



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB – BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en science de la nature et de la vie

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : Génétique

THEME

Validation d'une méthode d'essai d'orientation, de recherche de traces de sperme par la phosphatase acide et identification d'un profil génétique d'une affaire réelle d'agression sexuelle.

Présenté par :

- **Kebbal Nafila**

Date de soutenance : 13/09/2022

Devant le jury :

- Mr BENYAHIA.N	MAA	USDB1	Président
- Mme CHERRALLAH.A	MCB	USDB1	Examinatrice
- Mme GUESSAIBIA.N	MCA	USDB1	Promotrice
- Mr Djebbar.H	lieutenant	LPS(DGSN)	Co-promoteur

Année universitaire : 2021/2022



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB – BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en science de la nature et de la vie

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : Génétique

THEME

Validation d'une méthode d'essai d'orientation, de recherche de traces de sperme par la phosphatase acide et identification d'un profil génétique d'une affaire réelle d'agression sexuelle.

Présenté par :

- Kebbali Nafila

Date de soutenance : 13/09/2022

Devant le jury :

-Mr BENYAHIA.N	MAA	USDB1	Président
-Mme CHERRALLAH.A	MCB	USDB1	Examinatrice
-Mme GUESSAIBIA.N	MCA	USDB1	Promotrice
-Mr Djebbar.H	lieutenant	LPS(DGSN)	Co-promoteur

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Au terme de la rédaction de ce mémoire, c'est avec un immense plaisir que je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet. Je remercie le bon dieu tout puissant de m'avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire de la fin de mes études.

*Tout d'abord, ce travail ne serait jamais aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide précieuse et l'encadrement exceptionnel de Madame **Guessaibia.N**, mes remerciements les plus distingués à ma promotrice, pour la qualité de son encadrement, pour ses judicieux conseils, sa patience et sa disponibilité. Ses encouragements qui m'ont été d'une aide inestimable, Merci infiniment !*

*Mes remerciements les plus sincères à Monsieur **MOHAMED SAID.R**. Notre chef d'option et à l'ensemble des enseignants de la Faculté des Sciences Biologiques, pour leur suivi tout au long de ma formation en Biologie.*

*J'exprime ma gratitude à Monsieur **BENYAHIA .N** de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury, je vous remercie aussi pour la qualité du savoir que vous m'avez transmis durant ma formation en biologie, je remercie également Madame **CHERRALLAH .A** pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail ainsi que pour les connaissances qu'elle m'a transmises.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à mon co-promoteur Monsieur **Djebbar.H** d'avoir accepté d'administrer ce travail ainsi que pour sa confiance et ses conseils, son sacrifice et son soutien tout au long du projet.*

*Mes vifs remerciements à Monsieur **ZEKRI.M**, commissaire divisionnaire et sous-directeur de la police scientifique et technique, Monsieur **BRAHITI.H**, commissaire principal de police et chef de service du laboratoire et Madame **BELKHIRAT.S**, chef de département d'identification génétique de m'avoir accueilli ainsi que tout l'ensemble du personnel du laboratoire et du département biologie légale / ADN, en particulier Mme **CHAALAL.S**, Mme **BENABDELLAH.N**, Mr **Bechar.M**.*

*Je remercie spécialement et grandement Mme **MEDDOUR.S** et **ZEGROUR.S** pour leurs gentillesse, leurs aides précieuses et leurs attentions tout au long de mon stage.*

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents et à toute ma famille, pour leur aide, leur soutien et leurs encouragements.

A mes très chers sœurs et frères, Yamina, Djamila, Tassadit, karima, Karim, Yacine, Amine et Omar, je vous remercie énormément pour votre présence, votre soutien moral, votre attention tout au long de ma vie.

A mes chers nièces et neveux, Sara, Meriem, Ferial, Wassim, Ines, Serine, Sofia, Selma, Nassim, Melissa, Adem, Hamza, Yasmine, Younes, Yousra.

Je dédie particulièrement ce travail à Famouza et Sassou, qui n'ont jamais cessé de me conseiller, de m'encourager, de me pousser toujours plus haut, vous êtes mon exemple de réussite, je ne saurais jamais vous remercier et vous rendre tout ce que vous faites pour moi, puisse dieu vous offrir la santé et bonheur.

A toutes mes chères et précieuses personnes, Lila, Maria, Maissa, Katia, Yousra, Fairouz, Rania, Narimene, Lilia et Khadidja, particulièrement à Rayan qui est ma source de motivation et de bonheur, merci infiniment pour tout !

A toute personne qui occupe une place dans mon cœur.

JE VOUS AIME TOUS

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ADN mt : Acide Désoxyribonucléique mitochondrial.

ATL: Tissue Lysis Buffer.

ATE: Tissue Elution Buffer.

CODIS : Combined DNA Index System.

DNTP : Désoxy nucléotide triphosphate.

DTT : Dithiothréitol.

EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique.

FAM : 6- Carboxyfluorocein.

Kpb : Kilo paire de base.

LIZ : Internal lane size.

Min : Minute.

Mg : Milligramme.

ml : Millilitre.

Pb : Paire de base.

PCR : Polymerase chain reaction.

PK : Protéinase K.

POP-4 : Performance optimized polymer 4.

PSA : Prostatic Specific Antigen.

QPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism.

Rpm : Rotation par minute.

SNP : Single Nucléotide Polymorphism.

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate.

STR : Short Tandem Repeat.

Taq : Thermus aquaticus.

VNTR : Variable Number of Tandem Repeat.

Zn : Zinc.

μl : micro litre.

PAP : Phosphatase Acide Prostatique.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Schéma des marqueurs microsatellites (Gnis, 2019).	05
02	Les 13 microsatellites utilisés pour établir les empreintes génétiques. (Butler, 2013).	06
03	Schéma de la réaction du Polymorphisme de Longueur des Fragments d'Amplification RFLP (Gnis-pedagogie, 2017).	07
04	Exemples de profils génétiques observables dans différentes conditions de mélange (Laurent et al., 2017).	08
05	Structure d'un spermatozoïde humain (Duijn et al., 1953).	11
06	Schéma réactionnel de diazotation (mécanisme proposé phosphatase acide) (Briant, 2010).	12
07	Réaction positif et révélation de liquide séminal (Ricordel, 2011).	13
08	Schéma simplifié illustrant le principe de la méthode TaqMan pour la détection en temps réel de l'ADN amplifié (Flaender et al., 2019).	14
09	Amplification de l'ADN à l'aide de la technique PCR (Bruce et al., 2002).	15
10	Tache de sperme observé et prélevée sur un sous-vêtement par un crimeliste (Amssalem, 2016).	20
11	Schéma réactionnel de la révélation de l'activité de la phosphatase acide.	21
12	Témoin positif et Témoin négatif de la phosphatase acide (original, 2022)	22
13	Principe de la sonde taqman (Postras et al., 2002).	28
14	Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles (Postras et Al., 2002).	29
15	Résultat positif obtenu lors d'une affaire réelle par PAP (Original, 2022).	37
16	Résultat positif et négatif après 15min de presse (Original, 2022).	37
17	Le profil génétique obtenu à partir de la validation est un profil complet en utilisant le kit AmpFlSTR® MiniFiler™.	42
18	Test PSA positif. (Original 2022)	43
19	Observation des spermatozoïdes (Original, 2022).	43
20	Comparaison entre le profil de la tache de sperme et le profil du suspect N°2 B8641 (l'agresseur).	44
21	Comparaison entre la défunte (victime) B8630 et le profil du suspect N°2 B8641 (l'agresseur).	45
22	Comparaison entre le profil de la tache de sperme et le profil du suspect N°1 B8626 (l'oncle paternel).	46

Liste des tableaux

Tableau	Titres	Page
I	Les principales dates de développement de l'analyse ADN en pratique judiciaire (Doutrempuich, 2012).	03
II	Des loci analysés sur l'ADN autosomal (Doutrempuich, 2012).	09
III	Liste des loci analysés sur le chromosome Y (doutrempuich, 2012).	10
IV	Les différentes salles et équipements du laboratoire.	18
V	Examen de scellés de traces.	19
VI	Les dilutions de sperme.	19
VII	Les réactifs de la phosphatase acide.	22
VIII	Préparation des échantillons (Original, 2022).	24
IX	Composant du kit Qiagen (catalogue QIAamp DNA Investigator Kit).	25
X	Cible du kit Quantifiler.	30
XI	Les dilutions des 08 standards de la quantification d'ADN.	30
XII	Le plan de dépôt des échantillons dans la plaque de quantification.	30
XIII	Composition du master mix.	31
XIV	Caractéristique de kit AmpFLSTR™ Identifiler™.	32
XV	Les composants du kit AmpFISTR® MiniFiler™.	32
XVI	Les composants du kit AmpFISTR® Identifiler®.	33
XVII	Composition des réactifs de la post-PCR.	34
XVIII	Les résultats de la sensibilité et la répétabilité des premiers travaux de la phosphatase acide	38
XIX	Les résultats de la sensibilité et répétabilité de la phosphatase acide (1ère reproductibilité)	38
XX	Les résultats de la sensibilité et répétabilité de la phosphatase acide (2ème reproductibilité)	38
XXI	Les résultats de quelques échantillons en quantification	39
XXII	Résultats observés après détection de la phosphatase acide pour des dilutions croissantes de sperme	40
XXIII	Résultats du test PAP	41
XXIV	Les résultats des trois tests préliminaires pour détecter la présence du liquide séminal sur le scellé (des deux taches observées dessus)	42
XXV	Les quantités obtenues de l'ADN extrait en affaire réelle	43

Résumé

La criminalistique est la discipline scientifique qui étudie les traces en lien avec des activités criminelles. Cette discipline s'appuie sur les sciences expérimentales pour révéler les traces d'ADN. Toutefois, l'enjeu principal réside dans leur interprétation : identification, association à une source ou à une activité et reconstitution des événements.

Dans ce travail, on a étudié un cas réel d'agression sexuelle en ayant comme données : un scellé de la victime et trois prélèvements sanguin qui appartiennent à la victime et aux deux suspects (qu'on utilise comme profils de comparaison à celui obtenu par l'analyse des taches de sperme sorties de la pièce à conviction), en comparant les profils génétiques des suspects, des taches de sperme et de la victime, on a pu inclure l'un des suspects et exclure l'autre.

Le 2^{ème} but était de vérifier la validité d'une technique d'orientation et de détection de sperme par la phosphatase acide, en mettant en évidence un protocole (diluer un échantillon pur de sperme à la plus faible concentration et tester sur 5 différents supports), tout en respectant les paramètres suivants : sensibilité, répétabilité et reproductibilité ; qui sont les trois critères les plus importants pour cette méthode d'essai.

Les résultats obtenus de cette méthode ont défini les limites de cette méthode par rapports aux paramètres cités précédemment, aux taux de dilutions (ou le seuil analytique a été retrouvé jusqu'à 1/500) sur les différents supports (couche, serviette hygiénique, coton et nylon).

D'autre part on a pu déterminer, grâce à la comparaison des profils génétiques l'identité du coupable lors d'une affaire d'agression sexuelle réelle.

Mots clés : test colorimétrique, phosphatase acide, sperme, agression sexuelle, profil génétique.

Abstract

Forensic science is the scientific discipline that studies traces related to criminal activities. This discipline relies on experimental sciences to reveal traces of DNA. However, the main issue lies in their interpretation: identification, association with a source or activity and reconstruction of events.

In this work, we studied a real case of sexual assault having as data: a seal from the victim and three blood samples belonging to the victim and to the two suspects (which we use as comparison profiles with the one obtained by analysis of the semen stains taken from the exhibit), by comparing the genetic profiles of the suspects, the semen stains and the victim, we were able to include one of the suspects and exclude the other.

The second goal was to verify the validation of a technique for orientation and detection of sperm by acid phosphatase, by highlighting a protocol (dilute a pure sample of sperm at the lowest concentration and test on five different supports), while respecting the following parameters: sensitivity, repeatability and reproducibility; which are the three most important criteria for this test method.

The results obtained from this method defined the limits of this method in relation to the parameters mentioned above, to the dilution rates (or the analytical threshold was found up to 1/500) on the different supports (diaper, sanitary napkin, cotton and nylon).

On the other hand, we have been able to determine, thanks to the comparison of genetic profiles, the identity of the culprit in a case of real sexual assault.

Keywords: colorimetric test, acid phosphatase, sperm, sexual assault, genetic profile.

ملخص

علم الطب الشرعي هو النظام العلمي الذي يدرس الآثار المتعلقة بالأنشطة الإجرامية. يعتمد هذا التخصص على العلوم التجريبية للكشف عن آثار الحمض النووي. ومع ذلك ، فإن القضية الرئيسية تكمن في تفسيرهم: تحديد الهوية ، والارتباط بمصدر أو نشاط وإعادة بناء الأحداث.

في هذا العمل ، درسنا حالة حقيقية من الاعتداء الجنسي باستخدام البيانات: ختم من الضحية وثلاث عينات دم تخص الضحية والمتهمين (والتي نستخدمها كملفات مقارنة مع تلك التي تم الحصول عليها عن طريق تحليل بقع السائل المنوي. مأخوذة من المعرض) ، من خلال مقارنة السمات الجينية للمشتبه بهم وبقع السائل المنوي والضحية ، تمكنا من تضمين أحد المشتبه بهم واستبعاد الآخر.

الهدف الثاني هو التحقق من صحة تقنية توجيه واكتشاف الحيوانات المنوية بواسطة الفوسفاتيز الحمضي ، من خلال تسليط الضوء على بروتوكول (تميع عينة نقية من الحيوانات المنوية بأقل تركيز واختبار على 5 دعامات مختلفة) ، مع مراعاة المعايير التالية: الحساسية والتكرار وقابلية التكاثر ؛ وهي أهم ثلاثة معايير لطريقة الاختبار هذه.

حددت النتائج التي تم الحصول عليها من هذه الطريقة حدود هذه الطريقة فيما يتعلق بالمعايير المذكورة أعلاه ، لمعدلات التخفيف (أو تم العثور على الحد التحليلي حتى 500/1) على الدعامات المختلفة (حفاضات ، فوط صحية ، قطن ، نايلون).

من ناحية أخرى ، تمكنا من تحديد هوية الجاني في حالة اعتداء جنسي حقيقي بفضل مقارنة السمات الجينية.

الكلمات المفتاحية: اختبار القياس اللوني ، الفوسفاتاز الحمضي ، الحيوانات المنوية ، الاعتداء الجنسي ، الملف الوراثي.

Sommaire

Introduction	01
--------------------	----

Chapitre : Etude bibliographique.

I	-Historique.....	02
II	- L'ADN et l'empreinte génétique : la molécule d'ADN est si informative	02
II.1	- Chercher de l'ADN.....	02
II.2	- Profil ADN et empreinte génétique	03
III	-Les polymorphismes de l'ADN.....	04
III.1	- Les caractéristiques des polymorphismes	04
III.1.1	-Le polymorphisme d'un seul nucléotide SNP (de séquence)	04
III.1.2	- Le polymorphisme de longueur (les séquences répétitives).....	04
III.1.2.1	- Les mini satellites.....	05
III.1.2.2	- Les micro satellites.....	05
III.1.3	- Le polymorphisme de restriction RFLP.....	06
IV	- Dégradation de l'ADN et interférences dans l'analyse criminalistique	07
V	- La difficulté des mélanges d'ADN	07
VI	- L'analyse de l'ADN nucléaire	08
VI.1	- Les analyses d'ADN particulières (test de sexe).....	09
VII	- Les ennemis de l'ADN.....	11
VIII	- Mise en évidence du matériel biologique.....	11
VIII.1	- Les sources d'ADN	11
VIII.2	- Trace de sperme.....	11
VIII.3	-Recherche et mise en évidence biochimique du sperme.....	12
VIII.3.1	- Le principe de la phosphatase acide	12
IX	-Extraction de l'ADN	14
X	- Quantification de l'ADN par PCR en temps réel	14
XI	- L'amplification de l'ADN par PCR.....	15
XII	- L'électrophorèse capillaire	16
XIII	- Validation d'une méthode d'analyse	16

Chapitre : Matériels et méthodes.

I	Matériels	18
I.1	Matériel biologique	18
I.2	Matériel non biologique.....	18
I.3	Affaire réelle	19
II	Méthode.....	19
II.1	Désinfection et préparation de la paillasse	19
II.2	Préparation des dilutions du sperme pur pour la validation	19
III	Les tests préliminaires	20
III.1	Test d'orientation crimelite.....	20
III.1.1	Méthode d'utilisation.....	20
III.1.2	Le processus opératoire.....	20
III.2	Examen chimique : recherche de phosphatase acide (PA).....	21
III.2.1	Le principe.....	21
III.2.1.1	Recherche de la phosphatase acide (test par vaporisation).....	21
III.2.1.2	Interprétation des résultats.....	22
III.2.2	La préparation des réactifs	22

III.2.3	La validation de la phosphatase acide.....	23
III.2.3.1	Objectifs	23
III.2.3.2	Plan d'expériences effectuées.....	23
III.2.3.3	Préparation des échantillons pour la validation.....	23
IV	Extraction d'ADN	24
IV.1	Le contenu du kit Qiagen	25
IV.2	Le processus opératoire de l'extraction d'ADN	25
IV.2.1	Préparation du tampon AW1	25
IV.2.2	Préparation du tampon AW2	25
IV.2.3	La Lyse.....	25
IV.2.4	La purification.....	26
V	La quantification par une PCR en temps réel	27
V.1	Le principe	27
V.2	Le protocole de la quantification	29
V.2.1	Les composants du kit Quantifler Human DNA	29
V.2.2	Cible du kit Quantifler	30
V.2.3	Préparer la courbe d'étalon à partir de l'ADN standard 200ng/ml.....	30
V.2.4	Préparation de la plaque de la quantification	30
V.2.5	Préparation du Mix	31
VI	L'amplification de l'ADN par PCR multiplexe.....	31
VI.1	Le protocole	32
VII	La post PCR.....	34
VII.1	Le protocole	34
VIII	Electrophorèse capillaire	34
IX	Profilage ADN.....	35
X	Validation du profil génétique	35
XI	Méthode de travail sur une affaire réelle	36

Chapitre : Résultats et discussion

I	Les résultats de la validation	37
I.1	Les résultats de la sous-presse récapitulés dans les tableaux suivants	38
II	Interprétation et discussion des résultats	39
III	Etude comparative à nos travaux.....	39
III.1	Etude de la spécificité	40
IV	Résultats et interprétation de l'affaire réelle	42
IV.1	Les résultats obtenus de la quantification	43
IV.2	Les profils génétiques obtenus	44
	Conclusion.....	45

Les références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

L'histoire de la criminalistique a toujours été fascinante et particulière, surtout avec les derniers progrès scientifiques, il s'agit d'une science qui se caractérise par l'observation, de la scène de crime aux actes de laboratoire, des traces relevées et analysées et une conclusion de l'observation par des experts et ainsi une interprétation des résultats. Passer du terrain aux paillasse des laboratoires, l'observation n'a de valeur que par l'interprétation des résultats obtenus (**François, 2020**).

