

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Blida 1

Faculté des sciences biologiques
Département de biologie-physiologie cellulaire
Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Génétique et physiologie



Approche de recherche de filiation en empreinte génétique

Réalisé par :

IFTENE Ferial
DJELLOULI Amina

Soutenue devant le jury

M ^{me} CHAKHMA.A	MAAUSDB1	Présidente
M ^{me} BEN AZOUZ.F	MAA USDB1	Examinatrice
M ^{lle} CHERRALLAH.AMCBUSDB1		Promotrice
M ^{me} KHOUAS.L	INGENIEUR	DGSN
PRINCIPAL EN BIOLOGIE		Co-promotrice

Travail réalisé au sein du Département d'Identification Génétique
DIG/SDPST/DPJ/DGSN

Promotion 2016/2017

Sommaire :

Introduction

Chapitre I : Recherche bibliographique

I .L’ADN en criminalistique.....	1
II. L’ADN molécule-clé des sciences médico-légales.....	2
II.1. Polymorphisme de l’ADN.....	2
II.1.1. Polymorphisme de longueur de fragments de restriction RFLP.....	2
II.1.2. Polymorphisme de répétition.....	2
II.1.2.1. Les Mini satellites (VNTR).....	3
II.1.2.2. Les Microsatellites (STR).....	3
II.1.2.3. Polymorphisme d’un seul nucléotide (Les SNPs).....	4
II.2. Typage d’un individu.....	4
II.2.1. Le polymorphisme de l’ADN nucléaire.....	4
II.2.2. Le polymorphisme de l’ADN mitochondriale.....	5
II.2.3. Chromosome Y.....	6
II.3. Mutations somatiques et germinales.....	6
III. Empreinte génétique (profil ADN.....	7
IV. Les analyses préliminaires pour les échantillons prélevés.....	7
(Les indices biologiques permettant une identification génétique.....	7
V. Méthodes d’analyse génétique en criminalistique.....	8
V.1. Les différentes méthodes d’extraction de l’ADN.	9
V.1.1. La méthode d’extraction organique (phénol-chloroforme).....	9
V.1.2. Méthodes d’extractions inorganiques (Chelex).....	10
V.1.3. La méthode d’extraction sur papier FTA	10
V.1.4. La méthode d’extraction en phase solide exemple (PrepFiler).....	10

V.2. Conservation des échantillons.....	10
V.3. Quantification de l'ADN (PCR en temps réel).....	11
V.4. Amplification d'ADN par PCR (PCR multiplex).....	12
V.5. Post amplification (électrophorèse capillaire).	13
V.6.Profil génétique.....	13
V.6.1.Recherche de paternité.....	15
V.6.1.1. Paramètre statistiques de paternité.....	15
V.6.1.1.1.Exclusion et certitude.....	16
V.6.1.1.2 Inclusion et probabilité de la paternité	17
V.6.1.1.3.L'interprétation de la preuve avec le théorème bayes.....	17
V.6.1.1.4.Le logiciel familias.....	17
 Chapitre II : matériel et méthodes	
I -Matériel biologique.....	18
II-Méthodes.....	19
II.1 Extraction de l'ADN à partir de la salive a l'aide du kit Crime PrepAdem-kit....	21
II.2 Quantification de l'ADN par PCR en temps réel.....	21
II.3 Amplification de l'ADN par PCR multiplexe.....	23
II.4 Post amplification (électrophorèse capillaire).....	23
II.5.Profil génétique dans le cadre de la recherche de paternité.....	29
 Chapitre III : résultats et discussion	
I. Inclusion et exclusion de paternité par le calcul de rapport de vraisemblance et l'indice de paternité	32
Conclusion et perspectives.....	40
Références bibliographiques.....	41
Annexe.....	45

Remerciement

Ce travail a été réalisé au sein du département d'identification génétique laboratoire de la police scientifique et technique /direction de la sureté national.

Tout d'abord nous tenons à remercier Monsieur **FERRAGH A**, Contrôleur de police et directeur de la police judiciaire. Le Monsieur **ZEKRI M.**, (Commissaire divisionnaire) de police et sous-directeur de la police scientifique et technique, Monsieur **BRAHITI H.**, Commissaire principal de la police et chef de service du laboratoire de la police scientifique.

Nos remerciements s'adressent également Madame **BELKHIRAT S.**, Ainsi que Monsieur **BENAKMOUM T.**, Commissaire de police et chef de département de l'identification génétique par intérim.

Nous voudrions adresser toute notre gratitude à Madame **KHOUASE L.**, Ingénieur principal au département d'identification génétique, pour le temps qu'elle nous a accordée, sa gentillesse, sa modestie et sa disponibilité, merci infiniment.

Nous tenons à remercier spécialement notre promotrice madame **CHERRALLAH A.**, Nous la remercions de nous avoir encadrés, et surtout de nous avoir prodigué ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nos remerciements s'adressent aussi aux membres du jury Madame **CHAKHMA A.**, et Madame **BEN AZOUZ F.**, pour nous avoir fait l'honneur de juger notre travail.

Nous voudrions exprimer nos remerciements les plus sincères à Monsieur **MOHAMED SAID R.**, Notre chef d'option, pour nous avoir acceptés dans son option.

Un grand merci à mademoiselle **BELBAS S.**, toutes les personnes travaillant au sein du laboratoire central de police scientifique de nous avoir bien accueillies au sein de leur équipe. Un immense merci à vous pour tous vos conseils et pour le temps que vous nous avez accordé.

Nous voudrions exprimer notre reconnaissance envers les amis et collègues qui nous ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de notre démarche.

Dédicaces

*À nos très chers parents, qui ont toujours été là pour nous et
ont tout sacrifié pour nous, n'épargnant ni santé ni efforts.
Nous vous sommes très redevables.*

Liste des abréviations

RFLP : Polymorphisme de Longueur de Fragments de Restriction

VNTR :Variable Number of Tandem Repeats

STR : Short Tandem Repeat

SNPs :Single Nucleotide Polymorphism

ADN mt :ADN mitochondriale

SDS : Sodium DodécylSulfate

PK : Protéinase K

Pb : Paire de Base

PCR : Polymerase Chain Reaction

CE : Electrophorèse Capillaire

ID+ :Identifier plus

NGM :Next Generation Multiplex

DTT :DithioThrèiTol

AB : Applied Biosystems

FRET : (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Taq: ThermophilusAquaticus

UV: Ultra Violet

LR : Likelihood Ration

PSA:Prostate SpécificAntigen

Liste des figures

Figure 1 : Transmission maternelle de l'ADN mitochondrial (reconstituée).....	6
Figure2 : Exemple de profil génétique déterminé à partir d'un prélèvement buccal.....	13
Figure 3 : Représentation schématique de la technologie TaqMan.....	20
Figure 4 : Etapes de la PCR et cycles thermiques.....	21
Figure 5 : Le ladder du kit Identifier.....	26
Figure 6 : Le ladder du kit NGM.....	27
Figure 7 : présentation de logiciel familias.....	28
Figure 8 : Différentes étapes d'utilisation du logiciel Familais.....	33
Figure 09 : Calcul de la probabilité de paternité et du rapport de vraisemblance (LR) pour le 1 ^{er} cas.....	37
Figure 10 : Calcul de la probabilité de paternité et du rapport de vraisemblance (LR) pour le 2 ^{eme} cas.....	38
Figure 11 : Introduction du taux de mutation (0.14%) dans le système D8S1179.....	39
Figure 12 : Calcul de la probabilité de paternité et du rapport de vraisemblance (LR) pour le 3 ^{eme} cas.....	40
Figure 13 : Calcul de la probabilité de paternité et du rapport de vraisemblance (Likelihood Ratio) pour le 4 ^{eme} cas en utilisant le kit ID plus, sans mutation	41
Figure 14: Calcul de la probabilité de paternité et du rapport de vraisemblance (Likelihood Ratio) pour le 4 ^{eme} cas, avec mutation.....	43

Liste des tableaux

Tableau I : présentation des diverses possibilités de combinaisons de génotypes de la mère, de l'enfant et du père présumé dans les tests de paternité.....	14
Tableau II : Composition de la solution de lyse (Echantillon salive).....	19
Tableau III: Composition du Master Mix.....	20
Tableau IV : Loci amplifiés et fluorochromes utilisés par le kit AmpFISTRIdentifiler(AmpFISTR® Identifiler™kitUser's guide).....	22
Tableau V : Loci amplifiés et fluorochromes utilisés par le kit AmpFISTR NGM (AmpFISTR® NGM™kitUser's guide).....	22 23
Tableaux VI : Composition du Master Mix (Kit ID+ /NGM)	24
Tableau VII : Préparation du mix (Post PCR).....	
Tableau VIII : Profil génétique obtenu à partir des prélèvements buccaux de la mère, enfant, père.....	33
Tableaux IX : Préparation de combinaison de génotype de la mère, de l'enfant, et du père présumé(p) et le calcul de vraisemblance.....	34
Tableaux X : Résultat du test de paternité obtenu par le typage des 16 STR du kit (NGM).....	36 38
Tableau XI : Résultat du test de paternité obtenu par le typage des 16 STR du kit (ID+).....	40
Tableau XII : Résultat du test de paternité obtenu par le typage des 16 STR du kit (ID+).....	
Liste des diagrammes :	
Diagramme 1 : Etape d'analyse génétique.....	19
Diagramme 2 : Présentation des affaires traitées.....	2

Résumé

L'empreinte génétique est considérée comme l'une des découvertes médico-légale les plus importantes de notre siècle, basée sur le fait que l'ADN de chaque être humain est unique, le typage par empreinte génétique est aujourd'hui la technique la plus efficace pour l'identification de l'individu.

Dans le cadre d'une recherche de paternité, les empreintes génétiques jouent un rôle crucial lors de l'identification d'un ou plusieurs individus. L'identification d'un même individu, au moyen de son empreinte génétique, repose sur la mise en évidence et la comparaison d'éléments spécifique inclus dans son ADN. La détermination des empreintes génétiques est une méthode fiable qui peut être pratiquée à partir des traces infimes d'origine biologique.

Lors de la réalisation de ce mémoire, nous avons travaillé sur 11 échantillons de 4 cas de familles différentes. Ces échantillons ont été traité afin d'obtenir des profils génétiques analysables puis les résultats ont été exploités par le logiciel Familias pour leur interprétation et validation. En effet, le calcul de la probabilité de paternité a été réalisé grâce à ce logiciel. Ce calcul prend en compte les génotypes du trio (père présumé-mère-enfant) et les fréquences géniques des systèmes considérés dans la population d'origine.

Les calculs des rapports de vraisemblances et de l'indice de paternité nous ont ainsi permis de confirmer la paternité dans $\frac{3}{4}$ familles et de l'exclure dans 1 famille.

Ce résultat montre bien l'efficacité de cet outil (Familias) d'analyse dans le cadre de recherche de paternité et ceci représente un atout intéressant pour le service en charge dans la police Scientifique.

Mots clés : ADN, empreinte génétique, Filiation, probabilité de paternité, logiciel Familias.

Abstract

The genetic fingerprint is one of the most important findings in the history of the human genome, within the framework of year affiliation, the genetic fingerprints play plays crucial role during the identification of one more individuals, the identification of the same individual, by means of its genetic fingerprint, rests on the description and the specific comparison of elements included in its DNA. Genetic fingerprint typing is now the most effective technique for identifying the individual.

During our work, we work done 11 samples of 4 boxes of different families.

Analyze thesis samples were treated in order to obtain genetic profile then the results were exploited by the Familias software for their interpretation and validation.

At the time of parental parenting, the probability calculus of paternity must be established, it is the probability that the alleles obligatorily parental present in the child are well inherited the supposed father and not has man taken randomly in has population.

She takes into account the genotypes of the trio (father supposes-mother child) and the genic frequencies of the systems considered in the population of origin.

Calculations of the carry forwards of probabilities and the index of paternity to customize to confirm paternity in $\frac{3}{4}$ families and to exclude it in 1 family.

This result shows the effectiveness of this tool (Familias) for analysis in the frame of affiliation and this represents year austenite resting for the service in load in the scientific font

This result shows the effectiveness of this tool (familias) for analysis with in the frame work of affiliation and represents an interesting for the service in load in the scientific police

Keywords: DNA, genetic, fingerprint, Filiation, probability of paternity, software Familias.

ملخص

وتعتبر البصمة الوراثية واحدة من نتائج الطب الشرعي وأهم من هذا القرن، استنادا إلى حقيقة أن الحمض النووي لكل إنسان فريد من نوعه، وذلك بكتابة البصمة الوراثية هي الآن الأكثر التقنية فعالة لتحديد هوية الفرد. في أبحاث الأبوة، البصمة الحمض النووي يلعب دورا حاسما في تحديد واحد أو أكثر من الأفراد. ويستند تحديد هوية الفرد نفسه، عن طريق بصماته الجينية، إلى تحديد ومقارنة العناصر المحددة المدرجة في الحمض النووي. البصمة الوراثية هي طريقة يمكن الاعتماد عليها التي يمكن أن تمارس من كميات ضئيلة من أصل بيولوجي.

خلال عملنا، عملنا على 11 عينة من 4 حالات من عائلات مختلفة. تم تجهيز هذه العينات للحصول على مواصفات جينية تحليلها وتعرضوا للاستغلال النتائج وفقا لبرنامج فاميلياس في التفسير والانتماء الأبوي، وحساب احتمال الأبوة ويجب وضع غير احتمالية أن تكون الأليلات الوالدية الحاضرة في الطفل مورثة من الأب المفترض وليس من رجل تم القبض عليه عشوائيا في مجموعة من السكان. فإنه يأخذ في الاعتبار المورثات من الثلاثي (يفترض والد الأم والطفل) وترددات الجين أنظمة النظر فيها سكانا الحسابات تقارير احتمالاتها ومؤشر الأبوة سمح لنا لتأكيد أبوة 3/4 في الأسر والمستبعدين في نتيجة يدل على فعالية هذه الأداة (أسر في) التحليل في سياق الأبوة وهذا يمثل رصيذا للاهتمام لخدمة الشرطة العلمية.

الكلمات الرئيسية: الحمض النووي، البصمات الوراثية، النسب ، احتمال الأبوة برنامج فاميلياس

Introduction

En criminalistique, toute trace de matériel biologique peut en effet faire l'objet d'une analyse permettant l'identification fiable de l'auteur d'un crime, d'une victime. Les substances rencontrées sont nombreuses (sang, sperme, ongle, cheveux, tissus ou dents). Ces éléments permettent l'établissement de profils génétiques, notamment dans le cas de recherche de filiation.

C'est en 1987 que l'analyse génétique a pour la première fois été portée à l'attention du grand public dans les enquêtes policières. Cette technique avait alors été utilisée dans le cadre d'une affaire très médiatisée, au cours de laquelle les éléments de preuve génétiques avaient permis d'obtenir la condamnation d'un délinquant sexuel dangereux et d'innocenter un suspect. L'intérêt, sans cesse renforcé, de l'analyse d'ADN tient au fait qu'elle permet de comparer un grand nombre d'échantillons avec une grande fiabilité (Coquoz, 2003).

Lorsque l'analyse d'ADN est réalisée dans des conditions optimales de fiabilité [...], elle permet une identification pratiquement sans risque d'erreur : « La probabilité la plus souvent citée que deux individus non apparentés aient exactement la même empreinte génétique serait de un sur trente milliards ».

La filiation est le lien judiciaire existant entre enfant et parents. Nous sommes en effet des organismes diploïdes ; il s'agit donc de deux allèles, dont l'un vient du père, l'autre de la mère. Nous disposons donc d'une formule biologique entièrement objective qui va permettre de définir chacun de nous avec précision, à partir seulement d'une trace biologique.

