs  
P. BENDAN  
J.J. BOFFA  
J. BOUILLÉ  
G. DEVINT  
O. OLYMPIE  
V.G. LEVY  
J.L. PRUGNAUD  
A. ROUSSEAU

Membres Correspondants  
O. ADLERA  
S. RINDENNE

Membres Correspondants  
F. BERGIER DESCOMBES  
G. ETIENNE

Membres Correspondants  
S. OUBOULOY  
(à désigner)

Membres Correspondants  
N. LEROUX  
J. POUILLARD

Membres Correspondants  
A. KURZ  
F. LEFEVRE

Membres Correspondants  
(à désigner)

Membres Correspondants  
M. BENA  
M. COUST  
C. GRICOURT  
L. LACHARPAGNE

Membres Correspondants  
C. BUIRET  
A. BUISSON  
M. IMPELLIZZIERI  
A. OLYMPIE



## Annexe 4 : Formulaire d'information aux patients et consentement

### Formulaire d'information aux patients

#### Registre Français des syndromes coronaires Aigus avec ou sans sus-décalage du segment ST (FAST-MI)

Madame, Monsieur,

L'objectif de ce document est de vous fournir toutes les informations qui vous permettront de comprendre le but de cette étude, ainsi que ses contraintes et l'intérêt qu'elle peut présenter pour vous. N'hésitez pas à demander à votre médecin l'explication des mots ou expressions que vous ne comprendriez pas.

Vous venez d'être hospitalisé dans une unité de soins intensifs pour une maladie de votre cœur. Votre médecin, le Docteur ..... vous propose de participer à une enquête épidémiologique appelée FAST-MI dont l'objectif est de recenser le nombre de patients qui sont hospitalisés en France comme vous pour la même maladie, et d'étudier la manière dont ils sont traités.

Cette enquête n'a pas d'influence sur la prescription médicale et la prise en charge de votre maladie au cours de votre hospitalisation ni dans le suivi à plus long terme. Votre médecin est libre de modifier ou non les traitements que vous recevez. Aucune visite particulière n'est exigée dans le cadre de cette étude. Après la sortie de l'hôpital et si vous êtes d'accord, vous serez contacté annuellement par un médecin pour avoir des nouvelles de votre santé.

Si vous acceptez de participer à cette enquête, une quantité additionnelle de 60 ml au maximum de sang sera prélevée, au cours du prélèvement sanguin que l'on effectue dans le cadre habituel des soins, lors de votre admission dans le service des unités de soins intensifs. Cet échantillon sanguin contient les éléments permettant de caractériser un certain nombre de gènes ou de marqueurs biologiques qui peuvent être en rapport avec votre maladie. Parce que les gènes de chacun sont différents, l'information scientifique recueillie, ainsi que celle obtenue chez les autres patients participant à cette étude, pourra aider les chercheurs à mieux comprendre votre maladie. Il ne s'agit en aucun cas de votre identification génétique complète. Préalablement à l'analyse génétique de l'échantillon, la possibilité de relier la numérotation du tube avec votre identité sera supprimée. Cela signifie que votre identité ne pourra plus être reliée ou associée à l'information génétique obtenue à partir de votre échantillon sanguin et ne pourra jamais être révélée à personne. En conséquence il ne sera pas possible de communiquer à vous ni à personne d'autre les résultats des tests génétiques pratiqués sur votre échantillon.

Cette enquête est effectuée conformément à la législation française. Tous les résultats obtenus dans cette recherche resteront confidentiels, en accord avec les règles de la loi du 1<sup>er</sup> juillet 1994 relative au traitement automatisé des données de santé. Vous avez bien noté que votre droit d'accès et de rectification prévu conformément à la loi Informatique et Libertés (article 40 de la LOI 78.17 en date du 6 Janvier 1978 modifiée)

pourra s'exercer à tout moment auprès du médecin qui vous suit dans le cadre de cette étude.

### CONSENTEMENT DE PARTICIPATION

#### **Registre Français des syndromes coronaires Aigus avec ou sans sus-décalage du segment ST : FAST-MI**

Le Docteur ..... m'a proposé de participer à l'enquête sus citée. J'ai pris connaissance des informations ci-dessus et les ai parfaitement comprises. Il m'a été laissé le temps et le loisir de poser toutes les questions que je souhaitais au sujet de l'enquête, et une réponse a été fournie à toutes mes questions. La teneur et la signification de ces informations m'ont été expliquées avec précision. Il m'a été précisé que je suis libre d'accepter ou de refuser cette enquête. Cela ne change en rien mes relations avec mon médecin pour mon traitement et mon suivi médical.

**J'accepte librement de participer à cette enquête dans les conditions précisées dans ce document.**

Mon consentement ne décharge pas les médecins de leurs responsabilités. Je conserve tous mes droits garantis par la Loi. J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche, puissent faire l'objet d'un traitement informatisé. J'ai bien noté que le droit d'accès et de rectification prévu par la Loi 'Informatique et Libertés' (article 40) s'exerce à tout moment. Ces données qui me concernent resteront **STRICTEMENT CONFIDENTIELLES**. Je pourrai, à tout moment, demander toute information complémentaire au Docteur ..... . J'ai bien noté qu'il me sera remis un exemplaire du présent formulaire de consentement signé.

_____	_____	
Nom / prénom du patient en lettres capitales	Signature du patient :	Date
_____	_____	
Nom / prénom du médecin en lettres capitales	Signature du médecin	Date

## Annexe 4bis : Formulaire d'information à un membre de la famille ou à la personne de confiance et confirmation du consentement

### Formulaire d'information à un membre de la famille ou à la personne de confiance désignée par le patient

#### Registre Français des syndromes coronaires Aigus avec ou sans sus-décalage du segment ST (FAST-MI)

Madame, Monsieur,

L'objectif de ce document est de vous fournir toutes les informations qui vous permettront de comprendre le but de cette étude, ainsi que ses contraintes et l'intérêt qu'elle peut présenter pour la personne de votre famille qui a été hospitalisée. N'hésitez pas à demander au médecin l'explication des mots ou expressions que vous ne comprendriez pas.

Un membre de votre famille ou celui pour lequel vous avez été désigné comme étant la personne de confiance vient d'être hospitalisé dans une unité de soins intensifs pour une maladie de son cœur. Son médecin, le Docteur ..... lui propose de participer à une enquête épidémiologique appelée FAST-MI dont l'objectif est de recenser le nombre de patients qui sont hospitalisés en France comme lui pour la même maladie, et d'étudier la manière dont ils sont traités.

Comme son état de santé actuel ne permet pas de demander son consentement, votre consentement est demandé. Le consentement du patient lui sera demandé dès que son état le permettra. En cas de refus, les données le concernant ne pourront être utilisées pour cette enquête.

Cette enquête n'a pas d'influence sur la prescription médicale et la prise en charge de la maladie du patient au cours de son hospitalisation ni dans le suivi à plus long terme. Son médecin est libre de modifier ou non les traitements qu'il reçoit. Aucune visite particulière n'est exigée dans le cadre de cette étude. Après la sortie de l'hôpital et s'il est d'accord, il sera contacté annuellement par un médecin pour avoir de ses nouvelles.

En cas de participation à cette enquête, une quantité additionnelle de 60 ml de sang sera prélevée, au cours du prélèvement sanguin que l'on effectue dans le cadre habituel des soins, lors de son admission dans le service des unités de soins intensifs. Cet échantillon sanguin contient les éléments permettant de caractériser un certain nombre de gènes ou de marqueurs biologiques qui peuvent être en rapport avec sa maladie. Il ne s'agit en aucun cas de son identification génétique complète. Parce que les gènes de chacun sont différents, l'information scientifique recueillie, ainsi que celle obtenue chez les autres patients participant à cette étude, pourra aider les chercheurs à mieux comprendre sa maladie. Préalablement à l'analyse génétique de l'échantillon, la possibilité de relier la numérotation du tube avec son identité sera supprimée. Cela signifie que son identité ne pourra plus être reliée ou associée à l'information génétique obtenue à partir de son échantillon sanguin et ne pourra jamais être révélée à personne. En conséquence il ne

sera pas possible de lui communiquer ni à personne d'autre les résultats des tests génétiques pratiqués sur son échantillon.

Cette enquête est effectuée conformément à la législation française. Tous les résultats obtenus dans cette recherche resteront confidentiels, en accord avec les règles de la loi du 1<sup>er</sup> juillet 1994 relative au traitement automatisé des données de santé. Vous avez bien noté que son droit d'accès et de rectification prévu conformément à la loi Informatique et Libertés (article 40 de la LOI 78.17 en date du 6 Janvier 1978 modifiée) pourra s'exercer à tout moment auprès du médecin qui le suit dans le cadre de cette étude.

---

Nom / prénom de la personne de confiance  
(en lettres capitales)

---

Signature du patient :

Date

### **CONFIRMATION DU CONSENTEMENT DE PARTICIPATION**

**Registre Français des syndromes coronaires Aigus avec ou sans sus-décalage du segment**

#### **ST : FAST-MI**

Le Docteur ..... m'a proposé de participer à l'enquête sus citée. J'ai pris connaissance des informations ci-dessus et les ai parfaitement comprises. Il m'a été laissé le temps et le loisir de poser toutes les questions que je souhaitais au sujet de l'enquête, et une réponse a été fournie à toutes mes questions. La teneur et la signification de ces informations m'ont été expliquées avec précision. Il m'a été précisé que je suis libre d'accepter ou de refuser cette enquête. Cela ne change en rien mes relations avec mon médecin pour mon traitement et mon suivi médical.

**J'accepte librement de participer à cette enquête dans les conditions précisées dans ce document.**

Mon consentement ne décharge pas les médecins de leurs responsabilités. Je conserve tous mes droits garantis par la Loi. J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche, puissent faire l'objet d'un traitement informatisé. J'ai bien noté que le droit d'accès et de rectification prévu par la Loi 'Informatique et Libertés' (article 40) s'exerce à tout moment. Ces données qui me concernent resteront **STRICTEMENT CONFIDENTIELLES**. Je pourrai, à tout moment, demander toute information complémentaire au Docteur ..... J'ai bien noté qu'il me sera remis un exemplaire du présent formulaire de consentement signé.

---

Nom / prénom du patient en lettres capitales

---

Signature du patient :

Date

---

Nom / prénom du médecin en lettres capitales

---

Signature du médecin

Date

## Annexe 5 : Plaquettes informatives pour les prélèvements sanguins

### ➤ Identification des additifs

	<b>Z / CAT</b> Sec (verre) ou CAT (PET)		<b>9NC</b> Citrate 1/9
	<b>SST</b> Activateur de coagulation + séparateur de serum		<b>4NC</b> Citrate 1/4
	Thrombine		<b>K2E</b> ou <b>K3E</b> EDTA K2 ou EDTA K3
	<b>LH</b> Heparine de lithium		<b>CAT</b> ou <b>K2E</b> Eléments trace. CAT ou EDTA K2 (PET)
	<b>NH</b> Heparine de sodium		<b>FX</b> Fluorure de sodium / Oxalate de potassium <b>NaF/Na<sub>2</sub></b> Fluorure de sodium / EDTA de sodium
	<b>LH PST</b> Heparine de lithium + séparateur		<b>LH</b> ou <b>L Iodoacétate</b> Heparine de lithium + Iodoacétate de lithium
	Aprotinine / EDTA K3		<b>ACD</b> Acide citrique, Citrate, Dextrose

### ➤ Recommandations pour le prélèvement sanguin

**Ordre de prélèvement** Recommandations CLSI (NCCLS), Edic, 2007, Doc. H3-A6 et GEHT 2007 ([www.geht.org](http://www.geht.org))

**AVEC UNE AIGUILLE (ponction franche)**



Autres tubes : ACD, VS, Aprotinine et tube Thrombine (toujours en dernier)

---

**AVEC UNE UNITÉ A AILETTES**

• Avec hémoculture



Autres tubes : ACD, VS, Aprotinine et tube Thrombine (toujours en dernier)

• Sans hémoculture



Autres tubes : ACD, VS, Aprotinine et tube Thrombine (toujours en dernier)


• Veiller au bon remplissage des tubes.  
 • Il est recommandé d'**homogénéiser** le tube dès le retrait du corps de prélèvement, par **plusieurs retournements lents**.  
 • Identifier les tubes.  
 • Veiller à respecter les conditions recommandées de prélèvement et de transport.







## Annexe 7 : MOD d'extraction d'ADN sur Autopure LS

	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

## I. ETAPES DU MODE OPERATOIRE :

### 1. MATERIEL NECESSAIRE

MATERIEL	EMPLACEMENT	SPECIFICITE
Protections individuelles	Meuble « Hygiene » laboratoire Pièce 1207	Gants, blouse, lunettes, <i>lingettes RNASE free</i>
Congélateur -20°C	Selon protocole	Conservation de l'ADN
CRB Autopure LS®01	pièce 1207a	Extraction de l'ADN
Etuve	Laboratoire Pièce 1207b	
Bain-marie	Laboratoire Pièce 1207c	
Cryotubes GREINER 2mL	Laboratoire Pièce 1207c	Réf DUTSCHER123 263
Portoir	Pièce 1207c	
Agitateurs	Pièces 1207b, 1207c	Orbital ou rotatif
Cônes à filtre 100-1000µL	Laboratoire Pièce 1207c	
Qubes	Pièce 1207a	QIAGEN
Kit puregene® Autopure LS®		QIAGEN

### 2. GENERALITES

L'appareil doit impérativement être allumé durant la semaine (présence de personnel) et éteint le week-end.

**Pour toute opération (runs, maintenances) le personnel doit être doté de gants de protection.**

Le bouton d'alimentation se trouve au dos de l'appareil.

Avant le lancement d'un run, s'assurer que les maintenances journalière, hebdomadaire ou mensuelles ont été faites (Cf. chapitre maintenances et la feuille d'enregistrement des maintenances accrochée à l'appareil). Dans le cas contraire, les réaliser.

Le sang pour extraction d'ADN doit être prélevé préférentiellement sur tube EDTA.

Le sang frais peut être conservé 24h à T°C ambiante et moins de 5 jours à 4°C.

Le sang congelé doit être à -80°C.

La salive en bain de bouche peut être conservée 3 semaines à 4°C.

**Tout ce qui est conservé différemment est considéré comme étant compromis.**

N° de protocole	Quantité d'échantillon possible (mL)
N°1 = Fresch whole blood	1-5mL /4-7mL/5-10mL ==> 35µg/mL de sang total extrait.
N°2 = Frozen whole blood	
N°3 = Compromised whole blood	
N°4= Buffy coat	
N°5 = Cell Lysates (Cell Lysate prep/Comp. Cell Lysate prep/Cell Lysate Finish/cell Lysate finish increased spin)	Volume éch.+vol.cell lysis buffer =soit 1mL (si éch.< 1mL) ; ou 5mL (si 1<éch<5) ;ou 10mL(si 5<éch<10) .Utilisé pour le kit Oragene (5mL) ADN salivaire ou sang compromis à très compromis pré traité par la Protéinase K.
N°6 = Buccal cells	10 ml dans du bain de bouche
N°7 = compromised whole Blood increased spin	1-5mL/5-10mL ==> 35µg/mL de sang total extrait.
N°8 = 2PCompromised whole blood	


Date de création : 06/09/2010

Visa rédacteur : V.Jodon

Date de révision : 25/11/2013

Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER

1/17

	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

### 3. AVANT CHAQUE RUN

Vérifier :

- Qu'il n'y a pas trop de condensation dans la centrifugeuse, et essayer si nécessaire avec du papier essuie-main.
- Que le niveau des réactifs est compatible avec le lancement d'un run. Sinon, procéder au changement de réactifs si la quantité est trop faible. (Cf. changement des réactifs).
- Que le niveau de la poubelle est correct, et ne nécessite pas le changement de bidon.
- Que le plan de travail de l'Autopure, n'est pas souillé. Nettoyer avec un essuie-main imbibé de « surface'safe » ou de désinfectant « Conflit ».

### 4. PREPARATION DU RUN

- Dans le classeur CRB-LABO CL1, prendre une feuille d'extraction vierge « Extraction d'ADN sur Autopure® ». Remplir la feuille (ne pas oublier, de noter le numéro de Rack, et le nom du technicien).

- Noter le numéro de protocole :

N°1 = Fresh whole blood

N°5 = Cell lysates

N°2 = Frozen whole blood

N°6 = Buccal cells

N°3 = Compromised whole blood

N°7 = Compromised whole blood increased spin

N°4 = Buffy coat

N°8 = 2PCompromised whole blood

- Les volumes d'échantillons possibles sont notés dans le tableau des généralités ci-dessus.

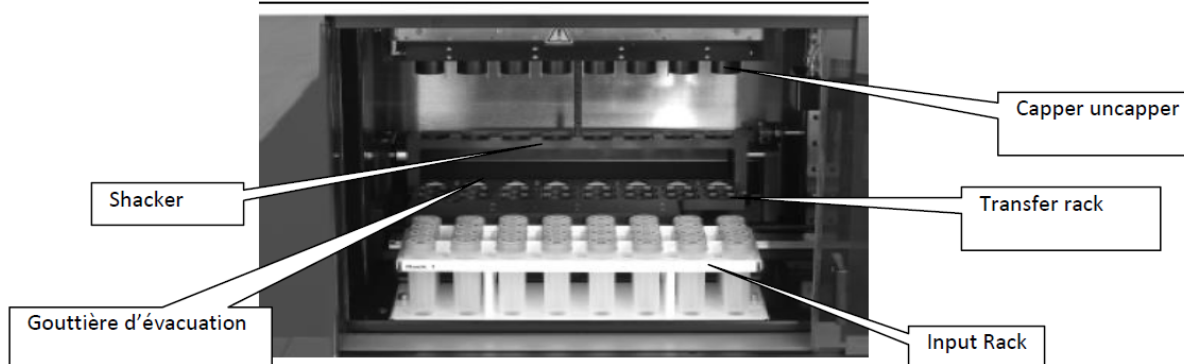
- Le volume d'élution possible est de 50µL à 6000µL.

**RQ : en cas de sang compromis ou très compromis, il est possible de mettre 66.5µL (protocole 1-5mL) ou 133µL de glycogène (protocole 5-10 mL) dans les Output Qubes, avant de démarrer le run. Si les tubes de sang sont déjà identifiés via un code barre, utiliser le code barre pour programmer le run !**

- Les quantités attendues sont indiquées dans le tableau des généralités

- Remplir les Qubes roses avec le volume d'échantillon requis pour le lancement du run.

Remarque : les quantités d'échantillon par protocoles sont bornées, ex : pour le protocole 1-5 mL il est totalement exclu de mettre plus de 5mL (sinon, l'appareil se met en erreur, et se met en PAUSE)



Date de création : 06/09/2010

Visa rédacteur : V.Jodon

Date de révision : 25/11/2013

Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER

2/17

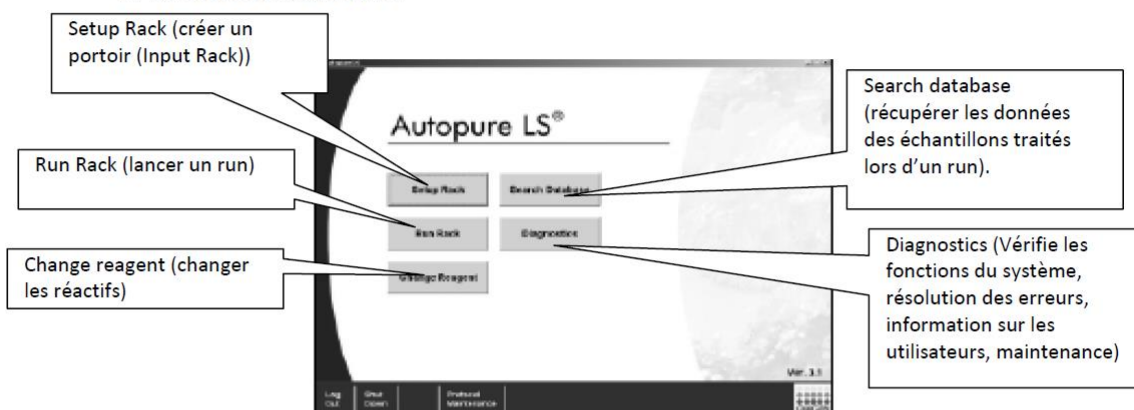


	<p>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</p>	<p>MOD-15-V3</p>
---	---	------------------

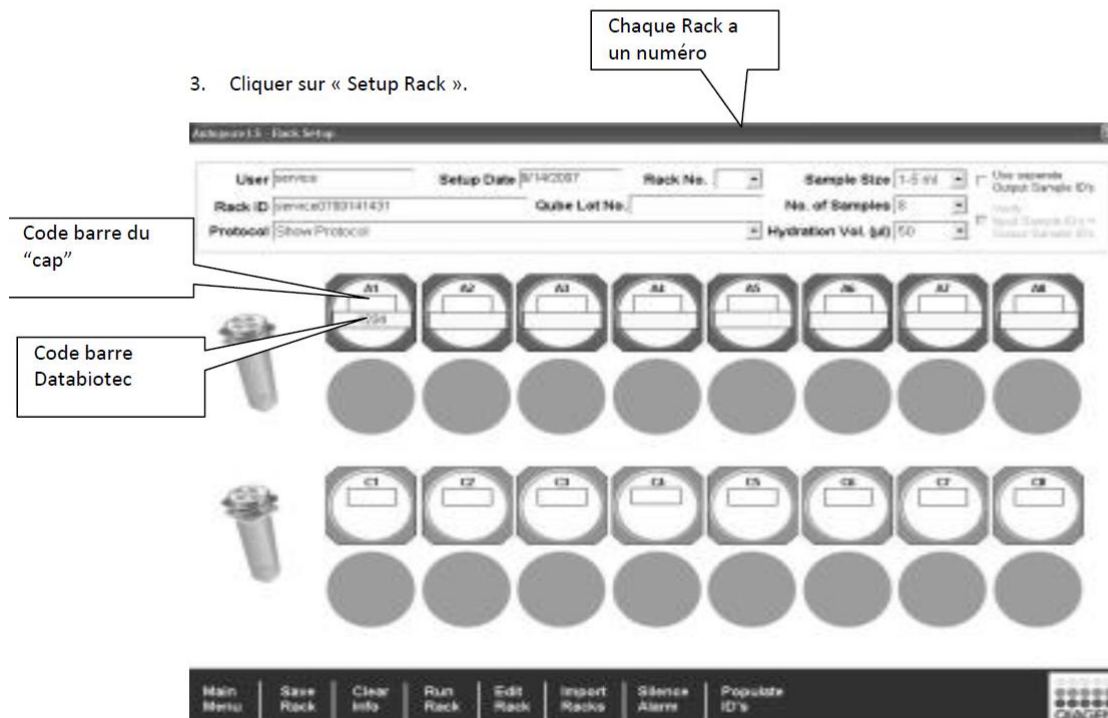
### 5. LANCEMENT DU RUN

Cliquer sur l'icône « Autopure LS » se trouvant sur le bureau de l'ordinateur de l'appareil.