La biologie moléculaire et la génétique sont des études et des techniques de base sur laquelle se repose l'analyse d'ADN et d'empreinte génétique (DNA fingerprint) dans les laboratoires de la police scientifique (**Bry, 1999**).

En matière pénale, la méthode d'identification de référence est l'identification par empreinte génétique. Initiée par Sir Alec Jeffreys, elle consistait en l'analyse de polymorphismes de longueur de fragments de restriction (ou RFLP pour restriction fragment length polymorphism). Elle fût rapidement remplacée par la PCR, son utilisation en criminalistique décupla les capacités d'analyse, permettant d'obtenir des empreintes génétiques à partir de traces contenant peu d'ADN, ou de l'ADN dégradé. Les variations génétiques recherchées lors du profilage sont désignées par l'acronyme STR (short tandem repeats) sont amplifiées par PCR multiplexe ensuite détectées par électrophorèse capillaire pour obtenir au final un profil génétique (**Laurent, 2017**).

À partir du code génétique spécifique à chaque individu, on peut extraire des informations situées dans des zones particulières de l'ADN appelées microsatellites ou STR. Ces courtes séquences nucléotidiques (de deux à six paires de bases) polymorphes, sont utilisées comme marqueurs génétiques. La carte d'identité réalisée à partir de ces marqueurs est appelée le profil génétique (**Briant, 2011**).

L'analyse des empreintes génétiques a maintenant été utilisée dans de nombreuses affaires criminelles (agressions sexuelles et homicides) et civiles (recherche de paternité) partout dans le monde et elle est devenue une technologie bien établie (**Curran, 1997**). Dans ce but et afin d'identifier les individus inculpés ou mêlés dans toute affaire judiciaire, l'institut national de la police scientifique en Algérie traite ces affaires par la mise en œuvre des techniques scientifiques de laboratoire, qui consiste en l'analyse d'ADN et de différents prélèvements recueillis sur les lieux d'infraction pour enfin obtenir un profil génétique et résoudre les investigations de la justice.

En cas d'agression sexuelle, le liquide biologique le plus recherché pour l'établissement d'un profil génétique est évidemment le sperme, afin de pouvoir révéler l'identification de l'agresseur. La mise en évidence du liquide séminal peut être réalisée grâce à différents tests dont celui de la phosphatase acide.

L'objectif de notre travail au sein du laboratoire de la police scientifique repose sur :

- La confirmation de la validation de la phosphatase acide, une technique colorimétrique d'orientation qui consiste à révéler la présence de taches de sperme à différentes concentrations, sur différents supports.
- L'établissement d'un profil génétique pour une affaire réelle d'agression sexuelle à partir de traces de sperme prélevées sur le scellé de la victime (défunte) en suivant des techniques de laboratoire pour obtenir une quantité d'ADN à analyser, pour enfin arriver au profil génétique de l'agresseur.

Chapitre

Etude bibliographique.

I Historique

La police scientifique est fondée sur le postulat d'Edmond Locard, professeur de médecine légale et fondateur du premier laboratoire de police scientifique au monde en 1910 (**Laurent et al., 2017**).

La criminalistique, est une discipline qui regroupe l'ensemble des méthodes d'analyses scientifiques qui reposent sur le fait qu'un malfaiteur laisse des traces sur les lieux de l'infraction qui détermineront sa présence et son action sur la scène d'infraction, depuis près de trente années la biologie a révolutionné les preuves scientifiques dans le monde judiciaire sur l'apport de nouvelles technologies d'analyse Adn en génétique criminalistique (**Laurent, 2017**).

En 1985 la découverte de l'empreinte génétique par le généticien britannique Sir Alex Jeffreys a permis l'innovation des méthodes de profilage d'ADN au service de la justice, par les microsatellites (**Butler, 2005**).

Pendant la même année, le biochimiste américain Kary Bank Mullis a inventé la PCR (Plymerase Chain Reaction) son utilité a servi la police scientifique à augmenter et amplifier la quantité d'ADN infime trouvée sur les scènes d'infraction (**Saiki et al., 1985**).

Depuis le milieu des années 1980, l'introduction des tests ADN dans un contexte médico-légal en Algérie a contribué de manière importante au bon déroulement de la justice criminelle en aidant à la condamnation des coupables et a l'exonération des innocents (**Cherifi, 2018**).

II L'ADN et l'empreinte génétique : L'ADN est une molécule si informative

Tout organisme vivant est constitué d'un assemblage de cellules, génétiquement identiques, dans lesquelles se trouve l'intégralité des informations relatives à son fonctionnement. Ces informations sont contenues dans un bio-polymère : l'acide désoxyribonucléique (ADN). Cette macromolécule, qui supporte l'information génétique, est spécifique à chaque individu. Elle est composée d'une répétition de nucléotides (**Briant, 2010**).

La molécule d'ADN est le support génétique de tout individu. On le retrouve dans le noyau des cellules de l'organisme et aussi en plus petite quantité dans les mitochondries. Il a la particularité d'être identique dans toutes les cellules d'un même organisme, en effet chaque cellule mère qui se divise pour donner des cellules filles va transmettre une réplique à l'identique de son ADN. De même elle se transmet de manière héréditaire et chaque parent transmet une partie de son patrimoine génétique à son enfant par le biais des cellules germinales (**Coquoz et al., 2012**).

II.1 Chercher de l'ADN

Tout individu laisse son ADN un peu partout : sur une brosse à dent, un mégot, ou encore dans un cheveu pris dans les mailles d'un bonnet, encore plus systématiquement dans le sang, le sperme et même dans les cellules contenues dans ses empreintes digitales. L'expertise en génétique judiciaire débute par l'identification des traces humaines avant de procéder aux analyses génétiques (**Ricordel, 2011**).

La chronologie du développement d'analyse d'ADN en médecine légale est résumée dans le tableau I.

Tableau I : Les principales dates de développement de l'analyse ADN en pratique judiciaire (Doutrempuich, 2012).

1985	Développement par Sir Alex Jeffreys des premières analyses d'identification
1987	Création de laboratoires pour les analyses de routine en Angleterre (Laboratoire Cellmark) et aux États-Unis (Laboratoire Lifécode)
1988	Développement d'une nouvelle méthode d'analyse de l'ADN grâce à des sondes (mono-locus)
1991	Développement des analyses des STR
1993	Mise en place du premier kit commercial d'analyses des STR
1995	Développement du premier analyseur de STR en fluorescence : ABI 310
1996	Développement de l'analyse de l'ADN mitochondrial
2000	Développement de kits commerciaux permettant l'analyse de 16 STR en simultané
2001	Développement de l'analyse du Chromosome Y
2002	Développement de la recherche sur les SNP
2005	Développement de kits commerciaux sur l'analyse du Chromosome Y
2010	Développement de séquenceurs de seconde génération

II.2 Profil ADN et empreinte génétique

En matière pénale, la méthode d'identification de référence est l'identification par empreinte génétique. Initiée par Sir Alec Jeffreys, en 1983, elle consistait en l'analyse par *Southern blot*, de polymorphismes de longueur de fragments de restriction (ou RFLP Polymorphisme de longueur des fragments de restriction) (Jeffreys AJ *et al.*, 1985).

L'inconvénient majeur de cette technique étant les grandes quantités d'ADN nécessaires, elle fût rapidement remplacée par la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) méthode d'amplification de l'ADN *in vitro* (Saiki *et al.*, 1988).

L'utilisation de la PCR en criminalistique décupla les capacités d'analyse, permettant d'obtenir des empreintes génétiques à partir de traces contenant peu d'ADN, ou de l'ADN dégradé. Depuis près de 30 ans, les variations génétiques recherchées concernent les microsatellites, désignés par l'acronyme STR (Répétitions courtes en tandem), des séquences courtes de 2 à 6 paires nucléotidiques répétées jusqu'à plusieurs dizaines de fois (Butler, 2007 ; Fan *et al.*, 2007).

L'expression d'empreinte masque la diversité des analyses d'ADN disponibles, donnant l'impression erronée de l'existence d'une caractéristique personnelle, le terme de profil d'ADN est probablement le plus adéquat, le terme de profil indiquant bien que cette analyse détermine le contour d'une personne, sans en donner, de loin une description complète (Coquoz *et al.*, 2013).

III Les polymorphismes de l'ADN

Des variations communes de la séquence des gènes sont rencontrées tout au long du génome et sont responsables de l'extrême diversité de l'espèce humaine : ce sont les polymorphismes génétiques (**Robert, 2010**).

Étymologiquement, polymorphisme veut dire l'hétérogénéité des formes (**Till et al., 1989**).

Les polymorphismes génétiques sont des variations interindividuelles et si on compare l'ADN de deux personnes prises au hasard, on trouve en moyenne une différence tous les 1200 nucléotides (**Sachidanandam et al., 2001**).

Ce sont de nombreuses variations de la séquence génomique et le support de variations phénotypiques mineures. Leur fréquence varie d'un gène à l'autre, elle est plus élevée dans les introns que les exons (**Robert, 2010**).

Environ 99,3% d'ADN est similaire chez tous les individus, et 0,3% d'ADN est hétérogène ce qui fait la différence entre chaque individu, plus d'un tiers de nos gènes sont polymorphes (**Butler, 2001**).

III.1 Les caractéristiques des polymorphismes

III.1.1 Le polymorphisme d'un seul nucléotide SNP (de séquence)

Les SNP (polymorphisme d'un seul nucléotide), sont une forme d'altération ponctuelle, qui est une substitution très fréquente non délétère résultant du remplacement d'un nucléotide par un autre (**Robert, 2010**).

Tous les SNP proviennent d'une mutation initiale, mais lorsque l'on observe un variant génétique dans une population, l'évènement qui lui a donné naissance est généralement ancien et le SNP observé ne constitue pas une nouvelle mutation. Il s'agit en fait d'un polymorphisme transmis de génération en génération (**Courivaud et al., 2012**).

Ce sont des marqueurs bi-alléliques de petites tailles utilisés en criminalistique qui permettent l'analyse et l'étude des molécules d'acides nucléiques fragmentés dans le cadre d'identification des personnes (**Keyser et al., 2006**).

III.1.2 Le polymorphisme de longueur (les séquences répétitives)

C'est en 1985 que l'analyse de l'ADN a fait irruption sur la scène de la criminalistique sous la forme de la technique dite « empreinte génétique ». Cette irruption était le fruit de la découverte d'une grande nouveauté dans notre connaissance de l'ADN, cette nouveauté ce sont les séquences répétitives ; qui sont les zones de l'ADN non codant où des séquences d'ADN sont répétées (**Jeffreys, 1985 ; Coquoz et al., 2013**).

Environ 50 % du génome est constitué de séquences qui sont répétées, soit les unes à la suite des autres, en tandem, soit de façon dispersée dans le génome. Elles sont de taille variable, constituées de répétitions d'un motif unitaire plus ou moins complexe, selon la taille du motif et le nombre de répétitions (**Robert, 2010**).

III.1.2.1 Les minisatellites

C'est un nombre variable de séquences répétées en tandem (VNTR). (**Ricordel 2015**)

Ce sont des motifs de quelques dizaines de nucléotides répétés jusqu'à quelques centaines de fois, très polymorphes dans leur séquence et le nombre de répétitions, et qui sont également dispersés dans le génome (**Robert, 2010**).

Les satellites, pour lesquels le motif, peut comporter jusqu'à quelques centaines de nucléotides, est répété un très grand nombre de fois (de l'ordre de 500 000 à 1 000 000) (**Robert, 2010**).

Les travaux de Jeffreys ont montré que certains loci non codants de l'ADN sont occupés par des minisatellites. Ces loci, sont donc occupés par des allèles très différents selon les individus. Comme chaque locus est multi-allélique, cela les rend spécifiques de chaque individu et la probabilité de rencontrer deux individus ayant le même nombre de séquences est très infime, on appelle cela le polymorphisme de répétition (**Bry 1999**).

III.1.2.2 Les microsatellites

STR (Répétitions courtes en tandem), ce sont des séquences comportant des séries de répétitions n'excédant pas le plus souvent quelques dizaines, d'un motif court (en majorité d'un à cinq nucléotides) que l'on rencontre en de nombreux points du génome. On peut les rencontrer dans certains introns, en particulier des répétitions des deux nucléotides C et A (CA repeats). Le nombre de ces répétitions varie d'un individu à l'autre, ce qui représente un polymorphisme pouvant être utilisé comme marqueur génétique (**Robert, 2010**).

De même que les VNTR, les STR sont donc polymorphes, très informatifs, et ils se transmettent selon les lois mendéliennes. Ils vont donc être très précieux pour identifier des individus, et de par leur petite taille, ils pourront être étudiés par des techniques d'amplification *in vitro* (**Bry, 1999**).

La plupart des polymorphismes des STR examinés ne concernent pas le nombre de répétitions du motif, mais leur séquence nucléotidique (**Rockenbauer et al., 2014 ; Morling et al., 2015**).

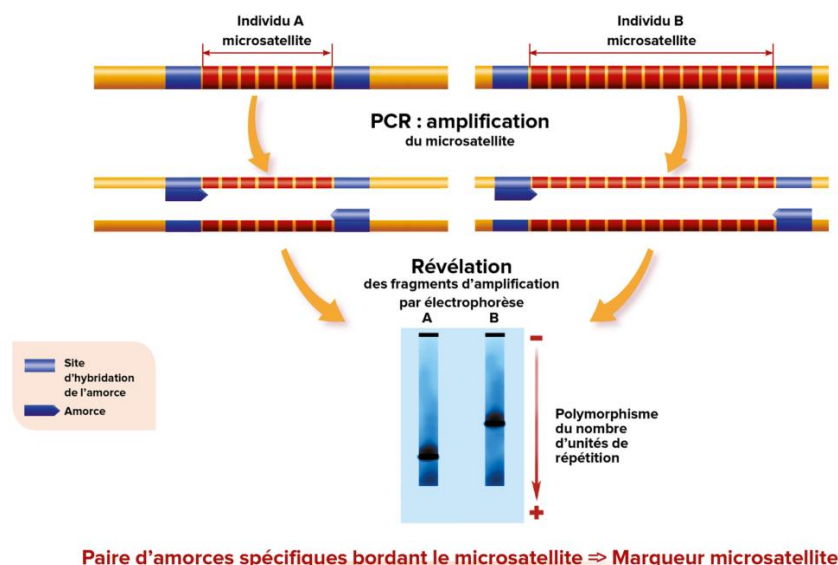


Figure 01. Schéma des marqueurs microsatellites (Gnis, 2019).

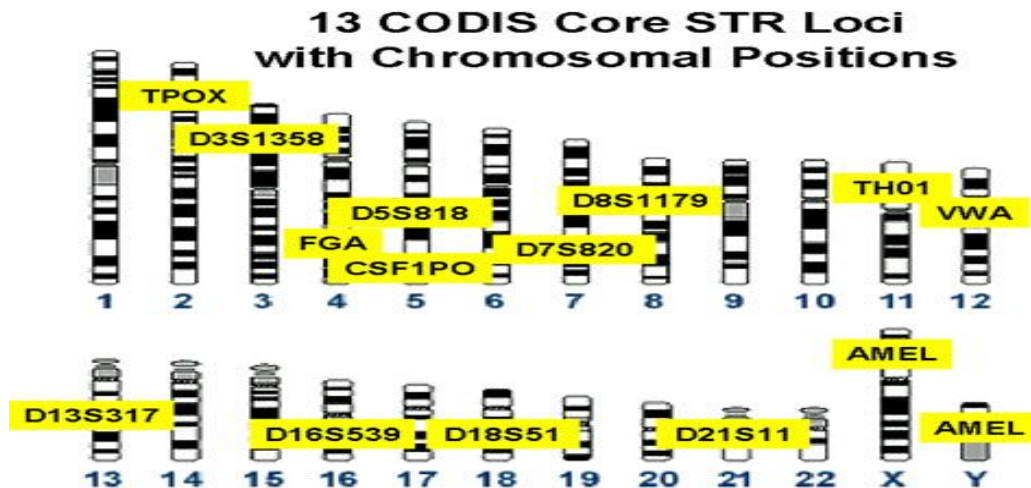


Figure 02. Les 13 microsatellites utilisés pour établir les empreintes génétiques (Butler, 2013).

III.1.3 Le polymorphisme de restriction RFLP

La Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) est une méthode d'analyse génétique utilisée pour la première fois en 1980 par Botstein et al. Elle permet de détecter le polymorphisme génétique inter- ou intra- espèce dans les régions codantes et non codantes (Rasmussen, 2012).

Cette méthode est donc basée sur la variation d'un nucléotide au niveau d'un site de restriction. Après extraction de l'ADN, celui-ci est digéré par une enzyme, et les fragments obtenus séparés les uns des autres par électrophorèse sur gel d'agarose. Une sonde marquée est alors utilisée pour révéler certains fragments d'ADN, ce qui nous permet de déduire des différences de nucléotides entre les séquences étudiées (Reshma *et al.*, 2017).

L'ADN varie d'une personne à une autre, tant au niveau des gènes qui constituent la base de leur individualité, que des séquences inter-géniques. La variabilité est même beaucoup plus forte pour les séquences non codantes et non régulatrices (où les mutations peuvent s'accumuler sans conséquences) qu'au niveau des exons des gènes et des zones de contrôle de leur expression. Cette variabilité de l'ADN d'un même locus entre deux individus peut modifier les sites de reconnaissance des enzymes de restriction et donc les points de clivage. Le résultat est une modification de la taille d'un fragment d'ADN analysé par « Southern blot » d'où le nom anglais de RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism (Kahn, 1986).

L'utilisation d'un polymorphisme de taille des fragments de restriction pour détecter des hétérozygotes d'une maladie autosomale récessive et pour faire un diagnostic prénatal de l'affection (Kahn, 1986).

Après la digestion d'ADN de deux individus par une enzyme de restriction, ça résulte à chaque fois des fragments avec une longueur différente (Botstein *et al.*, 1980).

