

Filière Technologies du vivant

Orientation Biotechnologie

Diplôme 2010

Stéphane Richard

*— Efficient DNA —
decontamination procedure
for diagnostic Systems*

Hes-so VALAIS WALLIS

Rte du Rawyl 47 - 1950 Sion 2

Professeur

MARC PFEIFER

Expert

PHILIPP KULL

HES-HEVS (Sion)



EM000006111551

Sion, le 20 août 2010

BT / 2010 / 60

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2009/2010	No TD / Nr. DA bt/2010/60
Mandant / Auftraggeber <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire	Etudiant / Student Stéphane Richard	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire
Professeur / Dozent Marc Pfeifer	Expert / Experte (données complètes)	
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja ¹ <input checked="" type="checkbox"/> non / nein		

Titre / Titel <p style="text-align: center;">Efficient DNA-decontamination procedure for diagnostic Systems</p>
Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele — Conduct experiments to compare efficacy and corrosiveness of commercially available DNA degrading agents. — Conceive a model DNA suitable for probing contamination and establish a reliable (e.g. swab-based) sample collection method. — Establish an analytical method (e.g. gel electrophoresis, RT-PCR, HPLC, etc.) to assess decontamination efficacy of agents tested. — Present results and findings in a comprehensive report.

Délais / Termine	
Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 03.05.2010	Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 27.08.2010
Fin des travaux en laboratoires / Ende Laborarbeiten: 16.07.2010	Défense orale / Mündliche Verteidigung: dès la semaine 35 / ab Woche 35
Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 20.08.2010 12h00	
Signature ou visa / Unterschrift oder Visum	
Responsable de la filière Leiter des Studiengangs:	¹ Etudiant/Student:

¹ Par sa signature, l'étudiant s'engage à respecter strictement le caractère confidentiel du travail de diplôme qui lui est confié et des informations mises à sa disposition; il s'engage également à appliquer formellement la directive y relative.
Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der Student, die Richtlinie einzuhalten sowie die Vertraulichkeit der Diplomarbeit und der dafür zur Verfügung gestellten Informationen zu wahren.

Evaluation de réactifs de décontamination de l'ADN

Diplômant/e Stéphane Richard



Objectif du projet

Le but est de mettre au point une méthode swab-based de récolte des contaminations ADN de surface et d'établir une méthode analytique afin d'évaluer l'efficacité de huit réactifs de décontamination de l'ADN. La corrosivité desdits réactifs est également étudiée.

Méthodes | Expériences | Résultats

L'ADN cible utilisé pour les tests d'efficacité est un produit d'amplification de 283 bp. Ces tests sont réalisés sur une surface en PVC en appliquant des spots (5, 10 et 30 µl) d'ADN cible à une concentration de 28.1 µg/ml. Le réactif (20 µl) est ensuite appliqué pendant 10 min avant d'être collecté à l'aide d'un écouvillon. Celui-ci est ensuite trempé dans de l'eau qui est analysé par real-time PCR (avec sonde YY-lectin-TMP). Les tests de corrosion qualitatifs sont faits en appliquant des spots de 20 µl de réactif pendant différents temps de contact (5, 10 et 20 min) sur les matériaux suivants : acier, acier inoxydable, aluminium, cuivre et laiton. D'autres tests sont faits en trempant des barrettes de plastique (PVC, Ertalon, PTFE et polypropylène) pendant une semaine. Les tests de corrosion quantitatifs sont faits en trempant des barrettes d'acier inoxydable et des Eppendorf en polypropylène dans les réactifs pendant une semaine.

Les réactifs à tester peuvent être classifiés en deux groupes, ceux de nature acide (DNA Zap, LookOut DNA Erase, DNA Remover et DNA ExitusPlus) et ceux de nature basique (DNA Away, DNA Decontamination reagent, LTK 008 et l'eau de Javel).

LookOut DNA Erase et DNA Remover sont très efficaces car ils dégradent totalement l'ADN dans toutes les conditions testées. DNA ExitusPlus dégrade totalement l'ADN pour les tests avec 10 et 30 µl d'ADN mais semble peu efficace avec 5 µl d'ADN ce qui n'est pas logique. DNA Zap est le réactif le moins efficace (pourcentage de dégradation de l'ADN de 93 % en moyenne). Les réactifs de nature acide ne sont cependant pas retenus car très corrosifs, notamment sur l'acier, l'aluminium, le cuivre et le laiton. Les réactifs basiques sont nettement moins corrosifs. En effet, ils attaquent moins fortement et moins rapidement le cuivre et le laiton. Ils peuvent de plus être utilisés sans problème sur l'acier inoxydable, l'aluminium et les plastiques. DNA Away et DNA Decontamination reagent dégradent totalement l'ADN pour les tests avec 5 µl mais pas pour les tests avec 10 et 30 µl (plus de 99.99 % de dégradation tout de même). LTK 008 et la Javel sont très efficaces car il n'y a plus de trace d'ADN après traitement. La différence entre ces deux derniers réactifs est le prix qui est respectivement de 90 CHF/500 ml et de 0.43 CHF/500 ml.

Au vu des tests effectués, c'est donc l'eau de Javel qui est considérée comme le meilleur réactif de décontamination de l'ADN.

Travail de diplôme | édition 2010 |

Filière

Technologies du vivant

Domaine d'application

Biotechnologie

Professeur responsable

Dr Pfeifer Marc

marc.pfeifer@hevs.ch

Partenaire

Projet interne

Evaluation of DNA decontamination agents

Graduate

Stéphane Richard



Objectives

The goal is to develop a swab-based method for collecting DNA contamination from surfaces and establish an analytical method to evaluate the effectiveness of eight reagents for decontamination of DNA. The corrosiveness of these reagents is also investigated.

Methods | Experiences | Results

The target DNA used for tests of effectiveness is an amplification product of 283 bp. These tests are performed on a PVC surface by applying spots (5, 10 and 30 μ l) of target DNA at a concentration of 28.1 μ g/ml. The reagent (20 μ l) is then applied for 10 min before being collected using a swab. It is then soaked in water that is analyzed by real-time PCR (probe YY-lectin-TMP). The corrosion tests are made by applying spots of 20 μ l of reagent for different contact times (5, 10 and 20 min) on the following materials: steel, stainless steel, aluminum, copper and brass. Further tests are made by dipping strips of plastic (PVC, Ertalon, PTFE and polypropylene) during one week. The corrosion tests were made quantitative by dipping strips of stainless steel and polypropylene Eppendorf reagents in a week.

The reagents can be classified into two groups, those of acidic nature (DNA Zap, LookOut DNA Erase, DNA Remover and DNA ExitusPlus) and of basic nature (DNA Away, DNA Decontamination reagent, LTK 008 and the Bleach). LookOut DNA Erase and DNA Remover are very effective because they fully degrade the DNA in all tested conditions. DNA ExitusPlus degrades completely DNA with 10 and 30 μ l tests but appears ineffective with 5 μ l test (not logic). DNA Zap reagent is the least efficient (percentage of DNA degradation by 93% on average). Acidic agents are not suitable as decontamination agents due to their strong corrosiveness, particularly on steel, aluminum, copper and brass. The basic reagents are much less corrosive. Indeed, they attack less strongly and less quickly copper and brass. They may be safely used on stainless steel, aluminum and plastics. DNA Away and DNA Decontamination reagent completely degrade the DNA with 5 μ l test but not for tests with 10 and 30 μ l (more than 99.99% degradation anyway). LTK 008 and bleach are very effective because there is no trace of DNA after treatment. The difference between these two reagents is the price which is 90 CHF/500 ml and 0.43 CHF/500 ml, respectively.

In view of the results obtained, bleach is considered the best reagent for the decontamination of DNA.

Bachelor's Thesis | 2010 |

Degree course
Life Technologies

Field of application
Biotechnologie

Supervising professor
Dr Pfeifer Marc
marc.pfeifer@hevs.ch

Partner
Internal project

Table des matières

1. Introduction.....	6
2. Matériels	10
2.1 Réactifs de décontamination testés	10
2.2 Surfaces utilisées pour les tests d'efficacité	10
2.3 Swabs utilisés pour les tests d'efficacité	10
2.4 Barrettes utilisées pour les tests de corrosion.....	11
2.5 Milieu de culture	11
2.6 Extraction du plasmide.....	11
2.7 ADN et amorces pour PCR	11
2.8 Purification de l'ADN cible.....	12
2.9 ADN, amorces et sonde pour real-time PCR	12
2.10 Electrophorèses sur gel	12
2.11 Appareils de laboratoire utilisés	13
3. Méthodes.....	13
3.1 Milieu de culture.....	13
3.2 Culture de E. coli XL1-Blue du projet IPC	13
3.3 Extraction de « pUC18 + insert »	14
3.4 Quantification d'ADN double brin (dsDNA) par spectrophotométrie.....	14
3.5 Optimisation de la réaction PCR	14
3.6 PCR scale up pour obtenir ADN cible pool 1	15
3.7 PCR scale up pour obtenir ADN cible pool 2	16
3.8 Fabrication de l'eau PCR	16
3.9 Real-time PCR 1: optimisation	16
3.10 Real-time PCR 2: optimisation	17
3.11 Real-time PCR 3: optimisation	18
3.12 Real-time PCR 4: optimisation	18
3.13 Test de purification 1 : méthode phenol/chloroform/isoamylalcool.....	19
3.14 Test de purification 2 : méthode éthanol	19
3.15 Real-time PCR 5: optimisation	19
3.16 ADN cible pool 3	20
3.17 Purification scale-up : méthode phenol/chloroform/isoamylalcool.....	20
3.18 Test d'efficacité : prélèvement pour real-time PCR 6	20
3.19 Real-time PCR 6 : optimisation des tests d'efficacité	21
3.20 Test d'efficacité : prélèvement pour real-time PCR 7	22
3.21 Real-time PCR 7 : optimisation des tests d'efficacité	22
3.22 Real-time PCR 8 : tests d'efficacité.....	23
3.23 Real-time PCR 9 : tests d'efficacité.....	23
3.24 Real-time PCR 10 : tests d'efficacité.....	23
3.25 Test d'efficacité : prélèvement pour real-time PCR 11	24
3.26 Real-time PCR 11 : tests d'efficacité.....	24

3.27 Real-time PCR 12 : tests d'efficacité	25
3.28 Test d'efficacité : prélèvement pour real-time PCR 13	25
3.29 Real-time PCR 13 : tests d'efficacité	26
3.30 Real-time PCR 14 : tests d'efficacité	26
3.31 Test d'efficacité : prélèvement pour real-time PCR 15	26
3.32 Real-time PCR 15 : tests d'efficacité	27
3.33 Real-time PCR 16 : tests d'efficacité	27
3.34 Real-time PCR 17 : tests d'efficacité	28
3.35 Tests de corrosion.....	28
3.35.1 Méthode par spots	28
3.35.2 Méthode par immersion	28
4. Résultats.....	29
4.1 Extraction du plasmide pUC18 + insert	29
4.2 Optimisation de la réaction PCR	30
4.3 PCR scale up pour obtenir ADN cible pool 1	31
4.4 PCR scale up pour obtenir ADN cible pool 2	32
4.5 Real-time PCR 1 : optimisation	34
4.6 Real-time PCR 2 : optimisation	36
4.7 Real-time PCR 3 : optimisation	37
4.8 Real-time PCR 4 : optimisation	38
4.9 Tests de purification de l'ADN cible.....	39
4.10 Real-time PCR 5 : optimisation	40
4.11 Purification scale-up de l'ADN cible: méthode phenol/chloroform/isoamylalcohol	40
4.12 Real-time PCR 6 : optimisation des tests d'efficacité	41
4.13 Real-time PCR 7 : optimisation des tests d'efficacité	42
4.14 Tests d'efficacité : real-time PCR 8, 9 et 10	43
4.15 Tests d'efficacité : real-time PCR 11 et 12	47
4.16 Tests d'efficacité : real-time PCR 13 et 14	50
4.17 Tests d'efficacité : real-time PCR 15 et 16	53
4.18 Tests d'efficacité : real-time PCR 17	56
4.19 Tests monomères d'amorces et dimères d'amorces.....	58
4.20 Compilation des tests d'efficacité	59
4.21 Tests de corrosion : méthode par spots	61
4.22 Tests de corrosion : méthode par immersion	64
4.23 Comparaison des tests de corrosion effectués avec les tests issus de la littérature	67
5. Discussion	68
6. Conclusion et perspectives	71
7. Bibliographie	72

1. Introduction

Le diagnostic est le raisonnement menant à l'identification de la cause d'une défaillance, d'un problème ou d'une maladie. Issu du grec *diagnosis*, de *gnosis* (connaissance, discernement) et de *dia* (à travers), le mot *diagnostic* signifie connaissance à travers des signes. Pour le médecin, il s'agit donc d'acquérir la connaissance à travers des signes observables. Dans l'antiquité, comme il n'y avait pas d'examens venant de la chimie, de la biologie ou de la physique, qui n'existaient pas, il n'y avait pour établir un diagnostic que l'interrogatoire du médecin et l'examen dit clinique. Le mot clinique provient également du grec et signifie couché. Cet examen clinique se faisait pas l'inspection visuelle, la palpation voire l'odorat et le goût (des urines par exemple).

De nos jours, l'inspection visuelle ainsi que la palpation sont toujours d'actualité. Pendant la consultation, le malade explique au médecin comment et où il souffre : malaises, sensations anormales, troubles d'une fonction comme la respiration ou la digestion, etc. Ce sont les symptômes qui sont donc subjectifs. Ensuite le médecin examine le malade en cherchant des anomalies. Pour cela, il utilise éventuellement des appareils qui peuvent lui fournir des informations tels que des radioscopies par exemple. Mais pour confirmer ses hypothèses, il aura souvent recours au prélèvement d'échantillons (de sang, d'urine, selles, moelle, liquide céphalorachidien, etc.) qui seront analysés par un laboratoire. Celui-ci lui retournera un résultat chiffré qui lui sera essentiel à l'établissement du diagnostic. Ces résultats de laboratoire sont donc des signes qui sont objectifs [1]. L'objectif du laboratoire est de pouvoir délivrer des résultats fiables basés sur la meilleure technique et ceci le plus rapidement possible. Ce n'est qu'alors que le médecin peut en tirer les conclusions qui s'imposent et qu'il peut traiter le patient. Ceci implique donc que le laboratoire choisisse des méthodes d'analyse qui prennent en compte des critères tels que reproductibilité, spécificité et sensibilité. On comprend dès lors l'importance du laboratoire en diagnostic.

En diagnostic médical, il est souvent question de détection et identification de micro-organismes pathogènes tels que bactéries, virus, levures, moisissures ou parasites. Pour cela, deux approches peuvent être envisagées ; le diagnostic direct et le diagnostic indirect. Le diagnostic direct vise à révéler la présence, à partir de prélèvements biologiques, du micro-organisme lui-même ou un de ses constituants tels que antigènes, ADN ou ARN. Le diagnostic indirect, quant à lui, permet de mettre en évidence la réponse immunitaire humorale du malade et ceci en détectant la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre le micro-organisme [2]. C'est le diagnostic direct qui nous intéressera ici, plus particulièrement l'utilisation de l'ADN comme outil de diagnostic.

En effet, l'analyse ADN n'est pas seulement utilisée pour le génotypage d'organismes pathogènes, mais aussi pour le diagnostic génétique de certaines maladies, pour la détection de produits agricoles génétiquement modifiés, pour les tests de paternités ou encore par la police scientifique. Le principal avantage des techniques de détection de séquences d'ADN/ARN est que ces séquences font partie intégrante de l'information génétique du pathogène, et donc elles sont toujours présentes. A la différence des techniques immunologiques, la détection de l'ADN/ARN ne dépend pas de l'expression du gène considéré, donc de l'environnement influant cette expression. Ces méthodes sont donc très spécifiques.

Durant les deux dernières décennies, la PCR et quelques autres techniques d'amplification de l'ADN/ARN sont devenus des outils importants des laboratoires de diagnostic. La possibilité d'amplifier des régions spécifiques de l'ADN ou de l'ARN microbien par ces diverses techniques a dès lors permis une détection rapide et sensible de pathogènes infectieux. Ces méthodes sont également utilisées dans les laboratoires cliniques pour détecter des organismes qui ne se développent pas sur des milieux de culture conventionnels. Elles facilitent aussi l'étude des épidémies ainsi que la détection des mutations associée aux résistances aux médicaments dans les agents viraux, bactériens et fongiques [3].

Malheureusement, la grande sensibilité de ces techniques les rend susceptibles aux contaminations [4]. Pour exemple, au moins deux cas documentés de maladie de Lyme (un avec issue fatale), ont été attribués à des résultats de PCR faux positifs [3].

Les sources de contamination ADN sont diverses. Ces contaminations peuvent être dues à l'aération, à l'eau, aux centrifugeuses, aux opérateurs, etc. La figure 1 présente quelques sources de contaminations possibles.

Sources for nucleic acid contamination	
Room ventilation	Reagents/kits
Autoclave	(cross contamination by careless handling)
Laboratory water	Centrifuges
Chemicals	Multiple-use laboratory vessels
Solutions and buffer	(centrifuge beaker, test tubes, flasks, etc.)
Reagents/kits already contaminated at the supplier's	Workers (hair, skin cells, sweat, individual way of working)

Figure 1 : Sources de contaminations ADN.

Cependant, les sources principales de contamination sont d'une part les réactifs utilisés tels que les Taq polymérases. En effet, celles-ci sont très souvent contaminées par de l'ADN exogène du fait de leur production à partir de clonage dans des agents microbiens [4]. D'une autre part, les contaminations ADN sont souvent dues à des contaminations croisées (*carryover contamination*) par des produits d'amplification précédents et qui reste dans l'environnement du laboratoire [3]. Cette dernière source de contamination est un réel problème c'est pourquoi elle est le sujet de ce travail de diplôme.

En effet, une PCR typique génère environ 10^9 copies de la séquence cible et si, ne serait-ce qu'une faible quantité, s'échappe dans l'environnement du laboratoire sous forme d'aérosol, cela peut contaminer les réactifs ainsi que les équipements et surfaces.

En premier lieu, certaines règles doivent impérativement être respectées.

Les barrières mécaniques pour prévenir les contaminations croisées nécessite la séparation stricte des zones de laboratoire où les réactifs et les échantillons sont préparés des zones de laboratoire où l'amplification est effectuée et celles où les produits d'amplification sont analysés.

De plus, Les opérations doivent être effectuées dans un sens unilatéral, de la zone de préparation des réactifs à la zone de préparation des échantillons, puis à la zone d'amplification et ensuite à la zone de détection. Ces zones de travail doivent donc être séparées spatialement et si possible à une certaine distance les unes des autres. Chaque zone doit être équipée des instruments et réactifs nécessaires mais aussi de blouses, de gants et de matériel à usage unique (disposable) ADN-free qui sont utilisés dans cette zone et qui reste dans celle-ci après leur utilisation [3]. A noter que le déplacement du personnel d'une zone à l'autre est également une source de contamination car ils peuvent toucher les objets contaminés d'une zone et ensuite transférer cette contamination sur des objets propres d'une autre zone [5]. Le personnel de laboratoire doit donc être informé du problème des contaminations et que se déplacer d'une zone à l'autre peut promouvoir celles-ci.

Cependant, ces quelques règles ne sont pas suffisantes pour éviter des contaminations croisées, c'est pourquoi il est nécessaire de développer une méthode de décontamination efficace des surfaces et des équipements de laboratoire. En plus de l'efficacité, le réactif de décontamination se devra d'être le moins corrosif possible pour éviter une dégradation desdits surfaces et équipements. De plus, ce réactif serait idéalement peu cher, peu (ou pas) toxique pour l'être humain et permettrait de dégrader l'ADN rapidement.

L'objectif de ce travail de diplôme est de tester huit réactifs de décontamination de l'ADN. Ces réactifs sont le LookOut DNA Erase, le DNA Remover, le DNA ExitusPlus, le DNA Zap, le DNA Away, le DNA Decontamination reagent, le LTK 008 et l'eau de Javel. Ils seront évalués en terme d'efficacité et de

corrosivité. Pour cela, il faut dans un premier temps mettre en place une méthode analytique capable de détecter l'ADN résiduelle après traitement par le réactif. La méthode sélectionnée est la real-time PCR (avec une sonde) car elle est très sensible et qu'elle permet de quantifier l'ADN. Le principe de la real-time PCR est simple. La détection ainsi que la quantification est faite grâce à un reporter fluorescent dont l'émission qu'il génère est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction PCR. A chaque cycle, la fluorescence est observée. Il devient dès lors possible de suivre la réaction durant la phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est directement en corrélation avec la quantité initiale de la matrice originale cible [6]. Cette augmentation significative, lorsqu'elle coupe un seuil (threshold) qui est fixé, donne une valeur Ct. Cette valeur Ct représente le cycle à partir duquel la courbe d'amplification coupe le seuil. Une grande quantité initiale d'ADN donne une petite valeur Ct et inversement. Pour évaluer l'efficacité des réactifs, les valeurs Ct obtenues pour chaque condition testée seront étudiées. Et plus précisément, c'est le ΔCt obtenu avec chaque réactif qui sera étudié. Le ΔCt est la différence entre la valeur Ct de l'ADN cible non traité (contrôle positif de surface) et la valeur Ct de l'ADN cible après traitement par le réactif. Plus ce ΔCt est grand et plus le réactif est efficace. La figure 2 présente la photo du thermocycler Rotor-Gene Q de Qiagen.



Figure 2 : thermocycler Rotor-Gene Q de Qiagen.

Les prélèvements des tests d'efficacité seront effectués en faisant des spots d'ADN sur une surface en PVC, spots qui seront ensuite traités par le réactif de décontamination. Pour évaluer l'efficacité avec laquelle le réactif dégrade l'ADN, il est nécessaire de collecter l'ADN résiduelle avant d'effectuer l'analyse. Ceci se fait par une méthode swab-based (écouvillonnage) qu'il est nécessaire de mettre en place. Le principe est de frotter le spot avec un écouvillon (DNA-free et DNase-free) préalablement humidifié et de tremper ensuite celui-ci dans de l'eau PCR. En effet, l'ADN étant très soluble dans l'eau, il se dissoudra dedans et cette eau pourra être analysée. La méthode de collection de l'ADN est une étape critique. En effet, la qualité du prélèvement influence directement la qualité du résultat d'analyse effectué sur celui-ci. Dans le cas présent, la réussite de la collecte de l'ADN résiduelle est influencée par plusieurs facteurs, comme l'absorption de cet ADN par l'écouvillon, ou encore la libération de cet ADN dans le tampon d'extraction (ici l'eau) après la collecte. La figure 3 montre les surfaces de PVC utilisées.

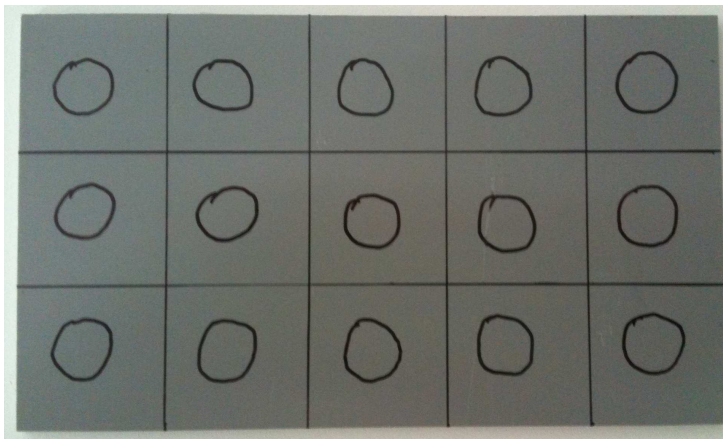


Figure 3 : Surface de PVC utilisée pour faire les prélèvements des tests d'efficacité.

L'écouvillon (swab) utilisé pour la collecte des échantillons est le DryswabTM de Medical Wire and Equipment [7]. A noter que DryswabTM est en fait une gamme de produit qui comprend différents swabs selon l'utilisation souhaitée. C'est le DryswabTM fabriqué avec la fibre DacronTM (polyester) qui nous intéresse ici car c'est celui-la qui est indiqué lorsque des tests de biologie moléculaire (PCR) ou d'immunodiagnostic (ELISA) veulent être effectués.

Les tests de corrosion sont faits de deux manières différentes, soit la méthode par spots, soit la méthode par immersion. La méthode par spots consiste à appliquer des spots de réactifs sur différents matériaux et cela en variant les temps de contact. La méthode par immersion consiste à tremper des barrettes (préalablement pesées) de différents matériaux dans les réactifs pendant des temps plus long et en pesant ces barrettes après traitement. Les matériaux testés sont l'acier, l'acier inoxydable, l'aluminium, le cuivre, le laiton, le PVC, le PTFE, l'Ertalon et le polypropylène. Les tests de corrosion effectués (essentiellement qualitatif) sont très importants car ils peuvent être un critère déterminant dans le choix du réactif de décontamination. En effet, deux réactifs très efficaces peuvent être différenciés de part le caractère agressif qu'ils peuvent avoir, l'un pouvant être plus corrosif que l'autre. Il ne faut pas oublier que les réactifs de décontamination testés sont prévus pour traiter les surfaces et équipements. Si ceux-ci sont très efficace mais également très corrosifs, ils ne peuvent pas être utilisés car ils pourraient dégrader ces surfaces et équipements.

2. Matériels

2.1 Réactifs de décontamination testés

Le tableau 1 présente les réactifs de décontamination testés au cours du travail de diplôme [8-14] ainsi que des informations telles que le fabricant, pH mesuré, principal composant et prix.

Tableau 1 : Informations sur les réactifs de décontamination testés.

Nom du réactif	Fabricant	N° de produit	N° de lot	pH mesuré	Composant	Prix (CHF/500 ml)
LookOut® DNA Erase	Sigma	L8917	059K0731	1.1	H ₃ PO ₄ < 8 %	100
DNA Remover™	Minerva Biolabs	15-2025	152D1099	1.2	H ₃ PO ₄ < 10 %	127
DNA-ExitusPlus™	AppliChem	A7409,0250	9H006508	2.5	?	122
DNA ZAP™ solution 1	Ambion	9891G	910015	2.5	?	209
DNA ZAP™ solution 2	Ambion	9892G	910015	2.5	?	
DNA Away®	Molecular BioProducts	7010	9471415	12.6	hydroxyde alcalin < 1 %	67
DNA Decontamination reagent	Sigma	43944	BCBB5873	12.6	?	164
LTK 008™	Biodelta	-	-	11.8	?	90
Javel	Migros	247803670	-	12.8	agent de blanchiment chloré < 5 %	0.43

2.2 Surfaces utilisées pour les tests d'efficacité

Le tableau 2 présente les surfaces utilisées pour effectuer les tests d'efficacité.

Tableau 2 : Informations sur les surfaces utilisées pour les tests d'efficacité.

Matière	Dimensions [mm]	Références
Polychlorure de vinyle (PVC)	110 x 170 x 1.5	PVC-U

Les surfaces en question ont été commandées à l'atelier de M. Paul-Henri Emery au bâtiment C de la HES-SO Valais.

2.3 Swabs utilisés pour les tests d'efficacité

Le tableau 3 présente les swabs (écouvillons) utilisés pour effectuer les prélèvements des tests d'efficacité ainsi que des informations telles que le fabricant, le type de swab, la matière et la certification [7].

Tableau 3 : Informations sur les swabs utilisés pour les prélèvements des tests d'efficacité.

Marque	Fabricant	Type	Matière	Certifié
Dryswab™	Medical Wire & Equipment	sec	polyester	DNA-free, Dnase-free

2.4 Barrettes utilisées pour les tests de corrosion

Le tableau 4 présente les barrettes utilisées pour effectuer les tests de corrosion ainsi que des informations telles que les différents types de matières et les dimensions.

Tableau 4 : Informations sur les barrettes utilisées pour les tests de corrosion.

Matières	Dimensions [mm]	Références
Aluminium	25 x 100 x 2	ALU-EN AW-5005 (ALM91)
Cuivre	25 x 100 x 2	ENCW004A (CU-ETP)
Laiton	25 x 100 x 2	CuZn37
Acier	25 x 100 x 2	AC37-2
Acier inoxydable	25 x 100 x 2	qual 1, 4435
Polychlorure de vinyle (PVC)	25 x 100 x 2	PVC-U
Polypropylène gris (PP)	25 x 100 x 2	-
Polytétrafluoroéthylène vierge naturel (PTFE)	25 x 100 x 2	-
Polyamide (Ertalon)	25 x 100 x 2	66SA, PA66

Les barrettes en question ont été commandées à l'atelier de M. Paul-Henri Emery au bâtiment C de la HES-SO Valais.

2.5 Milieu de culture

Le tableau 5 présente les ingrédients utilisés pour la préparation du milieu LB-Broth (+ ampicilline) liquide et LB-Broth (+ ampicilline) solide.

Tableau 5 : Ingrédients utilisés pour la préparation du milieu LB-Broth (+ ampicilline).

Composition	N°produit	N°lot	Fournisseur
Tryptic digest of casein	4123402	7B0745	Biolife (I)
Yeast extract	4122202	6P1567	Biolife (I)
NaCl	368257	7L312227M	Carlo Erba (I)
Ampicilline	10044	-	Fluka (D)
Agar nutriment	4018102	-	Biolife (I)

2.6 Extraction du plasmide

L'extraction du plasmide est réalisée avec le kit PureYield™ Plasmid Miniprep System, 250 preps, n° produit A122, n°lot 288599, de Promega, 2800 Woods Hollow Road, Madison, USA.

2.7 ADN et amorces pour PCR

Le tableau 6 présente la taille du plasmide pUC18 + insert, les amorces stx2 et le produit d'amplification obtenu.

Tableau 6 : Taille du plasmide pUC18 + insert, les amorces stx2 et le produit d'amplification obtenu.

Désignation	Taille [bp]
plasmide pUC18 + insert	3007
amorce stx2-F	18
amorce stx2-R	20
produit d'amplification obtenu (= ADN cible)	283

2.8 Purification de l'ADN cible

Le tableau 7 présente les réactifs utilisés pour purifier l'ADN cible ainsi que des informations telles que la sécurité et le fournisseur.

Tableau 7 : Informations les réactifs utilisés pour purifier l'ADN cible.

Produit	Formule chimique	Sécurité	N°produit	N°lot	Fournisseur
Phenol	C ₆ H ₆ O	T, C	77607	1392040	Fluka (D)
Chloroforme	CHCl ₃	Xn	C2432	67-66-3	Sigma (D)
Isoamylalcool	C ₅ H ₁₂ O	Xn, F	822255	9270974	Merck Schuchardt (D)
Acétate de sodium 3M, pH 5.2	CH ₃ COONa	-	S7899	126-96-5	Sigma (D)
Ethanol 80 %	C ₂ H ₅ OH	F	2558	64-17-5	Sigma (D)
Ethanol 100 %	C ₂ H ₅ OH	F	4146082	200-578-6	Carlo Erba (I)

2.9 ADN, amorces et sonde pour real-time PCR

Le tableau 8 présente la taille des amorces atpA, le produit d'amplification obtenu ainsi que la sonde utilisée pour les analyses par real-time PCR.

Tableau 8 : Taille des amorces atpA, du produit d'amplification obtenu et la sonde YY-lectin-TMP.

Désignation	Taille [bp]	Taille [nucléotides]
amorce atpA-F	28	-
amorce atpA-R	20	-
produit d'amplification obtenu avec amorces atpA	106	-
sonde YY-lectin-TMP*	-	23

*fluorescence : jaune

Reporter : yakima yellow

Quencher : bhq (black hole quencher)

2.10 Electrophorèses sur gel

Les électrophorèses sur gel d'agarose effectuées pendant le travail de diplôme sont préparées à l'aide des réactifs suivants :

- Tampon d'électrophorèse TBE 1x (89mM Tris-Base, 89 mM acide borique, 0.2 mM EDTA, pH 8.3).
- Tampon d'électrophorèse TAE 1x (40 mM Tris-acetate, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 8.0).
- Agarose, n°produit 50003, n°lot 708194, FMC BioProducts, USA.
- Bromure d'éthidium, toxique, n°produit E-1510, n° lot 117H8509, Sigma, Allemagne.
- Tampon de charge 5x (50 % (w/v) sucrose, 0.1 M EDTA, 0.02 % (w/v) bleu de bromophénol).
- Marqueur GeneRuler 1 kb DNA Ladder, n° produit SM0311, n° lot 00032587, Fermentas, USA.

- Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder, n° produit S M0241, n° lot 00037437, Fermentas, USA.

2.11 Appareils de laboratoire utilisés

En outre des appareils de laboratoire standard, les appareils suivants ont été utilisés :

- Flux laminaire du laboratoire de biologie moléculaire, modèle BSB4, de Gelare Flow Laboratories, USA.
- Thermocycler Biometra de Biolabo Scientific Instruments, Suisse.
- Thermocycler Rotor-Gene Q de Qiagen, Allemagne.
- Programme informatique Rotor-Gene Q Series Software 1.7

3. Méthodes

3.1 Milieu de culture

Les milieux de culture (liquide et solide) LB-Broth + ampicilline sont préparés selon le protocole suivant :

Solution LB-Broth + amp. (500 ml)

- Ajouter 5 g de Tryptic digest of casein à 500 ml d'eau déminéralisée (= 10 g/l)
- Ajouter 2.5 g de Yeast extract (= 5 g/l)
- Ajouter 2.5 g de NaCl (= 5 g/l) *
- Agiter manuellement ou avec un barreau magnétique jusqu'à ce que la solution soit homogène
- Verser 10 ml de cette solution dans le nombre de tubes voulus
- Autoclaver les tubes 15 min à 121 °C
- Ajouter 10 µl d'ampicilline à 100 mg/ml dans chaque tube de sorte que la concentration finale soit de 100 mg/l. Effectuer cette opération à la flamme pour garantir la stérilité du milieu.

*Plaques LB Broth + amp.

- Prendre 350 ml de la solution LB-Broth non autoclavée
- Ajouter 5.25 g d'agar nutriment (= 15 g/l)
- Mélanger la solution sur une plaque chauffante jusqu'à ce que le milieu devienne homogène
- Autoclaver la bouteille 15 min à 121 °C
- Laisser refroidir la solution quelques minutes dans un bain-marie à 50 °C
- Ajouter 350 µl d'ampicilline 100 mg/ml afin d'obtenir une concentration finale de 10 mg/l
- Verser environ 20 ml de milieu dans chaque boîte de petri
- Laisser le milieu se solidifier.

3.2 Culture de *E. coli* XL1-Blue du projet IPC

L'ADN cible utilisé pour les tests d'efficacité est un produit d'amplification de l'insert du plasmide pUC18 + insert, c'est pourquoi il est nécessaire de l'obtenir dans un premier temps. Ce plasmide est extrait d'*E. coli* XL1-Blue, bactérie issue du projet IPC de biologie moléculaire. Ce plasmide possède un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R) qui confère donc une résistance à l'ampicilline aux bactéries porteuses du plasmide. Cette propriété est utilisée pour le screening des colonies. A partir de celles-ci, une extraction de plasmide est effectuée selon la méthode du kit PureYield™ Plasmid Miniprep System [15] (décrite ci-après).

- Ensemencer 3 plaques de petri LB + ampicilline avec *E.coli XL1-Blue* (boîte BIM 1, position I3)
- Incubation tout le weekend à température ambiante ou une nuit à 37 °C
- Repiquer une colonie (ou 3-4 pour être sûr) dans des tubes contenant la solution LB-Broth + ampicilline
- Incuber 12-16 h à 37 °C et sous agitation
- Pour pouvoir effectuer l'extraction du plasmide, la culture doit avoir une absorbance A_{600nm} entre 2-4 (selon protocole du kit PureYield™ Plasmid Miniprep System)

3.3 Extraction de « pUC18 + insert »

La méthode d'extraction du plasmide est effectuée selon le protocole Promega du kit PureYield™ Plasmid Miniprep System [15]. Ce protocole est décrit ci-dessous.

- Pipeter 600 µl de culture dans un Eppendorf stérile de 1.5 ml
- Ajouter 100 µl de solution CLC et mélanger par retournement 6 fois. La solution passe de opaque à bleu clair (lyse des cellules)
- Cette étape est à faire dans les 2 min après l'étape précédente : ajouter 350 µl de la solution NSC à 4 °C et mélanger par retournement. La solution passe de bleu clair à jaune (neutralisation)
- Centrifuger 3 min à 12000 g
- Transférer le surnageant dans une colonne PureYield et placer celle-ci dans un tube de collection PureYield
- Centrifuger 15 s à 12000 g
- Jeter le filtrat et placer la colonne dans le même tube de collection
- Ajouter 200 µl de la solution ERB
- Centrifuger 15 s à 12000 g
- Ajouter 400 µl de la solution CWC
- Centrifuger 30 s à 12000 g
- Transférer la colonne dans un Eppendorf stérile de 1.5 ml et ajouter 30 µl de la solution EBB
- Attendre 1 min à température ambiante puis centrifuger 15 s à 12000 g pour éluer le plasmide.
- Faire un pool de plasmide et congeler celui-ci à -20 °C.

3.4 Quantification d'ADN double brin (dsDNA) par spectrophotométrie

La méthode utilisée pour quantifier l'ADN par spectrophotométrie est décrite ci-dessous :

- Mesurer l'absorbance à 260, 280 et 320 nm.
- L'absorbance doit être comprise dans un intervalle de 0.1 à 1.0. Si la valeur est au-dessus de 1.0, diluer l'échantillon.
- L'ADN est considéré pur si le rapport A_{260}/A_{280} est compris entre 1.7 et 2.0. Un taux élevé de protéine peut diminuer la valeur de ce rapport.
- Pour calculer la concentration en ADN double brin, effectuer le calcul suivant :

$$\text{Concentration en ADN double brin } [\mu\text{g/ml}] = (A_{260} - A_{320}) \times 50 \times f_{\text{dil.}}^*$$

* $f_{\text{dil.}}$ = facteur de dilution

3.5 Optimisation de la réaction PCR

Pour obtenir l'ADN cible il faut amplifier une séquence du plasmide pUC18 + insert. Le but de cette optimisation est d'identifier la meilleure condition de réaction PCR. Ici, trois concentrations en MgCl_2 du mastermix ont été variées, soit trois mastermix différents de 1.5 mM, 2.5 mM et 3.5 mM en MgCl_2 . Pour chaque mastermix, 2 réactions sont effectuées soit 6 réactions au total. Le tableau 9 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer les mastermix.

Tableau 9 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [μ l]	Volume du réactif pour 2 rxn + 5 % [μ l]
Eau PCR	-	26.8 / 24.8 / 22.8	56.2 / 52.0 / 47.8
Tampon PCR 10 X	1 X	5	10.5
BSA 20 μ g/ml	2 μ g/ml	5	10.5
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM / 2.5 mM / 3.5 mM	3 / 5 / 7	6.3 / 10.5 / 14.7
dNTPs 4 mM	0.2 mM	2.5	5.25
stx2-F 20 μ M	0.5 μ M	1.25	2.625
stx2-R 20 μ M	0.5 μ M	1.25	2.625
AmpliTaqGold 5 U/ μ l	1.25 U/rxn	0.25	0.525
Total		45	94.5

45 μ l de chaque mastermix est pipeté dans 2 tubes PCR. 5 μ l de plasmide (15.9 μ g/ml) ou 5 μ l d'eau PCR (contrôle négatif) sont ajoutés, soit un volume de réaction total de 50 μ l. La PCR est effectuée dans les conditions mentionnées par le tableau 10.

Tableau 10 : Conditions de réaction de la PCR

Etapes	Temps	Température [$^{\circ}$ C]	Cycles
Préincubation	10 min	95	-
Dénaturation	30 s	95	35
Annealing	30 s	60	35
Extension	20 s	72	35
Extension finale	5 min	72	-

3.6 PCR scale up pour obtenir ADN cible pool 1

Les conditions de la réaction PCR ayant été choisies grâce au test d'optimisation, il est maintenant possible de faire la PCR en utilisant tout le volume de plasmide à disposition (230 μ l). Pour chaque réaction PCR, 5 μ l de plasmide sont utilisés, on peut donc effectuer ici 46 réactions PCR. Le volume totale d'une réaction est de 50 μ l, on obtient donc 2.3 ml d'ADN cible (= ADN cible pool 1). Le tableau 11 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 11 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [μ l]	Volume du réactif pour 46 rxn + 5 % [μ l]
Eau PCR	-	22.8	1098.8
Tampon PCR 10 X	1 X	5	241.5
BSA 20 μ g/ml	2 μ g/ml	5	241.5
MgCl ₂ 25 mM	3.5 mM	7	338.1
dNTPs 4 mM	0.2 mM	2.5	120.8
stx2-F 20 μ M	0.5 μ M	1.25	60.4
stx2-R 20 μ M	0.5 μ M	1.25	60.4
AmpliTaqGold 5 U/ μ l	1.25 U/rxn	0.25	12.1
Total		45	2173.5

Pipeter 45 μ l de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 μ l de plasmide (15.9 μ g/ml) ou 5 μ l d'eau PCR (contrôle négatif). La PCR est effectuée dans les conditions mentionnées par le tableau 12.

Tableau 12 : Conditions de réaction de la PCR.

Etapes	Temps	Température [°C]	Cycles
Préincubation	10 min	95	-
Dénaturation	30 s	95	35
Annealing	30 s	60	35
Extension	20 s	72	35
Extension finale	5 min	72	-

3.7 PCR scale up pour obtenir ADN cible pool 2

Le volume d'ADN cible obtenu avec le pool 1 n'est pas suffisant pour effectuer tous les tests d'efficacité voulus c'est pourquoi un deuxième pool d'ADN cible est effectué. Pour cela, une nouvelle culture d'*E. coli* XL1-Blue, une nouvelle extraction de plasmide ainsi que de nouvelles réactions PCR sont effectuées. Les méthodes étant identiques à celles présentées ci-dessus, elles ne seront pas décrites ici.

3.8 Fabrication de l'eau PCR

L'eau PCR est de l'eau qui est exempte d'ADN ce qui est important pour faire les mastermix ainsi que pour les contrôles négatifs (NTC = no template control). Le protocole pour obtenir cette eau est décrit ci-dessous :

- Prendre le volume voulu d'eau ultrapure dans le laboratoire de culture cellulaire
- Verser cette eau dans des cristallisoirs et placer ceux-ci sous le flux laminaire de biologie moléculaire
- Placer également sous le flux les bouteilles ouvertes ainsi que les bouchons correspondant, ceux-ci devant être retournés et posés à côté des bouteilles
- Allumer la lampe UV et laisser agir une nuit complète
- Le lendemain, verser l'eau dans les bouteilles et fermer celles-ci
- Autoclaver les bouteilles 15 min à 121 °C

3.9 Real-time PCR 1: optimisation

La première real-time PCR a pour but de mettre au point une courbe de calibration afin de pouvoir quantifier l'ADN cible résiduel lors des tests d'efficacité des réactifs de décontamination. De plus, des tests (20 µl de mastermix + 5 µl de réactif de décontamination) sont effectués pour vérifier que les réactifs de décontamination n'émettent pas de fluorescence.

Pour cet essai, les tubes real-time PCR utilisés ne sont pas stériles et le mastermix a été préparé dans la salle prévu à cet effet dans le laboratoire F 105 de biologie moléculaire. Le tableau 13 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 13 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 1.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [µl]	Volume du réactif pour 39 rxn + 5 % [µl]
Eau PCR	-	2.35	96.2
BSA 20 µg/ml	2 µg/ml	2.5	102.4
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	102.4
dNTPs 4 mM	200 µM	1.25	51.2
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	245.7
atpA-F 9 µM	0.8 µM	2.2	90.1
atpA-R 9 µM	0.8 µM	2.2	90.1
sonde YY-lectin-TMP 10 µM	0.2 µM	0.5	20.5

AmpliTaQGold 5 U/μl	2.5 U/rxn	0.5	20.5
Total		20	819.1

Pipeter 20 μl de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 μl d'ADN des différentes dilutions d'ADN pour les standards, 5 μl d'eau PCR pour les contrôles négatifs et 5 μl de réactifs de décontamination pour les tests de fluorescences. La real-time PCR est effectuée dans les conditions mentionnées par le tableau 14.

Tableau 14 : Conditions de réaction de la real-time PCR 1.

Etapes	Temps	Température [°C]	Cycles
Hold	2 min	50	-
Hold 2	15 min	95	-
Cycling	60 s	95	50
	60 s	60	50

Gel d'agarose

Le contrôle de la real-time PCR a été effectué sur un gel d'agarose 0.8 %, TBE 1x. Le protocole pour préparer le gel est décrit ci-dessous :

1. Peser 0.8 g d'agarose et les ajouter à 100 ml de tampon TBE 1x.
2. Porter la solution à ébullition aux micro-ondes jusqu'à dissolution totale de l'agarose.
3. Refroidir la solution et avant polymérisation, ajouter 2 μl de bromure d'éthidium puis couler le gel.
4. Charger 12 μl (10 μl échantillon + 2 μl de tampon de charge) pour les échantillons et 5 μl pour les marqueurs.
5. La migration est effectuée à 100V pendant environ une heure.

Ce protocole est valable pour la préparation de tous les gels agaroses effectués durant ce projet.

3.10 Real-time PCR 2: optimisation

Le but de ce second essai est identique à la real-time PCR 1.

Le mastermix a été préparé dans la même salle que pour la PCR 1. Les tubes PCR employés pour cet essai (et tous les suivants) sont stériles. Le tableau 15 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 15 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 15.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [μl]	Volume du réactif pour 44 rxn + 5 % [μl]
Eau PCR	-	2.35	108.6
BSA 20 μg/ml	2 μg/ml	2.5	115.5
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	115.5
dNTPs 4 mM	200 μM	1.25	57.8
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	277.2
atpA-F 9 μM	0.8 μM	2.2	101.6
atpA-R 9 μM	0.8 μM	2.2	101.6
sonde YY-lectin-TMP 10 μM	0.2 μM	0.5	23.1
AmpliTaQGold 5 U/μl	2.5 U/rxn	0.5	23.1
Total		20	924

Pipeter 20 μl de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 μl d'ADN des différentes dilutions d'ADN pour les standards, 5 μl d'eau PCR pour les contrôles négatifs et 5 μl de réactifs de décontamination pour les tests de fluorescence. La real-time PCR est effectuée dans les conditions mentionnées par le tableau 16.

Tableau 16 : Conditions de réaction de la real-time PCR 2.

Etapes	Temps	Température [°C]	Cycles
Hold	2 min	50	-
Hold 2	10 min	95	-
Cycling	60 s	95	50
	60 s	60	50

Remarque : Les conditions utilisées pour ce deuxième essai seront gardées pour tous les autres essais lors de ce projet. Elles ne seront donc présentées qu'ici.

3.11 Real-time PCR 3: optimisation

Pour ce troisième essai, tous les réactifs utilisés pour préparer le mastermix ont été changé car l'un d'eux (ou plusieurs) était contaminés. Le but de ce troisième essai est donc d'arriver à obtenir des contrôles négatif qui soit négatif.

Le mastermix a été préparé dans la même salle que pour la PCR 1 et 2. Le tableau 17 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 17 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 17.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [µl]	Volume du réactif pour 15 rxn + 5 % [µl]
Eau PCR	-	2.35	37
BSA 20 µg/ml	2 µg/ml	2.5	39.4
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	39.4
dNTPs 4 mM	200 µM	1.25	19.7
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	94.5
atpA-F 9 µM	0.8 µM	2.2	34.7
atpA-R 9 µM	0.8 µM	2.2	34.7
sonde YY-lectin-TMP 10 µM	0.2 µM	0.5	7.9
AmpliTaqGold 5 U/µl	2.5 U/rxn	0.5	7.9
Total		20	315.2

Pipeter 20 µl de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 µl d'ADN des différentes dilutions d'ADN pour les standards et 5 µl d'eau PCR pour les contrôles négatifs

3.12 Real-time PCR 4: optimisation

Le but de ce quatrième essai est identique à la real-time PCR 3. Pour cela, le mastermix n'a plus été préparé dans la salle prévue à cet effet mais sous le flux laminaire du laboratoire F105 de biologie moléculaire. Avant utilisation, le flux laminaire ainsi que la hotte (où l'ADN est ajouté au mastermix) ont été nettoyés à l'éthanol 70 % puis avec DNA Remover. Les pipettes se trouvant sous le flux et sous la hotte ont été démontées et nettoyées avec DNA Remover. Avant utilisation du flux laminaire, les UV ont été enclenchés une nuit. Le tableau 18 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 18 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 18.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [µl]	Volume du réactif pour 30 rxn + 5 % [µl]
Eau PCR	-	2.35	74
BSA 20 µg/ml	2 µg/ml	2.5	78.8
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	78.8
dNTPs 4 mM	200 µM	1.25	39.4
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	189

atpA-F 9 µM	0.8 µM	2.2	69.3
atpA-R 9 µM	0.8 µM	2.2	69.3
sonde YY-lectin-TMP 10 µM	0.2 µM	0.5	15.8
AmpliTaQGold 5 U/µl	2.5 U/rxn	0.5	15.8
Total		20	630.2

Pipeter 20 µl de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 µl d'ADN des différentes dilutions d'ADN pour les standards et 5 µl d'eau PCR pour les contrôles négatifs.

3.13 Test de purification 1 : méthode phenol/chloroform/isoamylalcohol

Le test de purification suivant est effectué avec l'ADN cible pool 2 (178.5 µg/ml). La méthode utilisée [16] est décrite ci-dessous :

1. Ajouter 200 µl de phenol/chloroforme/isoamylalcohol (25/24/1 v/v/v) à 200 µl d'ADN cible pool 2.
2. Vortexer 10 s et centrifuger 15 s à 14000 g.
3. Transférer le surnageant (= phase aqueuse) dans un nouvel Eppendorf.
4. Ajouter $\frac{1}{10}$ vol. de sodium acétate 3M pH 5.2 et mélanger par retournement.
5. Ajouter 2 vol. d'éthanol 100 % froid, vortexer 10 s et refroidir 30 min à -70 °C.
6. Centrifuger 5 min à 14000 g et jeter le surnageant.
7. Ajouter 1 ml d'éthanol 80 % (température ambiante), mélanger par retournement et centrifuger comme au point 6.
8. Jeter le surnageant et sécher le culot par vacuum 10 min à 800 mbar.
9. Dissoudre le culot dans le volume d'eau PCR approprié.