L'objectif de ce travail était de faire une étude préliminaire à partir d'un logiciel familial qui est un programme de calcul des probabilités de la paternité basée sur des données génétiques et d'évaluer ces résultats avec l'étude de sa fiabilité par rapport à une ancienne méthode manuelle.

Notre travail s'articule autour d'une première partie consistant en une étude bibliographique suivie par une description de la méthodologie de travail permettant de répondre à nos objectifs. Par la suite, les résultats de notre étude sont étayés puis discutés avant de poser une conclusion finale.

I.L'ADN en criminalistique

Chaque année, des milliers d'affaires criminelles sont résolus grâce à un témoin biologique silencieux sur la scène de crime (**Butler, 2012**). Jusqu'en 1990 environs, seuls les groupages érythrocytaires et enzymatiques pouvaient être régulièrement effectués pour identifier une tache de sang, de sperme ou de salive.

L'analyse comparative de deux résultats aboutissait :

- soit à une différence donc à une exclusion.
- soit à une absence de différence sans pouvoir se prononcer plus.

En 1987, deux travaux scientifiques allaient modifier cette situation :

- les travaux de Jeffrey retrouvent un polymorphisme au niveau de l'ADN.
- les travaux de Mullis découvrent un moyen simple et rapide pour amplifier certaines parties de la molécule d'ADN.

La conjonction de ces deux travaux permet donc l'utilisation d'un nouveau type d'analyse pour l'identification des cellules dans les années 90 appelé : profil ADN ou empreinte génétique. Ces analyses ont été employées en pratique judiciaire dans les trois principales situations :

- L'identification de corps des cadavres en grande catastrophe
- Teste de paternité /maternité

-L'identification de l'ADN agresseur à partir des cellules qu'il aura laissé sur les lieux de son crime(**Doutremepuich, 2001**). La criminologie est une science qui étudie les facteurs et les processus de l'action criminelle et qui détermine, à partir de la connaissance de ces facteurs et de ces processus, les moyens de lutte pour réduire ce mal social. La criminalistique est composée d'un ensemble de disciplines et de techniques ayant pour objectif la détermination des circonstances exactes de commission d'une infraction ou un crime, de l'identification et de la personnalité de son auteur. La criminalistique met l'accent sur les techniques scientifiques, elle s'adresse surtout aux sciences purement neutres pour découvrir, enregistrer, faire des examens et identifier les preuves(**Kellens, 1998**).

D'une part, elle puise dans cette dernière des données qui l'aident à perfectionner les méthodes d'identification et de recherche des délinquants, d'autre part, et à l'inverse, la criminologie trouve dans la criminalistique des renseignements très précieux pour l'étude du crime et des criminels (**Draft, 2001**).

II. L'ADN molécule-clé des sciences médico-légales

II.1. Polymorphisme de l'ADN

Tous les êtres humains appartiennent évidemment à la même espèce. Ils sont de ce fait génétiquement très proches, voire quasi identique. Les variations interindividuelles de l'information génétique sont très faibles. En d'autres termes, les différences de séquence d'ADN sont très mineures. Il existe malgré tout des variations interindividuelles qui permettent la merveilleuse diversité que l'on peut observer tous les jours. Ces variations interindividuelles affectent en général des caractères biologiques mineurs. Ces variations constituent ce qu'on appelle des polymorphismes (**Coquoz, 2003**).

II.1.1. Polymorphisme de longueur de fragments de restriction RFLP

Les polymorphismes de restrictions RFLP sont les premiers marqueurs génotypiques découverts. Ils ont été décelés chez l'homme dans les gènes de globine (Kan, 1978 ; Jeffreys, 1979), et sont utilisés essentiellement comme outils de détection de mutations ponctuelles délétères (**Botstein et al., 1980**).

Ce sont des variations individuelles de séquences de l'ADN créant ou abolissant un site de restriction. Il s'en suit une modification de la taille des fragments obtenus après digestion par l'enzyme en question. En effet, toute insertion, délétion ou mutation entre les deux sites enzymatiques engendre des différences de tailles des fragments, ce qui caractérise sa variabilité d'un individu à un autre (**Kaplan et Delpeche ; 2007**).

Un RFLP est défini par un couple sonde/enzyme de restriction correspondant à un locus génétique. Celui-ci est mis en évidence par la méthode de Southern Blot ou par PCR-digestion enzymatique (**Botstein et al., 1980**).

II.1.2. Polymorphisme de répétition

C'est en 1985 que l'analyse d'ADN a fait irruption sur la scène de la criminalistique sous la forme de la technique dite des « empreinte génétique » cette irruption était le fruit de la découverte de grandes nouveautés dans notre connaissance d'ADN. Cette nouveauté concerne les séquences répétitives (**Jeffreys, 1985**). Les séquences répétitives présentent une caractéristique précieuse pour la police scientifique puisqu'elles sont le siège d'un très grand nombre de polymorphismes (**Coquoz, 2003**).

II.1.2.1. Les Minisatellites (VNTR)

La découverte des minisatellites par Alec Jeffreys en 1985 a révolutionné l'utilisation de l'ADN en matière d'identification et de filiation (**Jeffreys *et al.*, 1985**).

Le motif de base de ces marqueurs, également appelés VNTR, compte entre 9 et 100 pb (**Nakamura *et al.*, 1987**). Les minisatellites se trouvent plus fréquemment dans les régions subtélomériques des chromosomes (**Royle *et al.*, 1988**) et leur variabilité semble être liée à des recombinaisons méiotiques ("*crossing-over*") inégales et des conversions génétiques (**Jeffreys *et al.*, 1998**). Les VNTRs ont été les marqueurs génétiques les plus utilisés dans le traitement des dossiers médico-légaux et ont connu un très grand succès durant plusieurs années, mais leur utilisation était limitée car ils présentaient un inconvénient majeur qui est la nécessité d'avoir de grandes quantités d'ADN de bonne qualité (**Mansuet Lupo *et al.*, 2007**).

Leur utilisation en génétique médico-légale est maintenant remplacée par les microsatellites ou STRs (**Goodwin *et al.*, 2007**).

II.1.2.2. Les Microsatellites (STR) (Short Tandem Repeat)

STRs sont des polymorphismes de répétition, constitués de motifs nucléotidiques de 2 à 6 pb répétés de 2 à 100 fois les uns à la suite des autres, générant des allèles variant en taille entre 50 et 500 pb. Ils sont localisés dans les régions non codantes de l'ADN nucléaire au niveau des chromosomes et présentent une distribution plutôt uniforme sur le génome avec la présence d'un locus toutes les 6 à 10 kpb (**Weber *et al.*, 1989**).

Le nombre de répétition des STR autosomaux est très variable d'un individu à l'autre, en raison du brassage génétique qu'ils subissent, cette variabilité semble principalement liée à des dérapages de réplication. Leur pouvoir de discrimination élevé fait de ces polymorphismes des marqueurs de choix pour l'identification des individus.

(**Gill *et al.*, 2001**).

Les STR peuvent contenir des répétitions en tandem, de courts motifs, qui seront dinucléotidiques, trinucléotidiques, tetranucléotidique, pentanucléotidiques ou même hexanucléotidique (**Coquoz, 2003**).

II.1.2.3. Polymorphisme d'un seul nucléotide (Les SNPs)

L'analyse de la variation d'une seule base à un point précis du génome est appelé SNPs (**Chakravarti, 2011**).

Les SNP constituent les polymorphismes les plus répandus dans le génome humain. Ils sont stables, très abondants et distribués uniformément dans tout le génome. Ils sont présents sur les régions codantes et non codantes de l'ADN et ce aussi bien sur l'ADN nucléaire que sur l'ADN mitochondrial (**Goodwin, 2007**).

Les SNPs sont considérés comme des marqueurs génétiques stables : ils présentent un taux de mutation bien inférieur à celui des microsatellites ou STR, marqueurs actuellement utilisés pour établir le profil génétique d'un individu. Ce taux moindre de mutations (de l'ordre de 10^{-8} contre 10^{-3}) peut constituer un réel avantage dans les tests de parenté où des mutations qui surviennent sur quelques générations peuvent être sources de confusions (**Sullivan, 2003**).

II.2. Les différents types de polymorphisme

Chaque être humain se distingue de ses semblables par un ensemble de caractéristiques morphologiques et biologiques qui rendent son identification possible. Les techniques utilisées pour mettre en évidence les polymorphismes permettent aujourd'hui d'obtenir, dans de courts délais, des résultats extrêmement précis à partir des échantillons ne contenant qu'une quantité infime de produit biologique (**Canon et al., 2001**).

II.2.1. Le polymorphisme de l'ADN nucléaire

L'ADN nucléaire se retrouve dans le centre de contrôle d'une cellule : le noyau, stocké à l'intérieur de vingt-trois paires de chromosomes.

Les marqueurs polymorphes sont des loci présentant plusieurs allèles qui vont servir de balises le long des chromosomes. Ce sont rarement des gènes mais se transmettent d'une génération à l'autre comme des gènes.

En revanche, la plus grande partie de l'ADN nucléaire ne commande directement aucune synthèse protéique et l'on ignore actuellement sa fonction précise. Dans cette partie non codante, l'analyse a mis en évidence des régions variables : il s'agit de segments d'ADN caractérisés par la répétition en tandem d'unités de base (VNTR « Variable Numbers of Tandem Repeats » et STR « Short Tandem Repeats »).

II.2.2- Le polymorphisme de l'ADN mitochondriale (ADN mt)

En plus de l'ADN nucléaire, il existe un autre type d'ADN au sein des cellules humaines (eucaryote). C'est l'ADN mitochondrial. Il est présent en grand nombre dans les mitochondries et chez les deux sexes. Cependant, il ne s'hérite que de la mère car il se transmet à la descendance à travers l'ovocyte II (**Doutremepuich, 2001**) (**figure1**).

L'ADN mt est un ADN circulaire, dans sa majorité codant à l'exception d'une région non codante de 1000 pb appelés D-loop. L'ADN mt ne contient aucune séquence répétée, le polymorphisme existant étant limité à un seul nucléotide ou (polymorphisme de structure) (**Carracedo et al., 2000**). Il est utile d'avoir recours à l'analyse de l'ADN mitochondrial dans les cas où les échantillons prélevés ne contiennent qu'une faible quantité d'ADN nucléaire de bonne qualité. Car le nombre élevé de molécules d'ADN mt augmente la probabilité de trouver quelques fragments intacts même dans les traces très dégradées qui ne contiennent plus d'ADN génomique (nucléaire), ce qui est le cas dans cheveux (sans racine) qui sont perdus naturellement (**Higuchi et al., 1988**).

Le génome mitochondrial a été séquencé par Anderson et ses collaborateurs en 1981. Lorsque deux individus choisis de façon aléatoire sont comparés, il y a en moyenne huit différences de bases entre les deux (**Piercy et Coll, 1993**).

L'inconvénient potentiel de cette technique est sa grande complexité en raison notamment d'une possible hétéroplasmie, et le fait qu'elle est très sensible aux contaminations de toutes origines. En outre, sa mise en œuvre est longue et coûteuse et le pouvoir discriminant des résultats obtenus est moindre en comparaison à celui offert par l'analyse de l'ADN nucléaire (**Schuller Werner et al., 2001**).

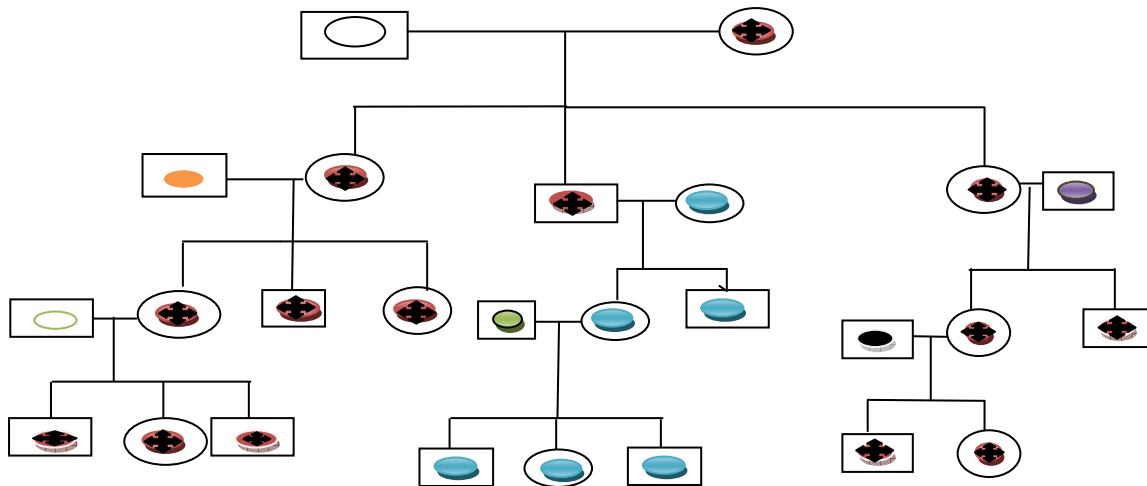
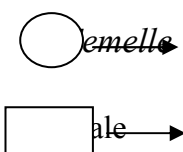


Figure 1 : Transmission maternelle de l'ADN mitochondrial (reconstituée).



Présentation d'un arbre généalogique à 4 générations qui montre la transmission maternelle de l'ADN mitochondrial. Les individus sont marqués soit par des ronds (individus féminins) soit par des carrés (individus masculins). Chaque individu porte un ADN mitochondrial représenté par un petit cercle dont l'espèce varie selon les types d'ADN mt. L'ADN mitochondrial de l'arrière-grand mère, symbolisé de façon à être reconnaissable à travers les générations, se retrouve identique chez un grand nombre d'individus de cet arbre (●).

II.2.3. Chromosome Y

L'ADN microsatellite peut être étudié sur le chromosome Y. Ce chromosome ne possède pas de chromosome homologue. Il est hérité par la lignée paternelle, il passe de père en fils de façon relativement stable. C'est donc l'antithèse directe de l'ADN mitochondrial en terme médico-légale. Le chromosome Y est utile pour discerner la paternité biologique d'enfant de sexe masculin. Cependant, il n'est pas totalement fiable pour affirmer cette paternité car le père présumé possède les mêmes chances de transmettre le chromosome Y que ses frères, son père, ses oncles paternelle, et son grand père (Doutremepuiche, 2001).

II.3. Mutations somatiques et germinales

Il existe des mutations somatiques qui affectent les cellules d'un tissu ou d'un organe et des mutations germinales qui affectent les gamètes de la lignée germinale. Les mutations somatiques ne sont pas transmises à la descendance.

De ce fait, connaître le taux de mutations affectant la lignée germinale dans la population générale est important dans le cas de recherche de paternité ou de filiation. Le taux de mutation des loci STR est déterminé en examinant la transmission des STR entre les parents et leurs descendance sur un échantillonnage de taille importante car le taux de mutation des STR utilisés en génétique criminalistique est relativement faible. Les mutations affectant la lignée germinale paternelle semblent plus fréquentes que celles affectant la lignée maternelle. Le taux moyen de mutations des loci STR utilisés en identification humaine est inférieur à 0.1% (Weber et wong, 1993).