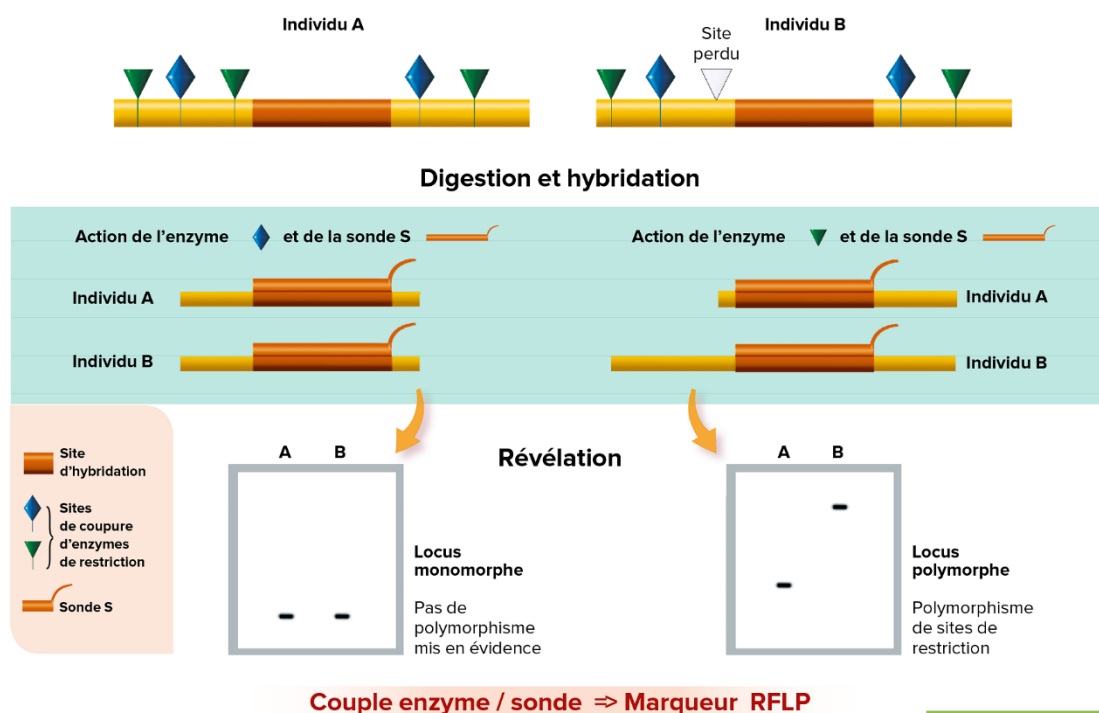


Figure 03. Schéma de la réaction du Polymorphisme de Longueur des Fragments d'Amplification RFLP (Gnis-pedagogie, 2017).

IV Dégradation de l'ADN et interférences dans l'analyse criminalistique

En génétique médicale, les échantillons biologiques analysés sont généralement riches en ADN et conservés dans des conditions de température et d'humidité optimales afin de garantir leur intégrité (Laurent *et al.*, 2017).

Le dépôt de traces sur des supports non contrôlés (tissus et objets de la vie courante) peut également être contaminé par des produits (le calcium, le colorant indigo, le collagène, etc.) qui seront co-purifiés avec l'ADN et qui pourront interférer de façon partielle ou totale avec les analyses génétiques réalisées par amplifications par PCR (Alaeddini, 2012).

Il n'est donc pas surprenant qu'un grand nombre de profils génétiques analysés en génétique criminalistique soient des profils partiels (intensité de fluorescence trop faible, balance d'hétérozygotie sous le seuil fixé, etc.) (Laurent *et al.*, 2017).

Les grands fragments d'ADN sont sensibles à la dégradation, Outre le fait que l'amplification soit impossible pour certains marqueurs comme les STR, la dégradation peut affecter sélectivement l'allèle le plus grand chez un individu hétérozygote, c'est ce que l'on appelle un « drop-out » (Laurent *et al.*, 2017).

V La difficulté des mélanges d'ADN

Si la détérioration de l'ADN est, en criminalistique, à l'origine de nombreuses difficultés, ce sont les mélanges d'ADN qui représentent le plus grand défi. Dès lors qu'un objet est manipulé par plusieurs individus, des traces biologiques peuvent en effet être prélevées en même temps conduisant ainsi à un mélange d'ADN au sein de l'échantillon (Laurent *et al.*, 2017).

Dès la mise en évidence, sur au moins deux marqueurs, de plus de deux allèles, l'hypothèse de la présence d'ADN issu d'au moins deux individus, au sein de la trace biologique, doit être testée (**Schneider *et al.*, 2009**).

Cette hypothèse est renforcée par la présence de balances d'hétérozygotie déséquilibrées pour certains marqueurs, preuve d'un effet cumulatif d'allèles de taille identique provenant d'individus différents qui se traduit par des intensités de fluorescence variables (**Gill *et al.*, 2009**).

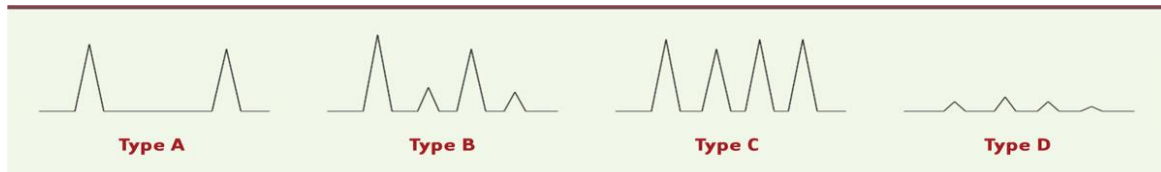


Figure 04. Exemples de profils génétiques observables dans différentes conditions de mélange (Laurent *et al.*, 2017).

- Le type A : représente un profil unique (hétérozygote) ou un mélange de deux individus possédant les mêmes allèles.
- Le type B : correspond à un profil en mélange où il est possible de séparer le contributeur minoritaire (pics de faible intensité) du contributeur majoritaire (pics de haute intensité).
- Le type C : correspond à un profil en mélange de deux contributeurs de type « mélange à comparer » où il n'est pas possible de séparer les contributeurs. Le type D correspond à un profil ADN en mélange obtenu à partir d'une quantité très faible d'ADN pouvant générer des disparités d'amplification caractérisées par la présence d'effets stochastiques. Ce type de profil n'est pas interprétable (**Laurent *et al.*, 2017**).

VI L'analyse de l'ADN nucléaire

Le génome des cellules humaines comporte des séquences répétées qui varient selon leur taille. Ces unités répétitives comportent aujourd'hui 4 ou 5pb. Ce nombre définit l'allèle. (**Doutrempuich *et al.*, 2003, 2004**).

-L'analyse de l'ADN autosomal résumé dans le tableau II.

Tableau II : Des loci analysés sur l'ADN autosomal (Doutrempuich, 2012).

Locus	Chr	Position	Taille des fragments	Motif répété	Echelle allélique
D8S1179	8	8q	de 128 à 168 pb	(TCTR)n	entre 8 et 19
D21S11	21	21q11-q21	de 189 à 243 pb	(TCTA)n	entre 24.2 et 38
D7S820	7	7q11.21-q22	de 215 à 247 pb	(AGAT)n	entre 6 et 15
CSF1PO	5	q33.3-34 située dans le gène du récepteur cfms proto — oncogène pour le CSF1.	de 295 à 327 pb	(AGAT)n	entre 7 et 15
D3S1358	3	3p	de 114 et 142 pb	(TCTA)n	entre 9 et 19
TH01	11	11p15.5 située dans l'intron 1 du gène de la tyrosine hydrolase	de 154 pb à 178 pb	(TCAT)n	entre 5 et 11
D13S317	13	13q22-q31	de 165 à 197 pb	(AGAT)n	entre 5 et 15
D16S539	16	16q24-qter	de 264 à 304 pb	(AGAT)n	entre 5 et 15
D2S1338	2	2q35-37.1	de 289 à 341 pb	(TGCC)n	entre 15 et 28
D19S433	19	19q12-13.1	de 106 à 140 pb	(AAGG)n	entre 9 et 18.2
vWA	12	12p12 pter située dans l'intron 40 du gène humain VWA	de 135 à 167 pb	(TCTR)n	entre 11 et 22
TPOX	2	2p13 située dans le gène de la thyroïde-péroxydase	de 232 à 248pb	(AATG)n	entre 8 et 12
D18S51	18	18q21.3	de 273 à 341 pb	(AGAA)n	entre 9 et 26
D5S818	5	5q21-31	de 135 à 171 pb	(AGAT)n	entre 7 et 16
FGA	4	4q28	de 219 à 267 pb	(TTTC)n	entre 16.2 et 30

-Des analyses complémentaires peuvent être réalisées afin :

- D'augmenter le nombre de résultats sur des prélèvements d'ADN dégradé
- D'établir une lignée paternelle dans l'identification de personne (découverte de cadavre, paternité) (Doutrempuich, 2012).

VI.1 Les analyses d'ADN particulières (test de sexe)

Le test du sexe par analyse d'ADN a un statut un peu particulier, le sexe est un polymorphisme avec 2 variantes possibles, dans le cas de délit sexuel, la recherche de la présence d'ADN dans les chromosomes X et Y permet de vérifier que le profil d'ADN provient des cellules masculines (spermatozoïdes) (Coquoz *et al.*, 2015).

Un test du sexe très simple peut être effectué par analyse d'ADN : l'analyse du gène de « l'amélogénine ». Ce gène portant l'information génétique pour la synthèse d'une protéine des dents est commun aux chromosomes X et Y. Toutefois, l'exemplaire porté par le chromosome Y comporte 6 paires de bases de plus que celui du chromosome X. Après amplification par PCR, une électrophorèse permet aisément de distinguer les deux allèles (Sullivan, 1993).

-L'identification d'individus masculins à partir de l'étude de 17 loci situés sur le chromosome sexuel Y résumé dans tableau III.

Tableau III : Liste des loci analysés sur le chromosome Y (Doutrempuich, 2012).

Locus	Chr	Position	Taille des fragments	Motif répété	Échelle allélique
Amélogénine	Y	Yp11.2			
DY S393	Y		de 113 à 137 pb	(AGAT) _n	entre 11 et 17
DY S19	Y		de 182 à 201 pb	TAGA) _n	entre 12 et 17
DY S389 II	Y		de 294 à 320 pb	(TCTG et TCTA) _n	entre 27 et 33
DY S390	Y		de 179 à 199 pb	(TCTA et TCTG) _n	entre 20 et 25
DY S391	Y		de 245 à 257 pb	(TCTA) _n	entre 9 et 12
DY S385	Y		de 346 à 386 pb	(GAAA) _n	entre 8 et 19
DY S389 I	Y		de 243 à 259 pb	(TCTG et TCTA) _n	entre 11 et 15
DY S439	Y		de 238 à 254 bp	(GATA) _n	entre 10 et 14
DY S438	Y		de 131 à 158 bp	(TTTTTC) _n	entre 8 et 13
DY S392	Y		de 247 à 262 pb	(TAT) _n	entre 10 et 15
DY S437	Y		de 183 à 199 pb.	(TCTA et TCTG) _n	entre 13 et 17
DY S456	Y		de 100 à 127 pb.	(AGAT) _n	entre 13 et 18
DY S458	Y		de 133 à 165 bp.	(GAAA) _n	entre 14 et 20
DY S4635	Y		de 242 à 274 bp.	(TCTA et TGTA) _n	entre 20 et 26
Y GATA H4	Y		de 114 à 150 pb.	(TAGA) _n	entre 8 et 13
DY S448	Y		de 274 à 332 pb.	(AGAGAT) _n	entre 17 et 24

-Les marqueurs du chromosome Y sont utilisés :

- Pour les recherches de paternité.
- Dans les affaires d'identification de victimes de catastrophes, pour identifier des liens de parenté éloignés. Les marqueurs autosomaux usuels n'apportent que peu d'informations sur ce lien car les profils génétiques peuvent être très différents et ils ne permettent aucune hypothèse sur la parenté. En revanche deux hommes dont le lien de parenté est éloigné doivent posséder les mêmes allèles.
- En cas de mélange complexe à trois ADN dont deux hommes et une femme, la lecture du profil génétique autosomal est complexe puisque les 3 ADN sont présents. L'haplotype du chromosome Y sera un mélange de deux ADN masculins plus aisé à interpréter.
- En cas d'agression sexuelle, on réalise une lyse différentielle à partir du prélèvement afin de séparer les spermatozoïdes des autres cellules présentes. Malgré cette séparation, lorsque le nombre de spermatozoïdes est particulièrement faible, il peut arriver qu'aucun ADN masculin ne soit détecté par les marqueurs autosomaux. L'ADN féminin fortement majoritaire, est préférentiellement amplifié au détriment de l'ADN masculin, minoritaire. Dans ce cas l'utilisation des marqueurs spécifiques du chromosome Y peut révéler un haplotype Y (**Ricordel, 2010**)
- L'identification de personnes de sexe féminin à partir de l'analyse de 12 loci localisés sur le chromosome sexuel X résumé dans le tableau. (Annexe)

VII Les ennemis de l'ADN

L'ADN des cellules déposées sur un objet ou une personne est soumis à des agressions environnementales qui peuvent le dégrader. Ces principaux facteurs sont :

- **L'humidité et l'eau** : qui rendent possible la dégradation de l'ADN par l'action des DNases.
- **La chaleur et le feu** : qui accélèrent les réactions chimiques tout et diverses réactions de dégradation d'ADN comme l'hydrolyse et l'oxydation ...
- **La lumière** : (les rayons UV) qui induisent également des transformations chimiques de l'ADN (Coquoz *et al.*, 2015 ; Doutrempuich, 2012).

VIII Mise en évidence du matériel biologique

La recherche de traces contenant de l'ADN ou de traces biologiques suspectes nécessite un travail minutieux qui passe par l'utilisation de tests indicatifs permettant de révéler la présence de certains matériels biologiques (sang, sperme, salive, urine ou fèces) de manière spécifique. Ce sont souvent des tests d'orientation, biochimiques et colorés qui indiquent quel type de matériel biologique est présent et qui permettent de localiser des taches ou traces afin de les prélever (Briant, 2010).

VIII.1 Les sources d'ADN

Un échantillon d'ADN peut avoir diverses sources physiques qui sont viables, il peut être liquide tel que le sang, sperme, urine, salive, ou non comme, os, dent et cheveu (Armstrong, 2013).

VIII.2 Trace de sperme

Le sperme est une suspension de cellule, les spermatozoïdes, dans un liquide le plasma séminal. La densité du sperme est de 100 000 cellules/ μ l. Il est donc très riche en ADN et si elle est découverte une trace de sperme devrait en principe fournir un résultat à l'analyse (coquoz *et al.*, 2015).

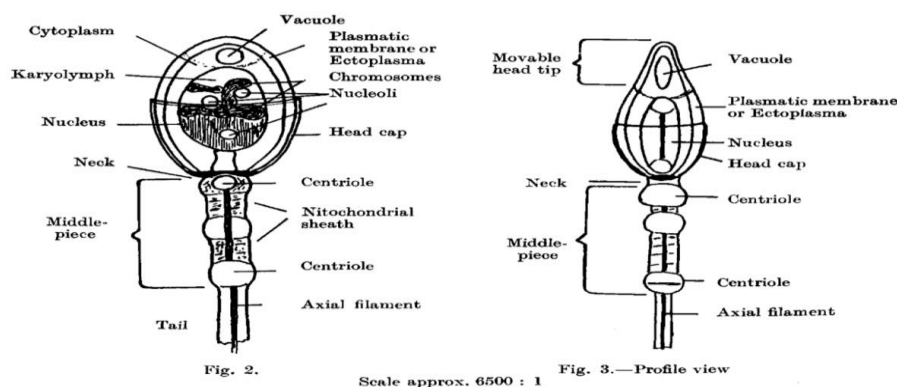


Figure 05. Structure d'un spermatozoïde humain (Duijn *et al.*, 1953).

VIII.3 Recherche et mise en évidence biochimique du sperme

Le sperme est une trace typique des délits sexuels. On s'attend logiquement à en trouver dans les orifices naturels de la victime mais aussi sur les lieux, les vêtements ou la peau de la victime (Willott, 1982)

Cette recherche s'effectue sur les scellés transmis dans le cadre d'affaires d'agressions à caractères sexuels. La caractérisation d'une tache de sperme se fait en premier temps par détecter les taches de sperme par la lumière (crimelite) pour visualiser la tache (Ricordel, 2015).

Pour détecter la présence de sperme, il convient de procéder en 2^{ème} temps par un test d'orientation : le test de la phosphatase acide (réactif Fast Blue B Salt) (Briant, 2010).

La phosphatase acide (PA) est une enzyme présente en concentration élevée dans le sperme. Elle catalyse les réactions de décomposition des composés du phosphate. En présence d'alpha-naphthylphosphate, la PA va libérer l'alpha-naphtol et le phosphate. L'alpha-naphtol va réagir avec le sel de diazodium (Fast Blue B Salt) pour former un colorant azoïque de couleur violette (Coquoz *et al.*, 2015 ; Briant, 2010).

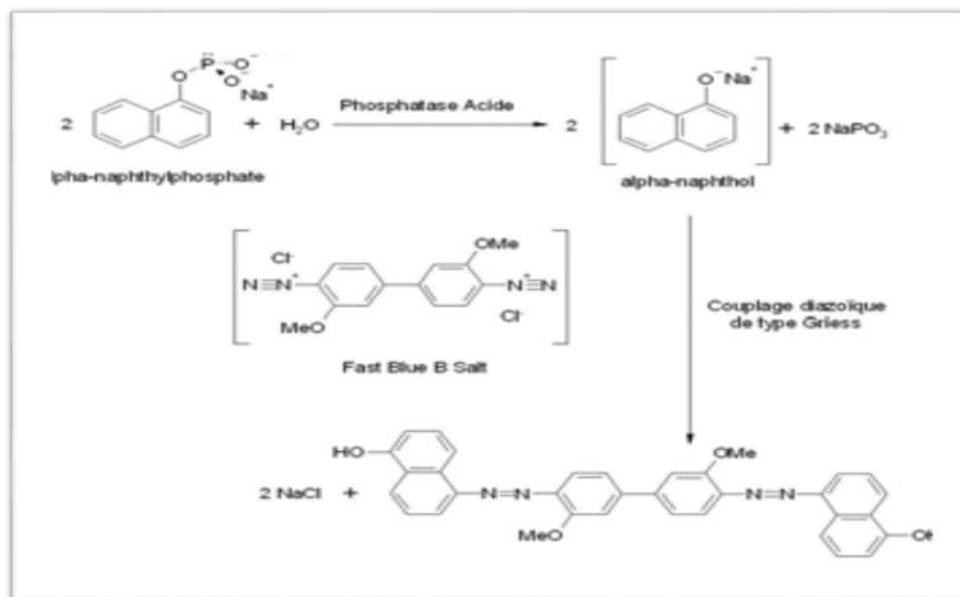


Figure 06. Schéma réactionnel de diazotation (mécanisme proposé phosphatase acide) (Briant, 2010)

VIII.3.1 Le principe de la phosphatase acide

Les phosphatases acides sont des enzymes produites par la glande prostatique (PAP). Elles catalysent les réactions de décomposition des composés du phosphate. Cette propriété est utilisée pour la détection de liquide spermatique. Le substrat utilisé est l'alpha-naphthylphosphate couplé à l'orthodianisidine comme révélateur. La recherche n'est pas faite directement sur la pièce à analyser par exemple, pour un vêtement, on réalise une « empreinte » en le pressant entre deux feuilles de papier absorbant humidifiée (Ricordel, 2011).

Les phosphatases acides éventuellement présentes sont alors partiellement transférées sur le papier absorbant. Elles sont révélées en vaporisant une solution acide d'alpha-naphtylphosphate de sodium et de colorant Fast Bleu B.

En présence de phosphatases acides, on observe une coloration violette sous forme de gouttes, taches ou zones violettes sur le papier absorbant.

L’empreinte sur le papier permet par analogie de localiser les taches suspectes sur le vêtement lui-même. Prélèvement pour confirmation cytochimique (**Ricordel, 2011**).