3.14 Test de purification 2 : méthode éthanol

Le test de purification suivant est effectué avec l'ADN cible pool 2 (178.5 µg/ml). La méthode utilisée [16] est décrite ci-dessous :

1. Ajouter $\frac{1}{10}$ vol. de sodium acétate 3M pH 5.2 à 100 µl d'ADN cible pool 2 et mélanger par retournement.
2. Ajouter 2 vol. d'éthanol 100 % froid, vortexer 10 s et refroidir 30 min à -70 °C.
3. Centrifuger 5 min à 14000 g et jeter le surnageant.
4. Ajouter 1 ml d'éthanol 80 % (température ambiante), mélanger par retournement et centrifuger comme au point 6.
5. Jeter le surnageant et sécher le culot par vacuum 10 min à 800 mbar.
6. Dissoudre le culot dans le volume d'eau PCR approprié.

3.15 Real-time PCR 5: optimisation

Le but de ce cinquième essai est de vérifier si la purification permet d'obtenir une efficacité de réaction proche de 100 %. L'ADN cible utilisé est celui obtenu par le test de purification 1. Le tableau 19 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 19 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 5.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [µl]	Volume du réactif pour 28 rxn + 5 % [µl]
Eau PCR	-	2.35	70.5
BSA 20 µg/ml	2 µg/ml	2.5	75
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	75
dNTPs 4 mM	200 µM	1.25	37.5
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	180
atpA-F 9 µM	0.8 µM	2.2	66
atpA-R 9 µM	0.8 µM	2.2	66

sonde YY-lectin-TMP 10 μ M	0.2 μ M	0.5	15
AmpliTaQGold 5 U/ μ l	2.5 U/rxn	0.5	15
Total		20	600

Pipeter 20 μ l de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 μ l d'ADN des différentes dilutions d'ADN pour les standards et 5 μ l d'eau PCR pour les contrôles négatifs.

3.16 ADN cible pool 3

Le pool 3 d'ADN cible (non purifié) est un mélange des pools 1 et 2 soit 5.5 ml à 273 μ g/ml.

3.17 Purification scale-up : méthode phenol/chloroform/isoamylalcool

La purification de l'ADN cible est effectuée sur le pool 3 (273 μ g/ml), soit sur tout le volume d'ADN cible disponible. Le protocole suivi est décrit ci-dessous :

1. Ajouter 500 μ l de phenol/chloroforme/isoamylalcool (25/24/1 v/v/v) à 500 μ l d'ADN cible pool 3.
2. Vortexer 10 s et centrifuger 15 s à 14000 g.
3. Transférer le surnageant (= phase aqueuse) dans un nouvel Eppendorf.
4. Ajouter $\frac{1}{10}$ vol. de sodium acétate 3M pH 5.2 et mélanger par retournement.
5. Ajouter 2 vol. d'éthanol 100 % froid, vortexer 10 s et refroidir 2 h à -70 °C.
6. Centrifuger 5 min à 14000 g et jeter le surnageant.
7. Ajouter 1 ml d'éthanol 80 % (température ambiante), mélanger par retournement et centrifuger comme au point 6.
8. Jeter le surnageant et ajouter 500 μ l d'eau PCR avant de sécher le culot par vacuum 20 min à 800 mbar.
9. Dissoudre le culot dans le volume d'eau PCR approprié.

3.18 Test d'efficacité : prélèvement pour real-time PCR 6

Préparation préalable

Les Eppendorf contenant le volume d'eau PCR adéquat pour le bon nombre d'échantillon, de contrôle positif et de contrôle négatif sont exposés aux UV une nuit dans le flux laminaire du laboratoire F105 de biologie moléculaire. Les surfaces sur lesquelles les tests sont effectués subissent également le même traitement. Ce traitement est une mesure de précaution pour prévenir une contamination du matériel employé. Ceci a été réalisé pour le prélèvement de la real-time PCR 6 ainsi que pour tous les prélèvements suivant, c'est pourquoi ce paragraphe ne sera pas répété dans les sections prélèvements suivantes.

Prélèvements

Ces prélèvements ainsi que tous les autres réalisés au cours du travail de diplôme sont effectués sous le flux laminaire de culture cellulaire. Ici, le volume total dans lequel se font les tests est de 250 μ l. L'ADN cible utilisé pour effectuer ces prélèvements et tous les suivants est l'ADN cible pool 3 purifié (28.1 μ g/ml). Pour ces premiers tests sur surface, seul le réactif DNA Away sera utilisé. Les prélèvements se font de la manière suivante :

Contrôles négatifs :

- Pipeter 10 μ l d'eau PCR sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 45 min.
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 240 μ l d'eau PCR se trouvant dans l'eppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même eppendorf.

- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'éppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'éppendorf.

Contrôles positifs :

- Pipeter 10 µl d'ADN cible sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 45 min.
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 240 µl d'eau PCR se trouvant dans l'éppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même éppendorf.
- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'éppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'éppendorf.

Tests DNA Away ; rapport ADN/réactif (v/v) = 1/2 :

- Pipeter 10 µl d'ADN cible sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 45 min.
- Ajouter 20 µl de DNA Away sur chaque spot et laisser agir 10 min
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 220 µl d'eau PCR se trouvant dans l'éppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même éppendorf.
- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'éppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'éppendorf.

Tests DNA Away ; rapport ADN/réactif (v/v) = 1/1 :

- Pipeter 10 µl d'ADN cible sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 45 min.
- Ajouter 10 µl de DNA Away sur chaque spot et laisser agir 10 min
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 230 µl d'eau PCR se trouvant dans l'éppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même éppendorf.
- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'éppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'éppendorf.

Tests DNA Away ; rapport ADN/réactif (v/v) = 2/1 :

- Pipeter 10 µl d'ADN cible sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 45 min.
- Ajouter 5 µl de DNA Away sur chaque spot et laisser agir 10 min
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 235 µl d'eau PCR se trouvant dans l'éppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même éppendorf.
- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'éppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'éppendorf.

3.19 Real-time PCR 6 : optimisation des tests d'efficacité

Le but de cette real-time PCR est d'analyser les prélèvements effectués sur les surfaces et de vérifier que la méthode utilisée permette d'obtenir des contrôles négatifs qui soient négatifs et des contrôles positifs qui soient positifs. De plus, des prélèvements d'ADN cible traité par DNA Away dans différents rapports v/v ont été effectués afin de permettre la sélection des conditions pour les futurs tests. Le tableau 20 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 20 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 6.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [µl]	Volume du réactif pour 34 rxn + 5 % [µl]
Eau PCR	-	2.35	84.6
BSA 20 µg/ml	2 µg/ml	2.5	90
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	90
dNTPs 4 mM	200 µM	1.25	45
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	216
atpA-F 9 µM	0.8 µM	2.2	79.2
atpA-R 9 µM	0.8 µM	2.2	79.2
sonde YY-lectin-TMP 10 µM	0.2 µM	0.5	18
AmpliAqGold 5 U/µl	2.5 U/rxn	0.5	18
Total		20	720

Pipeter 20 µl de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 µl des divers échantillons (tests d'efficacité, contrôle positif et contrôle négatif de surface) et 5 µl d'eau PCR pour les contrôles négatifs.

3.20 Test d'efficacité : prélèvement pour real-time PCR 7

Ici, le volume total dans lequel se font les tests est de 500 µl. Tout comme pour les tests précédents, seul le réactif DNA Away sera utilisé ici. Etant donné que seuls les volumes d'eau PCR dans les eppendorf changent pour ces prélèvements (le volume total étant de 500 µl), le protocole à suivre ne sera pas décrit ici. La méthode de prélèvement ne variant pas jusqu'à la real-time PCR 11, elle ne sera donc pas décrit pour les real-time PCR 8, 9 et 10.

3.21 Real-time PCR 7 : optimisation des tests d'efficacité

Le but de cette real-time PCR est le même que la real-time PCR 6. De plus, une nouvelle courbe de calibration contenant deux dilutions de plus est effectuée. Le tableau 21 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 21 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 7.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [µl]	Volume du réactif pour 49 rxn + 5 % [µl]
Eau PCR	-	2.35	122.2
BSA 20 µg/ml	2 µg/ml	2.5	130
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	130
dNTPs 4 mM	200 µM	1.25	65
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	312
atpA-F 9 µM	0.8 µM	2.2	114.4
atpA-R 9 µM	0.8 µM	2.2	114.4
sonde YY-lectin-TMP 10 µM	0.2 µM	0.5	26
AmpliAqGold 5 U/µl	2.5 U/rxn	0.5	26
Total		20	1040

Pipeter 20 µl de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 µl des divers échantillons (tests d'efficacité, contrôle positif et contrôle négatif de surface), 5 µl des différentes dilutions d'ADN cible pour les standards et 5 µl d'eau PCR pour les contrôles négatifs.

3.22 Real-time PCR 8 : tests d'efficacité

Les conditions de réaction choisies (rapport ADN/réactif (v/v) = 1/2), de nouveaux tests d'efficacité sont réalisés. Pour cela, les réactifs suivants sont employés : DNA Away, LTK 008 et DNA Remover. La real-time PCR 8 a pour but d'analyser ces divers prélèvements. La courbe de calibration utilisée pour la real-time PCR 8 (et toutes les suivantes) est celle effectuée pour la real-time PCR 7. Seul un standard de cette courbe doit être analysé à chaque nouvelle real-time PCR afin d'ajuster la courbe. Le tableau 22 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 22 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 8.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [µl]	Volume du réactif pour 52 rxn + 5 % [µl]
Eau PCR	-	2.35	129.3
BSA 20 µg/ml	2 µg/ml	2.5	137.5
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	137.5
dNTPs 4 mM	200 µM	1.25	68.8
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	330
atpA-F 9 µM	0.8 µM	2.2	121
atpA-R 9 µM	0.8 µM	2.2	121
sonde YY-lectin-TMP 10 µM	0.2 µM	0.5	27.5
AmpliTaGold 5 U/µl	2.5 U/rxn	0.5	27.5
Total		20	1100.1

Pipeter 20 µl de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 µl des divers échantillons (tests d'efficacité, contrôle positif et contrôle négatif de surface), 5 µl d'une des dilutions d'ADN cible pour le standard et 5 µl d'eau PCR pour les contrôles négatifs.

3.23 Real-time PCR 9 : tests d'efficacité

Le but de la real-time PCR 9 est le même que la real-time PCR 8 mais en analysant cette fois les échantillons testés des réactifs suivants : LookOut DNA Erase, DNA ExitusPlus, DNA Decontamination reagent.

La préparation du mastermix s'est faite de la même manière que pour la real-time PCR 8 c'est pourquoi elle ne sera pas décrite ici.

3.24 Real-time PCR 10 : tests d'efficacité

Le but de la real-time PCR 10 est le même que les real-time PCR 8 et 9 mais en analysant cette fois les échantillons testés des réactifs suivants : Javel 5 % et DNA Zap. Le tableau 23 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 23 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 10.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [µl]	Volume du réactif pour 36 rxn + 5 % [µl]
Eau PCR	-	2.35	89.3
BSA 20 µg/ml	2 µg/ml	2.5	95
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	95
dNTPs 4 mM	200 µM	1.25	47.5
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	228
atpA-F 9 µM	0.8 µM	2.2	83.6

atpA-R 9 µM	0.8 µM	2.2	83.6
sonde YY-lectin-TMP 10 µM	0.2 µM	0.5	19
AmpliTaQGold 5 U/µl	2.5 U/rxn	0.5	19
Total		20	760

Pipeter 20 µl de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 µl des divers échantillons (tests d'efficacité, contrôle positif et contrôle négatif de surface), 5 µl d'une des dilutions d'ADN cible pour le standard et 5 µl d'eau PCR pour les contrôles négatifs.

3.25 Test d'efficacité : prélèvement pour real-time PCR 11

Une petite modification dans la méthode de prélèvement des contrôles négatifs et positifs est opérée pour la real-time PCR 11 (et pour les suivantes) c'est pourquoi elle est à nouveau décrite ici.

Contrôles négatifs :

- Pipeter 10 µl d'eau PCR sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 45 min.
- Ajouter 20 µl d'eau PCR sur chaque spot et laisser agir 10 min
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 470 µl d'eau PCR se trouvant dans l'eppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même eppendorf.
- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'eppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'eppendorf.

Contrôles positifs :

- Pipeter 10 µl d'ADN cible sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 45 min.
- Ajouter 20 µl d'eau PCR sur chaque spot et laisser agir 10 min.
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 470 µl d'eau PCR se trouvant dans l'eppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même eppendorf.
- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'eppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'eppendorf.

3.26 Real-time PCR 11 : tests d'efficacité

Les tests effectués pour les real-time PCR 8, 9 et 10 sont refait pour vérifier la reproductibilité de la méthode. Les mêmes conditions de réactions sont utilisés (rapport ADN/réactif (v/v) = 1/2). La real-time PCR 11 a pour but d'analyser ces nouveaux prélèvements qui ont été effectués avec les réactifs suivants : Javel 5 %, LTK 008, DNA Away et DNA Decontamination reagent. Le tableau 24 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 24 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 11.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [µl]	Volume du réactif pour 63 rxn + 5 % [µl]
Eau PCR	-	2.35	155.1
BSA 20 µg/ml	2 µg/ml	2.5	165
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	165
dNTPs 4 mM	200 µM	1.25	82.5
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	396
atpA-F 9 µM	0.8 µM	2.2	145.2

atpA-R 9 µM	0.8 µM	2.2	145.2
sonde YY-lectin-TMP 10 µM	0.2 µM	0.5	33
AmpliTaqGold 5 U/µl	2.5 U/rxn	0.5	33
Total		20	1320

Pipeter 20 µl de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 µl des divers échantillons (tests d'efficacité, contrôle positif et contrôle négatif de surface), 5 µl d'une des dilutions d'ADN cible pour le standard et 5 µl d'eau PCR pour les contrôles négatifs.

3.27 Real-time PCR 12 : tests d'efficacité

Le but de la real-time PCR 12 est le même que celui de la real-time PCR 11 mais cette fois-ci en analysant les échantillons effectués avec les réactifs suivants : LookOut DNA Erase, DNA Remover, DNA ExitusPlus, DNA Zap.

La préparation du mastermix s'est faite de la même manière que pour la real-time PCR 11 c'est pourquoi elle ne sera pas décrite ici.

3.28 Test d'efficacité : prélèvement pour real-time PCR 13

Les tests d'efficacité suivants sont effectués avec des spots de 5 µl. Le volume de réactif ajouté est toujours de 20 µl. Le protocole à suivre est décrit ci-dessous. A noter que celui-ci est également valable pour la real-time PCR 14.

Contrôles négatifs :

- Pipeter 5 µl d'eau PCR sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 45 min.
- Ajouter 20 µl d'eau PCR sur chaque spot et laisser agir 10 min
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 475 µl d'eau PCR se trouvant dans l'eppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même eppendorf.
- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'eppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'eppendorf.

Contrôles positifs :

- Pipeter 5 µl d'ADN cible sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 45 min.
- Ajouter 20 µl d'eau PCR sur chaque spot et laisser agir 10 min.
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 475 µl d'eau PCR se trouvant dans l'eppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même eppendorf.
- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'eppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'eppendorf.

Tests réactifs ; rapport ADN/réactif (v/v) = 1/4 :

- Pipeter 5 µl d'ADN cible sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 45 min.
- Ajouter 20 µl de réactif sur chaque spot et laisser agir 10 min
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 475 µl d'eau PCR se trouvant dans l'eppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même eppendorf.

- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'éppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'éppendorf.

3.29 Real-time PCR 13 : tests d'efficacité

La real-time PCR 13 a pour but d'analyser les prélèvements effectués pour les tests d'efficacité dans les conditions suivantes : rapport ADN/réactif (v/v) = 1/4. Les réactifs DNA Decontamination reagent, DNA Away, LookOut DNA Erase, DNA Remover et DNA Zap ont été testés ici. Le tableau 25 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 25 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 13.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [µl]	Volume du réactif pour 67 rxn + 5 % [µl]
Eau PCR	-	2.35	166.9
BSA 20 µg/ml	2 µg/ml	2.5	177.5
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	177.5
dNTPs 4 mM	200 µM	1.25	88.8
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	426
atpA-F 9 µM	0.8 µM	2.2	156.2
atpA-R 9 µM	0.8 µM	2.2	156.2
sonde YY-lectin-TMP 10 µM	0.2 µM	0.5	35.5
AmpliTaqGold 5 U/µl	2.5 U/rxn	0.5	35.5
Total		20	1420.1

Pipeter 20 µl de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 µl des divers échantillons (tests d'efficacité, contrôle positif et contrôle négatif de surface), 5 µl d'une des dilutions d'ADN cible pour le standard et 5 µl d'eau PCR pour les contrôles négatifs.

3.30 Real-time PCR 14 : tests d'efficacité

Le but de la real-time PCR 14 est le même que celui de la real-time PCR 13 mais cette fois en analysant les prélèvements faits avec les réactifs suivants : Javel 5 %, LTK 008 et DNA ExitusPlus.

La préparation du mastermix s'est faite de la même manière que pour la real-time PCR 2 c'est pourquoi elle ne sera pas décrite ici.

3.31 Test d'efficacité : prélèvement pour real-time PCR 15

Les tests d'efficacité suivants sont effectués avec des spots de 30 µl. Le volume de réactif ajouté est toujours de 20 µl. Le protocole à suivre est décrit ci-dessous. A noter que celui-ci est également valable pour la real-time PCR 16.

Contrôles négatifs :

- Pipeter 30 µl d'eau PCR sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 1h30.
- Ajouter 20 µl d'eau PCR sur chaque spot et laisser agir 10 min
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 450 µl d'eau PCR se trouvant dans l'éppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même éppendorf.
- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'éppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'éppendorf.

Contrôles positifs :

- Pipeter 30 µl d'ADN cible sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 1h30.
- Ajouter 20 µl d'eau PCR sur chaque spot et laisser agir 10 min.
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 450 µl d'eau PCR se trouvant dans l'eppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même eppendorf.
- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'eppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'eppendorf.

Tests réactifs ; rapport ADN/réactif (v/v) = 1/0.6 :

- Pipeter 30 µl d'ADN cible sur chaque spot prévu à cet effet et laisser sécher environ 1h30.
- Ajouter 20 µl de réactif sur chaque spot et laisser agir 10 min
- Humecter le swab en le trempant légèrement dans les 450 µl d'eau PCR se trouvant dans l'eppendorf prévu à cet effet.
- Frotter le spot avec le swab de manière à ce que toute la tête du swab entre en contact avec la surface.
- Tremper ensuite plusieurs fois le swab dans le volume d'eau PCR du même eppendorf.
- Egoutter ensuite le swab en pressant sa tête vigoureusement contre la paroi interne de l'eppendorf et ceci en appliquant un mouvement circulaire.
- Jeter le swab et fermer l'eppendorf.

3.32 Real-time PCR 15 : tests d'efficacité

La real-time PCR 15 a pour but d'analyser les prélèvements effectués pour les tests d'efficacité dans les conditions suivantes : rapport ADN/réactif (v/v) = 1/0.6. Les réactifs Javel 5 %, LTK 008, DNA ExitusPlus et DNA Remover ont été testés ici. Le tableau 26 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 26 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 15.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [µl]	Volume du réactif pour 56 rxn + 5 % [µl]
Eau PCR	-	2.35	138.7
BSA 20 µg/ml	2 µg/ml	2.5	147.5
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	147.5
dNTPs 4 mM	200 µM	1.25	73.8
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	354
atpA-F 9 µM	0.8 µM	2.2	129.8
atpA-R 9 µM	0.8 µM	2.2	129.8
sonde YY-lectin-TMP 10 µM	0.2 µM	0.5	29.5
AmpliAqGold 5 U/µl	2.5 U/rxn	0.5	29.5
Total		20	1180.1

Pipeter 20 µl de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 µl des divers échantillons (tests d'efficacité, contrôle positif et contrôle négatif de surface), 5 µl d'une des dilutions d'ADN cible pour le standard et 5 µl d'eau PCR pour les contrôles négatifs.

3.33 Real-time PCR 16 : tests d'efficacité

Le but de la real-time PCR 16 est le même que celui de la real-time PCR 15 mais cette fois en analysant les prélèvements faits avec les réactifs suivants : DNA Decontamination reagent, DNA Away, LookOut DNA Erase et DNA Zap.

La préparation du mastermix s'est faite de la même manière que pour la real-time PCR 15 c'est pourquoi elle ne sera pas décrite ici.

3.34 Real-time PCR 17 : tests d'efficacité

Des tests d'efficacité avec différentes dilutions de Javel 5 % ont été effectués. Ces prélèvements ont été fait dans les conditions suivantes : rapport ADN/réactif (v/v) = 1/2. La méthode de prélèvements est la même que celle décrite pour la real-time PCR 11. De plus, des tests d'efficacité avec le réactif DNA ExitusPlus ont été à nouveau effectués dans les conditions suivantes : rapport ADN/réactif (v/v) = 1/4. La méthode de prélèvements est la même que celle décrite pour la real-time PCR 13.

Le but de la real-time PCR 17 est d'analyser ces différents prélèvements. Le tableau 27 présente les réactifs et les quantités utilisées pour préparer le mastermix.

Tableau 27 : Réactifs et quantités utilisés pour préparer le mastermix de la real-time PCR 17.

Réactifs	Concentration finale	Volume du réactif pour 1 rxn [µl]	Volume du réactif pour 43 rxn + 5 % [µl]
Eau PCR	-	2.35	106
BSA 20 µg/ml	2 µg/ml	2.5	113
Tampon PCR 10 X	1 X	2.5	113
dNTPs 4 mM	200 µM	1.25	57
MgCl ₂ 25 mM	6 mM	6	270
atpA-F 9 µM	0.8 µM	2.2	99
atpA-R 9 µM	0.8 µM	2.2	99
sonde YY-lectin-TMP 10 µM	0.2 µM	0.5	22.5
AmpliTaqGold 5 U/µl	2.5 U/rxn	0.5	22.5
Total		20	902

Pipeter 20 µl de mastermix dans chaque tube PCR et ajouter 5 µl des divers échantillons (tests d'efficacité, contrôle positif et contrôle négatif de surface), 5 µl d'une des dilutions d'ADN cible pour le standard et 5 µl d'eau PCR pour les contrôles négatifs.

3.35 Tests de corrosion

Les tests de corrosion ont été réalisés selon deux méthodes. Ces deux méthodes sont décrites ci-après.

3.35.1 Méthode par spots

Les tests de corrosion par spots sont des tests qualitatifs. La méthode utilisée est décrite ci-dessous :

- Faire des spots de 20 µl des divers réactifs et d'eau déminéralisée (contrôle négatif) sur chaque barrette et laisser réagir le temps nécessaire à température ambiante.
- Eliminer le réactif avec un papier absorbant, rincer avec de l'eau déminéralisée et sécher avec un papier absorbant.
- Faire une photo en alignant les barrettes des différents matériaux.

3.35.2 Méthode par immersion

Les tests de corrosion par immersion sont des tests quantitatifs. La méthode utilisée est décrite ci-dessous :

- Faire sécher les barrettes à l'étuve pendant 2h à 50 °C.

- Peser les barrettes à la balance analytiques.
- Huit barrettes de chaque matière testée sont trempées chacune dans 30 ml d'un réactif différents.
- Laisser réagir à température ambiante pendant le temps désiré.
- Sortir les barrettes des réactifs et rincer avec de l'eau déminéralisée.
- Sécher les barrettes à l'étuve pendant 2h à 50 °C.
- Peser les barrettes à la balance analytiques.

A noter que pour les matières plastiques (PVC, PTFE, Ertalon et polypropylène), les tests de corrosion par immersion sont effectués de manière qualitative, c'est-à-dire sans peser les barrettes avant et après traitement.

4. Résultats

4.1 Extraction du plasmide pUC18 + insert

Après culture de *E.coli* XL1-Blue sur le milieu de culture LB-Broth + ampicilline, les colonies obtenues ont été utilisées pour faire l'extraction du plasmide pUC18 + insert ; il en résulte le pool plasmide 1. Pour vérifier que le plasmide a bien été obtenu, un gel d'agarose a été effectué. La figure 4 présente la photo de ce gel.

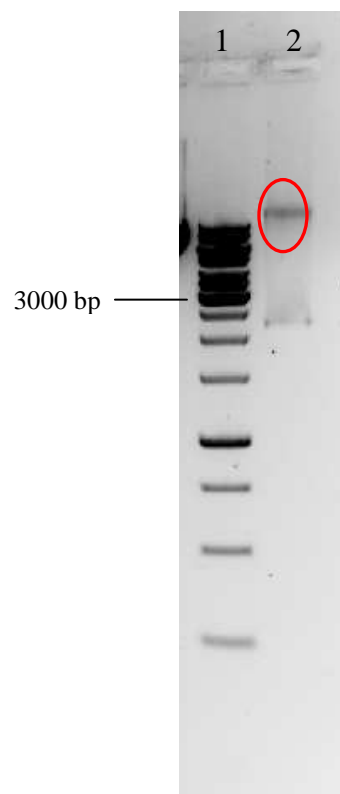


Figure 4 : Gel d'agarose 0.8 % (TBE 1X) du pool plasmide 1.

1. Marqueur GeneRuler 1kb DNA Ladder
2. Pool plasmide 1

On observe la bande du plasmide pUC18 + insert (entourée en rouge) ce qui confirme l'obtention dudit plasmide. Celui-ci à une taille de 3007 bp et pourtant la bande obtenue n'apparaît pas à côté de la bande 3000 bp du marqueur. Ceci est tout à fait normal car l'ADN du marqueur est linéaire alors que le plasmide lui est circulaire c'est pourquoi ils ne migrent pas de la même manière. Le marqueur n'est donc pas vraiment utile ici.

La concentration en ADN double brin a été quantifiée par la méthode spectrophotométrique. Le tableau 28 présente les résultats obtenus.

Tableau 28 : Concentration en ADN du pool plasmide 1.

Echantillon	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{320 nm}	rapport A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentration [µg/ml]
pool plasmide 1	0.352	0.2	0.034	1.8	15.9

Après extraction on obtient donc le plasmide pUC18 + insert à une concentration de 15.9 µg/ml. Le rapport A₂₆₀/A₂₈₀ est de 1.8, on peut donc considérer le pool plasmide 1 obtenu comme étant pur.

4.2 Optimisation de la réaction PCR

Pour obtenir l'ADN cible, il faut amplifier celui-ci à partir du plasmide pUC18 + insert. Ceci se fait par une réaction PCR conventionnelle. Cependant, avant d'effectuer tout le volume de plasmide à disposition, il faut effectuer un test de différentes conditions PCR afin d'identifier quelle est la meilleure condition. Ici, trois concentrations en MgCl₂ du mastermix ont été variées, soit trois mastermix différents de 1.5 mM, 2.5 mM et 3.5 mM en MgCl₂.

Après PCR, un gel d'agarose a été effectué afin d'identifier la meilleure condition de réaction. La figure 5 présente les résultats obtenus.

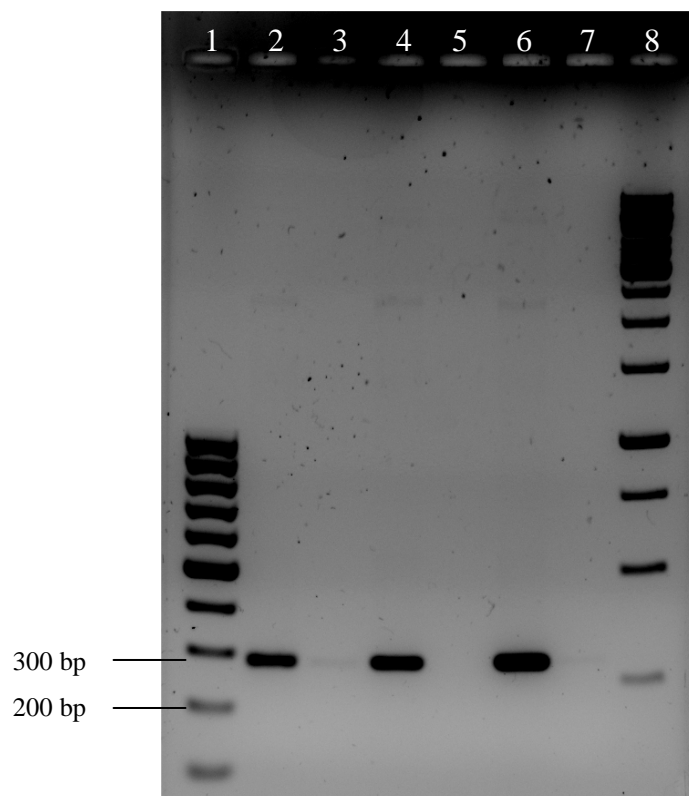


Figure 5 : Gel d'agarose 0.8 % (TBE 1X) après PCR.

1. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
2. Produit PCR avec mastermix 1.5 mM MgCl₂
3. Contrôle négatif avec mastermix 1.5 mM MgCl₂
4. Produit PCR avec mastermix 2.5 mM MgCl₂
5. Contrôle négatif avec mastermix 2.5 mM MgCl₂
6. Produit PCR avec mastermix 3.5 mM MgCl₂
7. Contrôle négatif avec mastermix 3.5 mM MgCl₂
8. Marqueur GeneRuler 1 kp DNA Ladder

On constate que chaque condition testée permet d'obtenir de manière satisfaisante le produit PCR voulu. Les contrôles négatifs ne présentent pas de bande sauf avec le mastermix 1.5 mM MgCl_2 (puit 3) ou l'on discerne une légère bande. Le produit d'amplification voulu (= ADN cible) a théoriquement une taille de 283 bp. On observe que les bandes obtenues sur le gel d'agarose se trouvent légèrement en dessous de la bande 300 bp du marqueur. Les trois PCR ont donc fonctionnées correctement. On constate cependant que la bande obtenu avec le mastermix 3.5 mM MgCl_2 (puit 6) est plus épaisse que les autres c'est donc cette condition de réaction qui a été retenue.

La concentration en ADN double brin des divers tests ci-dessus a été déterminé par la méthode spectrophotométrique. Le tableau 29 présente les résultats obtenus.

Tableau 29 : Concentration en ADN des produits PCR et contrôles négatifs effectués avec les mastermix 1.5 mM, 2.5 mM et 3.5 mM en MgCl_2 .

Echantillons*	$A_{260 \text{ nm}}$	$A_{280 \text{ nm}}$	$A_{320 \text{ nm}}$	rapport A_{260}/A_{280}	Concentration $[\mu\text{g/ml}]$
Produit PCR (mastermix 1.5 mM MgCl_2)	0.482	0.262	0	1.8	421.8
Contrôle négatif (mastermix 1.5 mM MgCl_2)	0.512	0.272	0	1.9	448.0
Produit PCR (mastermix 2.5 mM MgCl_2)	0.434	0.233	0	1.9	379.8
Contrôle négatif (mastermix 2.5 mM MgCl_2)	0.49	0.285	0.051	1.7	384.1
Produit PCR (mastermix 3.5 mM MgCl_2)	0.432	0.233	0	1.9	378.0
Contrôle négatif (mastermix 3.5 mM MgCl_2)	0.461	0.245	0	1.9	403.4

*A noter que les absorbances présentées sont celles des échantillons dilués 17.5 fois mais qu'il est tenu compte de ce facteur de dilution pour le calcul des concentrations.

Les rapports A_{260}/A_{280} sont entre 1.7 et 2.0, on peut donc considérer les produits PCR obtenus comme étant pur.

Contrairement au gel d'agarose, on constate ici que la condition qui permette d'obtenir le plus d'ADN cible soit celle avec le mastermix 1.5 mM MgCl_2 . Cependant, on constate également que tous les contrôles négatifs possèdent une concentration en ADN double brin semblable aux trois différentes conditions. Pourtant, en regardant les contrôles sur le gel on voit clairement qu'il n'y a pas de bandes clairement prononcée comme pour les produit PCR. Il semblerait donc que quelque chose dans le mastermix absorbe à la même longueur d'onde que l'ADN double brin, probablement les nucléotides (dNTPs). Ici, le gel d'agarose est donc plus fiable que la quantification par spectrophotométrie pour sélectionner la condition de réaction.

4.3 PCR scale up pour obtenir ADN cible pool 1

Les conditions de la réaction PCR ayant été déterminées, tout le volume de plasmide pUC18 + insert obtenu par extraction a été utilisé pour obtenir l'ADN cible pool 1, cela en faisant 46 réactions PCR. Un volume de 2.3 ml d'ADN cible est donc obtenu. Un gel d'agarose a été effectué pour vérifier le bon déroulement de l'opération. La figure 6 présente ce gel.

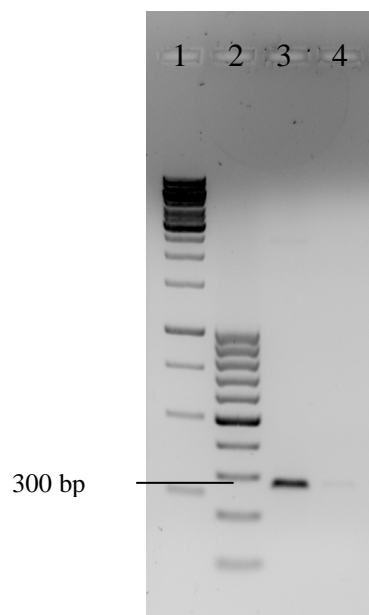


Figure 6 : Gel d'agarose 0.8 % (TBE 1X) après PCR scale up.

1. Marqueur GeneRuler 1 kp DNA Ladder
2. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
3. ADN cible pool 1
4. Contrôle négatif du mastermix

Le gel d'agarose montre que les réactions PCR se sont bien déroulées. En effet, pour le pool d'ADN cible 1 on retrouve la même bande qu'observée précédemment pour les tests d'optimisation. A noter que le contrôle négatif présente une légère bande ce qui témoigne déjà de la difficulté de travailler avec un plasmide sans que celui-ci ne contamine les autres échantillons.

La concentration en ADN double brin de l'ADN cible pool 1 est a nouveau déterminée selon la méthode spectrophotométrique. Le tableau 30 présente les résultats obtenus.

Tableau 30 : Concentration en ADN de l'ADN cible pool 1.

Echantillon*	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{320 nm}	rapport A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentration [µg/ml]
ADN cible pool 1	0.639	0.357	0.029	1.8	533.8
Contrôle négatif du mastermix	0.446	0.253	0.014	1.8	378

*A noter que les absorbances présentées sont celles des échantillons dilués 17.5 fois mais qu'il est tenu compte de ce facteur de dilution pour le calcul des concentrations.

Le rapport A₂₆₀/A₂₈₀ est de 1.8, on peut donc considérer l'ADN cible pool 1 comme étant pur. Comme précédemment, le contrôle négatif du mastermix présente une absorbance. Ceci s'explique de la même manière que ci-dessus.

4.4 PCR scale up pour obtenir ADN cible pool 2

L'ADN cible pool 1 n'étant pas suffisant pour effectuer tous les tests d'efficacité voulus, un deuxième pool d'ADN a été produit. Pour cela, une nouvelle culture de *E.coli* XL1-Blue ainsi qu'une nouvelle extraction de plasmide sont réalisées. Ainsi, on obtient après extraction 700 µl de plasmide à 16.1 µg/ml (= pool plasmide 2). Ensuite, 76 réactions PCR sont effectuées avec le pool plasmide 2, ceci afin d'obtenir l'ADN cible pool 2. Ce dernier représente un volume de 3.8 ml.

Afin de vérifier à nouveau que les opérations se sont déroulées comme prévues, un gel d'électrophorèse a été effectué. La figure 7 présente les résultats obtenus.

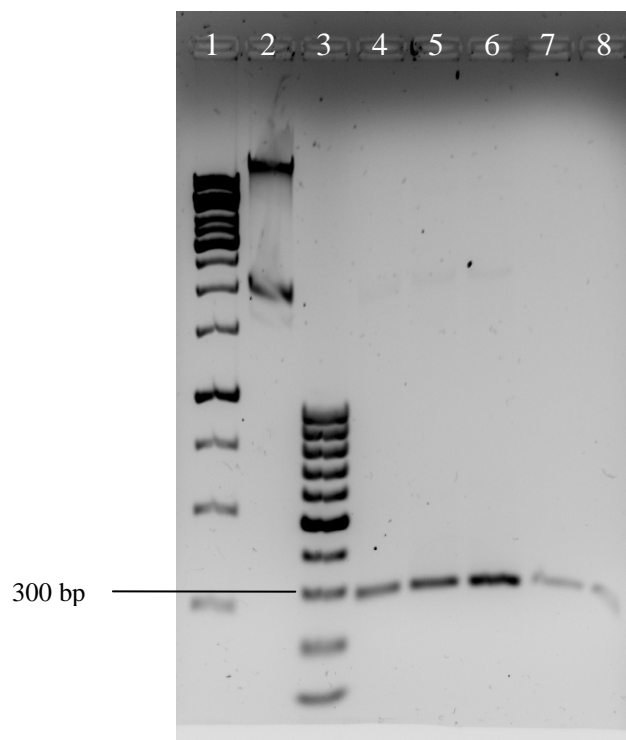


Figure 7 : Gel d'agarose 0.8 % (TBE 1X) après PCR scale up.

1. Marqueur GeneRuler 1 kp DNA Ladder
2. Pool plasmide 2
3. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 4-6. ADN cible pool 2
- 7-8. Contrôle négatif du mastermix

Pour le pool plasmide 2 (puits 2), on constate que la bande du plasmide est tout à fait similaire à celle obtenue pour le pool plasmide 1, la deuxième extraction a donc réussi. Quant l'ADN cible pool 2 (= produit d'amplification obtenu par PCR à partir du pool plasmide 2), les bandes obtenues (puits 4,5 et 6) sont également similaires à celles obtenues pour l'ADN cible pool 1, à savoir des bandes légèrement en dessous de la bande 300 bp du marqueur. Ceci montre que les réactions PCR se sont déroulées correctement. Cependant, pour les contrôles négatifs de la PCR (puits 7 et 8) on voit que des bandes sont visibles. Celles-ci sont à la même hauteur que les bandes des produits PCR ce qui témoigne d'une contamination des contrôles négatifs par le plasmide pUC18 + insert. Ceci démontre une nouvelle fois la difficulté de travailler avec des plasmides.

La concentration en ADN double brin de l'ADN cible pool 2 est déterminée selon la méthode spectrophotométrique. Le tableau 31 présente les résultats obtenus.

Tableau 31 : Concentration en ADN de l'ADN cible pool 2.

Echantillon*	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{320 nm}	rapport A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentration [µg/ml]
ADN cible pool 2	0.204	0.111	0	1.8	178.5

*A noter que les absorbances présentées sont celles des échantillons dilués 17.5 fois mais qu'il est tenu compte de ce facteur de dilution pour le calcul de la concentration.

Le rapport A_{260}/A_{280} est de 1.8, on peut donc considérer l'ADN cible pool 2 comme étant pur. La concentration obtenue pour l'ADN cible pool 2 est par contre nettement inférieure à celle obtenue pour l'ADN cible pool 1 (533.8 µg/ml).

4.5 Real-time PCR 1 : optimisation

La real-time PCR 1 a été réalisée pour mettre au point une courbe de calibration afin de pouvoir utiliser celle-ci lors de l'analyse des tests d'efficacité des réactifs de décontamination. En effet, avec une courbe de calibration on peut ensuite quantifier l'ADN résiduel qui n'a pas été dégradé par les réactifs de décontamination. L'ADN cible utilisé pour les différentes dilutions est l'ADN cible pool 1. De plus, d'autres tests - à savoir l'ajout au mastermix de chaque réactif de décontamination à la place de l'ADN - ont été réalisés afin de vérifier que les réactifs à tester n'émettent pas de fluorescence.

En consultant le rapport d'analyse (Annexe 1) on constate d'emblé que les contrôles négatifs du mastermix (no template control) sont tous clairement positifs. En effet la valeur Ct moyenne est de 21.19 avec un écart-type de 2.08. Ceci est montré par la figure 8 qui est tirée du rapport d'analyse. Ceci indique donc que le mastermix utilisé a été contaminé. La courbe de calibration effectuée ne peut donc pas être utilisée pour quantifier les échantillons des tests d'efficacité. De plus, celle-ci possède une efficacité de réaction de 1.72823 (soit 172.8 %) alors que celle-ci devrait être proche de 100 %.

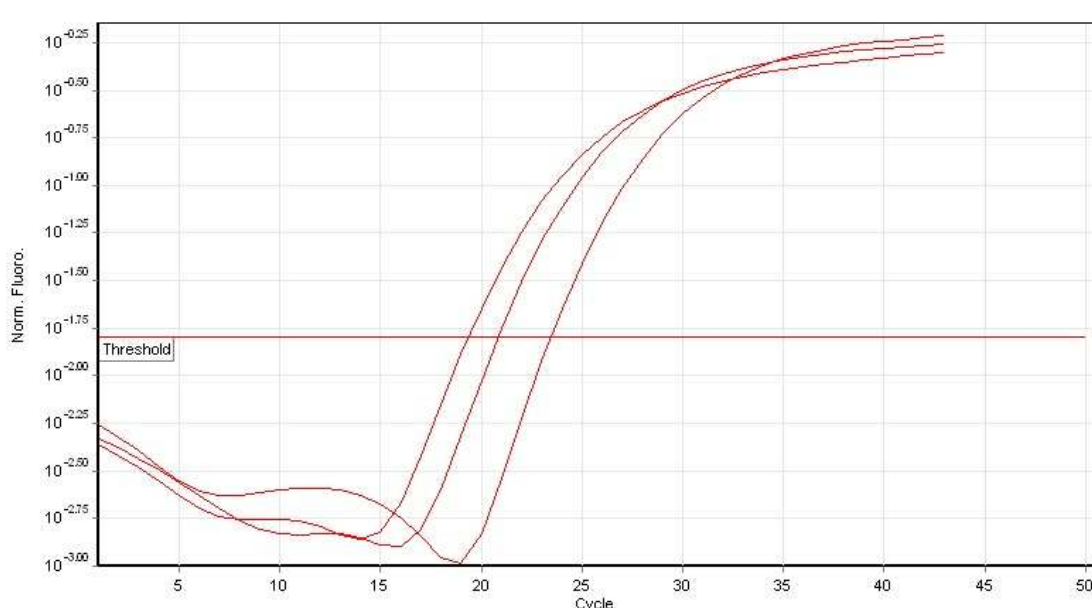


Figure 8 : Courbe d'amplification obtenue pour les NTC de la real-time PCR 1.

A noter tout de même que les tests réalisés pour vérifier que les réactifs de décontamination n'émettent pas de fluorescence n'ont pas donné de valeur Ct sauf pour un des duplicat effectué avec le réactif LTK 008. Ceci signifie donc que les réactifs de décontamination n'émettent pas de fluorescence ce qui aurait été un problème pour l'analyse des tests d'efficacité. En effet il est important pour ces tests de savoir que si une fluorescence est émise qu'elle soit due à la présence d'ADN résiduel et non à la présence du réactif de décontamination. On peut également en déduire que malgré la contamination du mastermix, les réactifs de décontamination ont empêché l'ADN contaminant d'être amplifié. Deux gels d'électrophorèses ont été effectués afin de vérifier cette déduction. Les résultats obtenus sont présentés par les figures 9 et 10.

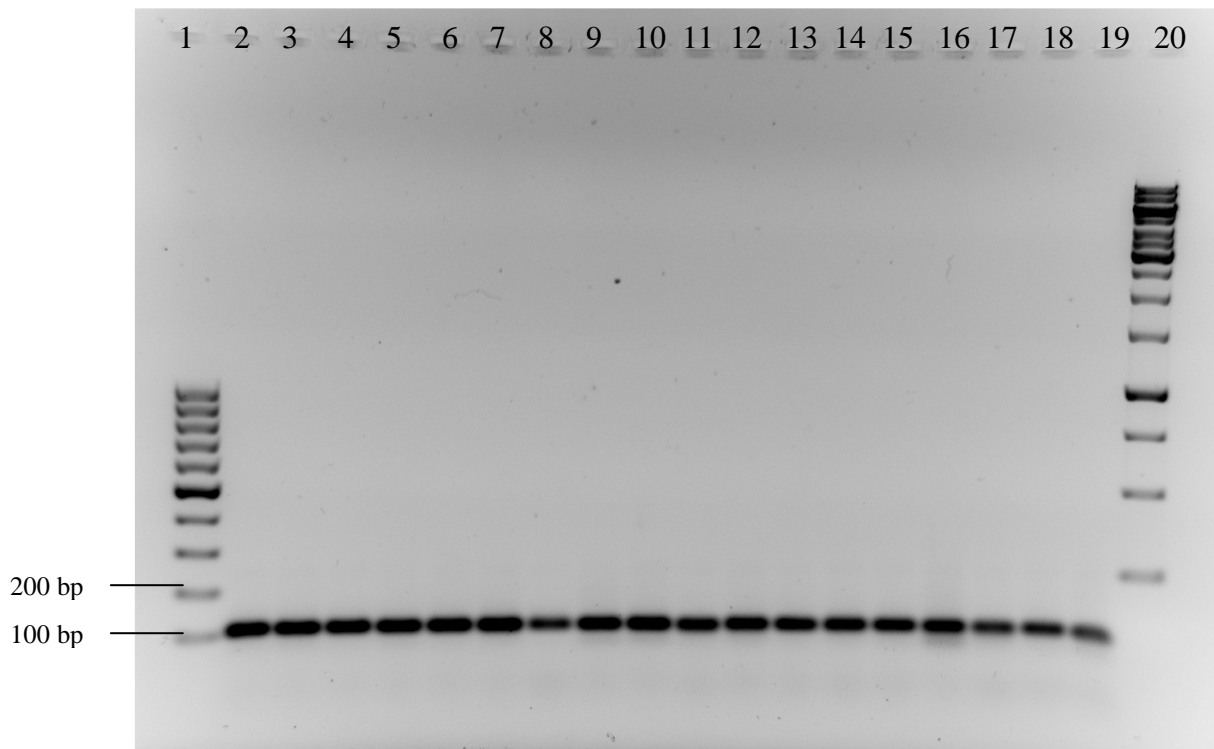


Figure 9: Gel d'agarose (1) 0.8 % (TBE 1X) après real-time PCR 1.

1. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 2-4. Standard (ADN cible pool 1) : dilutions 10⁻³
- 5-7. Standard (ADN cible pool 1) : dilutions 10⁻⁴
- 8-10. Standard (ADN cible pool 1) : dilutions 10⁻⁵
- 11-13. Standard (ADN cible pool 1) : dilutions 10⁻⁶
- 14-16. Standard (ADN cible pool 1) : dilutions 10⁻⁷
- 17-19. Standard (ADN cible pool 1) : dilutions 10⁻⁸
20. Marqueur GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Le premier gel d'agarose montre les produits PCR obtenus à partir des différentes dilutions de l'ADN cible pool 1. On observe que toutes les bandes obtenues sont à la même hauteur, légèrement au-dessus de la bande 100 bp du marqueur. Ceci est tout à fait logique car le produit PCR a une taille de 106 bp.

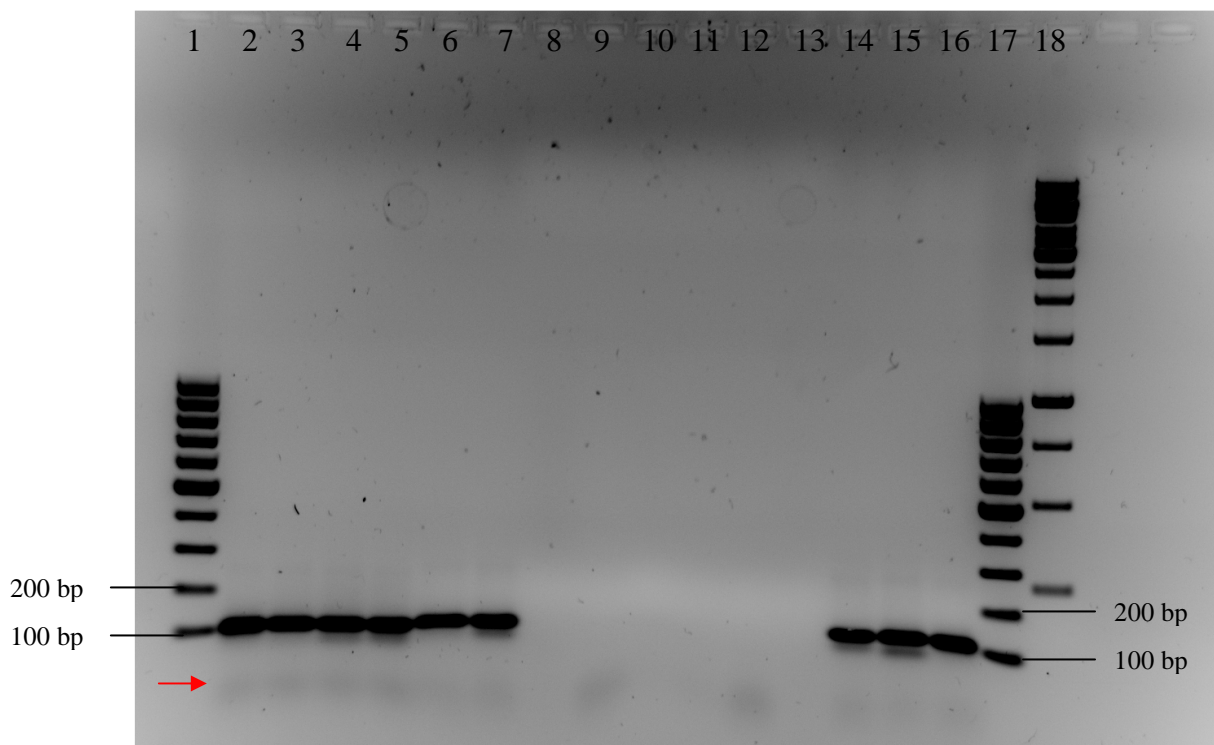


Figure 10: Gel d'agarose (2) 0.8 % (TBE 1X) après real-time PCR 1.

1. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 2-4. Standard (ADN cible pool 1) : dilutions 10^{-9}
- 5-7. Standard (ADN cible pool 1) : dilutions 10^{-10}
8. Test fluorescence réactif : DNA ExitusPlus
9. Test fluorescence réactif : DNA Decontamination reagent
10. Test fluorescence réactif : LookOut DNA Erase
11. Test fluorescence réactif : LTK 008
12. Test fluorescence réactif : DNA Away
13. Test fluorescence réactif : DNA Zap
- 14-16. Contrôle négatif du mastermix
17. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
18. Marqueur GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Le deuxième gel d'agarose montre les dernières dilutions de l'ADN cible pool 1 (puits 2-4 et 5-7). Les bandes obtenues sont identiques à celles des dilutions du gel précédent. On constate toutefois sur ce gel de très légères bandes (indiquées par la flèche rouge) qui se trouve en dessous des bandes des produits PCR. Ce sont probablement les monomères d'amorces (atpA-F est de 28 bp et atpA-R est de 20 bp) étant donné la faible taille de cette séquence ADN.

Pour les tests de fluorescence des réactifs, on ne constate aucune bande de produit PCR, juste une bande qui correspond probablement aux monomères d'amorces pour les réactifs DNA Decontamination reagent (puits 9) et DNA Away (puits 12). Ceci prouve que les réactifs de décontamination ont empêchés la contamination présente dans le mastermix d'être amplifiée.

Cette contamination du mastermix est également démontrée par la présence des bandes de produit PCR dans les puits 14 à 16.

La contamination du mastermix de la real-time PCR 1 peut être expliquée suite à une erreur de sélection des tubes PCR. En effet, les tubes PCR utilisés n'étaient pas stériles. A noter que le mastermix a été préparé dans la salle des mastermix du labo F105 c'est-à-dire dans un espace isolé spatialement du reste du laboratoire mais qui n'est pas stérile car l'air n'y est pas ventilé et filtré.

4.6 Real-time PCR 2 : optimisation

La real-time PCR 2 a été effectuée pour refaire les tests réalisés lors de la real-time PCR 1. Cette fois cependant, les tubes PCR utilisés sont stériles. A noter que le mastermix a été préparé à nouveau dans la salle des mastermix, le flux laminaire n'étant pas disponible.

Le rapport d'analyse (Annexe 2) montre à nouveau que les contrôles négatifs (NTC) sont positifs. Ceci est montré par la figure 11 qui provient du rapport d'analyse. Trois différentes eau PCR ont été testées afin de savoir si c'est l'eau PCR de la real-time PCR 1 qui est contaminée. Les trois eaux PCR testées sont une eau fournie par un kit, une eau PCR préparée par moi-même et une eau PCR préparée par Sarah W. Toutes trois sont contaminées car les résultats des valeurs Ct moyenne sont respectivement de 21.75 (analyse en triplicat avec écart-type de 0.08), de 21.69 (analyse en triplicat avec écart-type de 0.03) et de 21.56 (analyse effectuée qu'une seule fois). Il semblerait donc que la contamination soit la même que celle observée pour la real-time PCR 1 (valeur Ct moyenne de 21.19) et qu'elle ne provienne pas de l'eau PCR utilisée. Cette contamination doit donc probablement venir d'un réactif utilisé pour faire le mastermix.

La courbe de calibration ne peut donc pas non plus être utilisée (effectuée avec ADN cible pool 1). De plus et comme précédemment, l'efficacité de la réaction est de 1.77366 (soit 177.4 %) ce qui est à nouveau beaucoup trop élevé.

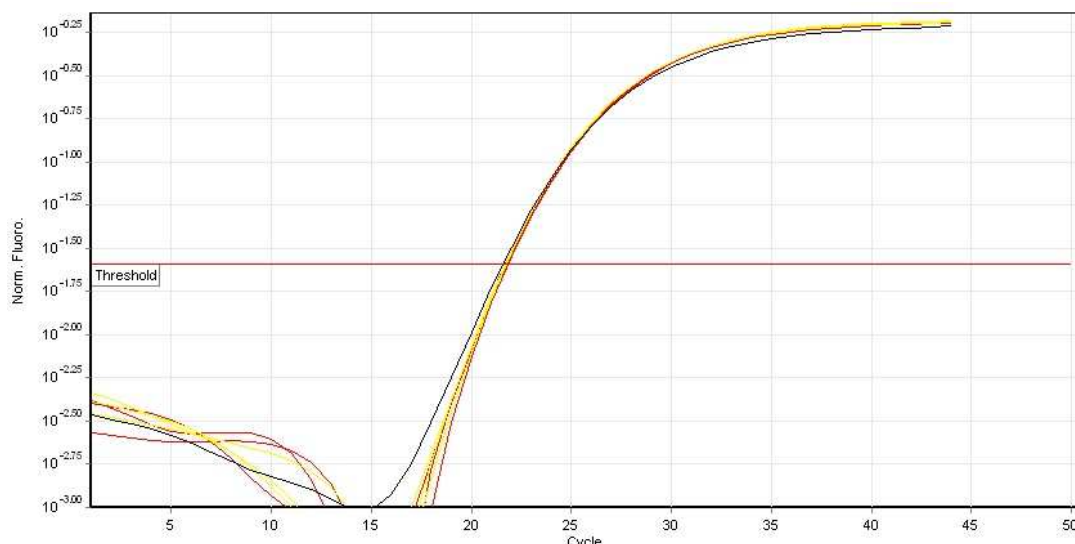


Figure 11 : Courbe d'amplification obtenue pour les NTC de la real-time PCR 2.

Les tests de fluorescence des réactifs de décontamination ont été à nouveau effectués et ils donnent aucun signal pour les réactifs DNA Decontamination reagent, LookOut DNA Erase, DNA Away, DNA Zap et DNA Remover. Par contre on obtient un signal pour le LTK 008 et pour un des duplicat de DNA ExitusPlus. Les valeurs Ct moyenne obtenus sont de 20.24 pour LTK 008 (analyse en duplicat avec écart-type de 4.01) et de 4.38 pour un des duplicat de DNA ExitusPlus. Pour le LTK 008 le résultat est semblable au signal d'un des duplicat observé lors de la real-time PCR 1, qui était de 24.16. Etant donné le résultat du gel d'électrophorèse effectué pour la real-time PCR 1, qui ne montre aucune bande du produit PCR pour le réactif LTK 008, il semblerait donc que ce réactif empêche également l'amplification de la contamination présente dans le mastermix et que donc le signal soit dû à une fluorescence du réactif et que cette fluorescence est donc un signal parasite. Pour DNA ExitusPlus, il n'y avait pas de signal obtenu (ni de bande du produit PCR sur le gel) lors des mêmes tests de la real-time PCR 1 et donc que l'explication est la même que pour le LTK 008, à savoir un signal parasite provoqué par le réactif lui-même. Cette hypothèse se confirme en observant les courbes obtenues pour ces deux réactifs qui sont des courbes différentes, plus « plates » que celles obtenues pour les standards. Elles ne correspondent donc probablement pas à des courbes d'amplification.

Les résultats obtenus pour la real-time PCR 2 étant semblable à la real-time PCR 1, aucun gel d'électrophorèse n'a été effectué ici.

4.7 Real-time PCR 3 : optimisation

La real-time PCR 3 a été effectuée non plus pour effectuer une courbe de calibration mais pour voir s'il était possible d'obtenir des contrôles négatifs (NTC) qui soit négatifs. Pour cela, les réactifs utilisés pour la préparation du mastermix ont tous été changés. A noter que le mastermix a de nouveau été préparé dans la salle des mastermix.

En consultant le rapport d'analyse (Annexe 3), on constate que les contrôles négatifs sont de nouveau positifs mais que la contamination est cette fois moins importante. Ceci est montré par la figure 12. Les mêmes eaux PCR ont été testées que pour la real-time PCR 2. Les valeurs Ct moyenne obtenues sont de 35.03 (analyse en duplicat avec écart-type de 1.20) pour l'eau PCR de Sarah W., de 38.49 (analyse en triplicat avec écart-type de 7.08) pour mon eau PCR et de 35.85 (analyse en triplicat avec écart-type de 0.71) pour l'eau PCR provenant du kit. Ces résultats montrent que les valeurs Ct sont de nouveau très semblable d'une eau à l'autre (pour cette real-time PCR) mais que la contamination est moins importante que pour les mêmes tests effectués lors de la real-time PCR 2. En effet, les valeurs Ct étant ici plus grande, le pic exponentielle d'amplification correspondant à la courbe survient donc plus tard, et donc la quantité d'ADN contaminant initiale est plus faible.

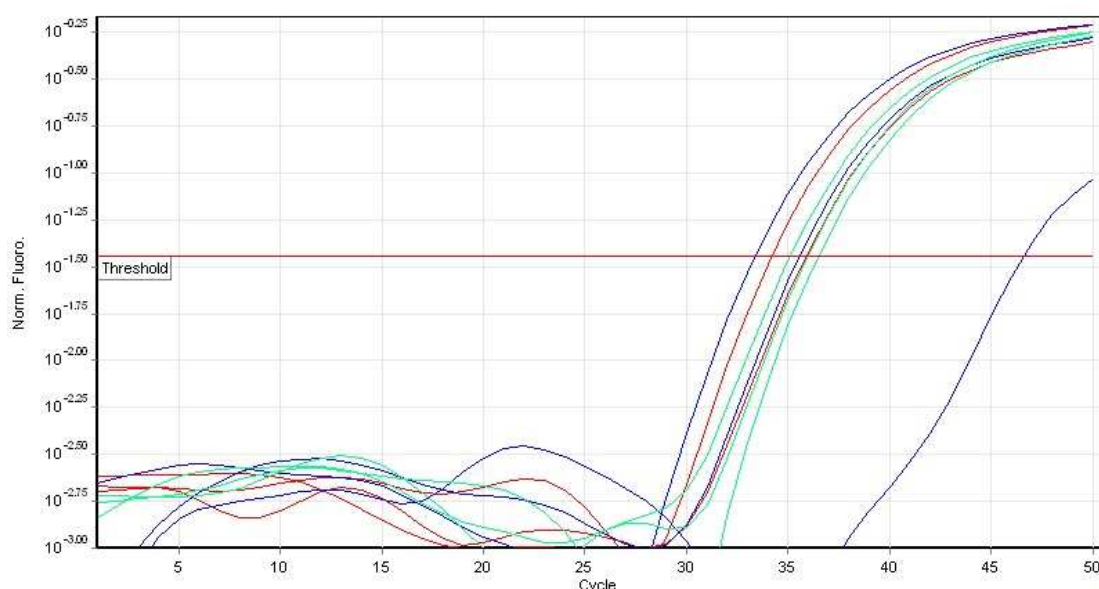


Figure 12 : Courbe d'amplification obtenue pour les NTC de la real-time PCR 3.

Trois standards ont également été analysés (en duplicat) en tant que contrôle positif. A noter que pour un des standards (dilution 10^{-3}), il y a certainement eu une erreur de pipetage. En effet, il est probable que le standard ait été pipeté seulement dans le premier tube PCR (correspondant à ce standard) et qu'il n'ait pas été pipeté dans le second. Ceci se voit car la valeur Ct du premier tube est de 8.17 (qui correspond aux tests effectués lors des real-time 1 et 2 avec respectivement des valeurs Ct de 8.01 avec écart-type de 0.37 et 8.32 avec écart-type de 0.07 pour ce même standard) et que celle du deuxième est de 33.97. Cette valeur est justement très semblable aux valeurs Ct des contrôles négatifs contaminés.

La contamination n'est cette fois pas due aux réactifs car ceux-ci ont été changés depuis la real-time PCR 3. Le problème vient donc certainement du fait de travailler dans la salle des mastermix. Peut-être que les pipettes sont contaminées. Cela est peu probable car ces pipettes ne sont jamais utilisées ailleurs que dans cette salle et donc on ne pipette en générale pas d'ADN avec. Une autre explication serait que mes habits (car la blouse doit être enlevée avant d'entrer dans la salle des mastermix) ont fait office de vecteur de contamination.

4.8 Real-time PCR 4 : optimisation

Pour la préparation du mastermix de la real-time PCR 4, le flux laminaire a été utilisé. Préalablement, celui-ci a été décontaminé avec DNA Remover afin de garantir un espace de travail exempt en ADN. De plus, les pipettes se trouvant sous le flux ont été démontées et décontaminées également avec DNA Remover. Après cette opération de décontamination, les UV ont été allumés une nuit complète, ceci comme précaution supplémentaire.

Le but de la real-time PCR 4 est similaire à ceux des real-time PCR 1 et 2, à savoir obtenir des contrôles négatifs qui le soient et établir une courbe de calibration.

En consultant le rapport d'analyse (Annexe 4), on constate que les contrôles négatifs du mastermix sont effectivement négatifs sauf un des six effectués. Cependant, la valeur Ct de ce contrôle est de 44.24 ce qui peut être considéré comme négatif. Ceci confirme l'importance de la préparation du mastermix sous le flux laminaire.

Les valeurs Ct moyennes obtenues pour les standards 10^{-5} et 10^{-6} ne sont pas cohérentes. En effet, cette valeur est de 14.72 pour le standard 10^{-5} et de 13.48 pour le standard 10^{-6} . Étant donné que le premier standard est une plus petite dilution, la valeur Ct devrait être plus grande. Il apparaît que ces résultats sont inversés ce qui correspond peut-être à une erreur de manipulation.

La courbe de calibration ne peut donc pas être utilisée. De plus, l'efficacité de la réaction est toujours autant élevée que précédemment. Elle est de 1.63973 (soit 163.9 %). La littérature Invitrogen [17] indique qu'une efficacité de réaction supérieure à 110 % est la conséquence d'une inhibition de réaction. Deux solutions sont envisageables toujours selon la littérature Invitrogen [17].

La première est d'enlever les standards qui correspondent à une dilution d'ADN trop concentré et de réanalyser la courbe de calibration. Cette solution a été testée et elle ne fonctionne pas.

La deuxième solution est de purifier l'ADN utilisé pour faire les tests. Après réflexion, il apparaît que l'ADN cible utilisé pour les tests de détection est en réalité un produit PCR (ADN cible pool 1 ici) et donc qu'il contient encore les ingrédients du mastermix utilisés pour obtenir cette ADN cible tel que par exemple les amorces stx2. C'est peut-être ceux-ci qui interfèrent et qui empêchent l'obtention d'une efficacité de réaction proche de 100 %.

4.9 Tests de purification de l'ADN cible

Pour obtenir une efficacité de réaction qui ne soit pas en dessous de 110 %, une purification de l'ADN cible doit être effectuée. Pour cela, il existe des colonnes de purification telles que les colonnes Miniprep ou encore les colonnes Wizard. Les premières possèdent une capacité trop faible (15 µg/colonne) et les secondes, bien que possédant une meilleure capacité (40 µg/colonne) coûtent trop cher pour envisager de purifier tout l'ADN cible à disposition de cette manière.

Une autre méthode, utilisant un mélange de phénol, de chloroforme et d'isoamyl alcool (système à deux phases) puis une précipitation à l'éthanol pourra être utilisée. Cette méthode [16] possède l'avantage d'être mise en œuvre facilement, tout le matériel étant à disposition. Cependant, avant de purifier tout l'ADN cible à disposition, deux tests ont été effectués.

Le premier test est effectué avec la méthode complète, c'est-à-dire avec le phénol/chloroforme/isoamyl alcool puis la précipitation à l'éthanol alors que le deuxième test est effectué seulement en précipitant l'ADN cible à l'éthanol, c'est-à-dire en ne faisant pas les premières étapes.

Avec le deuxième test, le pellet d'ADN obtenu n'a pu être dissout, même après incubation à 65 °C, ni même après incubation à 90 °C. Un gel d'électrophorèse a été effectué afin de contrôler le succès de l'opération. La figure 13 présente les résultats obtenus.

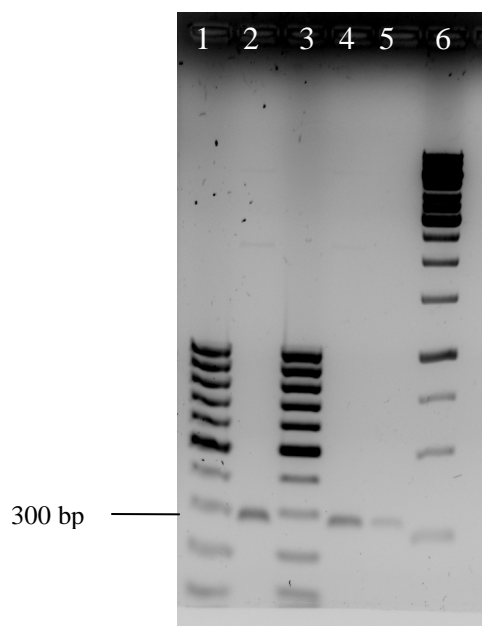


Figure 13: Gel d'agarose 0.8 % (TBE 1X) après tests de purification.

1. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
2. ADN cible pool 2 (avant purification)
3. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
4. test purification 1
5. test purification 2
6. Marqueur GeneRuler 1 kb DNA Ladder

On constate que le test de purification 2 donne une bande d'ADN beaucoup moins prononcée que le test de purification 1.

La concentration en ADN double brin de l'ADN cible pool 2 après les tests de purification ont été déterminée selon la méthode spectrophotométrique. Le tableau 32 présente les résultats.

Tableau 32 : Concentration en ADN de l'ADN cible pool 2 après purification selon les deux méthodes.

Echantillons*	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{320 nm}	rapport A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentration [µg/ml]
ADN cible pool 2 avant purification	0.204	0.111	0	1.8	178.5
ADN cible pool 2 après purification: test 1	0.047	0.03	0	1.6	41.1
ADN cible pool 2 après purification: test 2	0.092	0.077	0.053	1.2	34.1

*A noter que les absorbances présentées sont celles des échantillons dilués 17.5 fois mais qu'il est tenu compte de ce facteur de dilution pour le calcul de la concentration.

Le rapport A₂₆₀/A₂₈₀ du test de purification 2 n'étant que de 1.2, l'ADN ne peut pas être considéré comme étant pur. Le rapport A₂₆₀/A₂₈₀ du test de purification 1 est de 1.6 ce qui témoigne d'une plus grande pureté. La concentration en ADN pour le test 1 est plus élevée que pour le test 2 ce qui confirme les résultats observés sur le gel d'agarose. A noter que les absorbances mesurées sont en dehors du domaine de linéarité. Quoiqu'il en soit, la méthode du test 2 permet peut-être d'obtenir une concentration en ADN purifiée plus élevée mais comme le pellet ne se dissout pas, c'est la première méthode qui est retenue pour effectuer les tests de la real-time PCR 5. A noter que cette méthode de purification a permis un rendement de 23 %.

4.10 Real-time PCR 5 : optimisation

La real-time PCR 5 a été effectuée avec l'ADN obtenu par le test de purification 1. Elle a pour but d'obtenir une courbe de calibration utilisable et de vérifier que la méthode de purification permette d'obtenir une efficacité de réaction proche de 100 %.

Le rapport d'analyse (Annexe 5) montre que les contrôles négatifs du mastermix (NTC) sont négatifs. Les valeurs Ct de plus de 40 peuvent en effet être considérées comme négatives. L'efficacité de réaction obtenue est de 0.95359 (soit 95.4 %) ce qui est tout à fait satisfaisant. Ce résultat montre que la purification de l'ADN cible est nécessaire bien que la perte (rendement de 23 %) soit importante. La courbe de calibration pourrait donc être utilisée pour la suite des opérations mais il serait préférable de réaliser une courbe qui contienne des standards plus dilués.

Suite aux résultats obtenus pour la real-time PCR 5, il apparaît nécessaire de purifier tout le volume d'ADN cible (pool 1 et 2) disponible.

4.11 Purification scale-up de l'ADN cible: méthode phenol/chloroform/isoamylalcohol

Pour effectuer la purification de tout le volume d'ADN cible disponible, l'ADN cible pool 1 et l'ADN cible pool 2 ont été mixé pour donner l'ADN cible pool 3 (soit 5.25 ml). La concentration en ADN de ce pool 3 avant et après purification a été mesurée par spectrophotométrie. Le tableau 33 présente les résultats.

Tableau 33 : Concentration en ADN de l'ADN cible pool 3 avant et après purification.

Echantillons	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{320 nm}	rapport A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentration [µg/ml]
ADN cible pool 3 avant purification*	0.316	0.181	0.004	1.7	273
ADN cible pool 3 après purification**	0.315	0.21	0.034	1.5	28.1

*A noter que les absorbances présentées sont celles des échantillons dilués 17.5 fois mais qu'il est tenu compte de ce facteur de dilution pour le calcul de la concentration.

**A noter que les absorbances présentées sont celles des échantillons dilués 2 fois mais qu'il est tenu compte de ce facteur de dilution pour le calcul de la concentration.

Pour l'ADN cible pool 3 après purification, on constate que le rapport A_{260}/A_{280} est de 1.5 ce qui ne permet pas de considérer l'ADN comme étant pur (cas où le rapport est entre 1.7 et 2.0). Cependant, ce résultat reste acceptable. Le rendement de la purification qui est de 10.3 % est nettement moins bon que celui obtenu pour le test de purification (23%). Cette méthode est donc relativement aléatoire mais la concentration obtenue est suffisante pour effectuer les tests d'efficacité.

Pour confirmer que l'opération se soit déroulée correctement, un gel d'électrophorèse a été réalisé. La figure 14 présente les résultats obtenus.

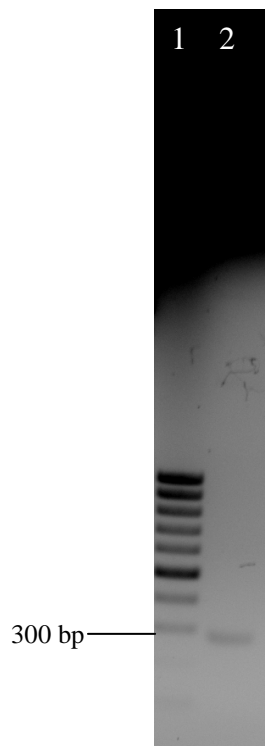


Figure 14: Gel d'agarose 0.8 % (TAE 1X) après purification de l'ADN cible pool 3.

1. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
2. ADN cible pool 3 après purification

La bande d'ADN obtenue pour l'ADN cible pool 3 après purification est légèrement en dessous de la bande 300 bp du marqueur ce qui est normal étant donné que l'ADN cible a une taille de 283 bp. On constate donc que la purification sur tout le volume d'ADN cible à disposition a fonctionné correctement bien qu'ayant un rendement de purification faible.

4.12 Real-time PCR 6 : optimisation des tests d'efficacité

La real-time PCR 6 est l'analyse effectuée sur les prélèvements des premiers tests d'efficacité. À partir de cette real-time PCR 6, il est important d'expliquer la notation utilisée dans les rapports d'analyse. Les « NTC » (no template control) sont comme précédemment les contrôles négatifs du mastermix alors que les « Contrôle négatif » sont les contrôles négatifs de surface et qui sont prélevés comme les échantillons. De même les « Contrôle positif » sont les contrôles positifs de surface.

En consultant le rapport d'analyse (Annexe 6), on constate que les NTC sont positifs avec une valeur C_t moyenne de 34.59. Ceci signifie que le mastermix est contaminé et donc que toutes les analyses effectuées pour cette real-time PCR 6 sont inutilisables. Les contrôles négatifs de surface sont aussi positifs avec une valeur C_t moyenne de 33.10 ce qui est logique étant donné que le mastermix est contaminé. À noter que les contrôles positifs de surface montrent une très bonne répétabilité avec une valeur C_t moyenne de 4.56 et un écart-type de 0.33.

4.13 Real-time PCR 7 : optimisation des tests d'efficacité

Le but de la real-time PCR 7 est d'obtenir une courbe de calibration avec deux dilutions de plus ainsi que d'effectuer à nouveau quelques tests d'efficacité (avec DNA Away) pour estimer les conditions des tests effectués ultérieurement.

Les NTC obtenus sont négatifs ce qui permet de dire que le mastermix n'est pas contaminé. Un des contrôles négatifs de surface est contaminé mais pas les trois autres ce qui indique probablement une erreur de manipulation et non une contamination de la surface.

Les tests d'efficacité effectués avec DNA Away montrent que le rapport ADN/réactif permettant la meilleure répétabilité est le rapport 1:2 (soit 10 µl d'ADN cible traité avec 20 µl de réactif). C'est donc ces conditions qui seront testées pour tous les réactifs lors des real-time PCR 8, 9, 10, 11 et 12.

Les courbes obtenues pour les différents standards sont présentées par la figure 15.

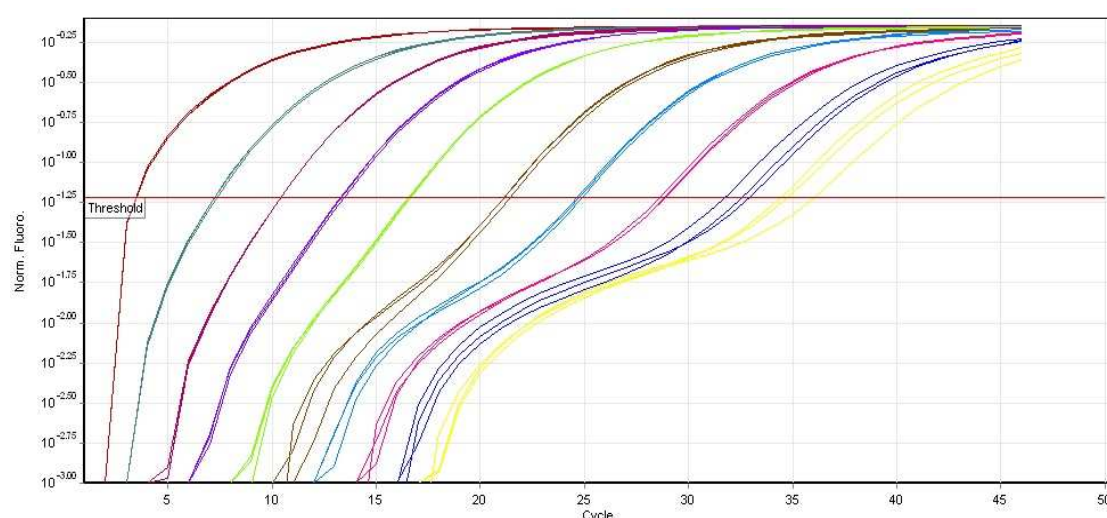


Figure 15: Fluorescence normalisée obtenus pour les différents standards en fonction du cycle.

Chaque standard est analysé en triplicat. Les valeurs Ct obtenues montrent une très grande répétabilité. Ceci est visible sur la figure car les courbes de chaque standard sont parfaitement superposées pour les petites dilutions (courbes sortant pendant les premiers cycles) et légèrement moins bien superposées pour les grandes dilutions (courbes sortant pendant les derniers cycles). Ceci montre notamment que plus la concentration en ADN est faible et plus il est difficile d'obtenir une bonne répétabilité. A noter que vu l'espace entre les courbes des dernières dilutions (soit entre les courbes bleues et les courbes jaunes), il est probable qu'à ces concentrations la on atteint presque la limite de quantification de la méthode.

D'après ces données, la courbe de calibration générée est présentée par la figure 16.

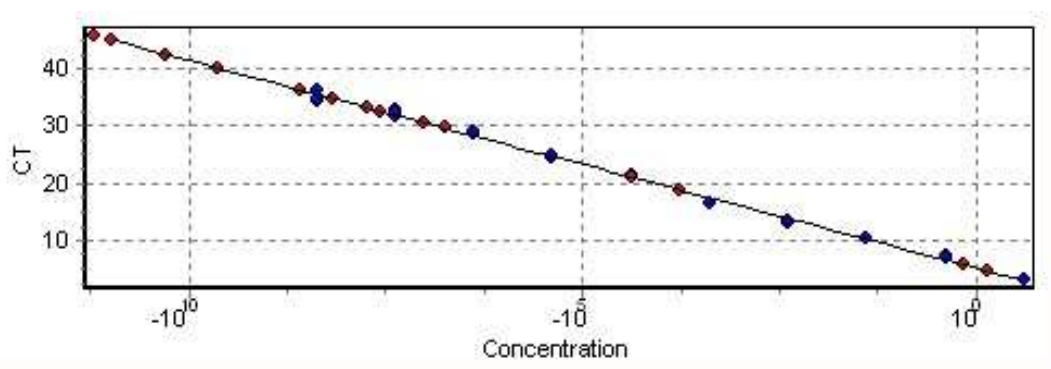


Figure 16: Courbe de calibration de l'ADN cible obtenu par la real-time PCR 7.

Cette courbe de calibration est tout à fait satisfaisante et elle possède de plus une efficacité de réaction de 0.90028 soit 90 % ce qui est acceptable. Cette courbe sera dès lors utilisée pour toutes

les real-time PCR suivante. Il suffit pour cela d'analyser un seul des standards de cette courbe à chaque nouvelle analyse et ensuite d'ajuster cette courbe en fonction de ce standard analysé. Ceci est effectué directement par le programme RotorGene Q.

4.14 Tests d'efficacité : real-time PCR 8, 9 et 10

Ces trois real-time PCR regroupent les résultats des tests d'efficacité pour tous les réactifs de décontamination dans les conditions ADN/réactif = 1/2. Pour chaque réactif, les tests ont été effectués 11 fois. Cependant, le nombre d'analyse effectuée qui est indiquée dans les tableaux de résultat est généralement inférieur à 11. Ceci est dû au fait que certains résultats sont aberrants et donc qu'il n'en est pas tenu compte pour l'analyse des résultats.

Pour la real-time PCR 8, les NTC sont négatifs et les contrôles négatifs de surfaces sont tous négatifs sauf un. Ceci est montré par la figure suivante. Il apparaît que la plupart des courbes coupent le seuil et donc qu'on obtient ainsi une valeur Ct. Cependant, on voit que ces courbes (sauf une) correspondent à un bruit de fond et non à une courbe d'amplification. Étant donné que toutes les autres courbes sont négatives, il est peu probable que la surface où sont effectués les spots soit contaminée mais plutôt que ce contrôle ait été contaminé après les prélèvements et que donc les résultats de la real-time PCR 8 peuvent être validés. La figure 17 montre les courbes de fluorescence obtenue pour les contrôles négatifs de surface de la real-time PCR 8.

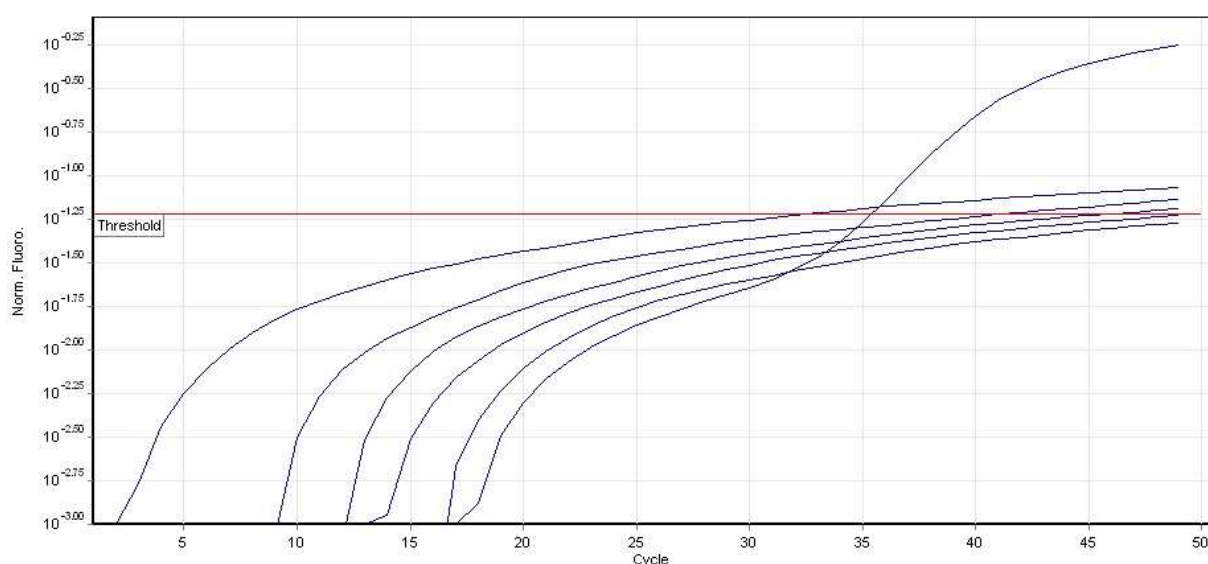


Figure 17 : Courbes de fluorescence obtenues pour les contrôles négatifs de surface de la real-time PCR 8.

La figure 18 présente les courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs de décontamination suivant : DNA Away (courbes vertes), LTK 008 (courbes violettes) et DNA Remover (courbes oranges). Les courbes roses quant à elles correspondent aux contrôles positifs de surface.

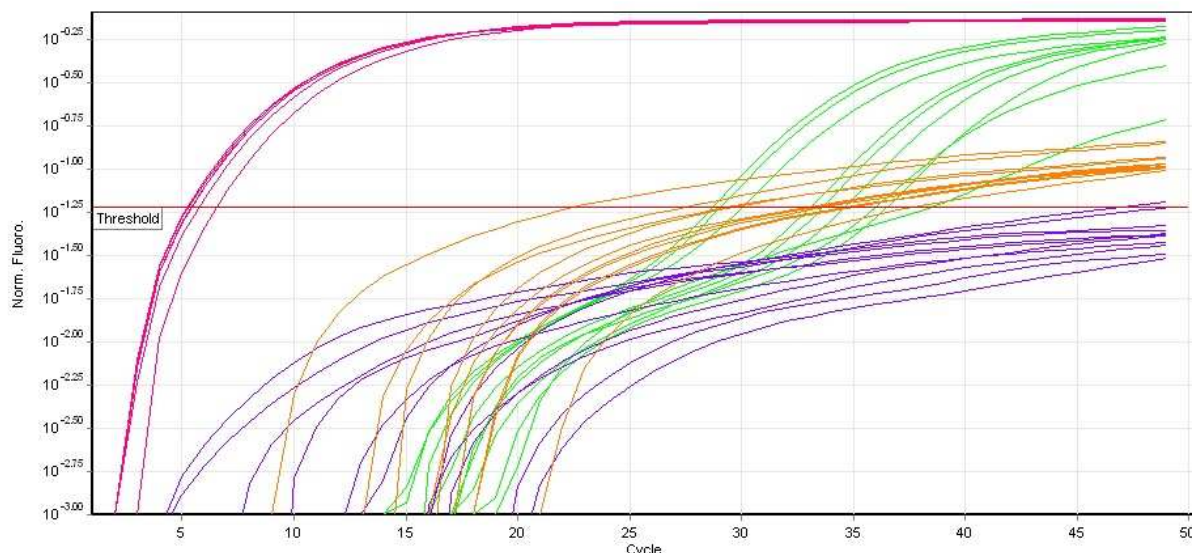


Figure 18: Courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité de la real-time PCR 8.

On constate que les contrôles positifs de surface (effectués six fois) possèdent une très bonne répétabilité. Les courbes de fluorescence pour les tests d'efficacité avec LTK 008 ne coupent pas le seuil (threshold) sauf une. Ces courbes pour le réactif LTK ne sont que des courbes de bruit de fond et non des courbes d'amplification. Les courbes obtenues pour le réactif DNA Remover ne sont pas très répétables. En effet la valeur Ct moyenne est de 31.7 avec un écart-type de 4.4. Pour le DNA Away, les courbes obtenues ressemblent d'avantage à des courbes d'amplification que celles obtenues pour le DNA Remover. La répétabilité n'est cependant pas beaucoup meilleur. En effet, la valeur Ct moyenne est de 33.3 avec un écart-type de 3.5.

Pour la real-time PCR 9, les NTC et les contrôles négatifs de surfaces sont tous négatifs. De plus, les contrôles positifs de surface sont positifs et la répétabilité est excellente.

La figure 19 présente les courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs de décontamination suivant : ExitusPlus (courbes vertes) et DNA Decontamination reagent (courbes oranges). Les courbes violettes quant à elles correspondent aux contrôles positifs de surface.

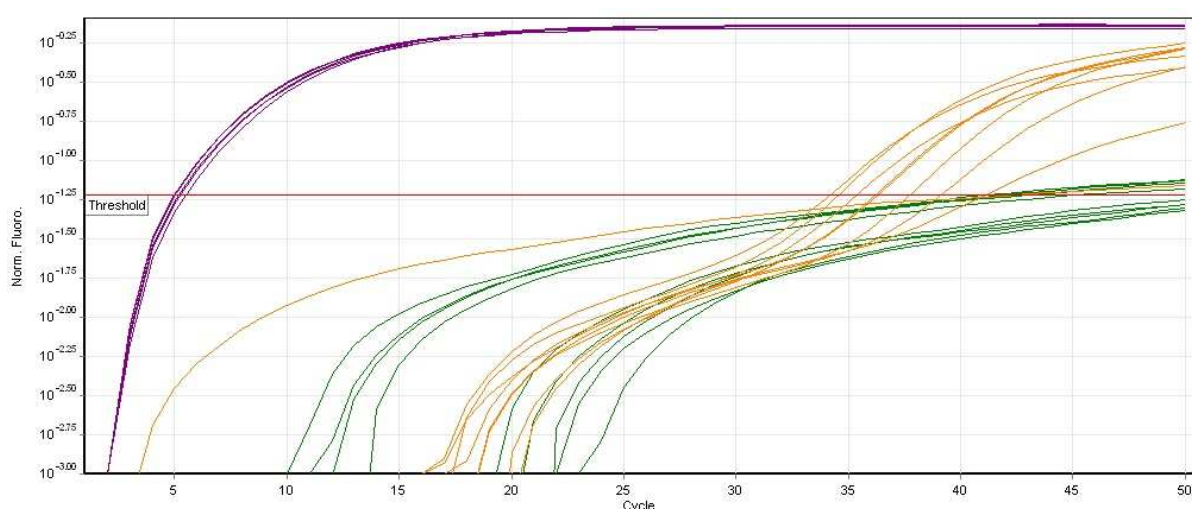


Figure 19: Courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs ExitusPlus (vert) et DNA Decontamination reagent (orange) lors de la real-time PCR 9.

Les courbes de fluorescence obtenues avec le réactif ExitusPlus sont aplaties et la plupart ne coupent pas le seuil. Les seules courbes qui coupent le seuil le font au delà du cycle 40 ce qui permet de les considérer comme négatif. Les courbes obtenues pour le réactif DNA Decontamination reagent sont clairement des courbes d'amplification d'ADN. La valeur Ct moyenne est de 37.5 avec un écart-type de 2.9.

La figure 20 présente les courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité du réactif LookOut DNA Erase (courbes roses). Les courbes violettes correspondent à nouveau aux contrôles positifs de surface.

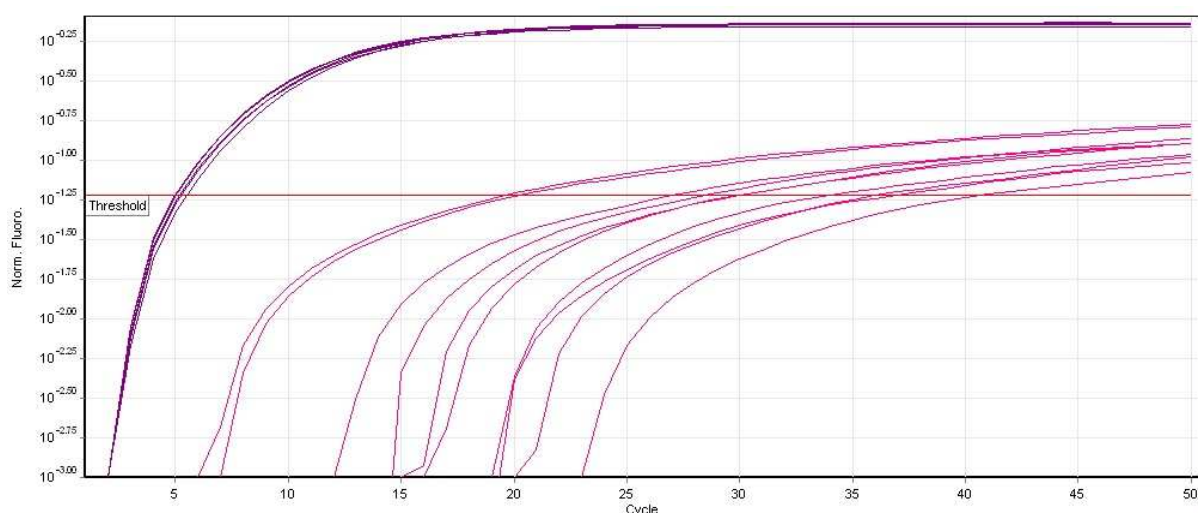


Figure 20 : Courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité du réactif LookOut DNA Erase (rose) lors de la real-time PCR 9.

La répétabilité des courbes obtenues pour le réactif LookOut DNA Erase est très mauvaise. En effet, la valeur Ct moyenne est de 30.3 avec un écart-type de 6.9. On constate de plus que ces courbes sont aplaties et qu'il est probable qu'elles ne correspondent pas à une amplification d'ADN.

Pour la real-time PCR 10, il y a un NTC qui est positif et également un contrôle négatif de surface. Cependant, en observant la figure suivante on constate que ces courbes sont plates et qu'elles coupent de très peu le seuil. Ce ne sont pas des courbes d'amplification d'ADN c'est pourquoi les résultats peuvent être validés. La figure 21 présente les courbes obtenues.

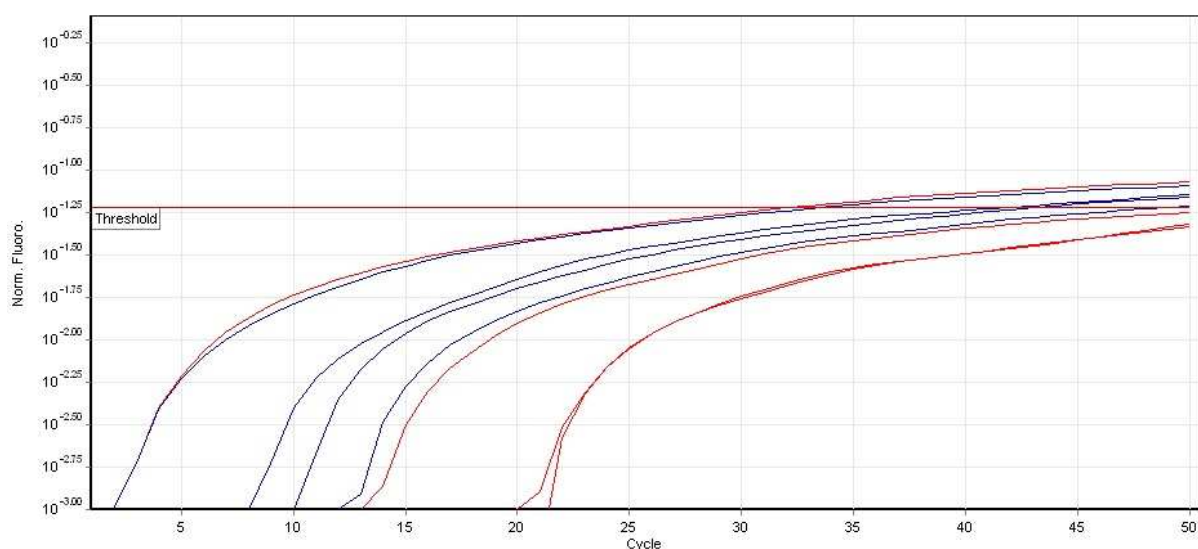


Figure 21 : Courbes de fluorescence obtenues pour les NTC (rouge) et les contrôles négatifs de surface (bleu) de la real-time PCR 10.

La figure 22 présente les courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs de décontamination suivant : Javel 5 % (courbes vertes) et DNA Zap (courbes oranges). Les courbes violettes correspondent aux contrôles positifs de surface.

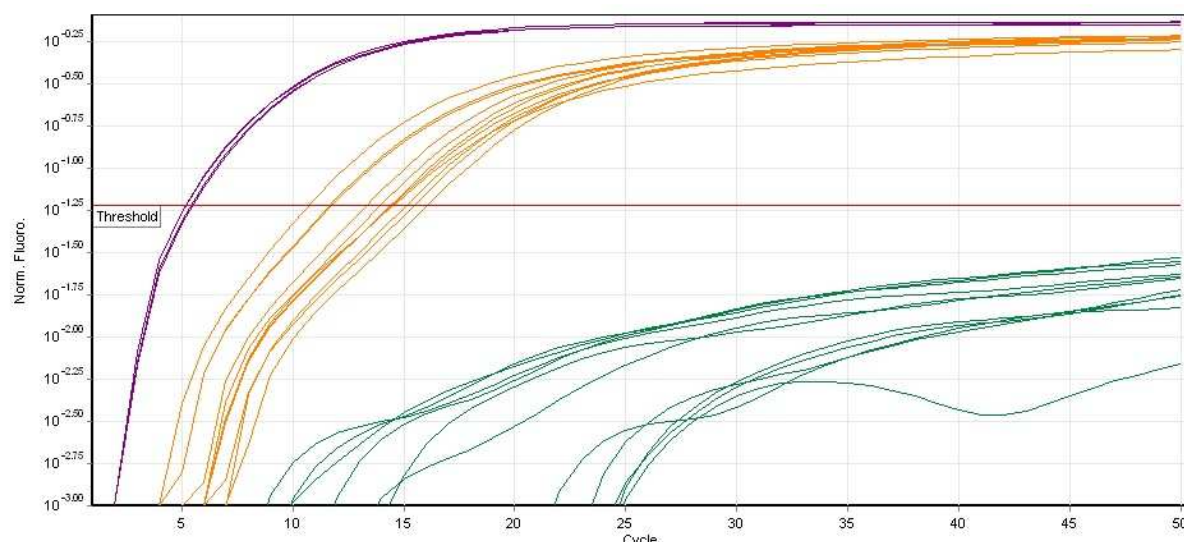


Figure 22 : Courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs DNA Zap (orange) et pour la Javel 5 % (vert) lors de la real-time PCR 10.

Les courbes de fluorescence pour la Javel 5 % (courbes vertes) ne coupent pas le seuil donc aucune valeur Ct n'est de ce fait obtenue. Les courbes pour le réactif DNA Zap sont très répétables. La valeur Ct moyenne obtenue est de 13.8 avec un écart-type de 1.7.

Pour analyser l'efficacité des différents réactifs de décontamination, le ΔCt moyen est calculé. Pour cela, la différence entre la valeur Ct moyenne de l'ADN cible non traité (contrôle positif de surface) et la valeur Ct moyenne de l'ADN cible après traitement par le réactif est effectuée. Plus ce ΔCt moyen est grand et plus le réactif est efficace. Pour les réactifs qui dégradent totalement l'ADN, c'est-à-dire pour les réactifs avec lesquels aucune valeur Ct n'est obtenue, le ΔCt moyen est fixé par défaut à une valeur de 50. Le tableau 34 est une compilation des résultats des real-time PCR 8, 9 et 10. Il présente les ΔCt moyen obtenus pour chaque réactif.

Tableau 34 : ΔCt moyen obtenus pour chaque réactif pour les tests d'efficacité (rapport ADN/réactif = 1/2)

Réactifs (rapport ADN/réactif = 1/2)	Nombre d'analyses effectuées	Ct moyen	Ecart-type	Ct moyen du contrôle positif	Ecart-type	ΔCt moyen	Ecart-type
Javel 5 %	11	-	-	5.3	0.2	50	-
LTK 008	10	-	-	5.6	0.5	50	-
DNA Decont. reag.	9	37.5	2.9	5.2	0.2	32.3	2.9
DNA Away	9	33.3	3.5	5.6	0.5	27.7	3.5
DNA ExitusPlus	9	-	-	5.2	0.2	50	-
DNA Remover	10	31.7	4.4	5.6	0.5	26.1	4.4
LookOut DNA Erase	10	30.3	6.9	5.2	0.2	25.1	6.9
DNA Zap	11	13.8	1.7	5.3	0.2	8.5	1.7

Dans ces conditions de réactions, les réactifs les plus efficaces sont le LTK 008, la Javel 5 % ainsi que le DNA ExitusPlus car ils ne donnent aucune courbe d'amplification. L'ADN cible a donc totalement été dégradé. Les réactifs LookOut DNA Erase, DNA Remover et DNA Away présentent des résultats sensiblement pareil. Ces réactifs semblent tout de même relativement efficaces. Le réactif DNA Decontamination reagent est légèrement plus efficace que ces trois derniers car son ΔCt moyen est plus grand. Par contre, le réactif DNA Zap semble peu efficace étant donné le faible ΔCt moyen obtenu.

4.15 Tests d'efficacité : real-time PCR 11 et 12

Ces deux real-time PCR regroupent les résultats des tests d'efficacité pour tous les réactifs de décontamination dans les conditions ADN/réactif = 1/2. Pour chaque réactif, les tests ont été effectués dans les mêmes conditions que pour les real-time PCR 8, 9 et 10, et cela 6 fois. Cependant, le nombre d'analyse effectuée qui est indiquée dans les tableaux de résultat est généralement inférieur à 6. Comme précédemment, ceci est dû au fait que certains résultats sont aberrants et donc qu'il n'en est pas tenu compte pour l'analyse des résultats.

Pour la real-time PCR 11, les NTC et les contrôles négatifs de surface sont négatifs. Les contrôles positifs de surfaces sont parfaitement répétables et ils sont de plus reproductibles en comparaison des contrôles positifs des real-time PCR 8, 9 et 10. Pour cela, les résultats peuvent être validés.

