Compte rendu des actes
46e Réunion Italo-Belgo-Franco-Suisse
Lugano (Suisse), 6 et 7 octobre 2006

Conception et mise en route d'une unité automatisée de génotypage au laboratoire de police scientifique de Lyon

M. SAVART[1], N. SCARAMOZZINO, P. TERRENOIRE, L. BURBAN, L. LABARRE, I. MARCON, V. DELARCHE

Mots-clés: Unité automatisée, Génotypage, FTA, PCR, Empreintes génétiques, Salle blanche, Police scientifique.

TITLE: Conception and Start-Up of an Automated Unit for DNA Typing at the Forensic Laboratory of Lyon to Supply the French DNA Data Base.

Key-words: High-throughput unit, DNA typing, FTA, PCR, Forensic science, Clean rooms.

Résumé

L'unité automatisée de génotypage nouvellement créée au laboratoire de police scientifique de Lyon, d'une capacité de 125 000 profils individus par an, permet d'alimenter en partie le fichier national automatisé français des empreintes génétiques (FNAEG) tout en répondant aux plus hautes exigences de fiabilité en la matière. Chaque profil étant obtenu à partir de deux échantillons et différents contrôles techniques étant nécessaires, c'est au total 300 000 échantillons qui doivent être analysés chaque année pour réaliser ces 125 000 profils. Les locaux et la robotique sont conçus pour une évolution vers le génotypage annuel de 250 000 individus après un simple ajout de thermocycleurs et de trois appareils d'électrophorèse capillaire. Au plan de l'organisation, quatre chaînes robotisées sont implantées dans deux salles blanches indépendantes, reliées par un sas permettant le passage des plaques d'analyse. Dans ces salles, le taux de particules en suspension, la pression, la température et l'hygrométrie sont rigoureusement contrôlés.

Summary

The automated unit of DNA typing within the forensic laboratory of Lyon, with a capacity of 125.000 profiles individuals per annum, make possible to supply the french DNA database while respecting the highest

1. Laboratoire de Police Scientifique de Lyon, 31, avenue Franklin Roosevelt, 69134 ECULLY Cedex (France).

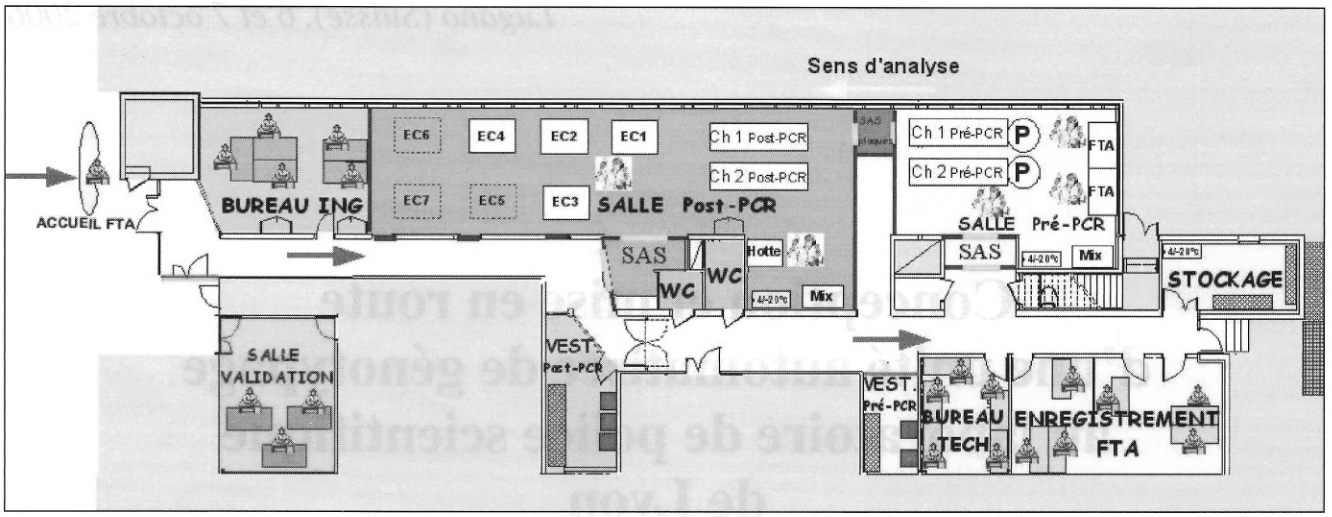

Figure 1. *Schéma de l'unité automatisée de génotypage du laboratoire de police scientifique de Lyon.*