Résultats : (Figure 7)

L’examen d’orientation est une technique qui a largement fait ses preuves, le transfert sur papier filtre permet :

- De localiser des taches de sperme sur de grandes étoffes comme des draps, des housses de canapé...
- De travailler de manière exhaustive sur l’ensemble des pièces à conviction sans les altérer.
- De détecter des taches de sperme sur des tissus de couleur sombre ou foncé ou supportant des motifs qui ne permettent pas de les percevoir (**Ricordel, 2011**).



Figure 07. Réaction positif et révélation de liquide séminal (Ricordel, 2011).

Les limites :

Bien que d’apparence simple, la lecture des résultats requiert une expérience certaine et de la prudence car la réaction peut s’avérer faussement positive en présence de certaines moisissures, jus de fruits, crèmes contraceptives ... La vitesse d’apparition de la réaction et sa couleur sont importantes à surveiller :

- Un délai inférieur à 30 secondes est en faveur de la présence de sperme, une vitesse d’apparition plus lente conduit à une réserve sur les résultats jusqu’au contrôle ultérieur.

En présence d’autres types de sécrétions biologiques (vaginales), les taches apparaissent plus roses que violettes (**Ricordel, 2011**)

C’est la raison pour laquelle un examen de certitude est systématiquement mis en œuvre à partir des zones révélées comme positives au test d’orientation afin de confirmer ou infirmer la présence de spermatozoïdes en microscopie optique. (**FNAEG, 1998 ,2000,2001 ; Ricordel, 2011**).

IX Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une étape cruciale dans les dossiers médico-légaux pour obtenir des résultats fiables et de qualité. Les principales caractéristiques recherchées dans les méthodes d'extraction d'ADN comprennent une récupération élevée de l'ADN, l'élimination des impuretés et des inhibiteurs et un traitement à haut débit (Alonso, 2013).

-Les objectifs du processus d'extraction d'ADN sont généralement de :

1. Lysér les cellules pour libérer les molécules d'ADN.
2. Séparer les molécules d'ADN des autres matériaux cellulaires.
3. Isoler les ADN dans un format compatible avec les applications en aval, y compris l'amplification PCR (Butler, 2012).

X Quantification de l'ADN par PCR en temps réel

Les techniques de PCR en temps réel permettent de quantifier le produit amplifié au fur et à mesure de la réaction. La réaction quantitative en chaîne par polymérase en temps réel par transcription inverse (RT-qPCR) est une méthode pratique et très efficace pour la détection de l'ARNm dans les tissus ou les échantillons de fluides corporels. Elle présente les caractéristiques d'une opération facile, d'une sensibilité et d'une spécificité élevées, etc. Avec une large application en médecine, en biologie et dans d'autres domaines, la technique RT-qPCR a fait quelques progrès dans le domaine de la recherche en médecine légale. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification. Elle repose sur la chimie Taqman qui permet d'obtenir un signal fluorescent à partir d'une sonde bi-marquée dont l'augmentation du signal d'émission de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifiée (Higuchi *et al.*, 1993)

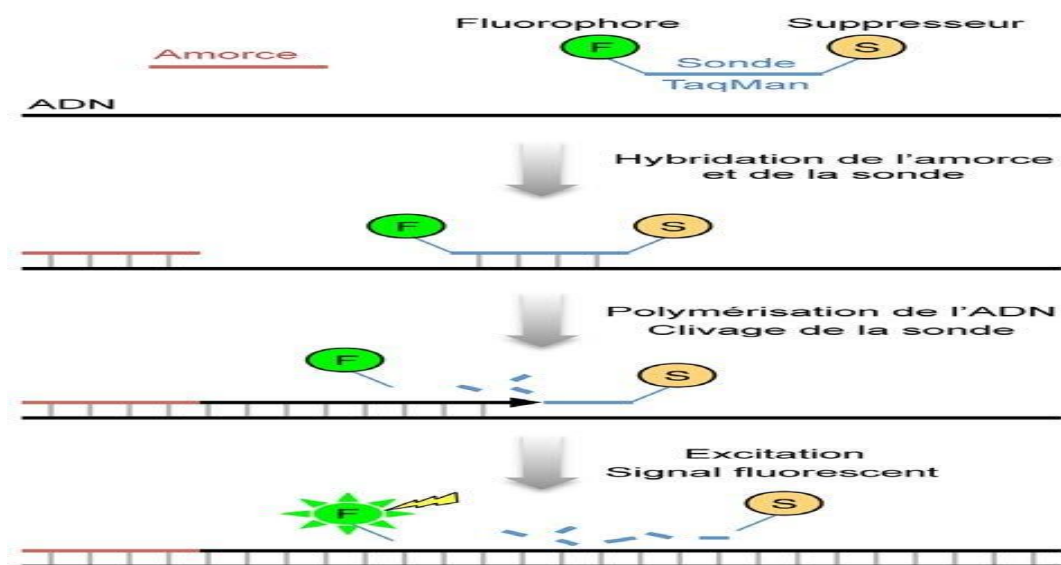


Figure 08. Schéma simplifié illustrant le principe de la méthode TaqMan pour la détection en temps réel de l'ADN amplifié (Flaender *et al.*, 2019).

L'amorce et la sonde TaqMan sont des oligonucléotides qui s'hybrident de façon spécifique sur l'ADN cible. La sonde comporte un fluorophore et un suppresseur qui empêche l'émission de

signal tant que la sonde est intacte. La polymérisation de l'ADN à partir de l'amorce s'accompagne d'un clivage de la sonde. Une fois que le fluorophore et le suppresseur sont dissociés, l'excitation à une longueur d'onde appropriée permet l'obtention d'un signal fluorescent. Sur ce schéma simplifié, un seul brin d'ADN (celui sur lequel s'hybride la sonde TaqMan) est représenté dans la partie supérieure de la figure (Flaender *et al.*, 2019).

XI L'amplification de l'ADN par PCR

Le principe de la PCR repose sur des répétitions de cycles de transition de température. Pour amplifier l'ADN, il faut mettre en présence dans le même milieu réactionnel l'ADN cible, des amorces, de l'ADN polymérase (Taq polymérase), des nucléotides, des ions Mg^{2+} , et assurer un pH optimal (Briant, 2010).

À chaque cycle, la quantité d'ADN est doublée et les nouvelles copies servent de matrice pour le cycle suivant. Ainsi la quantité d'ADN augmente de façon exponentielle. Deux types de méthodes d'amplification sont classiquement utilisés : la PCR traditionnelle (amplification exponentielle non quantifiée) et la PCR quantitative (Briant, 2010).

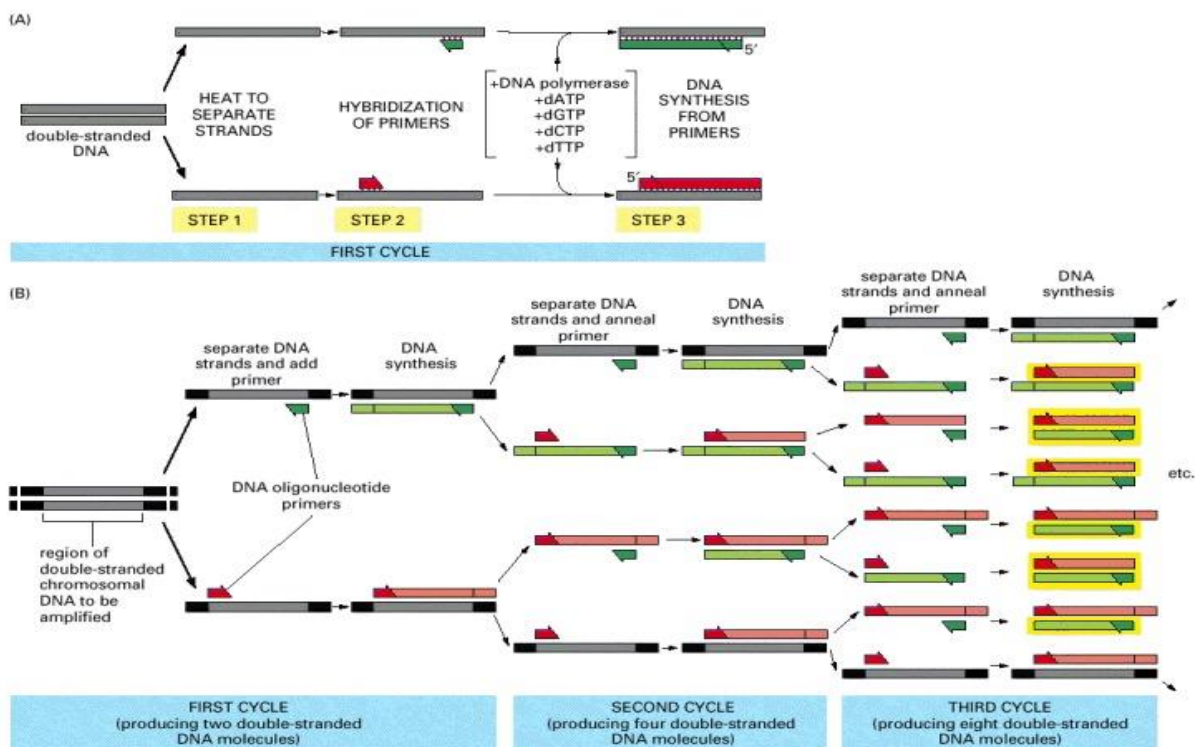


Figure 09. Amplification de l'ADN à l'aide de la technique PCR (Bruce *et al.*, 2002).

- Le Principe de la PCR « polymerase chain reaction » multiplexe permet d'obtenir d'importantes quantités de différents fragments d'ADN ou STR. Plusieurs cycles de multiplication ont lieu. Chaque cycle est constitué de trois phases différentes : la dénaturation pendant laquelle les brins d'ADN complémentaires se séparent, l'hybridation pendant laquelle les amorces vont se fixer sur les brins d'ADN, et l'élongation (extension des amorces) pendant laquelle la copie des STR s'effectue (Briant, 2010).

XII L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire en gel est aujourd'hui largement utilisée pour obtenir des profils ADN permettant de détecter des variations alléliques et donc de différencier les individus (**Butler, 1995**).

Développée depuis quelques années, l'électrophorèse capillaire (EC) est devenue une méthode de séparation efficace en médecine légale (**Labat, 2000**).

Lors de l'amplification, les copies des STR, ou amplicons, sont marquées par les fluorophores, Il faut ensuite déterminer la taille des fragments d'ADN amplifiés pour établir un profil génétique. Pour cela, on sépare les amplicons par électrophorèse capillaire (**Briant, 2011**).

C'est une des principales microtechniques en émergence destinées à l'analyse qualitative et quantitative de solutions complexes à partir d'échantillons de très faible volume (**Feuilleole et al., 1999**).

XIII Validation d'une méthode d'analyse

- La validation d'une méthode d'essai c'est de Confirmer par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites (**Longtin et al., 2022**).
- La validation permet de déterminer les caractéristiques propres à la méthode.
- L'étape de validation d'une méthode interne suit l'étape de développement. Il est important de ne pas confondre ces étapes, car la validation est effectuée sur une méthode développée et rédigée. Certaines données obtenues lors du développement peuvent cependant servir à la validation.
- La vérification : est de déterminer si les caractéristiques de la méthode normalisée sont satisfaites lorsque cette méthode est utilisée dans le contexte du laboratoire. La confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiées ont été satisfaites. (**Longtin et al., 2022**).
- Tout en assurant la qualité des résultats selon la norme des laboratoires de la police scientifique ISO 17025 (**Butler, 2010**).

La validation d'une méthode d'analyse qualitative (qui fournit des résultats exprimés sous un format non numérique par exemple : Présence/absence, positif/négatif) se fait tout en respectant les paramètres suivants :

- **La répétabilité** : qui consiste à analyser un même échantillon par un même opérateur, un même lot de réactifs, un même instrument et un même étalonnage (**CORFAC, 2018**).
- **La reproductibilité** : la reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des conditions différentes : utilisateur différent, appareil différent, jour différent ou même jour (**CORFAC, 2018**).
- **La robustesse** : qui est la capacité de donner des résultats proches en présence de changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de la procédure (**Clark et al., 2009**).

- **La sensibilité analytique** : Pour une méthode quantitative ou semi-quantitative, la sensibilité à une concentration donnée correspond au rapport de la variable mesurée à la valeur correspondante de la concentration connue. Elle peut aussi être définie comme un indice qui mesure l'aptitude de l'épreuve à détecter (**CLSI, 2008**).
- **La spécificité analytique** : La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Valeur attendue : Valeur théorique certifiée (**FDA, 2014**).

Chapitre

Matériel et méthodes.

Notre travail a été réalisé à la sous-direction de la police scientifique château neuf- Ben Aknoun, au niveau du département génétique/ADN pour une période de 3 mois.

Ce travail est porté sur la confirmation de la validation d'une méthode d'orientation de la phosphatase acide qui sert à identifier les taches du liquide séminal sur plusieurs types de tissus et l'obtention d'un profil génétique à partir d'une affaire réelle d'agression sexuelle.

I Matériel

I.1 Matériel biologique

Il s'agit d'un fluide biologique humain : le liquide séminal.

Les échantillons étudiés sont :

- Du sperme pur d'une personne anonyme, récupéré au niveau d'un laboratoire d'analyses.
- Des traces de sperme prélevées et analysées à partir de plusieurs supports (vêtements) qui ont été emmenés au sein du labo d'analyse pour identifier l'agresseur d'une affaire réelle.

I.2 Matériel non biologique (tableau IV)

- Appareillages et équipements.
- Les kits et les réactifs utilisés.

Tableau IV : les différentes salles et équipements du laboratoire

Les salles	Les équipements	Les réactifs
La sous presse	La Hotte – la presse –papier paille-papier parafilm –gants latex-réfrigérateur-chronomètre-marqueur-ciseaux	Réactif de révélation de la Phosphatase acide à base d' α -naphtylphosphate et de fast blue B salt
Examen de scellés	Papier paille-tubes –écouvillons stériles-micro pipettes de 10 /100/200/1000 μ l –Bistouri-eppendorfs – coupelles-tips –pinces –ciseaux – portoirs	L'eau miliQ Erytrosine Ethanol Test PSA
Extraction d'ADN	Centrifugeuse – hotte –bloc chauffant –vortex-eppendorfs passoires	QIamp DNA Investigator kit de QIAGEN
Quantification d'ADN	Thermocycleur 7500fast Real Time PCR-centrifugeuse-plaque de 96 puits- film adhésif	Quantifler™-Human DNA Quantification kits
PCR	Thermocycleur 9700ABI-plaque de 96 puits-portoirs- feuille d'Alluminium	PCR ampFISTR-identifier plus
Post PCR	Thermocycleur 9700ABI-plaque de 96 puits-septa strip-centrifugeuse pour plaque cryobloque	PCR ampFISTR-identifier plus- Etamp FISTR-identifier plus-allelic Ladder –formamide
Electrophorèse capillaire	Séquenceur –ordinateur	

I.3 Affaire réelle

Tableau V : Examen des scellés de traces.

Examen scelle traces (support)	Description
N°1	Pull rose appartenant à la victime (Défunte)
N°2	Prélèvement buccal sur écouvillon de la défunte
N°3	Prélèvement sanguin du 1 ^{er} suspect
N°4	Prélèvement sanguin du 2 ^{ème} suspect

II Méthodes

Dans ce travail nous avons réalisé en 1^{er} lieu une vérification de la méthode enzymatique phosphatase acide en utilisant la sous presse et en respectant un protocole, afin d'avoir un résultat qui nous permettra d'avoir un profil génétique, en second en étudiant une affaire réelle. Tout en respectant les étapes suivantes :

II.1 Désinfection et préparation de la paille

Il s'agit d'une étape préparatoire obligatoire avant chaque examen de scellés, et elle consiste en :

- Nettoyage de la paille au SDS 0,1%.
- Nettoyage du matériel et équipements à utiliser.
- Préparation des échantillons sur un papier paille en identifiant chaque échantillon.

II.2 Préparation des dilutions du sperme pur pour la validation

Tableau VI : Les dilutions de sperme

Taux de dilution	Sperme dilué
1/10	100µl de sperme pur + 900 µl H ₂ O
1/100	(10µl de sperme pur + 999µl H ₂ O) x 5 = 50 µl de sperme pur + 4950 µl H ₂ O
1/500	(1µl de sperme pur + 499µl H ₂ O) x2 2µl de sperme + 998 H ₂ O
1/10000	1µl de sperme pur + 999µl H ₂ O
1/20000	1µl de sperme pur +9999 H ₂ O

III Les tests préliminaires

Dans certains cas on peut visualiser les traces de sperme seulement à l'œil nu sur les vêtements de la victime et malgré ça on préfère confirmer la nature de la tache observée par des tests d'orientation :

III.1 Test d'orientation crimelite

- Les techniques d'orientation traditionnelles peuvent être substituées par des sources lumineuses pour révéler des traces biologiques non visibles à l'œil nu par fluorescence.
- C'est une lampe portative qui propage des rayons à grande longueur d'onde allant jusqu'à 495nm, qui aide les scientifiques à cerner les traces d'ADN.
- Les composés organiques dont les taches de spermes ou les fluides humains absorbent la lumière ultraviolette ainsi les traces d'ADN émettent des rayons fluorescents visibles à l'œil nu.

III.1.1 Méthode d'utilisation

Le manipulateur utilisant cette lumière doit être dans une chambre sombre, en portant une combinaison et des lunettes de protection pour mieux observer la fluorescence.



Figure 10. Tache de sperme observée et prélevée sur un sous-vêtement par un crimelite. (Amssalem2016)

III.1.2 Le processus opératoire

- Etendre la pièce à conviction à examiner (vêtements, draps, ...etc.).
- Allumer le crimelite et le régler à la longueur d'onde spécifique : 495nm (ne diriger la lumière du crimelite que vers la pièce à conviction).
- Eteindre la lumière de la salle et balayer toute la pièce à conviction avec la lumière du crimelite.
- Entourer et énumérer les taches suspectes (les taches de sperme donnent une fluorescence intense et se caractérisent par des bordures irrégulières).

- Les tests de mise en évidence de sperme se font sur les taches localisées.

III.2 Examen chimique : recherche de phosphatase acide (PA)

Un test présomptif chimique visant à retracer et orienter les zones de prélèvement en vue de la mise en évidence de la présence de sperme et des fluides humains sans abimer les indices.

Celle-ci peut ensuite être confirmée par l'utilisation du test PSA, spécifique du liquide séminal, et par la coloration cytologique de Christmas tree ou l'érythrosine qui permettent de mettre en évidence de manière non ambiguë la présence de spermatozoïde dans l'objet d'analyse.