III. Empreinte génétique (profil ADN)

Le typage de l'ADN a été considéré comme la découverte la plus extraordinaire du vingtième siècle. Cette technique est connue également sous le nom «d'empreinte génétique». Les empreintes génétiques sont utilisées en médecine légale pour identifier ou innocenter des suspects. Il est donc possible d'établir un profil génétique à partir de toute sécrétion ou de tout tissu du corps humain. Les traces biologiques les plus fréquemment rencontrées et analysées en science forensique sont le sang et le sperme. D'autres échantillons biologiques peuvent aussi constituer une source possible d'ADN, tels que la salive, les os et tissus musculaires (Butler et al, 2003).

Les empreintes génétiques peuvent également être utilisées dans les tests de paternité pour identifier les parents biologiques d'un enfant ou à la suite d'accidents graves, de catastrophes ou de guerres pour identifier les morts.

IV. Les analyses préliminaires pour les échantillons prélevés (Les indices biologiques permettant une identification génétique)

Il existe deux types d'indices biologiques, l'un dit <trace> prélevé sur les lieux du crime et l'autre dit <comparaison> prélevé sur les personnes connues (suspect, victime ou parents).

- **La Salive :** La substance la plus spécifique de la salive dont nous disposons actuellement est l'amylase qui est une enzyme spécifique pour la dégradation de l'amidon. Le test phadebas utilise l'amidon insoluble auquel ont été attachées des molécules de colorant bleu comme substrat. Pour détecter la présence d'amylase sur un prélèvement donnée, il suffit d'observer l'intensité du bleu dans le liquide (surnageant) après incubation et centrifugation(**Coquoz, 2003**).
- **Le Sang :** Les traces de sang peuvent être nettoyées et ainsi devenir invisibles à l'œil nu. Par ailleurs, l'hémoglobine, présente à raison de 15 grammes par litre de sang, a tendance à rester fixée sur les tissus. Il existe donc des méthodes de révélation des zones tachées de sang :

L'eau oxygénée est un moyen de mettre en évidence la présence de sang (test kastel Mayer (**Peltier, 2011**)).

- **Le sperme :** Le sperme est principalement constitué de spermatozoïdes mais également de cellules épithéliales et des globules blancs baignant dans le plasma séminal. Du point de vue criminalistique, dans le cas d'agression sexuelle, on peut prélever ce liquide sur des vêtements ou directement sur la victime pour repérer ces taches invisibles à l'œil nu, mais on peut également utiliser un crimescope. Pour identifier le sperme, on effectue le test PSA (**ForensicSci Int, 1982**).

La PSA (Prostate SpécificAntigen) est une protéine produite par la prostate. Sa spécificité pour le sperme humain est établie, sa concentration dans le sperme est d'environ 1,5 mg/ml. Sa sensibilité est telle que du sperme dilué 200 000 à 1000 000 fois donne encore un résultat positif (**Hochmeisteretal.,1999**).

- **Les éléments pileux :** Les cheveux et les poils peuvent également faire l'objet d'une analyse, notons néanmoins que l'étude de l'ADN nucléaire présente au niveau de la racine du cheveu, est en général décevante car l'ADN y est souvent en trop petite quantité, on a donc le plus souvent recours à l'analyse de l'ADN mitochondrial (**Histotechnol, 2004**).

V. Méthodes d'analyse génétique en criminalistique

V.1. Les différentes méthodes d'extraction de l'ADN

Les processus chimiques des analyses d'ADN sont facilement inhibés par toutes sortes de substances interférentes que l'on trouve dans les traces biologiques. Il est donc en principe nécessaire non seulement de dissoudre l'ADN des traces, mais également de le purifier des autres éléments potentiellement interférents. Diverses méthodes sont possibles et de nombreux kits sont disponibles pour réaliser les opérations d'extraction et de purification de l'ADN (Coquoz, 2003).

V.1.1. La méthode d'extraction organique (phénol-chloroforme)

L'extraction organique, parfois appelée extraction au phénol chloroforme, a été pendant de nombreuses années la méthode la plus utilisée pour l'extraction de l'ADN (Butler, 2010).

Dans ce procédé, les globules rouges qui ne contiennent pas d'ADN sont lysés par rupture physique de leurs membranes cellulaires. L'extraction organique implique l'addition en série de plusieurs produits chimiques. Les cellules sont ensuite lavées et traitées avec de la protéinase K et du (SDS) pour rompre les membranes cellulaires et décomposer les protéines qui protègent les molécules d'ADN quand elles sont dans les chromosomes.

L'étape de purification et d'extraction d'ADN utilise les solvants organiques (le phénol-chloroforme). La récupération des acides nucléiques se fait en général par une élution, ou par une précipitation. La précipitation est le plus souvent réalisée par l'alcool éthylique absolu (Kobilinsky *et al.*, 2011).

V.1.2. Méthodes d'extractions inorganiques (Chelex)

Chelex®, est une méthode basée sur l'échange d'ions, rapide, efficace et moins sujette à la contamination, que d'autres techniques d'extraction d'ADN (Rogers *et al.*, 2007).

Une méthode de préparation de l'ADN permet de procéder à la lyse cellulaire et à la purification du matériel génétique dans un seul tube. Cette méthode utilise la résine échangeuse d'ions Chelex® 100 et consiste en un bris cellulaire par le chauffage à de hautes Températures (100°C) et à la liaison des composés 'Non-ADN' à la résine.

V.1.3. La méthode d'extraction sur papier FTA

FTA® est un traitement chimique sur papier Whatman qui permet l'extraction d'ADN et son stockage rapide. Grâce aux accessoires de prélèvement contenus dans le kit lorsque les échantillons sont appliqués sur du papier FTA®, la lyse cellulaire s'effectue et l'ADN de haut poids moléculaire est immobilisé dans la matrice. Ainsi l'ADN est protégé contre les actions des nucléases, des UV, des attaques fongiques ou bactériennes, et des oxydations. La carte FTA® peut alors être transportée à température ambiante jusqu'au laboratoire ou bien stockée à température ambiante en vue d'une analyse ultérieure. Cette carte permet plusieurs prélèvements à la fois. La méthode de prélèvement par carte FTA® est donc une méthode en deux temps permettant la conservation mais aussi la préparation à l'amplification génique. Pour effectuer une analyse il suffit de découper une rondelle de papier ou « punch » avec un emporte-pièce et de le placer dans un microtube. Après quelques étapes de lavage et de rinçage, il suffira d'ajouter les réactifs d'analyse par PCR pour analyser l'ADN présent à la surface du papier (Cheung, 2008).

V.1.4. La méthode d'extraction en phase solide

L'ADN est sélectivement lié à un substrat tel que des particules de silice. Les molécules d'ADN sont alors retenues alors que les protéines et d'autres composants cellulaires sont élués par lavage, ensuite, l'ADN est libéré sous une forme purifiée.

PrepFiler est une technique d'extraction en phase solide qui a été validée et permet l'isolement de l'ADN de haute qualité avec des rendements élevés principalement en raison du fait qu'une petite taille des billes est utilisée pour fournir une plus grande surface pour capturer des molécules d'ADN au cours du processus d'extraction (Barbaro *et al.*, 2009).

V.2. Conservation des échantillons

Afin de ralentir sa dégradation, le matériel biologique doit être conservé dans des conditions favorables à basse température et loin de l'humidité. Au sein d'un laboratoire, les échantillons d'ADN sont stockés dans un réfrigérateur à 4°C pour une conservation de courte durée, à -20°C et à -70°C pour une conservation de longue durée (Caenazzo, 2009).

V.3. PCR en temps réel

Après avoir identifié, prélevé la trace biologique, l'ADN est extrait et purifié, puis on le quantifie par une réaction de polymérisation en chaîne ou (PCR en temps réel).

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction (**Bustin, 2000**).

Le processus complet est donc automatisé du début à la fin rendant ainsi cette technologie intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle (**Martell et al, 1999**).

V.4. Amplification d'ADN par PCR multiplex

Amplification sélective d'une séquence d'ADN double-brin, effectuée in vitro par extension itérative de deux amorces, situées de part et d'autre de la région considérée, grâce à une ADN polymérase. L'amplification est effectuée par la répétition de cycles de dénaturation/hybridation/extension qui assure une duplication exponentielle de chaque brin d'ADN (**Doutremepuich, 2001**).

La PCR multiplex utilise des paires multiples d'amorces pour amplifier simultanément un grand nombre de séquences (**Atlas et Bey., 1994**).

La PCR peut utiliser pour copier simultanément plusieurs fragments d'ADN. La zone copiée est spécifiée par une paire d'éléments du mélange réactif (amorce), pour copier simultanément plusieurs zones d'ADN il suffit d'ajouter plusieurs paires d'amorces de différentes couleurs correspondant chacune à une zone d'ADN à copier (**Coquoz, 2003**).

Il y a de nombreuses difficultés pour amplifier les échantillons d'ADN provenant de scènes de crime qui vont affecter le processus d'amplification par PCR, c'est les inhibiteurs présents dans les échantillons eux-mêmes. Dans la scène on peut trouver des fluides corporels tels que sang et le sperme sur le sol, le sable, le bois ou la litière de feuilles qui contiennent des substances qui peuvent co-extraire avec l'ADN d'agresseur et empêcher l'amplification par PCR (**Butler, 2012**).

V.5. Post amplification (électrophorèse capillaire)

L'électrophorèse est une technique physicochimique qui sépare des constituants ionisés dans un champ électrique. Depuis une vingtaine d'années, le développement de supports migratoires (gels de polyacrylamide, d'agarose et capillaire de silice) a donné à l'électrophorèse un nouvel essor (**Butler *et al.*, 2001**).

L'électrophorèse capillaire (CE) est la principale méthode utilisée pour séparer et détecter les allèles courts de répétition en tandem (STR) dans des laboratoires d'ADN médico-légal dans le monde entier. Elle est (CE) caractérisée par l'homogénéité de la solution tampon et la constance du champ électrique sur toute la longueur du capillaire. La séparation en électrophorèse capillaire est basée sur la différence de mobilités électrophorétiques dues à la différence de taille (**Butler *et al.*, 2004**).

V.6. Profil génétique

Le profil génétique d'un individu est unique et spécifique (en dehors des cas de jumeaux). Il existe statistiquement moins d'une chance sur plusieurs milliards pour rencontrer deux profils génétiques identiques issus de deux êtres distincts. Le nombre de répétitions dont on a parlé précédemment engendre les variations de taille appelées allèles. Bien qu'il existe une multitude d'allèles pour un marqueur particulier, un individu ne peut avoir que deux allèles (soit homozygote ou hétérozygote) pour un marqueur particulier. Pour la description d'un profil ADN comprenant tous les marqueurs d'un type multiplex, il suffit de mentionner les numéros des allèles détectés pour ces marqueurs (**Coquoz, 2003**).

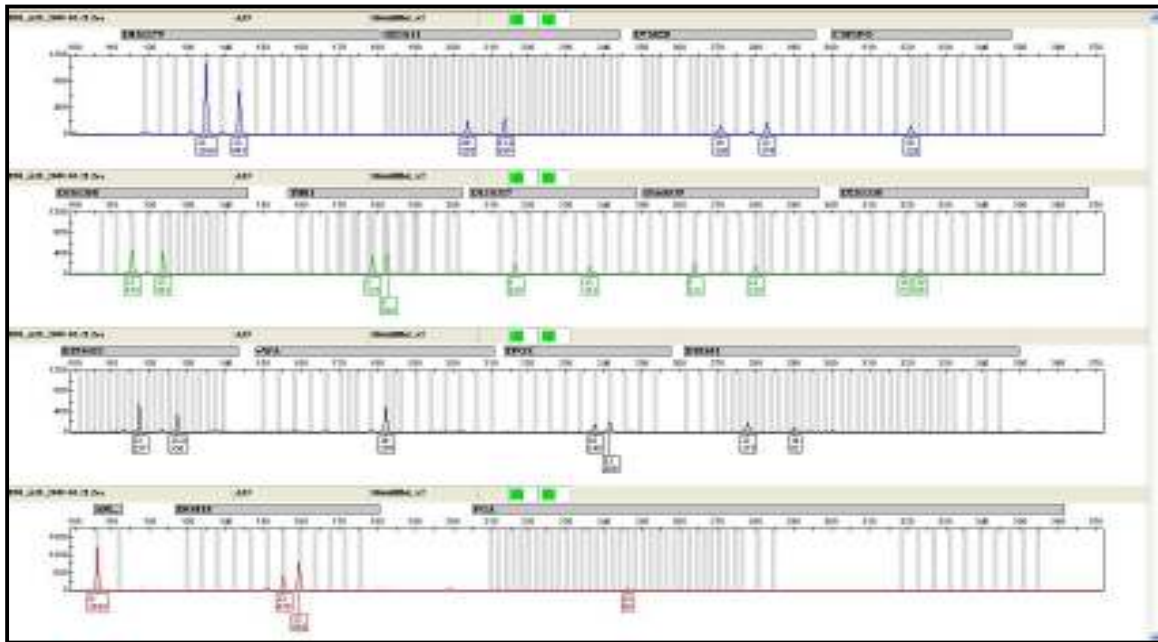


Figure2 : Exemple de profil génétique déterminé à partir d'un prélèvement buccal (reconstitué)

V.6.1. Recherche de paternité

L'expertise en recherche de paternité se constitue d'un trio mère-enfant-père présumé, ou d'un duo enfant père. Dans le cas de recherche de paternité, la probabilité de paternité est calculée. C'est la probabilité que les allèles obligatoirement paternels présents chez l'enfant soient bien hérités du père présumé, par rapport à une hypothèse qui serait d'être hérités d'un homme pris au hasard dans la population, elle prend en compte les génotypes du trio père présumé-mère-enfant et les fréquences génique des systèmes considérés dans la population d'origine (Coquoz et taroni., 2003)(TableauI).

Tableau I : présentation des diverses possibilités de combinaisons de génotypes (**a,b,c** : allèles) de la mère, de l'enfant et du père présumé dans les tests en paternité, ainsi que les rapports de vraisemblance correspondants. ces rapports présupposent l'absence de lien de paternité entre le père présumé et le père biologique (**Coquoz, 2003**).

Génotype de la mère	Génotype de l'enfant	Génotype du père présumé	Rapport de vraisemblance
a/a	a/a	a/a	1/Pa
“	“	a/b	1/2Pa
“	a/b	b/b	1/Pb
“	“	a/b b/c	1/2Pb
a/b	a/a	a/a	1/Pa
“	“	a/b a/c	1/2Pa
“	a/b	a/b a/a	1/(Pa+Pb)
“	“	a/c	1/2(Pa+Pb)
“	a/c	c/c	1/Pc
“	“	c/d a/c b/c	1/2 Pc

V.6.1.1.Paramètre statistiques de paternité

V.6.1.1.1. Exclusion et certitude

Le pouvoir d'exclusion exprime la capacité d'un système d'analyse de disculper un homme faussement accusé d'une paternité. Le pouvoir d'exclusion d'un locus peut être calculé de façon approximative à partir de l'hétérozygotie.

La proportion d'hommes exclus est une valeur basée sur le couple considéré mère-enfant et exprime la capacité de cette paire spécifique donnée d'exclure un non-père. La proportion d'hommes exclus ne dépend pas du phénotypes de la mère et de l'enfant. Elle est basée sur les méthodes de calcul, et dans la proportion d'hommes qui ne peuvent pas être le père biologique de l'enfant désigné.

L'exclusion de la paternité s'apprécie donc en termes de certitudes(**coquoz et taroni, 2006**).

V.6.1.1.2.Inclusion et probabilité de la paternité

Dans le cas d'inclusion, la présence d'un allèle commun entre l'enfant et le père présumé n'est pas une preuve de paternité formelle. L'inclusion de la paternité est donc évaluée en termes de probabilité. Les règles de la génétique des populations et les lois de Mendel permettent le calcul des probabilités conditionnelles sous l'hypothèse de paternité vérifiée nommée "P", et de non paternité nommée "NP".