1. Entrer le login/ mot de passe
2. La fenêtre suivante s'ouvre :




3. Cliquer sur « Setup Rack ».



**Remarque :** On peut toujours éditer un rack tant qu'il n'est pas lancé cette fonction permet de modifier un rack si vous avez constaté une erreur après qu'il soit sauvé (n° de qube..)

<p>Date de création : 06/09/2010 Visa rédacteur : V.Jodon</p>	<p>Date de révision : 25/11/2013 Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER 3/17</p>
---	--

	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

L'ID du rack est par défaut : « User-date-heure, », Mais cet ID doit être modifié par :

« User-Date-Etude-Run X » (Run X = numéro de run dans la journée pas plus de 6 runs).

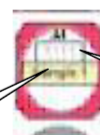
4. Prendre la douchette, et renseigner le numéro de lot de Qubes.
5. Sélectionner le protocole à utiliser. Sélectionner le « simple size » adéquat, en fonction du volume de départ dans les Qubes roses.
6. Sélectionner le volume d'hydratation de l'ADN ce volume est déterminé dans la fiche technique résumé des études en cours ».

7. Doucher les codes barre pour chaque tube. (si cela est possible)

Sinon rentrer le n° d'échantillon sous la forme suivante :

4 premières lettres ETUDE--n° Patient

En premier le  
code barre  
databiotec



En second, le  
code barre du  
« cap ».

8. Cliquer sur « save rack ».

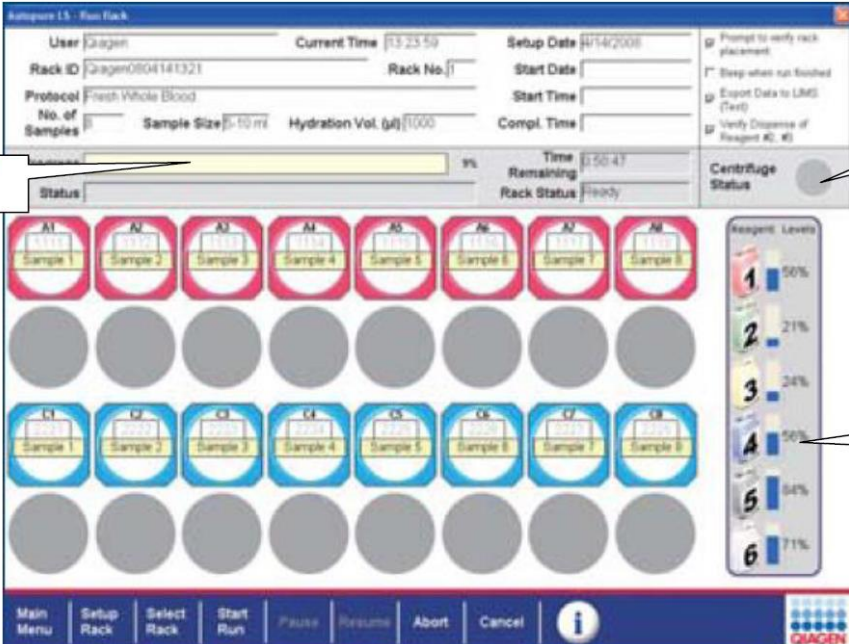
A cet instant, il est possible de retourner à « main menu » puis « setup rack » afin d'enregistrer un second rack, ou plusieurs.

9. cliquer sur « run rack » une fenêtre s'ouvre pour pouvoir sélectionner le rack à lancer.
10. Une fois sélectionné, déposer le rack dans l'appareil, cliquer sur « OK » un message apparait : « vérifier que les tubes se trouvent bien en A » vérifier et fermer la porte.
11. **IMPORTANT : il est interdit pendant le run d'ouvrir la porte coulissante bleue, ou d'ouvrir la porte pour la centrifugeuse, cela entraînant l'arrêt complet du run en cours.**
12. Lancer le run en cliquant sur « start run »,

**Remarque :** Lors des enregistrements des runs « Cell lysate prep » pré-enregistrer le même rack en « cell lysate finish » puisque ce sera le même ! Pour cela, une fois que le rack « prep » est enregistré, refaire la manip dans la foulée. Modifier le « ID » en mettant « User-Date-Etude- CF RunX » ( CF pour Cell finish) à la fin et le n° de run , et sauver.

Date de création : 06/09/2010 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : 25/11/2013 Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER 4/17
---	---

	<p>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</p>	<p>MOD-15-V3</p>
---	---	------------------



The screenshot shows the Autopure LS software interface. At the top, there are fields for User (Zagen), Current Time (13:23:59), Setup Date (4/14/2008), Rack ID (Zagen0804141321), Rack No., Protocol (Fresh Whole Blood), No. of Samples, Sample Size (5-10 ml), Hydration Vol. (µl) (1000), and Compl. Time. A progress bar indicates 91% completion. The Centrifuge Status is 'Ready'. Below the progress bar is a grid of 24 sample wells (8 columns by 3 rows). The top row is labeled 'Sample 1' through 'Sample 8' and is highlighted in red. The middle row is labeled 'Sample 1' through 'Sample 8' and is highlighted in blue. The bottom row is empty. To the right of the grid is a 'Reagent Levels' chart showing 6 levels with their respective percentages: 1 (50%), 2 (21%), 3 (24%), 4 (50%), 5 (64%), and 6 (71%). At the bottom of the interface are buttons for Main Menu, Setup Rack, Select Rack, Start Run, Pause, Resume, Abort, and Cancel, along with an information icon and the QIAGEN logo.

Annotations on the screenshot:

- Progression du run**: Points to the progress bar showing 91%.
- Etat de la centrifugeuse**: Points to the Centrifuge Status indicator.
- Niveau des réactifs**: Points to the Reagent Levels chart.

## 6. FIN DU RUN

Lorsque le run est terminé (progress = 100%), un signal sonore est émis.


1. Retirer le portoir de l'appareil
2. Procéder à l'inspection du plan de travail (gouttes d'échantillon, projections) passer un papier essuie-main imbibé de détergent sur le plan de travail.
3. Vérifier les niveaux des réactifs et de la poubelle
4. Vérifier l'absence de bulles d'air dans les tuyaux de dispensation des réactifs.
5. Remplir la check-list des maintenances, lors du PREMIER RUN de la journée

## 7. REHYDRATATION DE L'ADN

1. Mettre les Qubes contenant l'ADN sur un nouveau portoir, et les mettre à l'étuve 3h à 65°C bouchons fermés, sous agitation, ou 1h30 à 65°C au bain marie (bouchons fermés), puis Overnight sous agitation orbitale.
2. Transférer l'ADN dans les cryotubes (à fermeture étanche, de préférence)
3. Mettre ces cryotubes 48 heures sous agitation rotative à température ambiante
4. Puis mettre ces tubes sous agitation orbitale (tubes à l'horizontale) durant 5 jours.

Date de création : 06/09/2010  
Visa rédacteur : V.Jodon

Date de révision : 25/11/2013  
Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER  
5/17

	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

5. Effectuer le dosage (pour le dosage au nannodrop, récupérer le run à doser sous format excel, et suivre la procédure dans le MOD-04)

## 8. CELL LYSATE PREPARATION

Lorsqu'il s'agit d'un cell lysate la préparation est différente :

Si c'est sur de la salive, il faut :

1. verser l'ensemble du tube oragene ® dans le Qube (salive + solution oragene = 5mL).
2. Ajouter 1 mL de Cell lysis solution + 25µL de RNase A
3. Vortexer 10 secondes puis incuber 10 minutes à Température ambiante.
4. On peut ajouter 25µL de la PK (solution mère à 20 mg.mL) et incuber 1h à 55°C

Si c'est du sang compromis (ou très compromis) :

1. Verser le sang dans les QUBes lancer le run « cell lysate prepe » qui convient (préférence pour le compromised cell lysate prep)
2. Récupérer les tubes à la fin du run et y ajouter 50µL ou 25µL de PK mettre les tubes à l'étuve 2h (sans peu compromis) ou 3h (sang très compromis) en vortexant toutes les heures.
3. ATTENTION AUX ECLABOUSSURES avant le vortex, ouvrir le tube puis le refermer et s'assurer qu'il a baissé en température.
4. Une fois terminé remettre les tubes dans le portoir et lancer le run « cell lysate finish » qui convient. (préférence : Increased spin pour le très compromis)
5. Récupérer les tubes à la fin du run et effectuer le dosage.

## 9. MAINTENANCE

### A. MAINTENANCE REGULIERE (AVANT ET APRES CHAQUE RUN)

1. Vérifier la condensation dans la chambre de la centrifugeuse, si nécessaire, essuyer avec un papier essuie-mains. La condensation peut produire des erreurs type « imbalance ».
2. Essuyer toute projection sur le plan de travail de l'appareil en utilisant un papier essuie-mains imbibé de désinfectant (surface safe ou conflikt®).
3. Vérifier visuellement, le niveau des réactifs, et du bidon de déchets.
4. Si nécessaire, changer le bidon de réactif (Cf. p13)
5. Si l'appareil n'est plus utilisé, cliquer sur « log out ».

Date de création : 06/09/2010 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : 25/11/2013 Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER 6/17
---	---

	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

## B. MAINTENANCE JOURNALIERE

1. Maintenance régulière, étapes 1 à 3.
2. Ouvrir la centrifugeuse et vérifier qu'elle n'est pas souillée en fin de journée. Essuyer les godets et la chambre avec du « surface safe » puis refermer.
3. Dans Main Menu, cliquer sur « Diagnostics »
4. Puis dans « single Motions », cliquer sur « Home transfer Rack », afin de remettre le transfer rack à droite de l'appareil.
5. cliquer sur « shut down » pour éteindre l'ordinateur, puis éteindre complètement l'appareil par l'interrupteur se trouvant au dos.
6. Ouvrir la porte, soulever le shaker afin de pouvoir atteindre la gouttière, prendre la pissette d'H2O distillée dédiée à l'Autopure, passer de l'eau dans la gouttière.
7. essuyer, à l'aide d'un papier essuie-mains imbibé de désinfectant.
8. Ouvrir la cabine des réactifs et vérifier l'absence de bulles d'air dans les tuyaux d'alimentation de l'autopure. Si il existe des bulles (pas des microbulles, ce qui est normal) allumer l'appareil et après connection au logiciel, dans Main Menu, cliquer sur « Diagnostics » puis dans « Pump opérations » cliquer sur :
  - Prime : il y a des bulles dans tous les tuyaux
  - Purge en sélectionnant le réactif à purger : si les bulles se trouvent au niveau d'un ou 2 réactifs différents.

RQ : le nombre d'itération, doit être de 2 (consommation de réactif non négligeable lors de cette opération).

**ENREGISTRER LES ENTRETIENS REGULIERS QUOTIDIENS ET MENSUELS DANS LE FEN-28-V1**

## C. MAINTENANCE HEBDOMADAIRE

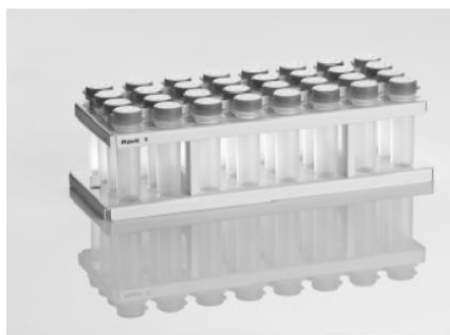
1. L'appareil doit être éteint, puis rallumé afin de rafraîchir la mémoire de l'ordinateur.
2. Procéder à un diagnostic de l'Autopure LS®
  - a. Prendre 8 tubes vides les placer en ligne A dans le Rack (la couleur des bouchons n'a pas d'importance)
  - b. Fermer la porte de l'Autopure
  - c. Dans Main Menu, cliquer sur « Diagnostics », puis dans « Diagnostics& instrument opération » cliquer sur « « Diagnostic protocol » puis « Execute ».
  - d. Une fenêtre s'ouvre pour vérifier la position des tubes puis cliquer « OK »
  - e. L'appareil effectue le diagnostic (15 minutes).

Date de création : 06/09/2010 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : 25/11/2013 Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER 7/17
---	---

	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

#### D. MAINTENANCE MENSUELLE


1. Inspecter la chambre de centrifugation, (rotors, godets, adaptateurs), en quête d'altérations.
2. Laver les godets avec un détergent doux, puis rincer à l'eau distillée.
3. Lubrifier les godets
4. Essuyer la chambre de la centrifugeuse avec du papier essuie-main imbibé de désinfectant.
5. Procéder à la calibration de la cellule de pesée (*à faire en cas de changement de lot de Qubes*) :
  - a. Prendre 8 tubes vides les placer en ligne A dans le Rack (la couleur des bouchons n'a pas d'importance)
  - b. Mettre le poids de 20g (se trouvant dans l'enveloppe marron de la cabine des réactifs) dans le tube placé en A2.
  - c. Fermer la porte de l'Autopure
  - d. Dans Main Menu, cliquer sur « Diagnostics », puis dans « Diagnostics& instrument opération » cliquer sur « « calibrate weigh cell » puis « Execute ».
  - e. Une fenêtre s'ouvre pour vérifier la position des tubes cliquer « OK »
  - f. L'appareil effectue la calibration (1 minute).



input rack (Sample Rack)

Date de création : 06/09/2010 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : 25/11/2013 Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER 8/17
---	---



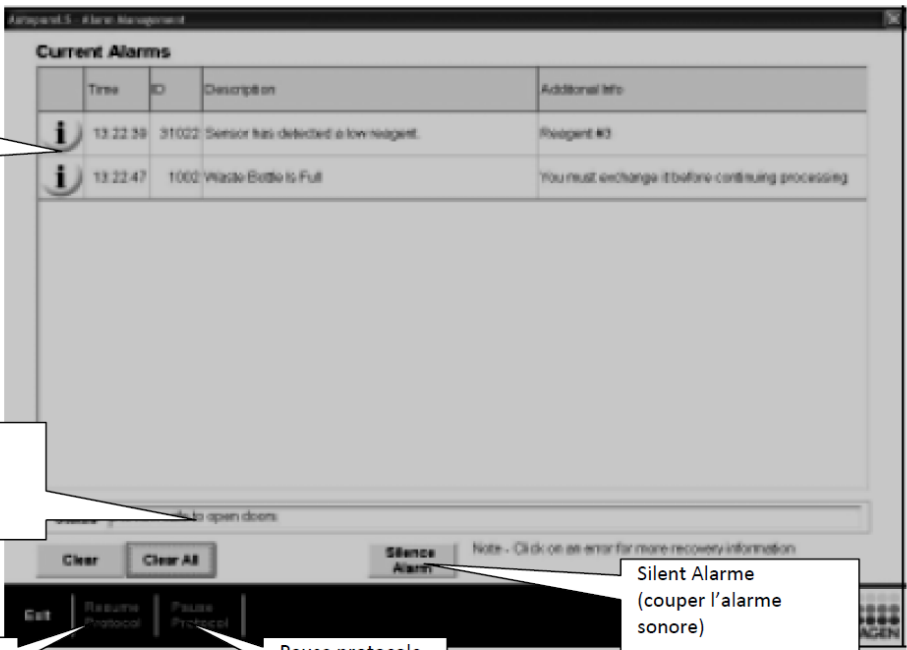
	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

**10. OPERATIONS SIMPLES**

Ce chapitre permet d'effectuer certaines opérations sur l'autopure en cas d'erreur détectée par l'appareil au cours d'un run, se soldant prioritairement par une pause de l'appareil.

**NE JAMAIS OUVRIR LA PORTE SI L'APPAREIL NE S'EST PAS COMPLETEMENT MIS EN PAUSE ET AFFICHE LE MESSAGE SUIVANT : « It's now safe to open the doors ».**

**A. ERREURS DETECTEES ET CONDUITES A TENIR**




The screenshot shows the 'Alert Management' window with a table of 'Current Alarms'. Callouts provide the following information:

- Détail de l'erreur détectée:** Points to the first row of the alarm table.
- Etat de l'appareil : possibilité d'ouvrir ou non la porte:** Points to the 'To open doors' text below the table.
- Resume protocole:** Points to the 'Resume Protocol' button.
- Pause protocole:** Points to the 'Pause Protocol' button.
- Silent Alarme (couper l'alarme sonore):** Points to the 'Silence Alarm' button.

	Time	ID	Description	Additional Info
	13:22:39	31022	Sensor has detected a low reagent.	Reagent #3
	13:22:47	1000	Waste Bottle is Full	You must exchange it before continuing processing

Lorsque l'appareil se met en pause cliquer sur le signal d'alerte pour lire le détail de l'erreur détectée.

Date de création : 06/09/2010 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : 25/11/2013 Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER 9/17
---	---

	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

S'il s'agit d'un dysfonctionnement :


Erreur	Conduite à tenir
Lié au système de pression à air	<b>CONTACTER IMMEDIATEMENT LE SERVICE SUPPORT TECHNIQUE DE QIAGEN AU 01 60 920 930</b>
Lié au system « vaccum »	
Lié à un fusible de la centrifugeuse	
Lié à un problème d'équilibre des charges	
Lié au détecteur du niveau de réactif	
Lié aux moteurs « motion time out »	
Error eppendorf 15	

Il se peut cependant que certaines erreurs puissent être réglées directement :

Erreur	Conduite à tenir
Détection de niveau insuffisant pour un réactif « sensor detects insufficient levels of reagent »	Changer la bouteille puis cliquer sur « resume » pour reprendre le run
Détection d'un niveau bas de réactif "insufficient volumes for performing the selected protocol"	Dans Main Menu, cliquer sur « change reagent », changer le réactif et continuer le run .
Détection d'un niveau bas de réactif alors que la bouteille est pleine	Enlever puis replacer la bouteille, et cliquer sur « start » pour démarrer le run. Si le problème persiste, contacter QIAGEN run .
Détection d'une poubelle pleine, alors qu'elle ne l'est pas. « Sensor detects that wast container is full »	Enlever puis remettre la poubelle, sinon la changer complètement et continuer le run
Les godets requièrent une lubrification « buckets in centrifuge require lubrication »	Cliquer sur « resume » pour continuer le run, puis à la fin, suivre la procédure de lubrification des godets de la centrifugeuse.
« Qubes weight out of tolerance »	Si la différence est infime, (jusqu'à 2mL) résumer, et après le run, re calibrer la cellule de pesée.
Read eppendorf Attempted read CNR	Si la différence est infime, (jusqu'à 2mL) résumer, et après le run, re-calibrer la cellule de pesée.
Error eppendorf 30	Vérifier l'équilibre dans la centrifugeuse.

Date de création : 06/09/2010 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : 25/11/2013 Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER 10/17
---	--



	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

Lorsque l'appareil se met en pause au cours d'un run à cause d'une erreur il faut:

1. Cliquer sur le warning qui signale l'erreur
2. Si possible résoudre l'erreur, ou le cas échéant contacter QIAGEN
3. Une fois l'erreur résolue, cliquer sur « Clear all » puis pour continuer le protocole, en cliquant sur « résumé protocole ».

**Attention !!** Lorsque le capper/uncapper a des tubes, faire attention à l'erreur si il s'agit d'un motion time out, il se peut que le capper laisse tout tomber sur le plan de travail !

Il est donc préférable d'éviter de résumer (sauf cas de poids de Qubes ou d'erreur de centrifugeuse) lorsque des tubes sont pris en charge par le capper/uncapper.

## B. RECUPERATION D'UN PROTOCOLE

En cas de pause au cours d'un run, il est possible de récupérer certaines étapes :

Dans Main Menu cliquer sur « Diagnostics » :

<u>Capping operations :</u> Recap Qubes at Transf.rack A, unload to input rack A Recap Qubes at Transf.rack B, unload to input rack B Recap Qubes at shaker, unload to input rack C Get caps at Transf.rack B , recap in Row A and unload to input rack A.	Si les Qubes sont dans le transfer rack et débouchés. Choisir option A, si ce sont les tubes de la ligne A, et option B si ce sont les tubes de la ligne B. Si les tubes sont débouchés dans le shaker choisir option C, pour les reboucher et les mettre dans à la ligne C Si les bouchons sont dans le transfer rack ligne B, et les tubes dans la ligne A
<u>Centrifuge operations :</u> Unload 8 Qubes, unload to input rack A Unload 16 Qubes, unload to input rack A+B	L'appareil décharge 8 tubes et les place dans l'input Rack ligne A L'appareil décharge 16 tubes et les place dans l'input Rack ligne A et ligne B
<u>Unload operations:</u> Unload transfer rack A to input rack A Unload transfer rack B to input rack B Unload shaker to input rack C	Décharger les 8 tubes du transfert rack en position A vers la ligne A de l'input rack. Décharger les 8 tubes du transfert rack en position B vers la ligne B de l'input rack. Décharger les 8 tubes du shaker vers la ligne C de l'input rack.