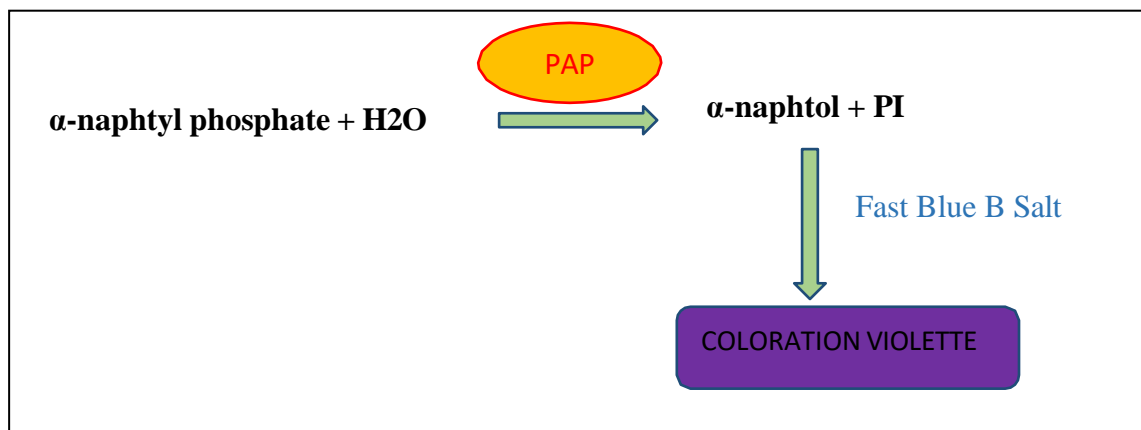


Figure 11. Schéma réactionnel de la révélation de l'activité de la phosphatase acide.

III.2.1 Le principe

Le substrat utilisé est l'alpha-naphthylphosphate couplé au Fast Blue B comme révélateur. La recherche n'est pas faite directement sur la pièce à analyser.

Par exemple, pour un vêtement, on réalise une « empreinte » en le pressant entre deux feuilles de papier absorbant humidifiées

Les phosphatases acides éventuellement présentes sont alors partiellement transférées sur le papier absorbant. Elles sont révélées en vaporisant une solution acide d'alpha naphthylphosphate de sodium et de colorant Fast Bleu B.

III.2.1.1 Recherche de la phosphatase acide (test par vaporisation)

- 1- Vaporiser les papiers filtres avec le tampon acétate sous hotte chimique (prévoir les témoins positifs et négatifs).
- 2- Placer le vêtement (ou tout autre prélèvement) entre deux papiers imbibés sur l'une des paillasse ou sous la hotte.
- 3- Mettre sous presse pendant 15 min.
- 4- Faire les repères sur les papiers.
- 5- Enlever le vêtement.

- 6- Vaporiser les papiers un par un avec le tampon révélateur (cette étape doit être réalisée obligatoirement sous hotte).
- 7- Lecture des résultats : une réaction positive se caractérise par l'apparition immédiate d'une coloration violette.

III.2.1.2 Interprétation des résultats

- Négatif (-) correspondant à une absence de coloration à 20 secondes et 5 minutes
- Douteux (-) correspondant à une absence de coloration à 20 secondes et une coloration rose à 5 minutes,
- Positif faible (+) correspondant à une coloration rose à 20 secondes et une coloration violette à 5 minutes
- Positif (++) correspondant à une coloration violette à 20 secondes et à 5 minutes
- Fortement positif (+++) correspondant à une coloration violette intense à 20 secondes et à 5 minutes.



Figure 12 Témoin positif et Témoin négatif de la phosphatase acide (original 2022)

III.2.2 La préparation des réactifs

Tableau VII : les réactifs de la phosphatase acide

Réactifs	Préparation
Tampon acétate	-40gr de NA+ en poudre. -10ml d'acide acétique. -1000ml H ₂ O autoclavée.
Le révélateur	-1 litre de tampon acétate -1gr d' α Naphtyl monosodique -5gr de Fast Blue B Salt

Note :

- Mettre sous agitation jusqu'à disparition de la poudre.
- Le révélateur doit être conservé à + 4°C.

III.2.3 La validation de la phosphatase acide

III.2.3.1 Objectifs

Elle a pour but de démontrer que la méthode de recherche de sperme dans leur environnement d'utilisation au LPS répond aux critères suivants définis comme les paramètres minimums de validation, à savoir :

- **Spécificité** : Capacité du test à ne fournir un résultat positif que dans le cas où l'objet d'analyse est constitué de sperme.
- **Sensibilité** : Quantité de sperme à partir duquel le test fournit un résultat positif.
- **Impact de la réduction du temps de presse** : Comparaison de la détection de l'activité phosphatase acide à des temps de presse différents -2-3-4-5 minutes.



















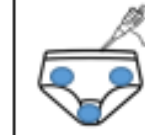
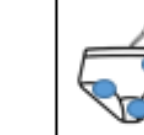



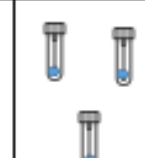

III.2.3.2 Plan d'expériences effectuées

- **Étude de la sensibilité** : La sensibilité de la Phosphatase est évaluée en utilisant des dilutions croissantes de sperme et en comparant les résultats obtenus aux données de la littérature.
- **Étude de la spécificité** : La spécificité de la méthode de détection de la phosphatase acide est évaluée à partir des données de la littérature.
- **Étude de la répétabilité** : Consiste à analyser un même échantillon par un même opérateur avec le même lot de réactifs, le même échantillon, les mêmes instruments et les mêmes dilutions, le tout dans un délai le plus court possible.
- **Étude de la reproductibilité** : La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des conditions différentes : utilisateur différent, appareil différent et jour différent.

III.2.3.3 Préparation des échantillons pour la validation

- Un prélèvement de 10µl de chaque dilution permet la réalisation des dépôts sur différents supports : écouvillon, coton, nylon, couche et serviette. (Tableau VIII)
- On fait un marquage de 3 points éloignés pour éviter la contamination sur chaque support pour respecter le facteur de la répétabilité.
- On dépose un témoin positif et négatif avec chaque support.

Tableau VIII : Préparation des échantillons (Original, 2022).

les supports	Le sperme dilué				
	1/10	1/100	1/500	1/10000	1/20000
Couche					
Serviette					
Coton					
Nylon					
Ecouvillon					

IV Extraction d'ADN :

Ce protocole est utilisé pour l'extraction d'ADN à partir de la macération de l'échantillon taché dans de l'eau ultra pure.

L'extraction d'ADN à partir de sperme avec le kit Qiagen est basée sur l'utilisation de colonne revêtue d'une matrice de silice qui est capable de fixer sélectivement l'ADN (silice chargée positivement et l'ADN chargé négativement) en condition de forces ioniques élevées.

Ce kit Qiagen permet l'obtention d'un ADN de haute qualité, isolé à partir d'une cellule ou un tissu en qualité et quantité qui peut permettre son analyse par la suite par PCR et séquençage.

IV.1 Le contenu du kit Qiagen

Tableau IX : composant du kit Qiagen (catalogue QIAamp DNA Investigator Kit)

QIAamp MinElute® Columns	50
Collection Tubes (2 ml)	200
Buffer ATL	50 ml
Buffer AL*	33 ml
Buffer AW1* (concentrate)	19 ml
Buffer AW2† (concentrate)	13 ml
Buffer ATE	20 ml
Carrier RNA (red cap)	310 µg
Proteinase K	1.25 ml

- D'autres produits comme : DTT1 XMolaire (congelé à -20°C) et de l'eau milliQ.

IV.2 Le processus opératoire de l'extraction d'ADN

IV.2.1 Préparation du tampon AW1

- Ajouter 25 ml d'éthanol (96 à 100 %) à la bouteille contenant 19ml de concentré de tampon AW1.
- Cocher la case à cocher sur l'étiquette de la bouteille pour indiquer que de l'éthanol a été ajouté.
- Le tampon reconstitué AW1 peut être conservé à température ambiante (15–25°C) jusqu'à 1 an.

IV.2.2 Préparation du tampon AW2

- Ajouter 30 ml d'éthanol (96 à 100 %) à la bouteille contenant 13ml de concentré de tampon AW2.
- Le tampon reconstitué AW2 peut être conservé à température ambiante (15–25 °C) jusqu'à 1 an.

IV.2.3 La Lyse

- Avant de commencer la lyse, si le tampon de lyse tissulaire contient des cristaux ou des précipités, dissoudre en chauffant à 70°C avec une légère agitation.
Si on trouve que c'est nécessaire d'utiliser le carrier RNA à nos échantillons, on ajoute 1µl de carrier RNA dans 300µl d'ATL.
- L'ajout d'ARN porteur au tampon ATL pour la purification de l'ADN à partir de très petites quantités d'échantillons, comme de faibles volumes de sperme (<10 µl) ou d'autres échantillons médico-légaux, nous recommandons d'ajouter l'ARN porteur au tampon ATL.

- Pour les échantillons contenant de plus grandes quantités d'ADN, l'ajout d'ARN porteur est facultatif.

- Il faut s'assurer que les tampons AW1 et AW2 ont été préparés conformément aux instructions.

Les étapes de la lyse sont comme suit :

- 1) Dans un tube de 2ml : immerger un échantillon de 0.5 cm² dans 300µl de tampon ATL + 20µl de PK du kit + 20 µl de DTT 1M.
- 2) Vortexer pendant 10 secondes et incubé pendant 1h à 56°C avec une agitation de 900rpm (en absence de bloc chauffant avec agitateur, faire agiter les échantillons pendant 10 secondes chaque 10 minutes.)
- 3) Centrifuger quelques secondes pour faire tomber les gouttelettes accumulées dans le couvercle de l'éppendorf.
- 4) Passer l'échantillon en tube passoire pour récupérer le lysat.
- 5) Ajouter 300µl de tampon AL (lysis Buffer) et vortexer pour bien mixer pendant 10 secondes.
- 6) Incuber pendant 10min à 70°C sur le bloc chauffant avec agitateur de 900rpm, en absence de bloc chauffant avec agitateur, faire agiter les échantillons chaque 3min pendant 10 secondes.

IV.2.4 La purification

- 1) Centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttelettes et ajouter 150µl d'éthanol absolu.
- 2) Vortexer pendant 15 secondes, centrifuger brièvement et déposer le tout doucement au centre d'une colonne QIAamp MinElute column, préalablement identifiée sans toucher la membrane avec le cône de la pipette.
- 3) Centrifuger 1min à 8000 rpm.
- 4) Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer dans un nouveau tube de 02ml et ajouter 500µl de tampon AW1.
- 5) Centrifuger 1min à 8000 rpm
- 6) Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAamp MinElute dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 700 µl de tampon AW.
- 7) Centrifuger 1 min à 8000 rpm.
- 8) Eliminer le tube contenant l'éluat transférer la colonne QIAamp MinElute column dans un nouveau tube de 02ml et ajouter 700µl d'éthanol absolu.
- 9) Centrifuger 1min à 8000 rpm.
- 10) Eliminer le tube contenant l'éluat ; transférer la colonne QIAamp MinElute column dans un nouveau tube de 02 ml.
- 11) Centrifuger 3min à 14000rpm.
- 12) Placer la colonne QIAamp MinElute column dans un nouveau tube de 1,5 ml stérile préalablement identifié, ouvrir le couvercle de la colonne et laisser sécher à température ambiante pendant 10 minute ou à 56° C pendant 03 minutes.
- 13) Ajouter 20 à 50 µl du tampon ATE ou bien de l'eau distillée, fermer le capuchon de la colonne.
- 14) Incuber pendant 1min à température ambiante, centrifuger pendant 1min à 14000rpm pour récupérer l'extractum, jeter la colonne.
- 15) Conserver les tubes d'ADN à -20° C.

V La quantification par une PCR en temps réel

La quantification de l'échantillon est effectuée à l'aide du kit QuantifilerHuman DNA et sur real time PCR 7500fast, ce kit est basé sur l'emploi de la chimie TaqMan qui permet de quantifier l'ADN humain total et permet d'estimer simultanément la quantité d'ADN et de détecter les inhibiteurs.

Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR.

La PCR en temps réel fait le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle.

V.1 Le principe

- FAM reporter à l'extrémité 5'.
- Quencher non fluorescent à l'extrémité 3'.
- En l'absence du gène cible : le FAM émet une fluorescence réprimée.
- En présence de gène cible : le FAM reporter est clivé de la sonde → Hybridation → Polymérisation → Emission de fluorescence et quantification.

-L'hydrolyse des sondes par la chimie TaqMan est une technologie basée sur l'activité exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'. Lorsque stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (fluorescence resonance energy transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence. (Mackay *et al* 2002)

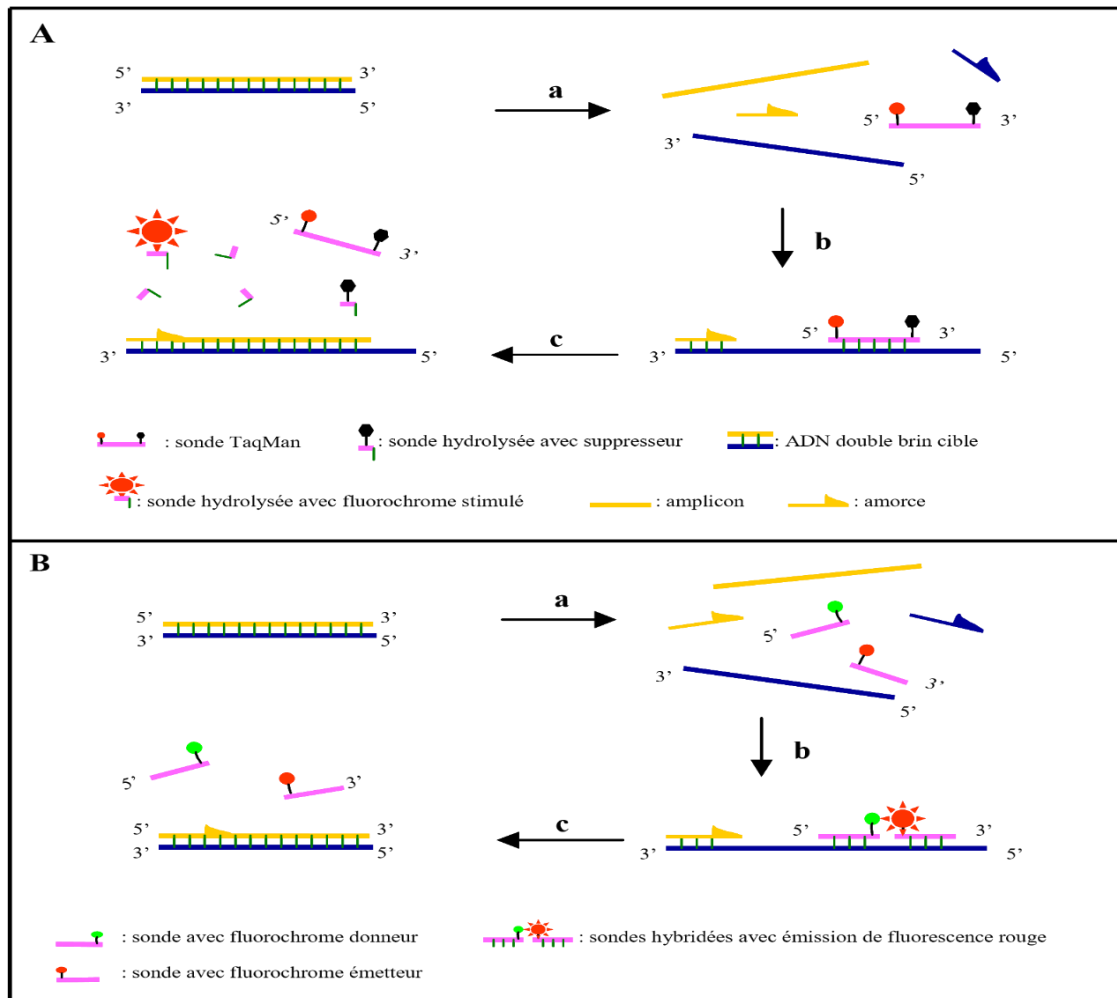


Figure 13. Principe de la sonde taqman (Poitras *et al* 2002)

A : Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes : Taqman assay)

- Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution.
- À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute.
- La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

B : Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes)

- Durant l'étape de dénaturation, les deux sondes demeurent séparées et en solution.
- À la température d'appariement, les sondes s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'émission de fluorescence rouge par le principe FRET.
- Les sondes retournent libres en solution. (Poitras *et al* 2002)

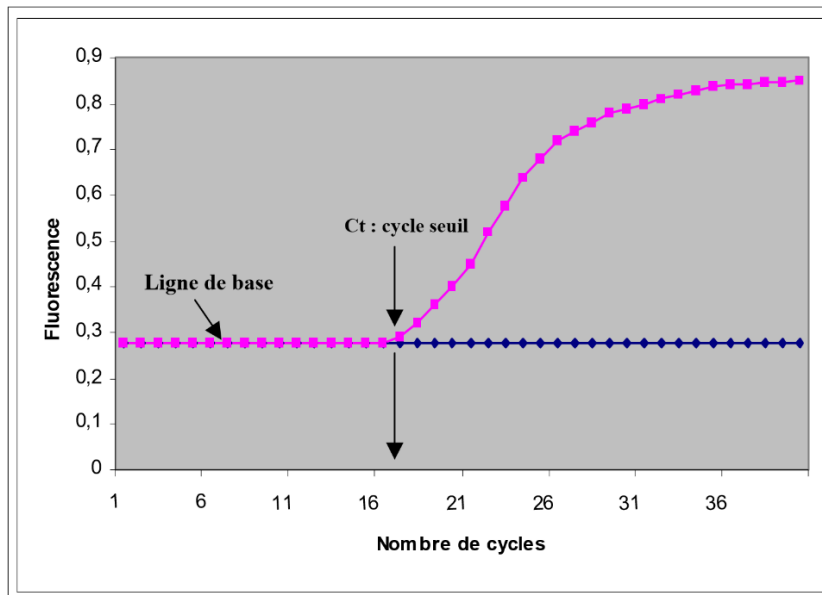


Figure 14. Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. (Poitras *et al* 2002)

- L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base.

Les trois phases de la courbe sont :

- La phase linéaire : les composants ne sont pas suffisants pour continuer la réaction.
- La phase exponentielle : l'augmentation de la fluorescence est observée avec l'augmentation du produit PCR.
- La phase plateau : la fluorescence et le taux d'amplicons restent stables.