P sera donc la probabilité d'observer un trio père-enfant-mère porteur des génotypes du père présumé d'une part et d'autre part de la mère et de l'enfant étudiés.

Le rapport de ces deux probabilités conditionnelles est un rapport de vraisemblance transmission allélique au sein de la population (**Coquoz et Taroni., 2006**).

Cet indice intègre la notion de trio mère-enfant-père. Le calcul de ces différentes probabilités se fait par le rapport de vraisemblance (liklihood ratio LR) qui correspond à l'indice de paternité (**Goodwinet al., 2011**).

Son calcul repose sur les génotypes de père présumé, de la mère, de l'enfant, sur les fréquences géniques de la population d'origine des sujets et sur le théorème de Bayes.

Ce théorème de Bayes permet de modifier la probabilité de l'hypothèse : cet homme est bien le père de cet enfant. La probabilité conditionnelle de ces résultats est en effet différente Sous l'hypothèse de paternité et sous l'hypothèse de non-paternité.

On la calculera donc d'une part en supposant que cet homme est bien le père biologique, d'autre part en supposant que le père biologique est un homme pris au hasard dans la population. Ainsi, le laboratoire fournit les génotypes sous une autre formulation, le rapport P/NP sera dit indice de paternité.

Cette formule mathématique se pose avec un choix initial d'une probabilité à priori neutre c'est-à-dire 50 chances sur 100 en faveur de la paternité du père présumé et 50 chances sur 100 en faveur de sa non-paternité.

Le résultat, nommé ici PP, est donc la probabilité de paternité a posteriori. Si le nombre de systèmes de polymorphisme étudié est suffisant, PP atteint une valeur significative, discriminative élevée, de l'ordre de 0,99999, soit 99,999% (**Coquoz et Taroni,2006**).

V.6.1.1.3 l'interprétation de la preuve avec le théorème de bayes (le modèle bayésien)

Il s'agit de raisonner sur la probabilité des causes et non sur celle des effets. Dans l'investigation, les enquêteurs ou les scientifiques exercent une logique inductive et réalisent des inférences inductives. Ils partent de l'observation des faits et émettent une conclusion sur leur déroulement. Cette conclusion n'est pas certaine, elle doit donc être présentée avec des probabilités.

Dans une enquête, deux hypothèses sont mise en compétition (**Coquoz et Taroni,2006**).

Il s'agit donc d'évaluer leur vraisemblance respective. Ces deux hypothèses sont :

- 1)-H1 : le père présumé est le père biologique de l'enfant.
- 2)-H2 : un autre homme inconnu est le père biologique de l'enfant.

Chacune de ces hypothèses a une certaine probabilité d'être vraie. Les valeurs de ces probabilités P(H1) et P(H2) sont appelées des probabilités à priori. Ces dernières risquent d'être modifiées par une nouvelle information (E) faites à la suite d'examens qui risquent fort de modifier notre conviction quant à la véracité des deux hypothèses. On parle alors de probabilités à posteriori : P(H1/E) et P(H2/E).

Vient ensuite l'étape d'évaluer l'observation (E) est vraisemblable, ce qui est réalisé à l'aide du rapport de vraisemblance RV (likelihood ration=LR) $LR=RV=\frac{P(E/H1)}{P(E/H2)}$

- Si $RV=1$ la preuve n'est pas pertinente
- Si $RV<1$ le résultat soutien l'hypothèse 2.
- Si $RV>1$ le résultat soutien l'hypothèse 1.

V.6.1.1.4. Logiciel familias

Le programme Familias utilisé pour calculer les probabilités dans les cas où les profils d'ADN de certaines personnes sont connus, mais leur relation familiale est douteuse. Familias prévoit plusieurs arbres généalogiques (ou pedigrees) alternatifs pour un groupe de personnes, base de données d'observations d'ADN dans la population pertinente. Jusqu'à présent, familias a la capacité à traiter des cas complexes où les mutations potentielles, les allèles silencieux et la stratification de la population sont pris en compte, ainsi que sa capacité à gérer plusieurs arbres généalogiques simultanément.

Le calcul de la probabilité de paternité est plus simplifié par l'utilisation du logiciel familias. Ce logiciel est utilisé dans les cas où l'on veut déterminer si un homme est le père d'un certain enfant. En général, on aurait des données génétiques pour l'enfant, la mère et le père présumé. On aurait également besoin de bases de données avec les fréquences pour les allèles observés dans la population concernée. Le programme calculera les chances pour le père présumé étant le vrai père. Dans de tels cas de paternité, on peut dire qu'il y a deux hypothèses alternatives: l'un où l'homme est le père et celui où il ne l'est pas. Le logiciel a la capacité par conséquent de calculer les chances pour n'importe quelle paire de pedigrees alternatifs. Ainsi, il peut être utilisé pour calculer si un oncle est en effet un oncle, que deux filles soient en effet des sœurs, etc. En fait, plusieurs hypothèses différentes peuvent être traitées (Klinget *al.*, 2014).

Notre travail a été réalisé au sein du département d'identification de laboratoire Central de Police scientifique a Chevalley, Alger. Pendant une durée de 3 mois.

L'objectif de ce travail était de faire une étude préliminaire à partir d'un logiciel familial qui est un programme de calcul des probabilités de la paternité basée sur des données génétiques et d'évaluer ces résultats avec l'étude de sa fiabilité par rapport à une ancienne méthode manuelle.

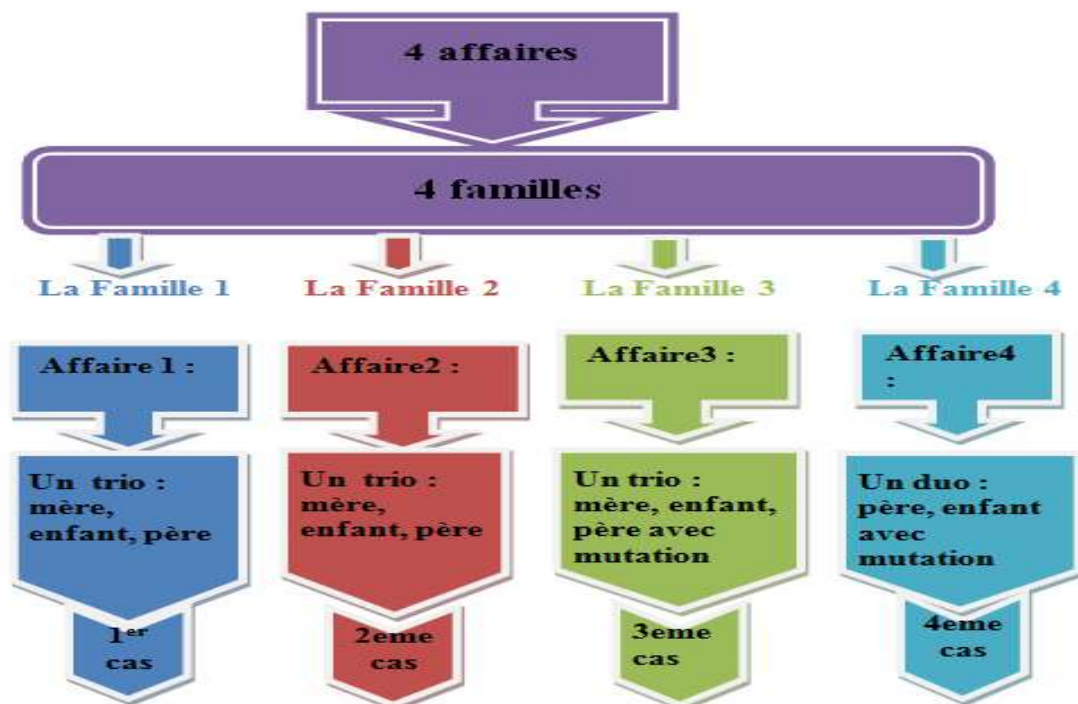
Notre étude a porté sur des échantillons constitués de prélèvements buccaux, la plupart de ces échantillons ont été prélevés à la demande des autorités judiciaires dans le cadre de recherche de paternité.

I- Prélèvements et préparation des échantillons

I.1-Matériel biologique

Nous avons eu à traiter 4 cas d'affaires comportant onze échantillons constitués de prélèvements buccaux (salive) issues de 4 familles dont un cas duo et trois cas trios (avec et sans mutation). Ces échantillon ont été prélevés directement sur les individus et ont été analysés pour les marqueurs STR, en utilisant deux kit NGM et Identiflier plus (ID+).

Avant chaque manipulation, il est nécessaire de porter un masque, une charlotte et des gants stériles afin d'éviter tout type de contamination.



Digamme 2 : Présentation des affaires traitées.

Avant que l'ADN ne soit analysé, nous avons fait une extraction de ce dernier à partir de la salive obtenus de ses personnes.

La méthode d'extraction de l'ADN la plus classique et la méthode organique, basée sur l'utilisation de solvants organiques (phénol, et le chloroforme) qui est néanmoins toxique, toutefois, d'autres méthodes sont commercialisées sous forme de kits, dans notre cas on a utilisé le kit (**Crime PrepAdem-kit**), qui offre une rapidité et facilite l'extraction et la purification de l'ADN, par la suite nous avons fait une quantification de l'ADN par PCRrt, et après l'amplification du matériel génétique à l'aide de le PCR mutiplexe cette PCR à été réalisée par deux kits (NGM et Identifier plus), et à la fin on a obtenus les profils génétiques par l'électrophorèse capillaire, ces profils génétiques ont été traités pour confirmé la paternité ou son exclusion.

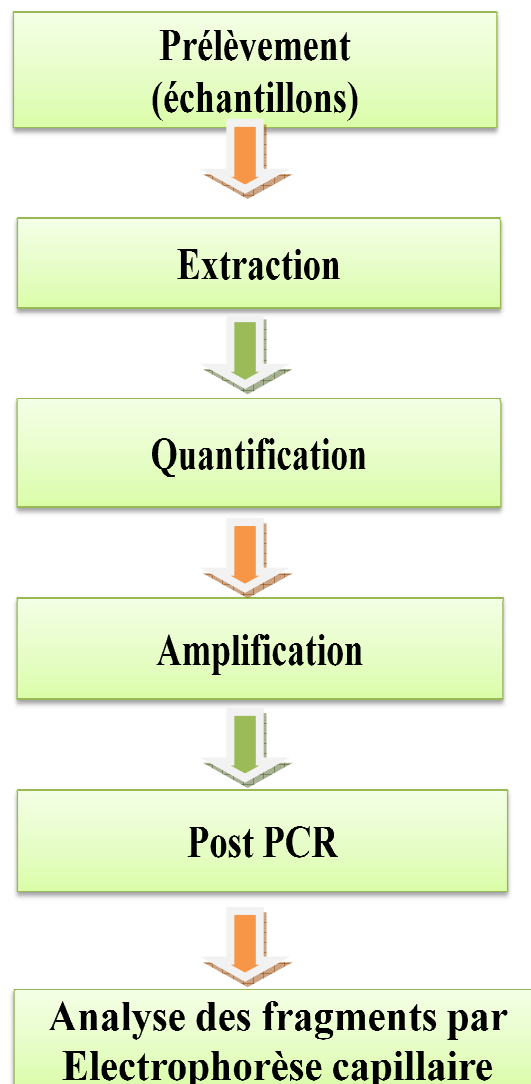


Diagramme1 : Etapes de l'analyse génétique

I .2.Prélèvements de la salive

A l'aide d'un écouvillon stérile, chaque participant est prélevé à partir de la cavité buccale. Un numéro identifiant est attribué à chaque écouvillon.

I .3.Mise en tube des prélèvements

Chaque échantillon est mis dans un tube eppendorf, un numéro ADN est attribué, puis vient l'étape d'extraction d'ADN.

II-Méthodes

II.1 Extraction de l'ADN à partir de la salive à l'aide du kit Crime PrepAdem-kit

- Protocole

Pour commencer, la solution de lyse est préparée selon le tableau (**tableau II**).

- Ajouter 454.5 µl de la solution de lyse (le crime Lysis Buffer) à l'échantillon, et les tubes sont placés sur un agitateur chauffant puis incubé à 56°C à 1000 rpm pendant 60minutes.
- Essorer les échantillons en utilisant un tube passoire (spin basket), puis 50 µl du lysat sont prélevés pour la suite de l'extraction.
- Ajouter respectivement au lysat 250 µl de LB Buffer, et de l'isopropanol, mélanger en pipetant et repipetant.
- Ajouter 15 µl de billes magnétique (Prep-ADembeads) dans les tubes contenant le lysat.
- Incuber à température ambiante (agitateur) à 1000 trs/min pendant 10 min.
- Placer les tubes contenant les échantillons et les billes magnétiques sur le portoir magnétique pendant 5 min. Après fixation de l'ADN aux billes magnétiques on élimine le surnageant.
- Laver les billes magnétiques avec les tampons de lavages (3 lavages consécutifs sont nécessaires), donc le 1^{er} lavage est effectué en ajoutant 500 µl du WASHING BUFFER1. Les tubes contenant le lysat et les billes magnétiques sont mis sur le portoir magnétique pendant au moins 5 min. Tout en les gardant sur ce dernier, le surnageant est éliminé, en faisant attention à ne pas toucher la paroi des tubes.
- Effectuer le 2^{ème} et le 3^{ème} lavage respectivement avec le WASHING BUFFER 2 et l'Ethanol 70%. Tout en repétant les étapes réalisées lors du 1^{er} lavage.
- Laisser les tubes séchés sur le portoir magnétique sous une hotte pendant au moins 5min à température ambiante.

- Ajouter 60 μ l du tampon d'élution (Elution Buffer), puis une agitation est réalisée pendant 10min à 75°C et à 1000 trs/min et les tubes sont remis sur le portoir magnétiques pendant 5 min.
- A la fin, isoler le surnageant contenant l'ADN génomique, est le transféré dans des tubes neufs puis 6 μ l sont aliquoté pour la quantification et le reste est conservé à -20°C (**Tableau II**).

II.2 Quantification de l'ADN par PCR en temps réel (RT-PCR)

- Principe

La quantité d'ADN présent dans chaque extrait peut varier de manière importante suivant les échantillons et les supports utilisés mais également d'une extraction à une autre à partir d'un même échantillon. Par conséquent, comme étape préalable à toute amplification nous avons réalisé la quantification de l'ADN présent dans nos extraits à l'aide du kit quantifier (AB) et de l'appareil de détection 7500 Fast Real-time PCR system (AB).

Les sondes taqman est un oligonucléotide spécifique d'un morceau interne à la séquence amplifiée, marquée avec un fluorphore. La technologie taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible hTERT (un fragment de 62 pb localisé en 5 p15.31 couplant pour la télomerase reverse transcriptase humaine) sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR.

Un fluorochrome émetteur appelées « Reporter » est fixée a l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome supprimeur présent à l'extrémité 3' appelées « Quencher ». Lorsqu'il est stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome supprimeur voisin par le principe FRET qui dissipe cette énergie sous forme de fluorescence qui sera détectée au niveau d'une camera. L'augmentation du signal correspondant à la composante du fluorophore Reporter est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR (**figure1**).