requirements of quality assurance. Each profile being obtained from two samples and the use of various standard samples being necessary, 300.000 samples could be analyzed each year to carry out the 125.000 profiles. The buildings and robotics are already conceived for an evolution towards the annual DNA typing of 250.000 individuals after simple addition of amplification and analysis apparatuses. Four robotized chains are established in two independent clean rooms, connected by an airlock allowing the passage of the microplates for subsequent PCR. In these rooms, the rate of suspended particles, the pressure, the temperature and the hygroscopy are rigorously controlled.

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1. Prélèvements sur individus

Sur l'ensemble du territoire national, les services de police et de gendarmerie recueillent les cellules buccales des individus sur un support spécifique appelé papier FTA (Fast Technology for Analysis). Ce support est fourni par la société Whatman, UK. Le détergent présent sur ce papier permet de faire éclater les membranes des cellules et de leurs noyaux, provoquant la libération de l'ADN qui va ensuite se fixer sur les fibres de cellulose. L'ADN est ainsi protégé de l'oxydation, des rayonnements UV et des nucléases d'origine microbienne. Les prélèvements peuvent ainsi être stockés durant plusieurs années et transportés à température ambiante sans aucun problème de dégradation. La traçabilité de ces supports et des formulaires associés de la procédure judiciaire est assurée à l'aide de codes barre.

I.2. Aménagement des locaux

Comme indiqué sur la figure 1, les locaux comportent deux salles blanches (pré et post-PCR), des bureaux et des vestiaires pour les techniciens et les ingénieurs, une plateforme pour le traitement administratif des scellés et des dossiers, une salle de stockage des réactifs et une salle pour la validation des profils génétiques. Les échantillons sont traités selon le principe de la marche en avant. Ils suivent donc un parcours à partir de la salle de traitement des scellés, via les salles pré et post-PCR. Les papiers FTA sont systématiquement détruits après analyse selon les règles d'hygiène et de sécurité en matière de prélèvements biologiques.

Les salles blanches ont été réalisées par le groupe Cofathec-Omega, France. La pression, la température et l'hygrométrie de ces salles sont rigoureusement contrôlées afin d'assurer les conditions opératoires nécessaires au bon déroulement des analyses et à la fiabilité des résultats de génotypage.

Les étapes d'échantillonnage et de distribution des réactifs indispensables à l'amplification de l'ADN sont réalisées dans une première salle blanche dite « pré-PCR ». Cette salle est en surpression à + 40 Pa pour

empêcher les reflux d'air susceptibles de contaminer les échantillons par la présence d'amplicons d'ADN indésirables. Son hygrométrie est régulée entre 45 et 65 % afin de minimiser les problèmes liés à l'électricité statique au moment de la répartition des disques de papier FTA dans les microplaques.

Une deuxième salle blanche dite « PCR/post-PCR », reliée à la précédente par un petit sas pour le passage des microplaques, est maintenue en dépression à – 30 Pa pour prévenir la fuite d'amplicons potentiellement contaminants. Comme dans la salle pré-PCR, le personnel travaillant dans cette salle est équipé en conséquence et y pénètre par l'intermédiaire d'un sas, lui-même en dépression par rapport à l'extérieur. La température de ces salles oscille entre 19 et 21° C afin d'obtenir, entre autre, une migration électrophorétique des échantillons la plus régulière possible.

Les pressions différentielles et la température de ces salles sont régulées par l'intermédiaire d'une centrale de traitement d'air entièrement contrôlée par un automate de gestion électronique.

L'utilisation de ces salles blanches limite la présence de micro particules en suspension dans l'air par passage sur filtres HEPA. Elles sont qualifiées selon la classe 7 de la norme ISO 14 644-1, ce qui correspond à la mesure de 2930 particules de 5 μm par m^3 d'air ventilé.