V.2 Le protocole de la quantification

V.2.1 Les composants du kit Quantifler Human DNA

- Primers : amorce-sonde TaqMan-Ipc (conservés à -20°C) 3 tubes de 1,4ml.
- DNA standard : ADN purifié à 200ng/ml (conservé à -20°C) 1 tube de 120µl.
- Reaction Mix : Taq Polymerase gold –Dntp-tampon Mg²⁺ (conservé à +4°C) 1 flacon de 5ml.
- Diluant : Tris HCL+EDTA 5 PH 08 (conservé à -20°C)

V.2.2 Cible du kit Quantifler

Tableau X : cible du kit Quantifler

Kit	Gène cible	Localisation	Longueur d'amplicon	Région amplifiée
Human Quantifler	Human telomerase reverse transcriptase	5p15.33	62 bases	Intron

V.2.3 Préparer la courbe d'étalon à partir de l'ADN standard 200ng/ml



















































Tableau XI : les dilutions des 08 standards de la quantification d'ADN

Facteur de dilution	standards	Dilutions	Concentration d'ADN (ng/μl)
1/4	Std1	Tube1 : 30μl (eau pure) +10μl ADN standard	50,0 ng
1/3	Std2	Tube2 : 20μl (eau pure) +10μl STD1	16,7 ng
1/3	Std3	Tube3 : 20μl (eau pure) +10μl STD2	5,56 ng
1/3	Std4	Tube4 : 20μl (eau pure) +10μl STD3	1,85 ng
1/3	Std5	Tube5 : 20μl (eau pure) +10μl STD4	0,62 ng
1/3	Std6	Tube6 : 20μl (eau pure) +10μl STD5	0,21 ng
1/3	Std7	Tube7 : 20μl (eau pure) +10μl STD6	0,068 ng
1/3	Std8	Tube8 : 20μl (eau pure) +10μl STD7	0,023 ng

V.2.4 Préparation de la plaque de la quantification

Après avoir préparé les dilutions des standards, on les dépose dans la 1^{ère} colonne de la plaque suivie de nos échantillons et le témoin positif et négatif comme dans le tableau suivant :

Tableau XII : Le plan de dépôt des échantillons dans la plaque de quantification

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	 std1	 Ech1	 Ech9	 Ech17	 Ech25	 Ech33	 Témoin+					
B	 Std2	 Ech2	 Ech10	 Ech18	 Ech26	 Ech34						
C	 Std3	 Ech3	 Ech11	 Ech19	 Ech27	 Ech35						
D	 Std4	 Ech4	 Ech12	 Ech20	 Ech28	 Ech36						
E	 Std5	 Ech5	 Ech13	 Ech21	 Ech29	 Ech37						
F	 Std6	 Ech6	 Ech14	 Ech22	 Ech30	 Ech38						
G	 Std7	 Ech7	 Ech15	 Ech23	 Ech31	 Ech39						
H	 Std8	 Ech8	 Ech16	 Ech24	 Ech32	 Ech40						 Témoin-

V.2.5 Préparation du Mix

Tableau XIII : composition du Master Mix.

Composant	Volume par réaction 25µl
Reaction Mix (taq gold ADN polymerase, dntps passive reference rox)	12,5µl
Primers Mix sonde taqMan-Fam, Amorce, IPC-VIC	10,5µl
Volume total du Mix	25µl

- On prend pour chaque échantillon 12,5µl du mélange réactionnel du Master Mix et 10,5µl du primer donc pour le totale des échantillons c'est 23µl du Master Mix multiplier par le nombre des échantillons.

- Répartir ce Mix sur les puits de la plaque PCR en ajoutant 2µl de chaque échantillon et l'ADN standard puis recouvrir avec un film adhésif.

-On centrifuge pendant quelques secondes à 1600rpm puis placer la plaque dans le thermocycleur 7500 Fast et on lance un programme.

-Après la quantification, on doit ajuster la concentration d'ADN, il faut respecter la concentration recommander par le kit PCR, on fait des dilutions avec de l'eau extra pure pour arriver à une concentration qui varie entre (0,1 et 0,125) ng/µl.

VI L'amplification de l'ADN par PCR multiplexe

Le terme de "PCR multiplexe" désigne une mise au point de la technique PCR autorisant l'amplification, en une seule réaction, de plusieurs segments d'ADN distincts. Elle permet l'amplification de plusieurs cibles simultanément dans le même tube en utilisant plusieurs couples d'amorces. La longueur des différents amplicons doit être sensiblement identique pour être dans les mêmes conditions d'amplification mais suffisamment différente pour permettre leur détection. (Vassias 2012)

La PCR multiplexe peut être effectuée avec deux kits soit avec le kit AmpFLSTR™ Identifiler™ ou l'AmpFISTR MiniFiler™, ce dernier comprend un protocole de 30 cycles en une seule réaction réalisé sur un thermocycleur GeneAmp PCR system 9700, en utilisant sa chimie à 5 colorants fluorescents qui aide à détecter huit loci STR principaux et l'amélogénine avec des tailles de produits PCR réduits par rapport aux autres kits.

Le tableau suivant montre les caractéristiques de ce kit, les locus amplifiés, leurs emplacements chromosomiques et les colorants marqueurs fluorescents correspondants du kit. L'échelle allélique AmpFISTR® MiniFiler™ est utilisée pour génotyper les échantillons analysés.

-Le kit AmpFLSTR™ Identifiler™, comprend un protocole de 29 cycles en une seule réaction réalisée sur un thermocycleur GeneAmp PCR system 9700 et utilise 4 colorants fluorescents qui aide à détecter 15 loci STR.

- On site les caractéristiques de ce kit dans le tableau **XIII** comme suit :

Tableau XVI : caractéristique de kit AmpFLSTR™ Identifier™,

Méthode de détection	Amorcee-sonde
Etiquette ou teinture	FAM(bleu) NED(jaune) PET(rouge) VIC(vert) LIZ(orange)
Nombre de réaction	200 réactions
Locus cibles	D21S11, CSF1PO, vWA, D8S1179, TH01, D18S51, D5S818, D16S539, D3S1358, D2S1338, TPOX, FGA, D7S820, D13S317, D19S433
Technique	Analyse STR (Short Tandem Repeat)

VI.1 Le protocole

Les composants du kit AmpFISTR® MiniFiler™ dans le tableau comme suit

Tableau XV : Les composants du kit AmpFISTR® MiniFiler™

Composants	Description	Stockage
AmpFISTR® MiniFiler™ Master Mix	Contient une enzyme, des sels, des dNTP, une protéine porteuse et 0,05 % d'azide de sodium	-15 à -25°C à réception, 2 à 8°C après première utilisation
AmpFISTR® Control DNA 007	Contient 0,10 ng/μL d'ADN génomique masculin humain dans de l'azoture de sodium à 0,05 % et un tampon.	
AmpFISTR® MiniFiler™ Primer Set	Contient des amorces directes et inverses pour amplifier les cibles d'ADN humain.	-15 à -25°C à réception. 2 à 8°C après la première utilisation.
AmpFISTR® MiniFiler™ Allelic Ladder	Contient des allèles amplifiés. Ladder alléliques	Conserver à l'abri de la lumière.

Les composants du kit AmpFISTR® Identifier® dans le tableau comme suit :

Tableau XVI : Les composants du kit AmpFISTR® Identifier®

Composants	Description	Stockage
AmpFISTR® PCR Reaction Mix	Contient du MgCl ₂ , des DNTPS et de l'albumine sérique bovine dans un tampon avec 0,05 % d'azide de sodium.	-15 à -25°C à réception, 2 à 8°C après la première utilisation
AmpFISTR® Identifier® Primer Set	Contient des amorces marquées par fluorescence et des amorces non marquées. TH01 – D7- Taq polymerase.	
AmpFISTR® Identifier® Allelic Ladder	Contient des allèles amplifiés.	-15 à -25°C à réception. 2 à 8°C après la première utilisation. Conserver à l'abri de la lumière.
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	Contient une enzyme, avec une activité de 5 U/μL.	
AmpFISTR® Control DNA 9947A	Contient 0,10 ng/μL d'ADN humain féminin 9947A dans de l'azoture de sodium à 0,05 % et un tampon	2 à 8°C

- On mélange les deux réactifs dans un tube vide :
- En prenons (7,5 μl Reaction Mix * le nombre d'échantillons) + (2,5μl primer *le N d'échantillons)
- On dépose 15μl du mélange préparé précédemment dans chaque puits de la plaque.
- On rajoute 10μl d'ADN dilué, sans oublier les témoins pour voir si y'a pas de contamination : positif (ADN control 15μl) et négatif on met de l'eau pure distillé (15μl).
- Le volume total déposé dans chaque puis est de 25μl.
- On couvre la plaque avec du papier aluminium puis on la met dans le thermocycleur 7500 Fast pendant 30 cycles, qui sont comme suit :
 - L'activation de la Taqpolymerase à 95°c pendant 5min.
 - La dénaturation des deux brins d'ADN à 96°c pendant 10S.
 - L'hybridation à 61°c pendant 120S.

La conservation de l'ADN amplifié se fait à -20°c pour une période de 6mois jusqu'à 1an.

VII La post PCR

Le but de cette étape est la dénaturation des deux et avoir au final un monobrin pour passer au séquençage (l'électrophorèse capillaire). En ajoutant de la formamide à chaque échantillon, qui est un agent intercalant entre les liaisons d'hydrogène pour séparer les deux brins.

C'est une technique réalisée par un kit MiniFiler qui se compose de :

- LIZ : ou DNA standard de taille son rôle est de mesurer la taille chaque fragment d'ADN en s'hybridant sur le brin d'ADN
- LADDER : Allelic Ladder MiniFiler son rôle est l'assignation des allèles pour avoir un profil génétique.
- DNA control : pour le témoin positif, qui correspond à un profil connu.

VII.1 Le protocole :

Tableau XVII : Composition des réactifs de la post -PCR

Réactif	Volume
Mélange réactionnel (formamide+ADN standard)	(8,7 μ lformamide+0,3 μ lADN standard) = 9 μ l
ADN amplifié	3 μ l
Ladder	1,5 μ l
Contrôles positifs et négatifs	1,5 μ l

- On calcule le volume du Mix nécessaire pour le nombre d'échantillons.
- On le prépare dans un tube eppendorf.
- Puis on répartit 9 μ l du mélange réactionnel dans les puits des échantillons et Ladder.
- On rajoute 3 μ l de l'ADN amplifié.
- On dépose 1,5 μ l de ladder.
- 1,5 μ l de contrôles positifs et négatifs.

Une fois terminé on couvre la plaque par un septa, puis on met la plaque dans le thermocycleur pendant 3min 95°c.

- Pour garder l'ADN figé en monobrin on lui fait un choc thermique puis dans un cryobloc à -20°c.

VIII Electrophorèse capillaire

- L'électrophorèse est une technique permettant de séparer des molécules par leurs différences de mobilité et leurs poids moléculaire dans un champ électrique (du plus petit poids moléculaire au plus grand).

- Les produits de post amplification sont soumis à une électrophorèse capillaire par un analyseur génétique ABI 3130XI qui se constitue un simple réseau capillaire est inséré dans les fentes disponibles. En outre, les réseaux sont garantis pour 100 passages (au lieu d'une plaque par passage) et il n'y a pas de perte d'échantillon.
- Les fragments d'ADN chargés négativement sont attirés par l'électrode cathodique en platine fixée à l'extrémité du capillaire (16 capillaires en tout), qui est ouverte et remplie de polymère à performances optimisées (le POP qui fait migrer l'ADN). Lorsqu'un courant est appliqué, les fragments d'ADN sont attirés vers le capillaire et voyagent à travers le polymère jusqu'à la fenêtre de détection et le boîtier de la matrice.
- Lorsque les fragments traversent une zone dégagée dans le capillaire, les fluorophores sont excités par un laser et l'émission est détectée et enregistrée par une caméra CCD sous forme de pixels (la série 3130 peut détecter jusqu'à cinq fluorophores bleu, vert, noir, rouge et violet). La capacité de détecter plusieurs fluorophores permet de détecter un plus grand nombre de fragments d'ADN de taille similaire.
- Tous ces données et ces signaux de fluorescence (pixels) vont être analysés donc ils sont collectés, traduits et validés par un logiciel puis nous donne à la fin un profil génétique.

IX Profilage ADN

- Le profilage ADN ou la prise d'empreintes ADN étudie la génétique d'individus pour résoudre les conflits parentaux et autres enquêtes criminelles.
- L'empreinte ADN d'un individu est dérivée de trois modes :
 - La répétition en tandem courte (STR).
 - Le polymorphisme mononucléotidique (SNP).
 - Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP).

X Validation du profil génétique

- L'analyse de plusieurs marqueurs génétiques résulte en un profil génétique discriminant permettant d'établir ou d'exclure un rapprochement entre une trace biologique relevée sur une scène d'infraction et un suspect. Cependant, un certain nombre de cas peuvent rendre complexe l'interprétation de l'expert habilité à procéder à des identifications génétiques.
- La validation des profils génétiques permet d'éliminer les artefacts d'analyse pour ne garder que les pics correspondant aux allèles présents dans la trace biologique.
- La validation des résultats se fait comme suit :
 - Assembler les données.
 - Identifier les pics.
 - Déterminer la taille des molécules.
 - Séparer par fluorochrome.
 - Comparer au Ladder allélique
 - Attribuer une nomenclature ou les allèles
 - Valider le profil génétique obtenu.

XI Méthode de travail sur une affaire réelle

- On commence par les tests préliminaires ou d'orientation pour détecter s'il y'a présence de sperme sur le scellé. (Crimelite, PAP, PSA, Observation microscopique)
- Si on a un résultat positif par les tests d'orientations crimelite ou phosphatase acide, on découpe le scellé là où on observe la réaction positive.
- Ensuite on passe à la macération, en rajoutant 250µl d'eau MilliQ au bout de tissu découpé dans un éppendorf stérile.
- On laisse macérée pendant 1h à température ambiante afin d'avoir tous les spermatozoïdes dans le macéra.
- Puis on transfère le tout dans d'autres éppendorfs à spins basket, puis on centrifuge à 14000rpm pendant 5min.
- On enlève les spins basket puis à l'aide d'une micropipette étalonnée on prend 100µl de ce macéra pour le déposer dans le test PSA. (Attendre le résultat instantanément)
- On dépose 5µl du macéra sur une lame préalablement nettoyée à l'eau oxygénée, en rajoutant dessus deux gouttes de l'érythrosine ammoniacale (qui donne une coloration rougeâtre aux spermatozoïdes), on la couvre avec une lamelle puis on dépose dessus une goutte d'huile d'immersion avant d'observer la lame sous microscope, on cherche les têtes rouges de spermatozoïdes en balayant la lame sous la lampe du microscope.
- Puis on note les résultats de chaque test et on passe aux étapes suivantes :
 - Extraction d'ADN.
 - Quantification par une q-PCR (kit Quantifiler Human DNA.
 - L'amplification par une PCR (kit Identifier, Kit Minifiler)
 - Électrophore capillaire.

Chapitre

Résultats et discussion

I Les résultats de la validation

-L'objectif de notre étude est de vérifier la validation de ce test d'orientation phosphatase acide tout en respectant les paramètres de cette technique et en se basant sur les caractéristiques de la validation qui sont :

- La sensibilité.
- La répétabilité.
- La reproductibilité.

-La technique de PAP repose sur l'apparition d'une coloration violette sur les supports ou le papier pailleuse qui définit la présence du liquide séminal (résultat positif).

- Témoin positif : on dépose 20 μ l de sperme pur.
- Témoin négatif : 20 μ l d'eau.

- Les images suivantes montrent les résultats :



Figure 15. Résultat positif obtenu lors d'une affaire réelle par PAP (Original 2022)



Figure 16. Résultat positif et négatif après 15min de presse (Original 2022)

I.1 Les résultats de la sous-presse récapitulés dans les tableaux suivants

-On a révélé les mêmes résultats en laissant tous les supports sous presse sous un même ordre chronologique 5min,15 min puis 30 min, on a confirmé la même observation des taches violettes en rapport avec les dilutions, donc on a eu des résultats identiques après chaque temps écoulé, les résultats de la répétabilité et la reproductibilité sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau XVIII : Les résultats de la sensibilité et la répétabilité des premiers travaux de la phosphatase acide

Dilution Support	1/10	1/100	1/500	1/10000	1/20000
Couche	+++	+++	+/- +/- +/-	---	---
Serviette	+++	+++	+/- +/- +/-	---	---
Coton	+++	+++	+/- +/- +/-	---	---
Nylon	+++	+++	+/- +/- +/-	---	---
Ecouvillon	+++	+++	+/- +/- +/-	---	---

Tableau XIX : Les résultats de la sensibilité et répétabilité de la phosphatase acide (1^{ère} reproductibilité)

Dilution Support	1/10	1/100	1/500	1/10000	1/20000
Couche	+++	+++	+/----	---	---
Serviette	+++	+++	+++	---	---
Coton	+++	+++	+++	---	---
Nylon	+++	+++	---	---	---
Ecouvillon	+++	+++	+++	---	---

Tableau XX : Les résultats de la sensibilité et répétabilité de la phosphatase acide (2^{ème} reproductibilité)

Dilution Support	1/10	1/100	1/500	1/10000	1/20000
Couche	+++	+++	+/----	---	---
Serviette	+++	+++	++/--	---	---
Coton	+++	+++	++/--	---	---
Nylon	+++	+++	---	---	---
Ecouvillon	+++	+++	+/- +/-	---	---

Tableau XXI : Les résultats de quelques échantillons en quantification

Support	Quantité d'ADN	Dilution d'ADN	Le profil génétique	N° d'ADN
Ecouvillon 1/10	0,4	1/4	Identifié	221161
Ecouvillon 1/10	0,7	1/7	Identifié	221162
Ecouvillon 1/100	0,004	/	Indéfini	221164
Serviette 1/10	0,01	Pure	Identifié	221170
Serviette 1/10	0,1	Pure	Identifié	221171
Serviette 1/100	Indéfini	Indéfini	Indéfini	221172
Nylon 1/10	0,01	Pure	Identifié	221178
Nylon 1/10	0,06	Pure	Identifié	221179
Nylon 1/100	0,001	/	Indéfini	221181
Couche 1/10	0,002	/	Identifié	221174
Couche 1/10	0,008	/	Identifié	221175
Couche 1/100	Indéfini	Indéfini	Indéfini	221177
Coton 1/10	0,03	Pure	Identifié	221166
Coton 1/10	0,01	Pure	Identifié	221167
Coton 1/100	Indéfini	Indéfini	Indéfini	221169

II Interprétation et discussion des résultats

- Ce test phosphatase acide nous a permis de dévoiler du liquide séminal sur tous nos supports, donc il a donné un résultat positif sur tout type de tissus, sauf que c'est négatif quand il s'agit de sperme à faible concentration autrement dit, très dilué.

- La révélation des résultats :

- Fortement positif pour tous les supports (couche, serviette, coton, nylon et écouvillon) jusqu'à 1/100 de taux de dilution.
- Moyennement à faiblement positif en allant jusqu'à 1/500, pareil pour tous les supports et pour les fois de reproductibilité.
- Tandis que pour les dilutions 1/10000 et 1/20000 c'est totalement négatif pour les 5 supports et même après avoir reproduit le test deux fois.

- On conclue à partir de nos travaux et des résultats obtenus et en prenant en considération chaque répétition et reproduction du protocole de la vérification de la sensibilité de PAP, la révélation de ce test est à 1/100 qui peut aller à des dilutions arrivant jusqu'à 1/500.

- Les résultats obtenus sont identiques à chaque fois, tout en respectant le protocole de la répétabilité et reproductibilité, on en a déduit que le seuil de la sensibilité de ce test est toujours pareil 1/1500.

-Pour les résultats obtenus en quantification montrent que la quantité et la qualité d'ADN varie d'un support à un autre, d'une dilution à une autre pour l'obtention d'un profil génétique.

-La trace d'ADN récupéré dépend de la qualité du support sur lequel elle est retrouvée.