Date de création : 06/09/2010  
Visa rédacteur : V.Jodon

Date de révision : 25/11/2013  
Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER  
11/17

 <p>Hôpitaux Universitaires Est Parisien CRB</p>	<p>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</p>	<p>MOD-15-V3</p>
---	---	------------------

**Récupération d'un échantillon contaminé par des protéines :**

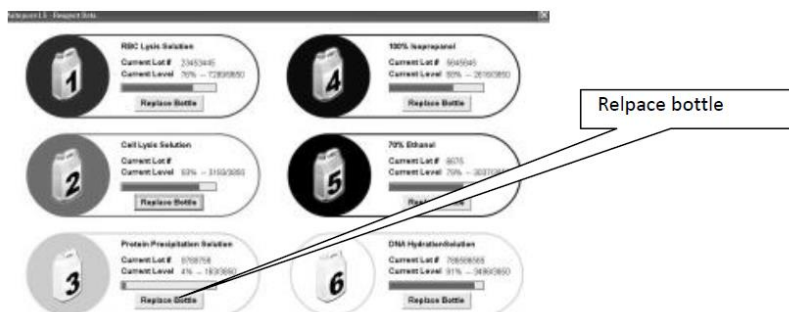
1. Récupérer la totalité de l'ADN dans son volume d'hydratation
2. Ajouter 5 volumes (volume de la solution d'ADN) de Cell lysis
3. Mélanger par va et vient avec la pipette
4. Incuber à 65°C jusqu'à dissolution complète du culot
5. si le culot ne se reprend pas, mettre de la protéinase K à 100µg/mL en concentration dans le volume final.
6. ajouter 2 volumes de protéin précipitation
7. Vortexer 20 secondes.
8. centrifuger à 2000g ou 4400rpm pendant 10 minutes
9. vider le surnageant dans 6 volumes d'isopropanol
10. agiter par retournement 50 fois
11. centrifuger à 2000g ou 4400rpm pendant 5 minutes
12. jeter le surnageant mettre 6 volumes d'EtOH 70%
13. centrifuger à 2000g ou 4400rpm pendant 1 minute
14. sécher pendant 10 minutes
15. Réhydrater l'ADN en suivant les étapes décrites au chapitre n°7 de ce MOD.

<p>Date de création : 06/09/2010 Visa rédacteur : V.Jodon</p>	<p>Date de révision : 25/11/2013 Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER 12/17</p>
---	---

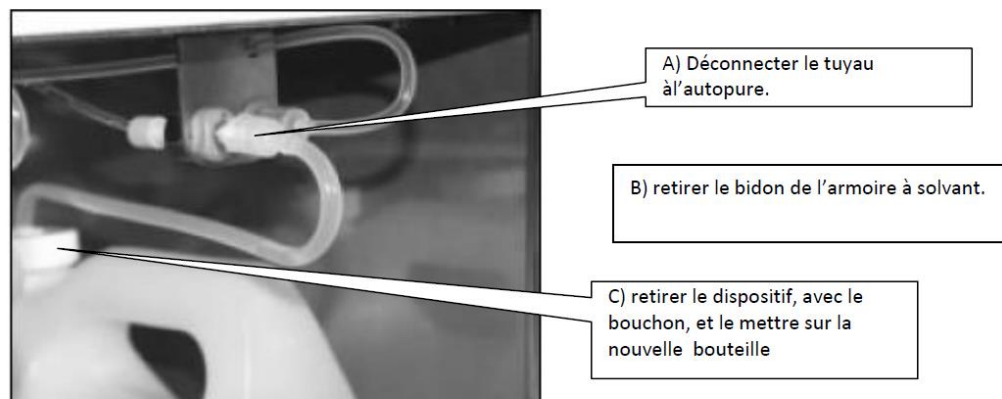
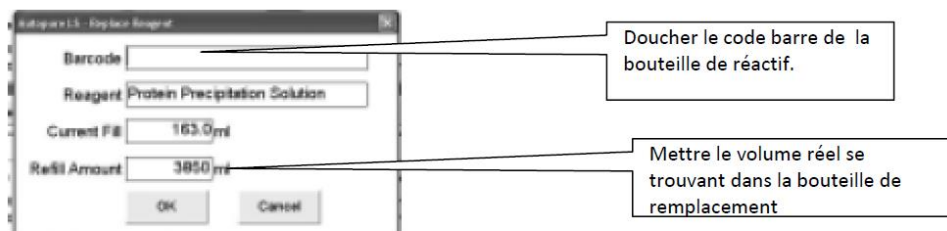
	<p>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</p>	<p>MOD-15-V3</p>
---	---	------------------

C. CHANGEMENT D'UNE BOUTEILLE DE REACTIF

Dans Main Menu, cliquer sur « change reagent » une fenêtre apparaît :



Sous chaque réactif, il y a le bouton "replace bottle". Cliquer dessus, afin de procéder au remplacement de la bouteille souhaitée. Une fenêtre de remplacement apparaît :



Très IMPORTANT : Pour le réactif 1 la déconnexion /connexion à l'Autopure (étape A) se fait par un clips. Tandis que pour les autres réactifs, il s'agit d'un vissage/dévisage.

<p>Date de création : 06/09/2010 Visa rédacteur : V.Jodon</p>	<p>Date de révision : 25/11/2013 Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER 13/17</p>
---	---

	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

Une fois le bouchon mis sur la nouvelle bouteille, et celle ci mise dans l'armoire à solvant de l'autopure, il faut connecter le tuyau à l'appareil. Une fois que tout est fait, cliquer sur « OK » dans la fenêtre de remplacement (image précédente).

Remarque lors du changement de l'ETOH 70% et de l'Isopropanol (fournis par l'hôpital), dans la section « barcode » noter le n° de Batch des bouteilles.

#### D. NETTOYAGE DES CAPILLAIRES DU DNA HYDRATATION

Déconnecter la bouteille vide

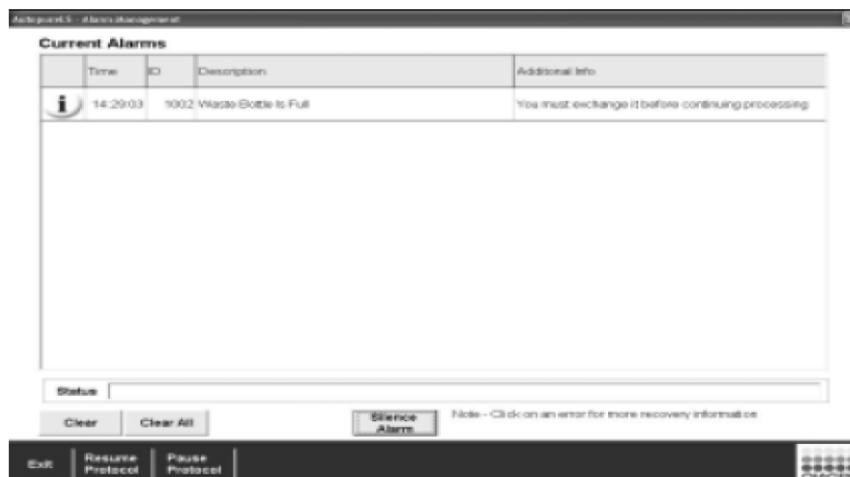
Dans « diagnostics » effectuer la purge (5 fois) sur le réactif n°6

Connecter une bouteille (même format) contenant de l'ETOH 70% puis faire à nouveau 1 purge (5 itérations) du réactif 6. Attendre 30 min. Revider le capillaire puis, effectuer le changement de réactifs comme indiqué en C. (page 20)

#### E. CHANGEMENT DE LA POUBELLE


La poubelle peut contenir les déchets pour un peu plus de 96 échantillons de 10 mL, soient 6 runs de 16 échantillons.

Une fois le bidon plein, l'autopure ne démarrera pas de run si il n'est pas changé. Généralement, l'appareil met une alerte :



- 1) Dévisser le bouchon du tube de déchets du bidon, plein (faire attention),
- 2) Visser le bouchon du tube de déchet sur le bidon vide (faire attention à ne pas mettre d'affiche au niveau des détecteurs interne de la cabine à déchets)

Date de création : 06/09/2010 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : 25/11/2013 Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER 14/17
---	--

	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

- 3) Fermer le bidon plein, avec le bouchon du bidon vide (sans ouverture), y coller l'étiquette propre au circuit de destruction de l'hôpital, afin qu'il soit enlevé:



## 11. EXPORT INFORMATIQUE DES DONNEES DU RUN

Sur l'écran de « run rack » il existe en haut à droite les cases :

- Prompt to verify rack placement (vérifie le placement du rack)
- Beep when run finished (signal sonore lors de la fin du run)
- Check to export data to LIMS (export des données du run automatique)
- Verify Dispense of reagent #2 ,#3 ( vérification de la dispensation des réactifs 2 et 3)

Il est préférable qu'elles soient toutes cochées.

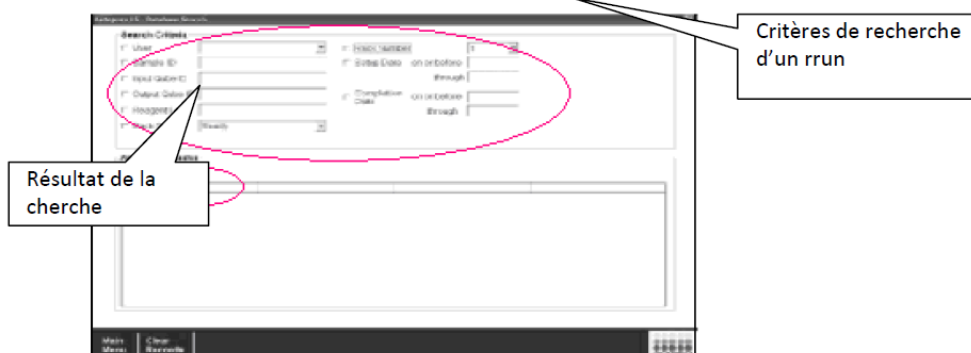
L'obtention des données relative aux runs faits sur l'appareil s'effectue via :

### A. « SEARCH DATABASE »

Depuis Main menu, cliquer sur le bouton « search database »,

Cet écran renseigne sur tous les runs effectués et/ou enregistrés (dans l'attente d'un run).

La recherche peut se faire par Utilisateur, ID de l'échantillon, ou code barre des bouchons des Input Qubes et Output Qubes, ou par le numéro de lot d'un réactif, ou du statut complété (pour run effectué) ou « ready ». Les résultats se trouvent sous forme de « Rack report »

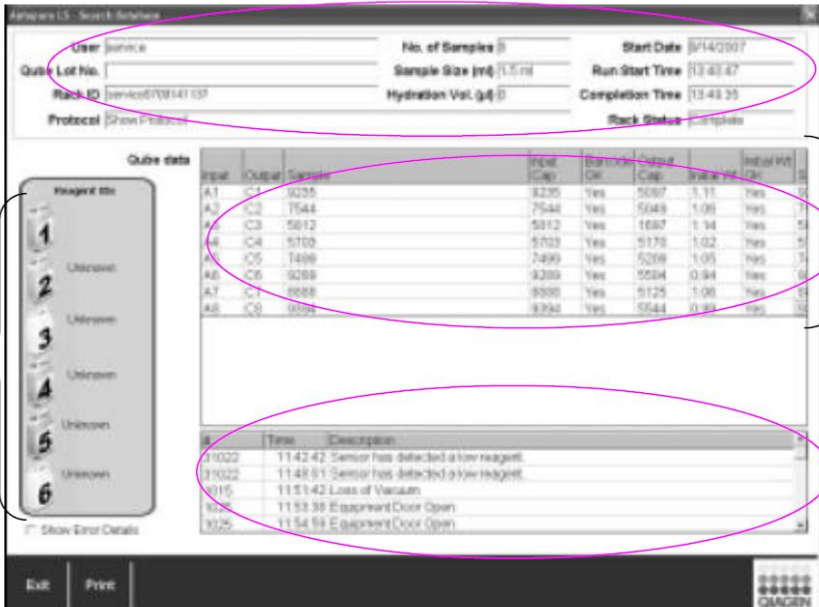


“Search Database” screen.

Date de création : 06/09/2010 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : 25/11/2013 Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER 15/17
---	--

	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

Le « rack report » se trouve sous la forme suivante :



N° de lot des réactifs utilisés

Détail : utilisateur, ID, rack date, volumes horaires.

Détail : ID Cap, ID code barre éch., position rack, poids..

Détail : des erreurs rencontrées lors du run

Ce rapport est imprimable uniquement. (imprimante non installée). Mais il reste accessible et tous les runs sont mémorisés dans le fichier « Database » de l'appareil, qui doit être sauvegardé tous les mois d'activité:

C:\Document and setting\qiagen\database

C:\document and setting \autopure LS\Ap log + Motion profile+Protocol

## B. EXPORT APEX

Tous les exports sont enregistrés sur le bureau de l'ordinateur de l'Autopure (dans un raccourci).

C:\Documents and Settings\All users\Desktop

En cas d'export manuel: cliquer sur l'icone "APEXport" sur le bureau de l'ordinateur. Une fenêtre s'ouvre, et permet d'effectuer l'export de données concernant un run ou un ensemble de runs (par semaines), en manuel, vers le bureau.

Possibilité de choisir les données en fonction de la date du run, ou du Rack ID.

Il est important de donner un nom au nouveau fichier (nom par défaut = APEX) : SEM X (1,2,3,4,5)MOIS ANNEE.

Date de création : 06/09/2010 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : 25/11/2013 Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER 16/17
---	--


	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN SUR AUTOMATE AUTOPURE LS®</b>	<b>MOD-15-V3</b>
---	---	------------------

ETAPES	ACTION	PIECE
1	Préparation de la feuille d'extraction	
2	Maintenance (vérification poubelle, niveau des réactifs, nettoyage du plan de travail, vérification de l'absence de condensation dans la centrifugeuse). Possible de lancer un « diagnostic protocol » si l'Autopure était éteint.	1207a
3	Préparation des Input racks (échantillons dans les Qubes roses)	1207c
4	Enregistrement des Input racks dans l'autopure et programmation du run (selon type et volume d'échantillon) USER DATE-PROJET-n° run	1207a
5	Lancement du run	1207a
6	Récupérer les échantillons	1207a
7	Mettre les échantillons sous agitation à l'étuve pendant 3 h à 65°C ou au bain marie pendant 1h30 à 65 °C	1207b ou 1207c
8	Mettre les échantillons sous agitation à T°C ambiante pendant 24 à 48 heures	1207c
9	Transférer les échantillons dans des cryotubes	1207c
10	Mettre sous agitation rotative pendant 48 heures	1207c
11	Mettre sous agitation orbitale pendant 5 jours	1207c ou 1207b
10	Doser l'ADN	1207b

Date de création : 06/09/2010	Date de révision : 25/11/2013
Visa rédacteur : V.Jodon	Visa Approbateur : J.WEISSENBURGER
	17/17



## Annexe 8 : MOD d'extraction manuelle d'ADN

	<b>Extraction manuelle d'ADN Kit Puregene</b>	<b>MOD-03-v2</b>
---	---	------------------

### I. GENERALITES :

#### 1. OBJET

Ce mode opératoire permet d'effectuer une extraction manuelle d'ADN dans le cas où l'extraction ne peut être réalisée sur l'automate dans les cas suivants :

- de dysfonctionnement de l'automate,
- d'une deuxième extraction après extraction automatisée,
- d'une exigence du demandeur.

Ce mode opératoire est réalisé dépendamment du kit d'extraction d'ADN fourni par Qiagen : Kit Puregene®.

#### 2. ENREGISTREMENTS ASSOCIES

- Fiche d'enregistrement des extractions manuelles (FEN-29)
- Inventaire fournitures (FEN-18)
- Entretien et nettoyage des équipements (FEN-39)
- Fiche de non-conformités et actions correctives (FEN-04)
- Tableau de surveillance des non-conformités des RBs (FEN-07)
- Tableau de surveillance des dysfonctionnements (FEN-16)


#### 3. RESULTATS ATTENDUS

Le Kit Puregene® permet d'obtenir :

- Un ADN dont 95% est de taille supérieure à 50kb
- Un ADN dont le rapport de DO A260/ A280 est supérieur à 1,70
- Un ADN qui permet une amplification par PCR de grande qualité  
(Pour le sang total prélevé sur tubes **hors Héparine**)
- Un ADN dont la qualité a permis d'obtenir des fragments de qualité suite à la digestion par 6 enzymes de restriction différentes, de l'ADN humain.

Date création : 16/03/2010 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de modification : 22/11/2013 Visa approbateur : J. Weissenburger 1/7
---	---



	<b>Extraction manuelle d'ADN Kit Puregene</b>	<b>MOD-03-v2</b>
---	---	------------------


## II. MATERIEL NECESSAIRE

### 1. APPAREILS DE LABORATOIRES

Nom/code	Localisation	Description
JULABO TW12	Laboratoire p1207	Bain-marie
MOVIL'Tubes	Laboratoire p1207	Agitateur doux/ Homogénéisateur pour tubes
Heidolph REAX 2000	Laboratoire p1207	Vortex
Labofuge 400R avec le rotor n° 8172	Laboratoire p1207	Centrifugeuse
Pipette GILSON P1000	Laboratoire p1207	Pipette
Pipette GILSON P200	Laboratoire p1207	Pipette
Pipette GILSON P20	Laboratoire p1207	Pipette

### 2. REACTIFS ET CONSOMMABLES DE LABORATOIRE

Nom/code	Localisation	Description
Cônes de pipettes universelles	Laboratoire p1207	Cônes P1000 stériles (SORENSEN, ART..selon fournisseur)
Pipette stérilisées jetables	Laboratoire p1207	Pipette type pasteur en plastique, jetable.
Tubes 15 mL et 50mL	Laboratoire p1207	Tubes coniques
Microtubes 1,5mL stérilisés	Laboratoire p1207	Microtubes coniques
ISOPROPANOL (2-propanol)	Armoire à solvants p1207	Solution à 100% 500mL
Ethanol	Armoire à solvants p1207	Solution à 70% ,500mL (à préparer si il n'y en a pas assez Cf. MO)
RBC Lysis Solution	Meuble blanc des réactifs laboratoire p1207	Réactif prêt à l'emploi se conserve à T°C ambiante.
Cell Lysis Solution	Meuble blanc des réactifs laboratoire p1207	Réactif prêt à l'emploi, se conserve à T°C ambiante
RNase A Solution	Meuble blanc des réactifs laboratoire p1207	4mg/ml à conserver à 4°C (faire des aliquotes de 100µL)
Protein précipitation Solution	Meuble blanc des réactifs laboratoire p1207	Réactif prêt à l'emploi se conserve à T°C ambiante.
DNA Hydratation	Meuble blanc des réactifs laboratoire p1207	Réactif prêt à l'emploi se conserve à T°C ambiante.
Protéinase K	Meuble blanc des réactifs laboratoire p1207	Réactif prêt à l'emploi se conserve à T°C ambiante.
Date création : 16/03/2010 Visa rédacteur : V. Jodon		Date de modification : 22/11/2013 Visa approuvateur : J. Weissenburger 2/7

	<b>Extraction manuelle d'ADN Kit Puregene</b>	<b>MOD-03-v2</b>
---	---	------------------

### III. ETAPES DU MODE OPÉRATOIRE

Les ressources biologiques à extraire sont sélectionnées par groupe de 12 échantillons et répertoriées sur la feuille d'extraction (FEN-29). Si nécessaire les échantillons sont mis à décongeler, au moins 2 heures avant le début de l'extraction (sur le MOVIL'Tube) dans le cas de tube EDTA de sang de 10 ml. Si les Ressources biologiques sont non congelées, elles peuvent être traitées directement. A ce stade une non conformité peut être décelé et doit faire l'objet d'une déclaration.

#### 1. A PREPARER AVANT L'EXTRACTION

Avant l'extraction, il faut s'assurer de la disponibilité :

- du nombre de tubes nécessaires
- des volumes de solvants nécessaires
- de la centrifugeuse, du bain marie et de l'étuve si nécessaire.


Ce mode opératoire présente des méthodes validées à partir d'échantillons :

- de sang total frais
- de sang total congelé
- de sang total compromis
- de salive en bain de bouche

Il faut alors utiliser la méthode ci-dessous adaptée à son type d'échantillon à extraire.

Si le volume d'échantillon à extraire est différent de celui du mode opératoire, il faut réadapter proportionnellement les volumes des différentes solutions du kit au volume d'échantillon de départ utilisé pour l'extraction.

Date création : 16/03/2010 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de modification : 22/11/2013 Visa approbateur : J. Weissenburger 3/7
---	---

	<b>Extraction manuelle d'ADN</b> <b>Kit Puregene</b> <b>A partir de sang total</b>	<b>MOD-03-v2</b>
---	--	------------------

## 2. EXTRACTION A PARTIR DE SANG TOTAL

### **a) Phase 1 : Lyse des cellules**

1. Ajouter 6 ml de RBS lysis solution dans un tube 15 ml
2. Ajouter 2 mL de sang total dans le tube 15mL
3. Inverser le tube pour homogénéiser
4. Incuber 10 minutes à Température ambiante pour que la lyse des globules rouges soit optimale.
5. Mettre à centrifuger 3300 rpm (2000g) pendant 10 minutes
6. Enlever le surnageant avec précaution afin de ne pas perdre le culot cellulaire, laisser environs 100µL de surnageant.
7. Vortexer vigoureusement pour remettre les cellules en solution
8. Ajouter 3 mL de Cell Lysis Solution, et remettre le tout en solution avec une pipette stérile jetable.

**A cette étape, il est possible d'arrêter, et de reprendre plusieurs mois après. Le Lysat cellulaire est stable pendant au moins 2 ans à T°C Ambiante.**

### **b) Phase 2 : Traitement par la Rnase (facultatif)**

La RNase se trouve dans le réfrigérateur n°7 à 4°C. Sortir un aliquote.

1. Ajouter 15 µL de RNase au lysat cellulaire
2. Mélanger doucement en inversant le tube 25 fois, puis incuber à 37°C pendant 30 minutes au Bain marie.