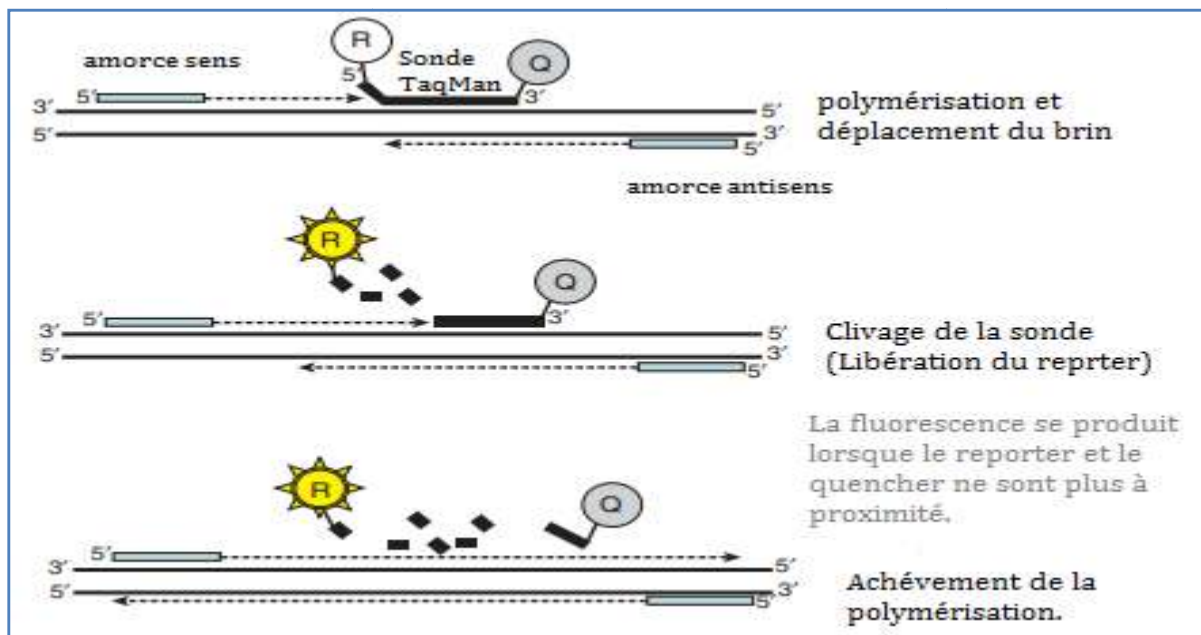


Figure3 : Représentation schématique de la technologie TaqMan(Butler, 2005).

- Protocole

- Préparer la courbe d'étalon : à partir de l'ADN standard 200ng/μl et procéder aux dilutions. Préparer ensuite le Master mixte dans un eppendorf selon les calculs(**Tableau III**).
- Répartir 23μl de ce Master mix dans une microplaque PCR de 96puits, et ajouter 2μl de chaque échantillon (ADN). Recouvrir la plaque avec un film adhésif transparent, centrifuger, et placer dans un thermocycler (7500 Fast) et lancer le programme.

II.3 Amplification de l'ADN par PCR multiplexe

- Principe

La PCR multiplexe présente l'avantage de l'utilisation de plusieurs amorces au sein de la même réaction. En conséquent, la possibilité de multiples amplifications à sélectivité dirigée (**Figure2**). La disponibilité des marqueurs fluorescents a permis le développement de multiplexes capables d'amplifier et d'analyser plus de 20 STR (**Bluter, 2007**).

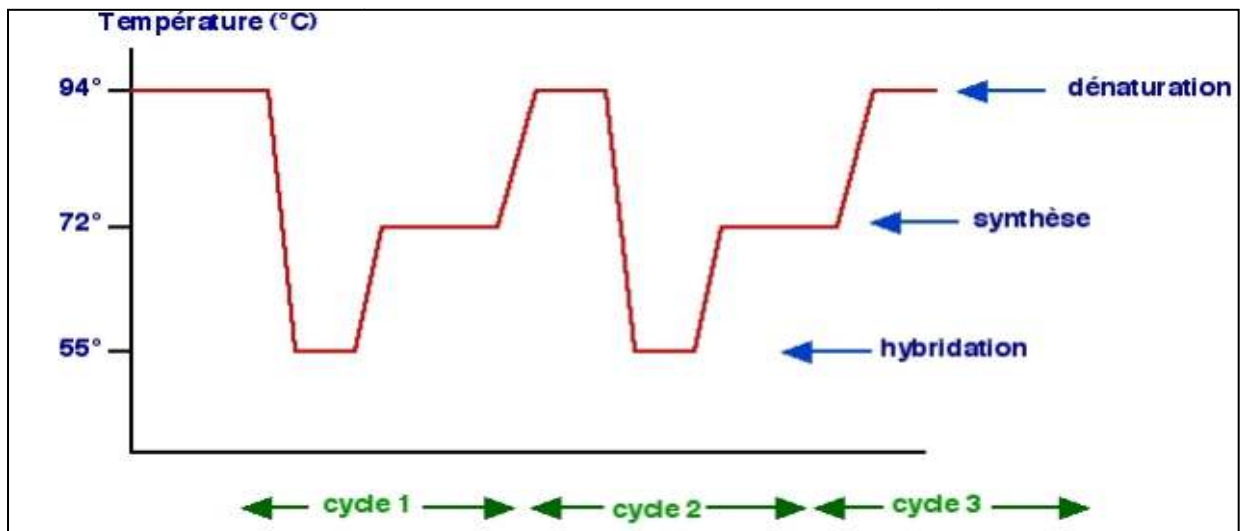


Figure4 : Etapes de la PCR et cycles thermiques(Bluter, 2007).

Dans notre travail, la PCR a été réalisée par deux kits AmpFISTRIdentifiler plus (ID +)(Tableau IV), et le kit NGM (tableau V). Par co-amplification, de 15 LociSTRs qui sont des répétitions tétra nucléotidiques en tandem, en plus de l'Amélogénine (marqueurs spécifiques du sexe).

Tableau IV : Loci amplifiés et fluorochromes utilisés par le kit AmpFISTRIdentifiler plus(AmpFISTR® Identifiler™ kit User's guide).

Les 16 loci AmpFISTRIdentifiler plus															
D18S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	THO1	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	VWA	TPOX	D18S51	AMEL	D5S8A8	FGA
Fluorochrome correspondant aux marqueurs															
AM FAM				VIC				NED				PET			

D21S1179 : D : DNA **21** : chromosome 21 **S** : séquence unique **1179** : position

-Tableau V : Loci amplifiés et fluorochromes utilisés par le kit AmpFISTRNGM (AmpFISTR® NGM™ kit User's guide)

Les 16 loci AmpFISTRNGM															
D10	Vwa	D16S539	D2S1338	Amel	D8S1179	D21S11	D18S51	D22	D19S433	TH01	FGA	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391
Fluorochrome correspondant aux marqueurs															
FAM				VIC				NED				PET			

- Protocole

On commence par préparer une plaque PCR de 96 puits, on l'identifie et on calcule les volumes des différents réactifs nécessaires au Mix pour n échantillons.

1- Kit Identifier plus (ID+)/ Kit NGM (Tableau IV).

A l'aide d'un vortex, on homogénéise les différents réactifs de la PCR (réaction Mix, primer et la taq polymérase), puis on les centrifuge 3 à 5 secondes.

Après l'homogénéisation et centrifugation du mix, on répartit 15µl dans chaque puits, selon le plan de dépôt préparé.

Dans chaque puits, on met 10µl de chaque échantillon à amplifier et on termine par DNA control du kit et le témoin négatif tout en respectant le plan de dépôt.

Enfin, on place la plaque dans un thermocycleur préalablement programmé pour STR après avoir vérifier tout les puits, couvrir la plaque avec une feuille en aluminium.

II.4 Post amplification

Le but de cette étape est de dénaturer les fragments d'ADN en séquences monocaténares. Cette réaction est assurée par l'addition de formamide. La préparation des échantillons pour une analyse EC nécessite l'ajout de deux réactifs, un standard de taille (comporte des fragments d'ADN synthétique de tailles connues présentent en paire de base qui vont migrer avec chaque échantillon), et un ladder allélique (porte les allèles connus de chaque marqueurs génétique STR et permet d'attribuer le nombre allélique approprié aux fragments d'ADN d'après leurs tailles et le fluorochrome associé.

- Protocole

- Commencer par remplir le plan de dépôt post amplification en se référant au plan de dépôt de l'amplification.
- Calculer les volumes des différents réactifs (standard de taille, formamide) nécessaires au mix.
- Préparer le mix dans un tube eppendorf.
- Vortexer doucement pendant 10 à 15sec.
- Repartir 09 µl de ce mix dans chaque puits
- Ajouter 1 à 2µl de chaque échantillon a partir de la plaque PCR dans leur puits correspondant en suivant le plan de dépôt.
- Ajouter 01 µl du ladder dans son puits approprié (selon le plan de dépôt).
- Recouvrir la plaque avec le septa trip.
- Placer la plaque dans le thermocycleur et lancer le programme dénaturation (85° pendant 3min).
- Placer ensuite la plaque dans crybloc pendant 3min.
- Centrifuger Pour éliminer les bulles d'aire.
- Placer la plaque dans l'appareille (séquenceur 3130) et lancer l'électrophorèse capillaire

II.5 Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire des fragments est réalisée à l'aide d'un séquenceur de type ABI PRISM 3130 à 16 capillaires. Les produits PCR migrent selon leurs tailles dans un capillaire sous l'influence d'un champ électrique. Après injection, une haute tension (3000volts) est appliqués a travers le capillaire à fin de séparer les fragments d'ADN en quelque minutes. Les fragments liés aux marqueurs fluorescents sont, lors du passage, excités par un laser et la lumière est captée par un détecteur.

Le séquenceur est relié à un ordinateur dans lequel sont transférés les donnés brutes de données de l'électrophorèse capillaire sont analysées et validées, pour obtenir à la fin un profil génétique. Selon le kit les donnés du produit amplifié sont superposées au LADDER ID +(figure 5). Et le LAADDER NGM (figure 6), ces derniers sont des produits amplifiés et qui renferme le maximum d'allèles relatifs aux marqueurs dans la population humaine.

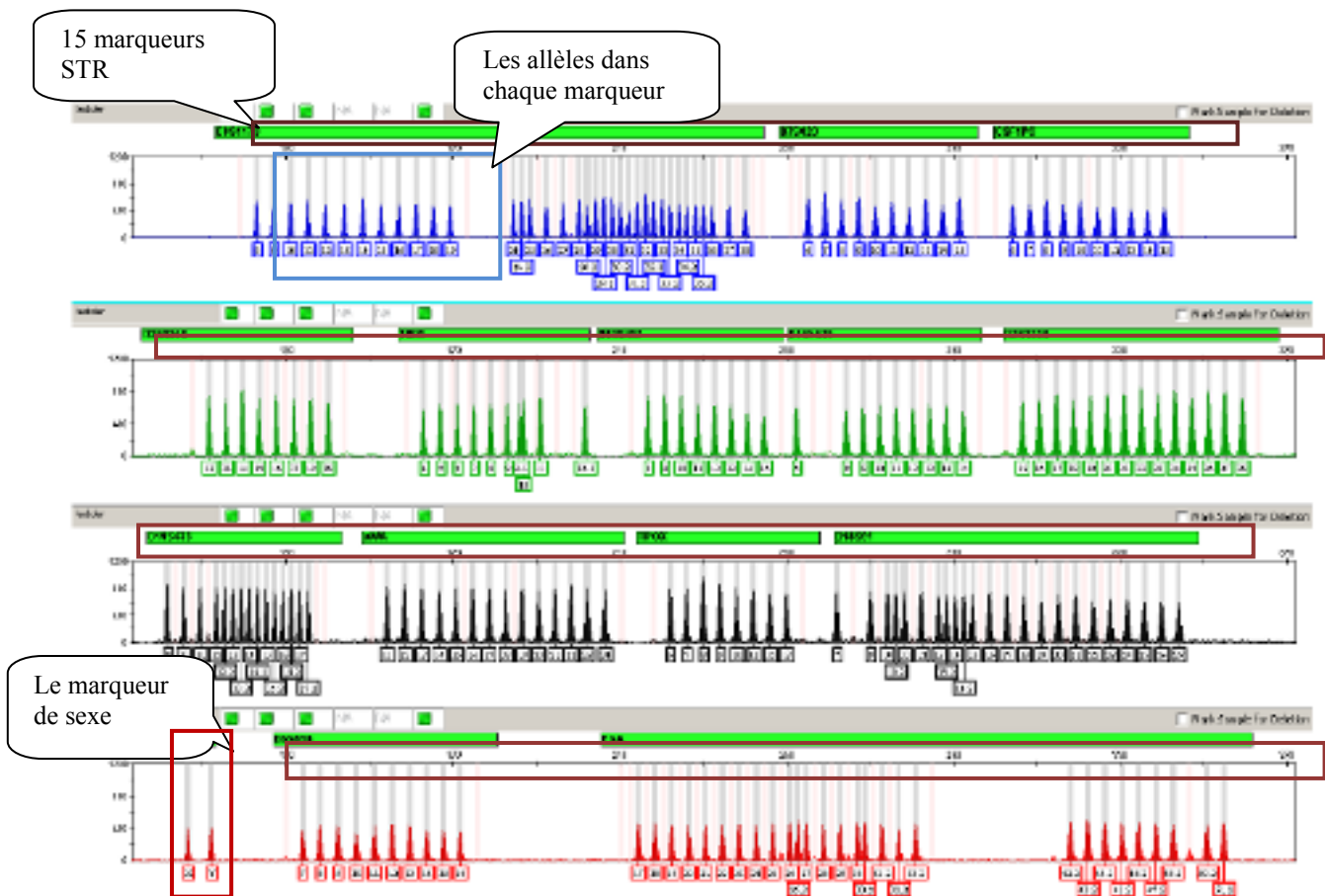


Figure 5 : Le ladder du kit Identifiler

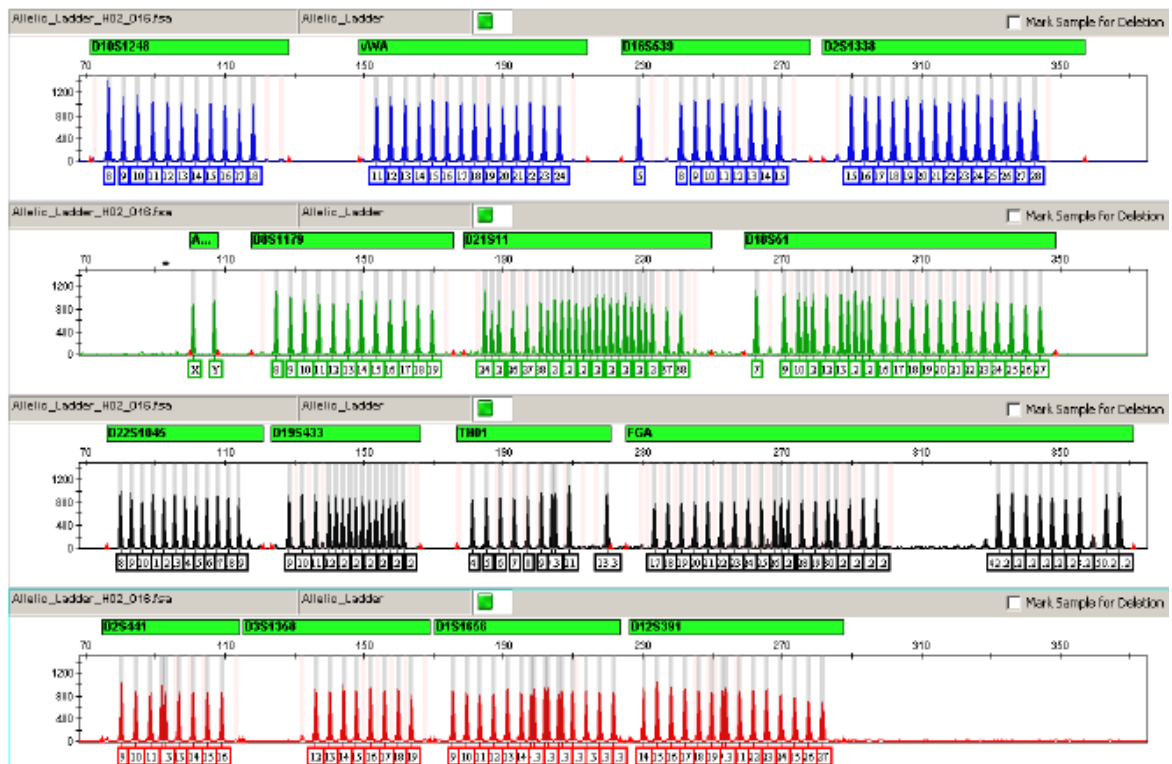


Figure 6 : Le ladder du kit NGM.