III Etude comparative à nos travaux

Les tests réalisés au laboratoire de l'université de Lille (France) où le test a été validé, ont permis d'obtenir des résultats positifs avec le test PAP pour des dilutions de sperme déposées

sur un morceau de tissu type drap atteignant 1:200. Le réactif alpha-naphthyl phosphate avec le Fast Blue B Salt est directement pulvérisé sur la feuille supportant les dépôts. L'interprétation du résultat est effectuée au bout de 5 minutes (tableau). Nos résultats sont comparables avec ceux publiés par (Allard et al., 2007).

Une autre recherche a été conçue pour déterminer le seuil de temps de détection des taches de sperme dans les dossiers médico-légaux lors de l'utilisation du test de la phosphatase acide. Les résultats obtenus prouvent clairement et démontrent que les taches de sperme diluées sont potentiellement capables d'être détectées bien au-delà du temps limite standard de deux minutes et jusqu'à 16 minutes et peuvent donner un profil ADN complet, car les concentrations de la phosphatase acide chez les hommes peut varier. Les réactions de la phosphatase acide étaient évaluées dans un délai de dix minutes, mais suggèrent que les résultats au-delà de ce délai peut également être avantageux (Redhead et al., 2012).

D'autres résultats du test colorimétrique PAP, prouvent que les anciens échantillons de sperme peuvent prendre plus de temps à réagir, le test ponctuel PAP sur les dilutions de sperme suggère que les échantillons qui contiennent de faibles quantités de phosphatase acide peuvent prendre plus de temps à donner une réaction positive, et cela peut prendre plus de deux minutes, les échantillons qui prennent plus de temps ne sont pas considérés comme de faux positifs, mais il faudrait confirmer par un autre test présomptif (Gonçalves et al., 2017).

Tableau XXII : résultats observés après détection de la phosphatase acide pour des dilutions croissantes de sperme

Dilutions	1 :1	1 :5	1 :10	1 :25	1 :50	1 :100	1 :200
Résultat	+++	+++	+++	++	++	+	+/-

➤ Sensibilité du test PAP/ sperme dilué au 1 :200 (Allard et al 2007)

III.1 Etude de la spécificité

- L'activité phosphatase acide n'est pas portée par une enzyme unique, mais par une famille d'isoenzymes sécrétées par diverses sources.
 - *Spécificité du test PAP : principalement liquide séminal + sécrétions vaginales*
- L'activité de la phosphatase acide est 50 à 1000 fois plus élevée dans le sperme que dans tout autre fluide corporel. Néanmoins, l'utilisation de la phosphatase acide en tant que marqueur de la présence de sperme est inadéquate, en raison de la présence d'une isoforme de l'enzyme dans les sécrétions vaginales. Les isoformes prostatiques et vaginales ne pouvant être discriminées, il est nécessaire de caractériser la présence de sperme sur un échantillon en utilisant d'autres méthodes comme l'examen cytologique ou le test PSA.
- Dans le cas où la recherche de phosphatase acide donne un résultat positif mais que l'examen cytologique est négatif (d'où l'impossibilité de conclure quant à la présence

de sperme), il est nécessaire de prendre en compte la possibilité que l'échantillon observé provient d'un individu à numération spermatique faible (cas d'un individu oligospermique par exemple). Donc ce test n'est jamais suffisant on doit toujours avoir recours à d'autres tests pour lever l'ambiguïté en permettant de confirmer ou d'infirmer la présence de liquide séminal dans l'échantillon.

L'étude comparative nous conduit aux affirmations suivantes :

- L'interprétation de la réaction colorimétrique induite par la détection de l'activité phosphatase acide à **20 secondes** est **moins fiable** qu'à **5 minutes** quel que soit le type de supports.
- Les seuils de détection obtenus après une lecture à 5 minutes sont **variables** en fonction des **différents types de supports**. Seules les interprétations +++ à sont considérées comme une recherche de sperme positive.
- Pour une dilution au 1/10ème, les tissus de type spongieux ou absorbants présentent des résultats aberrants avec des révélations plus intenses à 1 minute qu'à 5 minutes de temps de presse. Cela peut s'expliquer par la nature des tissus. Celle-ci peut ne pas être homogène sur la totalité de la surface utilisée notamment sur les tissus usagés comme ceux utilisés pour les essais et qui reflètent au mieux la diversité des scellés analysés en routine.
- Afin de couvrir l'ensemble des supports pouvant être analysés au laboratoire, le temps de presse optimal est de 10 minutes avec une interprétation à 5 minutes.

Tableau XXIII : Résultats du test PAP.

Mesures	Résultats expérimentaux	Valeurs attendus	Conclusion
Sensibilité	De 1 /100 peut aller jusqu'à 1/ 500	1 /200 ou un peu plus	Validé
Spécificité	Liquide séminal à différentes concentration (Réaction plus faible avec sécrétion vaginale)	/	Validé
Temps de presse	10 min avec une interprétation à 5min quel que soit le type de supports	/	Validé
Control qualité	Conforme	Résultat conforme	Validé

- En ayant le séquenceur du labo en panne, on n'a pas pu avoir un profil génétique de chaque dilution, sauf celui-ci.



Figure 17. Le profil génétique obtenu à partir de la validation est un profil complet en utilisant le kit AmpFISTR® MiniFiler™

IV Résultats et interprétation de l'affaire réelle

- Après avoir fait l'examen du scellé reçu au labo (pull rose d'un bébé de 2ans) et les prélèvements faits sur les deux suspects qui appartiennent à la même famille (sachant que le 1^{er} suspect était le plus concerné et le plus inculpé par cette affaire).

-Deux traces de spermes ont étaient observées sur la pièce à conviction grâce au crimelite.

Tableau XXIV : Les résultats des trois tests préliminaires pour détecter la présence du liquide séminal sur le scellé (des deux taches observées dessus)

Technique	Tache1	Tache2
Sous-presse	+	+
PSA	+	+
OBSERVATION MICROSCOPIQUE	+	+

-Les tests d'orientation nous indiquent la présence du liquide séminal en donnant un résultat positif :

- Présence de tache violette pour la sous presse (résultat positif).
 - Le résultat positif sur un kit SERATEC PSA se manifeste par l'apparition de 3 bandelettes instantanément.
- puis on a confirmé avec l'observation microscopique, on regarde des têtes de spermatozoïde sous microscope en rouge.

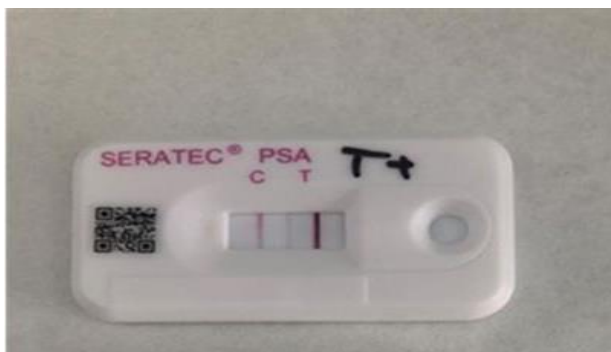


Figure 18. Test PSA positif spermatozoïdes



Figure 19. Observation des spermatozoïdes

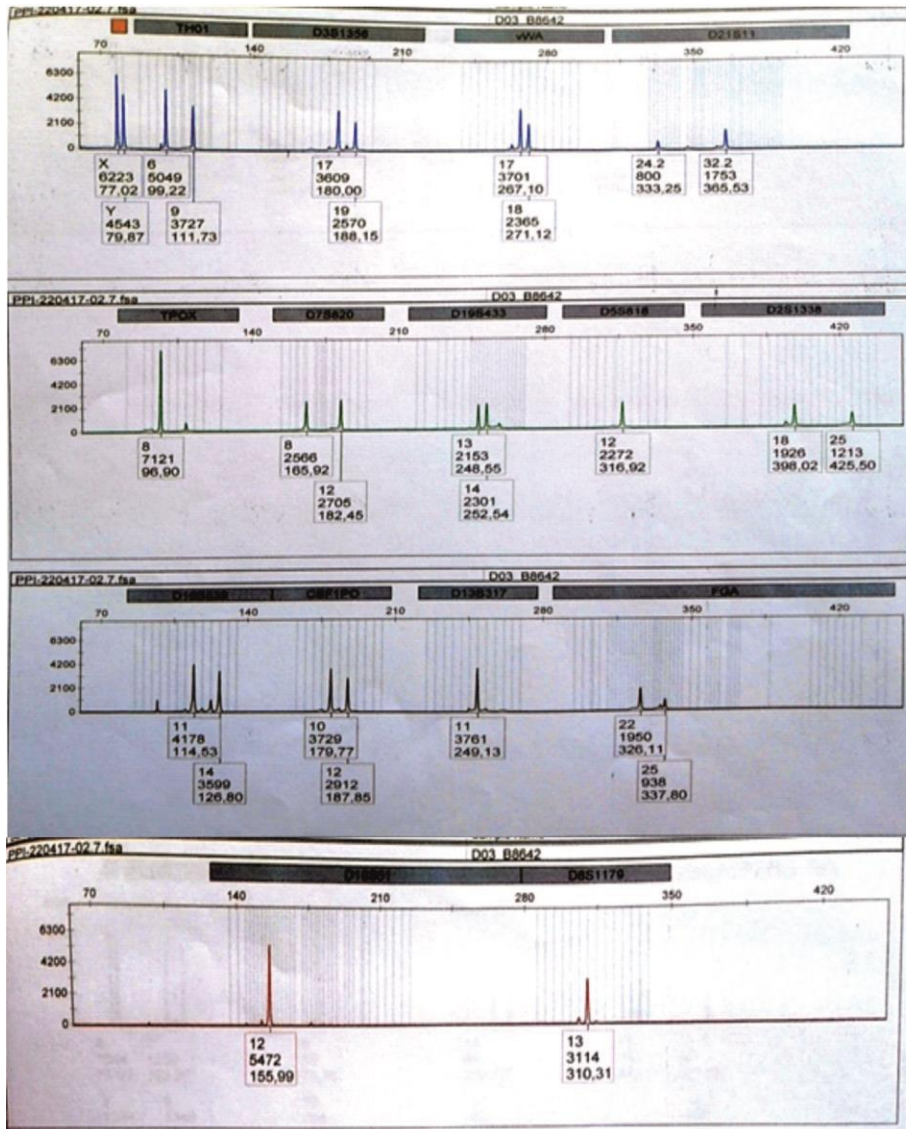
- En ayant un résultat fortement positif par tous les tests, on est passé à la suite du protocole pour avoir un profil génétique.

IV.1 Les résultats obtenus de la quantification

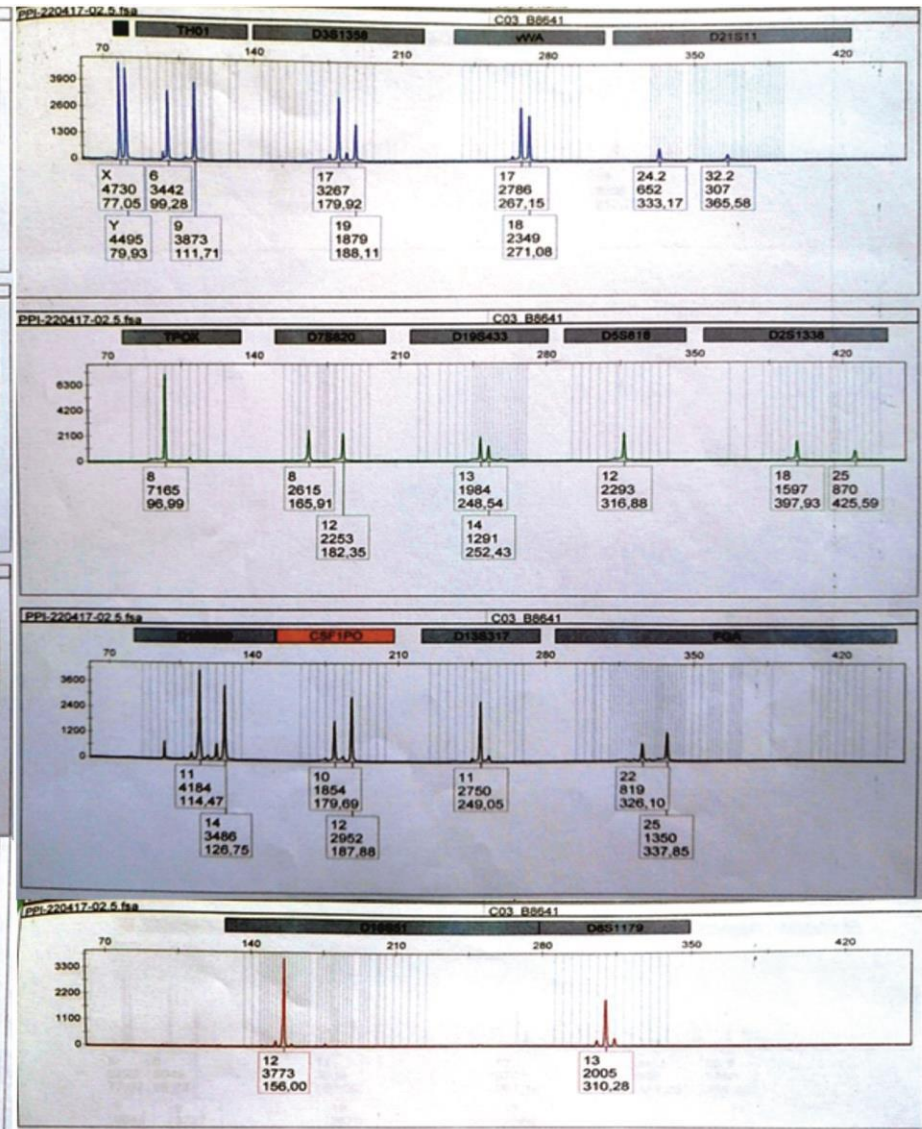
Tableau XXV : Les quantités obtenues de l'ADN extrait en affaire réelle

Support	Quantité d'ADN ng/μl	Dilution d'ADN	Le profil génétique	N° d'ADN
Pull rose (tache1)	0,5	1/7	Identifié	B8642
Pull rose (tache2)	0,7	1/5	Identifié	B8642

- Au final les deux taches de sperme B8642 ont donné le même profil génétique.



Profil génétique obtenu de la tache de sperme B8642.



Profil génétique obtenu du Suspect N°2 B8641 (l'agresseur).

Figure 20. Comparaison entre le profil de la tache de sperme et le profil du suspect N°2 B8641(l'agresseur).