I.3. Robotique

Afin d'assurer deux analyses totalement indépendantes pour chaque échantillon « individu », l'unité automatisée de génotypage (UAG) est équipée de deux lignes robotisées strictement identiques. Dans la salle pré-PCR, chaque ligne d'analyse comporte un puncher BSD 1000 (société BSD, Australie) couplé à une plateforme robotique Micro Lab STARplus (Société Hamilton, Bonaduz AG, Suisse). La plate forme robotique est équipée d'une centrifugeuse automatique pour deux microplaques de type Ixion centrifuge (société SIAS AG, Suisse). Une scelleuse automatique de type RoboSeal de la société HJ-Bioanalytik GmbH est utilisée pour sceller les microplaques en fin de ligne pré-PCR. Le pipetage sur microplaque est assuré à l'aide d'un jeu de 8 pipettes et d'une tête permettant d'assurer simultanément la distribution de phases liquides dans 96 puits. Tous les cônes utilisés sont à usage unique et munis de filtres. Le système de pipetage de chaque robot peut assurer la distribution de volumes de 1 μl avec une précision de l'ordre de 5 %. Les robots sont équipés de deux systèmes de préhension de plaques (un bras articulé et une pince constituée de 2 griffes emboitées sur 2 pipettes). Le puncher et les plates formes robotiques sont tous équipés de lecteurs de code barre pour assurer la traçabilité des microplaques et des échantillons.

Dans la salle PCR/post-PCR, chacune des deux lignes d'analyse est constituée d'une plateforme robotique Micro Lab STARplus (Société Hamilton, Bonaduz AG, Suisse) sur laquelle a été disposé un thermocycleur de type tétrade PTC 240 (Biorad, US), muni de quatre couvercles à ouverture automatique. Les plateformes traitent des microplaques de 96 puits jusqu'à la phase PCR incluse, puis des microplaques de 384 puits en phase post-PCR.

Les électrophorèses sont réalisées à l'aide de quatre appareils d'électrophorèse capillaire de type 3130XL (Applied Biosystems, US) munis chacun d'une nappe de 16 capillaires.

Les données d'électrophorèse sont traitées dans une salle de validation indépendantes des salles précédentes avec le logiciel Gene Mapper (Applied Biosystems, US).

La saisie initiale des cartes FTA, l'ensemble des lignes robotisées et la validation des profils génétiques sont pilotés par un LIMS (Laboratory Information Management System) de type Sapphire (société Labvantage, US).

II. MODE OPÉRATOIRE

II.1. Étape pré-PCR

Deux échantillons sont réalisés à partir de chaque carte FTA et analysés sur chaque chaîne robotisée afin d'assurer la robustesse des analyses.

La première étape, réalisée en salle pré-PCR, à l'aide d'un des robots, consiste à distribuer 5 μl d'eau stérile dans chaque puits d'une microplaque « 96 » afin de maintenir les disques de papier FTA au fond des puits et de supprimer l'électricité statique.

Les microplaques sont ensuite transférées de la plateforme robotique vers le carrousel du puncher BSD 1000. Les disques de 1,2 mm découpés dans le papier FTA à l'aide du puncher automatique sont répartis dans chacun des 96 puits d'une microplaque. Les micro-

plaques sont à nouveau transférées sur le robot et une première centrifugation de1,5 mn à 1000 rpm permet de précipiter les disques au fond des puits. Un bras préhenseur transfère ensuite les plaques vers un lecteur de code barre, puis vers une caméra numérique afin de réaliser un cliché de chaque plaque «96». Les plaques sont ensuite transférées vers la position de lavage (trois cycles de lavage à l'eau stérile, réalisés avec la tête à 96 cônes). Afin de réduire au maximun la quantité d'eau par puits après le troisième lavage, la dernière aspiration se fait en deux étapes avec des paramètres de pipetage différents. Les plaques sont ensuite séchées dans un module chauffant pendant 10 minutes à 75° C. Après séchage, elles sont transférées sur des portoirs maintenus à 4° C où se fait la distribution des réactifs d'amplification avec la tête à 96 cônes. Ce mélange (kit d'amplification Identifiler, Applied Biosystems, US) contient les dNTP, les amorces et la Taq Polymerase. Les amorces permettent le repèrage et l'amplification simultanée de 16 loci de l'ADN situées dans des parties non codantes, c'est-à-dire ne supportant aucune information génétique.