II.6.Profils génétiques dans le cadre de la recherche de paternité

- **Etude de cas d'expertise**

Au sein du laboratoire de la police scientifique, une action en recherche de paternité est plus souvent demandée dans le cadre d'une procédure civil lorsqu'un homme refuse de reconnaître un enfant et que la mère engage cette recherche pour prouver la filiation. En effet, les polymorphismes étudiés actuellement présentent une variabilité suffisante pour apporter une réponse très précise dans la majorité des cas traités en expertise.

L'expertise en recherche de paternité se constitue le plus habituellement d'un trio « Père présumé-mère-enfant » ou d'un duo « enfant-père présumé ». Notre cas comprend 4 affaires dont un duo, et trois trios (avec et sans mutation).

II.7.Etude de cas d'expertise

II.7.1. Cas (mère-enfant- père présumé (P)): **dit trio**.

- **les calculs manuels de LR et de l'indice de paternité**

Affaire(1) : 1^{er} cas (trio), en utilisant le kit (ID plus).

La règle générale en matière d'hérédité et que tout caractère présent chez l'enfant doit être présent soit chez la mère, soit chez le père. Ainsi, si l'enfant est hétérozygote pour un locus donné, un des allèles qu'il présente provient de la mère et l'autre du père

- Analyse des 16 marqueurs génétiques du kit (ID+) (**Tableau IX**).
- Calcul de la probabilité de paternité (**tableau X**).
- Deux hypothèses sont établit :
 - H1 : Le père présumé(P) est le père biologique de l'enfant.
 - H2 : Un autre père inconnu est le père biologique de l'enfant.
- On calcule le rapport de vraisemblance ou LR (Likelihood ratio)

$$RV=LR=\frac{P(E/H1)}{P(E/H2)}$$

- A la fin on calcul L'indice de paternité (IP) :

$$IP = \frac{LR}{LR + 1} \times 100$$

• Les calculs statistiques de LR et de l'indice de paternité par le logiciel « Familias »

Le calcul de la probabilité de paternité est simplifié par l'utilisation du logiciel familias. Les calculs standards dans familias sont effectués en quatre étapes :

1. Remplir les données générales d'ADN : les allèles+les fréquences
2. Ajouter les personnes concernées par le test de paternité : Le cas trio (mère-enfant-père présumé(P))
3. Assigner les allèles (mère-enfant-père présumé (P)).
4. Ajouter les deux hypothèses.

Les résultats de la probabilité de paternité et du rapport de vraisemblance (Likelihood Ratio) sont obtenus à la fin.

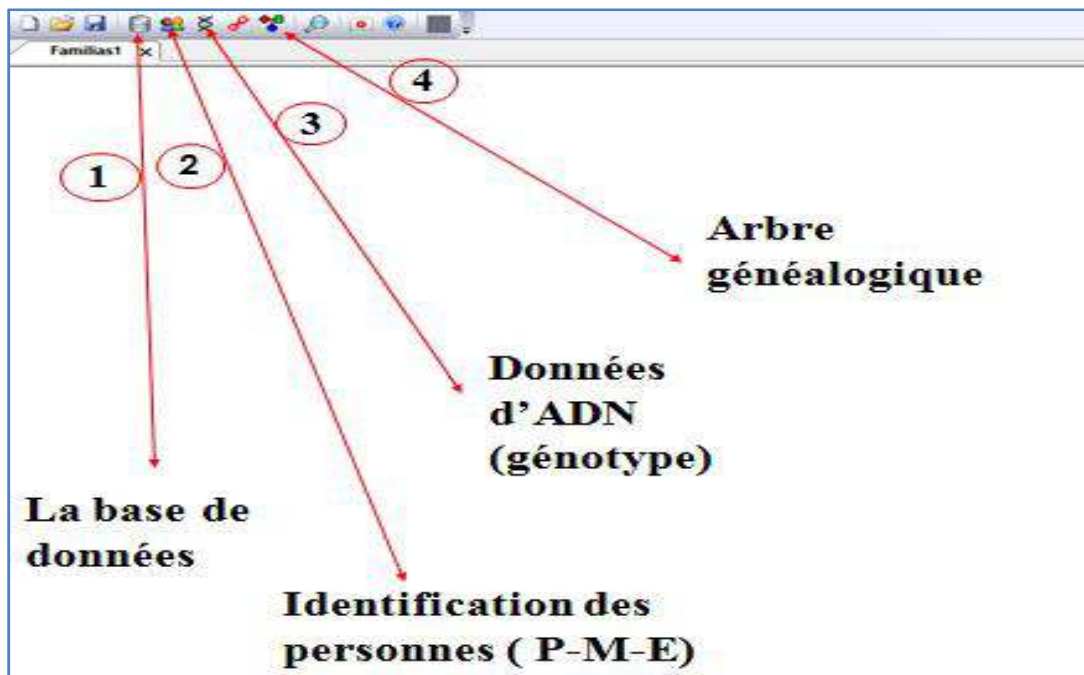
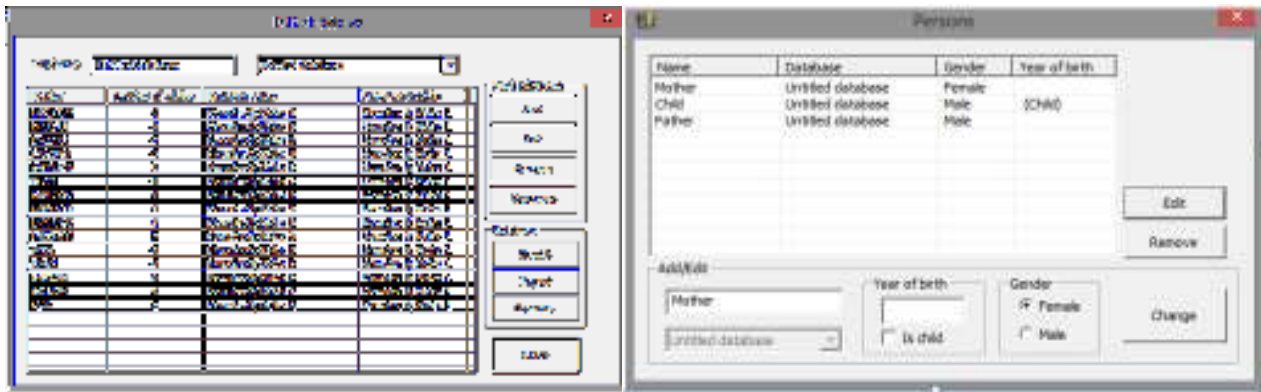
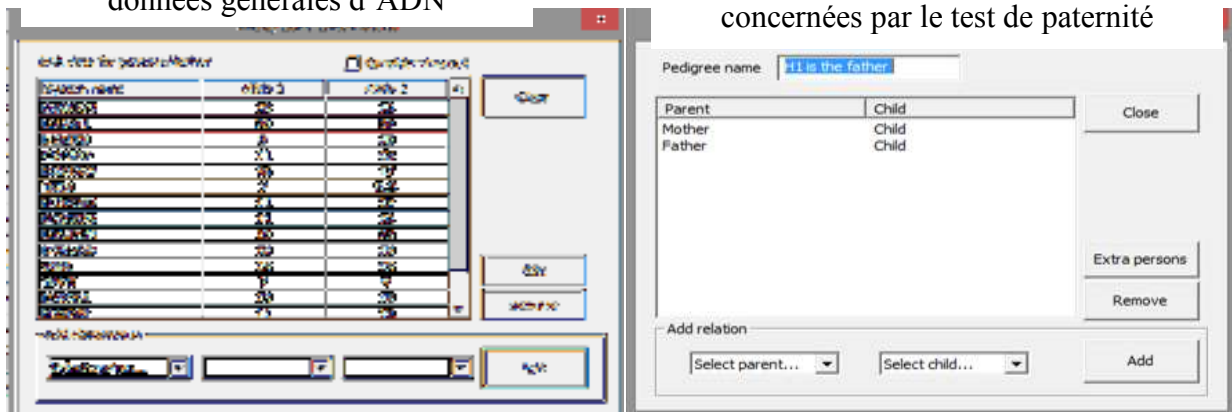


Figure 7 : présentation du logiciel familias.



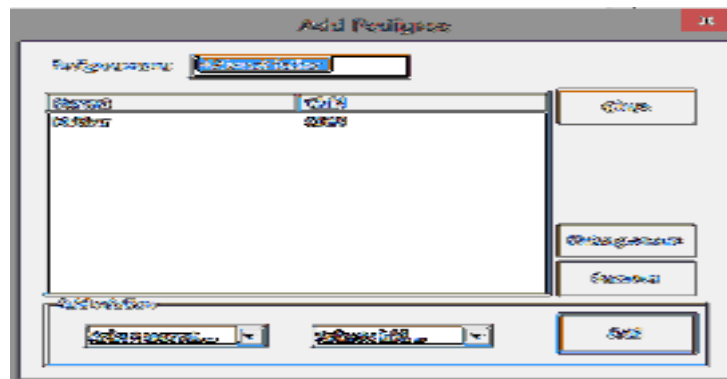
1^{ère} étape → Remplir les données générales d'ADN

2^{ème} étape → Ajouter les personnes concernées par le test de paternité



3^{ème} étape → Assigner les allèles

4^{ème} étape → H1 Le père présumé(P) est le père biologique de l'enfant (1).



4^{ème} étape → H2 Le père présumé(P) n'est pas le père biologique de l'enfant (1)

Figure 8 : Différentes étapes d'utilisation du logiciel Familais

Le but de ce travail était de faire une étude préliminaire à partir d'un logiciel Familias. Pour cela, il a fallu suivre étape par étape la procédure d'analyse permettant l'obtention de profils génétiques et jusqu'à l'interprétation des résultats obtenus.

Ainsi, ce logiciel (Familias) est un programme de calcul des probabilités lors de l'interférence de la paternité et de l'identification basée sur les données génétiques. Il est caractérisé par sa rapidité, ainsi que sa capacité à gérer des cas complexes, ou des mutations potentielles sont prises en compte, ainsi que sa capacité à gérer plusieurs arbres généalogiques simultanément.

A partir des prélèvements buccaux réalisés, une extraction d'ADN, quantification, amplification des 15 loci STRs ainsi que l'amélogénine puis séparation des fragments amplifiés par migration électrophorétique ont permis l'obtention des profils génétiques qui ont servi à la réalisation de cette étude et à la validation du logiciel Familias.

I. Inclusion et exclusion de paternité par le calcul du rapport de vraisemblance et de l'indice de paternité

Cette étude a porté sur quatre affaires, comportant onze échantillons constitués de prélèvements buccaux issues de 4 familles dont un cas duo et trois cas trios (avec et sans mutation). La règle générale en matière d'hérédité est que tout caractère présent chez l'enfant doit être présent soit chez la mère, soit chez le père. Ainsi, si l'enfant est hétérozygote pour un locus donné, un des allèles qu'il présente provient de la mère et l'autre du père.

Concernant **la première affaire (1^{er} cas)**, mère-enfant-père présumé → dit trio, nous avons effectué les calculs manuellement et en utilisant le logiciel Familias.

Le profil d'ADN obtenu par cette affaire est présenté dans le **tableau VIII**. Celui-ci présente les différents génotypes de la mère, de l'enfant, et du père présumé.

Tableau VIII : Profil génétique obtenu à partir des prélèvements buccaux de la mère, enfant, père présumé.

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier															
08 S1179	02 1511	07 S820	CSF 1PO	03 S1398	TH01	013 S317	016 S539	02 S1338	019 S433	VWA	TPOX	01 8551	AmeI	05 S818	FGA
Scellé N° 01 : prélèvement buccal appartenant au nommé <u>XXXXXX</u> (père présumé)															
14-14	28-28	11-11	11-10	16-17	9,3-6	11-9	12	17	13-15	14-17	8	15-12	X-Y	10	22-23
Scellé N° 02 : prélèvement buccal appartenant à la nommée <u>XXXXXX</u> (mère présumée)															
13-15	29-30	10-9	11-12	16-17	9,3-7	11-12	15-11	23-19	13-13	15-15	9-7	13-10	X-X	13-11	22-23
Scellé N° 03 : prélèvement buccal appartenant au nommé <u>XXXXXX</u> (enfant contesté)															
13-14	28-29	10-9	11-12	16-17	9,3-6	12-9	15-12	23-17	13-13	15-14	9-8	13-15	X-Y	13-10	22-23

L'observation de ce résultat nous permet déjà de conclure quant à la paternité du père présumé. Par ailleurs, le calcul statistique doit être effectué afin d'appuyer cette observation et donner un poids au résultat.

- calcul manuel de l'indice de paternité

Tableau IX : présentation de combinaisons de génotypes de la mère, de l'enfant, et du père présumé(P), et le calcul des rapports de vraisemblance.

1	a/b	a/b	a/b	a/b	a/b	a/b	a/b	a/b	a/b	a/a	a/a	a/b	a/b	a/b	a/b
Enfant	a/c	a/c	a/c	a/b	a/b	a/c	a/c	a/c	a/c	a/a	a/b	a/c	a/c	a/c	a/b
Père	c/c	c/c	c/c	a/c	a/b	a/c	b/c	c/c	c/c	a/b	b/c	c/c	c/d	c/c	a/b
Formule LR	1/Pc	1/Pc	1/Pc	1/2(Pa + Pb)	1/(Pa + Pb)	1/2(Pc)	1/2(Pc)	1/(Pc)	1/Pc	1/2(Pa)	1/2Pb	1/Pc	1/2(Pc)	1/Pc	1/(Pa + Pb)
Calcul LR	4.683	5.966	5.540	0.773	2.440	2.440	6.459	3.307	5.767	1.727	6.0168	1.876	3.673	18.382	3.115

Les résultats de profil génétique présent dans le tableau IX, montrent que l'enfant partage la moitié de ces allèles avec la mère et l'autre moitié avec le père présumé. Selon le théorème de Bayes, on donne à monsieur P une chance sur deux d'être le père présumé de l'enfant, (probabilité a priori de paternité de **0.50**), après examen des marqueurs génétiques en utilisant le kit (ID+), et le calcul manuel de RV (LR) selon la formule suivante : $RV = LR = \frac{P(E/H1)}{P(E/H2)}$

$$LR = 4,683 \times 5,966 \times 5,540 \times 0,773 \times 2,440 \times 6,459 \times 3,307 \times 5,767 \times 1,727 \times 6,0168 \times 1,876 \times 3,673 \times 18,382 \times 3,115$$

On a obtenu un $LR = 359\,739\,591.687$ qui est nettement supérieur à 1. Ceci est en faveur de l'Hypothèse 1. Pour confirmer ce résultat, on calcule l'indice de paternité en utilisant la formule suivante : $IP = \frac{LR}{LR+1} = 0.9999$

$$\text{On a obtenu un } IP = \frac{LR}{LR+1} \times 100 = 99.99\%$$

Le $LR \gg 1$, et la probabilité de paternité a posteriori est de **99.99%**. Ce résultat est en faveur de l'hypothèse 1, donc Monsieur P est le père biologique de l'enfant (**paternité incluse**).