### **c) Phase 3 : Précipitation des protéines**


1. Sortir les tubes du Bain marie, et laisser refroidir à température ambiante pendant 5 min.
2. Ajouter 1 mL de Protein précipitation Solution
3. Vortexer vigoureusement chaque tube pendant 20 secondes.
4. Mettre à centrifuger à 3300rpm pendant 10 minutes (2000g)
5. Les protéines précipitées forment un culot marron au fond du tube. Si le culot n'est pas compacte, répéter les étapes 3 et 4 de la phase 3.

### **d) Phase 4 : Précipitation et lavage de l'ADN**

1. Mettre le surnageant dans les tubes FALCON de la deuxième série de tubes préparée.
2. Homogénéiser doucement par inversion 50 fois, le surnageant et l'isopropanol.
3. Mettre à centrifuger à 3300 rpm pendant 3 minutes (2000g).
4. Enlever le surnageant très délicatement sans faire tomber le culot d'ADN.
5. Passer un papier absorbant sur les parois du tube.
6. Ajouter 3 mL d'Ethanol 70% puis retourner plusieurs fois le tube pour laver l'ADN
7. Mettre à centrifuger à 3300 rpm pendant 2 minutes (2000g).
8. Enlever l'éthanol en faisant attention à ne pas décoller le culot !
9. retourner le tube et essuyer les bords avec un papier absorbant.
10. Sécher à l'air pendant 10 minutes.

Date création : 16/03/2010  
 Visa rédacteur : V. Jodon

Date de modification : 22/11/2013  
 Visa approbateur : J. Weissenburger  
 4/7

	<b>Extraction manuelle d'ADN Kit Puregene A partir de sang total</b>	<b>MOD-03-v2</b>
---	--	------------------

***e) Phase 5 : Hydratation de l'ADN***

1. Ajouter 250 µL de DNA Hydratation Solution
2. Réhydrater l'ADN en chauffant 1 heure (à 1h30) à 65°C, puis à Température ambiante ON (Over Night) recommandé.

***f) Résultats attendus***

A partir de sang frais non compromis, le kit Puregene® permet d'obtenir :

**entre 45 et 135µg d'ADN (théoriquement en moyenne 105µg d'ADN).**

**3. DANS LE CAS DE SANG TOTAL COMPROMIS**

Ce protocole se réalise sur 2 jours alors que celui sur le sang total non compromis peut être réalisé dans une journée.


Il faut utiliser le même protocole que décrit en chapitre 2. et rajouter une étape entre la phase 2 et 3.

**A partir du lysat cellulaire +/- RNase (phase1 ou 2) :**

- ajouter 20µl de Protéinase K prête à l'emploi (stockée à température ambiante)
- incuber sur la nuit à 55°C dans l'étuve
- reprendre la phase 3 le lendemain
- réaliser la suite des étapes.

Date création : 16/03/2010  
Visa rédacteur : V. Jodon

Date de modification : 22/11/2013  
Visa approbateur : J. Weissenburger  
5/7

	<b>Extraction manuelle d'ADN Kit Puregene A partir de salive en bain de bouche</b>	<b>MOD-03-v2</b>
---	--	------------------

#### 4. EXTRACTION A PARTIR DE SALIVE EN BAIN DE BOUCHE

##### **a) Phase 1 : Séparation et Lyse des cellules**

1. Centrifuger 4500 rpm (3000g) pendant 5 minutes
2. Eliminer le surnageant
3. Enlever le surnageant avec précaution afin de ne pas perdre le culot cellulaire, laisser environ 100µL de surnageant.
4. Vortexer vigoureusement pour remettre les cellules en solution
5. Ajouter 1 mL de Cell Lysis Solution, et remettre le tout en solution avec une pipette stérile jetable.
6. Incuber pendant 15 minutes à température ambiante.

##### **b) Phase 2 : Traitement par la Rnase (facultatif)**

1. Ajouter 15 µL de RNase au lysat cellulaire
2. Mélanger doucement en inversant le tube 25 fois, puis incuber à 37°C pendant 30 minutes au Bain marie

##### **c) Phase 3 : Précipitation des protéines**

1. Ajouter 20µl de Protéinase K au lysat cellulaire
2. Incuber à 55°C pendant la nuit.

##### **d) Phase 3 suite : Précipitation des protéines**

1. Sortir les tubes, et laisser refroidir à température ambiante pendant 5 min.
2. Ajouter 2 mL de Protein précipitation Solution
3. Vortexer vigoureusement chaque tube pendant 20 secondes.
4. Incuber à 4°C pendant 10 minutes.
5. Mettre à centrifuger à 3300rpm pendant 10 minutes (2000g) à 4°C
6. Les protéines précipitées forment un culot marron au fond du tube. Si le culot n'est pas compacte, répéter les étapes 3 et 4 de la phase 3.


##### **e) Phase 5: Précipitation et lavage de l'ADN**

1. Mettre le surnageant dans un tube 15 ml contenant 3ml d'Isopropanol.
2. Homogénéiser doucement par inversion 50 fois, le surnageant et l'isopropanol.
3. Mettre à centrifuger à 3300 rpm pendant 3 minutes (2000g).
4. Enlever le surnageant très délicatement sans faire tomber le culot d'ADN.
5. Passer un papier absorbant sur les parois du tube.
6. Ajouter 3 mL d'Éthanol 70% puis retourner plusieurs fois le tube pour laver l'ADN
7. Mettre à centrifuger à 3300 rpm pendant 2 minutes (2000g).
8. Enlever l'éthanol en faisant attention à ne pas décoller le culot !
9. retourner le tube et essuyer les bords avec un papier absorbant.
10. Sécher à l'air sous Sorbonne pendant 10 minutes.

Date création : 16/03/2010  
Visa rédacteur : V. Jodon

Date de modification : 22/11/2013  
Visa approbateur : J. Weissenburger

6/7

	<p style="text-align: center;"><b>Extraction manuelle d'ADN Kit Puregene A partir de salive en bain de bouche</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>MOD-03-v2</b></p>
---	---	---

**f) Phase 5 : Hydratation de l'ADN**

1. Ajouter 250 µL de DNA Hydratation Solution
2. Réhydrater l'ADN en chauffant 1 heure (à 1h30) à 65°C, puis à Température ambiante ON (Over Night) recommandé.


**5. DANS LE CAS D'ADN A REPURIFIER**

Pour l'ensemble des méthodes décrites, si l'ADN extrait ne correspond pas aux critères de qualité définis selon l'état de l'art ou les exigences spécifiques du demandeur au niveau de la pureté, l'ADN peut être repurifié en réalisant le protocole ci-dessus à partir de la phase 3 de précipitation des protéines.

Par défaut, un ADN est considéré comme conforme avec un ratio DO260/280 entre 1.7 et 2.

Date création : 16/03/2010 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de modification : 22/11/2013 Visa approbateur : J. Weissenburger 7/7
---	---

## Annexe 9 : MOD de dosage des AN

	<b>Mode opératoire de dosage des Acides nucléiques</b>	<b>MOD-04-v2.1</b>
---	--	--------------------

### I. GENERALITES :

#### 1. OBJET

Ce mode opératoire décrit l'utilisation de 3 appareils permettant le contrôle qualité des acides nucléiques, incluant leur dosage et la mesure de leur pureté :

- Spectrophotomètre Nanodrop 8000 (SP03),
- Spectrophotomètre *GeneQuant pro* (SP01),
- Fluoromètre *SPECTRAFluor* (SP02).

Ce mode opératoire est à réaliser par un des appareils obligatoirement pour toutes les extractions d'acides nucléiques afin de valider leur conformité selon l'état de l'art ou les exigences spécifiques du demandeur.

Le choix de l'appareil se fait en fonction de leur disponibilité avec en priorité le Nanodrop et dans le cas d'un dysfonctionnement ou indisponibilité du Nanodrop d'un des 2 autres appareils.

#### 2. ENREGISTREMENTS ASSOCIES

- Fiche d'enregistrement des extractions manuelles (FEN-29)
- Fiche d'enregistrement des extractions automatisées ADN (FEN-06) et ARN (FEN-41)
- Entretien et nettoyage des équipements (FEN-39)
- Fiche de non-conformités et actions correctives (FEN-04)
- Tableau de surveillance des non-conformités des RBs (FEN-07)
- Tableau de surveillance des dysfonctionnements (FEN-16)


#### 3. RESULTATS ATTENDUS

Une extraction d'acides nucléiques est considérée comme conforme, quand les extraits ont :

- Une concentration >50ng/μl
- Un rapport de DO A260/ A280 :
  - Entre 1,70 et 2.00 pour l'ADN
  - Entre 1.7 et 2.2 pour l'ARN
- Un rapport de DO A260/230 supérieur à 1.7

Date de création : 04/03/2010  
 Visa rédacteur : V. Jodon

Date de modification : 27/05/2015  
 Visa Approbateur : J.Weissenburger  
 1/12

	<b>Mode opératoire de dosage des Acides nucléiques Nanodrop SP03</b>	<b>MOD-04-v2</b>
---	--	------------------

**II. PRESENTATION DU NANODROP (SP03)**

Le nanodrop 8000, est un appareil permettant le dosage d'échantillons d'ADN/ARN.

Le nanodrop 8000 permet la lecture simultanée en 6 secondes de 8 échantillons.

Bien que la taille de l'échantillon ne soit pas un facteur critique, il est essentiel que la colonne de liquide se forme entre le piédestal supérieur et inférieur de l'appareil pour les positions de mesures.

Il est possible de faire des mesures sur 1, 2 ....à 8 positions. Ce n'est pas obligatoire d'avoir du liquide sur toutes les positions.

Note : Dans la mesure du possible, les échantillons mesurés doivent être homogènes (solution trop visqueuse pas complètement réhydratée, agrégats présents dans le liquide peuvent entraîner des incohérences de dosage).

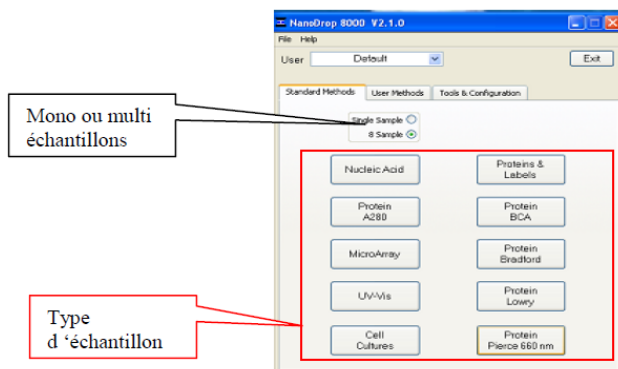
Le réglage du zéro est fait automatiquement sur la valeur à 340 nm, tous les spectres y ont leur référence de base.

**1. UTILISATION DE L'APPAREIL (CRB- SP03)**

- a. Enlever le film plastique et la protection de l'appareil
- b. Allumer si nécessaire l'ordinateur relié au Nannodrop.




- c. Cliquer sur l'icône du nanodrop ND8000 :
- d. La fenêtre suivante s'ouvre, et choisir :



Dans le cas où multi échantillon est sélectionné, il est possible de télécharger au format excel les échantillons à mesurer. Dans ce cas, ne pas oublier de créer des cases « vides »

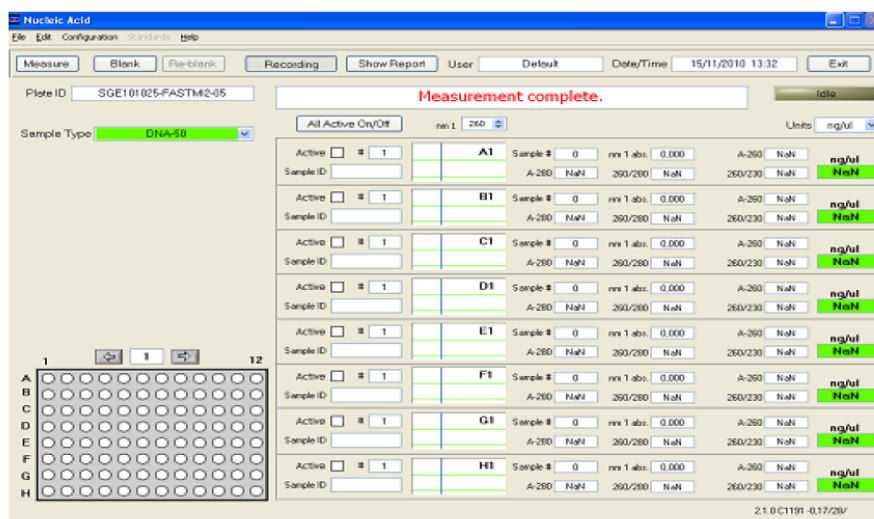
Date de création : 04/03/2010 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de modification : 27/05/2015 Visa Approbateur : J.Weissenburger 2/12
--	---



	<b>Mode opératoire de dosage des Acides nucléiques Nanodrop SP03</b>	<b>MOD-04-v2</b>
---	--	------------------

dans le tableau pour les puits témoin.

Pour les Acides Nucléiques, vérifier la sélection de la mesure ADNds (vert) ou ARNss (rose).  
La fenêtre suivante s'ouvre et l'appareil s'initialise **en vous demandant de charger de l'eau** :



### FAIRE LE BLANC


- Déposer 2 $\mu$ L d'eau distillée et nettoyer les piédestaux haut et bas à l'aide d'un papier de laboratoire ne laissant pas de dépôts (type papier mouchoir tissé).
- Déposer 2 $\mu$ L de la solution de dilution des ADN ou 2 $\mu$ L d'eau distillée sur les piédestaux désirés ( de H à A) sélectionner ces piédestaux en cliquant dans la case « Active », puis cliquer sur **Blank** puis sur **Measure** pour contrôler les valeurs puis cliquer sur **Re-Blank**.
- Vérifier le blanc en cliquant sur **Measure** et s'assurer que la lecture est à zéro. Dans le cas contraire refaire les étapes a ; b et c.

### ENTREE MANUELLE DES ECHANTILLONS A DOSER

- Rentrer les identifiants des échantillons dosés au niveau de « sample ID » ainsi que l'identifiant de la plaque, du run ; dosé dans le champ « Plate ID ». Note : il est possible dans le cas d'une plaque de 96 puits, si tous les échantillons sont à doser et sont déjà identifiés au format **xls**, de les charger directement dans le logiciel (il faut au préalable définir le format informatique des fichiers d'échantillons qui seront chargés).
- Vérifier que les puits voulus (piédestaux) sont activés, y déposer 2 $\mu$ L de l'échantillon NON DILUE le dépôt s'effectue de **A** à **H** (bien vérifier, car les résultats se lisent de **A** à **H**).

Date de création : 04/03/2010  
Visa rédacteur : V. Jodon

Date de modification : 27/05/2015  
Visa Approbateur : J.Weissenburger  
3/12

	<b>Mode opératoire de dosage des Acides nucléiques Nanodrop SP03</b>	<b>MOD-04-v2</b>
---	--	------------------

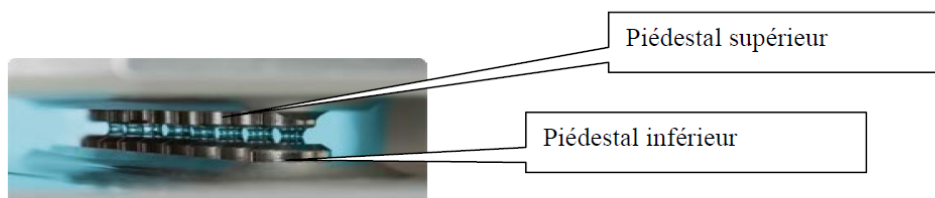
- c. Cliquer sur **Measure**. Les valeurs des concentrations s'affichent.

**Note** : Dans le cas d'une relecture de ces mêmes échantillons, il n'est pas nécessaire de changer la ligne de lecture (qui va de 1 à 12), puisqu'il sera indiqué le nombre de fois que cet échantillon (même ID sample, même ID plate) a été lu.

- d. Pour lire les 8 échantillons suivants, essuyer les piédestaux (haut et bas) Poser la série d'échantillons suivants.
- e. **Tous les runs (16 échantillons) vérifier que le zéro est encore correct**, au moment de l'essuyage des piédestaux, remettre 2 $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O et lancer une mesure. Dans le cas contraire refaire le blanc.


#### EXPORT DES DONNEES

- a. Pour exporter les données sous forme de fichier Excel, aller dans l'onglet « show report » puis, dans la fenêtre cliquer sur « report » et **save report**, donner un nom (le nom du plate ID) au fichier, et le sauvegarder. Pour son exploitation au format EXCEL, aller dans ND8000/Data/report et ouvrir le fichier sauvegardé, puis l'enregistrer sous format Excel 4.0. vers le fichier « report Nannodrop sur le bureau de l'ordinateur.
- b. A la fin des dosages, nettoyer les piédestaux à l'aide d'eau distillée (2 fois), puis fermer l'appareil, ranger dans son étui plastique poser la mousse sur le portoir des plaques, puis déconnecter l'appareil à l'ordinateur.
- c. COCHER l'entretien/nettoyage du nannodrop sur la FEN-39



***Toujours vérifier que les piédestaux supérieurs et inférieurs créent un canal de liquide avec la goutte d'échantillon déposée.***

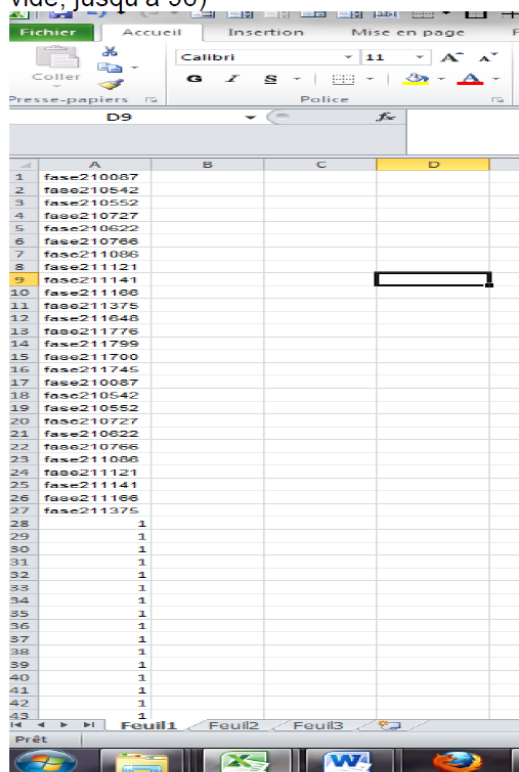
Date de création : 04/03/2010 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de modification : 27/05/2015 Visa Approbateur : J.Weissenburger 4/12
--	---

	<b>Mode opératoire de dosage des Acides nucléiques Nanodrop SP03</b>	<b>MOD-04-v2</b>
---	--	------------------

***IDENTIFIANT DES ECHANTILLONS A DOSER SUR FICHIER  
EXCEL***

---

Avant démarrage du logiciel, ouvrir le fichier d'échantillons à doser. (si il y en a moins de 96, compléter la colonne EXCEL par une valeur neutre (« 1 ») pour toute case vide, jusqu'à 96)



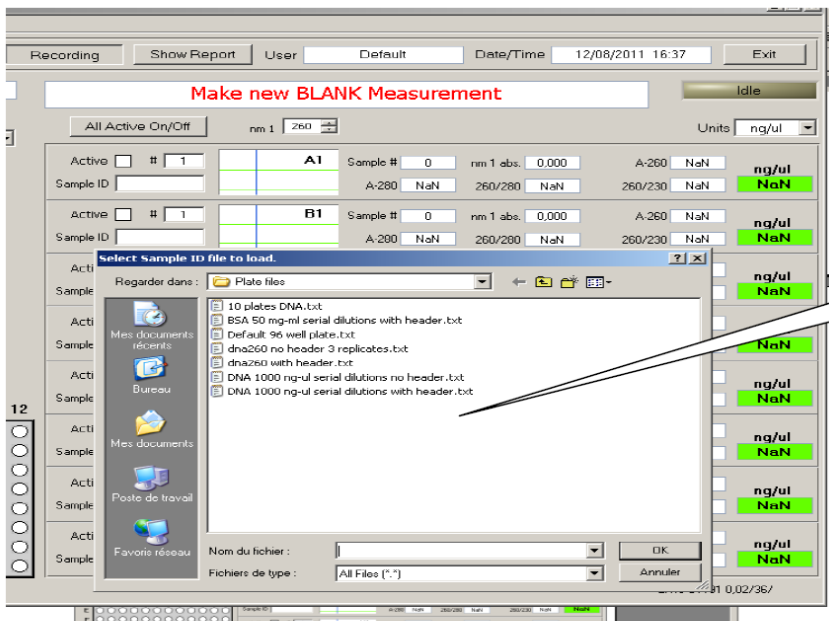
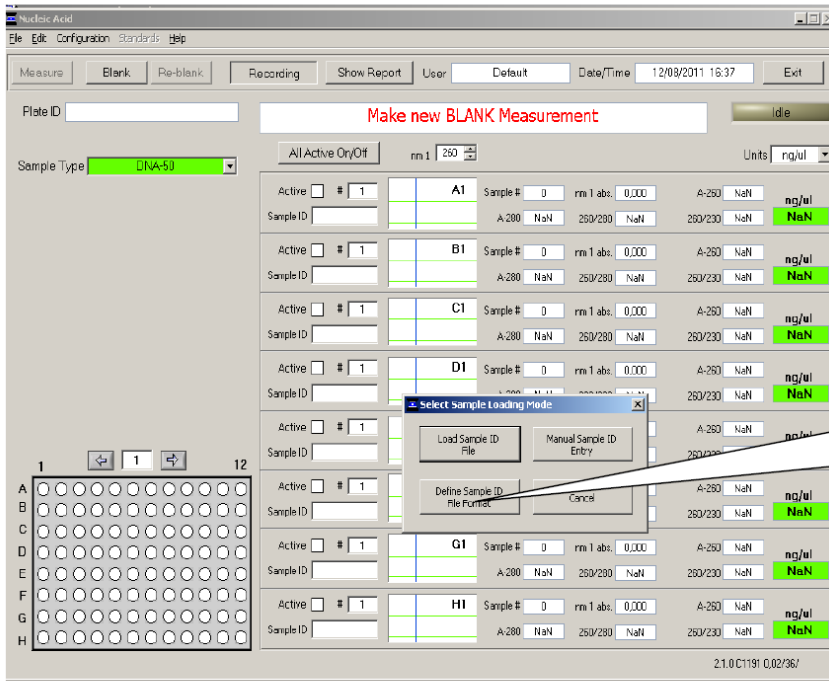
Enregistrer cette feuille sous le format « NOM DU RUN Autopure.TXT », puis Démarrer le logiciel du nannodrop. Après le choix de l'élément à doser, choisir le téléchargement de portoir.