La figure 23 présente les courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs de décontamination suivant : DNA Away (courbes bleues) et DNA Decontamination reagent (courbes oranges). Les courbes violettes correspondent aux contrôles positifs de surface.

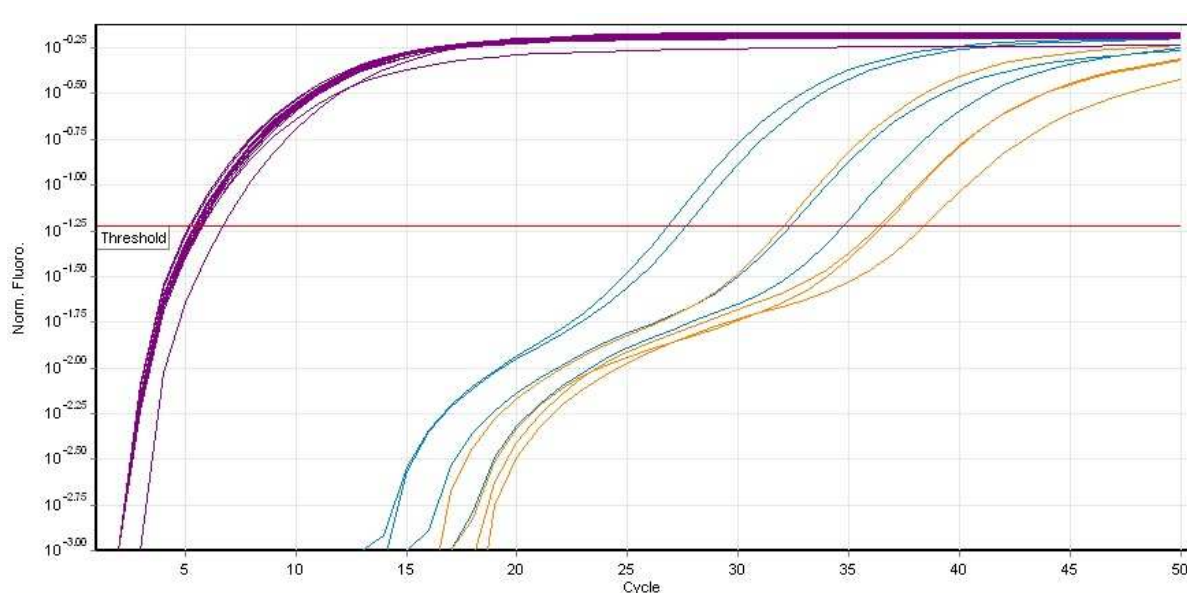


Figure 23: Courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs DNA Decontamination reagent (orange) et DNA Away (bleu) lors de la real-time PCR 11.

Les courbes de fluorescence obtenues pour le réactif DNA Decontamination reagent sont assez répétables. La valeur Ct moyenne obtenue est de 35.8 avec un écart-type de 2.7. Les courbes obtenues pour DNA Away sont similaires mais décalées sur la gauche. La valeur Ct moyenne obtenue est de 30.4 avec un écart-type de 3.8.

La figure 24 présente les courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs de décontamination suivant : LTK 008 (courbes roses) et Javel 5 % (courbes vertes). Les courbes violettes correspondent aux contrôles positifs de surface.

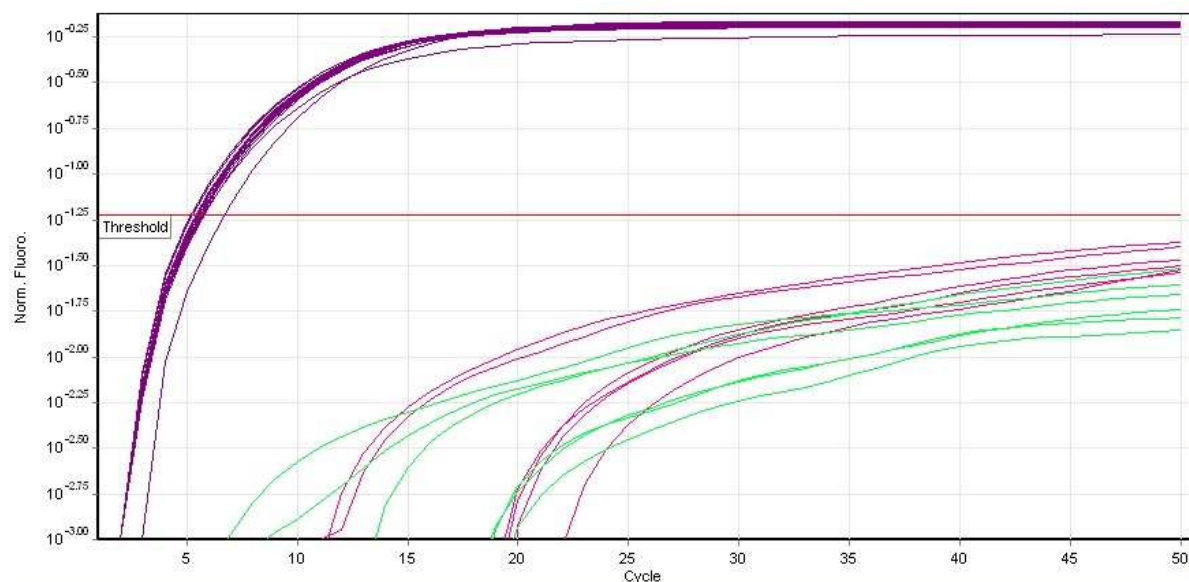


Figure 24 : Courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs LTK 008 (rose) et pour la Javel 5 % (vert) lors de la real-time PCR 11.

On constate que les courbes de fluorescence obtenues pour les réactifs LTK 008 et Javel 5 % ne franchissent pas le seuil. Aucune valeur Ct n'est donc obtenue.

Pour la real-time PCR 12, les remarques sur les différents contrôles de la real-time PCR 11 s'appliquent également ici. Les résultats sont donc valides.

La figure 25 présente les courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs de décontamination suivant : DNA Zap (courbes oranges), LookOut DNA Erase (courbes roses), DNA Remover (courbes vertes) et ExitusPlus (courbes bleues). Les courbes violettes correspondent aux contrôles positifs de surface.

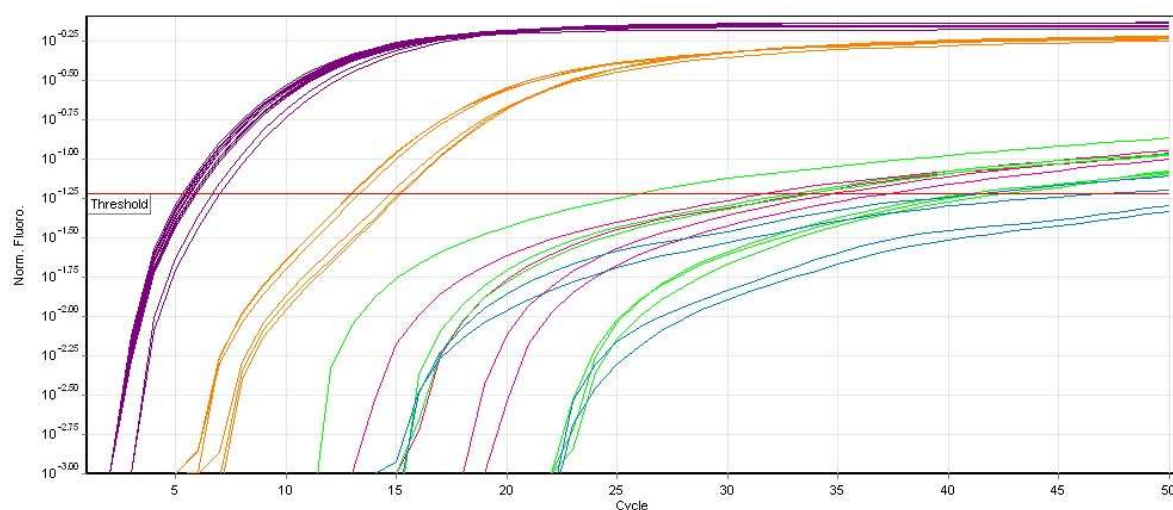


Figure 25 : Courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs DNA Zap (orange), LookOut DNA Erase (rose), DNA Remover (vert) et ExitusPlus (bleu) lors de la real-time PCR 12.

Les courbes de fluorescence obtenues pour le réactif DNA Zap possèdent une très bonne répétabilité. La valeur Ct moyenne obtenue est de 14.1 avec un écart-type de 1.1. Les courbes obtenues pour ExitusPlus ne donnent pas de valeur Ct. Les courbes obtenues pour les réactifs LookOut DNA Erase et DNA Remover sont similaires aux courbes obtenues pour ExitusPlus. En effet, elles sont plates et ne ressemblent pas à des courbes d'amplification. Cependant, avec LookOut DNA Erase et DNA Remover on obtient des valeurs Ct qui sont respectivement de 34.4 (avec écart-type de 2.3) et de 36.4 (avec écart-type de 6.5).

Pour contrôler les résultats obtenus, un gel d'électrophorèse a été effectué. La figure 26 présente la photo du gel.

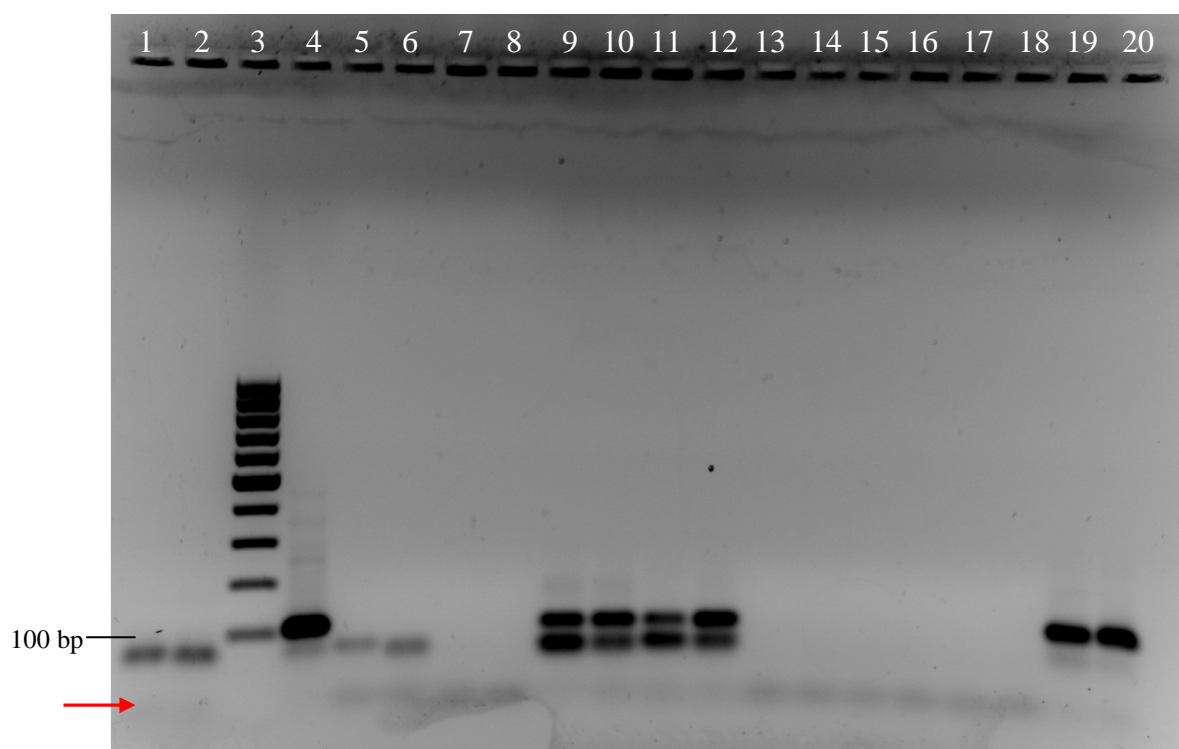


Figure 26 : Gel d'agarose 0.8 % (TBE 1X) après real-time PCR 11 et 12.

- 1-2. Contrôle négatif de surface
- 3. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 4. Contrôle positif de surface
- 5-6. Test d'efficacité 1:2 avec LTK 008
- 7-8. Test d'efficacité 1:2 avec Javel 5 %
- 9-10. Test d'efficacité 1:2 avec DNA Away
- 11-12. Test d'efficacité 1:2 avec DNA Decontamination reagent
- 13-14. Test d'efficacité 1:2 avec LookOut DNA Erase
- 15-16. Test d'efficacité 1:2 avec DNA Remover
- 17-18. Test d'efficacité 1:2 avec ExitusPlus
- 19-20. Test d'efficacité 1:2 avec DNA Zap

Pour le contrôle négatif, on constate une bande qui se trouve légèrement en dessous de la bande 100 bp du marqueur. Cette bande ne correspond pas au produit PCR. Ceci est visible en regardant la bande obtenue pour le contrôle positif, qui se trouve légèrement en dessus de la bande 100 bp du marqueur. Ceci est logique vu que le produit PCR à une taille de 106 bp. La bande obtenue pour le contrôle négatif est probablement due à des dimères d'amorces.

Pour le réactif LTK 008, on trouve la bande correspondant aux dimères d'amorces mais pas la bande du produit PCR. Pour la Javel et le réactif ExitusPlus, on ne constate ni bande des dimères d'amorces ni bande du produit PCR. Ceci confirme les résultats obtenus par les real-time PCR, à savoir que ces trois réactifs dégradent complètement l'ADN cible. Pour les réactifs DNA Away, DNA Decontamination reagent et DNA Zap, on constate la présence de la bande du produit PCR et celle des dimères d'amorces (moins prononcée pour DNA Zap). Ceci confirme à nouveau les résultats obtenus par les real-time PCR, c'est-à-dire que ces trois réactifs ne dégradent pas totalement l'ADN cible. Enfin, pour les réactifs LookOut DNA Erase et DNA Remover, on ne constate ni bande des dimères d'amorces ni bande du produit PCR. Ceci infirme les résultats obtenus par les real-time PCR. En effet, les real-time PCR donnent des valeurs Ct mais on ne constate pas la présence du produit PCR sur le gel. Ceci signifie que les courbes de fluorescence obtenues (pour ces deux réactifs) ne sont pas des courbes d'amplification. Elles correspondent probablement à un bruit de fond. Les ΔC_t moyen calculés pour ces deux réactifs devront donc être corrigés.

A noter que pour les puits qui ne contiennent pas la bande du produit PCR, on constate de légères bandes (à hauteur de la flèche rouge) qui correspondent probablement aux monomères d'amorces.

Le tableau 35 est une compilation des résultats des real-time PCR 11 et 12. Il présente les ΔCt moyen obtenus pour chaque réactif (corrigé en fonction des résultats du gel d'électrophorèse).

Tableau 35: ΔCt moyen obtenus pour chaque réactif pour les tests d'efficacité (rapport ADN/réactif = 1/2 bis)

Réactifs (rapport ADN/réactif = 1/2)	Nombre d'analyses effectuées	Ct moyen	Ecart-type	Ct moyen du contrôle positif	Ecart-type	ΔCt moyen	Ecart-type
Javel 5 %	6	-	-	5.6	0.4	50	-
LTK 008	6	-	-	5.6	0.4	50	-
DNA Decontamination reagent	4	35.8	2.7	5.6	0.4	30.3	2.7
DNA Away	4	30.4	3.8	5.6	0.4	24.8	3.8
DNA ExitusPlus	4	-	-	5.8	0.5	50	-
DNA Remover	6	-	-	5.8	0.5	50	-
LookOut DNA Erase	4	-	-	5.8	0.5	50	-
DNA Zap	6	14.1	1.1	5.8	0.5	8.3	1.2

Ces tests d'efficacité répétés permettent de confirmer les principales conclusions tirées après les real-time PCR 8,9 et 10. En effet, les réactifs les plus efficaces sont à nouveau le LTK 008, la Javel 5 % ainsi que le DNA ExitusPlus car ils ne donnent aucune courbe d'amplification. Pour les réactifs DNA Decontamination reagent et DNA Away, ils semblent relativement efficaces mais ils ne dégradent pas totalement l'ADN cible. Comme précédemment, le réactif DNA Zap semble le moins efficace étant donné le faible ΔCt moyen obtenu. Cependant, pour les réactifs LookOut DNA Erase et DNA Remover, les valeurs Ct obtenues ne sont en fait pas du à des courbes d'amplification. C'est pourquoi les ΔCt moyen ont été corrigé. Il semblerait donc que ces deux réactifs dégradent totalement l'ADN dans ces conditions.

4.16 Tests d'efficacité : real-time PCR 13 et 14

Ces deux real-time PCR regroupent les résultats des tests d'efficacité pour tous les réactifs de décontamination dans les conditions ADN/réactif = 1/4. Pour chaque réactif, les tests ont été effectués 6 fois. Cependant, le nombre d'analyse effectuée qui est indiquée dans les tableaux de résultat peut être inférieur à 6. Comme précédemment, ceci est dû au fait que certains résultats sont aberrants et donc qu'il n'en est pas tenu compte pour l'analyse des résultats.

Pour la real-time PCR 13 et 14, les NTC et les contrôles négatifs de surface sont négatifs. En effet seules quelques courbes donnent des valeurs Ct mais aucune d'elles ne correspondent à des courbes d'amplification. Les contrôles positifs de surfaces sont parfaitement répétables et ils sont de plus reproductibles de la real-time PCR 13 à la real-time PCR 14. Pour cela, les résultats peuvent être validés.

Pour la real-time PCR 13, les courbes obtenues sont similaires à celles obtenues lors des real-time PCR précédentes (sauf pour DNA Decontamination reagent et DNA Away pour lesquels les courbes sont la plupart aplaties ce qui ne correspond pas à des courbes d'amplification) pour les conditions ADN/réactif = 1/2 c'est pourquoi les courbes de fluorescence ne seront pas présentées ici. C'est également le cas pour la real-time PCR 14. Cependant pour cette dernière, le réactif ExitusPlus montre des courbes d'amplification ce qui n'est pas logique étant donné avec plus d'ADN (tests conditions ADN/réactif = 1/2), aucune courbe n'a été obtenue. C'est pourquoi la figure 27 présente les courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs de décontamination suivant : LTK 008 (courbes oranges), Javel 5 % (courbes vertes) et ExitusPlus (courbes bleues). Les courbes violettes correspondent aux contrôles positifs de surface.

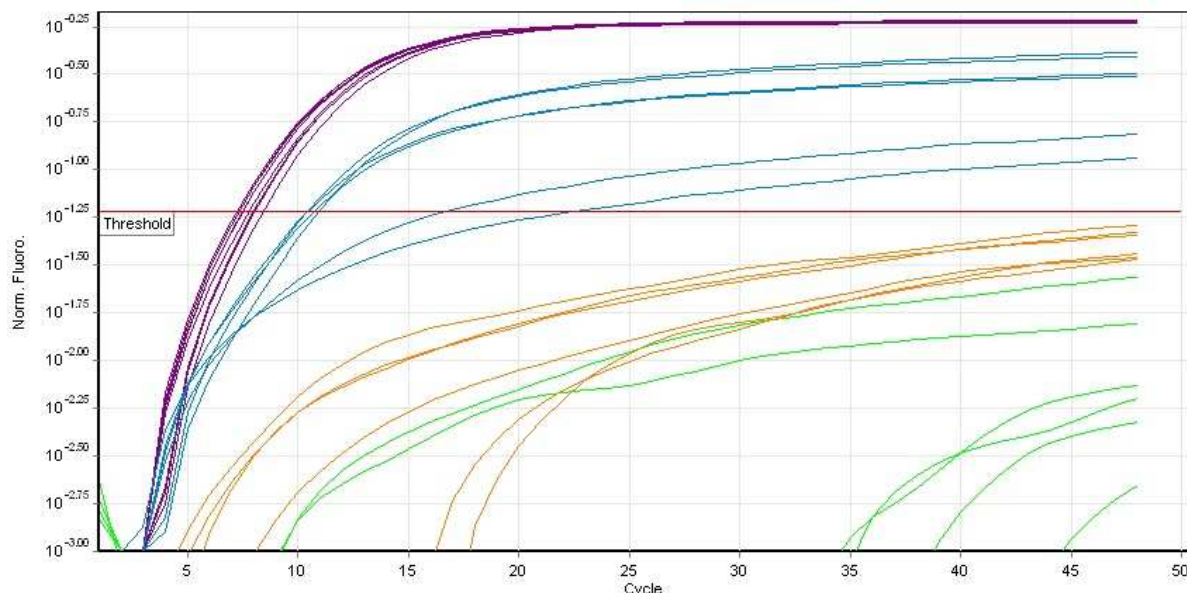


Figure 27 : Courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des réactifs LTK 008 (orange), Javel 5 % (vert) et ExitusPlus (bleu) lors de la real-time PCR 14.

Comme pour les tests précédents, les réactifs LTK 008 et Javel 5 % ne donnent aucune courbe d'amplification ce qui montre que l'ADN cible est totalement dégradé. Pour le réactif ExitusPlus, on constate que les courbes obtenues sont probablement des courbes d'amplification. La valeur Ct moyenne est de 13.6 avec un écart-type de 5.0. La répétabilité n'est donc pas bonne. Il semblerait donc que dans ces conditions (c'est-à-dire avec moins d'ADN cible traité) le réactif est moins efficace ce qui n'est pas logique. En effet la lors des tests dans les conditions ADN/réactif = 1/2, aucune courbe d'amplification n'a été obtenue.

Un gel d'électrophorèse à été effectué pour vérifier les résultats des real-time PCR 13 et 14. Les photos des gels obtenus sont présentées par les figures 28 et 29.

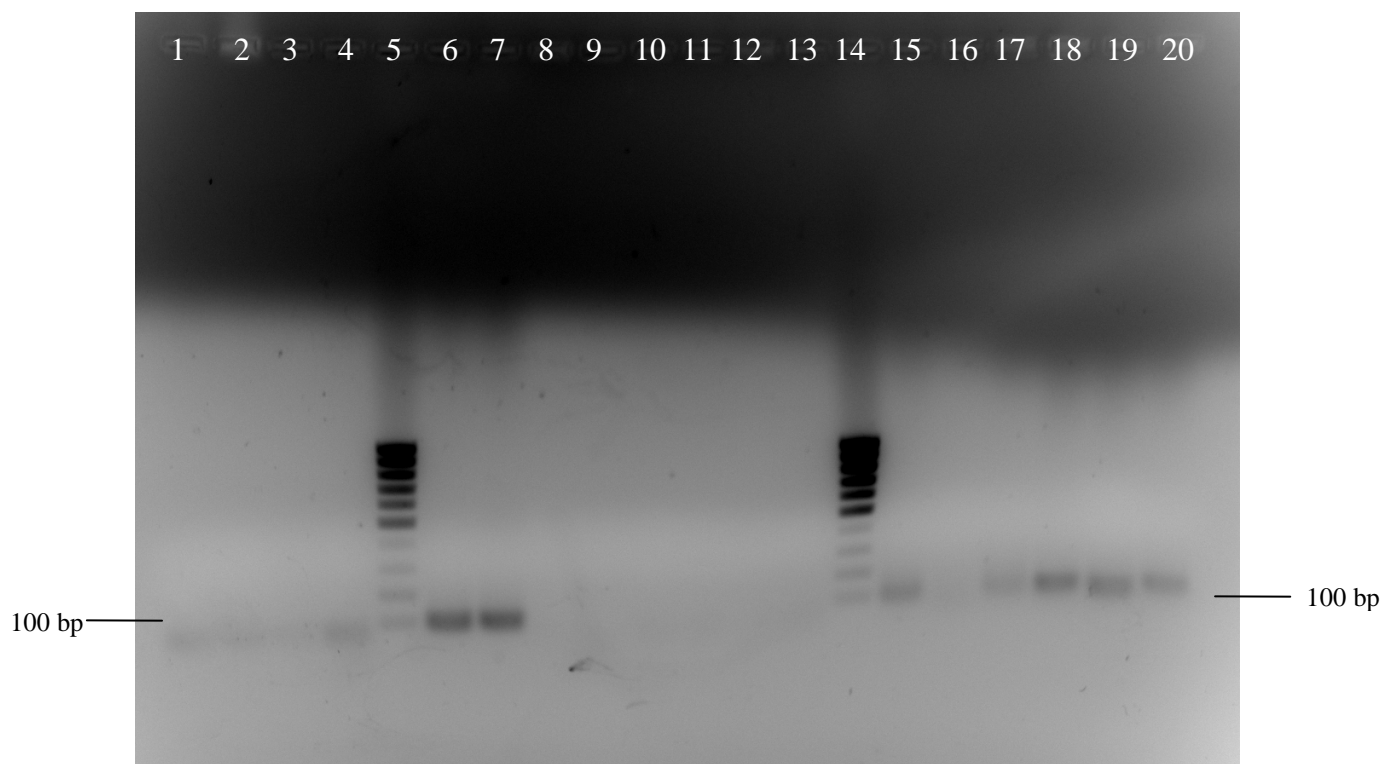


Figure 28 : Gel d'agarose 0.8 % (1) (TAE 1X) après real-time PCR 13 et 14.

- 1-2. Contrôle négatif de surface
- 3-4. Contrôle négatif du mastermix (NTC)
- 5. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 6-7. Contrôle positif de surface

- 8-10. Test d'efficacité 1:4 avec LookOut DNA Erase
- 11-13. Test d'efficacité 1:4 avec DNA Remover
- 14. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 15-17. Test d'efficacité 1:4 avec ExitusPlus
- 18-20. Test d'efficacité 1:4 avec DNA Zap

Les constatations effectuées pour les contrôles sur le gel d'électrophorèse précédent sont également applicable ici. Les contrôles négatifs sont donc négatifs et les contrôles positifs sont positifs. Pour les réactifs LookOut DNA Erase et DNA Remover on ne constate aucune bande. Pour ExitusPlus, on constate effectivement que le réactif n'a pas dégradé totalement l'ADN car on observe la bande du produit PCR (légèrement en dessus de la bande 100 bp du marqueur) dans deux des trois tests présentés ici. Pour DNA Zap, la bande du produit PCR est à nouveau présente ce qui montre que ce réactif ne dégrade pas efficacement l'ADN cible.

A noter qu'ici les bandes correspondant aux monomères d'amorces et celles correspondant aux dimères d'amorces (sauf pour les contrôles négatifs) ne sont pas visibles ici.

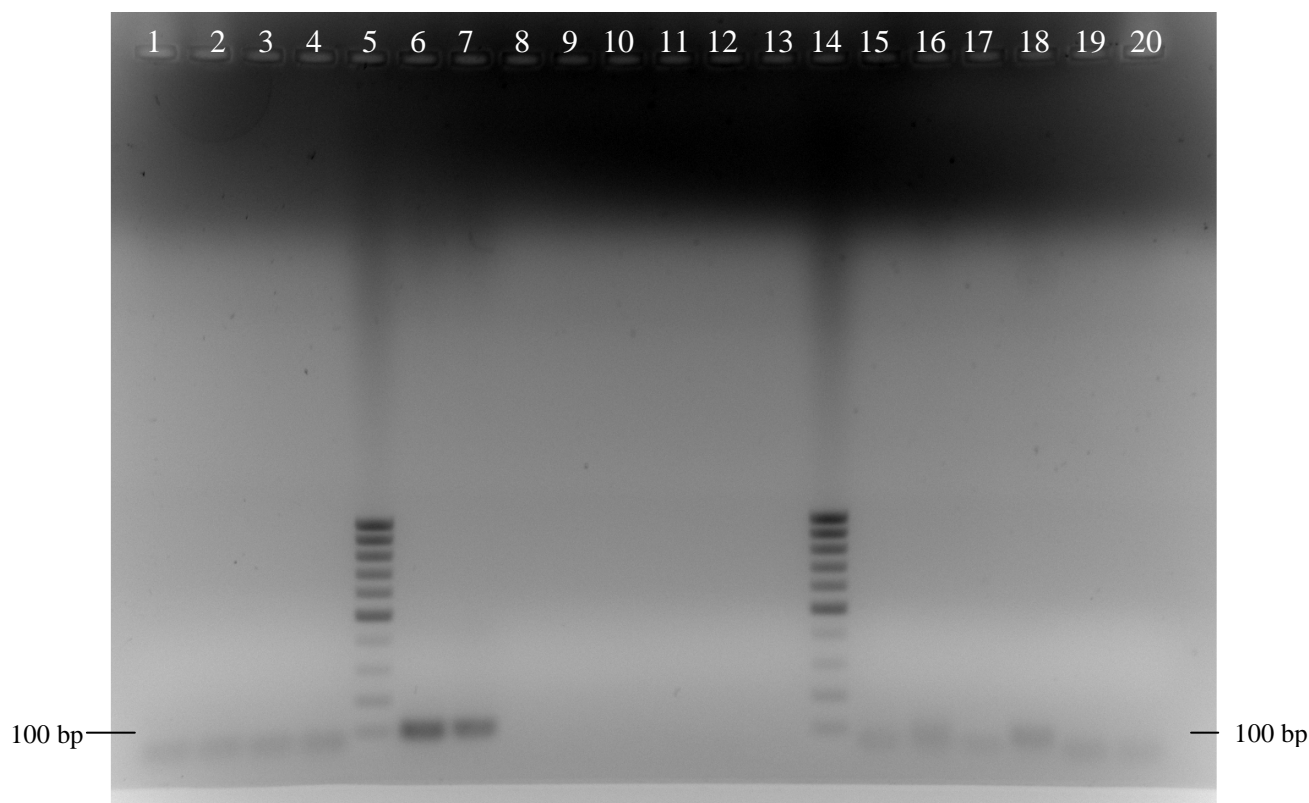


Figure 29: Gel d'agarose 0.8 % (2) (TAE 1X) après real-time PCR 13 et 14.

- 1-2. Contrôle négatif de surface
- 3-4. Contrôle négatif du mastermix (NTC)
- 5. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 6-7. Contrôle positif de surface
- 8-10. Test d'efficacité 1:4 avec Javel 5 %
- 11-13. Test d'efficacité 1:4 avec LTK 008
- 14. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 15-17. Test d'efficacité 1:4 avec DNA Away
- 18-20. Test d'efficacité 1:4 avec DNA Decontamination reagent

Les constatations effectuées pour les contrôles sur le gel d'électrophorèse précédent sont à nouveau applicable ici. Les contrôles négatifs sont donc négatifs et les contrôles positifs sont positifs. Pour les réactifs LTK 008 et Javel 5 % on ne constate aucune bande. Pour les réactifs DNA Away et DNA Decontamination reagent, on ne constate pas de bande de produit PCR. On constate cependant des bandes légères qui se trouvent en dessous de la bande 100 bp du marqueur. Ces bandes correspondent probablement à nouveau aux dimères d'amorces. Ceci montre que ces deux réactifs dégradent totalement l'ADN dans ces conditions là.

A noter qu'ici les bandes correspondant aux monomères d'amorces ne sont pas visibles car le gel d'électrophorèse a été laisser migrer trop longtemps.

Le tableau 36 est une compilation des résultats des real-time PCR 13 et 14. Il présente les ΔC_t moyen obtenus pour chaque réactif (corrigé en fonction des résultats des gels d'électrophorèse).

Tableau 36 : ΔC_t moyen obtenus pour chaque réactif pour les tests d'efficacité (rapport ADN/réactif = 1/4)

Réactifs (rapport ADN/réactif = 1/4)	Nombre d'analyses effectuées	Ct moyen	Ecart-type	Ct moyen du contrôle positif	Ecart-type	ΔC_t moyen	Ecart-type
Javel 5 %	6	-	-	7.7	0.4	50	-
LTK 008	6	-	-	7.7	0.4	50	-
DNA Decontamination reagent	4	-	5.9	7.0	0.4	50	-
DNA Away	4	-	5.2	7.0	0.4	50	-
DNA ExitusPlus	6	13.6	5.0	7.7	0.4	5.9	5.0
DNA Remover	6	-	2.9	7.0	0.4	50	-
LookOut DNA Erase	4	-	6.6	7.0	0.4	50	-
DNA Zap	6	14.3	2.1	7.0	0.4	7.3	2.2

On constate dans ces conditions que la plupart des réactifs sont très efficaces. En effet, les réactifs LTK 008, la Javel 5 %, DNA Remover, LookOut DNA Erase, DNA Away et DNA Decontamination reagent ne donnent aucune courbe d'amplification. Comme précédemment, le réactif DNA Zap semble le moins efficace étant donné le faible ΔC_t moyen obtenu. Pour le réactif ExitusPlus par contre, les résultats sont étonnants car il semble être moins efficace avec sur une quantité d'ADN plus petite. Pour ce réactif, d'autres tests devront être effectués dans les mêmes conditions.

4.17 Tests d'efficacité : real-time PCR 15 et 16

Ces deux real-time PCR regroupent les résultats des tests d'efficacité pour tous les réactifs de décontamination dans les conditions ADN/réactif = 1/0.6. Pour chaque réactif, les tests ont été effectués 6 fois. Cependant, le nombre d'analyse effectuée qui est indiquée dans les tableaux de résultat peut être inférieur à 6. Comme précédemment, ceci est dû au fait que certains résultats sont aberrants et donc qu'il n'en est pas tenu compte pour l'analyse des résultats.

Pour la real-time PCR 15 et 16, les NTC et les contrôles négatifs de surface sont négatifs. En effet seules quelques courbes donnent des valeurs Ct mais aucune d'elles ne correspondent à des courbes d'amplification. Les contrôles positifs de surfaces sont parfaitement répétables et ils sont de plus reproductibles de la real-time PCR 15 à la real-time PCR 16. Pour cela, les résultats peuvent être validés.

Pour la real-time PCR 15, les courbes obtenues sont similaires à celles obtenues lors des real-time PCR précédentes c'est pourquoi les courbes de fluorescence ne seront pas présentées ici. C'est également le cas pour la real-time PCR 16. A noter que cette fois, les courbes obtenues pour les DNA Away et DNA Decontamination reagent correspondent à des courbes d'amplification. Les courbes de fluorescence ne seront toutefois pas présentées ici.

Un gel d'électrophorèse a été effectué pour vérifier les résultats des real-time PCR 15 et 16. Les photos des gels obtenus sont présentées par les figures 30 et 31.

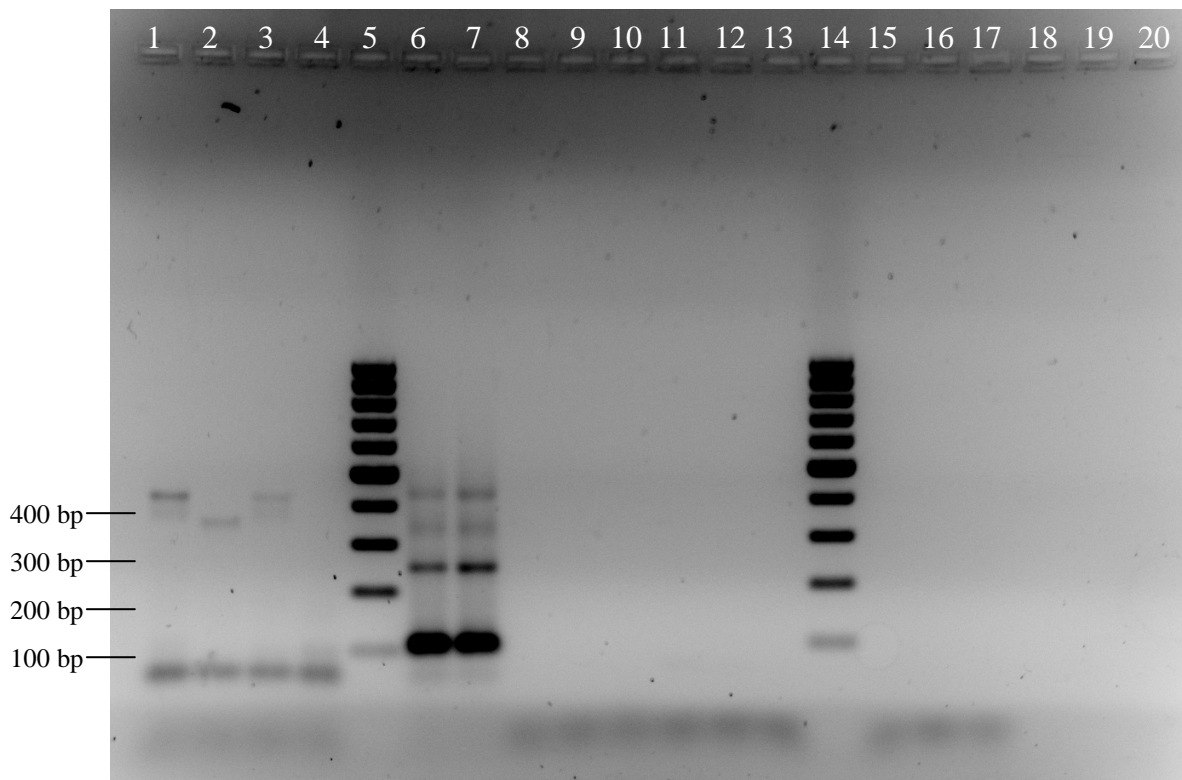


Figure 30: Gel d'agarose 0.8 % (TBE 1X) après real-time PCR 15.

- 1-2. Contrôle négatif de surface
- 3-4. Contrôle négatif du mastermix (NTC)
- 5. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 6-7. Contrôle positif de surface
- 8-10. Test d'efficacité 1:0.6 avec Javel 5 %
- 11-13. Test d'efficacité 1:0.6 avec LTK 008
- 14. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 15-17. Test d'efficacité 1:0.6 avec ExitusPlus
- 18-20. Test d'efficacité 1:0.6 avec DNA Remover

On constate que les contrôles négatifs sont négatifs car ils ne présentent que les bandes correspondant aux dimères d'amorces. On voit également la présence des bandes correspondant aux monomères d'amorces. On voit cependant des bandes à hauteur des 400 bp qui sont probablement des contaminations du au tampon dans lequel le gel est immergé pendant l'électrophorèse. En effet, ces tampons ne sont pas changés à chaque nouvelle électrophorèse. Pour les contrôles positifs on voit les bandes correspondant au produit PCR (légèrement au dessus de la bande 100 bp du marqueur). On voit également pour ces contrôles la présence de bande correspondant à de l'ADN de taille plus grande. La bande qui se trouve entre les bandes 200 bp et 300 bp du marqueur correspond très certainement à l'ADN cible qui a une taille de 283 bp. Pour les bandes plus lourdes (celle au dessus de la bande 300 bp et celle au dessus de la bande 400 bp), il s'agit certainement de la même explication que les bandes (à la même hauteur) présentent dans les contrôles négatif.

Pour les réactifs Javel 5 %, LTK 008, ExitusPlus et DNA Remover on ne constate aucune bande correspondant au produit PCR ni même de bandes correspondant aux dimères d'amorces. On constate tout de même la présence des bandes correspondant aux monomères d'amorces. Ceci montre que ces quatre réactifs dégradent totalement l'ADN cible dans ces conditions la.

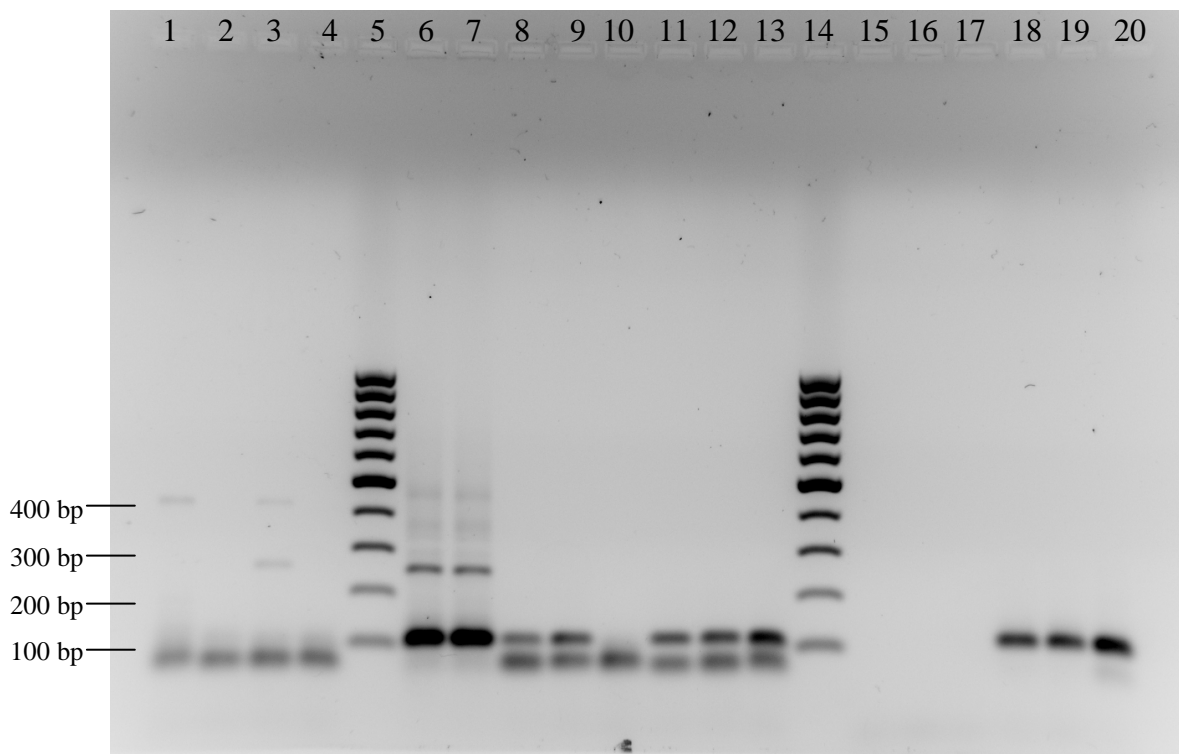


Figure 31: Gel d'agarose 0.8 % (TBE 1X) après real-time PCR 16.

- 1-2. Contrôle négatif de surface
- 3-4. Contrôle négatif du mastermix (NTC)
- 5. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 6-7. Contrôle positif de surface
- 8-10. Test d'efficacité 1:0.6 avec DNA Decontamination reagent
- 11-13. Test d'efficacité 1:0.6 avec DNA Away
- 14. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 15-17. Test d'efficacité 1:0.6 avec LookOut DNA Erase
- 18-20. Test d'efficacité 1:0.6 avec DNA Zap

Pour les contrôles présents sur ce gel, les mêmes constatations que pour le gel précédent peuvent être reportées. A noter tout de même que cette fois, les bandes correspondant aux monomères d'amorces ne sont pas visibles.

Pour les réactifs DNA Decontamination reagent et DNA Away, on constate que la bande du produit PCR est présente dans tous les puits sauf pour le puit 10 (DNA Decontamination reagent). Pour ce dernier puit, c'est un des tests qui a été éliminé. Il n'est donc pas à prendre en considération. A part cela, on constate également la présence de la bande des dimères d'amorces. Ces deux réactifs ne dégradent donc pas totalement l'ADN dans ces conditions. Pour le réactif LookOut DNA Erase, on ne constate la présence d'aucune bande. Ce réactif dégrade donc encore totalement l'ADN dans ces conditions. Pour le réactif DNA Zap, on constate la présence de la bande du produit PCR. On voit également la bande des dimères d'amorces dans le dernier puit. Ce réactif n'est donc pas plus efficace ici qu'auparavant ce qui est logique.

Le tableau 37 est une compilation des résultats des real-time PCR 15 et 16. Il présente les ΔC_t moyen obtenus pour chaque réactif (corrigé en fonction des résultats des gels d'électrophorèse).

Tableau 37: ΔCt moyen obtenus pour chaque réactif pour les tests d'efficacité (rapport ADN/réactif = 1/0.6)

Réactifs (rapport ADN/réactif = 1/0.6)	Nombre d'analyses effectuées	Ct moyen	Ecart-type	Ct moyen du contrôle positif	Ecart-type	ΔCt moyen	Ecart-type
Javel 5 %	6	-	-	4.2	0.5	50	-
LTK 008	6	-	-	4.2	0.5	50	-
DNA Decontamination reagent	2	34.5	0.7	4.4	0.5	30.0	0.8
DNA Away	6	31.0	4.5	4.4	0.5	26.6	4.5
DNA ExitusPlus	5	-	-	4.2	0.5	50	-
DNA Remover	6	-	-	4.2	0.5	50	-
LookOut DNA Erase	6	-	-	4.4	0.5	50	-
DNA Zap	6	10.3	1.0	4.4	0.5	5.9	1.1

On constate dans ces conditions que la plupart des réactifs sont très efficaces. En effet, les réactifs LTK 008, la Javel 5 %, DNA Remover, LookOut DNA Erase et ExitusPlus ne donnent aucune courbe d'amplification. Comme précédemment, le réactif DNA Zap semble le moins efficace étant donné le faible ΔCt moyen obtenu. Pour les réactifs DNA Decontamination reagent et DNA Away, on constate qu'ils dégradent l'ADN mais pas totalement vu qu'une amplification de l'ADN cible est encore possible. Ces deux réactifs sont tout de même bien plus efficaces que le DNA Zap.

4.18 Tests d'efficacité : real-time PCR 17

La real-time PCR 17 a été effectuée pour tester diverses dilutions de Javel 5 % dans les conditions ADN/réactif = 1/2. Ceci permet de vérifier si la Javel diluée est toujours efficace et également si les dimères d'amorces ne sont plus dégradés à partir d'une certaine dilution.

Des tests d'efficacité pour le réactif ExitusPlus dans les conditions ADN/réactif = 1/4 ont également été effectués ceci afin de vérifier les résultats obtenus lors de la real-time PCR 14.

Pour la real-time PCR 17, les NTC et les contrôles négatifs de surface sont négatifs. En effet seules quelques courbes donnent des valeurs Ct mais aucune d'elles ne correspondent à des courbes d'amplification. Les contrôles positifs de surfaces sont de plus parfaitement répétables. Pour cela, les résultats peuvent être validés.

Pour la real-time PCR 17, les courbes obtenues sont similaires à celles obtenues lors des real-time PCR précédentes c'est pourquoi les courbes de fluorescence ne seront pas présentées ici.

Un gel d'électrophorèse a été effectué pour vérifier les résultats de la real-time PCR 17. La photo du gel obtenu est présentée par la figure 32.

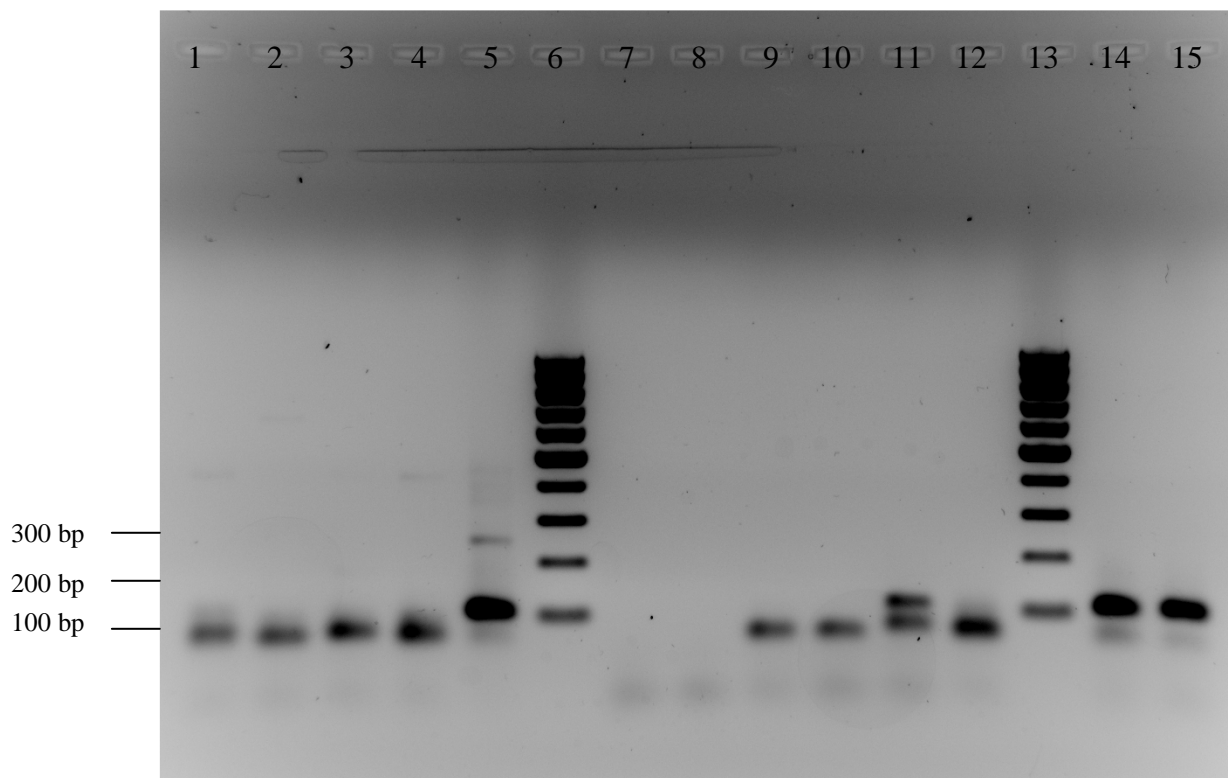


Figure 32: Gel d'agarose 0.8 % (TBE 1X) après real-time PCR 17.

- 1-2. Contrôle négatif de surface
- 3-4. Contrôle négatif du mastermix (NTC)
- 5. Contrôle positif de surface
- 6. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 7. Test d'efficacité 1:2 avec Javel 5 % non dilué
- 8. Test d'efficacité 1:2 avec Javel 5 % dilué 2x
- 9. Test d'efficacité 1:2 avec Javel 5 % dilué 5x
- 10. Test d'efficacité 1:2 avec Javel 5 % dilué 10x
- 11. Test d'efficacité 1:2 avec Javel 5 % dilué 20x
- 12. Test d'efficacité 1:2 avec Javel 5 % dilué 50x
- 13. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- 14-15. Test d'efficacité 1:4 avec ExitusPlus

Pour les contrôles présents sur ce gel, les mêmes constatations que pour les gels précédents peuvent être reportées. A noter que cette fois, les bandes correspondant aux monomères d'amorces sont visibles.