- Calcul par le logiciel « FAMILIAS »

Affaire 1 : Les résultats du calcul statistique effectué par le logiciel **Familias**, pour le 1^{er} cas, en utilisant le Kit (ID+), est illustré dans la (**Figure 09**).

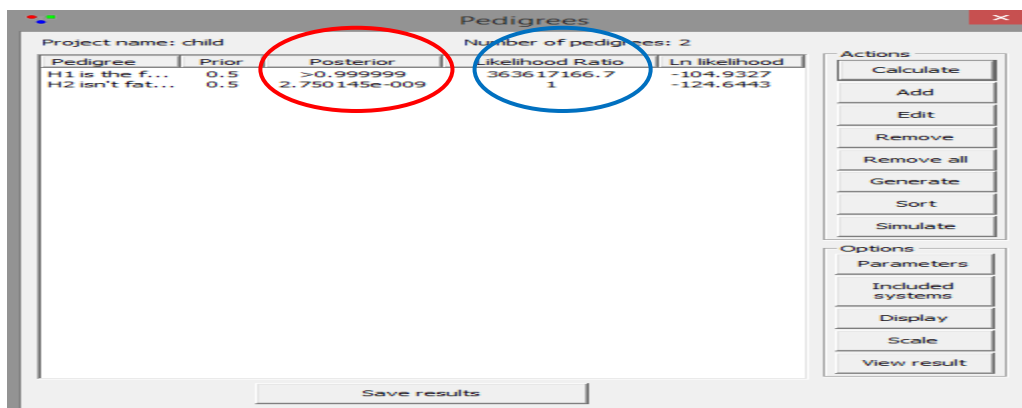


Figure 09 : Calcul de la probabilité de paternité et du rapport de vraisemblance (LR) pour le 1^{er} cas en utilisant le kit ID+ par le logiciel Familias.

$LR = 363617166.7$ et La probabilité « à posteriori » de paternité est de **99.99%**,
Ce qui est donc en faveur de l'H1 (selon le théorème de Bayes).

Pour le 1^{er} cas, la paternité de monsieur P, vis-à-vis de l'enfant, n'est exclue par aucun des quinze loci étudiés. En effet, l'étude du polymorphisme de l'ADN ne permet pas de procéder à une exclusion de paternité de monsieur P vis-à-vis de l'enfant.

Monsieur P fait donc partie des pères possibles de l'enfant. Si l'on donne a priori à monsieur P, une chance sur deux d'être le père de l'enfant, (probabilité à priori de paternité de 0.50), après examen des marqueurs génétiques en utilisant le kit (ID+), et le calcul de probabilité de paternité.

La probabilité a posteriori de paternité pour Monsieur P, serait **99,9999%** et le LR >>>1 ce qui est en faveur de l'hypothèse 1. Monsieur Pest le père biologique de l'enfant **Paternité incluse**(Figures 09).

Les calculs pour cette affaire ont été réalisés manuellement et en utilisant le logiciel Familias. Nous pouvons noter que les résultats obtenus sont similaires dans les deux situations. Il est donc plus intéressant d'effectuer nos calculs par le logiciel puisqu'il permet un gain de temps et une plus grande fiabilité dans les résultats.

Concernant la deuxième Affaire : 2^{ème} cas trio (mère-enfant -père présumé (P)).

Les profils génétiques obtenus à partir des prélèvements buccaux de la mère, de l'enfant et du père présumé (P) (**Tableau X**) présupposent l'absence de lien de parenté entre le père présumé et le père biologique. En effet, nous pouvons observer une incompatibilité dans plus de deux marqueurs dans les profils obtenus (VWA, D18, D22, D19, FGA, D2, D3, D1S, D12).

Tableau X: Résultat du test de paternité obtenu par le typage des 16 STR du kit (NGM)

Les 16 loci du NGM															
D10	VWA	D16S538	D2 S1338	Amel	D8 S1179	D21 S11	D18 S51	D22	D19 S433	TH01	FGA	D2 S441	D3 S1358	D15 S1656	D12 S391
Scellé N°01 : Prélèvement buccal du père présumé.															
15-16	16	11-13	20-22	X-Y	11-15	29	12-19	13-15	13-15	9	19-24	10-14	15-17	12-16	17-19.3
Scellé N°02 : Prélèvement buccal de la mère.															
12-14	17-18	11-12	16-19	X-X	8-15	30-30.2	12-15	15-17	13-16	8-9.3	18-23	11-11.3	14-15	12	19-23
Scellé N°03 : Prélèvement buccal de l'enfant contesté.															
14-15	18	12-13	19-22	x-x	11-15	30-30.2	13-15	16-17	13-15	7-8	23	11.3-14	15-18	12-18.3	19-22

Les calculs statistiques effectués pour le 2^{ème} cas en utilisant le (Kit NGM), est illustré dans la (Figure 10).

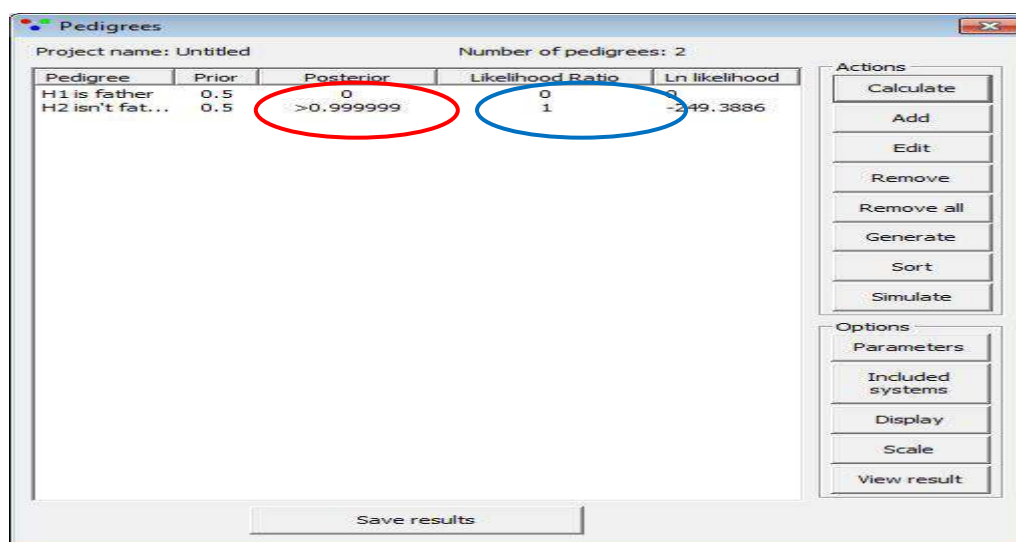


Figure10 : Calcul de la probabilité de paternité et du rapport de vraisemblance (LR) pour le 2^{ème} cas en utilisant le kit NGM.

Le LR= 0 et la probabilité « à posteriori » de paternité est de 0%, qui sera donc en faveur de l'H2 (selon le théorème de bayes).

Pour le 2^{ème} cas, la paternité de monsieur P, vis-à-vis de l'enfant, est exclue par les quinze loci étudiés. En effet, l'étude du polymorphisme de l'ADN a permis de procéder à une exclusion de paternité de monsieur P vis-à-vis de l'enfant. Monsieur P ne fait donc pas partie des pères possibles de l'enfant.

Si l'on donne à priori à monsieur P, une chance sur deux d'être le père de l'enfant, (la probabilité à priori de paternité de **0.50**), après examens des marqueurs génétique en utilisant le kit NGM, et le calcul de probabilité de paternité. La probabilité à posteriori de paternité pour Monsieur P, est **0** et le LR $\lll 1$ ce qui est en faveur de l'hypothèse 2. Monsieur P, n'est pas le père biologique de l'enfant (**Paternité exclue**) (**Figures10**).

Concernant la troisième affaire : 3^{ème} cas trio (mère-enfant-père présumé (P)), avec mutation.

Après l'analyse génétique des 16 STR du kit (ID+), les résultats ont été résumés dans le **Tableau XI**.

Les profils génétiques obtenus à partir des prélèvements buccaux de la mère, de l'enfant et du père présumé (P) présupposent la présence de lien de parenté entre le père présumé et le père biologique. En effet, on observe une incompatibilité entre le père présumé et l'enfant au niveau du système D8S1179. Cette incompatibilité n'est notée que dans un seul marqueur et serait probablement due à une mutation (**Tableau XI**).

Tableau XI : Résultat du test de paternité obtenu par le typage des 16 STR du kit (ID+), Présentation de profils génétiques de la mère, de l'enfant et du père présumé (P).

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier															
D8 S1179	D2 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D1 8S51	Amel	D5 S818	FGA
Scellé N° 01 : prélèvement buccal du père présumé.															
11-15	28-29	8-11	11-12	16-18	9	10-12	12	21-22	15-16.2	15	7-10	13-14	X-Y	11-13	21-23
Scellé N° 02 : prélèvement buccal appartenant de l'enfant contesté.															
14-15	28-29	11	11	17-18	6-9	10-11	12	21	14-16.2	15-18	10-11	13-16	X-Y	11-13	22-23
Scellé N° 03 : prélèvement buccal appartenant à la mère présumée.															
13-15	29-31.2	9-11	11-12	16-17	6-9	11-12	9-12	18-21	14-15	16-18	11	13-16	X-X	11-12	21-22

Pour ce cas, lorsqu'on remplit les données générales d'ADN du trio, on introduit chez le père présumé le taux de mutation (0,14%) dans le système (D8S1179) (**Figure 11**).

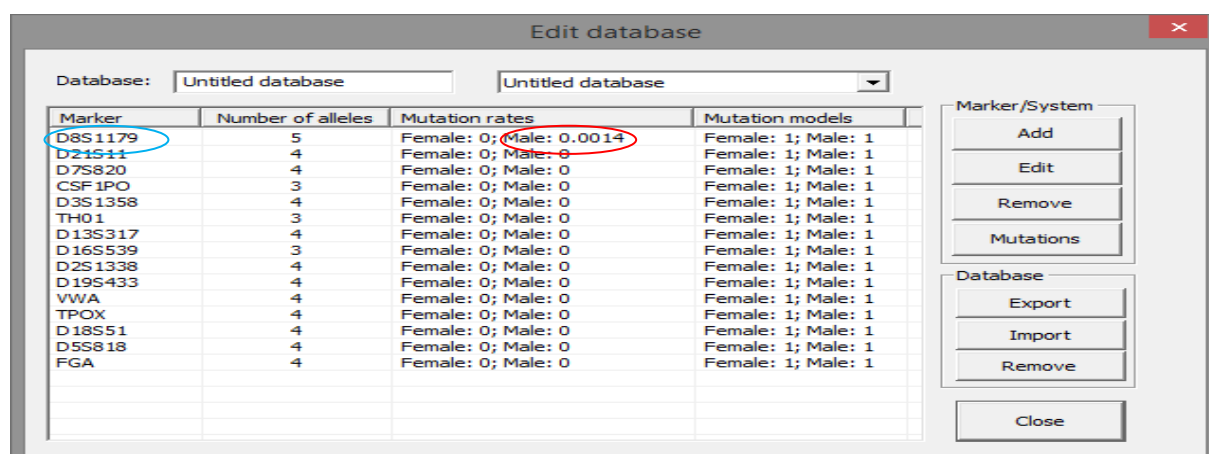


Figure 11 : Introduction du taux de mutation (0.14%) dans le système D8S1179.

Les résultats du calcul statistique effectués, pour le 3^{ème} cas, en utilisant le (Kit ID+), est illustré dans la (**Figure 12**).

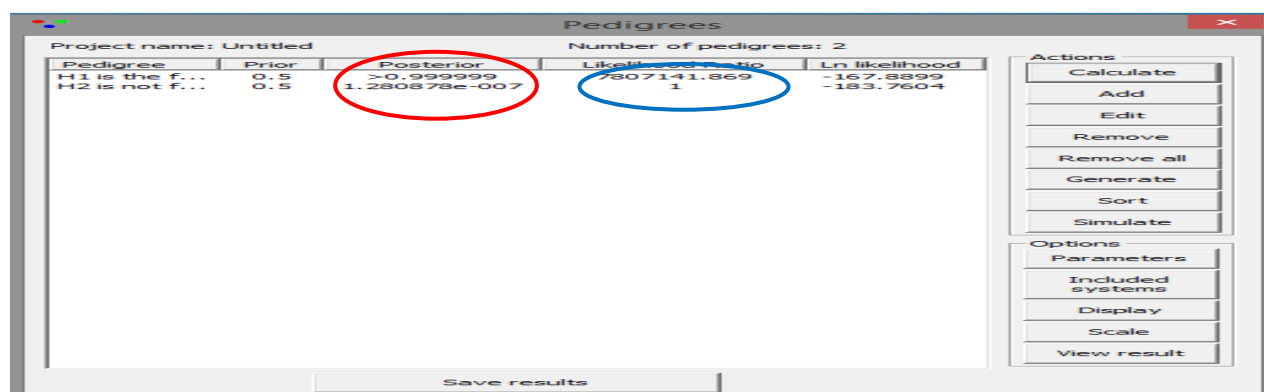


Figure12: Calcul de la probabilité de paternité et du rapport de vraisemblance (LR) pour le 3^{ème} cas en utilisant le kit ID+, avec introduction du taux de mutation dans le système D8S1179.

Le LR= 780714.669 et la probabilité « à posteriori » de paternité est de 99.99%, qui sera donc en faveur de l'H1 (selon le théorème de bayes).

Pour le 3^{ème} cas, la paternité de monsieur P vis-à-vis de l'enfant ne pourrait être exclue, malgré l'exclusion qui peut être considérée comme une mutation observée sur le système STR. Monsieur P, fait donc partie des pères possibles de l'enfant. Si l'on donne « à priori » à Monsieur P une chance sur deux d'être le père de l'enfant, (probabilité a priori de paternité de **0.50**), après examens des marqueurs génétique de Monsieur P en utilisant les deux kit (ID), et avec l'introduction du taux de mutation (**0.14%**), dans le système **D8S1179**, la probabilité « à posteriori » de paternité est de **0.999999** pour H1. Après avoir calculé la probabilité de paternité, il ressort qu'elle est de **99.99%** avec un LR >>>1. Cela soutiendrait l'H1 selon le théorème de bayes. De ce fait, Monsieur P est le père biologique de l'enfant (**Paternité incluse**)(Figure12).