Date de création : 04/03/2010 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de modification : 27/05/2015 Visa Approbateur : J.Weissenburger 5/12
--	---



**Mode opératoire de dosage des Acides nucléiques  
Nanodrop SP03**


**MOD-04-v2**

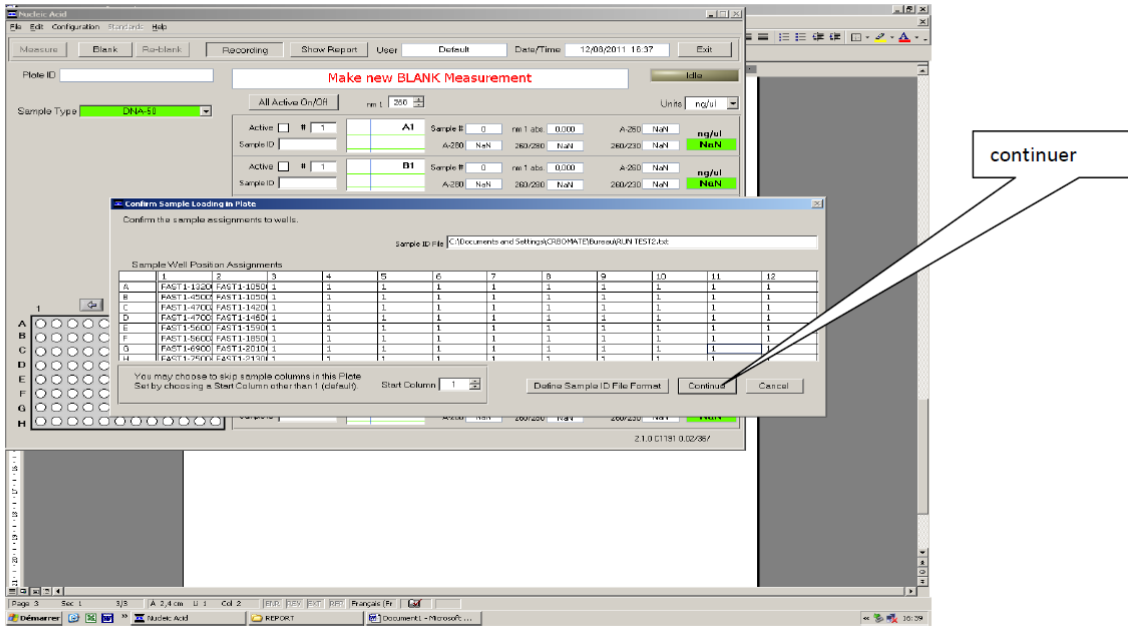


Date de création : 04/03/2010  
Visa rédacteur : V. Jodon

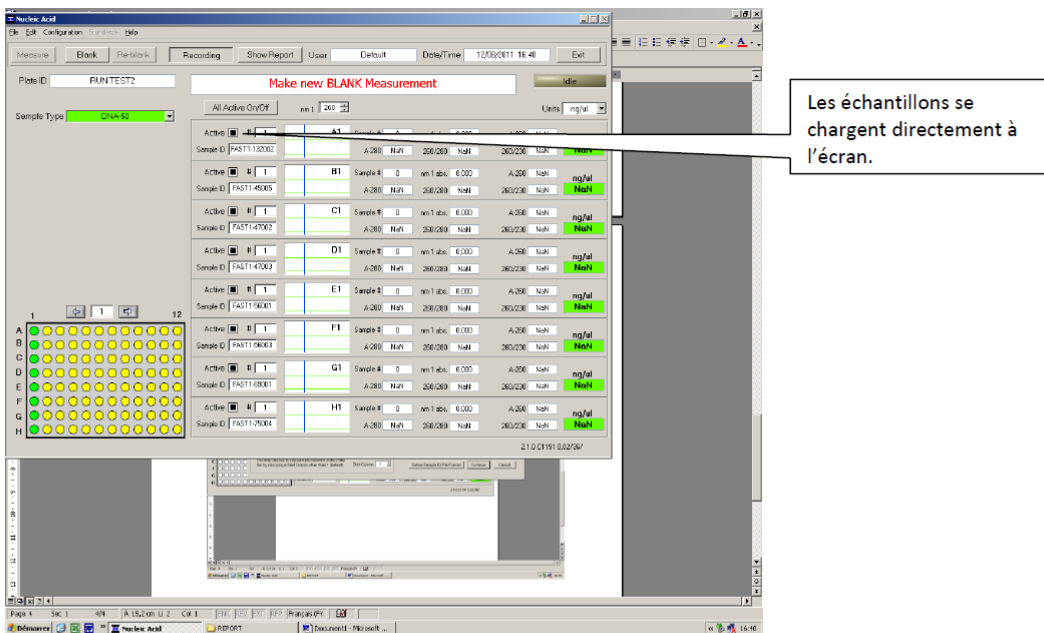
Date de modification : 27/05/2015  
Visa Approbateur : J.Weissenburger

6/12


	<b>Mode opératoire de dosage des Acides nucléiques Nanodrop SP03</b>	<b>MOD-04-v2</b>
---	--	------------------



Lorsque les ID sont téléchargées elles le sont au format 96 puits.



Date de création : 04/03/2010 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de modification : 27/05/2015 Visa Approbateur : J.Weissenburger 7/12
--	---

	<b>Mode opératoire de dosage des Acides nucléiques Nanodrop SP03</b>	<b>MOD-04-v2</b>
---	--	------------------

### PRECAUTIONS PARTICULIERES LORS DES MESURES : LA QUALITE

Les critères de qualité sont :

1,7 <DO260/280< 2

Il est donc important que la solution à doser soit bien homogène !

Si lors d'une mesure, les valeurs sont invalides, refaire les mesures sachant que celle-ci (si le technicien a bien suivi le protocole) doivent être proches.

Une différence de plus de 50% entre 2 mesures n'est pas acceptable. Cette mesure doit alors être effectuée 8 fois (1 goutte sur chaque piédestal). De préférence refaire ces mesures à la fin de la série enregistrée.

### MAINTENANCE PARTICULIERE

#### Reconditionning

Si le pont de liquide ne se forme plus avec 1µL d'eau, ou que la surface de mesure a été compromise utiliser le « Pedestal reconditionning » PR-1 (se trouve dans le meuble sous paillasse du laboratoire 1207C n°1)

Prendre un applicateur mettre de PR-1 sur la pointe, et appliquer une fine couche du PR-1 sur le piédestal (haut et bas). Attendre 30 secondes. Passer un mouchoir tissé et enlever le PR-1 par frottement énergique (pas trop !) un résidu noir sur le papier est normal

Mettre 1 µL d'eau et vérifier qu'un pont de liquide se forme bien.

#### La calibration

- Nettoyer les piédestaux
- Ouvrir la fenêtre de « calibration check » : (Tools et configuration tab> Utilities et diagnostic> calibration check.)
- Entrer l'absorbance ciblée dans la boîte pop-up « target absorbance@350 nm 1 nm pathlength».La valeur du CF-1 est visible sur l'étiquette de l'ampoule.
- Mettre dans 8 tubes 60µL d'H2O
- Utiliser une pipette MULTICANAUX pour éviter toute évaporation.
- Déposer 1,5 µL d'H2O sur chaque piédestal, et faire un blanc. Essuyer avec du papier mouchoir tissé.
- Mixer soigneusement la solution CF-1 dans l'ampoule, en secouant vigoureusement l'ampoule. pipeter au fond et aliquoter 60µL de solution dans 8 nouveaux tubes
- Déposer 1,5 µL de solution et baisser les piédestaux supérieurs puis lancer « Measure »
- A la fin de chaque mesure retirer la solution sur les piédestaux, et changer de cones
- Faire 5 lots de mesures.
- A la fin, les résultats s'affichent à l'écran. Imprimer les résultats (la copie se trouve dans le fichier « ND-8000\Data\calib »

Date de création : 04/03/2010 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de modification : 27/05/2015 Visa Approbateur : J.Weissenburger 8/12
--	---

## Annexe 10 : MOD de génotypage par l'étude de SNP en RT-PCR

	<b>GENOTYPAGE PAR L'ETUDE DES SNP A L'AIDE DE LA PCR EN TEMPS REEL (TECHNOLOGIE TAQMAN®)</b>	<b>MOD-32-V0</b>
---	--	------------------

### I. GENERALITES :

#### DOCUMENTS ASSOCIES AU MODE OPERATOIRE

Libellé	Code document
Utilisation de l'automate de PCR en temps réel Viiia7	En cours de validation
Utilisation du scelleur semi-automatique (4titude)	En cours de validation
Entretien du Viiia7	En cours de validation
Feuille d'enregistrement du run de génotypage	En cours de validation
Feuille d'enregistrement de contrôle qualité des RBs en plaque 96 puits	En cours de validation

#### 1. OBJECTIF

L'étude des SNPs permet de visualiser le polymorphisme de séquence de l'ADN dû à une substitution nucléotidique à un locus donné. Elle permet de savoir si un individu est homozygote (2 allèles identiques) ou hétérozygote (2 allèles différents) pour cette mutation du gène.

#### 2. PRINCIPE

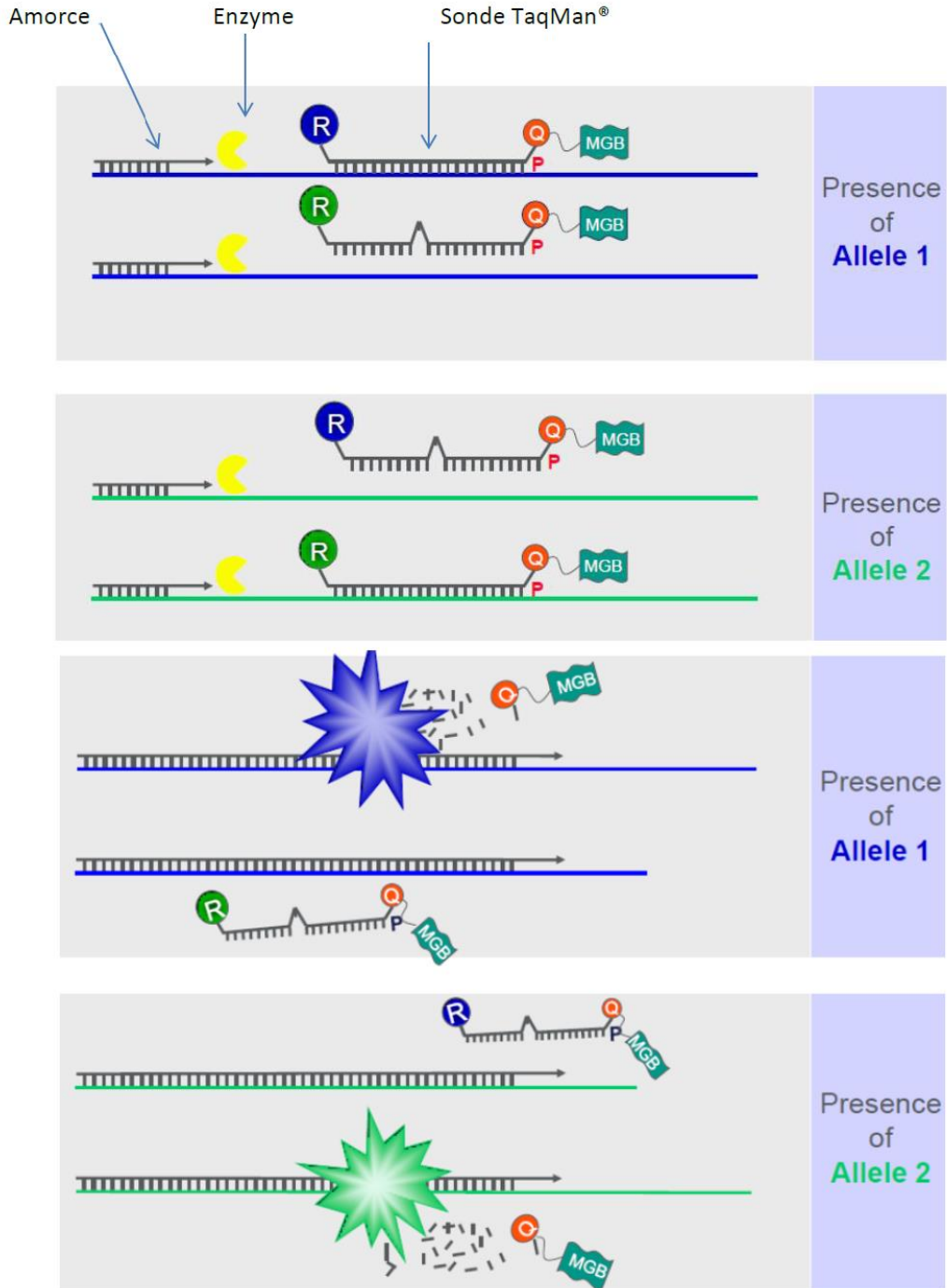
Pour identifier les SNPs, la méthode utilisée est la PCR en temps réel, et plus particulièrement avec la technique TaqMan®. De courtes sondes (environ 20 nucléotides) complémentaires de la séquence contenant le SNP vont s'hybrider à l'ADN en plus des amorces qui encadrent la séquence à amplifier. Lorsque l'ADN polymérase arrivera au niveau de la sonde TaqMan® celle-ci sera digérée grâce à l'activité exo nucléase de l'enzyme. La destruction de la sonde va créer un signal lumineux capté par l'appareil à PCR.

Chacune des sondes correspondantes à un allèle est marquée avec un fluorochrome différent. Si le signal obtenu équivaut à un seul fluorochrome alors l'individu est homozygote pour l'allèle donné. Sinon si le signal est double, l'individu est hétérozygote.

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J. Weissenburger Page 1 sur 11
---	--



	<p align="center"><b>GENOTYPAGE PAR L'ETUDE DES SNP A L'AIDE DE LA PCR EN TEMPS REEL (TECHNOLOGIE TAQMAN®)</b></p>	<p align="center"><b>MOD-32-V0</b></p>
---	--	--



<p>Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V.Jodon</p>	<p align="right">Date de révision : Visa Approbateur : J. Weissenburger Page 2 sur 11</p>
---	---



	<b>GENOTYPAGE PAR L'ETUDE DES SNP A L'AIDE DE LA PCR EN TEMPS REEL (TECHNOLOGIE TAQMAN®)</b>	<b>MOD-32-V0</b>
---	--	------------------


## II. MODE OPERATOIRE

### 1. MATERIEL NECESSAIRE

MATERIEL	EMPLACEMENT	SPECIFICITE
Equipement de protection individuelle (EPI)	Meuble « Hygiène » pièce 1207b	Gants
	Placard pièce 1203	Blouse
Station de travail PCR	Pièce 1206b	Préparation et distribution du mix
TaqMan® SNP Genotyping Assays	-20°C pièce 1205	Dilué au 20X et aliquotés sous 50 µl.
TaqMan® Genotyping Master Mix	+4°C pièce 1206	Flacon contenant l'enzyme et les dNTP et un dye de calibration (ROX)
H2O RNase DNase Free	RT pièce 1206b	Issue du kit d'extraction d'ADN de préférence, sinon du kit d'extraction d'ARN
Plaque P384 (4titude)	Pièce 1207c	Plaques standards pour utilisation avec le bloc standards 384.
Pipette multicanaux (eppendorf)	Pièce 1207c	Manuelle ou électronique (0.5-10µl)
Films optiques Clear Seal (4titude)	Pièce 1207c	Films transparents utilisables avec le scelleur semi-automatique
Films Peel seal (eppendorf)	Pièce 1207c	Films pour stockage utilisables avec le scelleur semi-automatique
Pointes à filter low retention (eppendorf)	Pièce 1207b	20 µl (et 10 µl) pour la préparation de la plaque + 200 µl et 1000µl pour la préparation du Mix.
RNase Away	Pièce 1206b	Décontaminant
Mini centrifugeuse	Pièce 1206b	Pour la préparation du mix
Plaque 96 puits quelconques	Pièce 1207c	Pour faciliter le prélèvement du mix à la pipette multicanaux (plaque de transfert)
Film aluminium adhésifs	Pièce 1207c	Protection de la P384 avant scellage

REM : Les amorces et sondes SNPs nécessaires pour l'étude des SNP déterminés, ont été au préalable définies et soit commandées directement soit désignées puis commandées chez Life technologies. Elles se présentent sous le kit **TaqMan® SNP Genotyping Assays**.

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J. Weissenburger Page 3 sur 11
---	--

	<b>GENOTYPAGE PAR L'ETUDE DES SNP A L'AIDE DE LA PCR EN TEMPS REEL (TECHNOLOGIE TAQMAN®)</b>	<b>MOD-32-V0</b>
---	--	------------------

## 2. PREPARATION DES REACTIFS

- a. Le **TaqMan® SNP Genotyping Assays** doit être utilisé au 20X.  
La solution stock peut être au 40X ou au 80X selon la taille du kit et se conserve à -20°C.
  - Préparation de la solution d'utilisation au 20X :
    - Diluer votre solution dans de l'eau DNase Free pour obtenir une concentration de 20X
    - Aliquoter la solution à 50µl en microtubes 0.5 ml préalablement étiquetés avec le nom du SNP et le lot.
    - Ranger les tubes dans une boîte identifiée et conserver à -20°C (pièce 1204).
- b. Le **TaqMan® Genotyping Master Mix** est quant à lui déjà à la concentration d'usage (2X) et se conserve à +4°C.

## 3. PREPARATION DE PLAQUES ET LANCEMENT D'UN RUN DE RT-PCR

L'ADN à géotyper a été aliquoté dans des plaques 96 puits à une concentration comprise entre 1 et 50 ng/µl.

Le volume total d'une réaction inclus le volume du mix réactionnel plus le volume de l'ADN.

### A. Préparation du mix réactionnel

1. Sortir du congélateur les plaques 96P contenant les ADN à analyser. Les laisser décongeler à température ambiante sous agitation pendant que vous préparez et distribuez le mix.

Calculer le nombre de réactions à réaliser **pour chaque SNP**. Le nombre de réaction est égale à :

X ADN à géotyper

+ 2 réactions sans ADN (NTC) + si possible 1 CTL positif.

+ 2 ou 3 réactions supplémentaires pour obtenir un nombre pair

2. Calculer le volume de chaque composant du mix en fonction du nombre de réactions déterminées plus haut et en se référant au tableau ci-dessous et émarginé la FEN-80

Type de plaque	Volume total de la réaction (µl)	Volume (µl) de TaqMan Genotyping Master Mix (2X)	Volume (µl) de TaqMan genotyping assay mix (20X)	H2O DNase Free (µl)
384 puits (384P)	5	2,5	0,25	1,25

3. Préparer le mix réactionnel

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J. Weissenburger Page 4 sur 11
---	--

	<b>GENOTYPAGE PAR L'ÉTUDE DES SNP A L'AIDE DE LA PCR EN TEMPS REEL (TECHNOLOGIE TAQMAN®)</b>	<b>MOD-32-V0</b>
---	--	------------------



**Les étapes suivantes sont à réaliser sous la station de travail (pièce 1206b)**

Avant de démarrer toute manipulation, nettoyer le plan de travail et la pipette multicanaux avec du RNase Away. Assurez-vous d'avoir à disposition tout le matériel nécessaire. (pointes, plaque 384P, portoir, pipettes,....)

**REM : Chaque SNP possède son propre mix !**

Préparer un tube de Mix / SNP avec successivement :

- le volume nécessaire d'H2O
- Après Homogénéisation douce du Master Mix par retournement, le volume nécessaire de Master Mix 2X.
- Après avoir décongelé, vortexé puis centrifugé les sondes, le volume de SNP nécessaire
- Vortexer le tube pour bien mélanger les 3 solutions.
- Faire un court spin afin d'éliminer les bulles et faire descendre les gouttes.

**B. Distribution du mix réactionnel**

1. Avec une pipette monocanale, répartir un même volume de mix dans 8 puits d'une même colonne d'une plaque 96P pour faciliter le prélèvement à la pipette multicanaux.  
(vol max / pts = 200 µl)
2. Distribuer **4 µl de mix** dans chacun des puits de la plaque 384P en fonction de votre plan de plaque et à l'aide d'une pipette multicanaux 0.5 – 10 µl électronique ou manuelle. (Utiliser des pointes de 20 µl LoRetention)
3. Vérifier que les puits désirés ont du mix. Sortir la plaque 384P de la hotte en ayant pris le soin de la recouvrir d'un film aluminium.
4. A la fin de la manip sous la station de travail, nettoyer le plan de travail, vider votre poubelle et lancer les UV pendant 30 minutes.