Pour la Javel 5 % non dilué, dilué 2x, dilué 5x, dilué 10x et dilué 50x, on ne constate pas la présence de la bande du produit PCR. On constate cependant cette bande pour la Javel 5 % dilué 20x. Ceci n'est pas logique. En effet, comme la Javel dilué 20x n'est plus aussi efficace pour dégrader l'ADN, la Javel dilué 50X devrait également présenter la bande du produit PCR. Les échantillons de ces deux tests ont probablement été intervertis. Pour la bande des dimères d'amorces, elles sont présentes pour les tests effectués avec la Javel 5 % dilué 5x, 10x, 20x et 50x. Ceci montre que la Javel trop concentrée dégrade les dimères d'amorces.

Pour les tests effectués avec ExitusPlus dans les conditions ADN/réactif = 1/4, on constate à nouveau que les courbes d'amplification obtenues correspondent effectivement à une amplification de l'ADN cible. En effet, on voit sur le gel la bande du produit PCR. On voit également la bande des dimères d'amorces.

A noter que la bande des monomères d'amorces est présente pour tous les tests.

Le tableau 38 est une compilation des résultats de la real-time PCR 17. Il présente les ΔC_t moyen obtenus pour chaque réactif.

Tableau 38: ΔCt moyen obtenus pour la Javel (rapport ADN/réactif = 1/2) et pour ExitusPlus (rapport ADN/réactif = 1/4) pour les tests d'efficacité.

Réactifs	Nombre d'analyses effectuées	Ct moyen	Ecart-type	Ct moyen du contrôle positif	Ecart-type	ΔCt moyen	Ecart-type
Javel 5 % non dilué	2	-	-	6.6	0.3	50	-
Javel 5 % dilué 2x	2	-	-	6.6	0.3	50	-
Javel 5 % dilué 5x	2	-	-	6.6	0.3	50	-
Javel 5 % dilué 10x	2	-	-	6.6	0.3	50	-
Javel 5 % dilué 20x	2	36.4	0.4	6.6	0.3	29.8	0.5
Javel 5 % dilué 50x	2	-	-	6.6	0.3	50	-
DNA ExitusPlus	9	15.2	3.0	7.7	0.5	7.5	3.0

On constate que la Javel est efficace jusqu'à une dilution 10x en tout cas. Les échantillons étant probablement inversés (sans que cela puisse être vérifié) pour les dilutions 20x et 50X, il n'est pas possible de savoir si la dilution 20x est dégradée encore totalement l'ADN.

Pour les tests avec ExitusPlus dans les conditions ADN/réactif = 1/4, les mêmes résultats que pour la real-time PCR 14 ont été obtenus, c'est-à-dire que ce réactif n'est pas efficace dans ces conditions.

4.19 Tests monomères d'amorces et dimères d'amorces

Un gel d'électrophorèse a été effectué avec le mastermix avant PCR et après PCR. De plus, les amorces ont également été chargées, séparément et ensemble, ainsi que le mélange des deux amorces avec la sonde. Les amorces et la sonde ont été chargées dans les mêmes concentrations que dans le mastermix. Ces tests ont simplement été faits afin de vérifier que les hypothèses effectuées (concernant les gels d'électrophorèse précédents) pour les bandes des monomères et des dimères d'amorces étaient correctes. La figure 33 présente les résultats obtenus.

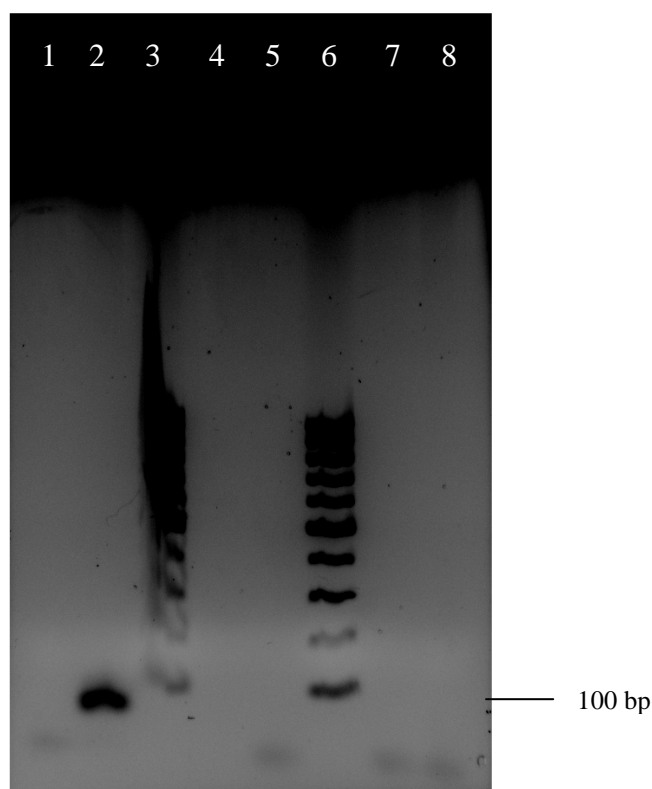


Figure 33: Gel d'agarose 0.8 % (TBE 1X) pour tests monomères et dimères d'amorces.

1. Mastermix avant real-time PCR 17

2. Mastermix après real-time PCR 17
3. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
4. Primer atpA-F 9 μ M
5. Primer atpA-R 9 μ M
6. Marqueur GeneRuler 100 bp DNA Ladder
7. Primer atpA-F 9 μ M et Primer atpA-R 9 μ M
8. Primer atpA-F 9 μ M, Primer atpA-R 9 μ M et sonde YY-lectin-TMP 10 μ M

Pour les puits 1, 5, 7 et 8 on constate que la présence de la même bande que rencontrée dans les gels précédents. Cette bande correspond donc certainement aux monomères d'amorces. Pour le mastermix après PCR on constate que cette bande n'est pas présente mais qu'on voit une large bande, légèrement en dessous de la bande 100 bp du marqueur. Il y a donc de grande chance que cette bande soit des dimères d'amorces. A noter que cette bande donne une valeur Ct de 35.1 (obtenu lors de la real-time PCR 17). Ceci explique donc pourquoi on obtient des valeurs Ct pour certains tests d'efficacité alors que tout l'ADN cible a été dégradé (visible sur les gels en question) par le réactif.

4.20 Compilation des tests d'efficacité

Cette section résume tous les tests d'efficacité effectués. Elle permet de constater rapidement quels sont les réactifs les plus efficaces. En effet, plus le Δ Ct moyen est grand et plus le réactif de décontamination est efficace dans les conditions testées. La figure 34 présente les résultats des tests d'efficacité obtenus pour les réactifs basique. A noter que les flèches rouges représentent les barres d'erreur.

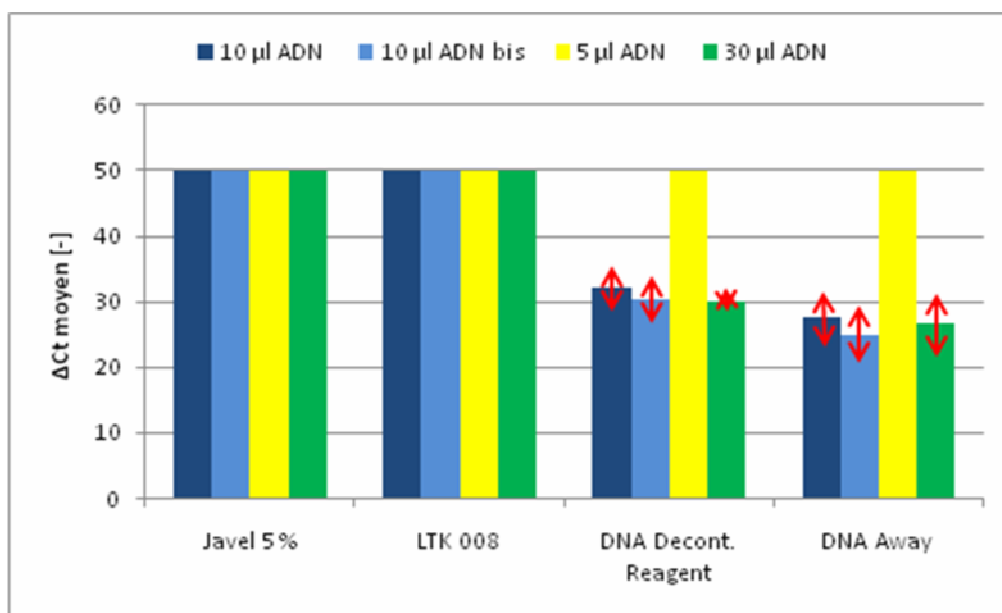


Figure 34: Δ Ct moyen obtenus pour les réactifs basiques

On constate que la Javel 5 % et le LTK 008 sont très efficaces car ils ne donnent aucune courbe d'amplification (Δ Ct moyen de 50 = aucune courbe d'amplification) quel que soit la quantité d'ADN cible traité. Les réactifs DNA Away et DNA Decontamination reagent sont moins efficaces pour les tests avec 10 μ l et 30 μ l d'ADN. Dans ces conditions, il n'est pas possible de dire lequel de ces deux réactifs est meilleur que l'autre étant donné que les barres d'erreur se chevauchent. La méthode n'est donc pas assez précise pour distinguer ces deux réactifs.

A noter que les tests 10 μ l d'ADN et 10 μ l d'ADN bis sont des tests effectués dans les mêmes conditions mais pas en même temps. Ces tests permettent donc d'évaluer la reproductibilité de la méthode de prélèvement des échantillons. Les barres bleu foncé et bleu clair devraient donc théoriquement être identiques. On constate ici que la méthode de prélèvement semble relativement reproductible.

La figure 35 présente les résultats des tests d'efficacité obtenus pour les réactifs acide.

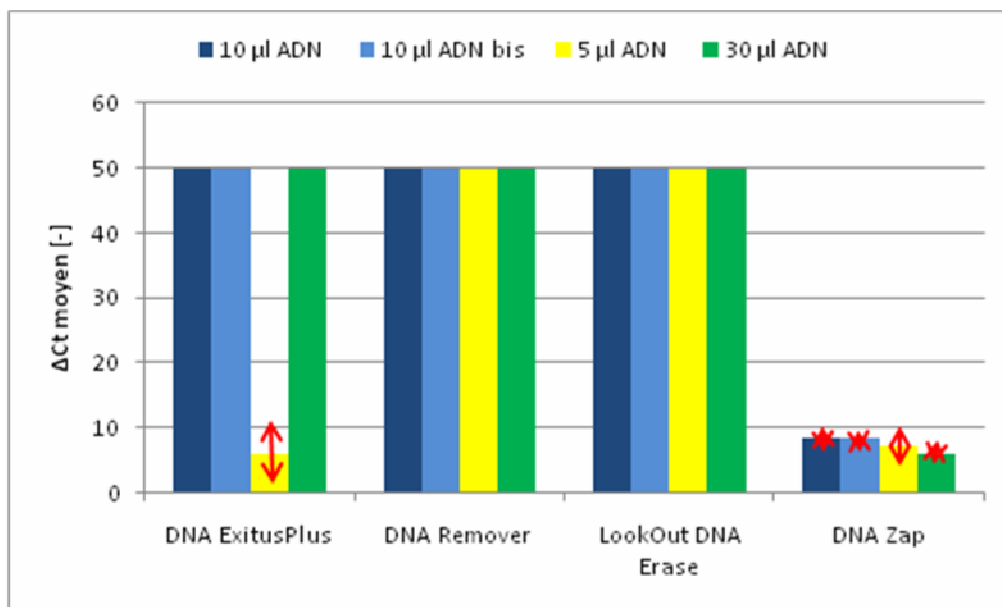


Figure 35: ΔC_t moyen obtenu pour les réactifs acides

On constate ici que DNA Remover et LookOut DNA Erase sont très efficaces dans toutes les conditions testées car ils ne donnent aucune courbe d'amplification (les courbes obtenues pour ces réactifs sont des courbes parasites). A noter que pour ces deux réactifs, les ΔC_t moyen obtenus avec 10 μl d'ADN (barres bleu foncé) ont été corrigés bien qu'aucun gel d'électrophorèse n'ait été fait. En effet, les courbes obtenues ne correspondaient pas à des courbes d'amplification.

Le réactif DNA ExitusPlus est très efficace pour les tests avec 10 μl et 30 μl d'ADN car il ne donne aucune courbe d'amplification. Cependant, le réactif ne semble pas du tout efficace pour les tests avec 5 μl d'ADN (c'est-à-dire avec moins d'ADN) ce qui n'est pas logique. Des tests dans ces conditions la on été refait et ils ont confirmé ces résultats (voir figure 36). Le réactif DNA Zap n'est pas très efficace quel que soit la condition testée.

Pour les réactifs qui présentent des ΔC_t moyen de 50 (valeur fixée), on peut dire qu'ils dégradent à 100 % l'ADN cible (dans les conditions en question). Pour les réactifs qui montrent des ΔC_t moyen inférieur à 50, c'est-à-dire les réactifs qui ne dégradent pas totalement l'ADN cible, il est nécessaire de calculer quel pourcentage de l'ADN cible a été dégradé. Pour cela, on sait quelle quantité d'ADN initiale est traitée et grâce à la courbe de calibration des real-time PCR, la quantité d'ADN résiduelle après traitement peut être calculé. Le tableau 39 présente les résultats obtenus.

Tableau 39: Pourcentage d'ADN cible dégradé par les conditions ne présentant pas de ΔC_t moyen de 50.

Réactifs (conditions)	Quantité initiale [μg]	Quantité finale [μg]	ADN dégradé [%]
DNA Away (1/2)	0.281	4.66E-08	99.99998
DNA Away (1/2 bis)	0.281	1.07E-06	99.99962
DNA Away (1/0.6)	0.843	2.01E-06	99.99976
DNA Decontamination reagent (1/2)	0.281	1.73E-09	100.00000
DNA Decontamination reagent (1/2 bis)	0.281	2.61E-08	99.99999
DNA Decontamination reagent (1/0.6)	0.843	1.76E-08	100.00000
ExitusPlus (1/4)	0.141	3.39E-02	75.87189
DNA Zap (1/2)	0.281	5.30E-03	98.11388
DNA Zap (1/2 bis)	0.281	3.86E-03	98.62633
DNA Zap (1/4)	0.141	5.90E-03	95.80071
DNA Zap (1/0.6)	0.843	1.08E-01	87.18861

On constate que les réactifs DNA Away et DNA Decontamination reagent (conditions 1/2, 1/2 bis et 1/0.6), bien qu'ils ne présentent pas de ΔC_t moyen de 50 (c'est-à-dire qu'ils ne dégradent pas l'ADN cible à 100 %), dégradent quand même l'ADN cible à plus de 99.99 %. Pour DNA Decontamination

reagent (conditions 1/2 et 1/0.6), on constate même que la quantité d'ADN résiduelle après traitement est tellement infime (mais non nul !) que le calcul du pourcentage donne 100 % de dégradation. Ceci indique que ces réactifs dégradent l'ADN efficacement mais pas totalement, étant donné qu'une amplification est encore possible.

Pour ExitusPlus (conditions 1/4), le calcul du pourcentage de dégradation de l'ADN cible montre que ce réactif est moins efficace (75.9 % de dégradation) avec une quantité d'ADN initiale plus faible ce qui n'est pas logique.

Pour DNA Zap (conditions 1/2, 1/2 bis et 1/4), les ΔC_t moyen obtenus montrent que ce réactif est très peu efficace. Cependant, le pourcentage de dégradation de l'ADN cible est tout de même de 93 % en moyenne.

Les figures présentant les ΔC_t moyens obtenus sont donc quelque peu trompeuses quant à l'efficacité effective de chaque réactif.

La figure 36 présente les résultats des tests d'efficacité pour les différentes dilutions de Javel ainsi que pour les tests ExitusPlus avec 5 μ l d'ADN bis.

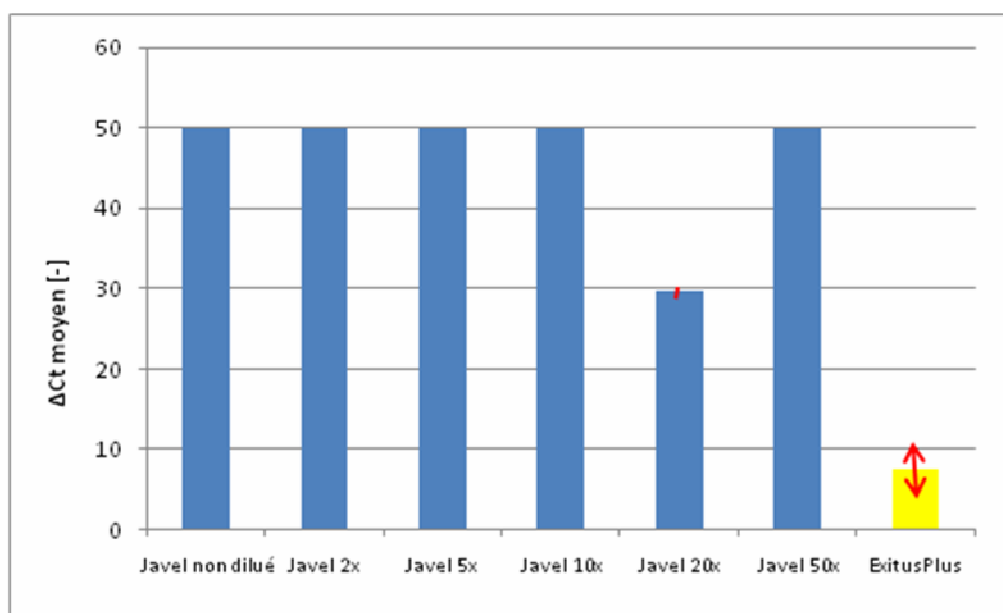


Figure 36: ΔC_t moyen obtenus pour la Javel 5 % non-diluée, diluée 2x, diluée 5x, diluée 10x, diluée 20x et diluée 50x (conditions ADN/réactif = 1/2) ainsi que pour ExitusPlus (conditions ADN/réactif = 1/4).

On constate que la Javel 5 % est encore très efficace jusqu'à la dilution 10x. Au-delà, la dilution 50x semble aussi très efficace alors que la dilution 20x ne dégrade déjà plus l'ADN totalement. Ceci n'est pas logique; il semblerait donc que les échantillons dilués 20x et dilués 50x ont été intervertis par erreur. Les tests d'efficacité avec 5 μ l d'ADN pour ExitusPlus ont été refaits car incohérents. Les résultats sont sensiblement pareils à ceux présentés par la figure 35. Les ΔC_t moyens montrent à nouveau que ce réactif est peu efficace dans ces conditions.

4.21 Tests de corrosion : méthode par spots

Les tests de corrosion permettent d'évaluer la corrosivité des réactifs. Ceux-ci ont été effectués avec des temps d'incubation de 5, 10 et 20 min. Ici, seuls les résultats des temps d'incubation de 10 min sont présentés ci-dessous (les photos des autres tests se trouvent à l'Annexe 18). À noter que pour les tests d'efficacité, l'ADN a été mis en contact avec le réactif pendant 10 min. On peut dès lors mettre en relation l'efficacité et la corrosivité d'un réactif. Les figures 37 et 38 présentent les photos prises après les tests de corrosion sur l'acier et l'acier inoxydable avec les réactifs acides et basiques (temps de contact de 10 min). À noter que les spots effectués avec l'eau sont des contrôles négatifs.

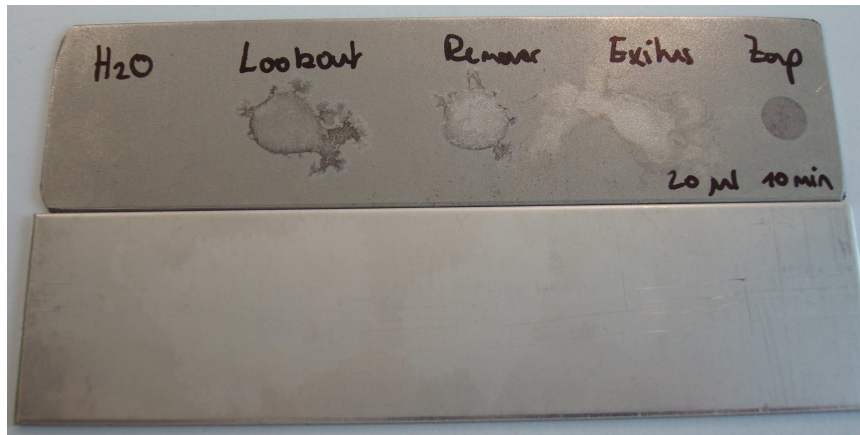


Figure 37: Tests de corrosion (10 min) des réactifs acides sur l'acier (en haut) et l'acier inoxydable (en bas)



Figure 38: Tests de corrosion (10 min) des réactifs basiques sur l'acier (en haut) et l'acier inoxydable (en bas)

Les réactifs LookOut DNA Erase et DNA Remover attaque l'acier de la même manière. Ceci est logique étant donné que c'est tout deux des réactifs à base d'acide phosphorique. Les réactifs ExitusPlus et DNA Zap attaque également l'acier. Aucun de ces réactifs ne peut donc être utilisé pour traiter l'acier. Les réactifs acides attaquent légèrement l'acier inoxydable.

Les réactifs Javel 5 % et LTK 008 sont très corrosifs sur l'acier. On voit que l'acier rouille (déjà au bout de 20 s) en contact de ces deux réactifs. Pour DNA Decontamination reagent et DNA Away, on constate également que l'acier rouille au bout de 10 min. La réaction est néanmoins beaucoup plus lente et moins intense qu'avec la Javel 5 % et LTK 008. Tout comme les réactifs acides, les réactifs basiques ne peuvent pas être utilisés pour décontaminer l'acier. Les réactifs basiques n'attaquent pas l'acier inoxydable.

Les figures 39 et 40 présentent les photos prises après les tests de corrosion sur l'aluminium, le cuivre et le laiton avec les réactifs acides et basiques (temps de contact de 10 min).

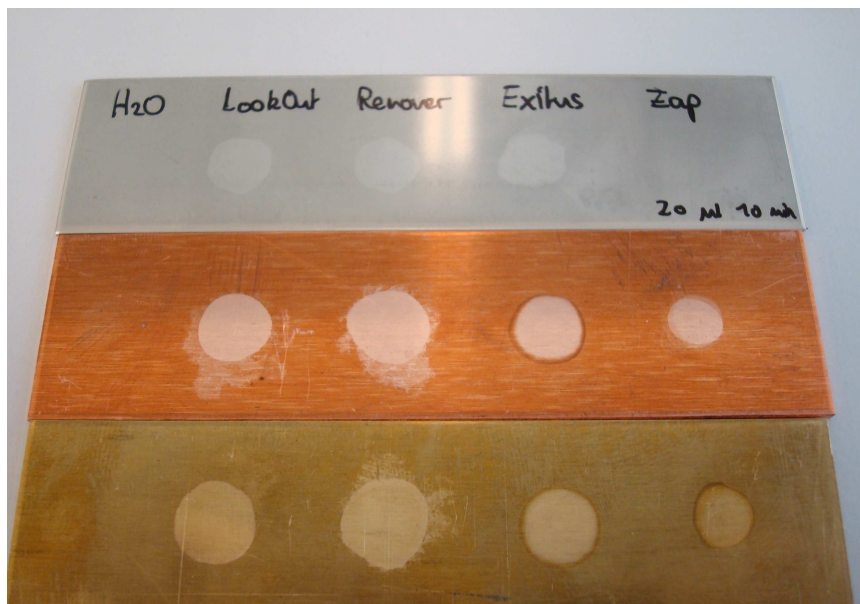


Figure 39: Tests de corrosion (10 min) des réactifs acides sur l'aluminium (en haut), le cuivre (au milieu) et le laiton (en bas)

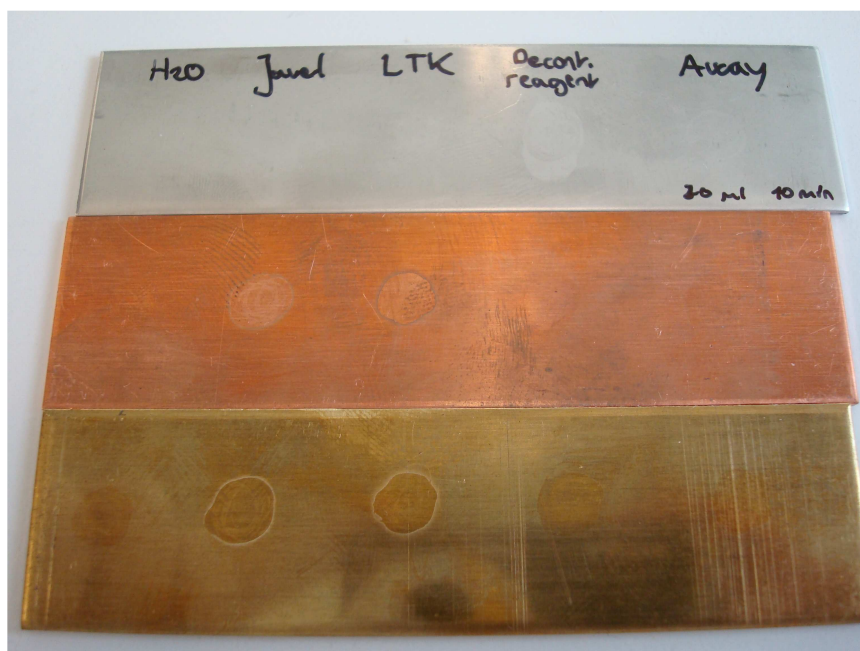


Figure 40: Tests de corrosion (10 min) des réactifs basiques sur l'aluminium (en haut), le cuivre (au milieu) et le laiton (en bas)

Les réactifs LookOut DNA Erase, DNA Remover et ExitusPlus agissent de la même manière en contact avec l'aluminium, le cuivre et le laiton. Ils sont très corrosifs. On voit en effet déjà la réaction apparaître en moins d'une minute de contact. Le DNA Zap attaque le cuivre et le laiton de la même manière. Il n'attaque cependant pas l'aluminium (même au bout de 20 min de contact).

La Javel 5 % et le LTK 008 n'attaquent pas ou peu l'aluminium mais attaquent par contre légèrement le cuivre et le laiton. Le réactif DNA Decontamination reagent attaque faiblement l'aluminium mais pas le cuivre ni le laiton. DNA Away n'attaque aucun de ces trois matériaux au bout de 10 min d'incubation. Cependant, DNA Decontamination reagent et DNA Away attaque légèrement (de la même manière que LTK 008 et la Javel au bout de 10 min) le cuivre et le laiton, mais ceci au bout de 20 min.

Les figures 41 et 42 présentent les photos prises après les tests de corrosion sur l'acier, l'acier inoxydable, l'aluminium, le cuivre et le laiton avec la Javel dilué 2x, 5x, 10x et 20x (temps de contact de 10 min).



Figure 41: Tests de corrosion (10 min) de la Javel diluée 2x, 5x, 10x et 20x sur l'acier (en haut) et l'acier inoxydable (en bas)

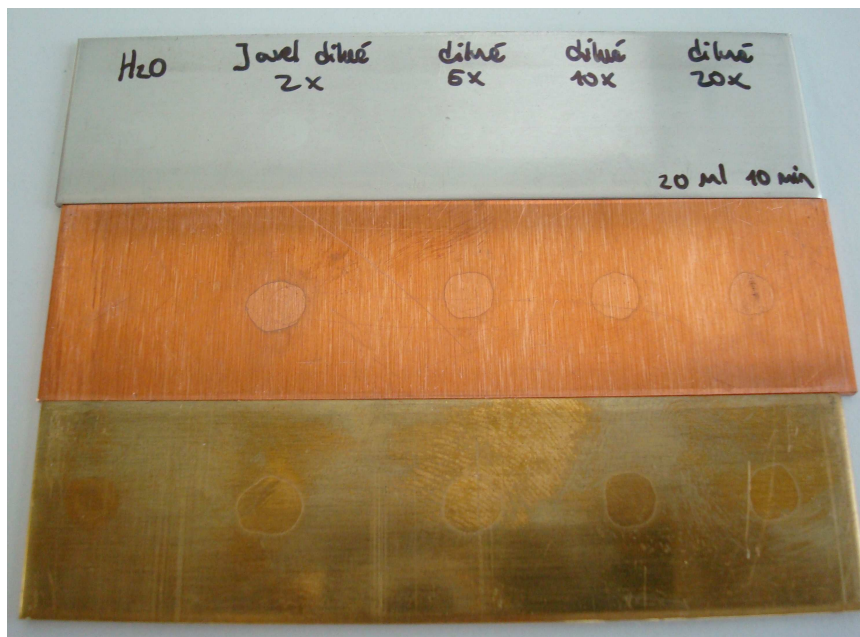


Figure 42: Tests de corrosion (10 min) de la Javel diluée 2x, 5x, 10x et 20x sur l'aluminium (en haut), le cuivre (au milieu) et le laiton (en bas)

On voit qu'avec un temps d'incubation de 10 min, les dilutions de la Javel agissent toutes de la même manière pour un même type de matière. Ces dilutions n'attaquent pas ou très faiblement l'acier inoxydable, l'aluminium et le laiton. Par contre elles attaquent légèrement le cuivre et attaquent très fortement l'acier.

4.22 Tests de corrosion : méthode par immersion

Des tests de corrosion sur les plastiques ont été effectués en trempant une partie des barrettes dans chacun des réactifs. Les barrettes de plastiques testées sont en PVC, Ertalon, polypropylène et PTFE. Chaque jour pendant une semaine, les barrettes sont sorties des réactifs et leur aspect ainsi que leur texture est observé. La figure 43 présente la photo de quatre barrettes trempées dans DNA Away.

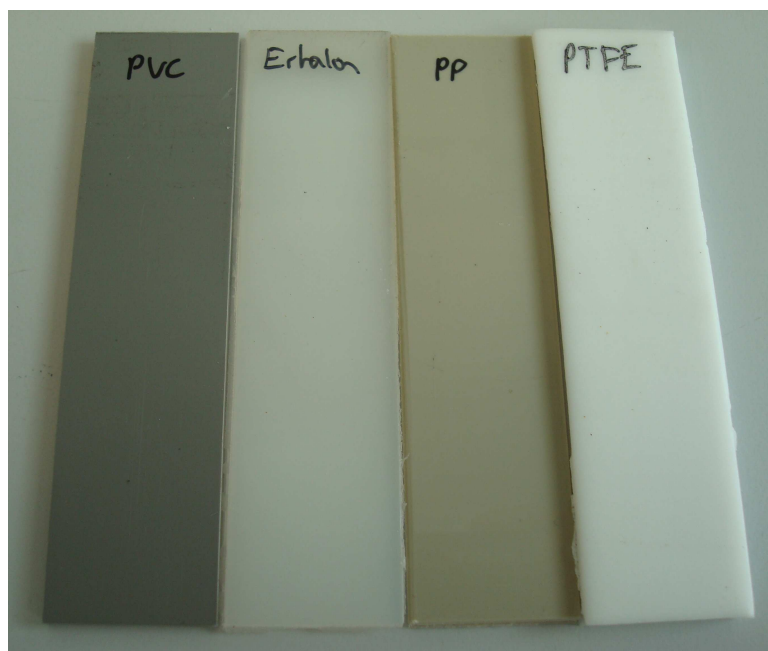


Figure 43: Tests de corrosion (1 semaine) de DNA Away sur le PVC, Ertalon, polypropylène et PTFE.

A noter que seule cette photo est présentée ici car aucun réactif n'a eu d'effet sur les barrettes de plastique (au bout d'une semaine).

Des tests de corrosion complémentaire ont été effectués sur l'acier inoxydable. Pour cela, des barrettes ont été trempées en partie dans chacun des réactifs et laissées ainsi pendant une semaine. Les figures 44 et 45 présentent les résultats obtenus.

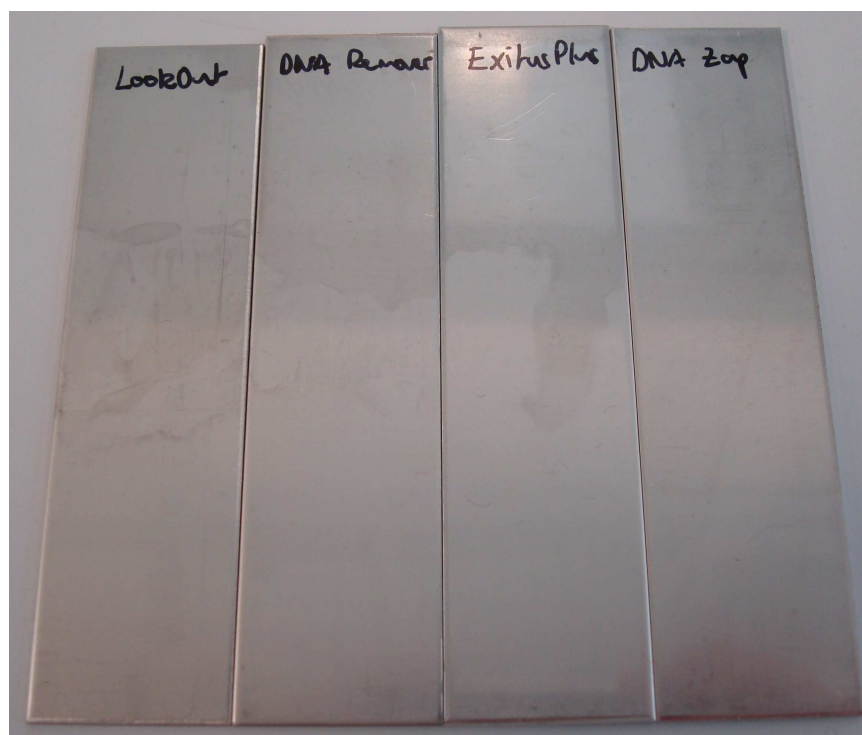


Figure 44: Tests de corrosion (1 semaine) des réactifs acides sur l'acier inoxydable.

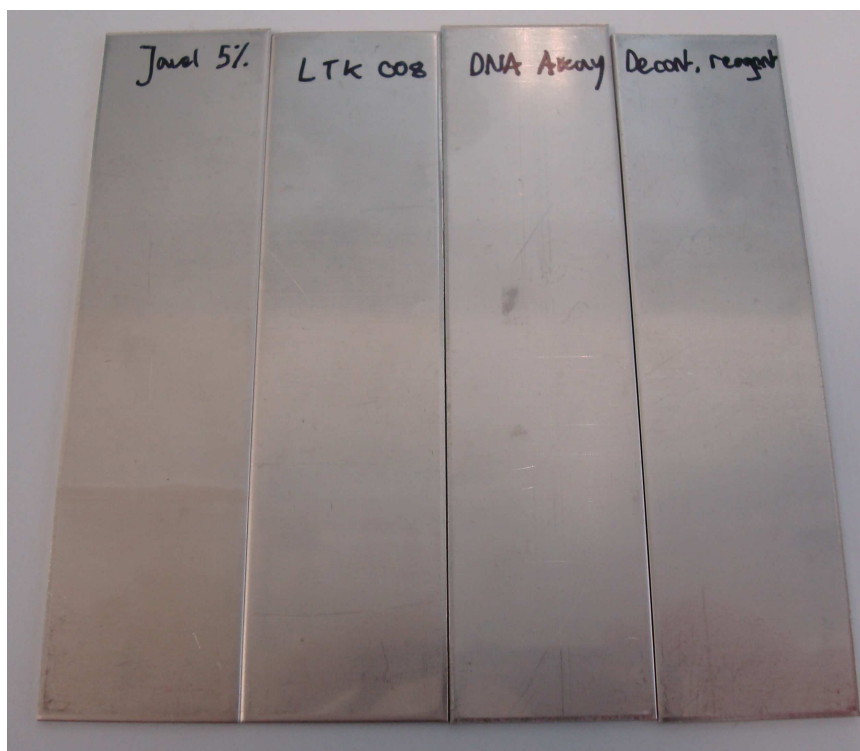


Figure 45: Tests de corrosion (1 semaine) des réactifs basiques sur l'acier inoxydable.

Pour les réactifs acides, on constate qu'ils attaquent tous légèrement l'acier inoxydable. Il n'y a pas de différences visibles par rapport aux tests de corrosion de 10 min d'incubation.

Pour les réactifs basiques, on constate que seule la Javel 5 % a rendu l'acier inoxydable légèrement brun. Les autres réactifs basiques attaquent pas l'acier inoxydable.

Les barrettes d'acier inoxydable ont été pesées avant et après le test de corrosion afin de d'obtenir une information quantitative quant à la dégradation de la matière par les réactifs. Le tableau 40 présente les résultats obtenus.

Tableau 40: Pourcentage de dégradation des barrettes en acier inoxydables après une semaine de contact.

Réactifs	Barrettes avant test [g]	Barrettes après test [g]	Pourcentage de dégradation [%]
Javel	24.9475	24.9467	0.003
LTK 008	24.6747	24.6742	0.002
DNA Away	25.1793	25.1789	0.002
DNA Decontamination reagent	24.6629	24.6622	0.003
LookOut DNA Erase	24.2565	24.2544	0.009
DNA Remover	24.5689	24.5674	0.006
DNA ExitusPlus	24.836	24.8353	0.003
DNA Zap	24.8017	24.8004	0.005

On constate évidemment que le pourcentage de dégradation des barrettes en acier inoxydable (après une semaine de temps de contact) est complètement négligeable. Tous les réactifs peuvent donc être utilisés sur l'acier inoxydable.

Des tests de corrosion sur les Eppendorf (polypropylène) ont été effectués afin de savoir si les réactifs peuvent être utilisés pour décontaminer ceux-ci. Pour cela, des Eppendorf on été trempés 21h dans chacun des réactifs. Ils ont été pesés avant et après l'immersion dans les réactifs. Le tableau 41 présente les résultats obtenus.

Tableau 41: Pourcentage de dégradation des Eppendorf après une semaine de contact.

Réactifs	Eppendorf avant test [g]	Eppendorf après test [g]	Pourcentage de dégradation [%]
Javel	1.0523	1.0514	0.09
LTK 008	1.057	1.0559	0.10
DNA Away	1.0521	1.0508	0.12
DNA Decontamination reagent	1.0508	1.0493	0.14
LookOut DNA Erase	1.0525	1.0512	0.12
DNA Remover	1.0634	1.0624	0.09
DNA ExitusPlus	1.0514	1.0504	0.10
DNA Zap	1.0523	1.0512	0.10

On constate ici aussi que les pourcentages de dégradation sont infimes pour chaque réactif. Ceux-ci peuvent donc être utilisés pour décontaminer les Eppendorf si nécessaire.

4.23 Comparaison des tests de corrosion effectués avec les tests issus de la littérature

Esser et al. ont reporté [18] que DNA-ExitusPlus™ n'est pas corrosif en comparaison de certains réactifs de décontamination conventionnel. Pour cela, ils ont appliqué 10 µl de chaque réactif sur différentes surfaces métalliques. Après 20 min d'incubation les réactifs ont été éliminés de la surface des métaux, puis ceux-ci ont été rincés avec de l'eau stérile avant d'être séchés. Les résultats sont présentés par la figure 46.

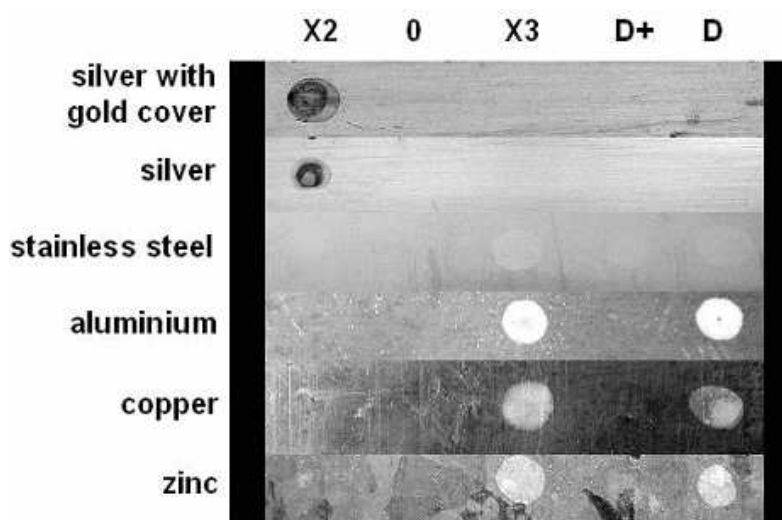


Figure 46: Test de l'effet corrosif (temps de contact 20 min) de différents réactifs en comparaison avec DNA-ExitusPlus™.

0 : Contrôle négatif (eau stérile).
X2 et X3 : Réactifs conventionnels de décontamination.
D : DNA-Exitus™ conventionnel.
D+ : DNA-ExitusPlus™.

Pour le réactif DNA ExitusPlus, les mêmes tests ont été effectués avec l'aluminium et le cuivre. La figure 47 présente les résultats obtenus. A noter que les mêmes tests ont également été effectués avec l'acier inoxydable (stainless steel) mais qu'il ne sont pas présentés ici car les résultats sont semblables, à savoir une légère réaction visible ou le spot a été déposé.

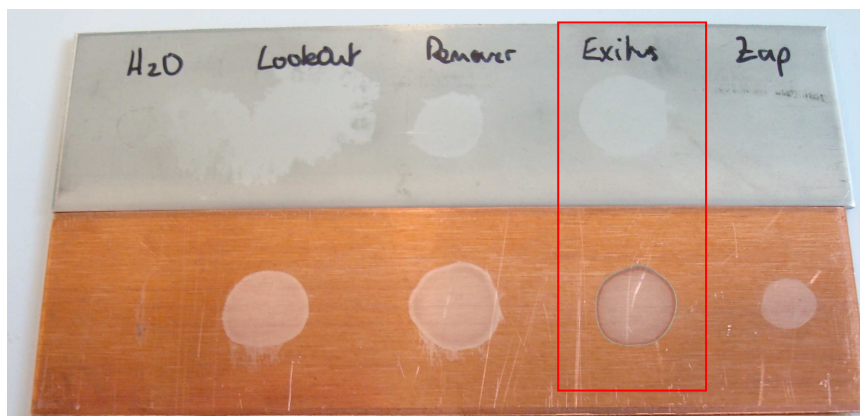


Figure 47: Test de l'effet corrosif (temps de contact 20 min) de DNA-ExitusPlus™ sur l'aluminium (en haut) et le cuivre (en bas).

On constate que contrairement aux résultats présentés par la littérature, DNA ExitusPlus attaque (temps d'incubation de 20 min) l'aluminium et le cuivre. Ce réactif attaque d'ailleurs ces deux matières au bout d'une minute de contact. Ceci prouve qu'il ne faut pas toujours croire aveuglément les résultats présentés dans la littérature.

5. Discussion

Les réactifs LookOut DNA Erase et DNA Remover sont des réactifs à base d'acide phosphorique. Les tests d'efficacité montre que ces deux réactifs dégradent totalement l'ADN cible, qu'importe la quantité initiale d'ADN. En effet, aucune courbe d'amplification n'a été détectée, preuve qu'il n'y a plus d'ADN cible après traitement par ces réactifs. Certes des courbes de fluorescence sont détectées pour ces réactifs dans certaines conditions, mais ces courbes sont aplaties et ne correspondent pas à des courbes d'amplification. Bien que certaines de ces courbes ont « coupé » le seuil (threshold) et donc qu'elles donnent une valeur Ct, force est de constater que ces courbes correspondent à un bruit de fond. Ces courbes ont d'ailleurs le même aspect que les courbes des contrôles négatif qui coupent le seuil au-delà du cycle 40 et qui ne correspond pas non plus à une contamination de ces contrôles mais bel et bien à un bruit de fond. Pour les contrôles négatifs, ces courbes ne sont d'ailleurs pas considérées comme une amplification d'ADN, il en va donc de même pour ces courbes « parasites » obtenues pour ces deux réactifs. Cette hypothèse est confirmée par les gels d'électrophorèse effectués après real-time PCR, qui ne montrent aucune bande correspondant au produit PCR. Si ces courbes ne sont pas à prendre en considération, il est tout de même à noter qu'elles coupent le seuil (et donc qu'elles donnent une valeur Ct). Ceci indique donc que le seuil a certainement été fixé trop bas. Comme cité plus haut, ces deux réactifs sont à base d'acide phosphorique. Il est connu que les pH acides hydrolyse l'ADN ce qui explique la grande efficacité de ces réactifs.

Ces deux réactifs sont cependant très corrosifs. En effet, les tests de corrosion par spots montrent qu'ils attaquent fortement l'acier, l'aluminium, le cuivre, le laiton et cela déjà au bout d'une minute de temps de contact. Ils ne peuvent donc en aucun cas être utilisés pour décontaminer des surfaces ou appareils constitués de telles matières. De plus, ces réactifs sont également corrosifs vis-à-vis de l'acier inoxydable. Certes la réaction est plus nuancée mais on voit tout de même une corrosion et cela déjà au bout de 5 min de temps de contact. Pour plus d'information, des tests qui donnent une information quantitative ont été effectués. En effet, des barrettes d'acier inoxydable (préalablement pesées) ont été trempées dans ces réactifs pendant une semaine puis rincées, séchées et pesées. Le pourcentage de dégradation obtenu est infime et donc ces deux réactifs peuvent être utilisés pour décontaminer des surfaces ou équipements en acier inoxydable, tout dépend si ceux-ci ne sont pas trop délicats. Par exemple, la surface de travail sous le flux laminaire de biologie moléculaire (en acier inoxydable), qui est somme toute relativement robuste, peut être décontaminée avec ces deux réactifs. Il est de toute façon évident que ces réactifs ne sont pas mis en contact avec les surfaces pendant une semaine pour les décontaminer. En effet, ces réactifs sont utilisés en sprayant la surface à décontaminer, celle-ci étant ensuite frottée puis correctement rincer avec de l'eau (exempte d'ADN). Les tests de corrosion par immersion effectués pour ces deux réactifs sur les barrettes en plastique ne montrent aucun changement de l'aspect de celles-ci. Ceci n'est pas étonnant étant donné que ces réactifs (tous en fait) sont fournis dans des bouteilles en plastique. Il apparaît donc logique que ces réactifs peuvent être utilisés pour décontaminer les plastiques, du moins le PVC, le PTFE, l'Ertalon (polyamide) ainsi que le polypropylène. En ce qui concerne ce dernier plastique, des tests de corrosion sur des Eppendorf (en polypropylène) ont été effectués, cela en trempant lesdits Eppendorf

(préalablement pesés) dans les réactifs pendant 21h puis en les rinçant, les séchant et les pesant à nouveau. Les pourcentages de dégradation obtenus pour ces deux réactifs sont négligeables. Ceci démontre que les Eppendorf peuvent être décontaminés par immersion dans ces deux réactifs.

Le réactif DNA ExitusPlus est également très efficace, du moins c'est ce que montre les tests d'efficacité effectués pour les conditions ADN/réactifs = 1/2 et ADN/réactifs = 1/0.6 (c'est-à-dire respectivement avec des spots de 10 μ l et 30 μ l d'ADN). Pour ces conditions, aucune courbe d'amplification n'a été détectée. Ceci indique que ce réactif dégrade totalement l'ADN cible dans ces conditions. Ceci est confirmé par les gels d'électrophorèse. Cependant, les tests d'efficacité pour les conditions ADN/réactifs = 1/4 (c'est-à-dire avec des spots de 5 μ l) montrent que le réactif est moins efficace avec une quantité d'ADN cible plus faible ce qui n'est pas logique. En effet, le Δ Ct moyen obtenu est de 5.9 ce qui indique une faible efficacité (bien que le pourcentage d'ADN dégradé soit tout de même de presque 76 %). Ces tests ont été refaits et le Δ Ct moyen obtenu est cette fois de 7.5 ce qui confirme les précédents résultats. Les gels d'électrophorèse effectués pour ces tests montrent qu'il ne s'agit pas d'un problème de courbe parasite mais bel et bien d'une amplification d'ADN. Le réactif ne dégrade donc pas efficacement l'ADN dans ces conditions. Il est difficile d'expliquer pourquoi ne connaissant pas la composition (ni le principe actif) de ce réactif. Ce réactif est de nature acide mais aucune précision supplémentaire n'est fournie par le fabricant. Il est à noter que la température ambiante était plus élevée (que lors des tests avec 10 μ l d'ADN) lorsque les tests avec 5 μ l d'ADN ont été effectués. La température ambiante ne peut cependant pas être responsable des résultats obtenus pour les tests avec 5 μ l d'ADN car celle-ci était également très élevée lors des tests avec 30 μ l d'ADN (effectués après). De plus, le fabricant assure que l'efficacité de DNA ExitusPlus augmente avec la température [10]. D'autres tests devront donc être réalisés pour confirmer ou infirmer ce résultat. En ce qui concerne les tests de corrosion, DNA ExitusPlus agit de manière semblable aux réactifs LookOut DNA Erase et DNA Remover. Il est en effet très corrosif sur l'acier, l'aluminium, le cuivre, le laiton et cela déjà au bout d'une minute de temps de contact. Ceci contredit donc les résultats présentés par la littérature [18] (article réalisé par des chercheurs travaillant pour AppliChem, le fabricant) qui montre que le réactif n'attaque pas l'aluminium et le cuivre au bout de 20 min de temps de contact. Ceci prouve qu'il faut toujours rester méfiant quant aux résultats décrits dans la littérature. Ce réactif ne peut donc pas être utilisé pour décontaminer des surfaces composées de telles matières. DNA ExitusPlus est peu corrosif sur l'acier inoxydable. On voit tout de même une légère réaction après 10 min de contact. Les tests quantitatifs de corrosion (par immersion) sur l'acier inoxydable et sur les Eppendorf montrent que ce réactif peut être utilisé pour décontaminer ces matières. Quant aux tests de corrosion (par immersion) des barrettes de plastique, l'aspect de celle-ci après une semaine d'immersion n'a pas changé. Ce réactif peut donc également être utilisé pour décontaminer ces différents plastiques.