Enfin, la quatrième affaire : 4^{ème} cas (enfant-père présumé (P)), dit duo avec mutation

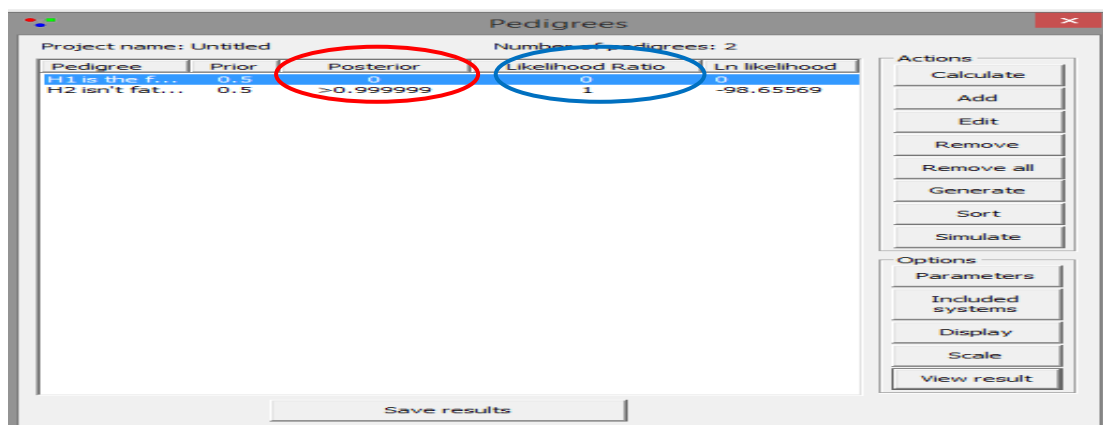
Après analyse des 16 marqueurs génétiques du kit (ID+), les résultats ont été illustrés dans le **Tableau XII**.

Les profils génétiques obtenus à partir des prélèvements buccaux de la mère, de l'enfant et du père présumé (P) présupposent la présence de lien de parenté entre le père présumé et le père biologique. En effet, on a observé une incompatibilité entre le père présumé et l'enfant au niveau du système (VWA) qui peut être considérée comme une mutation (**Tableau XII**).

Tableau XII: Résultat du test de paternité obtenu par le typage des 16 STR du kit (ID+)

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier plus															
D8 S1179	D2 S1511	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D1 S851	AmeI	D5 S818	FGA
Scellé N° 01 : prélèvement buccal de l'enfant contesté.															
14	29- 33.2	10- 12	10- 12	17	7-8	11- 13	8-10	18-19	14- 15.2	15- 19	8-11	14- 16	X-Y	11- 12	23-24
Scellé N° 02 : prélèvement buccal du père présumé.															
13-14	30- 33.2	10	10	17	7-9	8-13	10- 12	19-20	14- 15.2	17- 20	8	12- 16	X-Y	12	24

Le calcul statistique effectué, pour le 4^{ème} casen utilisant le (Kit ID+), sans l'introduction du taux de mutation, est illustré dans la (Figure 13).



Pedigree	Prior	Posterior	Likelihood Ratio	Ln likelihood
H1 is the f...	0.5	0	0	0
H2 isn't fat...	0.5	>0.999999	1	-98.65569

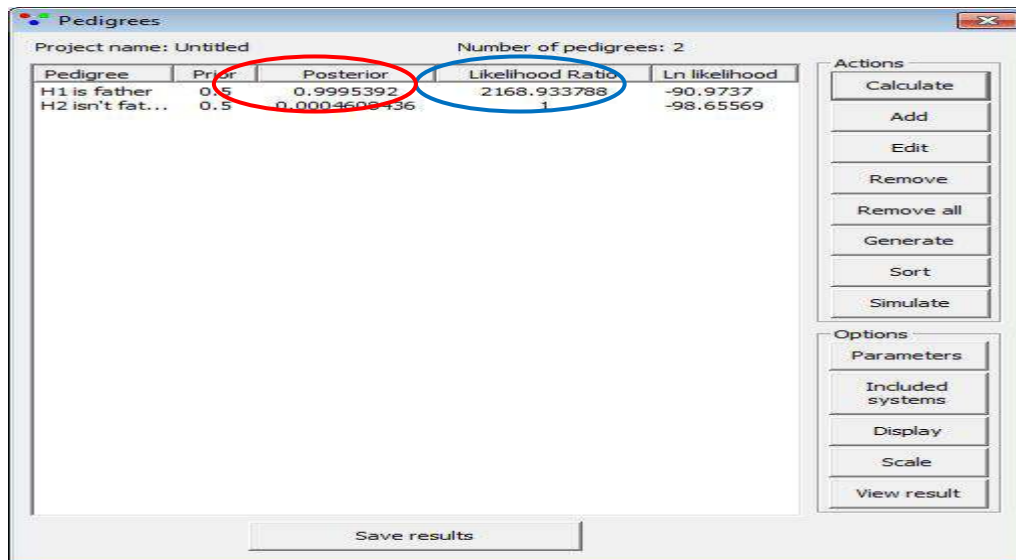
Figure 13 : Calcul de la probabilité de paternité et du rapport de vraisemblance (Likelihood Ratio) pour le 4^{ème} cas en utilisant le kit ID plus, sans l'introduction du taux de mutation dans le système VWA.

LR= 0 et la probabilité « à posteriori » de paternité est de 0%, qui sera donc en faveur de l'H2 (selon le théorème de bayes).

Pour le 4eme cas, si l'on donne à priori à Monsieur P une chance sur deux d'être le père de l'enfant,(probabilité a priori de paternité de **0.50**), après examen des marqueurs génétiques en utilisant le kit ID+, et sans l'introduction du taux de mutation au niveau du système **VWA (0.17%)**, la probabilité «à posteriori » de paternité est de **0** pour l'hypothèse H1, avec un $LR \ll 1$. Cela soutiendrait l'hypothèse 2, selon le théorème de bayes.

De ce fait, Monsieur P n'est pas le père biologique de l'enfant (**paternité exclue**)(Figure 13).

Les calculs statistiques effectués, avec l'introduction du taux de mutation, est illustré dans la (Figure 14).



Pedigree	Prior	Posterior	Likelihood Ratio	Ln likelihood
H1 is father	0.5	0.9995392	2168.933788	-90.9737
H2 isn't fat...	0.5	0.0004606	1	-98.65569

Figure 14: Calcul de la probabilité de paternité et du rapport de vraisemblance (Likelihood Ratio) pour le 4^{ème} cas en utilisant le kit ID plus, avec l'introduction du taux de mutation dans le système VWA.

LR= 2168.933 et la probabilité « à posteriori » de paternité est de 99.99%, avec un qui sera donc en faveur de l'H1 (selon le théorème de Bayes).

En introduisant le taux de mutation au niveau du système VWA (0.17%), la probabilité « à posteriori » de paternité est de **0.9995392**, résultat en faveur de l'hypothèse 1, avec un LR >>> 1, qui serait donc en sa faveur. De ce fait, Monsieur P est le père biologique de l'enfant (paternité incluse)(Figure 14).

Concernant les affaires 2, 3 et 4, les calculs statistiques avaient déjà été effectués au niveau du service de police scientifique. Les résultats obtenus étaient en accord avec les calculs obtenus par le logiciel Familias et ceci nous permet de dire que ce dernier est fiable pour la réalisation des calculs statistiques dans le cadre de la recherche de paternité.

Conclusion et perspectives

Les empreintes génétiques comme moyen d'identification quasi-absolu des individus permettent de résoudre de nombreux cas difficiles, tant dans le domaine de la recherche de paternité ou de maternité, que dans le domaine de la criminalistique. La recherche de paternité a trouvé, grâce à l'analyse des empreintes génétiques apparues en 1985, une sorte de norme d'excellence, qui rend les expertises et les jugements très fiables.

Les juges trouvent un outil d'une aide capitale dans les dossiers de filiation dans lesquels les liens de paternités entre les sujets suspectés sont proches.

La biologie se met donc au service de la justice et évolue en fonction de la complexité des dossiers, elle fait désormais mieux encore puisqu'elle permet d'élucider quasiment toutes les recherches de filiation.

Ce travail avait pour objectif de faire une étude préliminaire à partir d'un logiciel *familias* qui est un programme de calcul des probabilités de la paternité dans les cas où les profils d'ADN de personnes connues avec une relation familiale mise en doute. L'utilisation de ce logiciel nous a permis de gagner un temps considérable lors de la réalisation de ce travail tout en fournissant des résultats fiables. Cet outil représente donc un atout majeur pour l'inclusion ou l'exclusion de paternité dans les affaires judiciaires.

Enfin, l'utilisation de méthodes performantes de recherche de paternité par empreinte génétique, est fiable et d'une preuve biologique précieuse pour le juge.

Références bibliographiques

- A. Barbaro, P. Cormaci, A. Agostino, validation of prepfiler™ forensic DNA extraction kit (Applied Biosystems), Forensic Science International: Genetics supplement Series 2 (December (1) (2009), p. 176-17.
- A. Bitar.«Thèse». (2013). Élaboration de la silice magnétique colloïdale pour application en biologie moléculaire : extraction des acides nucléiques.
- A. Mansuet-Lupo, P. Rouger, V. Van Huffel, (2007), les empreintes génétiques : des affaires d'interprétation difficile, transfusion clinique et biologique, 14, 343-347.
- Atlas et Bey; 1994. Atlas, R.M. and Bej, A.K. (1994). Polymerase Chain Reaction. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R., (Eds.) Methods for general and molecular bacteriology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp.
- Bulter J.M(2010).Fundamentals Of Forensic DNA Typing.Ed.Elsevier, Academic Press San Diego.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnic, and R. W. DAVIS. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32:314-331.
- Bustin, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology 25: 169-193
- Butler, J. M., Shen, Y et McCord, B. R. (2003) The development of reduced size STR amplicons as a tool for the analysis of degraded DNA. J forensic Science, 48 (5): 1054 – 1064.
- Canon J. et al., 2001. Genetic diversity measures of local European beef cattle for conservation purposes.
- Carracedo A., Bar W., Mayr W., Morling N., Olaisen B., Schneider P., Budowle B., Brinkmann B., Gill ., Holland M., Tully G et Wilson M.(2000). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Guidelines for Mitochondrial DNA Typing. Forensic.Sci.Int.(110) : 79-85
-

- Chen X., Sullivan P.F., Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput, the pharmacogenomics Journal, 2003, 3, (p77-96).
- Chakravarti, A. (2011) Single nucleotide polymorphism to a future genetic medicine. Nature.409, 822-823.
- Claire Peltier. (2011) Dossier Police scientifique : les vraies méthodes d'investigation, Futura-Sciences.
- Coquoz R et Taroni, F.(2003). Preuve Par l'ADN –La Génétique Au Service de la Justice. 2ème Edition. Presses Polytechniques Et Universitaires Romandes, Lausanne.
- Coquoz R et Taroni, F.(2006). Preuve Par l'ADN –La Génétique Au Service de la -Justice. 2ème Edition. Presses Polytechniques Et Universitaires Romandes, Lausanne.
- Dermot O'Sullivan, « Romanov Riddle: DNA Tests Identify Bones of Czar and Family », Chemical & Engineering News, 19 juillet 1993, (p. 6-7.)
- Gill P. An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. Int. J. Legal Med. 2001;114(4-5):204-10.
- Doutremepuich C. 2001.10ans d'empreintes génétiques biologie and technology behind STR Markers, La Securite D'aujourd'hui, la Documentation française. PARIS
- Goodwin W., Linacre A., Hadi S.(2007). An introduction to forensic genetics. Ed. Johan Wiley & Sons Ltd. (1)
- Goodwin W., Linacre A. et Hadi S (2011). An Introduction To forensic Genetics. Ed. Haboken, new jersey: Johon Wiley & sons.
- Higuchi R., Von Beroldingen C. H., Sensabaugh G. F. and Erlich H. A. 1988, DNA Typing From Single Hairs. Nature (332): 543-546.
- Hochmeister et al, 1999. Validation studies of an Immunochromatographic 1- Step Test for the forensic identification of human blood. J.Forens.SCI.44 (3): 597-602.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 1985a; 314:67-73.

- Jeffreys AJ, Murray J, Neumann R. High-resolution mapping of crossovers in human sperm defines a minisatellite-associated recombination hotspot. *Mol. Cell.* 1998;2(2):267- 73.
- Kaplan J.C et Delpeche M. (2007). *Biologie moléculaire et médecine.*
- John M.Butler 2012 *Forensic DNA Typing Biology, Technology, And Genetics Of STR Markers 2ed Edition.*
- Kellens G.(1998) *Eléments de criminologie. Actes du colloque de l'Association Internationale des Criminologues de Langue Française (AICLF), Bruxelles: Erasme 10.*
- Kobilinsky.L. John.W. Sons (2011). *Manuel de chimie légale.*
- La crimino et crimina716 Draft, F. SUN : VIIe colloque de AICLF 15-05-2001).
- Martell, M. Gomez, J., Esteban, J. I., Sauleda, S., Quer, J., Cabot, B., Esteban, R. and Guardia, J. 1999. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of Hepatitis C virus RNA. *Journal of ClinicalMicrobiology* # 37: 327-332.
- Nakamura Y, leppert M., O'connelP ., Wolef R., Holm T ., Culver M., Matein C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlim E. and white R.1987. variable number of tendem repeat (VNTR) markers of human gene mapping, *science*, 235:1616-1622.
- Pang BCM, Cheung BKK. Applicability of two commercially available kits for forensic identification of saliva stains. *J. ForensicSci* 2008;53:1117-22.
- PAJTLER David. «Thèse».(2000). *LA RECHERCHE DE PATERNITE Aspects Biologiques et Médico-Légaux.*
- Prisca,B. Rev : Recherche d'ADN et Profils Genetiques.,Institut de Medcine légale, Strasboourg., 2004,17,n°1.,75 a 78P.
- Rogers NL, Cole SA, Lan HC, Crossa A, Demerath EW.(2007) New saliva DNA collectio method compared to buccal cell collection techniques for epidemiological studies. *Am J Hum Biol* ,19:319e26.
- Royle NJ, Clarkson RE, Wong Z, Jeffreys AJ. Clustering of hypervariableminisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics.* 1988;3(4):352-60.
- Schuller W., Fereday L., etScheithaur, 2001. *Guide Interpol sur l'échange de données génétiques et sur les pratiques en matière d'analyse D'ADN/ Recommandations du groupe d'experts d'Interpol sur le suivi des techniques dans le domaine de l'analyse d'ADN.*

- Taroni F., Lambert JA., Fereday L. and Werrett DJ. 2002. Evaluation and presentation of forensic DNA evidence in European laboratories. Science and Justice Volume 42 : 21-28.
- (Weber J. L. and May P.E. 1998 Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am.J.Hum.Genet.44; 388-396
- Weber J.L et Wong C (1993). Mutation Of Human Short Tandem Repeats. Hum Molec Genet, 2 (8) : 1123-1128.
- Weber et Wong, (1993). Centre de génétique médicale, Marshfield Medical Research Foundation, WI 54449.
- Willott, GM et Allard J.E. Spermatozoa : Their Persistence After Sexual Intercourse. Forensic Sci Int 1982 ; 19 : 133-154)

Tableau II : Composition de la solution de lyse (Echantillon salive).

Composants de la solution de lyse	Volumes
Crime lysis Buffer (tampon de lyse) :	400 μ l $\times$ nombre d'échantillons.
Protéinase K	50 μ l $\times$ nombre d'échantillons
Solution DTT 3M	4.5 μ l $\times$ nombre d'échantillons

- **Tableau III:** Composition du Master Mix

-

Réactifs	Volume
Mix	V(μ l)=12.5 (le nombre d'échantillons(N)+2)
Primer	V(μ l)=10.5 (le nombre d'échantillons(N)+2)

-Tableau VI : Composition du Master Mix.

Réactifs	Volume
Réaction Mix	$V(\mu\text{l})=10 (N+1)$
Primers	$V(\mu\text{l})=5 (N+1)$

-Tableau VII : préparation du mix (Post PCR).

Réactifs	Volume
HI-DI formamide	$V(\mu\text{l})=8.7 (N+1)$
Standard de taille LIZ	$V(\mu\text{l})=0.3X (N+1)$