**C. Distribution des échantillons d'ADN**



**Les étapes suivantes sont à réaliser sur la paillasse ADN (pièce 1207b)**

1. Vortexer et centrifuger la plaque d'ADN préalablement sorties à 1500 rpm 30 secondes.

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J. Weissenburger Page 5 sur 11
---	--

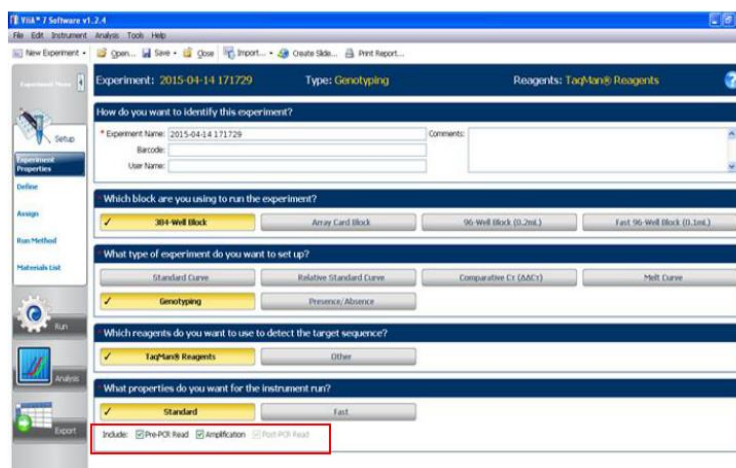
	<b>GENOTYPAGE PAR L'ETUDE DES SNP A L'AIDE DE LA PCR EN TEMPS REEL (TECHNOLOGIE TAQMAN®)</b>	<b>MOD-32-V0</b>
---	--	------------------

2. Prélever **1 µl d'ADN** à l'aide d'une pipette multicanaux 0.5 – 10 µl électronique ou manuelle et le déposer dans la plaque 384P. (Pointes 10 ou 20 µl LoRetention)
3. Ajouter 1µl H2O dans les puits NTC à la pipette monocanale (2 µl)
4. Vérifier qu'aucun puits n'a été oublié.
5. Sceller la plaque 384P avec un film optique Clear Seal (T°=170°C, temps = 3 s).
6. Vortexer et centrifuger la plaque 384P pour éliminer les bulles d'air. (1500rpm 1min)
7. Vérifier l'homogénéité des volumes. Si des anomalies de volume sont détectées, les annoter sur le plan de plaque.  
Assurez vous que les éventuelles bulles d'air présentes soient disposées en haut du liquide et non dedans. Elles éclateront lors de la montée en température de la plaque une fois dans l'appareil.  
  
Inscrire au marqueur sur le bord de la plaque le nom de la réaction.
8. Re-sceller les plaques 96P d'ADN avec un film Peel Seal (T°=170°C, temps = 3 s).

### C. Lancement de la PCR

Cf MOD-31 : utilisation de l'automate Viia7.

1. Dans la page de propriétés de l'expérience, après avoir nommé votre expérience, sélectionner les paramètres relatifs au génotypage : block 384, Génotyping, TaqMan reagents, mode standard, et inclure les lectures Pré-PCR et Amplification.

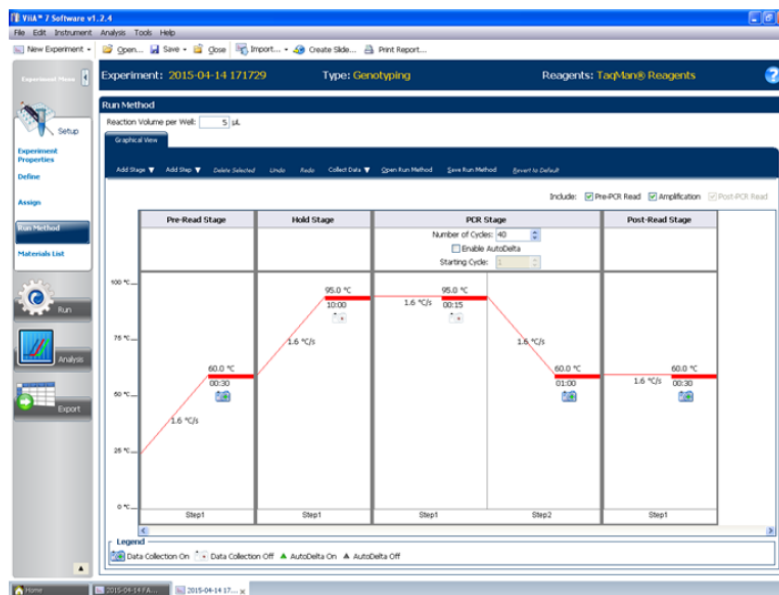


Date de création : 31/08/2015  
Visa rédacteur : V.Jodon

Date de révision :  
Visa Approbateur : J. Weissenburger  
Page 6 sur 11

	<b>GENOTYPAGE PAR L'ETUDE DES SNP A L'AIDE DE LA PCR EN TEMPS REEL (TECHNOLOGIE TAQMAN®)</b>	<b>MOD-32-V0</b>
---	--	------------------

2. Dans la Run Method, entrer le volume réactionnel (5µl) et conserver le programme par défaut. Si vous utilisez un protocole spécifique, précisez le sur la FEN-80 et penser à modifier le nombre de cycles PCR, supprimer ou ajouter des étapes ou adapter la température.



3. Pour la création du plan de plaque et le lancement proprement dit du run, reportez-vous au MOD-31 (Utilisation de l'automate Viia7)

### III. ANALYSE DES RESULTATS : DISCRIMINATION PAR LECTURE DE PLAQUE

A la fin de la PCR, l'appareil réalise une lecture de plaque au point final. En utilisant les mesures de fluorescence détectée pendant la lecture, le logiciel détermine les valeurs de Rn pour chaque signal provenant de chaque puits. (1 puits est représenté par un point/carre/croix selon les cas).

**Rn** (normalized reporter): Rapport entre l'intensité de fluorescence émise par le dye rapporteur (FAM, VIC,...) et l'intensité de fluorescence émise par la référence passive (ROX).

**ΔRn** : La différence entre le Rn et la ligne de base (Baseline)

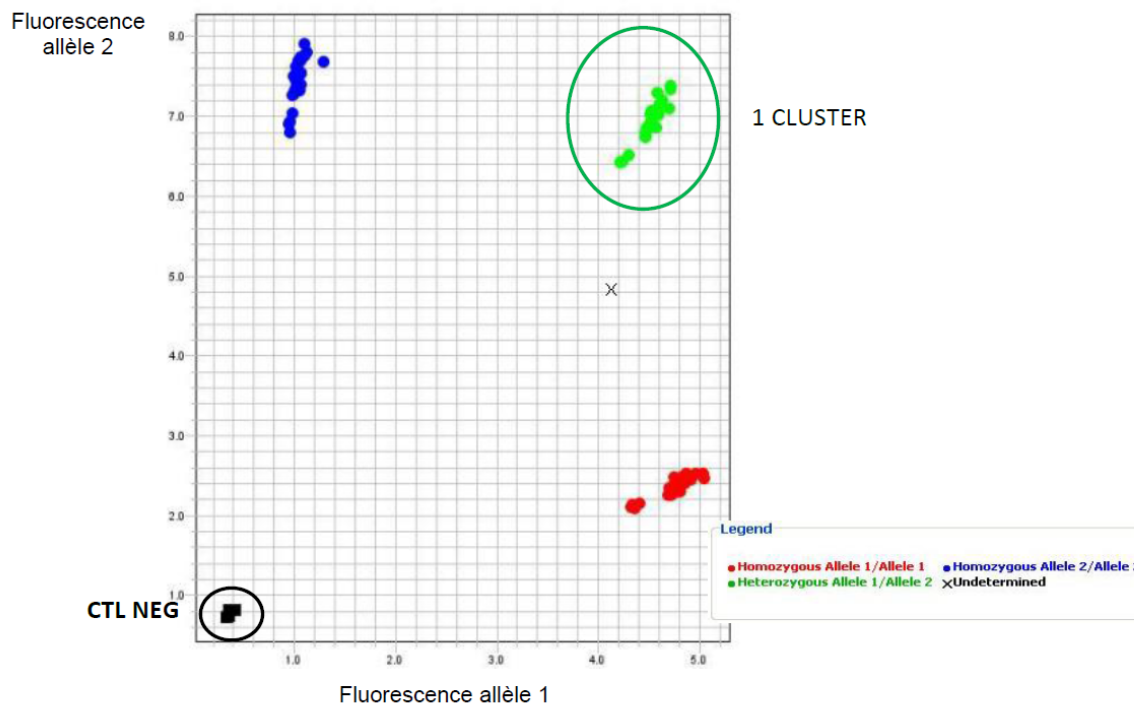
Le **seuil** (threshold) : Valeur de ΔRn où le signal est suffisant pour être mesuré avec précision.

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J. Weissenburger Page 7 sur 11
---	--

	<p align="center"><b>GENOTYPAGE PAR L'ETUDE DES SNP A L'AIDE DE LA PCR EN TEMPS REEL (TECHNOLOGIE TAQMAN®)</b></p>	<p align="center"><b>MOD-32-V0</b></p>
---	--	--

### A. Résultats attendus

Les résultats sont présentés sous la forme d'un graphique de discrimination allélique :



Chaque puits est représenté par un point sur le graphique.

Les contrôles NEG définissent l'origine du graphique et sont représentés par un carré noir.

Les nuages de points forment ce que l'on appelle des clusters.

### B. Points de vérification

Dans le menu Analysis, plusieurs onglets permettent de visualiser les courbes d'amplification et de température obtenues, le QC summary et le graphique de discrimination allélique (Allelic discrimination Plot).

#### I. Courbe d'amplification :

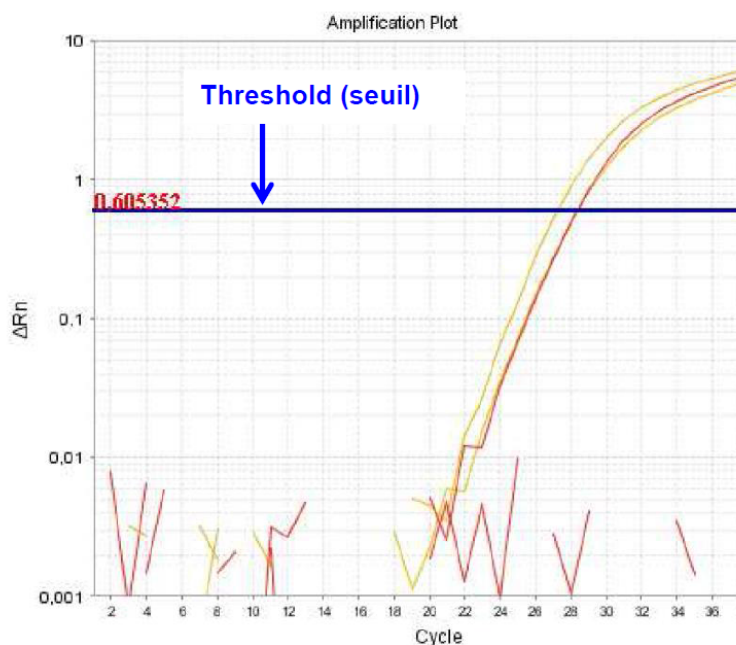
Généralement observée en échelle logarithmique pour bien voir la partie exponentielle correspondante à l'amplification et le début du plateau.

<p>Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V.Jodon</p>	<p>Date de révision : Visa Approbateur : J. Weissenburger Page 8 sur 11</p>
---	---



	<b>GENOTYPAGE PAR L'ÉTUDE DES SNP A L'AIDE DE LA PCR EN TEMPS REEL (TECHNOLOGIE TAQMAN®)</b>	<b>MOD-32-V0</b>
---	--	------------------

Exemple d'une courbe standard correcte :

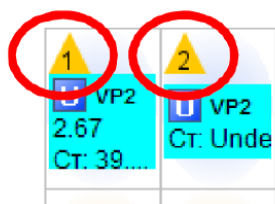


Le seuil est déterminé automatiquement, il se situe généralement au milieu de la phase exponentielle.

- ✓ S'assurer que la courbe d'amplification présente une allure correcte.

II. QC summary :

A la fin du Run, si un puits présente un problème il sera tagué par un triangle jaune appelé « FLAG » à l'intérieur duquel est indiqué le nombre de problèmes rencontrés.



Pour identifier le type de problème il faut se reporter au QC summary dans le Menu ANALYSIS.

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J. Weissenburger Page 9 sur 11
---	--

	<b>GENOTYPAGE PAR L'ÉTUDE DES SNP A L'AIDE DE LA PCR EN TEMPS REEL (TECHNOLOGIE TAQMAN®)</b>	<b>MOD-32-V0</b>
---	--	------------------

Flag	Name	Frequency	Wells
AMPNC	Amplification in negative control	0	
BADROX	Bad passive reference signal	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	19	C1, C2, C5, C6, C9, C10, ...
NOAMP	No amplification	22	B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, ...
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
SPIKE	Noise spikes	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	0	
ZPR	Zero Passive Reference	0	
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	22	B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, ...
BLFAIL	Baseline algorithm failed	0	
THOLDFAIL	Thresholding algorithm failed	0	
CTFAIL	Ct algorithm failed	0	

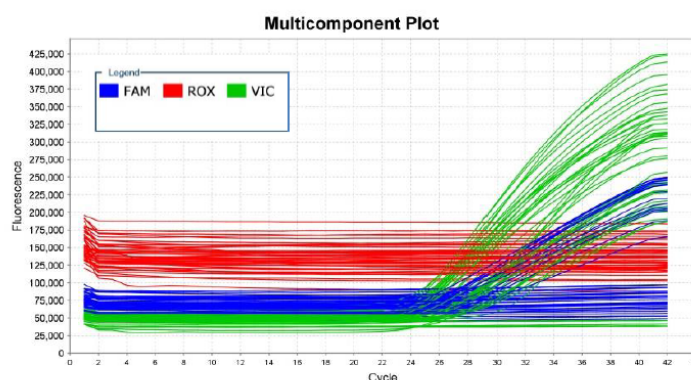
- ✓ Consulter le QC summary et identifier les flags et les échantillons concernés (notamment les No amplification). Emerger la FEN-80.

III. Graphique de discrimination allélique :

Les résultats obtenus sont représentés sous forme de clusters. Cliquer dans le graphique obtenu pour afficher les points correspondants à la légende. Chaque SNP a son propre graphique.

- ✓ Observer le graphique de discrimination allélique :
  - Clusters : identification, axe, dispersion des points,
  - Vérification des contrôles négatifs (Emerger la FEN-80)
  - Echantillons indéterminés : identifier les puits et noter la suspicion de génotype (Emerger la FEN-80)
  - Noter les échantillons non amplifiés à repasser (Emerger la FEN-80)

IV. Multicomponent plot



Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J. Weissenburger Page 10 sur 11
---	---



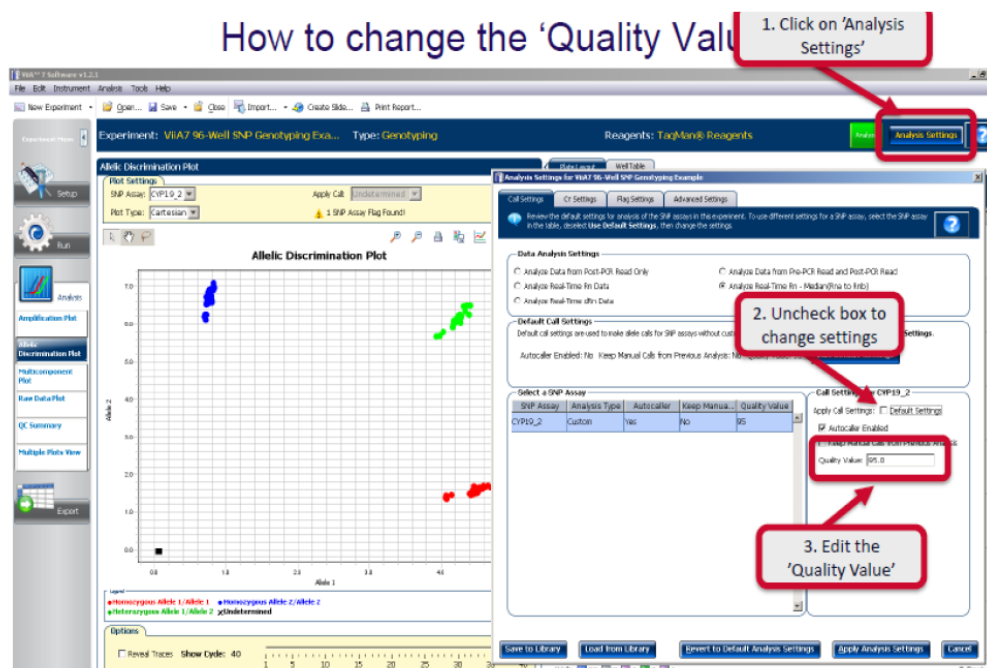
	<b>GENOTYPAGE PAR L'ETUDE DES SNP A L'AIDE DE LA PCR EN TEMPS REEL (TECHNOLOGIE TAQMAN®)</b>	<b>MOD-32-V0</b>
---	--	------------------

- ✓ Observer le multicomponent plot / signaux de fluorescence des dyes :
  - Etendu du ROX sur la totalité des échantillons (le signal du ROX doit rester constant tout au long de la manip et être équivalent d'un puits à l'autre). (Emarger la FEN-80)
  - Apprécier la cohérence entre les courbes de fluorescence et la discrimination allélique.

V. Paramètres modifiables


Les points non déterminés (x)n'appartenant à aucun cluster du fait de leur distance trop importante par rapport au cercle, peuvent être incorporés dans le cluster en modifiant la « Quality value » dans le menu Analysis settings en haut à droite.

La « Quality value » définit la limite de confiance pour l'analyse des clusters. Par défaut nous la conservons à 95%.



Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V.Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J. Weissenburger Page 11 sur 11
---	---

## Annexe 11 : MOD d'utilisation du ViiA 7

	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL ViiA7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	---	------------------

### I. GENERALITES

#### 1. DOCUMENTS ASSOCIES

- Livret Quick Reference Guide
- Classeur Getting Started Guides
- Classeur User Guide
- fiche des inventaires de fournitures externes (FEN-18)
- Check List d'entretien du ViiA7 (FEN-81)

#### 2. OBJET

Le ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems (AB)) est un appareil capable de détecter la fluorescence émise lors des PCR grâce aux réactifs utilisés afin de fournir :


- Une détection quantitative des séquences cibles d'acide nucléique en utilisant l'analyse en temps réel
- Une détection qualitative des cibles en utilisant l'analyse en point final (post-PCR)
- Une analyse qualitative des produits de PCR obtenus par l'analyse de la courbe de fusion post-PCR.

Il s'accompagne du logiciel ViiA™ 7 Real-Time PCR Software.

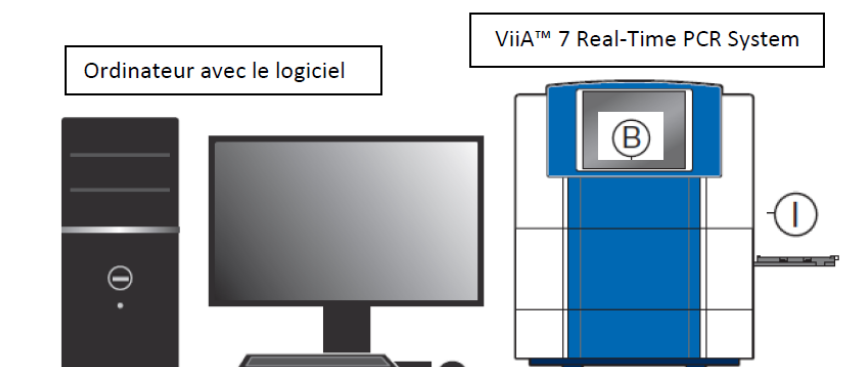
Cet appareil est utilisé principalement pour des expériences :

- D'expression de gènes
- De génotypage = analyse génomique des Single Nucléotide polymorphisme (SNP)

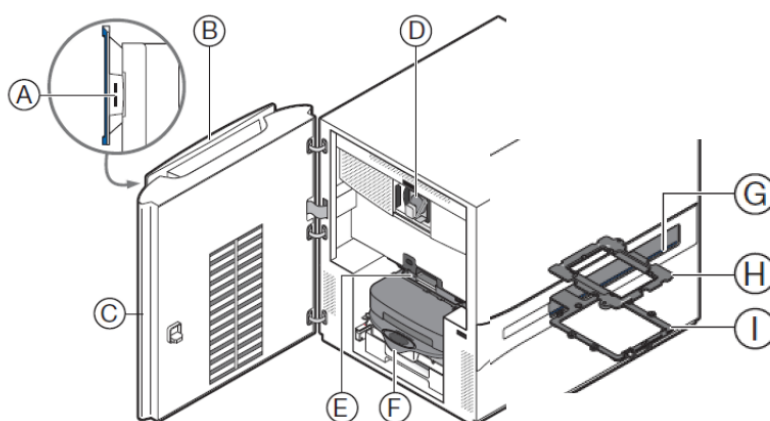
Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J.Weissenburger Page 1 sur 15
--	---

	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL</b> <b>ViiA7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	---	------------------

Représentation des différents éléments :




L'interface est tactile (B) et possède un port USB (A). L'intérieur de l'appareil est accessible en ouvrant la porte de la façade avant. (C) L'adaptateur de plaque (H) est positionné sur un support mouvant (I) qui sort sur le côté droit de la machine par une fente (G). La lampe (D) est la source d'excitation des fluorochromes (dyes). Le couvercle chauffant (E) permet le maintien de la température des échantillons lors des runs. Cet automate peut analyser les plaques 96 puits standards, les plaques 384 puits et les plaques 96 puits Fast grâce aux différents blocks. (F)



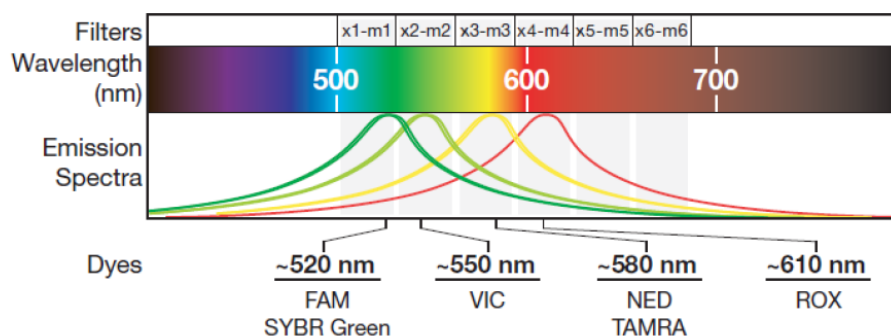
Le ViiA™ 7 Real-Time PCR System est composé de 6 filtres supportant tous les dyes commercialisés par AB. (FAM, VIC, NED, ROX, TAMRA, SYBR Green)

Il est aussi capable de réaliser des runs avec des dyes autres que ceux de AB s'ils sont excités entre 455 et 672nm, et émettent entre 505 et 723 nm.