Le réactif DNA Zap est le réactif testé qui est le moins efficace. Les Δ Ct moyen obtenu pour les conditions ADN/réactifs = 1/2, ADN/réactifs = 1/2 bis, ADN/réactifs = 1/4 et ADN/réactifs = 1/0.6 sont respectivement de 8.5, 8.3, 7.3 et 5.9. Ceci montre que le réactif ne dégrade pas efficacement l'ADN, qu'importe la quantité initiale. Ceci est confirmé par les gels d'électrophorèse sur lesquels on voit la bande du produit PCR. Le Δ Ct moyen pour la condition 1/4 est cependant plus faible que pour les conditions 1/2 et 1/2 bis ce qui indique théoriquement que le réactif est moins efficace avec une quantité d'ADN initiale plus faible ce qui n'est pas cohérent. Cependant, on regardant la barre d'erreur pour la condition 1/4, on voit que la répétabilité des tests dans cette condition est moins bonne. La valeur moyenne obtenue n'est donc peut-être pas la valeur vraie, qui peut elle être plus proche (voire légèrement supérieur) aux Δ Ct moyen obtenus pour les conditions 1/2 et 1/2 bis. Ceci indique donc que la quantité d'ADN résiduelle après traitement est probablement la même, qu'importe la quantité initiale d'ADN cible (5 μ l ou 10 μ l). Le Δ Ct moyen obtenu pour la condition 1/0.6 (spots de 30 μ l d'ADN) est également plus faible que pour les conditions 1/2 et 1/2 bis. En regardant les barres d'erreur pour ces conditions, on constate qu'elles peuvent également indiquer une valeur vraie qui soit identique. Ceci indique de la même manière que ci-dessus que l'efficacité du réactif DNA Zap peut être identique, quelles que soit la quantité initiale d'ADN à traiter. Il se peut cependant que ce réactif agisse moins efficacement lorsque la quantité initiale d'ADN est de 30 μ l que lorsque cette quantité est de 10 μ l ou 5 μ l. A noter tout de même que les pourcentages d'ADN dégradé pour les conditions ADN/réactifs = 1/2, ADN/réactifs = 1/2 bis, ADN/réactifs = 1/4 et ADN/réactifs = 1/0.6 sont respectivement de 98.1 %, 98.6 %, 95.8 % et 87.2 %. Ces pourcentages de dégradation sont relativement élevés étant donné que ce réactif est le moins efficace. Ceci est logique étant donné les faibles concentrations d'ADN obtenues après traitement avec un réactif.

Les tests de corrosion par spots pour DNA Zap montrent qu'il est moins corrosif que les autres réactifs acides. Certes il est également très corrosif sur l'acier, le cuivre, le laiton et cela déjà au bout d'une minute de contact. Il n'attaque cependant pas l'acier inoxydable ni l'aluminium et cela au bout de 20

min de contact. Les tests quantitatifs de corrosion par immersion montre les mêmes résultats que pour les réactifs précédents, à savoir qu'il peut être utilisé sur l'acier inoxydable et les plastiques (y compris les Eppendorf).

L'efficacité des réactifs DNA Away et DNA Decontamination reagent est sensiblement pareille pour les conditions ADN/réactif = 1/2 (spots 10 µl ADN), ADN/réactif = 1/2 bis (spots 10 µl ADN) et ADN/réactif = 1/0.6 (spots 30 µl ADN). Certes les ΔC_t moyen obtenus sont légèrement plus élevés pour DNA Decontamination reagent mais on constate que la répétabilité des tests n'est pas excellente. En effet les barres d'erreur se chevauchent ce qui indique que dans ces conditions, l'efficacité de ces réactifs peut être semblable. Quoiqu'il en soit, ces réactifs sont assez efficaces dans ces conditions car les ΔC_t moyen obtenus sont relativement importants. Ceci est confirmé en voyant les pourcentages de dégradation de l'ADN qui sont dans ces conditions de plus de 99.99 %. En ce qui concerne les tests de ces deux réactifs dans les conditions ADN/réactif = 1/4 (spots 5 µl ADN), on constate qu'ils dégradent totalement l'ADN cible. Il est vrai que des courbes de fluorescence ont été obtenues pour ces réactifs dans ces conditions mais qu'elles ne correspondaient pas à des courbes d'amplification. Le gel d'électrophorèse confirme ceci car aucune bande du produit PCR n'est visible, juste des bandes correspondant aux dimères d'amorces (qui sont peut-être responsables des courbes parasites bien que théoriquement pas possible lors de l'utilisation d'une sonde). DNA Away et DNA Decontamination reagent sont des réactifs basiques, le premier étant à base d'hydroxyde alcalin et le deuxième étant une solution alcaline, probablement également à base d'hydroxyde alcalin même si cela ne peut pas être confirmé. En effet cette hypothèse est renforcée par le fait que ces deux réactifs possèdent une efficacité ainsi qu'une corrosivité semblable. De plus, le pH mesuré (12.6) est identique pour les deux réactifs. Les pH basiques sont connus pour dénaturer l'ADN mais l'hydroxyde n'est probablement pas le seul composant de ces réactifs. En ne sachant pas de quoi il s'agit il est difficile d'expliquer pourquoi ceux-ci sont efficaces.

Les tests de corrosion par spots montrent que ces réactifs sont moins corrosifs que les réactifs acides. En effet, DNA Decontamination reagent n'attaque pas l'acier inoxydable (même au bout de 20 min), ni le cuivre et le laiton (même au bout de 10 min). Au bout de 10 min de temps de contact, une légère réaction est cependant visible sur l'aluminium. C'est également le cas au bout de 20 min de contact avec le cuivre et le laiton. La corrosion observée est néanmoins beaucoup moins importante que pour les réactifs acides (qui attaque l'aluminium, le cuivre et le laiton de manière violente et cela déjà au bout d'une minute). Ce réactif ne peut cependant pas être utilisé pour décontaminer l'acier car on constate déjà que l'acier rouille au bout de 5 min de contact. DNA Away n'attaque pas l'acier inoxydable ni l'aluminium (même au bout de 20 min). Au bout de 10 min de contact, il n'attaque pas non plus le cuivre ni le laiton. Tout comme pour DNA Decontamination reagent, on constate cependant qu'au bout de 20 min de contact, une légère corrosion est visible sur le cuivre et le laiton. DNA Away ne peut pas non plus être utilisé sur l'acier car on constate déjà une réaction au bout de 10 min et que l'acier rouille au bout de 20 min de contact. Pour ces deux réactifs, les tests quantitatifs de corrosion par immersion montre les mêmes résultats que pour les réactifs précédents, à savoir qu'ils peuvent être utilisés sur l'acier inoxydable et les plastiques (y compris les Eppendorf).

Le réactif LTK 008 et la Javel 5 % sont très efficaces car ils ne donnent aucune courbe d'amplification, qu'importe la quantité initiale d'ADN. Ceci est confirmé par les gels d'électrophorèse qui ne montrent pas la présence de la bande du produit PCR. Ceci peut être expliqué par le fait que le LTK 008 est probablement une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) qui est le principe actif de l'eau de Javel. Cette hypothèse se base sur plusieurs constatations. En effet, ils agissent de la même manière en termes d'efficacité et de corrosivité. De plus, les pH mesurés sont proches, à savoir de 11.8 pour le LTK 008 et de 12.8 pour la Javel 5 %. À noter encore que l'odeur de ces deux réactifs est très proche sinon semblable. Certes ce ne sont pas des preuves mais quand même des indications. Une différence notable tout de même, c'est le prix. En effet tous les réactifs coûtent en moyenne plus de 100 CHF/500 ml alors que l'eau de Javel, achetée à la Migros, coûte 0.43 CHF/500 ml !

Ces deux réactifs sont de plus non corrosifs avec l'acier inoxydable et l'aluminium (même au bout de 20 min) et peu corrosif avec le cuivre et le laiton (légère réaction au bout de 10 min de contact). Ils sont cependant extrêmement corrosifs avec l'acier (qui rouille déjà au bout de 20 s). Ces deux réactifs ne peuvent donc pas non plus être utilisés sur l'acier. Pour ces deux réactifs, les tests quantitatifs de corrosion par immersion montre les mêmes résultats que pour les réactifs précédents, à savoir qu'ils peuvent être utilisés sur l'acier inoxydable et les plastiques (y compris les Eppendorf).

Pour les tests avec les dilutions de Javel 5 %, l'efficacité est garantie jusqu'à la dilution 10x. Au-delà, une erreur de manipulation étant certainement survenue, il n'est pas possible de savoir si les dilutions sont encore efficaces. À noter que ces tests ayant été effectués en duplicat, il serait nécessaire d'en

effectuer d'autres afin de préciser ces résultats. Les tests de corrosion par spots pour ces différentes dilutions montrent qu'elles réagissent de la même manière que la Javel 5 % non diluée.

6. Conclusion et perspectives

DNA Zap, bien que moins corrosif que les autres réactifs acides, ne sera pas choisi car de tous les réactifs il est le moins efficace. De plus, les réactifs basiques sont encore moins corrosifs et bien plus efficaces. À noter encore que de tous les réactifs, il est le seul qui n'est pas près à l'emploi (il consiste en deux solutions) et qu'il est de loin le plus cher de tous (209 CHF/500 ml). Les réactifs LookOut DNA Erase et DNA Remover ne seront pas non plus retenus car bien qu'étant très efficaces, ils sont également très corrosifs. DNA ExitusPlus ne sera pas non plus sélectionné pour les mêmes raisons que LookOut DNA Erase et DNA Remover. Il a en effet démontré son efficacité pour les tests avec 10 µl et 30 µl d'ADN cible. Cependant, il est également très corrosif et de plus les tests avec 5 µl d'ADN cible ont montré qu'il n'était pas efficace dans ces conditions ce qui n'est pas logique. Il serait tout de même intéressant de refaire ces derniers tests afin de vérifier ou infirmer cette constatation. Les réactifs acides ne sont donc pas de bons candidats pour prétendre au trône de meilleur réactif de décontamination. Les réactifs basiques seront donc préférés.

En ce qui concerne les réactifs basiques, ils peuvent être classifiés en deux groupes. D'un côté le DNA Away et le DNA Decontamination reagent qui sont des réactifs à base d'hydroxyde alcalin (hypothèse pour DNA Decontamination reagent). Ils sont relativement efficaces car ils dégradent totalement l'ADN cible pour les tests avec 5 µl. Cependant, ils ne dégradent pas totalement l'ADN cible dans certaines conditions (tests avec 10 µl et 30 µl d'ADN). Le pourcentage de dégradation de l'ADN étant tout de même de plus de 99.99 % dans ces conditions.

Le réactif LTK 008 et la Javel 5 % forment le deuxième groupe. Le LTK 008 est probablement une solution d'hypochlorite de sodium (hypothèse) qui est le principe actif de l'eau de Javel. En effet, le LTK 008 agit de la même manière que la Javel en termes d'efficacité et de corrosivité. Le pH mesuré ainsi que l'odeur sont de plus très semblable. Il serait intéressant d'effectuer une titration sur le LTK 008 pour déterminer la concentration en hypochlorite de sodium. En effet, l'hypochlorite de sodium peut être titré par le thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Le LTK 008 et la Javel sont très efficace car ils dégradent totalement l'ADN cible dans toutes les conditions testées. Ils sont cependant très légèrement plus corrosifs que le DNA Away et le DNA Decontamination reagent. Le LTK 008 et la Javel 5 % attaquent légèrement le cuivre et le laiton au bout de 10 min de contact, ce qui est également le cas pour DNA Away et DNA Decontamination reagent mais au bout de 20 min de contact. Cette différence de corrosivité est donc moindre en comparaison de leurs différences d'efficacité.

Le LTK 008 et la Javel 5 % sont donc les réactifs qui seront préférés. Comme ces deux réactifs agissent de manière identique aux tests d'efficacité et de corrosion, un autre critère doit donc être pris en compte. Ce critère est évidemment le prix. En effet, le LTK 008 coûte 90 CHF/500 ml alors que l'eau de Javel (achetée à la Migros) coûte 0.43 CHF/500 ml ce qui est presque 210 fois moins. L'eau de Javel 5 % peut sans problème être utilisée pour décontaminer les surfaces et équipements en acier inoxydable, en aluminium et en plastique (PVC, PTFE, Ertalon et polypropylène). L'eau de Javel 5 % étant légèrement corrosif avec le cuivre et le laiton, il est préférable d'éviter de décontaminer les surfaces et équipements composés de ces matières. Elle ne doit en aucun cas être appliquée sur l'acier car celui-ci rouille en moins de 20 secondes. À noter qu'aucun réactif ne peut être appliqué sur cette matière. Ceci n'est pas très grave étant donné que la grande majorité des surfaces et équipements sont en acier inoxydable et non en acier.

L'eau de Javel 5 % a été sélectionnée comme étant le meilleur réactif mais ceci sur la base des tests qui ont été effectués au cours de ce travail de diplôme. Il serait néanmoins intéressant de compléter ces tests. Les prélèvements des tests d'efficacité pourraient être refaits sur d'autres surfaces que le PVC, comme le verre par exemple, ceci afin de vérifier que la surface n'influence pas la méthode de prélèvement des échantillons (ce qui est une hypothèse). D'autres écouvillons (swabs) pourraient également être utilisés pour voir si cela a une influence sur la méthode de prélèvement des échantillons ce qui est probable. Le temps d'incubation des réactifs avec l'ADN devrait également être varié car ici seul un temps de 10 min a été testé. Ce temps d'incubation a évidemment un impact sur l'efficacité des réactifs. Il serait intéressant de compléter les tests de corrosion, par exemple en effectuant ceux-ci sur de nouvelles matières. Et finalement, il serait assurément très important de tester les réactifs DNA OFF et DNA Ex, qui n'ont pas pu être commandés pour le présent travail. Peut-être que ces réactifs sont autant efficaces que l'eau de Javel mais qu'ils sont encore moins corrosifs ce qui ferait d'eux de meilleurs réactifs.

7. Bibliographie

- [1] Sournia Jean-Charles, Histoire du diagnostic en médecine, Editions de la Santé, 1995.
- [2] Bassignot Agnès, Cours sur le diagnostic des infections virales, DCEM1, 2003.
- [3] Aslanzadeh Jaber, Preventing PCR amplification Carryover Contamination in a Clinical Laboratory, Annals of Clinical and Laboratory Science 34, no 4, 2004.
- [4] Rys et al, Preventing False Positives : Quantitative Evaluation of Three Protocols for Inactivation of Polymerase Chain Reaction Amplification Products, Journal of Clinical Microbiology 31, pages 2356-2360, 1993.
- [5] Phipps et al, The tendency of individuals to transfer DNA to handled items, Forensic Science International 168, pages 162-168, 2007.
- [6] Poitras et al., La PCR en temps réel : principes et applications, Review in Biology and Biotechnology 2, no 2, pages 2-11, 2002.
- [7] Site internet du Fournisseur (Medical Wire and Equipment): www.mwe.co.uk
Consulté le 05.04.2010
- [8] Product information de Sigma-Aldrich.
- [9] Safety Data Sheet de Minerva Biolabs.
- [10] Product information de AppliChem GmbH.
- [11] Product information de Ambion.
- [12] Safety Data Sheet de Molecular Bioproduct
- [13] Product information de Sigma-Aldrich.
- [14] Product information de Biodelta GmbH.
- [15] Instructions for use of products Part# TB374 kit PureYield™ Plasmid Miniprep System, de Promega, USA.
- [16] Moore et al., Purification and Concentration of DNA from Aqueous Solutions, Current Protocols in Molecular Biology, 2.1.1-2.1.10, 2002.
- [17] Real-time PCR: from theory to practice, pages 60-62, de Invitrogen, USA.
- [18] Esser et al., DNA Decontamination : Novel DNA-ExitusPlus in comparison with conventional reagents, Biotechniques 40, no 2, pages 238-239, 2006.

Annexe 1 : Real-time PCR 1

Experiment Information

Run Name	test real time 2010-05-25 (1)
Run Start	5/25/2010 4:33:25 PM
Run Finish	5/25/2010 6:58:48 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.0161
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	Yes
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.438 \cdot \text{CT} + 4.113)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -2.285 \cdot \log(\text{conc}) + 9.398$
Reaction efficiency (*)	1.7391 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
Start normalising from cycle	3
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

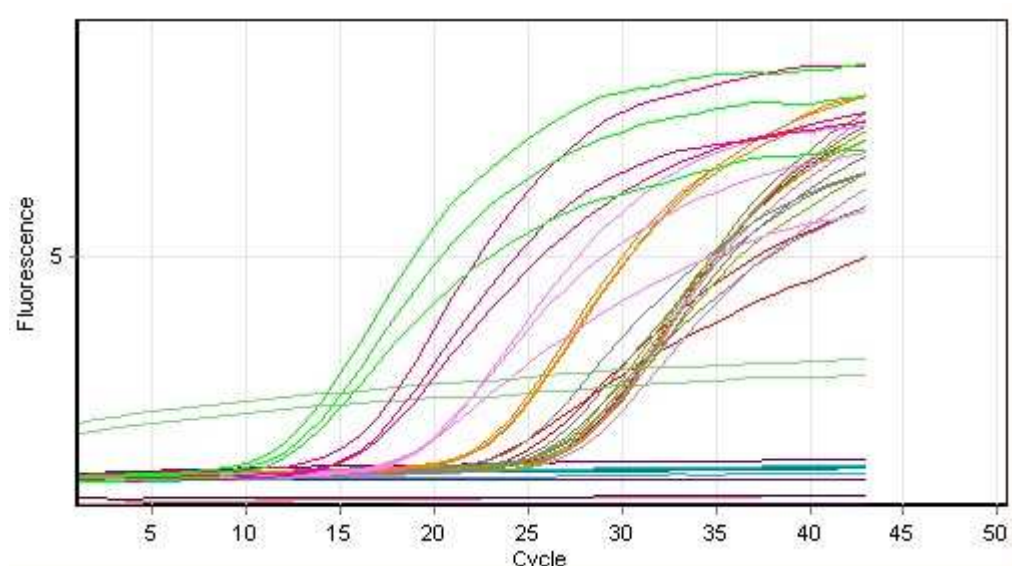
Messages

Message
Operator skipped end of cycle for Cycling @ Repeat 44

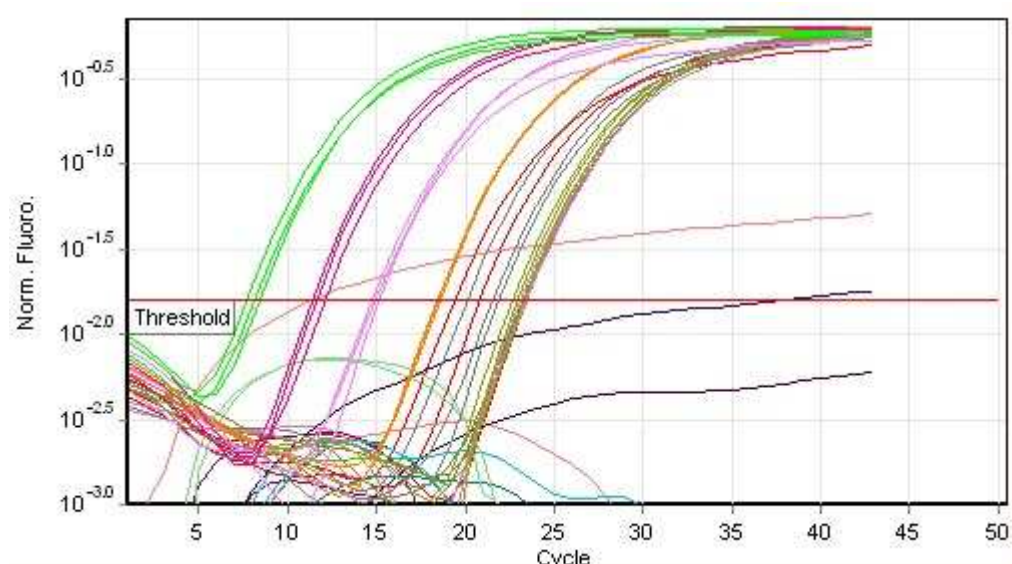
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 15 min 0 se cs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

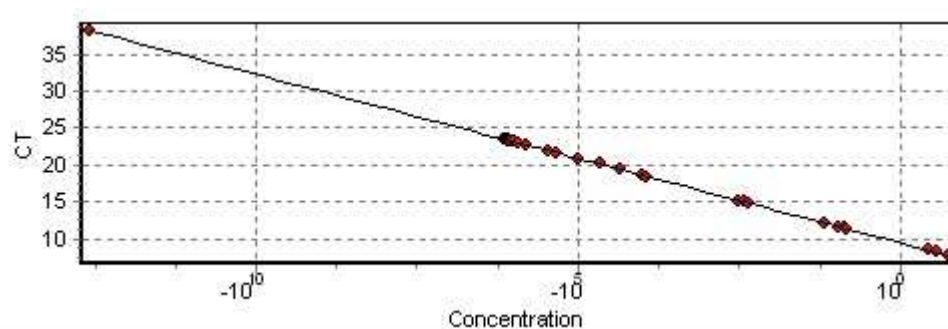
Raw Data For Cycling A.Yellow







































Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour Name		Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
■	NTC	23.46		.000000705210	21.22	2.07
■	NTC	20.84		.000009849053		
■	NTC	19.37		.000043325738		

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	ExitusPlus					
	ExitusPlus					
	Decontamination reagent					
	Decontamination reagent					
	LookOut DNA Erase	11.44		.127946966717	11.44	
	LookOut DNA Erase					
	LTK	38.16		.000000000000	38.16	
	LTK					
	DNA Away					
	DNA Away					
	DNA Zap					
	DNA Zap					
	-10	23.27	.000000053375	.000000846615	23.38	0.10
	-10	23.41	.000000053375	.000000735441		
	-10	23.46	.000000053375	.000000699315		
	-9	23.14	.000000533750	.000000973336	23.32	0.17
	-9	23.35	.000000533750	.000000781971		
	-9	23.47	.000000533750	.000000693021		
	-8	22.98	.000005337500	.000001133572	23.01	0.31
	-8	23.33	.000005337500	.000000802951		
	-8	22.71	.000005337500	.000001490595		
	-7	20.09	.000053375000	.000020898654	21.20	0.97
	-7	21.91	.000053375000	.000003332729		
	-7	21.60	.000053375000	.000004582069		
	-6	18.41	.000533750000	.000113840988	18.47	0.08
	-6	18.44	.000533750000	.000110366450		
	-6	18.55	.000533750000	.000098382314		
	-5	14.79	.005337500000	.004356688446	14.98	0.20
	-5	15.18	.005337500000	.002942003019		
	-5	14.97	.005337500000	.003654889051		
	-4	12.09	.053375000000	.066260055706	11.69	0.37
	-4	11.36	.053375000000	.137988407935		
	-4	11.61	.053375000000	.108101727609		
	-3	7.73	.533750000000	5.387588186549	8.10	0.36
	-3	8.14	.533750000000	3.554551530566		
	-3	8.44	.533750000000	2.622364321222		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)

Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.

ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 2 : Real-time PCR 2

Experiment Information

Run Name	test 2 real time 26.05
Run Start	5/26/2010 2:25:34 PM
Run Finish	5/26/2010 4:48:18 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.02552
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.460 \cdot \text{CT} + 3.620)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -2.172 \cdot \log(\text{conc}) + 7.864$
Reaction efficiency (*)	$1.88629 \text{ (*} = 10^{(-1/m)} - 1)$
M	-2.17231
B	7.86442
R Value	0.97802
R ² Value	0.95652
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Messages

Message

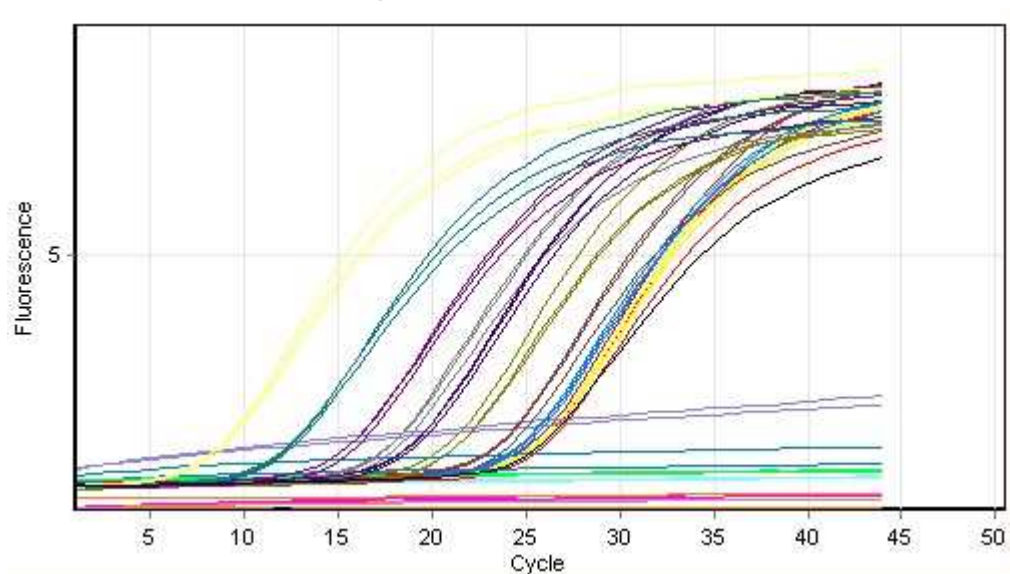
Operator skipped end of cycle for Cycling @ Repeat 45

Profile

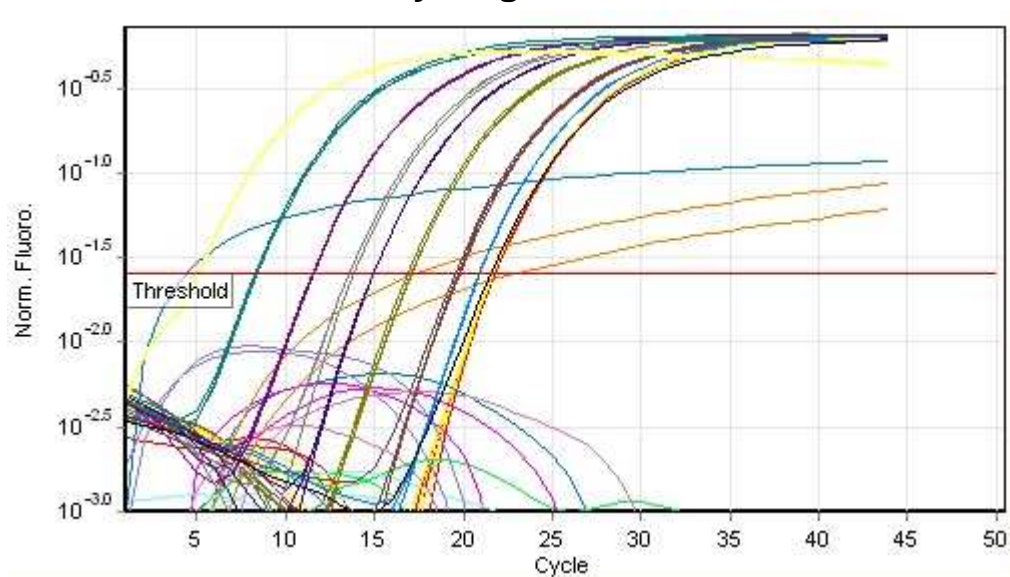
Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	

Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

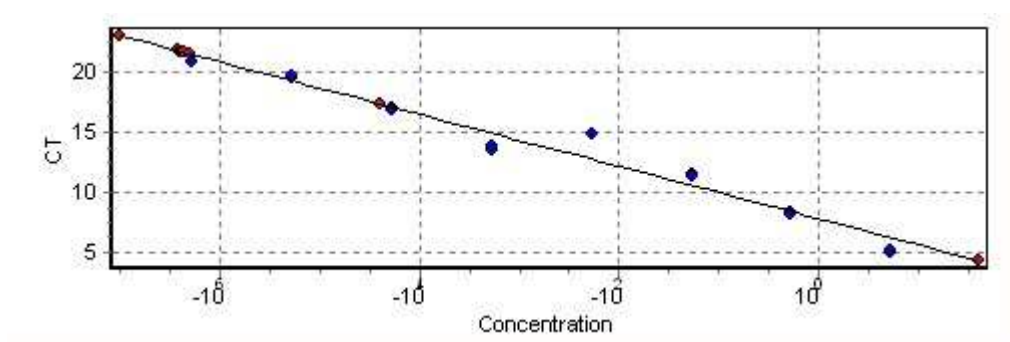
Raw Data For Cycling A.Yellow












Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	NTC (nuclease free water)	21.67		.00000044162	21.75	0.08
	NTC (nuclease free water)	21.76		.00000040148		
	NTC (nuclease free water)	21.82		.00000037529		
	NTC (eau pcr steph)	21.68		.00000043886	21.69	0.03
	NTC (eau pcr steph)	21.72		.00000041859		
	NTC (eau pcr steph)	21.67		.00000043947		
	ExitusPlus					
	ExitusPlus	4.38		40.16483607465		
	Decontamination reagent					
	Decontamination reagent					
	LookOut DNA Erase					
	LookOut DNA Erase					
	LTK	17.40		.00004086387	20.24	4.01
	LTK	23.07		.00000009984		
	DNA Away					
	DNA Away					
	DNA Zap					
	DNA Zap					
	DNA Remover					
	DNA Remover					
	-9	20.93	.00000053375	.00000096772	20.91	0.03
	-9	20.88	.00000053375	.00000101812		
	-9	20.92	.00000053375	.00000097380		
	-8	19.75	.000000533750	.00000338162	19.64	0.12
	-8	19.51	.000000533750	.00000435579		
	-8	19.66	.000000533750	.00000371967		
	-7	17.07	.00005337500	.00005757660	16.99	0.12
	-7	17.04	.00005337500	.00005990491		
	-7	16.86	.00005337500	.00007263199		
	-6	13.60	.00053375000	.00228534905	13.68	0.16
	-6	13.58	.00053375000	.00234003286		
	-6	13.87	.00053375000	.00172555065		
	-5	14.95	.00533750000	.00054619888	14.95	0.01
	-5	14.96	.00533750000	.00054053047		
	-5	14.94	.00533750000	.00055115957		
	-4	11.53	.05337500000	.02053515825	11.51	0.03

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	-4	11.53	.05337500000	.02063537405		
	-4	11.47	.05337500000	.02187680244		
	-3	8.41	.53375000000	.56340465166	8.32	0.07
	-3	8.29	.53375000000	.63942853053		
	-3	8.28	.53375000000	.64613406014		
	-2	5.03	5.33750000000	20.25988647819	5.09	0.07
	-2	5.10	5.33750000000	18.78081639078		
	-2	5.16	5.33750000000	17.60453639568		
	NTC (eau pcr sara)	21.56		.00000049601	21.56	

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)
Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.
ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 3 : Real-time PCR 3

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-05-27 (1)
Run Start	5/27/2010 1:02:14 PM
Run Finish	5/27/2010 3:39:13 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.03588
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= 10 ^{^(1.394*CT + -27.875)}
Standard Curve (2)	CT = 0.717*log(conc) + 19.993
Reaction efficiency (*)	-0.95965 (* = 10 ^{^(-1/m) - 1})
M	0.71726
B	19.99335
R Value	0.15113
R^2 Value	0.02284
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled

Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

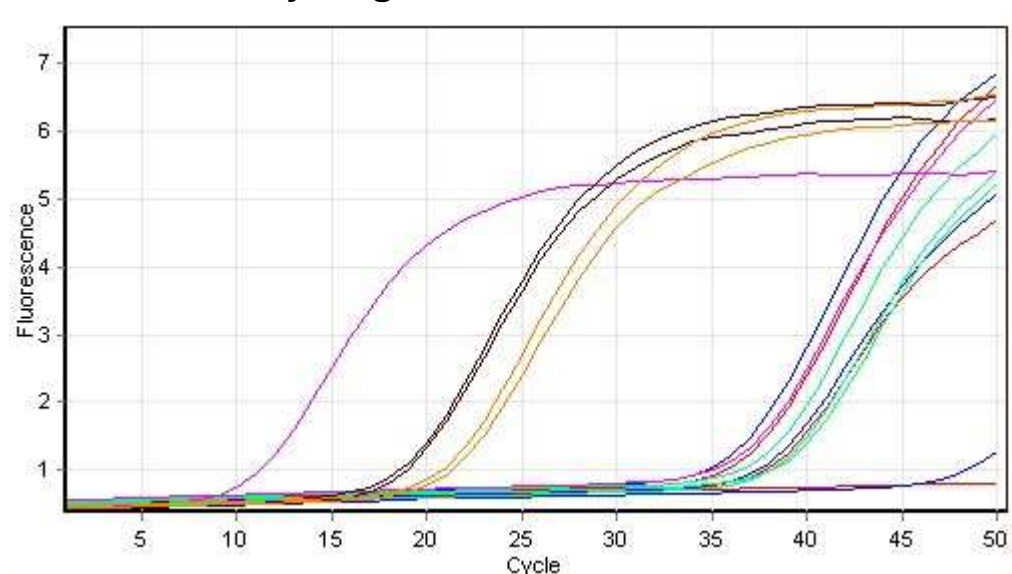
Messages

Message

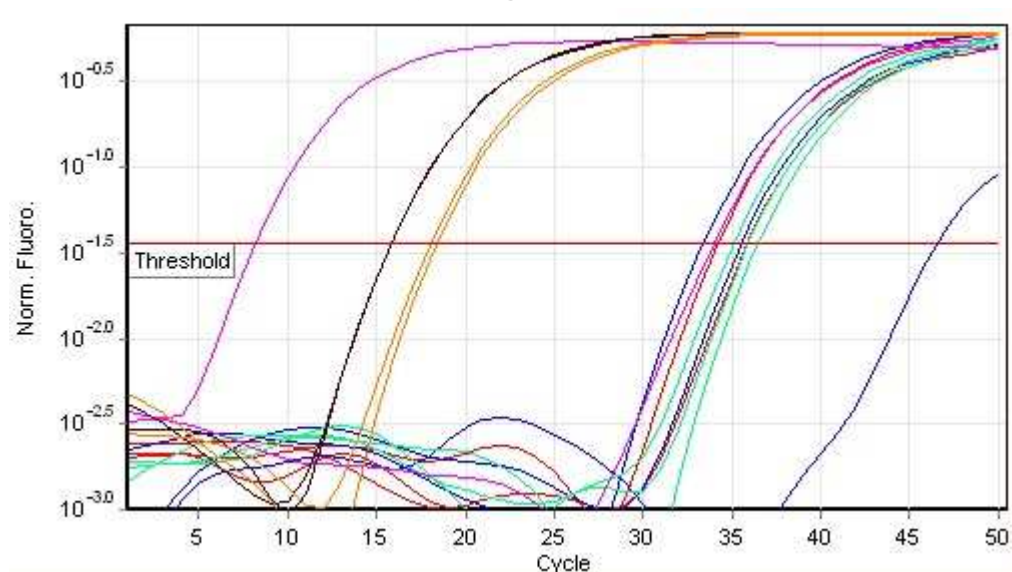
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

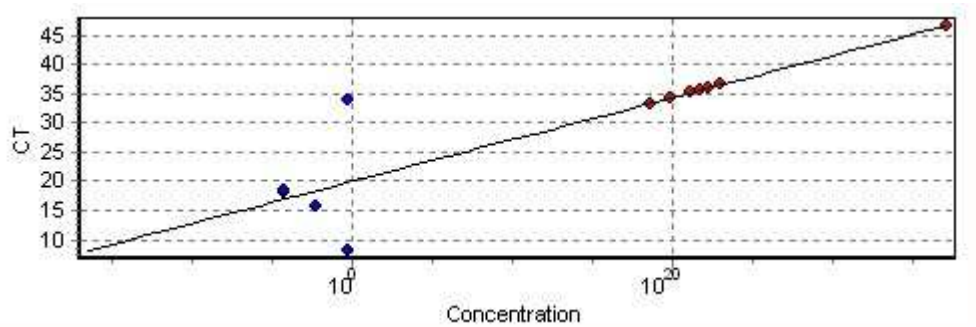
Raw Data For Cycling A.Yellow



Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Color	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
Red	NTC (eau sara)	35.88		14,098,332,779,462,300,000,000.00000000	35.03	1.20
Red	NTC (eau sara)	34.18		59,790,935,011,858,700,000.00000000		
Red	NTC (eau sara)					
Blue	NTC (eau steph)	46.57		11,340,544,619,494,800,000,000,000,000,000,000	38.49	7.08
Blue	NTC (eau steph)	33.36		4,317,107,923,506,920,000.00000000		
Blue	NTC (eau steph)	35.54		4,775,726,093,893,400,000,000.00000000		
Green	NTC (nuclease free water)	36.49		100,188,835,984,182,000,000,000.00000000	35.85	0.71
Green	NTC (nuclease free water)	35.96		18,009,178,495,209,800,000,000.00000000		
Green	NTC (nuclease free water)	35.09		1,117,839,450,457,060,000,000.00000000		
Magenta	-3	8.17	.533750000	.0000000000	21.07	18.24
Magenta	-3	33.97	.533750000	30,240,571,890,305,100,000.00000000		
Brown	-5	15.83	.005337500	.000001573	15.83	0.01
Brown	-5	15.82	.005337500	.000001516		
Orange	-7	18.04	.000053375	.001872830	18.20	0.23
Orange	-7	18.36	.000053375	.005256975		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)
 Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 4 : Real-time PCR 4

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-06-01 (1)
Run Start	6/1/2010 12:34:02 PM
Run Finish	6/1/2010 3:11:17 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.020
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.422 \cdot \text{CT} + 3.067)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -2.372 \cdot \log(\text{conc}) + 7.275$
Reaction efficiency (*)	1.63973 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
M	-2.37214
B	7.27472
R Value	0.9815
R ² Value	0.96335
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

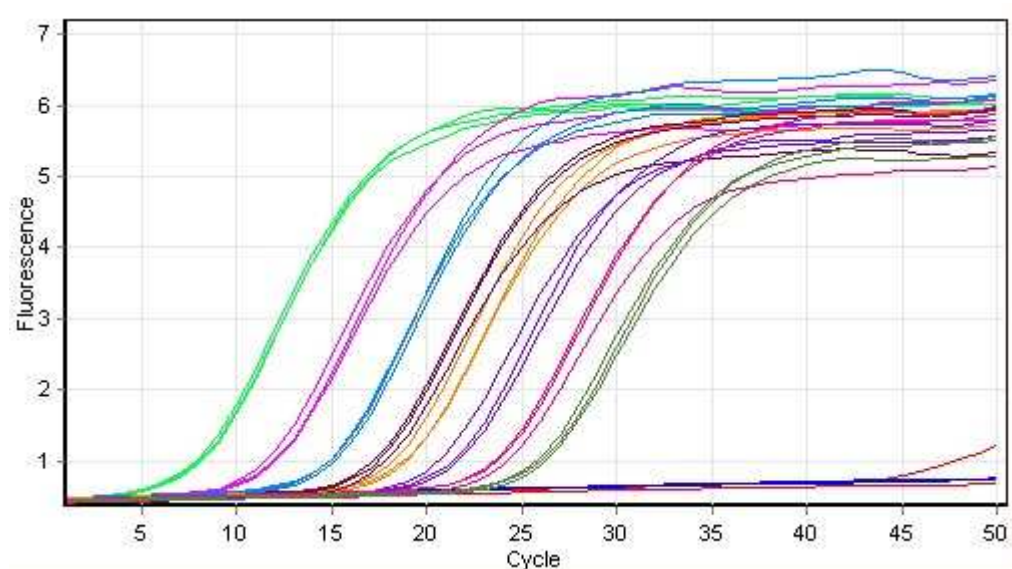
Messages

Message
Acquisition timed out, trying to resend at Cycling @ Repeat 47

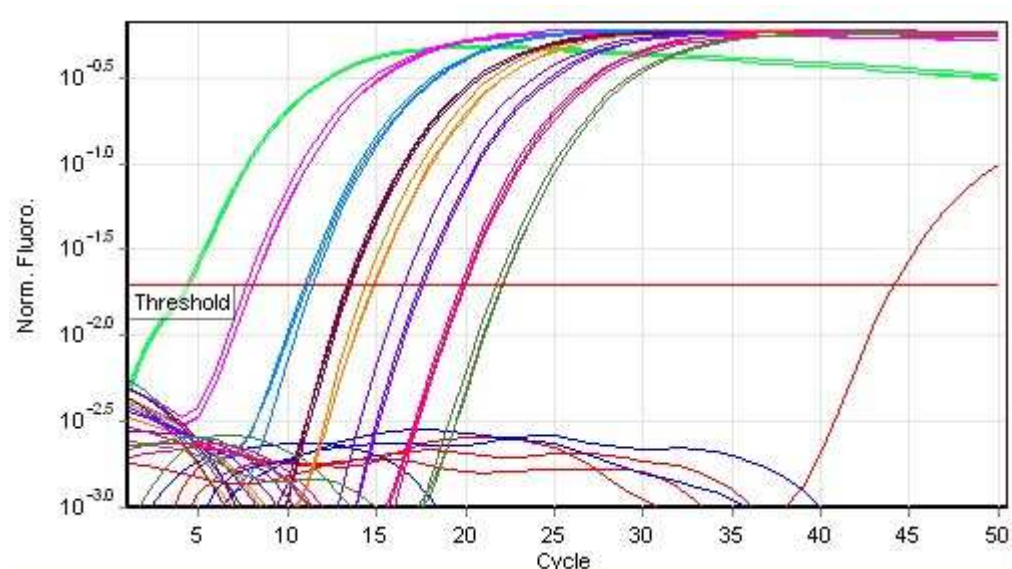
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

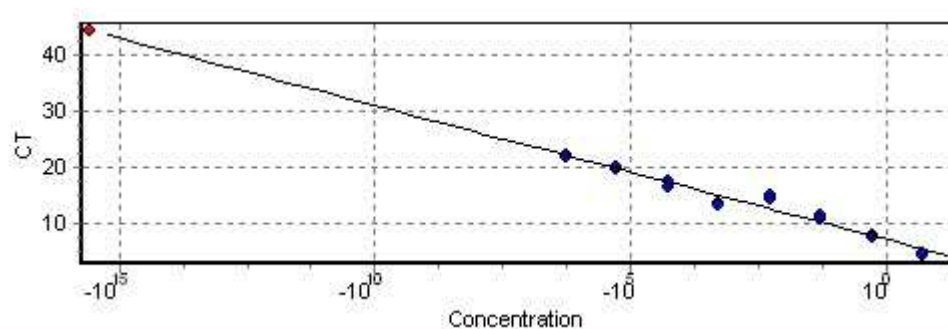
Raw Data For Cycling A.Yellow



Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
■	NTC (eau steph)						
■	NTC (eau steph)	44.24		2.62E-16			
■	NTC (eau steph)						
■	NTC (eau foc)						

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	NTC (eau foc)					
	NTC (eau foc)					
	-2	4.53	5.34E+00	1.44E+01	4.48	0.11
	-2	4.54	5.34E+00	1.42E+01		
	-2	4.35	5.34E+00	1.70E+01		
	-3	8.06	5.34E-01	4.65E-01	7.93	0.21
	-3	8.04	5.34E-01	4.75E-01		
	-3	7.69	5.34E-01	6.66E-01		
	-4	11.10	5.34E-02	2.43E-02	11.14	0.22
	-4	11.38	5.34E-02	1.87E-02		
	-4	10.94	5.34E-02	2.86E-02		
	-5	14.85	5.34E-03	6.43E-04	14.72	0.27
	-5	14.91	5.34E-03	6.03E-04		
	-5	14.42	5.34E-03	9.77E-04		
	-6	13.49	5.34E-04	2.41E-03	13.48	0.12
	-6	13.60	5.34E-04	2.15E-03		
	-6	13.36	5.34E-04	2.72E-03		
	-7	17.61	5.34E-05	4.41E-05	17.20	0.58
	-7	17.45	5.34E-05	5.15E-05		
	-7	16.53	5.34E-05	1.25E-04		
	-8	19.70	5.34E-06	5.79E-06	19.85	0.14
	-8	19.88	5.34E-06	4.86E-06		
	-8	19.98	5.34E-06	4.39E-06		
	-9	22.09	5.34E-07	5.68E-07	22.01	0.20
	-9	22.15	5.34E-07	5.35E-07		
	-9	21.78	5.34E-07	7.65E-07		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)

Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.

ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 5 : Real-time PCR 5

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-06-08 (1)
Run Start	6/8/2010 11:07:34 AM
Run Finish	6/8/2010 1:44:49 PM

Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.05956
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.291 \cdot \text{CT} + 1.423)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3.438 \cdot \log(\text{conc}) + 4.891$
Reaction efficiency (*)	0.95359 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
M	-3.43838
B	4.89132
R Value	0.9989
R^2 Value	0.9978
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

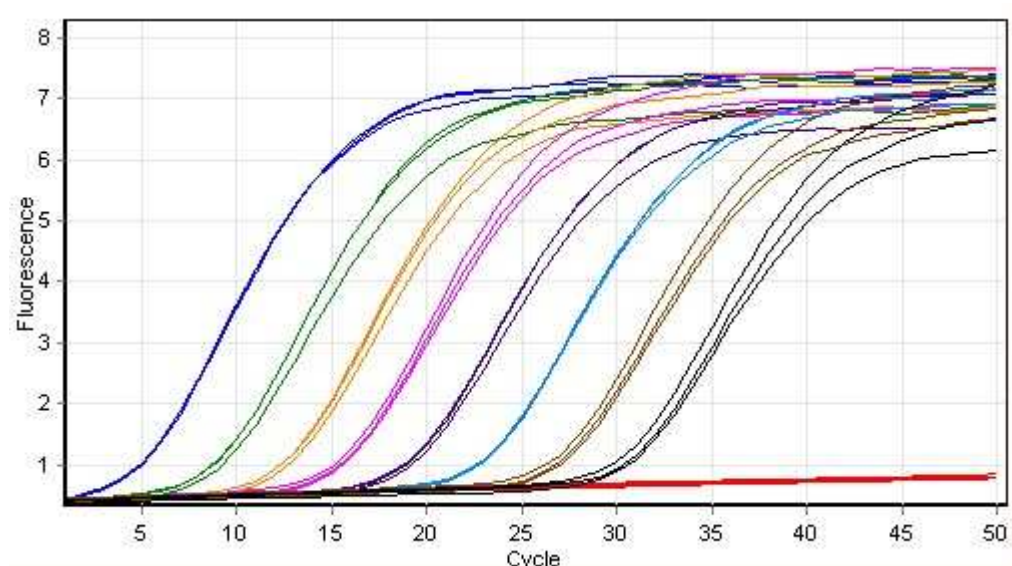
Messages

Message

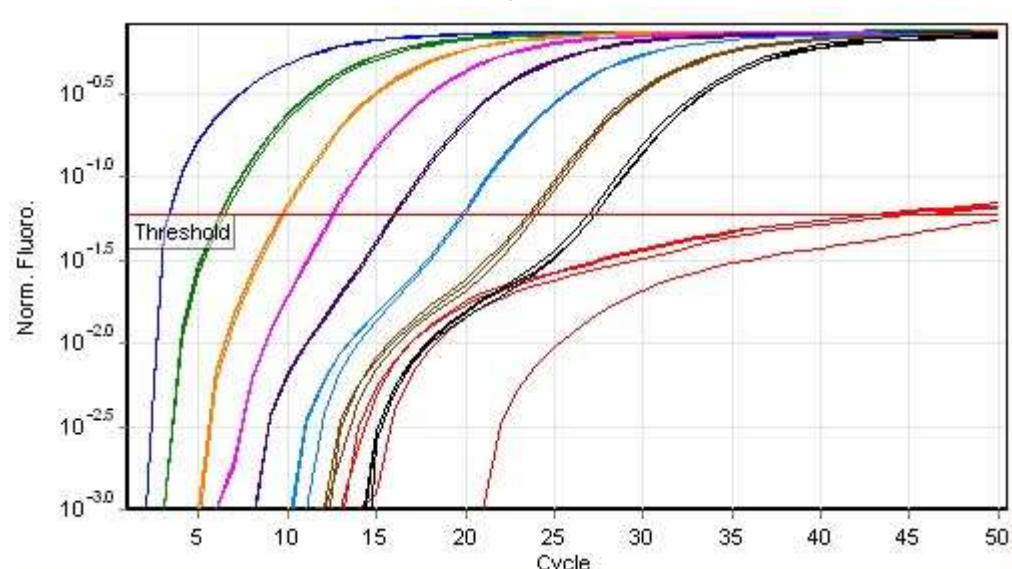
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

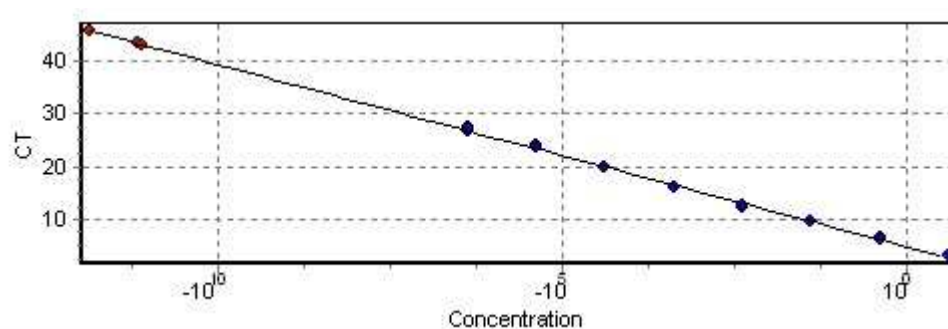
Raw Data For Cycling A.Yellow










Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
■	NTC (eau steph)						
■	NTC (eau steph)	45.73		1.33E-12			
■	NTC (eau steph)	43.31		6.69E-12			
■	NTC (eau steph)	43.17		7.37E-12			

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	-1	3.19	4.11E+00	3.12E+00	3.21	0.01
	-1	3.21	4.11E+00	3.08E+00		
	-1	3.22	4.11E+00	3.07E+00		
	-2	6.46	4.11E-01	3.51E-01	6.31	0.13
	-2	6.27	4.11E-01	3.98E-01		
	-2	6.21	4.11E-01	4.14E-01		
	-3	9.65	4.11E-02	4.14E-02	9.68	0.09
	-3	9.78	4.11E-02	3.78E-02		
	-3	9.62	4.11E-02	4.21E-02		
	-4	12.49	4.11E-03	6.19E-03	12.56	0.07
	-4	12.62	4.11E-03	5.67E-03		
	-4	12.58	4.11E-03	5.80E-03		
	-5	15.97	4.11E-04	5.98E-04	16.02	0.08
	-5	15.97	4.11E-04	6.00E-04		
	-5	16.11	4.11E-04	5.45E-04		
	-6	19.75	4.11E-05	4.77E-05	19.81	0.08
	-6	19.77	4.11E-05	4.69E-05		
	-6	19.91	4.11E-05	4.30E-05		
	-7	24.01	4.11E-06	2.75E-06	23.76	0.24
	-7	23.73	4.11E-06	3.32E-06		
	-7	23.53	4.11E-06	3.79E-06		
	-8	26.91	4.11E-07	3.95E-07	27.17	0.23
	-8	27.31	4.11E-07	3.01E-07		
	-8	27.30	4.11E-07	3.05E-07		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)

Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.

ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 6 : Real-time PCR 6

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-06-14 (1)
Run Start	6/14/2010 3:58:18 PM
Run Finish	6/14/2010 6:35:42 PM
Operator	Steph
Notes	

Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.05956
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	Yes
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.291 \cdot \text{CT} + 1.473)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3.438 \cdot \log(\text{conc}) + 5.064$
Reaction efficiency (*)	0.95359 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Messages

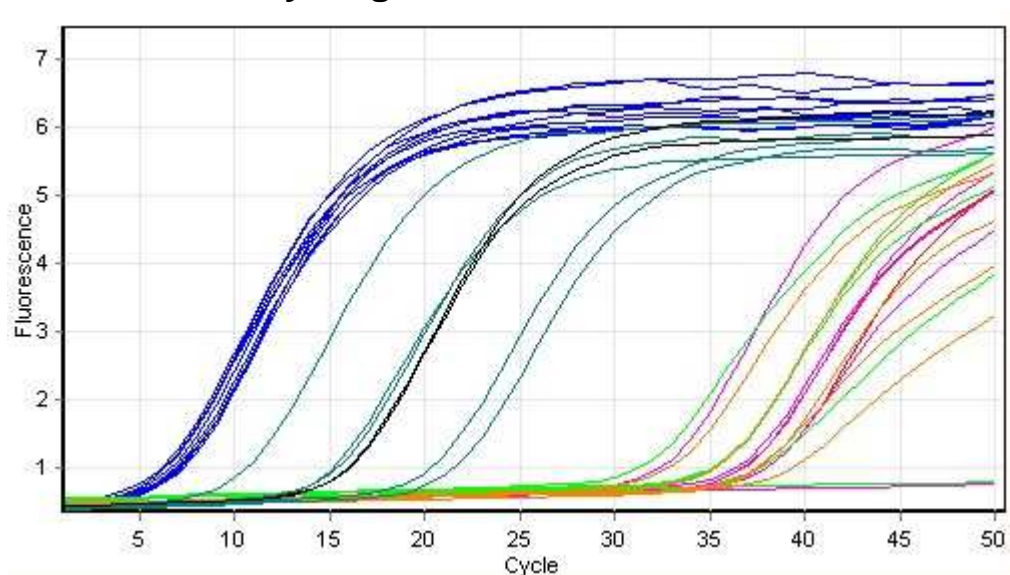
Message

Acquisition timed out, trying to resend at Cycling @ Repeat 47

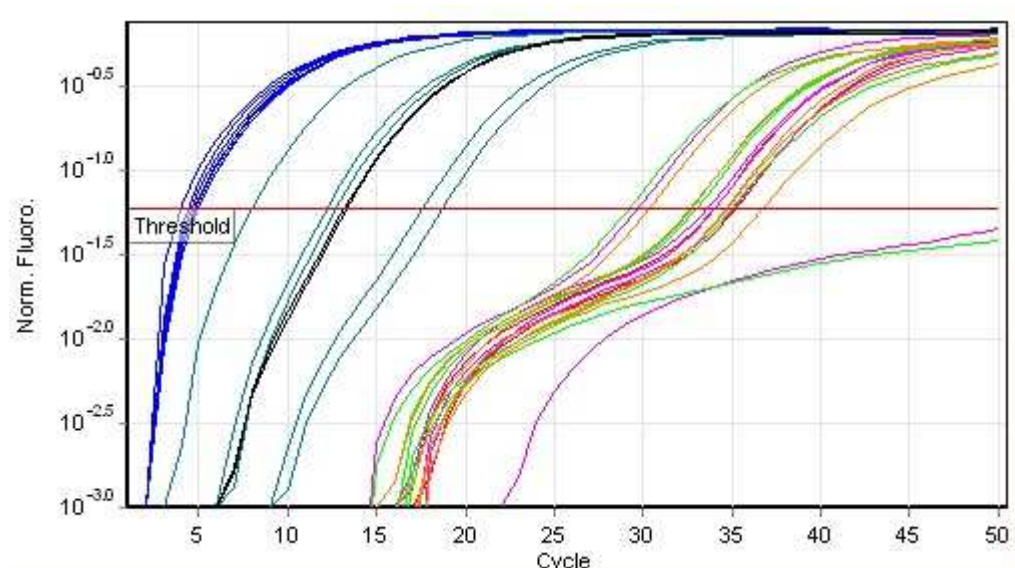
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

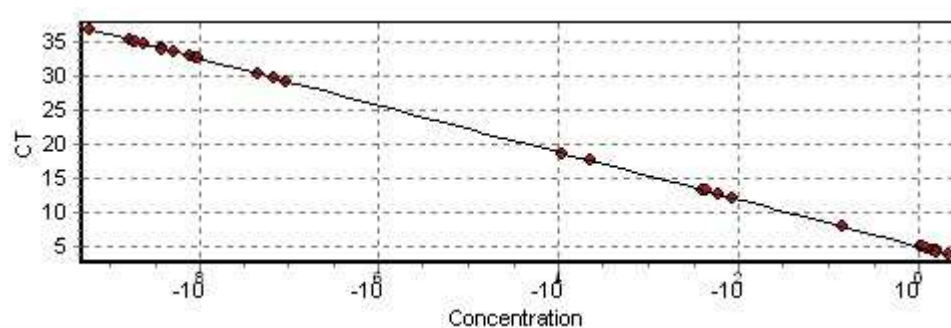
Raw Data For Cycling A.Yellow





















Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour	Name	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
■	NTC	35.20	34.59	0.87	
■	NTC	33.97			
■	Controle negatif	34.02	33.10	2.32	
■	Controle negatif				
■	Controle negatif	29.75			
■	Controle negatif	33.57			
■	Controle negatif	35.06			
■	Controle positif	4.76	4.56	0.33	
■	Controle positif	4.74			
■	Controle positif	4.34			
■	Controle positif	4.93			
■	Controle positif	4.77			
■	Controle positif	4.95			
■	Controle positif	4.55			
■	Controle positif	4.35			
■	Controle positif	3.91			

Colour	Name	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
	Controle positif	4.34			
	1;2 Away	32.96	32.47	2.38	
	1;2 Away	34.97			
	1;2 Away				
	1;2 Away	32.70			
	1;2 Away	29.25			
	1;1 Away	34.71	33.82	2.42	
	1;1 Away	36.76			
	1;1 Away	30.35			
	1;1 Away	32.65			
	1;1 Away	34.65			
	2;1 Away	18.65	13.82	4.34	
	2;1 Away	12.70			
	2;1 Away	17.58			
	2;1 Away	8.00			
	2;1 Away	12.15			
	-4	13.20	13.27	0.10	
	-4	13.34			

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)
 Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 7 : Real-time PCR 7

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-06-16 (1)
Run Start	6/16/2010 1:39:10 PM
Run Finish	6/16/2010 4:07:31 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.06027
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No

Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.279 \cdot \text{CT} + 1.498)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3.587 \cdot \log(\text{conc}) + 5.374$
Reaction efficiency (*)	0.90028 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
M	-3.58658
B	5.37417
R Value	0.9986
R^2 Value	0.99721
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Messages

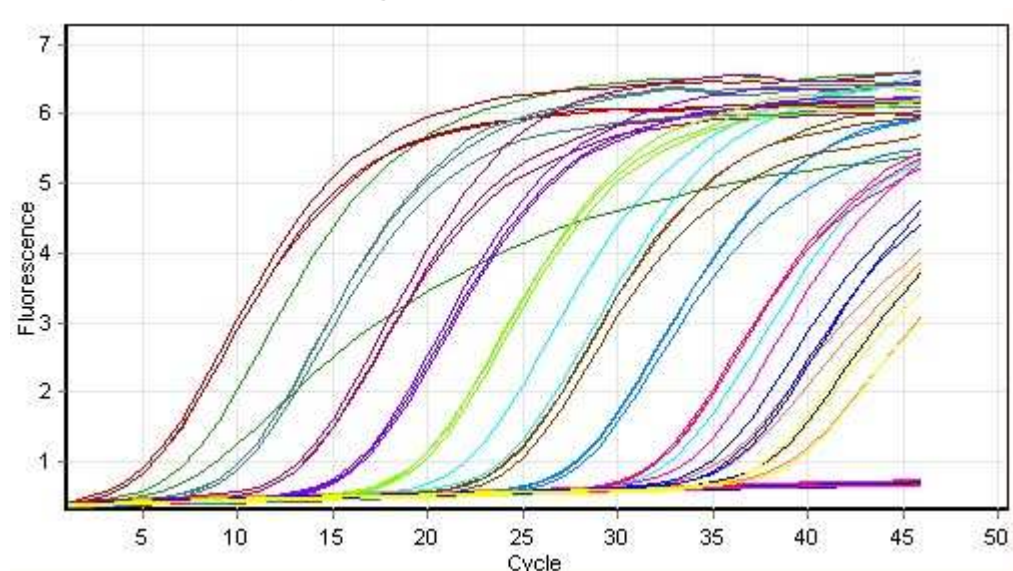
Message

Operator skipped end of cycle for Cycling @ Repeat 47

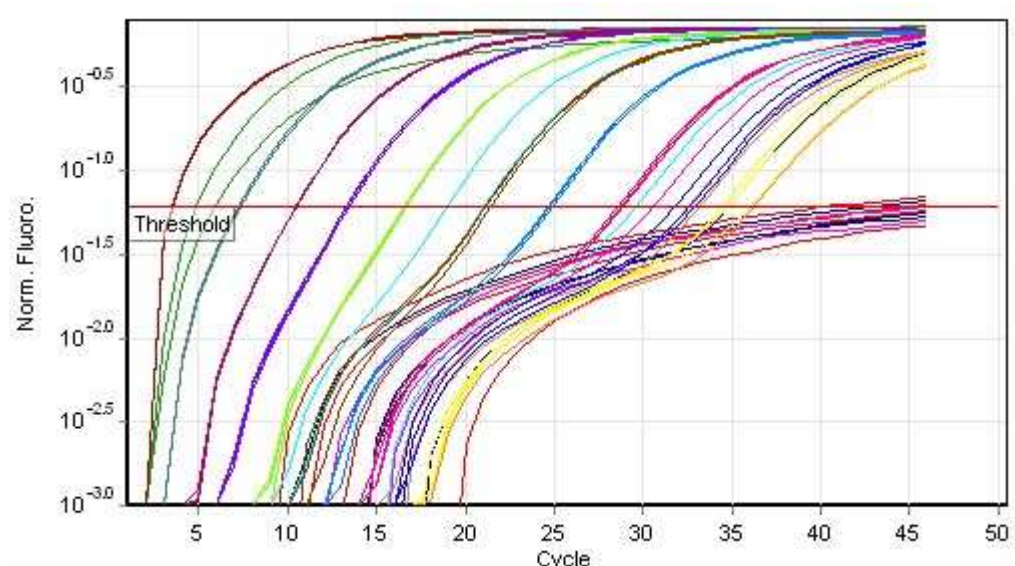
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

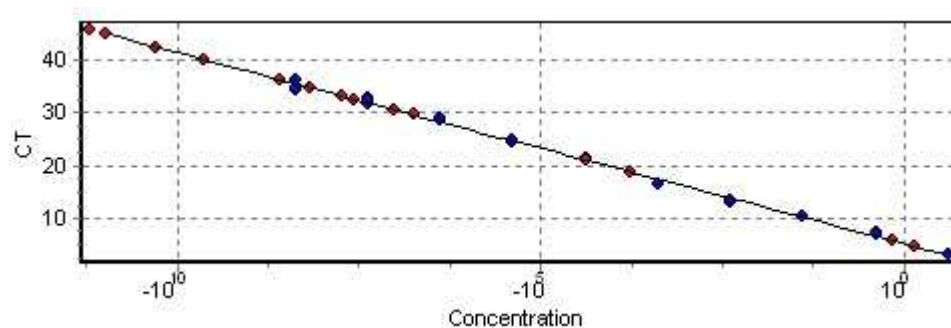
Raw Data For Cycling A.Yellow



Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
Red	NTC					
Red	NTC					
Red	NTC	40.00		2.22E-10		
Red	NTC	44.84		9.94E-12		
Blue	Controle negatif	34.76		6.42E-09	38.57	5.39
Blue	Controle negatif	42.37		4.83E-11		
Blue	Controle negatif					
Blue	Controle negatif					
Green	Controle positif	4.81		1.44E+00	5.35	0.77
Green	Controle positif	5.90		7.13E-01		
Cyan	2:1 Away	29.58		1.78E-07	23.18	5.64
Cyan	2:1 Away	18.92		1.67E-04		
Cyan	2:1 Away	21.04		4.29E-05		
Magenta	1;1 Away	30.58		9.36E-08	38.09	10.62
Magenta	1;1 Away	45.60		6.07E-12		
Magenta	1;1 Away					

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	1;2 Away	36.21		2.53E-09	33.95	1.98
	1;2 Away	33.13		1.83E-08		
	1;2 Away	32.52		2.70E-08		
	-1	3.39	4.11E+00	3.56E+00	3.38	0.02
	-1	3.36	4.11E+00	3.65E+00		
	-1	3.38	4.11E+00	3.59E+00		
	-2	7.22	4.11E-01	3.05E-01	7.25	0.07
	-2	7.33	4.11E-01	2.86E-01		
	-2	7.20	4.11E-01	3.10E-01		
	-3	10.40	4.11E-02	3.96E-02	10.39	0.01
	-3	10.39	4.11E-02	4.00E-02		
	-3	10.39	4.11E-02	3.99E-02		
	-4	13.31	4.11E-03	6.12E-03	13.35	0.08
	-4	13.29	4.11E-03	6.21E-03		
	-4	13.45	4.11E-03	5.62E-03		
	-5	16.53	4.11E-04	7.75E-04	16.58	0.06
	-5	16.56	4.11E-04	7.61E-04		
	-5	16.64	4.11E-04	7.23E-04		
	-6	21.40	4.11E-05	3.39E-05	21.22	0.16
	-6	21.14	4.11E-05	4.01E-05		
	-6	21.12	4.11E-05	4.08E-05		
	-7	24.64	4.11E-06	4.26E-06	24.74	0.12
	-7	24.86	4.11E-06	3.68E-06		
	-7	24.71	4.11E-06	4.05E-06		
	-8	28.82	4.11E-07	2.90E-07	28.77	0.15
	-8	28.60	4.11E-07	3.35E-07		
	-8	28.88	4.11E-07	2.79E-07		
	-9	31.72	4.11E-08	4.53E-08	32.39	0.61
	-9	32.89	4.11E-08	2.13E-08		
	-9	32.56	4.11E-08	2.63E-08		
	-10	34.42	4.11E-09	7.98E-09	35.06	0.85
	-10	34.74	4.11E-09	6.48E-09		
	-10	36.02	4.11E-09	2.85E-09		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

Annexe 8 : Real-time PCR 8

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-06-18 (1)
Run Start	6/18/2010 1:06:11 PM
Run Finish	6/18/2010 3:42:42 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.06027
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	Yes
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.279 \cdot \text{CT} + 1.556)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3.587 \cdot \log(\text{conc}) + 5.579$
Reaction efficiency (*)	0.90028 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

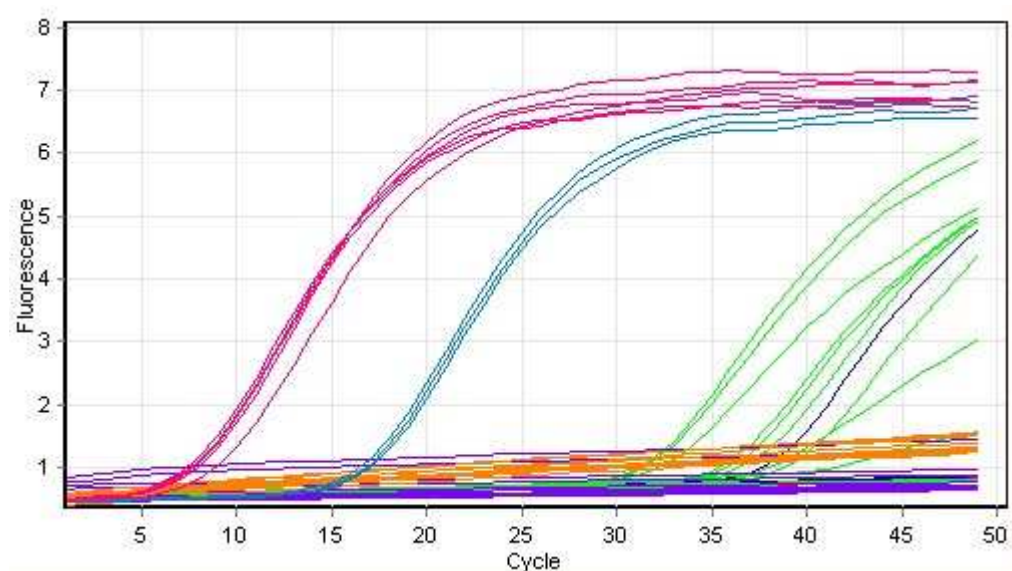
Messages

Message
Operator skipped end of cycle for Cycling @ Repeat 50

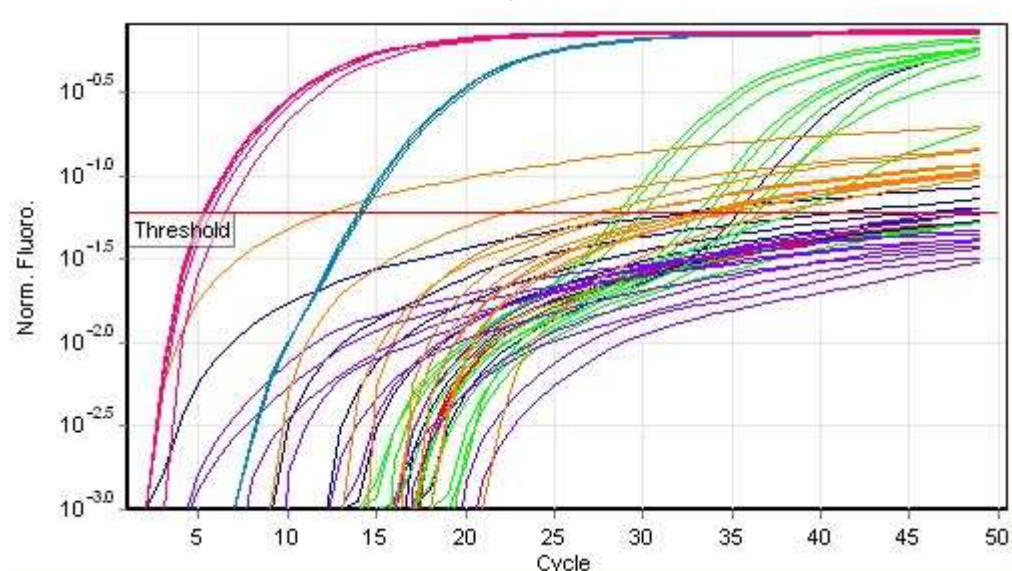
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

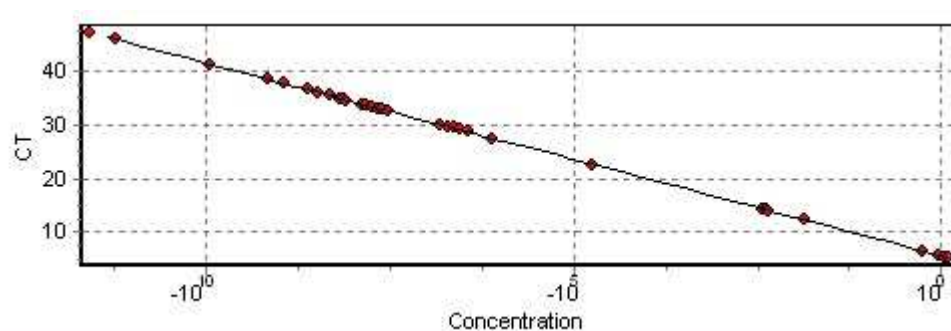
Raw Data For Cycling A.Yellow








Quantitation data for Cycling A.Yellow
















Standard Curve



Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
■	NTC					
■	NTC					
■	NTC					

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	NTC					
	Controle negatif (surface)	41.23		1.15E-10	38.78	5.94
	Controle negatif (surface)	32.61		2.90E-08		
	Controle negatif (surface)	35.38		4.90E-09		
	Controle negatif (surface)					
	Controle negatif (surface)	45.88		5.81E-12		
	Controle negatif (surface)					
	1;2 (DNA Away)	30.05		1.51E-07	33.34	3.46
	1;2 (DNA Away)	38.49		6.66E-10		
	1;2 (DNA Away)	33.62		1.52E-08		
	1;2 (DNA Away)	29.08		2.80E-07		
	1;2 (DNA Away)	28.70		3.57E-07		
	1;2 (DNA Away)					
	1;2 (DNA Away)	35.98		3.35E-09		
	1;2 (DNA Away)	34.60		8.12E-09		
	1;2 (DNA Away)	36.50		2.40E-09		
	1;2 (DNA Away)	33.08		2.15E-08		
	1;2 (DNA Away)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)	47.14		2.59E-12		
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (DNA Remover)	27.48		7.81E-07	29.90	7.18
	1;2 (DNA Remover)	37.66		1.14E-09		
	1;2 (DNA Remover)	12.27		1.36E-02		
	1;2 (DNA Remover)	22.59		1.81E-05		
	1;2 (DNA Remover)	34.95		6.49E-09		
	1;2 (DNA Remover)	29.41		2.27E-07		
	1;2 (DNA Remover)	33.40		1.75E-08		

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	1;2 (DNA Remover)	32.90		2.41E-08		
	1;2 (DNA Remover)	29.69		1.90E-07		
	1;2 (DNA Remover)	34.70		7.60E-09		
	1;2 (DNA Remover)	33.81		1.35E-08		
	-4	14.12	4.11E-03	4.17E-03	14.14	0.17
	-4	13.98	4.11E-03	4.53E-03		
	-4	14.31	4.11E-03	3.67E-03		
	Controle positif	5.74		9.02E-01	5.60	0.48
	Controle positif	5.28		1.21E+00		
	Controle positif	5.24		1.25E+00		
	Controle positif	5.40		1.12E+00		
	Controle positif	6.51		5.50E-01		
	Controle positif	5.42		1.11E+00		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)
 Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 9 : Real-time PCR 9

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-06-22 (1)
Run Start	6/22/2010 1:00:58 PM
Run Finish	6/22/2010 3:38:59 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.06027
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	Yes
Standard Curve (1)	conc= 10 ^(-0.279*CT + 1.553)
Standard Curve (2)	CT = -3.587*log(conc) + 5.571
Reaction efficiency (*)	0.90028 (* = 10 ^{(-1/m) - 1})
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No

No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

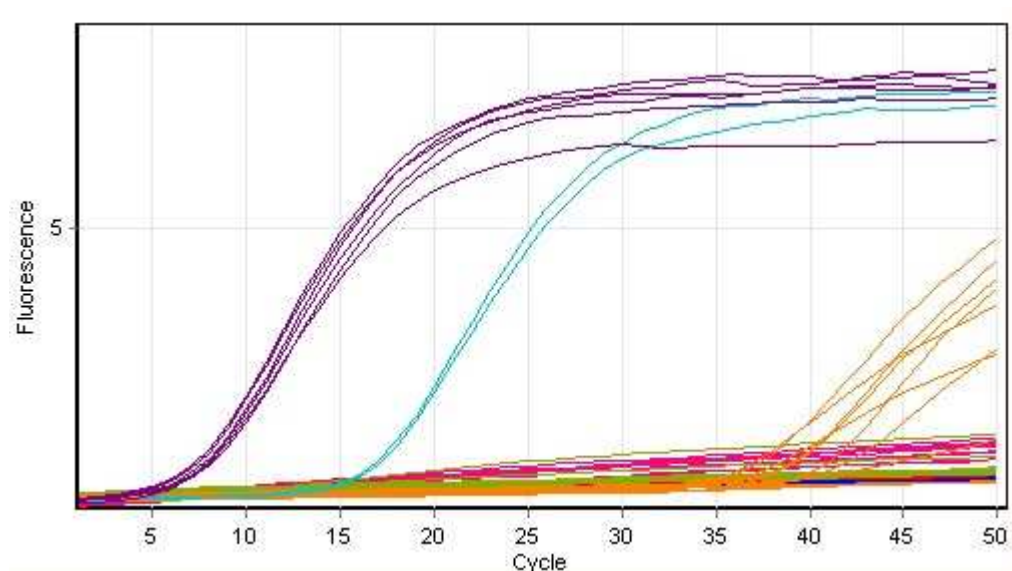
Messages

Message

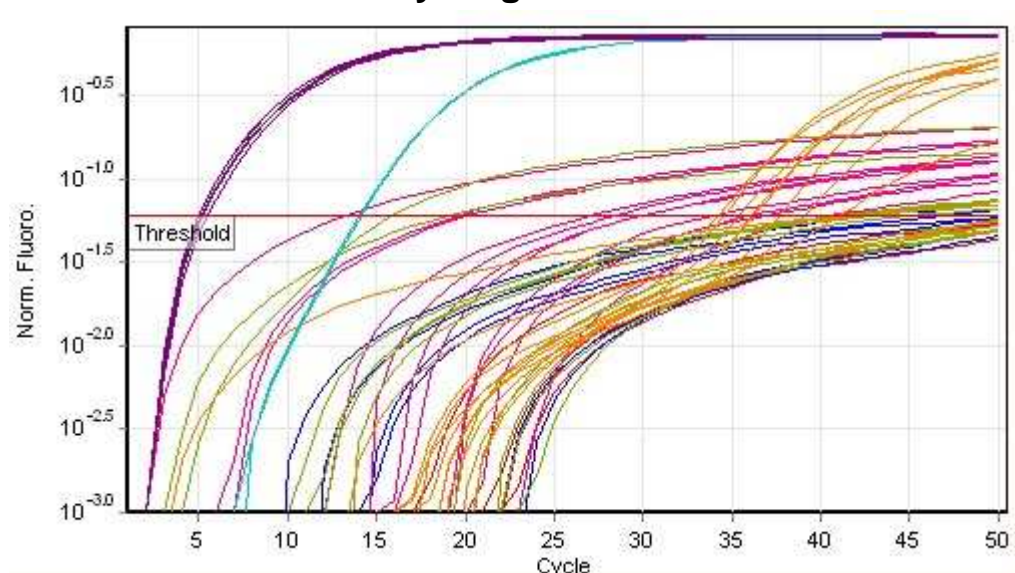
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

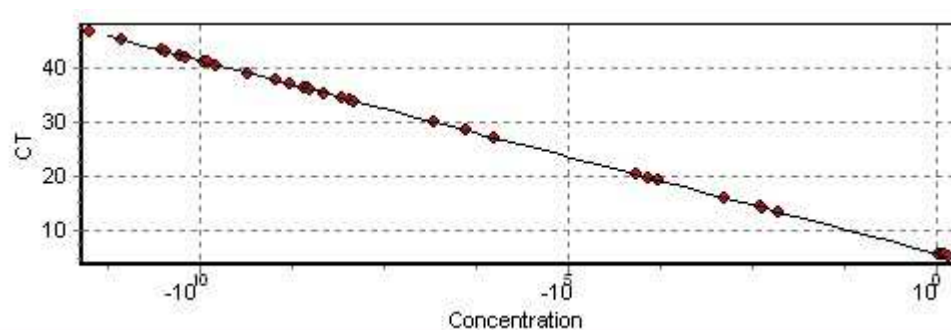
Raw Data For Cycling A.Yellow



Quantitation data for Cycling A.Yellow




Standard Curve



Colour Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
NTC					
NTC					
NTC					
NTC					
Controle negatif					
Controle negatif					
Controle negatif	46.79		3.21E-12		
Controle negatif	43.33		2.96E-11		
Controle negatif					
Controle negatif					
1;2 (LookOut DNA Erase)	30.01		1.53E-07	28.76	8.31
1;2 (LookOut DNA Erase)	40.63		1.68E-10		
1;2 (LookOut DNA Erase)	19.61		1.22E-04		
1;2 (LookOut DNA Erase)	28.48		4.09E-07		
1;2 (LookOut DNA Erase)	37.04		1.68E-09		

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	1;2 (LookOut DNA Erase)	27.11		9.90E-07		
	1;2 (LookOut DNA Erase)	36.03		3.22E-09		
	1;2 (LookOut DNA Erase)	13.29		7.06E-03		
	1;2 (LookOut DNA Erase)	30.05		1.50E-07		
	1;2 (LookOut DNA Erase)	20.21		8.30E-05		
	1;2 (LookOut DNA Erase)	33.90		1.26E-08		
	1;2 (DNA ExitusPlus)	15.86		1.35E-03	34.44	13.23
	1;2 (DNA ExitusPlus)	42.12		6.46E-11		
	1;2 (DNA ExitusPlus)					
	1;2 (DNA ExitusPlus)	43.09		3.46E-11		
	1;2 (DNA ExitusPlus)					
	1;2 (DNA ExitusPlus)	19.14		1.64E-04		
	1;2 (DNA ExitusPlus)					
	1;2 (DNA ExitusPlus)					
	1;2 (DNA ExitusPlus)	41.20		1.16E-10		
	1;2 (DNA ExitusPlus)	45.25		8.64E-12		
	1;2 (DNA ExitusPlus)					
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	36.33		2.65E-09	37.45	2.90
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	39.13		4.39E-10		
	1;2 (DNA Decontamination reagent)					
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	37.77		1.05E-09		
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	34.56		8.26E-09		
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	34.16		1.07E-08		
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	35.38		4.87E-09		
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	36.21		2.87E-09		
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	41.07		1.26E-10		
	1;2 (DNA Decontamination reagent)					
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	42.45		5.21E-11		
	-4	14.18	4.11E-03	3.98E-03	14.13	0.07
	-4	14.08	4.11E-03	4.24E-03		
	Controle positif	4.99		1.46E+00	5.20	0.19
	Controle positif	5.50		1.04E+00		
	Controle positif	5.25		1.23E+00		
	Controle positif	5.02		1.42E+00		
	Controle positif	5.25		1.23E+00		

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	Controle positif	5.18		1.28E+00		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)
 Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 10 : Real-time PCR 10

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-06-23 (1)
Run Start	6/23/2010 12:13:02 PM
Run Finish	6/23/2010 2:50:21 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.06027
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	Yes
Standard Curve (1)	conc= 10 [^] (-0.279*CT + 1.615)
Standard Curve (2)	CT = -3.587*log(conc) + 5.792
Reaction efficiency (*)	0.90028 (* = 10 [^] (-1/m) - 1)
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Messages

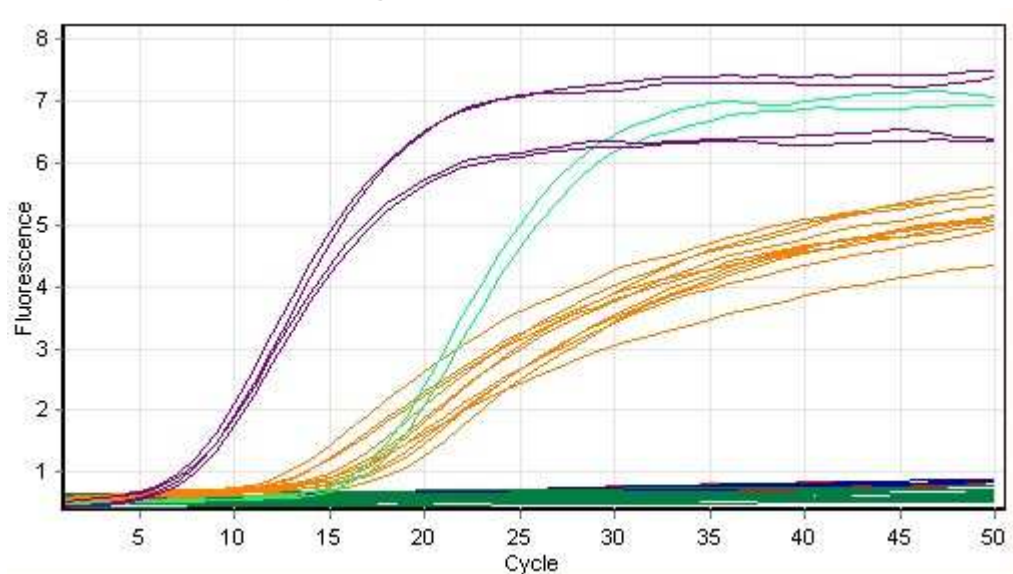
Message

Profile

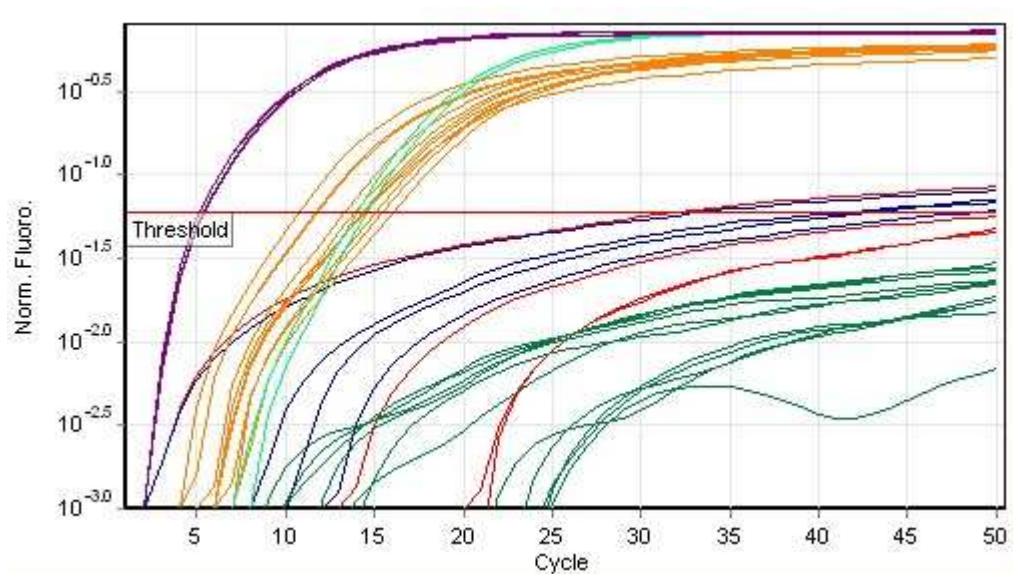
Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	

Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

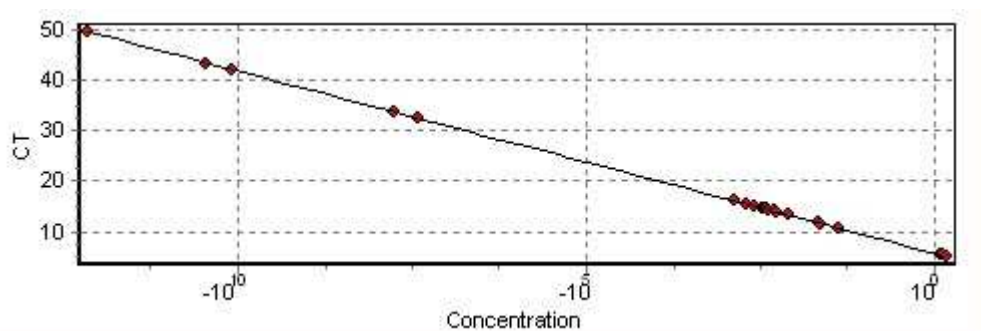
Raw Data For Cycling A.Yellow






































Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
■	NTC	32.43		3.75E-08	32.43		

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	NTC					
	NTC					
	NTC					
	Controle negatif	43.31		3.47E-11	42.12	6.48
	Controle negatif	42.03		7.86E-11		
	Controle negatif	49.44		6.75E-13		
	Controle negatif	33.71		1.65E-08		
	1;2 Javel					
	1;2 Javel					
	1;2 Javel					
	1;2 Javel					
	1;2 Javel					
	1;2 Javel					
	1;2 Javel					
	1;2 Javel					
	1;2 Javel					
	1;2 Javel					
	1;2 Javel					
	1;2 DNA Zap	10.74		4.18E-02	13.78	1.71
	1;2 DNA Zap	14.54		3.63E-03		
	1;2 DNA Zap	13.34		7.84E-03		
	1;2 DNA Zap	15.46		2.01E-03		
	1;2 DNA Zap	11.79		2.13E-02		
	1;2 DNA Zap	14.41		3.96E-03		
	1;2 DNA Zap	11.69		2.26E-02		
	1;2 DNA Zap	13.96		5.27E-03		
	1;2 DNA Zap	16.08		1.36E-03		
	1;2 DNA Zap	14.48		3.78E-03		
	1;2 DNA Zap	15.12		2.50E-03		
	-4	14.07	4.11E-03	4.91E-03	14.35	0.39
	-4	14.63	4.11E-03	3.44E-03		
	Controle positif	5.48		1.22E+00	5.31	0.16
	Controle positif	5.17		1.49E+00		
	Controle positif	5.18		1.48E+00		
	Controle positif	5.41		1.28E+00		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)
Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.
ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 11 : Real-time PCR 11

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-06-30 (1)
Run Start	6/30/2010 10:53:03 AM
Run Finish	6/30/2010 1:31:32 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.06027
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	Yes
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.279 \cdot \text{CT} + 2.202)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3.587 \cdot \log(\text{conc}) + 7.896$
Reaction efficiency (*)	0.90028 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

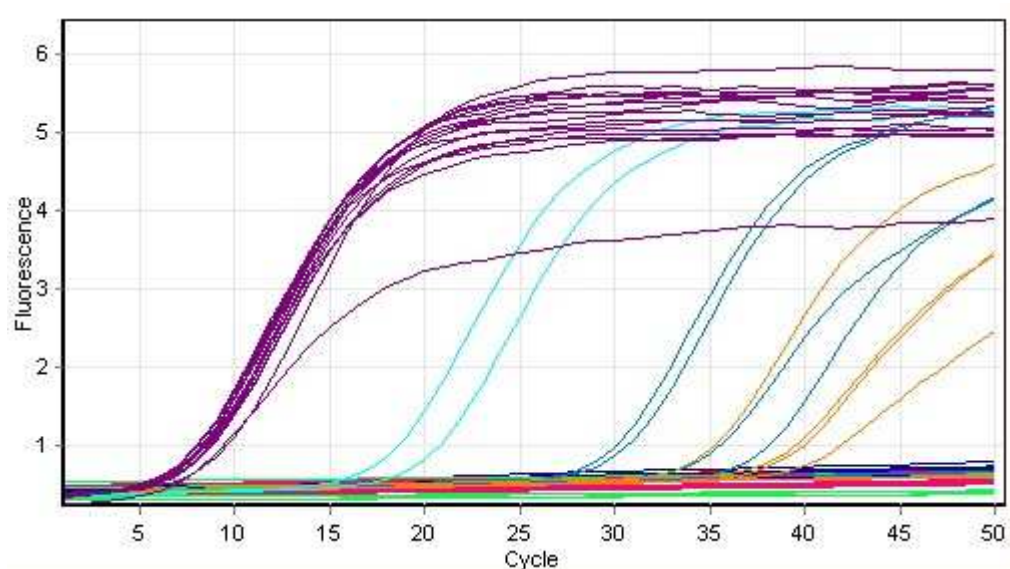
Messages

Message

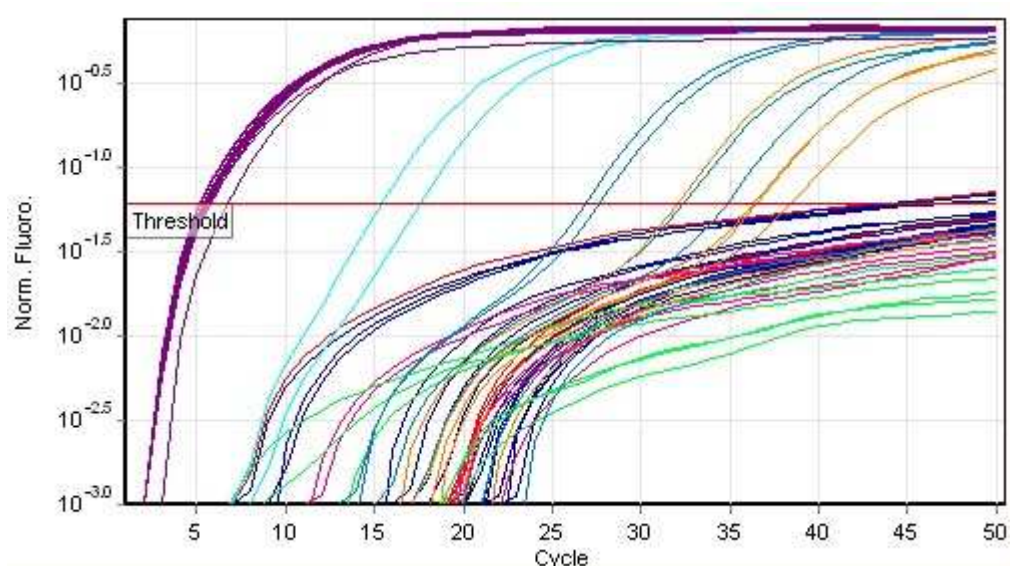
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

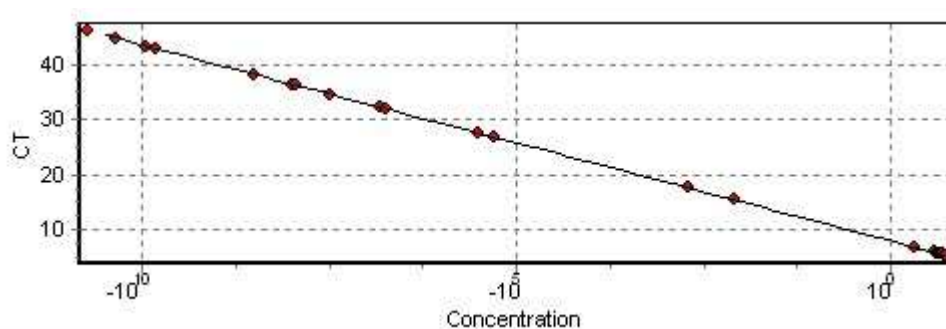
Raw Data For Cycling A.Yellow



Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
■	NTC					
■	NTC	43.09		1.54E-10		
■	NTC					

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	NTC					
	Controle negatif					
	Controle negatif	45.00		4.52E-11		
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif	43.57		1.13E-10		
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif	46.36		1.88E-11		
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (LTK)					
	1;2 (Javel)					
	1;2 (Javel)					
	1;2 (Javel)					
	1;2 (Javel)					
	1;2 (Javel)					
	1;2 (Javel)					
	1;2 (DNA Away)	32.36		1.51E-07	30.41	3.80
	1;2 (DNA Away)					
	1;2 (DNA Away)	26.83		5.26E-06		
	1;2 (DNA Away)	34.78		3.20E-08		
	1;2 (DNA Away)	27.66		3.09E-06		
	1;2 (DNA Away)					
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	38.41		3.11E-09	35.84	2.69

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	1;2 (DNA Decontamination reagent)					
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	36.37		1.15E-08		
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	36.54		1.03E-08		
	1;2 (DNA Decontamination reagent)	32.05		1.84E-07		
	1;2 (DNA Decontamination reagent)					
	-4	15.39	4.11E-03	8.14E-03	16.45	1.51
	-4	17.52	4.11E-03	2.07E-03		
	Controle positif	5.48		4.72E+00	5.57	0.36
	Controle positif	5.69		4.12E+00		
	Controle positif	5.47		4.76E+00		
	Controle positif	5.40		4.95E+00		
	Controle positif	5.67		4.18E+00		
	Controle positif	5.66		4.20E+00		
	Controle positif	5.55		4.52E+00		
	Controle positif	5.41		4.93E+00		
	Controle positif	5.60		4.37E+00		
	Controle positif	5.24		5.52E+00		
	Controle positif	5.42		4.91E+00		
	Controle positif	6.72		2.13E+00		
	Controle positif	5.18		5.72E+00		
	Controle positif	5.78		3.89E+00		
	Controle positif	5.18		5.72E+00		
	Controle positif	5.75		3.97E+00		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)

Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.

ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 12 : Real-time PCR 12

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-06-30 (2)
Run Start	6/30/2010 2:18:30 PM
Run Finish	6/30/2010 4:58:11 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94

Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.06027
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	Yes
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.279 \cdot \text{CT} + 1.727)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3.587 \cdot \log(\text{conc}) + 6.196$
Reaction efficiency (*)	0.90028 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

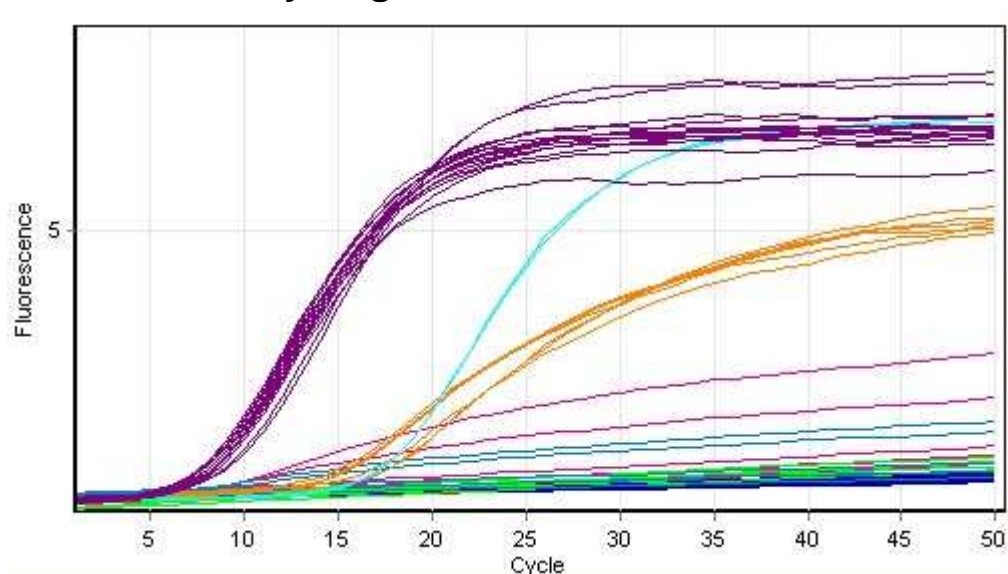
Messages

Message

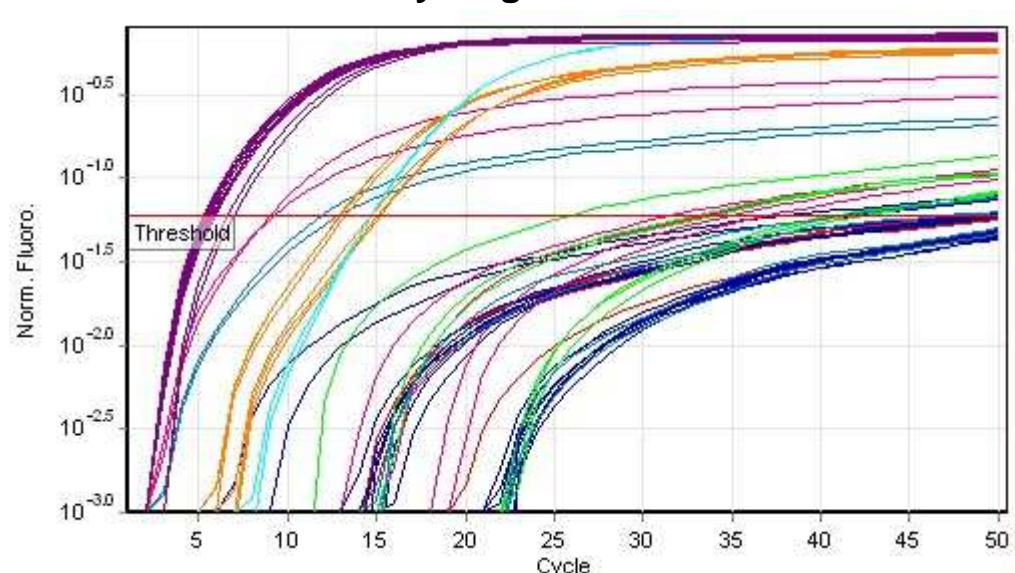
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

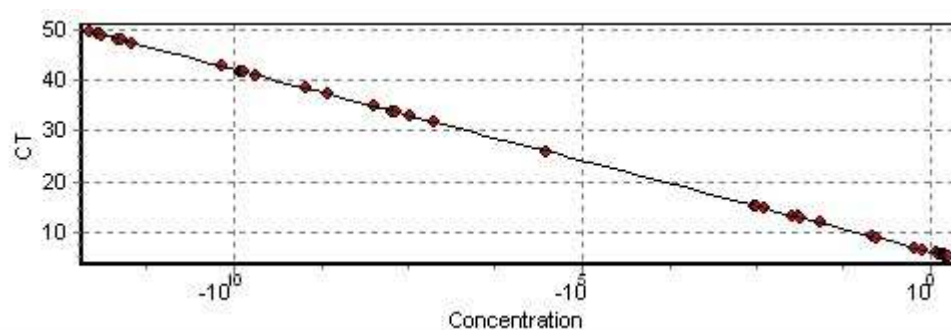
Raw Data For Cycling A.Yellow




Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
■	NTC	48.89		1.25E-12	48.47	0.59
■	NTC	48.05		2.14E-12		
■	NTC					
■	NTC					
■	Controle negatif					
■	Controle negatif	38.35		1.08E-09		
■	Controle negatif					
■	Controle negatif	49.49		8.51E-13		
■	Controle negatif					
■	Controle negatif					
■	Controle negatif	41.78		1.20E-10		
■	Controle negatif	48.95		1.20E-12		
■	Controle negatif					
■	Controle negatif					
■	Controle negatif	49.08		1.10E-12		
■	Controle negatif					

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	Controle negatif	47.85		2.43E-12		
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	1;2 (LookOut DNA Erase)	34.90		9.91E-09	25.98	13.17
	1;2 (LookOut DNA Erase)	37.25		2.19E-09		
	1;2 (LookOut DNA Erase)	31.75		7.51E-08		
	1;2 (LookOut DNA Erase)	9.26		1.40E-01		
	1;2 (LookOut DNA Erase)	9.01		1.64E-01		
	1;2 (LookOut DNA Erase)	33.72		2.12E-08		
	1;2 (DNA Remover)	40.94		2.06E-10	36.35	6.54
	1;2 (DNA Remover)	25.96		3.08E-06		
	1;2 (DNA Remover)	33.90		1.89E-08		
	1;2 (DNA Remover)	42.65		6.85E-11		
	1;2 (DNA Remover)	33.01		3.35E-08		
	1;2 (DNA Remover)	41.65		1.30E-10		
	1;2 (ExitusPlus)	11.91		2.55E-02	28.41	18.64
	1;2 (ExitusPlus)	41.54		1.40E-10		
	1;2 (ExitusPlus)					
	1;2 (ExitusPlus)					
	1;2 (ExitusPlus)	12.90		1.35E-02		
	1;2 (ExitusPlus)	47.30		3.46E-12		
	1;2 (DNA Zap)	15.25		3.00E-03	14.07	1.09
	1;2 (DNA Zap)	13.32		1.03E-02		
	1;2 (DNA Zap)	12.96		1.30E-02		
	1;2 (DNA Zap)	13.00		1.26E-02		
	1;2 (DNA Zap)	14.73		4.18E-03		
	1;2 (DNA Zap)	15.14		3.21E-03		
	-4	14.75	4.11E-03	4.11E-03	14.75	0.00
	-4	14.76	4.11E-03	4.11E-03		
	Controle positif	5.42		1.65E+00	5.77	0.48
	Controle positif	5.43		1.64E+00		
	Controle positif	5.52		1.55E+00		
	Controle positif	5.78		1.31E+00		
	Controle positif	6.65		7.46E-01		
	Controle positif	5.95		1.17E+00		

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
■	Controle positif	7.01		5.93E-01		
■	Controle positif	5.79		1.29E+00		
■	Controle positif	5.46		1.60E+00		
■	Controle positif	5.86		1.24E+00		
■	Controle positif	5.40		1.67E+00		
■	Controle positif	5.30		1.78E+00		
■	Controle positif	5.79		1.30E+00		
■	Controle positif	5.64		1.42E+00		
■	Controle positif	5.59		1.47E+00		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)
 Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 13 : Real-time PCR 13

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-07-07 (1)
Run Start	7/7/2010 11:44:16 AM
Run Finish	7/7/2010 2:22:43 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.06027
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	Yes
Standard Curve (1)	conc= 10 [^] (-0.279*CT + 1.669)
Standard Curve (2)	CT = -3.587*log(conc) + 5.987
Reaction efficiency (*)	0.90028 (* = 10 [^] (-1/m) - 1)
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1

Imported Analysis Settings	
----------------------------	--

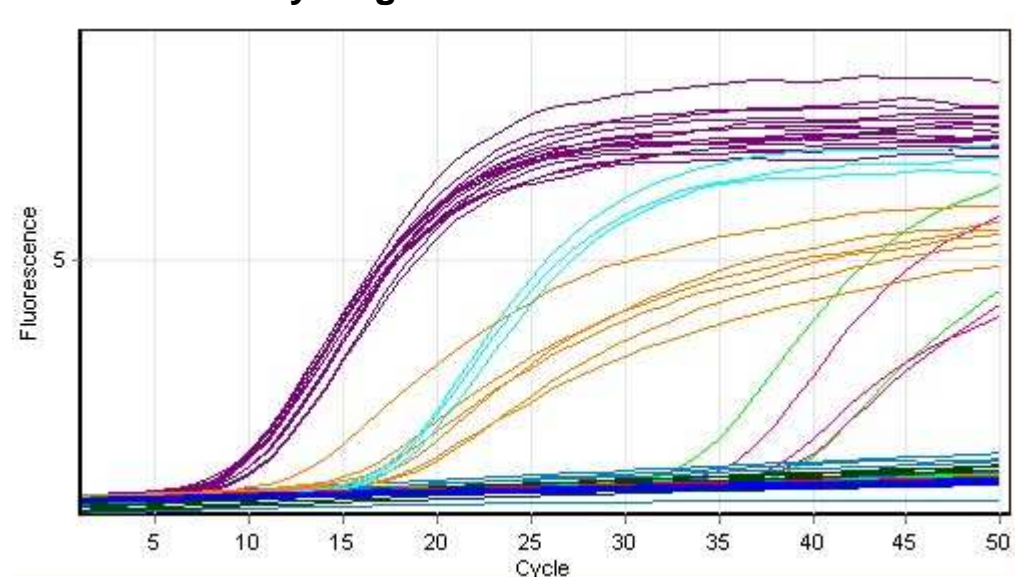
Messages

Message

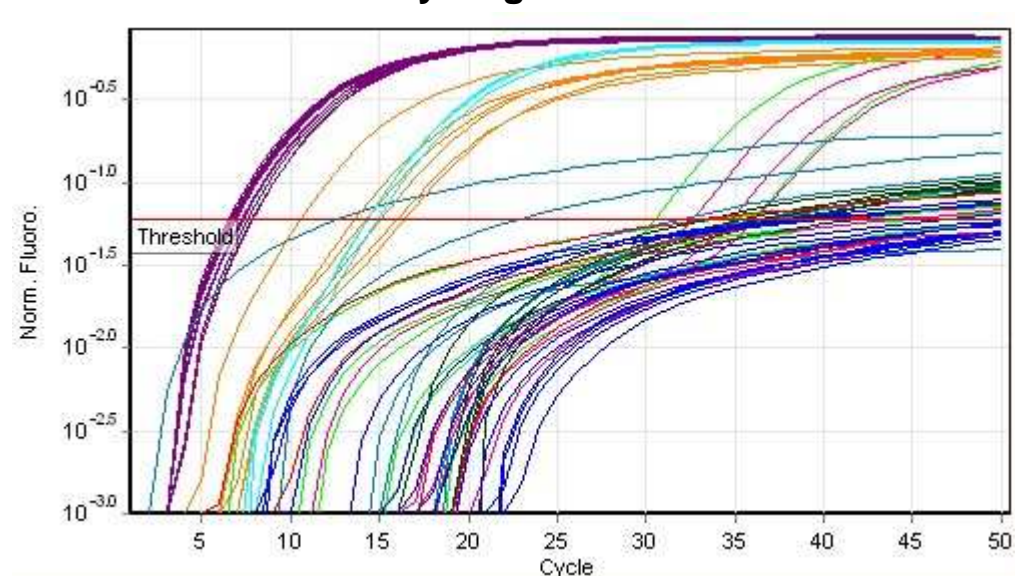
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

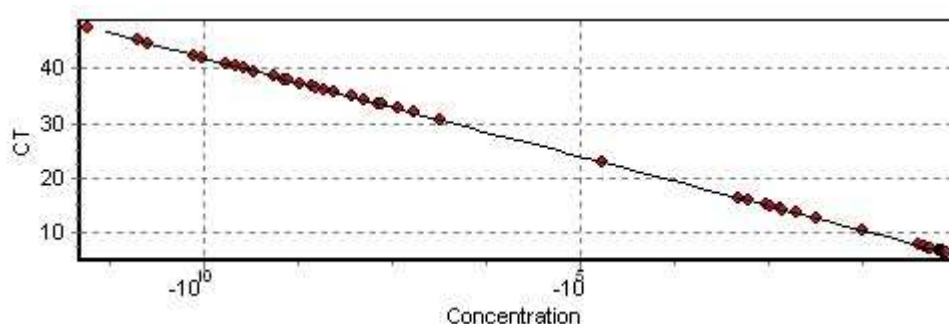
Raw Data For Cycling A.Yellow





Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
■ Controle positif	6.94		5.42E-01	7.03	0.44
■ Controle positif	6.52		7.09E-01		
■ Controle positif	6.75		6.15E-01		
■ Controle positif	7.87		2.99E-01		
■ Controle positif	6.77		6.04E-01		
■ Controle positif	7.35		4.17E-01		
■ Controle positif	7.27		4.38E-01		
■ Controle positif	7.82		3.09E-01		
■ Controle positif	6.68		6.41E-01		
■ Controle positif	6.86		5.71E-01		
■ Controle positif	6.64		6.56E-01		
■ Controle positif	6.70		6.33E-01		
■ Controle positif	6.86		5.71E-01		
■ Controle positif	7.59		3.57E-01		
■ Controle positif	6.78		6.01E-01		
■ 1;4 (DNA Decontamination reagent)	34.19		1.37E-08	37.64	5.92
■ 1;4 (DNA Decontamination reagent)	30.57		1.40E-07		
■ 1;4 (DNA Decontamination reagent)	42.28		7.58E-11		
■ 1;4 (DNA Decontamination reagent)					
■ 1;4 (DNA Decontamination reagent)	36.13		3.95E-09		
■ 1;4 (DNA Decontamination reagent)	45.03		1.30E-11		
■ 1;4 (DNA Away)	32.64		3.72E-08	37.02	5.19
■ 1;4 (DNA Away)	34.80		9.29E-09		
■ 1;4 (DNA Away)					
■ 1;4 (DNA Away)					
■ 1;4 (DNA Away)	36.17		3.85E-09		
■ 1;4 (DNA Away)	44.50		1.83E-11		
■ 1;4 (LookOut DNA Erase)	31.88		6.03E-08	28.25	10.40

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	1;4 (LookOut DNA Erase)	12.70		1.34E-02		
	1;4 (LookOut DNA Erase)					
	1;4 (LookOut DNA Erase)	36.48		3.14E-09		
	1;4 (LookOut DNA Erase)	37.27		1.89E-09		
	1;4 (LookOut DNA Erase)	22.92		1.89E-05		
	1;4 (DNA Remover)	36.73		2.68E-09	37.37	2.89
	1;4 (DNA Remover)	41.90		9.73E-11		
	1;4 (DNA Remover)	38.56		8.28E-10		
	1;4 (DNA Remover)	35.64		5.41E-09		
	1;4 (DNA Remover)	33.38		2.31E-08		
	1;4 (DNA Remover)	38.00		1.18E-09		
	1;4 (DNA Zap)	14.32		4.76E-03	14.34	2.11
	1;4 (DNA Zap)	15.09		2.89E-03		
	1;4 (DNA Zap)	10.56		5.30E-02		
	1;4 (DNA Zap)	16.42		1.24E-03		
	1;4 (DNA Zap)	15.98		1.64E-03		
	1;4 (DNA Zap)	13.68		7.16E-03		
	-4	14.33	4.11E-03	4.71E-03	14.55	0.33
	-4	14.92	4.11E-03	3.23E-03		
	-4	14.38	4.11E-03	4.57E-03		
	NTC	33.53		2.10E-08	37.14	5.11
	NTC					
	NTC	40.75		2.03E-10		
	NTC					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif	39.91		3.48E-10		
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif	39.42		4.77E-10		
	Controle negatif	37.85		1.31E-09		
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
■	Controle negatif	47.37		2.90E-12		
■	Controle negatif					
■	Controle negatif	40.37		2.59E-10		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)
 Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 14 : Real-time PCR 14

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-07-07 (2)
Run Start	7/7/2010 3:20:09 PM
Run Finish	7/7/2010 5:54:03 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.06027
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	Yes
Standard Curve (1)	conc= $10^{(-0.279 \cdot CT + 1.964)}$
Standard Curve (2)	$CT = -3.587 \cdot \log(\text{conc}) + 7.042$
Reaction efficiency (*)	0.90028 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

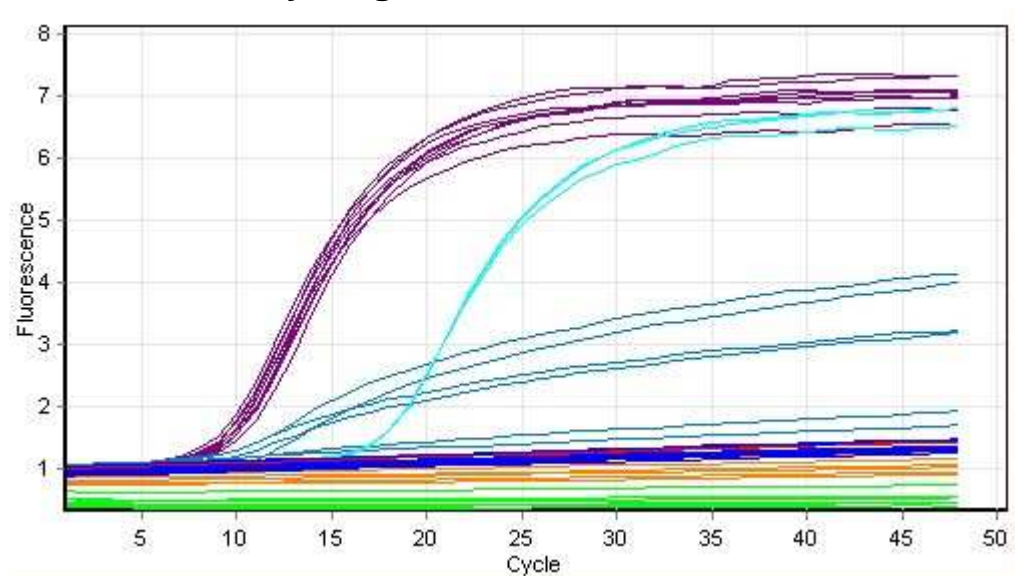
Messages

Message
Operator skipped end of cycle for Cycling @ Repeat 49

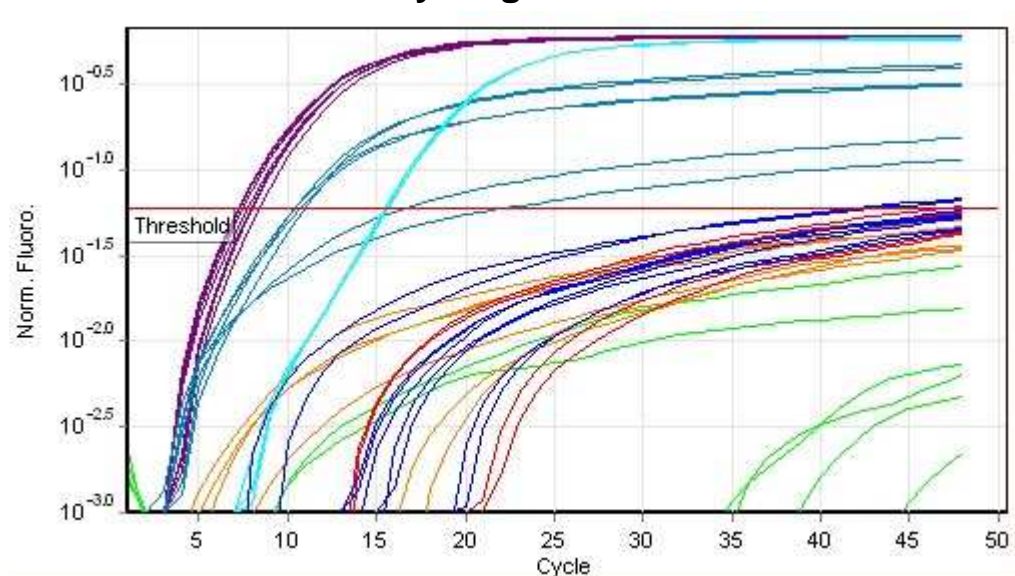
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

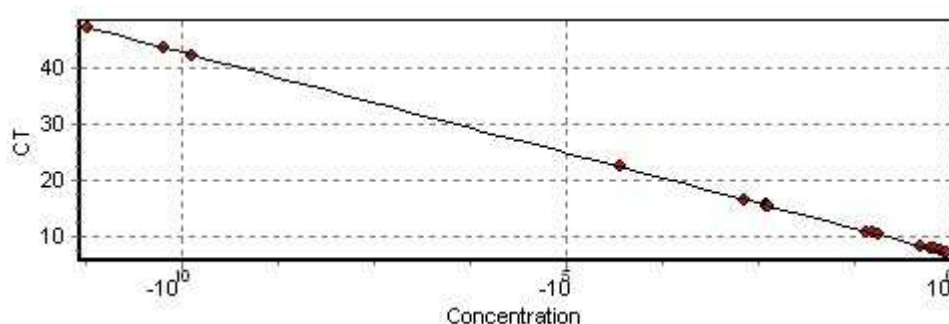
Raw Data For Cycling A.Yellow

















Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
■	Controle positif	7.23		8.84E-01	7.67	0.40
■	Controle positif	7.48		7.55E-01		
■	Controle positif	7.95		5.58E-01		
■	Controle positif	7.34		8.28E-01		
■	Controle positif	7.32		8.37E-01		
■	Controle positif	7.78		6.22E-01		
■	Controle positif	8.41		4.17E-01		
■	Controle positif	7.49		7.49E-01		
■	Controle positif	8.02		5.34E-01		
■	1;4 (Javel)					
■	1;4 (Javel)					
■	1;4 (Javel)					
■	1;4 (Javel)					
■	1;4 (Javel)					
■	1;4 (Javel)					
■	1;4 (LTK)					
■	1;4 (LTK)					
■	1;4 (LTK)					
■	1;4 (LTK)					
■	1;4 (LTK)					
■	1;4 (LTK)					
■	1;4 (ExitusPlus)	10.40		1.16E-01	13.61	4.98
■	1;4 (ExitusPlus)	16.67		2.06E-03		
■	1;4 (ExitusPlus)	10.74		9.33E-02		
■	1;4 (ExitusPlus)	10.44		1.13E-01		
■	1;4 (ExitusPlus)	22.50		4.91E-05		
■	1;4 (ExitusPlus)	10.93		8.22E-02		
■	-4	15.50	4.11E-03	4.37E-03	15.60	0.09
■	-4	15.67	4.11E-03	3.93E-03		

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	-4	15.63	4.11E-03	4.04E-03		
	NTC	47.32		5.90E-12	47.32	
	NTC					
	NTC					
	NTC					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif	42.42		1.37E-10		
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif	43.79		5.68E-11		
	Controle negatif					
	Controle negatif					

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)
 Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 15 : Real-time PCR 15

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-07-08 (1)
Run Start	7/8/2010 11:57:26 AM
Run Finish	7/8/2010 2:35:24 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.06027
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	Yes
Standard Curve (1)	conc= 10 [^] (-0.279*CT + 1.882)
Standard Curve (2)	CT = -3.587*log(conc) + 6.749
Reaction efficiency (*)	0.90028 (* = 10 [^] (-1/m) - 1)
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No

No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

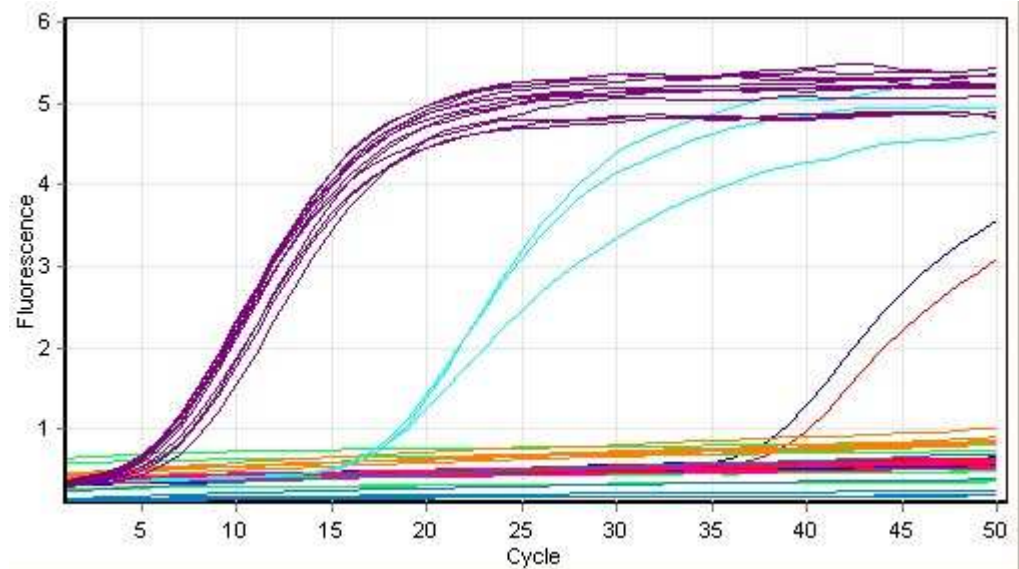
Messages

Message

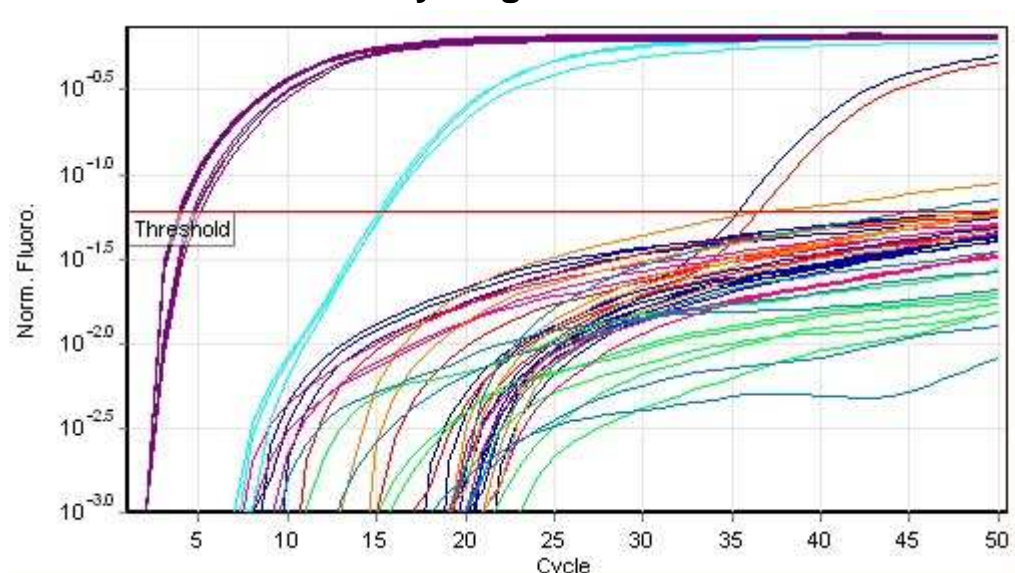
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

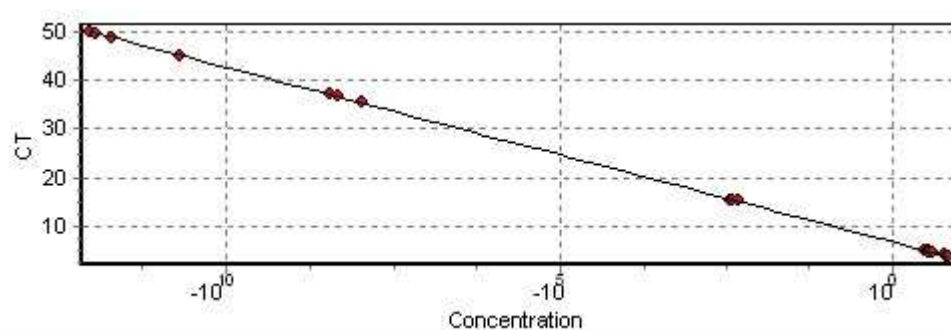
Raw Data For Cycling A.Yellow







































Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
■	Controle negatif					
■	Controle negatif	49.57		1.15E-12		
■	Controle negatif					
■	Controle negatif					
■	Controle negatif					
■	Controle negatif	49.92		9.21E-13		
■	Controle negatif					
■	Controle negatif					
■	Controle negatif					
■	Controle negatif					
■	Controle negatif	35.33		1.07E-08		
■	Controle negatif					
■	NTC					
■	NTC					
■	NTC					
■	NTC	36.56		4.88E-09		

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
	1; 0.6 (Javel)						
	1; 0.6 (Javel)						
	1; 0.6 (Javel)						
	1; 0.6 (Javel)						
	1; 0.6 (Javel)						
	1; 0.6 (Javel)						
	1; 0.6 (LTK)						
	1; 0.6 (LTK)						
	1; 0.6 (LTK)						
	1; 0.6 (LTK)						
	1; 0.6 (LTK)						
	1; 0.6 (LTK)						
	1; 0.6 (ExitusPlus)	48.77		1.92E-12	42.88	8.34	
	1; 0.6 (ExitusPlus)						
	1; 0.6 (ExitusPlus)						
	1; 0.6 (ExitusPlus)						
	1; 0.6 (ExitusPlus)						
	1; 0.6 (ExitusPlus)	36.98		3.73E-09			
	1; 0.6 (DNA Remover)						
	1; 0.6 (DNA Remover)	45.08		2.05E-11			
	1; 0.6 (DNA Remover)						
	1; 0.6 (DNA Remover)						
	1; 0.6 (DNA Remover)						
	1; 0.6 (DNA Remover)						
	-4	15.45	4.11E-03	3.76E-03	15.31	0.18	
	-4	15.37	4.11E-03	3.94E-03			
	-4	15.10	4.11E-03	4.69E-03			
	Controle positif	3.86		6.37E+00	4.18	0.50	
	Controle positif	3.77		6.79E+00			
	Controle positif	3.81		6.59E+00			
	Controle positif	4.62		3.91E+00			
	Controle positif	5.11		2.87E+00			
	Controle positif	4.86		3.35E+00			
	Controle positif	3.90		6.22E+00			
	Controle positif	3.83		6.52E+00			
	Controle positif	4.79		3.51E+00			

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
	Controle positif	3.80		6.66E+00			
	Controle positif	3.99		5.89E+00			
	Controle positif	3.85		6.45E+00			

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)

Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.

ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 16 : Real-time PCR 16

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-07-12 (1)
Run Start	7/12/2010 4:37:25 PM
Run Finish	7/12/2010 7:17:02 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.06027
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	Yes
Standard Curve (1)	conc= $10^{(-0.279 \cdot CT + 2.126)}$
Standard Curve (2)	$CT = -3.587 \cdot \log(\text{conc}) + 7.626$
Reaction efficiency (*)	0.90028 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Messages

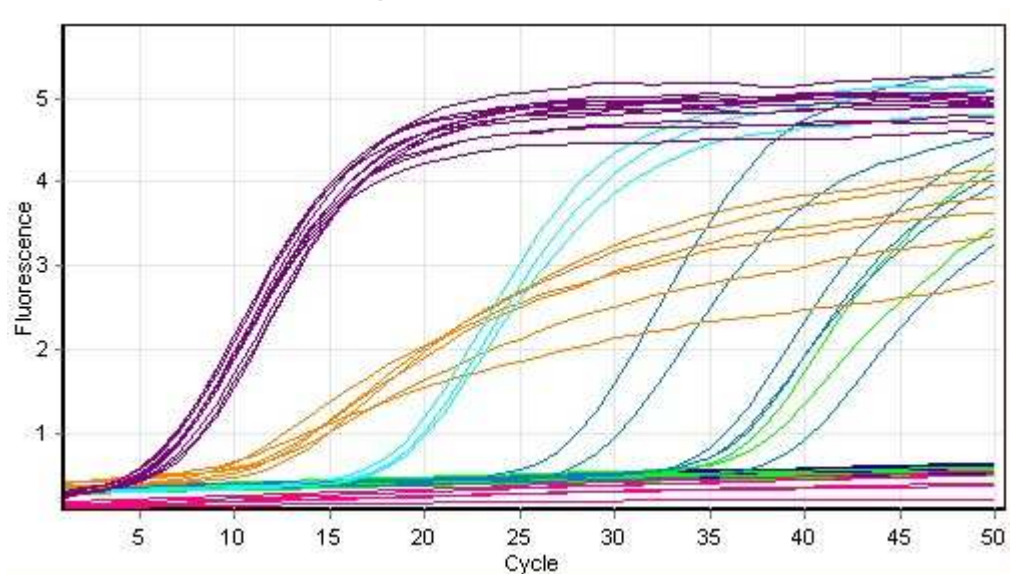
Message

Profile

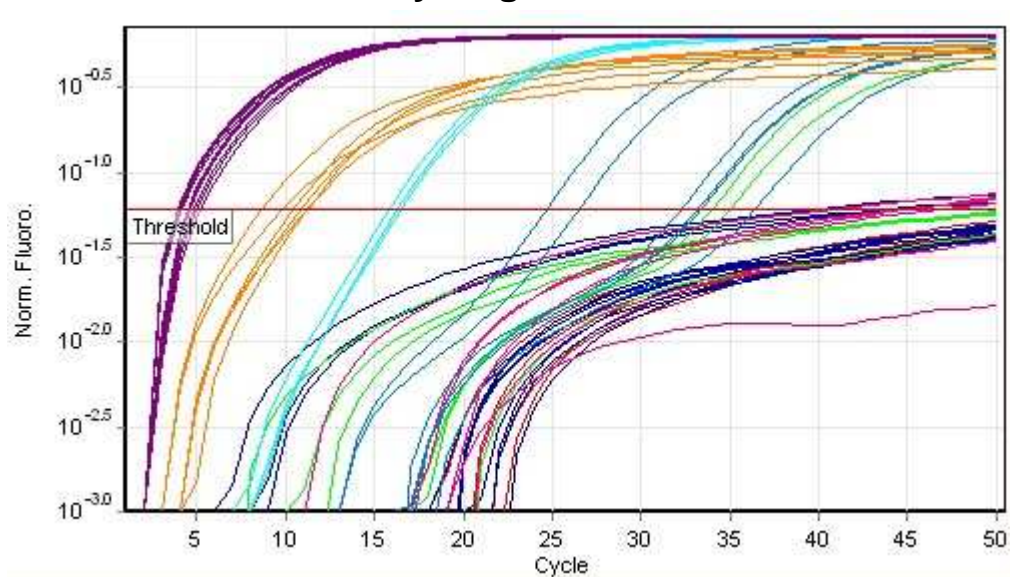
Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	

Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

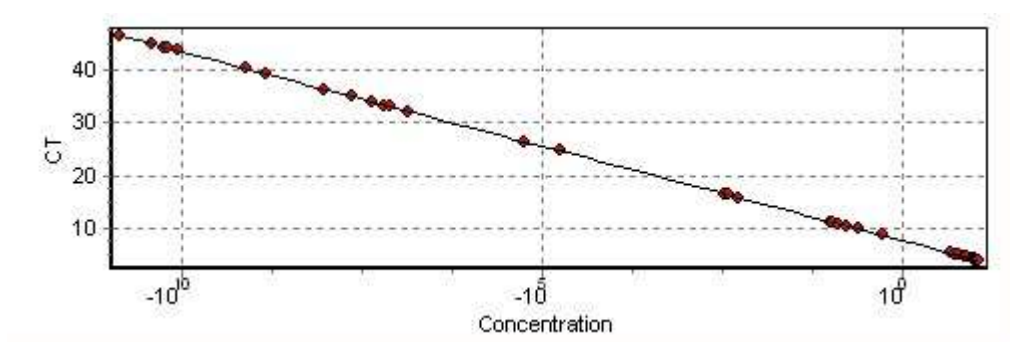
Raw Data For Cycling A.Yellow



Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	NTC					
	NTC					
	NTC					
	NTC					
	Controle negatif					
	Controle negatif	39.28		1.50E-09		
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif	43.67		8.91E-11		
	Controle negatif					
	Controle negatif	44.13		6.63E-11		
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	Controle negatif					
	1; 0.6 (DNA Decontamination reagent)	34.95		2.41E-08	34.45	0.71
	1; 0.6 (DNA Decontamination reagent)	33.94		4.60E-08		
	1; 0.6 (DNA Decontamination reagent)					
	1; 0.6 (DNA Decontamination reagent)					
	1; 0.6 (DNA Decontamination reagent)					
	1; 0.6 (DNA Decontamination reagent)					
	1; 0.6 (LookOut DNA Erase)	40.29		7.80E-10	44.04	2.66
	1; 0.6 (LookOut DNA Erase)	46.53		1.42E-11		
	1; 0.6 (LookOut DNA Erase)	44.39		5.62E-11		
	1; 0.6 (LookOut DNA Erase)					
	1; 0.6 (LookOut DNA Erase)	44.93		3.96E-11		
	1; 0.6 (LookOut DNA Erase)					
	1; 0.6 (DNA Away)	33.34		6.76E-08	31.03	4.52
	1; 0.6 (DNA Away)	33.13		7.75E-08		
	1; 0.6 (DNA Away)	32.22		1.39E-07		
	1; 0.6 (DNA Away)	36.42		9.40E-09		
	1; 0.6 (DNA Away)	24.63		1.82E-05		
	1; 0.6 (DNA Away)	26.46		5.61E-06		
	1; 0.6 (DNA Zap)	10.38		1.71E-01	10.30	0.98

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
■	1; 0.6 (DNA Zap)	8.61		5.33E-01		
■	1; 0.6 (DNA Zap)	10.79		1.31E-01		
■	1; 0.6 (DNA Zap)	9.76		2.54E-01		
■	1; 0.6 (DNA Zap)	11.13		1.05E-01		
■	1; 0.6 (DNA Zap)	11.16		1.04E-01		
■	-4	15.81	4.11E-03	5.23E-03	16.18	0.34
■	-4	16.28	4.11E-03	3.86E-03		
■	-4	16.46	4.11E-03	3.43E-03		
■	Controle positif	4.80		6.13E+00	4.41	0.45
■	Controle positif	4.54		7.25E+00		
■	Controle positif	4.45		7.70E+00		
■	Controle positif	4.99		5.45E+00		
■	Controle positif	4.49		7.51E+00		
■	Controle positif	3.89		1.10E+01		
■	Controle positif	5.21		4.71E+00		
■	Controle positif	4.57		7.14E+00		
■	Controle positif	4.07		9.78E+00		
■	Controle positif	3.98		1.04E+01		
■	Controle positif	3.83		1.15E+01		
■	Controle positif	4.10		9.65E+00		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)

Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.

ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 17 : Real-time PCR 17

Experiment Information

Run Name	Programme real-time 2010-05-26 (1) 2010-07-13 (1)
Run Start	7/13/2010 4:28:00 PM
Run Finish	7/13/2010 7:06:37 PM
Operator	Steph
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.94
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Yellow	5.

Quantitation Information

Threshold	0.06027
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	Yes
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.279 \cdot \text{CT} + 1.450)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3.587 \cdot \log(\text{conc}) + 5.200$
Reaction efficiency (*)	0.90028 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

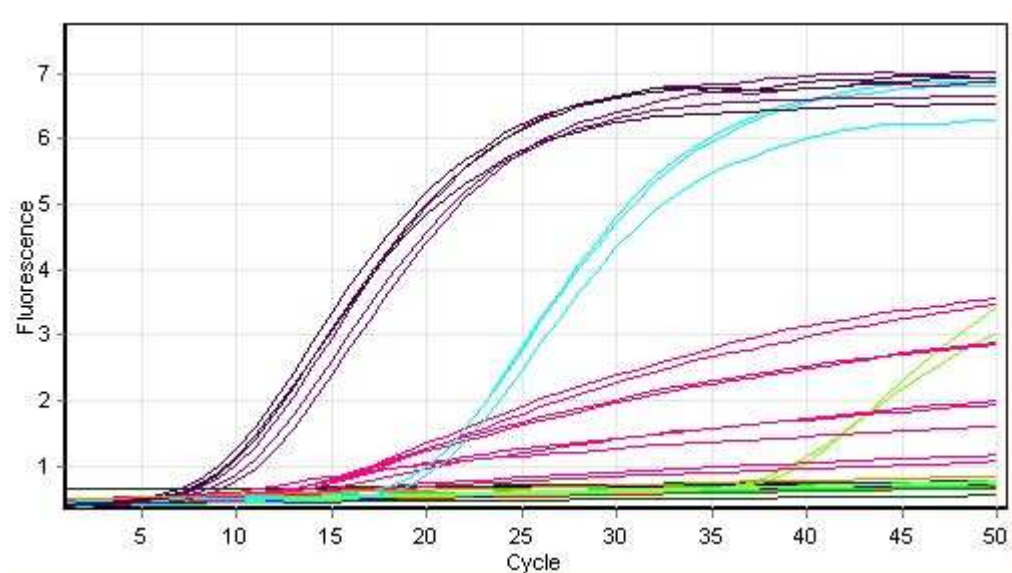
Messages

Message

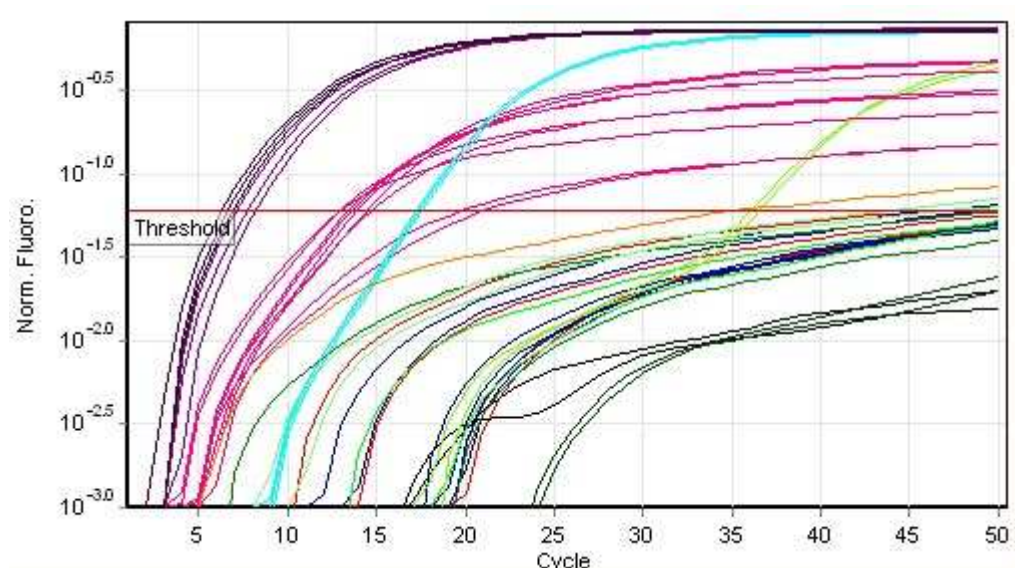
Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50°C, 2 min 0 secs	
Hold 2 @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 60 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Yellow][2][2])

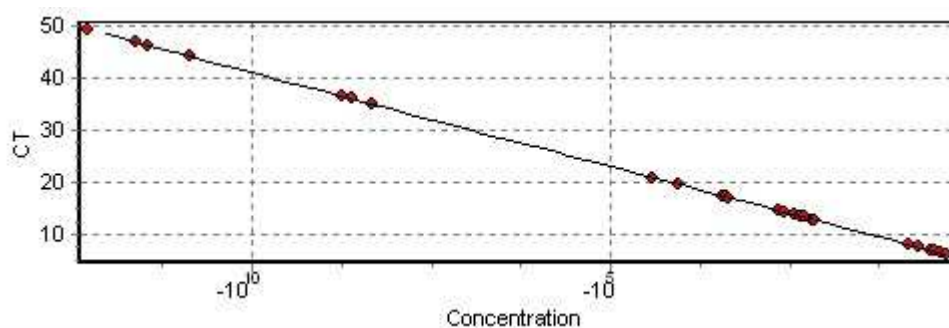
Raw Data For Cycling A.Yellow




























Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve



Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
■	NTC	46.24		3.60E-12	46.24		
■	NTC						
■	NTC						
■	NTC						
■	Controle negatif						
■	Controle negatif	49.27		5.16E-13			
■	Controle negatif						
■	Controle negatif						
■	Controle negatif	46.31		3.45E-12			
■	Controle negatif						
■	1;2 (Javel non-dilue)						
■	1;2 (Javel non-dilue)						
■	1;2 (Javel dilue 2x)						
■	1;2 (Javel dilue 2x)						
■	1;2 (Javel dilue 5x)						
■	1;2 (Javel dilue 5x)						

Colour	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
	1;2 (Javel dilue 10x)					
	1;2 (Javel dilue 10x)					
	1;2 (Javel dilue 20x)	36.09		2.43E-09	36.35	0.36
	1;2 (Javel dilue 20x)	36.60		1.76E-09		
	1;2 (Javel dilue 50x)	44.17		1.37E-11	45.50	1.89
	1;2 (Javel dilue 50x)	46.84		2.45E-12		
	1;4 (ExitusPlus)	14.45		2.64E-03	15.20	3.02
	1;4 (ExitusPlus)	12.92		7.05E-03		
	1;4 (ExitusPlus)	13.92		3.71E-03		
	1;4 (ExitusPlus)	13.43		5.06E-03		
	1;4 (ExitusPlus)	13.61		4.52E-03		
	1;4 (ExitusPlus)	14.70		2.24E-03		
	1;4 (ExitusPlus)	13.00		6.70E-03		
	1;4 (ExitusPlus)	21.06		3.78E-05		
	1;4 (ExitusPlus)	19.74		8.83E-05		
	-5	17.51	4.11E-04	3.69E-04	17.35	0.16
	-5	17.32	4.11E-04	4.17E-04		
	-5	17.20	4.11E-04	4.50E-04		
	Controle positif (Exitus)	7.14		2.89E-01	7.67	0.52
	Controle positif (Exitus)	8.17		1.48E-01		
	Controle positif (Exitus)	7.71		2.00E-01		
	Controle positif (Javel)	6.30		4.94E-01	6.62	0.31
	Controle positif (Javel)	6.92		3.32E-01		
	Controle positif (Javel)	6.64		3.97E-01		
	Mastermix	35.09		4.62E-09	35.09	

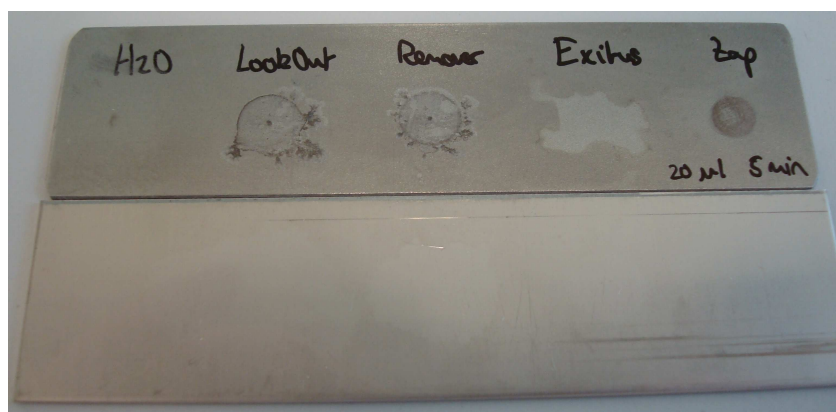
Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build 94)
 Copyright ©2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Annexe 18 : Tests de corrosion (5 et 20 min) par spots



Tests de corrosion (5 min) des réactifs acides sur l'acier (en haut) et l'acier inoxydable (en bas)



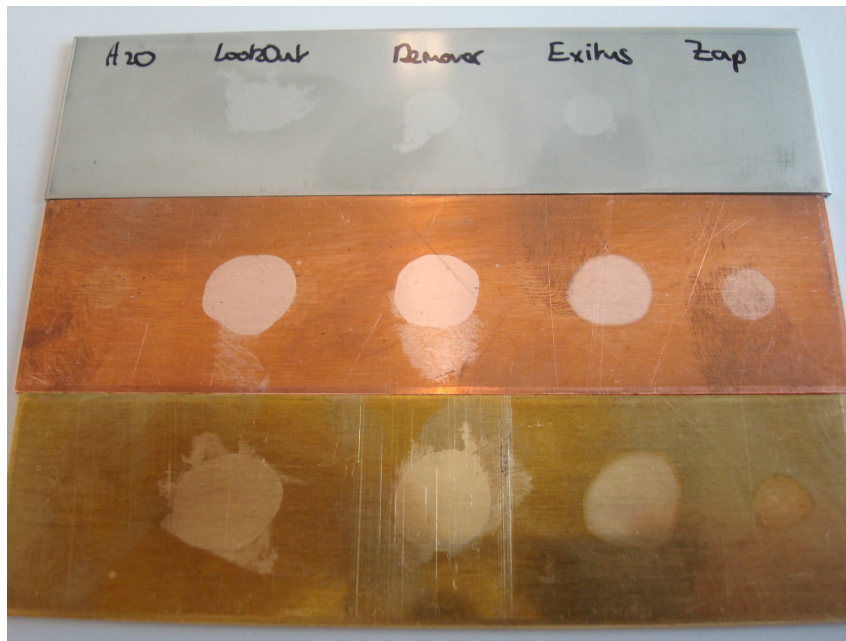
Tests de corrosion (5 min) des réactifs basiques sur l'acier (en haut) et l'acier inoxydable (en bas)



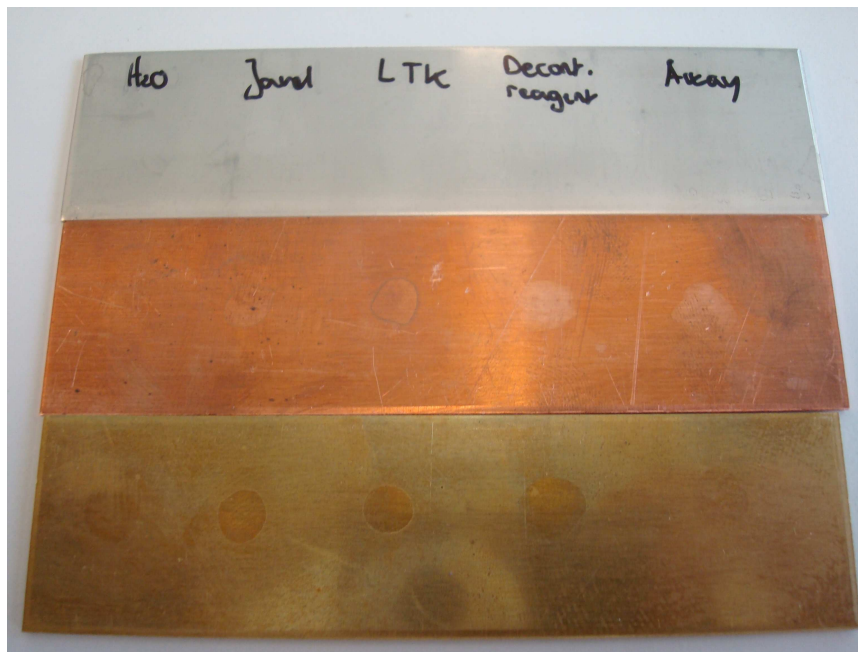
Tests de corrosion (20 min) des réactifs acides sur l'acier (en haut) et l'acier inoxydable (en bas)



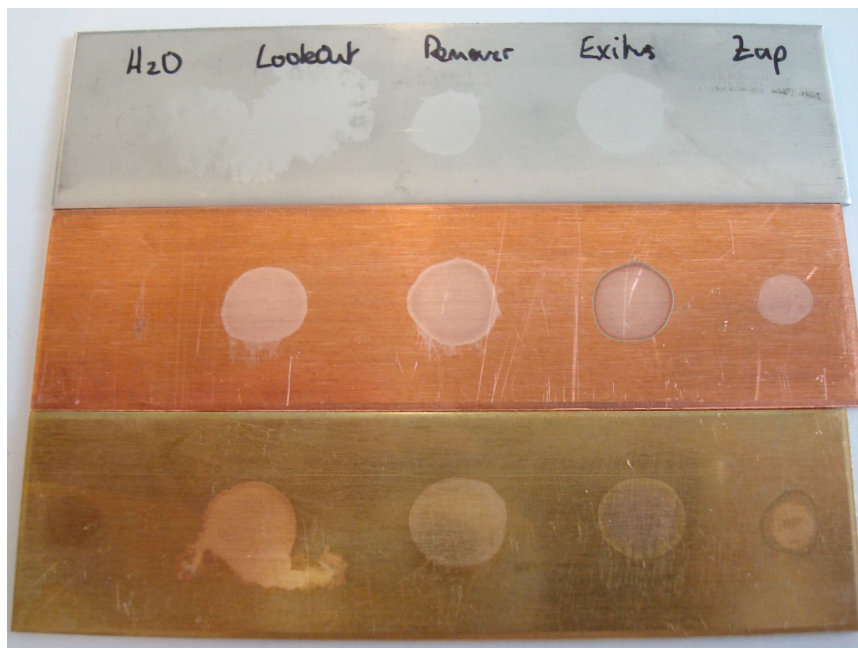
Tests de corrosion (20 min) des réactifs basiques sur l'acier (en haut) et l'acier inoxydable (en bas)



Tests de corrosion (5 min) des réactifs acides sur l'aluminium (en haut), le cuivre (au milieu) et le laiton (en bas)



Tests de corrosion (5 min) des réactifs basiques sur l'aluminium (en haut), le cuivre (au milieu) et le laiton (en bas)



Tests de corrosion (20 min) des réactifs acides sur l'aluminium (en haut), le cuivre (au milieu) et le laiton (en bas)



Tests de corrosion (20 min) des réactifs basiques sur l'aluminium (en haut), le cuivre (au milieu) et le laiton (en bas)