La distribution des réactifs d'amplification par le robot se fait à l'aide de la tête de distribution supportant 96 cônes. Les microplaques sont ensuite centrifugées afin de précipiter les disques au fond des puits, puis de nouveau photographiées. Elles sont enfin scellées avec un film d'aluminium autoadhésif et perçable, puis stockées à 4° C avant transfert en salle PCR/post-PCR.

II.2. Étape PCR/postPCR

Cette étape se déroule dans la deuxième salle blanche. Les microplaques sont centrifugées pendant 1,5 mn à 1000 rpm avant d'être transférées dans les thermocycleurs qui sont dotés de 4 blocs chauffants permettant ainsi l'amplification simultanée des 4 plaques. Le cycle d'amplification est reproduit 27 fois en 3h. Après amplification, les plaques sont centrifugées 1,5 mn à 1000 rpm.

Les échantillons amplifiés sont ensuite répartis en microplaques de 384 puits contenant un mélange formamide/standard de taille interne. Pour assurer la dénaturation en formamide, les microplaques sont chauffées à 95° C durant 3 mn, puis immédiatement placées à 4° C dans un module réfrigérant du robot, afin d'éviter la renaturation.

Les fragments d'ADN obtenus après amplification sont séparés sur les quatre appareils d'électrophorèse capillaire 3130XL (Applied Biosystems).

II.3. Détermination des profils génétiques

Plusieurs ordinateurs situés dans une salle spécifique et reliés aux appareils d'électrophorèse par le réseau informatique du laboratoire permettent de récupérer automatiquement les données analytiques. Les signaux de fluorescence détectés lors de la migration sont analysés avec le logiciel GeneMapper. La méthode d'analyse utilisée par ce logiciel est structurée en 5 points :

- ✔ *Peak Detection* : analyse des données brutes pour identifier les pics ;
- ✔ *Size-matching/calling* : analyse des standards de taille pour attribuer des tailles en paires de bases aux pics identifiés ;
- ✔ *Binning* : analyse des Allelic Ladder pour déterminer les zones d'affectation des allèles référencés ;
- ✔ *Allele calling* : analyse des pics des échantillons pour nommer les allèles ;
- ✔ *Quality value determination* : détermine un indice de qualité pour les processus d'affectation de taille et d'appellation des allèles.

A partir de ces données, les analystes établissent le «profil génétique» final, qui se présente sous la forme de tableaux alphanumériques pouvant être transmis au fichier national des empreintes génétiques (FNAEG).

III. DISCUSSION

L'unité automatisée de génotypage du laboratoire de police scientifique de Lyon a été conçue dans la perspective de l'obtention d'une accréditation selon la norme internationale ISO 17025/2005.

En conséquence, lors de la conception des locaux et des chaînes robotisées, toutes les exigences qui doivent satisfaire à cette norme ont été prises en compte. Afin de s'assurer de la traçabilité et de la fiabilité des analyses, deux prélèvements sont réalisés à partir de chaque papier FTA et analysés sur deux lignes robotisées identiques. Les résultats ne sont validés et envoyés au fichier national automatisé des empreintes génétiques qu'après coïncidence totale des résultats d'analyses réalisées sur ces chaînes indépendantes.

Un soin particulier a été apporté à l'élimination de l'électricité statique qui peut être un paramètre très perturbant pour ce type d'analyses. À cette fin, le revêtement des salles blanches a été entièrement réalisé en matériaux antistatiques et l'hygrométrie et la température ont été soigneusement régulées.

C'est la première fois en Europe que des analyses génétiques, à des fins judiciaires, sont réalisées en salles blanches avec un tel degré d'automatisation. Cette unité, qui a été mise en production en septembre 2006, représente un investissement global de 2,6 millions d'euros. Vingt quatre personnes (ingénieurs, techniciens, administratifs) ont été recrutées pour en assurer le fonctionnement. ■

IV. RÉFÉRENCES DES SITES WEB DES FOURNISSEURS DE MATÉRIEL ET DE CONSOMMABLES CITÉS DANS L'ARTICLE

www.whatman.com
www.omega-concept.fr
www.sias.ch
www.hamiltoncompany.com
www.appliedbiosystems.com
www.bsdrobotics.com
www.bio-rad.com
www.hj-bioanalytich.de
www.labvantage.com