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J.Weissenburger Page 2 sur 15
--	---

	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL</b> <b>ViiA7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	---	------------------


### Spectre d'émission des dyes AB



Plusieurs types d'expériences sont possible avec le ViiA™ 7 Real-Time PCR System :

- Standard Curve : méthode utilisée pour déterminer la quantité absolue de cible dans l'échantillon.
- Relative standard Curve et Comparative Ct experiments : méthodes utilisées pour déterminer la quantité relative de cible dans l'échantillon. La méthode Relative standard Curve permet de générer une courbe standard à partir de séries de dilutions alors que la méthode Comparative Ct experiments compare les Ct obtenus de chaque échantillon avec un échantillon de référence. Ces techniques sont communément utilisées pour comparer les niveaux d'expression d'un gène dans différents tissus, comparer les niveaux d'expression d'un gène dans des échantillons traitées et non traitées, comparer les niveaux d'expression d'allèles sauvages et mutées, analyser les changements d'expression de gènes au cours du temps suite à des conditions de traitement spécifique.
- Genotyping : méthode utilisée pour détecter les variants de SNP d'une séquence cible d'acide nucléique dans un échantillon.
- Presence/Absence : méthode utilisée pour détecter une séquence cible d'acide nucléique cible (analyse en point final).
- Melt curve : la courbe de fusion ou de dissociation est utilisée pour déterminer la température de fusion (T<sub>m</sub>) d'une séquence cible d'AN ou pour identifier des produits de PCR non spécifiques.

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J.Weissenburger Page 3 sur 15
--	---

	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL</b> <b>ViiA7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	---	------------------

## II. ETAPES DU MODE OPERATOIRE :


### 1. MATERIEL NECESSAIRE


MATERIEL	EMPLACEMENT	SPECIFICITE
Equipement de protection individuelle (EPI)	Meuble « Hygiène » pièce 1207b	Gants
	Placard pièce 1203	Blouse
ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Pièce 1207c	Automate de PCR en temps réel
Plaques multipuits 4titude (96 ou 384 puits)	Pièce 1207 c	Plaques standards pour utilisation avec le bloc standard
Films optiques Clear Seal (4titude)	Pièce 1207 c	Utilisable avec le scelleur semi-automatique (4titude)
Station de travail PCR	Pièce 1206b	Préparation et distribution du Mix
Pointes à filtres low retention (ependorf)	Pièce 1207b	20 µl (et 10 µl) pour la préparation de la plaque + 200 µl et 1000µl pour la préparation du Mix.
Réactifs de PCR	Pièce 1207b et 1205	Master mix + assay mix
Pipette multicanaux	Pièce 1207c	Manuelle ou électronique (0.5-10 µl)
Blocks	Pièce 1207c	1 block pour plaque 384 1 block pour plaque 96 FAST
Heat cover (couvercle chauffant)	Pièce 1207c (valisette)	1 cover pour plaque 384 1 cover pour plaque 96 FAST
Adaptateur de plaque	Pièce 1207c	1 adaptateur pour plaque 384 1 adaptateur pour plaque 96 FAST

### 2. AVANT CHAQUE RUN

- a. Vérifier que block, adaptateur de plaque et couvercle chauffant adéquats soient installés (384 puits ou 96 puits FAST). Sinon les remplacer. (cf 6. OPERATIONS SIMPLÉS).

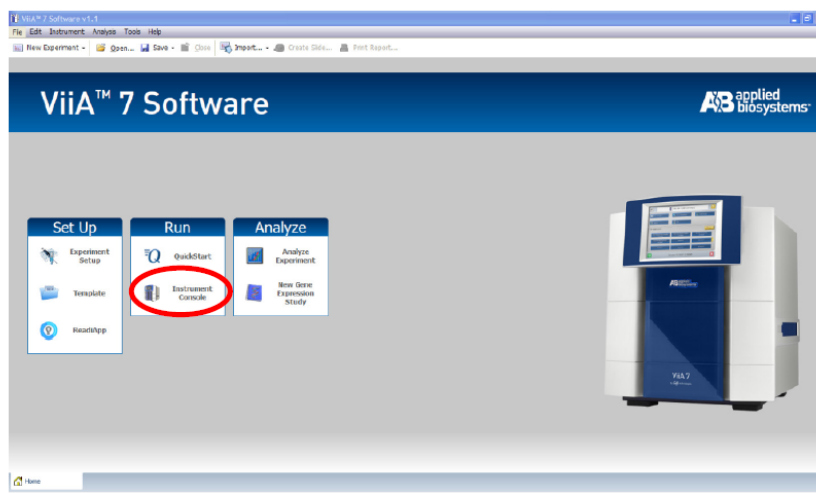
Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J.Weissenburger Page 4 sur 15
--	---

	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL Viia7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	---	------------------

- b. Allumer l'ordinateur puis l'appareil (interrupteur à l'arrière). Si l'appareil est déjà allumé et en veille, toucher l'écran et appuyer sur le symbole 

Vérifier que les calibrations ne sont pas expirées. Pour cela, lancer le logiciel en double cliquant sur l'icône du bureau.

Sur la page d'accueil, cliquer sur *Instrument Console*.




Sélectionner l'appareil (n° 278881586) et cliquer sur **Manage Instrument**.

*Remarque* : Si l'appareil n'a pas été ajouté à la liste My Instrument, l'ajouter en le sélectionnant et en cliquant sur **Add to My Instrument**.

A droite apparaissent les différentes calibrations, la date de dernière réalisation et le statut. Vérifier que le statut soit « **Current** » et non « **Expired** ».


**Si les calibrations sont expirées, les refaire avant tout lancement de run.** (cf 7. MAINTENANCE BI ANNUELLE)

### 3. LANCEMENT DU RUN

Appuyer sur le symbole  de l'écran tactile pour faire sortir le bras contenant le support de la plaque. Déposer la plaque sur le support en prenant soin de bien caler le coin en haut à gauche.

Date de création : 31/08/2015  
Visa rédacteur : V. Jodon

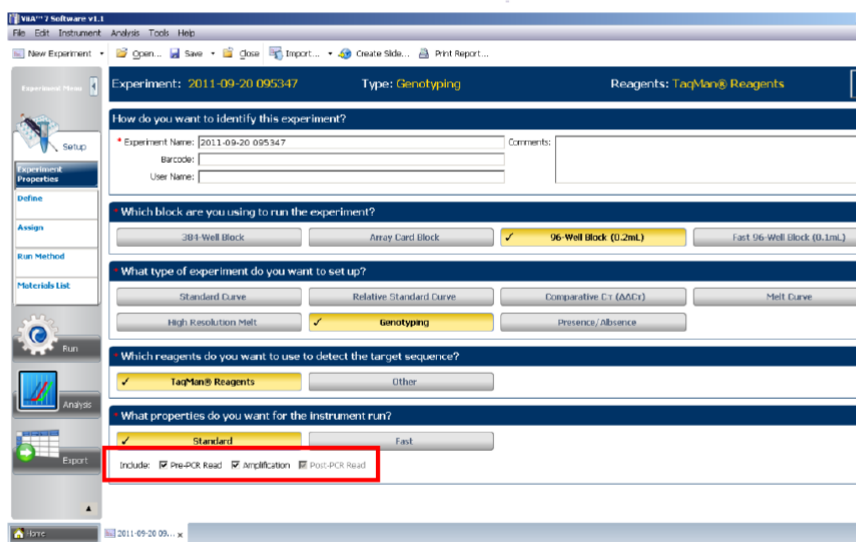
Date de révision :  
Visa Approbateur : J.Weissenburger  
Page 5 sur 15

	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL</b> <b>Viia7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	---	------------------

\*S'il s'agit d'une toute nouvelle manip :

- a. Dans la page d'accueil, cliquer sur **Experiment Setup**
- b. Dans le menu Setup à gauche, sélectionner **Experiment Properties** et renseigner les différents champs :

Experiment name	Choisir un nom pour l'expérience
Block or instrument type	Sélectionner le type de block
Type of experiment	Genotyping, Melt Curve, Standard Curve, Comparative Ct, Presence/Absence,...
Reagents	TaqMan® Reagents, SYBR® Green Reagents or Others
Run properties	Ramp speed (Standard or Fast) Génotyping et Presence/Absence: Collect of data (Pre-PCR read, Amplification or Post-PCR read) SYBR®Green: include melt curve or not Melt curve: include PCR or not



- c. Aller dans **Define** (Menu à gauche)

- Pour le génotypage : Définir les SNPs

Créer un nouveau SNP dans l'encart **SNPs** en cliquant sur > **New**

Entrée les informations demandées pour le SNP utilisé:

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J.Weissenburger Page 6 sur 15
--	---

	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL</b> <b>Viia7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	---	------------------

SNP Assay Name	
Assay ID	
Allele 1 Name or Base(s)	
Allele 1 Reporter	
Allele 2 Name or Base(s)	
Allele 2 Reporter	

Vous pouvez attribuer des couleurs à vos allèles et à vos SNPs.

- Pour les autres types d'expériences : définir les cibles (Targets)

Dans l'encart Target, entrer une nouvelle cible en cliquant sur > **New**  
 Préciser son nom, la nature des fluorochromes dans les menus déroulants (Quencher et reporter) et la couleur que vous souhaitez associer.

- Définir les échantillons

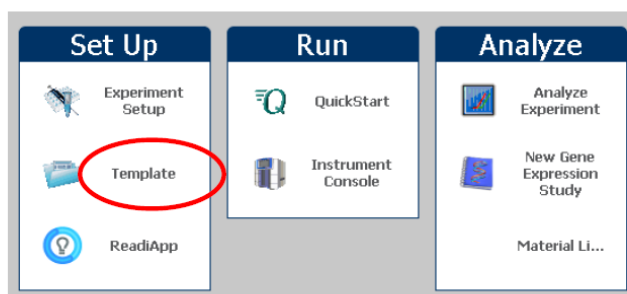
Ajouter un nouvel échantillon en cliquant sur **New**.  
 Rentrer son identifiant. Vous pouvez lui attribuer une couleur particulière ou laisser le choix automatique.

- Pour toutes les expériences sauf Presence / Absence :

Sélectionner la référence Passive. (ROX)


\*S'il s'agit d'une manip possédant déjà un template :

Ouvrir le template désiré : au niveau de l'écran d'accueil, dans l'encadré Set Up cliquer sur Template et sélectionner le fichier souhaité.



Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J.Weissenburger Page 7 sur 15
--	---



	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL</b> <b>Viiia7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	--	------------------

Nommer votre expérience dans « Experiment name »

Vérifier les paramètres.

Il est possible d'ajouter de nouveaux SNP, targets et/ou de nouveaux échantillons à ce template. (cf c.)

**d. Réaliser le plan de plaque :**

Aller dans Assign (Menu de gauche)

Assigner les échantillons, les SNPs ou les targets aux puits correspondants dans le tableau : cliquer sur un puits et sélectionner l'échantillon et le SNP ou la target appropriés

Ne pas oublier le NTC (No Template Control): cliquer sur le puits et modifier le statut (Task) de U(nknown) à N(TC) au niveau du SNP ou de la target correspondant.

Vérifier le plan de plaque une fois terminé.

*Remarque* : l'assignation des SNP ou des cibles doit être faite avant le lancement du run mais l'assignation des échantillons peut être faite avant, pendant ou après le run.

**e. Définir les conditions du Run**

Aller dans **Run Method** (Menu de gauche) : Le programme par défaut relatif au type d'expérience sélectionné s'affiche.

REM : si vous avez ouvert un template, le programme enregistré précédemment dans le template est celui qui s'affichera.

Définir les variables souhaitées à partir du programme standard ou pré-enregistré (template) :

- Volume réactionnel

**Le volume réactionnel est de 5 µl pour une 384P et 10 µl pour une 96P FAST**


- Profil thermique : temps et températures

**Des étapes peuvent être ajoutées ou supprimées.**


- Nombre de cycles

Cliquer sur *revert to default* pour revenir aux paramètres par défaut

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J.Weissenburger Page 8 sur 15
--	---

	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL</b> <b>Via7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	--	------------------

f. Sauvegarder le fichier en tant que **Template** (facultatif)

Aller dans **File > Save as Template**. Ou accès direct en cliquant sur  dans la barre de menu en haut puis **Save as Template**. Les Templates se reconnaissent grâce à l'extension de fichier \*.edt

g. Démarrer le Run

Cliquer sur **RUN** (Menu de gauche) puis **START RUN**. Cliquer sur le numéro de l'appareil qui s'affiche. (278881586)

Le logiciel vous demande d'enregistrer le fichier de run. Choisissez l'emplacement désiré. Le fichier de run ne comporte que les data enregistrés durant le Run. Ils se reconnaissent grâce à l'extension de fichier \*.eds.


Pendant le Run il est possible d'observer les courbes d'amplification et de température.


#### 4. FIN DU RUN

A la fin du run, le logiciel passe automatiquement dans l'onglet **Analysis**. Lancer une analyse en cliquant sur le bouton vert en haut à droite puis enregistrer une nouvelle fois les données en cliquant sur **save**.

Ejecter la plaque en touchant le symbole  sur l'interface tactile de l'appareil.

Récupérer la plaque, l'identifier et la conserver à 4°C si besoin, sinon l'éliminer comme DASRI.

Ranger le bras en appuyant de nouveau sur .

En fin de semaine, éteindre l'appareil en touchant le symbole  en bas à gauche de l'écran tactile puis une fois l'écran éteint, éteindre complètement l'appareil à l'aide de l'interrupteur.

#### 5. EXPORT DES DONNEES


Dans le menu de gauche, cliquer sur **Export**.

Sélectionner l'export en un seul ou plusieurs fichiers

Sélectionner l'ouverture automatique ou non du fichier après l'export

Date de création : 31/08/2015  
 Visa rédacteur : V. Jodon

Date de révision :  
 Visa Approbateur : J.Weissenburger  
 Page 9 sur 15

	<p align="center"><b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL</b> <b>Via7</b></p>	<p align="center"><b>MOD-31-V0</b></p>
---	---	--

Cliquer sur **Browse** pour sélectionner l'emplacement désiré pour le fichier d'export, vérifier le nom du fichier et sélectionner le type de fichier (Excel ou texte)

Choisissez le contenu du fichier :

- Sample setup data
- Raw data
- Amplification data
- Multicomponent data
- Results

Cliquer sur START EXPORT

## 6. OPERATION SIMPLES

Ces opérations se réalisent lorsque l'appareil est complètement éteint et refroidit. Le port de gants est obligatoire.

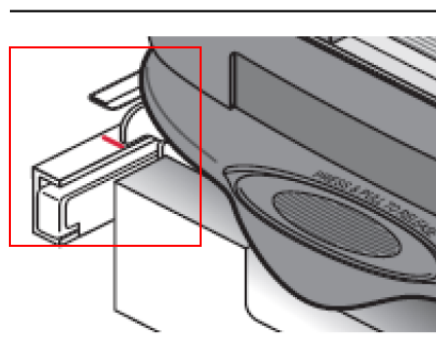
### A. CHANGEMENT D'ELEMENTS

Lorsque l'installation d'un nouvel élément est nécessaire, pensez à changer également les éléments associés.

#### ➤ **Changement de block :**


1. Ouvrir la porte d'accès.
2. Saisir la poignée du block, la presser vers le bas et tirer le block vers soi.
3. Déposer le block sur une surface propre et sèche.
4. Sortir le block souhaité et le positionner dans l'appareil.

**IMPORTANT :** Après avoir installé le block dans l'appareil, vérifier que l'indicateur blanc sur le côté gauche du block soit positionner derrière la ligne rouge présente sur le rail. Si l'indicateur est sur la ligne rouge, pousser légèrement le block jusqu'à ce qu'il soit positionner correctement.



Date de création : 31/08/2015  
Visa rédacteur : V. Jodon

Date de révision :  
Visa Approbateur : J.Weissenburger  
Page 10 sur 15

	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL</b> <b>Via7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	--	------------------

5. Fermer la porte d'accès.
6. Ranger le block laissé sur la paillasse à la place du block souhaité.
7. Connecter l'appareil et vérifier la prise en charge du nouveau block.

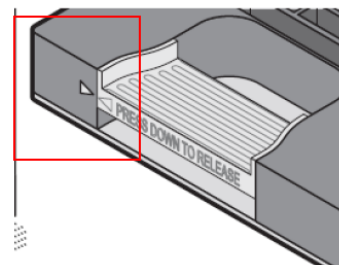
Lancer le logiciel et sélectionner *Instrument console*

Sélectionner l'instrument et vérifier le champ Block Type dans la fenêtre Instrument Properties à droite.

➤ **Changement de couvercle chauffant (Heat cover) :**

1. Ouvrir la porte d'accès.
2. Débloquer l'élément en pinçant la poignée argentée et tirer le couvercle vers soi.
3. Déposer l'élément sur une surface propre et sèche.
4. Installer le nouveau couvercle chauffant dans l'instrument.

**IMPORTANT :** Pour savoir si le couvercle est bien installé, la petite flèche située sur la poignée doit être alignée avec celle présente sur l'appareil. Pour cela, la poignée doit être en position haute.




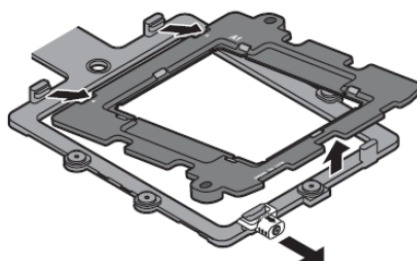
5. Fermer la porte d'accès.
6. Ranger le couvercle laissé sur la paillasse à la place du block souhaité.
7. Connecter l'appareil et vérifier la prise en charge du nouveau couvercle.

Lancer le logiciel et sélectionner *Instrument console*

Sélectionner l'instrument et vérifier le champ Block Type dans la fenêtre Instrument Properties à droite.

➤ **Changement d'adaptateur :**

1. Faire sortir le bras de l'appareil en cliquant sur .
2. Détacher l'adaptateur en tirant d'une main le petit piston en bas à droite et en soulevant l'adaptateur de l'autre main à partir du côté droit comme indiqué sur l'image.

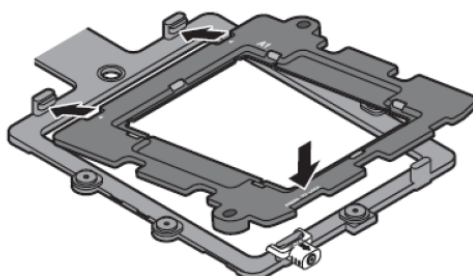



Date de création : 31/08/2015  
 Visa rédacteur : V. Jodon

Date de révision :  
 Visa Approbateur : J.Weissenburger  
 Page 11 sur 15

	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL</b> <b>ViiA7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	---	------------------

3. Installer le nouvel adaptateur en l'attachant d'abord par le bord gauche puis en pressant le coin bas de droite au niveau du piston comme indiqué sur l'image.



4. Refermer le bras en cliquant sur 

#### B. DECONTAMINATION DU BLOCK


1. Ouvrir la porte d'accès.
2. Saisir la poignée du block, la presser vers le bas et tirer le block vers soi.
3. Placer le block sur une surface propre et sèche.
4. Déposer un petit volume d'eau déminéralisée dans les puits à décontaminer.
5. Faire plusieurs va et vient à la pipette pour rincer le puits puis aspirer l'eau et jeter le cône.
6. A l'aide d'un coton-tige, frotter doucement l'intérieur des puits.
7. Essuyer le reste d'eau à l'aide d'un chiffon doux.
8. Repositionner le block dans l'appareil.
9. Fermer la porte d'accès.
10. Vérifier la décontamination en procédant à une BACKGROUND calibration.  
(cf. 7. E. MAINTENANCE BI ANNUELLE)

## 7. ENTRETIEN

### A. ENTRETIEN REGULIER (AVANT ET APRES CHAQUE RUN)

- Vérifier le statut de la lampe : La durée de vie de la lampe est d'environ 2000 heures.  
 Dans l'écran d'accueil cliquer sur **Instrument Console**  
 Sélectionner l'automate dans la liste pour afficher les fenêtres de statut à droite  
 Lire le statut de la lampe dans la fenêtre Maintenance Info.  
 Si nécessaire, la remplacer (Consulter le User Guide, chapitre 5, page 128) et réaliser les calibrations. (cf. 7. E. MAINTENANCE BI ANNUELLE)

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J.Weissenburger Page 12 sur 15
--	--

	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL Viia7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	---	------------------

#### B. ENTRETIEN JOURNALIER

- Vérifier la DASRI. La changer si nécessaire.


#### C. ENTRETIEN HEBDOMADAIRE

- Vérifier l'espace du disque. Si l'espace libre est inférieur à 20 %, transférer les fichiers les moins récents sur un autre support de stockage.
- Eteindre l'ordinateur rattaché à l'automate. Attendre minimum 30 minutes avant de la rallumer.
- Nettoyer la surface externe de l'appareil avec un chiffon doux non pelucheux.



**Ne pas utiliser de solvants organiques pour nettoyer le Viia7**

- Réaliser un « Instrument self test » :

Allumer l'appareil, dans le Main Menu sélectionner  **Tools** puis **Run Self Test**.  
Lancer le test en touchant **Start Self Test** et attendre que le test se termine (environ 10 minutes).  
Vérifier vous que tous les points de contrôle affiche le statut PASS.  
Connecter la clé USB dédié et cliquer sur **Save to USB** pour récupérer les résultats.  
Cliquer sur **OK** et déconnecter la clé.

#### D. ENTRETIEN MENSUEL

- Réaliser une calibration BACKGROUND afin de vérifier l'éventuelle contamination du block :  
Voir E. MAINTENANCE BI ANNUELLE
- Lancer un nettoyage du disque et une défragmentation du disque


#### E. ENTRETIEN BI ANNUEL

*Remarque :* Les calibrations sont à réaliser tous les 6 mois ou après le remplacement de la lampe.

Réaliser les calibrations en respectant l'ordre suivant :

- Regions of interest (ROI) calibration
- Background calibration
- Uniformity calibration
- Dye calibration

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J.Weissenburger Page 13 sur 15
--	--

	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL</b> <b>Viia7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	---	------------------

➤ Normalization calibration

1. Sortir les plaques du congélateur -20°C. Selon le cas, les plaques sont au format 96 puits ou 384 puits.
2. Les laisser décongeler plusieurs minutes dans leur emballage sur la paillasse.  
**Ne pas déballer les plaques tant que vous ne les utilisez pas, elles doivent être protégées de la lumière.**
3. Déballer la plaque **sans enlever le film optique** et conserver l'emballage.
4. Vortexer la plaque pendant 5 secondes puis la centrifuger 2 minutes à 1500 rpm maximum avant usage.
5. Vérifier que tout le liquide est bien au fond du puits sans bulle d'air. Si ce n'est pas le cas, re-centrifuger la plaque plus longtemps.
6. Dans l'écran d'accueil, cliquer sur **Instrument Console**
7. Sélectionner l'appareil (n°278881586) et cliquer sur **Manage Instrument**
8. Cliquer sur Maintenance. Choisir la calibration concernée et cliquer sur **Start Calibration**
9. suivre les indications de l'onglet SET UP.
10. Attendre la fin complète du RUN et l'affichage de l'écran d'analyse pour vérifier le statut de la calibration (Analysis statut et QC statut) :
  - Si « **Passed** » cliquer sur **Next** et récupérer la plaque. **Attention celle-ci peut être chaude.** La ranger dans son emballage et la remettre à -20°C.
  - si « **Failed** » consulter le Troubleshoot relatif à chaque calibration dans le User Guide chapitre 2.
11. Enregistrer la calibration.

#### F. ENTRETIEN PARTICULIER

- Lors de la première utilisation ou suite au déplacement de l'appareil, il faut vérifier la performance de l'appareil à l'aide de la RNase P calibration. C'est une plaque comme les autres plaques de calibration à l'exception qu'elle est à usage unique. Pour la réaliser se référer au User Guide chapitre 2 page 79.

## II. TROUBLESHOOTING

### A. CONTACTS


En cas d'interrogation, vous pouvez contacter :

la technico-commercial **Mme Christine CADOUX** par mail à [christine.cadoux@thermofisher.com](mailto:christine.cadoux@thermofisher.com) ou par téléphone au 01.69.59.85.34

### B. TROUBLESHOOTING

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J.Weissenburger Page 14 sur 15
--	--



	<b>UTILISATION DE L'AUTOMATE DE PCR EN TEMPS REEL</b> <b>Via7</b>	<b>MOD-31-V0</b>
---	--	------------------

- Problème à l'allumage du Via7 : Un message d'erreur apparait et l'appareil vous demande de lancer un Self Run Test (cf C. MAINTENANCE HEBDOMADAIRE).
- Problème de connexion entre l'ordinateur et l'appareil : Fermer le logiciel et attendre que l'appareil soit complètement allumé et démarré puis relancer le logiciel.
- Apparition d'un message d'erreur « **Instrument error Internal error in flagged command [Block raise error] Cover in sensor not detected** » = problème dans le positionnement du Heat Cover : Repositionner correctement le couvercle chauffant (cf 6.A)

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de révision : Visa Approbateur : J.Weissenburger Page 15 sur 15
--	--



## Annexe 12 : MOD d'utilisation du scelleur de plaque

	<b>MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU SCELLEUR DE PLAQUES SEMI-AUTOMATIQUE</b>	<b>MOD-30_v0</b>
---	--	------------------

### I. GENERALITES

#### 1. OBJET

Ce mode opératoire décrit le fonctionnement du scelleur automatique 4S3 (4titude), un scelleur chauffant, permettant de sceller des plaques multipuits à l'aide de films thermocollants. Ce mode opératoire présente :

- les consommables associés et l'utilisation du scelleur,
- la programmation du scelleur
- l'entretien du scelleur
- les résolutions de problèmes connus.

#### 2. DOCUMENTS ASSOCIES

- Plaquette d'utilisation 4titude plastifiée
- Le mode d'emploi du fabricant
- fiche des inventaires de fournitures externes (FEN-18)


### II. ETAPES DU MODE OPERATOIRE

#### A. MATERIEL NECESSAIRE

MATERIEL	EMPLACEMENT	SPECIFICITE
Plaques multipuits (96 ou 384 puits)	Pièce 1207 c	Compatibilité d'un grand nombre de plaques
Films optiques Clear Seal (4titude)	Pièce 1207 c	Films transparents optiques pour la RT-PCR
Films Peel Seal (4titude)	Pièce 1207 c	Film gris pour le stockage ou la PCR traditionnelle
Cadre de maintien	Pièce 1207 c	Empêche le film de s'enrouler sur lui-même
Adaptateur pour plaques 96 puits	Pièce 1207 c	A utiliser pour sceller les plaques 96 puits

Date de création : 31/08/2015  
rédacteur : V. Jodon

Date de mise à jour :  
Visa approuvateur : J.Weissenburger  
1/6

	<b>MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU SCELLEUR DE PLAQUES SEMI-AUTOMATIQUE</b>	<b>MOD-30_v0</b>
---	--	------------------

## 2. UTILISATION DU SCELLEUR

- a. Allumer le scelleur (interrupteur 0/1 au dos de la machine)

L'appareil affichera pendant quelques secondes la version du logiciel.

Il chauffera ensuite jusqu'à la température de scellage précédemment programmée (cf. 3. et 4.) en affichant la progression de la température du bloc en temps réel.

**Programme standard à utiliser : 170°C – 3 secondes**


Lorsque la température est atteinte, l'appareil émet une alarme sonore. (BIP)

- b. Appuyer sur le bouton OPERATE pour ouvrir le tiroir motorisé.
- c. Si nécessaire insérer l'adaptateur (pour les plaques 96 puits)
- d. Déposer la plaque sur son support
- e. Sortir le film adéquat et le déposer sur la plaque :
- Pour les films Peel Seal, mettre la face argentée côté plaque (face grise vers l'extérieur)
  - Pour les films Clear seal, mettre la face mate (face protégée) côté plaque.
- f. Pour les plaques 96 puits, utiliser le cadre de maintien. Les films Peel Seal ont tendance à s'enrouler sur eux même une fois sur la plaque. Insérer le cadre dans les bordures du support et positionner les bords du film sous les arrêtes de maintien.
- g. Appuyer sur OPERATE pour lancer le scellage.
- h. Après scellage, l'ouverture du tiroir est automatique.
- i. Récupérer la plaque. Vérifier l'étanchéité du scellage des puits en bordure.
- j. Fermer le tiroir en appuyant sur CLOSE. (sans déclenchement du scellage)
- k. Eteindre l'appareil (interrupteur 0/1 au dos de la machine)

REM 1 : le scelleur peut rester allumé pour un usage ultérieur, alors il se mettra à une température de veille (60°C). En cas d'oubli d'extinction de l'appareil (le soir notamment), celui-ci s'éteindra automatiquement au bout d'un temps donné (temps à programmer cf. 3.) Pour le sortir de veille, appuyer sur n'importe quelle touche.

REM 2 : Après le premier scellage, il est possible de refilmer la plaque environ 10 fois.

Date de création : 31/08/2015 rédacteur : V. Jodon	Date de mise à jour : Visa approbateur : J.Weissenburger 2/6
---	--

	<b>MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU SCELLEUR DE PLAQUES SEMI-AUTOMATIQUE</b>	<b>MOD-30_v0</b>
---	--	------------------

### 3. PROGRAMMATION DU SCELLEUR

❖ **Changer les paramètres de scellage : APPUI COURT SUR SET**

- a. Afficher les paramètres de température en appuyant sur le bouton SET. L'affichage de la température clignote.
- b. Changer la température en utilisant les flèches de montée et descente. La température peut être réglée entre 120 et 180 °C. Descendre la valeur à 120 °C entraîne l'arrêt du bloc chauffant.
- c. Valider en appuyant sur SET.
- d. Puis les paramètres de temps s'affichent en secondes et la lettre « t » clignote.
- e. Changer le temps de scellage en utilisant les flèches de montée et descente. Le temps de scellage peut être réglé entre 0 et 10 secondes avec implémentation par intervalle de 0,5 secondes.
- f. Valider en appuyant sur SET.

L'augmentation de température du bloc chauffant est indiquée en temps réel sur le cadran. La machine est prête à être utilisée dès que la température de consigne est atteinte (émission d'un BIP sonore).

❖ **Menu de la mise en veille, de l'arrêt de la machine, de la sonnerie : APPUI LONG SUR SET**

- a. Le symbole « L » clignote. Il permet de régler le temps avant la mise en veille. Il est suivi du temps affiché en minutes. Le temps avant la mise en veille peut être compris entre 1 et 99 min ou nul (symbole « no »). Utiliser les flèches pour régler le temps souhaité. Lors de la mise en veille l'appareil diminue sa température jusqu'à 60°C.

Valider en appuyant sur SET.

- b. La lettre « P » clignote. Le temps avant l'arrêt de la machine s'affiche. Ce temps est affiché en heures et peut être compris en 1 et 24 heures. Utiliser les flèches pour régler le temps souhaité.

Valider en appuyant sur SET.


- c. La lettre « S » clignote. Les paramètres de sonnerie s'affichent. Utiliser les flèches pour régler l'option Son (BIP) sur « on » ou « no ».

Valider en appuyant sur SET.

- d. La lettre « r » clignote. Valider en appuyant sur SET.

**Ce réglage doit impérativement afficher « ON »**

Date de création : 31/08/2015 rédacteur : V. Jodon	Date de mise à jour : Visa approbateur : J.Weissenburger 3/6
---	--

	<b>MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU SCELLEUR DE PLAQUES SEMI-AUTOMATIQUE</b>	<b>MOD-30_v0</b>
---	--	------------------

#### 4. PARAMETRES DE SCELLAGE

Paramètres conseillés avec les plaques 4titude, à adapter en fonction de la marque et des composants de la plaque (faire des tests)

Référence fabricant	Type de film	Plaque 96 puits	Plaque 384 puits
4ti-0531	Peel Seal	175-185°C / 3 secondes	170-175°C / 2-3 secondes
4ti-0541	Clear Seal	175-185°C / 2-3 secondes	165-180°C / 3 secondes

### III. ENTRETIEN DU SCELLEUR

#### 1. ENTRETIEN

L'appareil ne nécessite pas d'entretien régulier mais il doit impérativement être maintenu propre à l'extérieur.

L'extérieur de l'appareil une fois éteint, refroidi et déconnecté peut être nettoyé avec un chiffon imbibé d'eau ou d'éthanol.


#### 2. NETTOYAGE DU BLOC CHAUFFANT

Parfois il peut arriver que celui-ci présente des traces de colle suite à la disposition d'un film à l'envers ou à l'enroulement d'un film lors du scellage.

**! NE PAS TENTER DE NETTOYER LE BLOC CHAUFFANT SI CELUI-CI EST ENCORE CHAUD !**

- a. Allumer l'appareil.
- b. Programmer la température de scellage sur OFF. (cf 3.)
- c. Laisser refroidir l'appareil jusqu'à atteindre une température proche de la température ambiante.
- d. Ouvrir le tiroir en appuyant sur OPERATE
- e. Eteindre l'appareil et le débrancher.
- f. Allonger l'appareil sur le côté pour faciliter l'accès au bloc chauffant.

Date de création : 31/08/2015 rédacteur : V. Jodon	Date de mise à jour : Visa approbateur : J.Weissenburger 4/6
---	--

	<b>MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU SCELLEUR DE PLAQUES SEMI-AUTOMATIQUE</b>	<b>MOD-30_v0</b>
---	--	------------------

- g. Nettoyer le bloc à l'aide d'eau savonneuse et d'un chiffon humide.
  - h. Redresser l'appareil.
  - i. Assurer vous que rien n'obstrue le tiroir, reconnecter l'appareil et le mettre sous tension.
- Le tiroir se referme automatiquement.

#### IV. TROUBLESHOOTING

En cas de problème l'appareil peut afficher sur son écran des codes correspondants à des messages d'erreur.


Dans le même temps un signal sonore est émis. Pour connaître la signification du code d'erreur se référer au tableau ci-dessous :

Code Erreur	Message
Er1	Le système ne parvient pas à atteindre la position de démarrage dans le temps défini
Er2	La plate-forme mobile ne parvient à rester en position élevée
Er3	Le moteur ne parvient pas à lever la plate-forme mobile vers le bloc chauffant dans le temps défini
Er4	Le moteur ne parvient pas à ramener la plate-forme mobile en position basse dans le temps défini
Er5	Surintensité du moteur
Er6	La sonde de température est déconnectée
Er8	« Sonde de détection de la plate-forme en position basse » active pendant le mouvement d'élévation
ErA	Obstruction du tiroir lors de l'ouverture
ErB	Obstruction du tiroir lors de la fermeture

Le code restera affiché jusqu'à ce que le problème soit résolu. Pour supprimer l'erreur, presser CLOSE.

Si l'erreur persiste éteindre l'appareil et le rallumer.

Date de création : 31/08/2015 rédacteur : V. Jodon	Date de mise à jour : Visa approbateur : J.Weissenburger 5/6
---	--

	<b>MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU SCELLEUR DE PLAQUES SEMI-AUTOMATIQUE</b>	<b>MOD-30_v0</b>
---	--	------------------

Si le problème ne peut être résolu simplement, contactez l'ingénieur commercial de la société 4titude :

Mr Yohan ZEDE: 01.55.58.15.19 / 06.67.72.16.16 / yohann.zede@bio-technofix.com

Date de création : 31/08/2015 rédacteur : V. Jodon	Date de mise à jour : Visa approbateur : J.Weissenburger 6/6
---	--



## Annexe 14 : Feuille d'enregistrement d'un RUN de géotypage

	<b>Enregistrement RUN de géotypage</b>	<b>FEN-80-v0</b>
---	--	------------------

Date : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_      Technicien : \_\_\_\_\_      Nom de l'expérience : \_\_\_\_\_

SNP : \_\_\_\_\_      NOM des plaques ADN : \_\_\_\_\_      Nombre de cycles : \_\_\_\_\_      Nombre d'échantillons : \_\_\_\_\_

Volume de mix à préparer : \_\_\_\_\_ µl H2O + \_\_\_\_\_ µl de Master mix + \_\_\_\_\_ µl SNP      Vol/puits à déposer dans plaque de transfert : \_\_\_\_\_

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C																								
D																								
E																								
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

Points de vérification :      Flags : \_\_\_\_\_      Nombre de NA (non amplifié) : \_\_\_\_\_


Check des NTC :  OK     Amplification (précisez le(s) puits concernés) \_\_\_\_\_      Etendu du ROX : \_\_\_\_\_

Echantillons indéterminés (noter les puits) : \_\_\_\_\_      Impression du graphique de résultats :  OUI  
 NON

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de mise à jour : _____ Visa Approbateur : J. Weissenburger
--	--



## Annexe 15 : Formulaire d'entretien du Viia7

	<b>CHECK LIST D'ENTRETIEN DU Viia7</b>	<b>FEN-81-V0</b>
---	--	------------------

		Mois de : _____																															
		jours																															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
<b>Maintenance régulière :</b>																																	
Vérifier le statut de la lampe																																	
Changement de la lampe																																	
Faire l'export des résultats du RUN																																	
Trigramme du technicien																																	
<b>Maintenance journalière :</b>																																	
Vérifier la DASRI																																	
Changer la DASRI																																	
Trigramme du technicien																																	
<b>Maintenance hebdomadaire :</b>																																	
Vérifier l'espace disque																																	
Eteindre l'ordinateur																																	
Nettoyer la surface externe																																	
Faire un « Instrument self test »																																	
Trigramme du technicien																																	
<b>Maintenance mensuelle :</b>																																	
Faire une BACKROUND calibration																																	
Nettoyage et défragmentation du disque																																	
Sauvegarder et Transférer les données																																	
Trigramme du technicien :																																	
<b>Maintenance biannuelle :</b>																																	
Faire les calibrations 384 puits																																	
Faire les calibrations 96 puits																																	
Trigramme du technicien :																																	
Trigramme du technicien :																																	

Date de création : 31/08/2015 Visa rédacteur : V. Jodon	Date de mise à jour : Visa Approbateur : J. Weissenburger
--	--

## Annexe 16 : Inventaire des consommables de biologie moléculaire

	INVENTAIRE FOURNITURE EXTERNE BIOLOGIE MOLECULAIRE	FEN-18-v2
---	--	-----------

MOIS:

Fournitures	Marque	Fournisseur	Quantité critique	Etat actuel		Quantité retirée-ajoutée/jour /lieu	Quantité retirée-ajoutée/jour /lieu	Quantité retirée-ajoutée/jour /lieu	Total cartons restants non ouverts
				Réserve	12ième cartons				
<b>PLAQUES</b>									
Plaques Framestar 96 puits	4titude	Dutscher	1	0	5				
Plaques Framestar 384 puits	4titude	Dutscher	1	0	1				
<b>FILMS</b>									
Films Clear Seal	4titude	Dutscher	1	0	1				
Films Peel Seal	4titude	Dutscher	2	0	9				
Films Adhesive PCR Foil Seal (Alu pour stockage)	4titude	Dutscher	2	0	6				
Films qPCR Seal (adhésifs)	4titude	Dutscher	0	0	1				
<b>MICROTUBES</b>									
Microtubes 0,5 ml	Molecular Bioproducts		0	0	0				
Safe lock 0,5 ml	Eppendorf	Dutscher	0	0	0				
<b>Trigramme</b>									
A commander									
Date: <input type="text"/>									

Date de création: 24/05/2012  
Visa rédacteur: V.Jodon

Date de MAJ: 31/08/2015

Date de modification : 15/02/2013  
Visa approbateur: J. Weissenburger

## Annexe 17 : Estimation de coût du génotypage de 1954 ADN (1 SNP en P384)

Tableau I

Consommable / réactifs	Prix de base	Quantité	Prix total
Equipement de protection individuelle (Gants)	3.62 les 100	100	3,62 €
Microtubes 1,5 ml (Eppendorf)	38,40 € les 1000	15	0,58 €
Microtubes 0,5 ml (Eppendorf)	41 € les 500	50	4,10 €
Plaques 384 (4titude)	179 € les 50	15	53,7 €
Plaques 96 (4titude)	157 € les 50	25	78,5 €
Films optiques pour PCR	62 € les 100	15	9,3 €
Films pour stockage	55 € les 100	50	27,5 €
Pointes à filtres low retention (Eppendorf)	150 € les 960	5000	781 €
<b>TaqMan® SNP Genotyping Assays (sondes SNP + primers)</b>	700 € les 1250 µl	500 µl	280 €
<b>TaqMan® Genotyping Master Mix</b>	2900 € les 50 ml	6 ml	348 €
<b>H2O Nuclease Free</b>	114 € les 10x50 ml	3 ml	0,68 €
<b>TOTAL :</b>			<b>1586,98 €</b>

Tableau II

Main d'œuvre	Prix de base	Temps (min)	Prix total
Technicien	15 € les 15 min	4320	<b>4320 €</b>

Tableau III

Appareil	Amortissement	Utilisation	Prix total
Vii7	17,8 € / jour	7,5 jours	133 €
Scelleur de plaque	1,14 € le scellage	65 scellages	74,1 €
Base de données	0,76 € / jour	35 jours	26,6 €
Spectrophotomètre	1,95 € / dosage	1954*2 = 3908 dosages	7620,6 €
Station de travail	4,9 € / jour	3,75 jours	18,4 €
<b>TOTAL :</b>			<b>7872,7 €</b>

# RESUME

---

Les Centres de Ressources Biologiques (CRB) ou biobanques ont été créés et définis afin d'assurer l'accès de la recherche et de l'industrie à des ressources de qualité dans des conditions de traçabilité garanties. Ces structures s'inscrivent dans une démarche qualité rigoureuse exigée par les normes NF S96-900 et ISO 9001. Dans ce contexte, le CRB HUEP-UPMC a mis en collection des prélèvements sanguins issus d'un protocole de recherche clinique. L'un des objectifs de ce projet est la mise en évidence d'un lien entre le polymorphisme d'un gène spécifique et la morbi-mortalité des patients inclus dans ce protocole.

La validation d'une méthode de génotypage est donc envisagée pour répondre aux objectifs du projet. C'est la technique des « Single Nucléotide Polymorphisms » (SNP) qui a été sélectionnée. Ce nouveau procédé d'analyse étant envisagé comme une prestation en routine, des conditions requises concernant les échantillons d'ADN à analyser doivent être définies, à la fois dans le cas d'ADN extraits en interne et d'ADN extraits et fournis par les utilisateurs.

La mise au point de la technique a permis de génotyper 1929 patients validant ainsi la méthode utilisée. Diverses conditions de conservation des prélèvements sanguins et d'extraction et de conservation des ADN ont été testées puis analysées par des contrôles de la qualité des ADN. Ces résultats ont permis de mettre en évidence que l'assurance d'un génotypage fiable est obtenue si l'ADN est jugé conforme (concentration  $>50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $1,7 < \text{DO } 260/280 \text{ nm} < 2$ ,  $\text{DO } 260/230 \text{ nm} > 1,8$ ) quelles que soient les méthodes de conservation du sang et d'extraction d'ADN. En revanche, la méthode de conservation de l'ADN est une étape plus critique qui nécessite un conditionnement en cryotube et une température de  $-20^\circ\text{C}$  sur le long terme.

Ces informations sont capitales pour proposer une prestation de qualité à des utilisateurs extérieurs pour lesquels nous n'avons aucun regard sur la phase pré-analytique.

Mots clés : CRB, recherche clinique, ADN, génotypage, SNP, contrôle qualité, prestation.