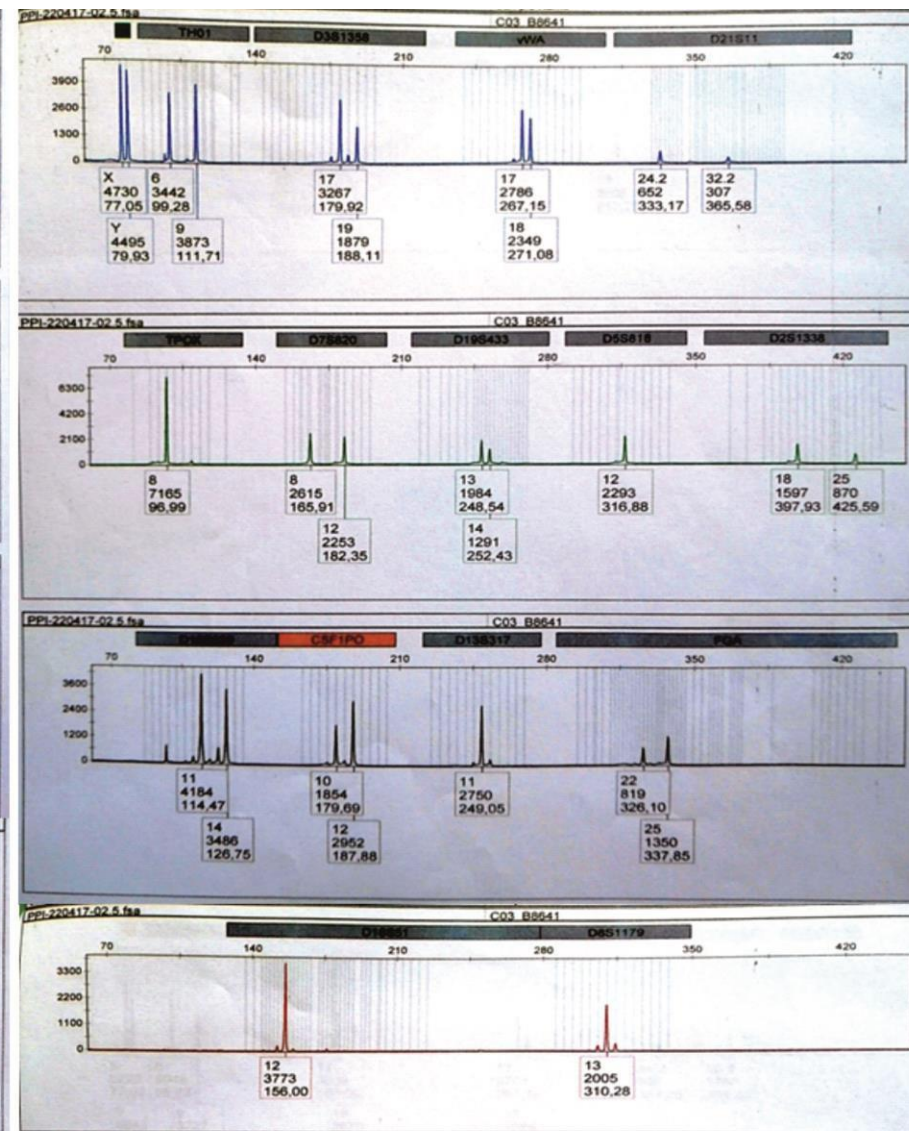
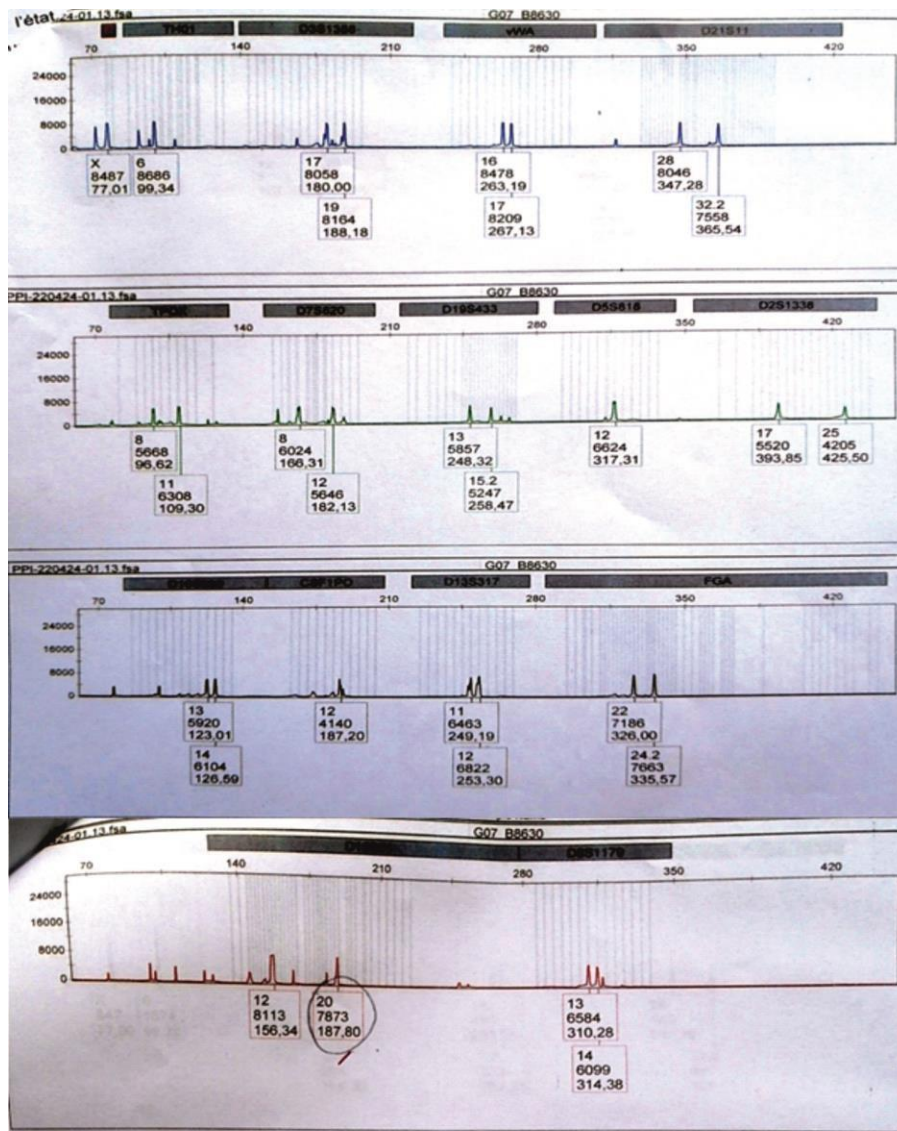
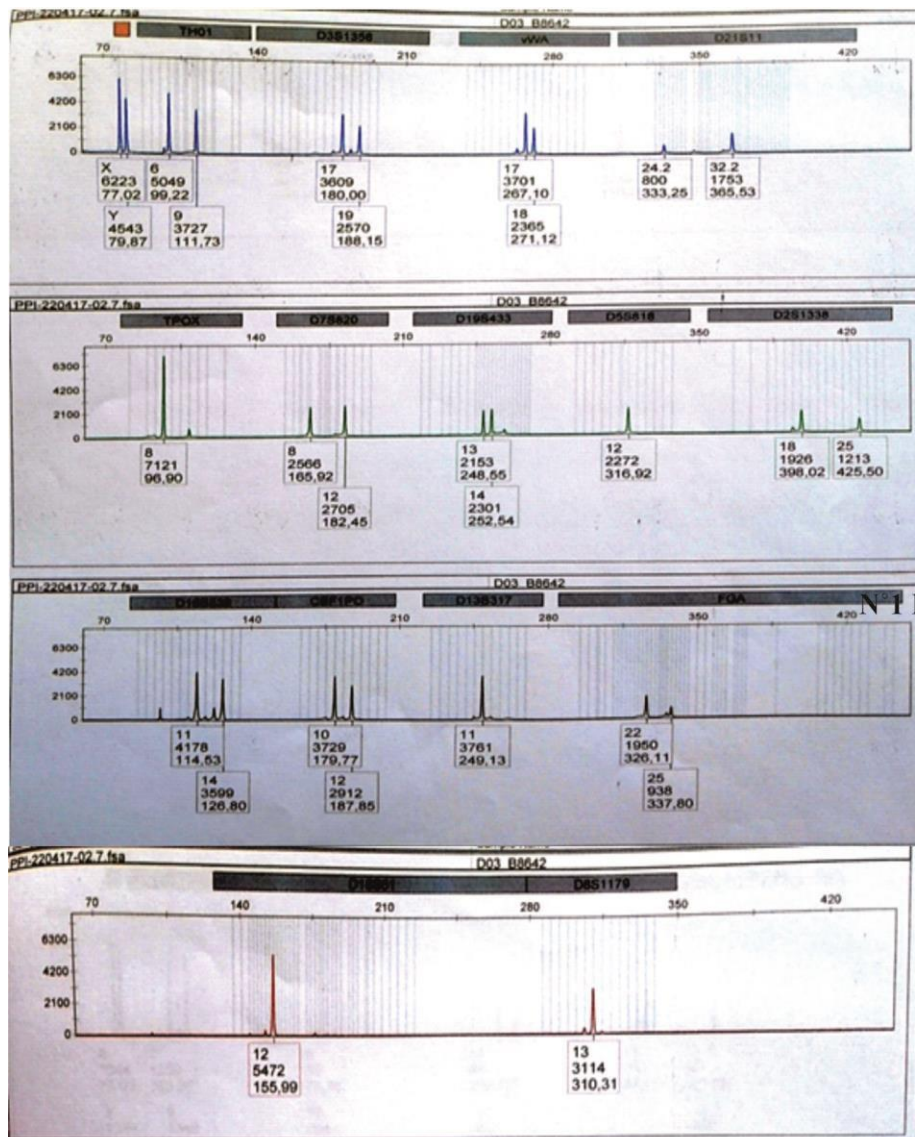
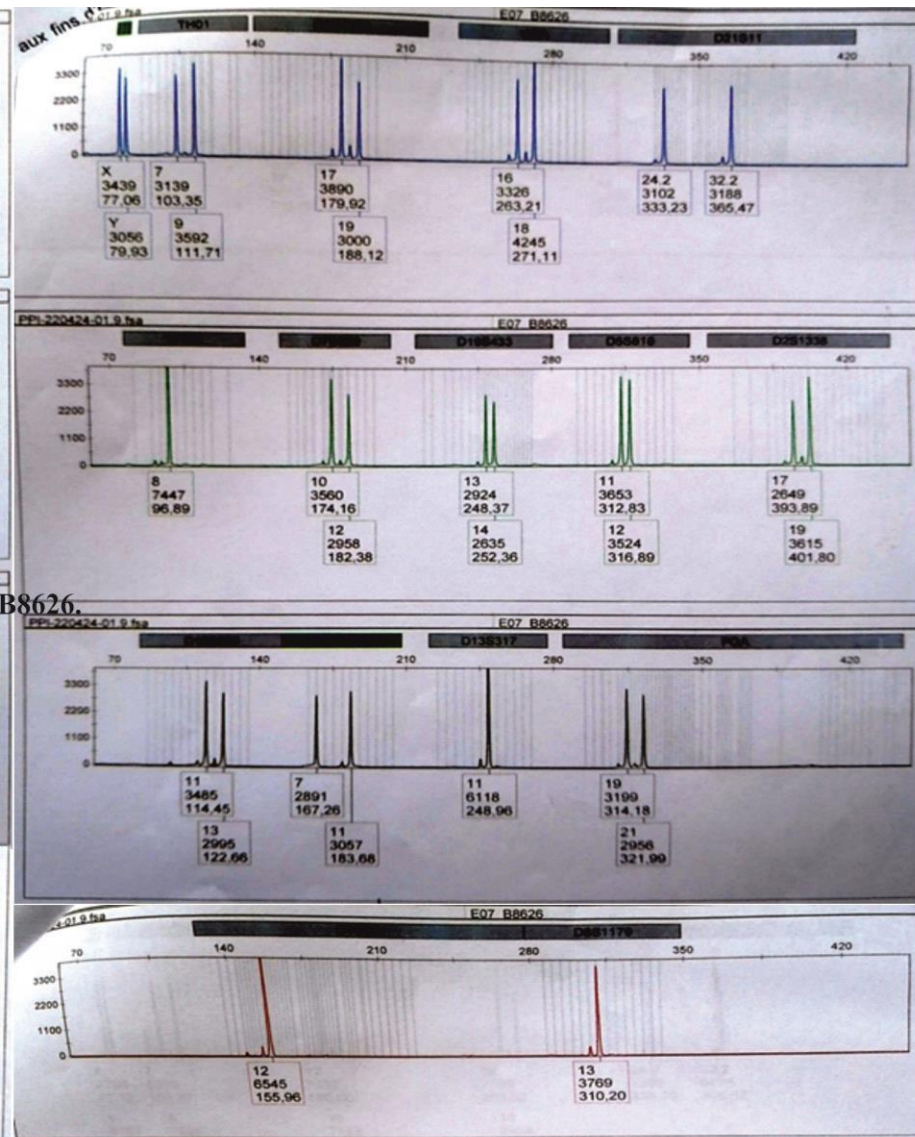


Figure 21. Comparaison entre la défunte (victime) B8630 et le profil du suspect N°2 B8641(l'agresseur).



Profil génétique obtenu de la tache de sperme B8642.



Le profil génétique obtenu du suspect N°1 B8626.

Figure 22. Comparaison entre le profil de la tache de sperme et le profil du suspect N°1 B8626.

Détails de l'affaire réelle d'agression sexuelle étudiée :

En fait, il s'agit d'une affaire d'inceste, où la victime était un bébé (petite fille de deux ans), ayant malheureusement succombé des suites de cette agression.

D'après les déclarations des parents les premiers soupçons se sont d'abord dirigés vers l'oncle paternel de la défunte petite fille.

Nous avons donc effectué un prélèvement sanguin chez ce suspect dans le but d'en sortir son profil génétique.

Mais après comparaison du profil génétique obtenu à partir de la trace de sperme sur le pull de la victime avec celui de son oncle, considéré comme étant le premier suspect, nous n'avons observé qu'une compatibilité partielle.

L'équipe de police scientifique chargée de l'enquête, voulant aller plus loin dans l'investigation, a décidé de prélever le papa de la victime en tant que second suspect.

Et effectivement, les doutes des agents chargés de l'enquête se sont avérés vérifiés, car la comparaison des profils génétiques sortir à partir de la pièce à conviction avec celui du père de la victime a révélé une compatibilité totale.

Par conséquent, ces méthodes de biologie moléculaire ont pu démontrer avec certitude que le coupable de ce crime atroce était malheureusement le propre père de la défunte victime, âgé rappelons-le, de seulement deux ans.

- On a obtenu des profils complets avec le kit AmpFLSTR™ Identifiler™.
- En comparant le profil obtenu par la tache de sperme B8642 et les profils des deux suspects (l'oncle paternel B8626 et le papa B8641), on remarque que le profil B8642 concorde avec le B8641 donc avec le 2^{ème} suspect qui était celui du papa.
- Les allèles sont totalement identiques ce qui confirme que le 2^{ème} suspect est le coupable.

Conclusion

Conclusion

Le champ de la police technique et scientifique est la criminalistique. Elle est l'ensemble des méthodes techniques et scientifiques mises en œuvre pour expliquer les circonstances d'une infraction. Dans le cas d'agression sexuelle, la médecine légale offre un système de rassemblement, conservation, et d'analyse de preuves qui peuvent nous aider à prouver qu'une agression a été commise et qui en est l'auteur.

Dans notre étude nous avons pu identifier l'agresseur dans une affaire réelle d'agression sexuelle, en ayant un profil complet de la trace d'ADN retrouvée sur un scellé en utilisant le kit Identifier.

Dans le but d'une vérification de la fiabilité de ce test colorimétrique, par rapport à sa sensibilité, sa spécificité, la concentration du sperme et au temps de presse, sur des supports différents, on a réalisé un protocole qui nous a permis d'avoir de bons résultats comme attendus. (Le seuil analytique de la phosphatase acide de 1/100 qui peut arriver jusqu'à 1/500 de taux de dilution).

Nous avons pu avoir un profil complet par l'utilisation du kit MiniFiler en vérifiant la fiabilité de ce test.

En perspectives, On aimerait bien pouvoir valider cette technique en reproduisant ce protocole avec un nombre d'échantillons plus élevés, ce qui nous permettrait d'appliquer des logiciels biostatistiques pour la confirmation de nos résultats.

Références

Bibliographiques

Les références

- 1) **Alaeddini R.** Forensic implications of PCR inhibition: a review . *Forensic Sci Int Genet.* 2012; ; 6 : :297.–305.
- 2) **Allard J.E,A. Baird , G. Davidson, S. Jones, J. Lewis, L. McKenna ,C. Weston, D. Scrimger ,G. Teppett ,**A comparison of methods used in the UK and Ireland for the extraction and detection of semen on swabs and cloth samples. *Science and Justice* 47 (2007) 160–167
- 3) **Alonso** DNA Extraction and Quantification / In book: *Encyclopedia of Forensic Sciences* (pp.214-218)December 2013
- 4) **Audrey Laroche-Clary; Valérie Le Morvan; Takao Yamori;** Jacques Robert
- 5) **Bill M, Gill P, Curran J, et al. PENDULUM:** a guideline-based approach to the interpretation of STR mixtures . *Forensic Sci Int.* 2005; ; 148 : :181.–189.
- 6) **Botstein D, R. L. White, M. Skolnick Et R.W. Davis.** (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics.* mai 1980. Volume 32, n° 3, 314-331.
- 7) **Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter.** *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition.: [Garland Science](#); 2002. Chapter; Selected DNA Segments Can Be Cloned in a Test Tube by a Polymerase Chain Reaction.
- 8) **Butler John M.,Dr. Bruce R. McCord,Janet M. Jung,James A. Lee,Bruce Budowle,Ralph O. Allen.**Application of dual internal standards for precise sizing of polymerase chain reaction products using capillary electrophoresis/First published: 1995 <https://doi.org/10.1002/elps.11501601163>
- 9) **Butler 2001** *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Forensic DNA Typing: Biology & Technology Behind STR Markers* 1st edition.Nature Academique Press ,Londres 322p
- 10) **Butler John M Æ Michael D. Coble Æ Peter M. Vallone.** STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing, 2007 *Forensic Sci Med Pathol* (2007) 3:200–205 DOI :10.1007/s12024-007-0018-1
- 11) **Butler J.M,** *Forensic dna Typing,* Elsevier-Academi -Press, 2005. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers* P 688
- 12) **Butler John M.** *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* 2012. Chapter 2 - DNA Extraction Methods Pages (29-47)
- 13) **Butler JM. STR Alleles and amplification artifacts.** Chapter 3. *Advanced topics in forensic DNA typing: interpretation . San Diego:* : Academic Press; , 2015 : :47.–86.

- 14) **Butler J.M.**, (2010). Fundamentals of Forensic DNA Taping. Contribution of the National Institute of Standards and Technology. Elsevier (USA) 8:147-205
- 15) **Cécile Courivaud , Philippe Saas , Didier Ducloux ELSEVIER MASSON**
Polymorphismes génétiques : comment interpréter les études ? -2012
Inserm UMR 645, établissement français du sang Bourgogne Franche-Comté, université de Franche-Comté, 1, boulevard Alexander-Fleming, BP 1937, 25020 Besançon.
- 16) **Céline Bry** Les empreintes génétiques en médecine légale 1999 submitted in 2017 livre pages (9-10)
- 17) **Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ (2009) Cumitech 31A.** Verification and validation of procedures in the clinical microbiology Laboratory. Coordinating ed., Sharp SE, ASM Press, Washington, DC.
- 18) **Claus Børsting, Niels Morling** Next generation sequencing and its applications in forensic genetics Forensic Science International: Genetics Volume 18, September 2015, Pages (78-89)
- 19) **CLSI**, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline—second edition, EP12-A2, Vol. 28 No.3, January 2008.
- 20) **Coquoz R., Taroni F.**, Preuve par l'ADN, 2^{ème} édition., Presses polytechniques et universitaires romandes, 2006. Chapitre 4 Profil ADN ou Empreinte Génétique P109/2013
- 21) **Coquoz R, Taroni F.** Preuve par l'ADN : la génétique au service de la justice. Paris : : PPUR Presses Polytechniques; , 2012 : :370p.. -Chapitre 4 Polymorphisme de longueur P79/2013
- 22) **Coquoz R, J Comte, D Hall, T Hicks, F Taroni** – 2013 Preuve par l'ADN: la génétique au service de la justice.livre Chapitre et pages :-Chapitre 1 l'ADN P11 /2012 Chapitre 5 Analyses d'ADN particulières P121/2015 Chapitre 6 Les ennemis de l'ADN P176/2015
- 23) **C. van Duijn Jnr, F.R.M.S. XVII.—THE STRUCTURE OF HUMAN SPERMATOZOA/ DECEMBER 1952 (Published APRIL 1953) Journal of the Royal Microscopical Society**
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1952.tb02335.x>
- 24) **Darryl Plecas, Irwin M. Cohen et Jennifer** Armstrong Université de Fraser Valley
Un examen des demandes d'analyse d'empreintes génétiques en laboratoire provenant des services municipaux et des détachements de la GRC dans le Lower Mainland de la Colombie-Britannique.2013 (page 6-7)
- 25) **Document COFRAC SH GTA 04**, Guide technique d'accréditation de vérification(portée A)/validation (portée B) des méthodes en Biologie Médicale. 2018.

- 26) **Document COFRAC SH GTA 14**, Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en Biologie Médicale. 2018
- 27) **Doutremepuich F., Doutremepuich C., Beaufiles M., Morales V.** — Les Empreintes génétiques en pratique judiciaire. Journal de la Société de Biologie, 2003, 197, 329-332.
- 28) **Doutremepuich C., Morling N.** — Progress in Forensic Genetic tome 10, 2004.
- 29) **DOUTREMEPUICH Christian** Les empreintes génétique en pratique judiciaire.livre2012 pages(1118 -1119-1120-1121-1122-1123-1124)
- 30) **DOUTREMEPUICH Christian** * Les empreintes génétique en pratique judiciaire Bull. Acad. Natle Méd., 2012
- 31) **Emmanuelle Briant** .La chimie dans les empreintes génétiques l'actualité chimique - juin-juillet-août 2010 - n° 342-343 pages (45-46-47-48-49-50)
- 32) **Eszter Rockenbauer Stine Hansen Martin Mikkelsen Claus Børsting Niels Morling**
Characterization of mutations and sequence variants in the D21S11 locus by next generation sequencing.Forensic Science International: Genetics Volume 8, Issue 1, January 2014, Pages (68-72)
- 33) **FDA - ORA-LAB.5.4.5.** ORA Laboratory Procedure–FDA. Methods, method verification and validation. 2014-08-29
<https://www.fda.gov/scienceresearch/fieldscience/laboratorymanual/ucm171877.htm>
- 34) **Feuilloley, MGJ - Merieau, A** - Orange, N, Applications bio-médicales de l'électrophorèse capillaire., Med Sci (Paris), 1999, Vol. 15, N° 12; p.1419-2673-
<http://hdl.handle.net/10608/1285>
- 35) **FNAEG** : Fichier national des empreintes génétiques (1998,2000 ,2001)
<https://www.police-scientifique.com/adn/fnaeg>
<https://police-scientifique.science/adn-sperme/#.YxHkA3bMLIU>
- 36) **Flaender M., D. Plaire, M. Boudadi-Maligne, J.-B. Mallye, J. Lambourdiere, J. Ventosa,R. Den Dulk, A.-G. Bourdat, J.-M. Elalouf**
Analyse de l'ADN pendant une campagne de fouilles. Page 269/septembre 2019
- 37) **François-Xavier Laurent,1a Geoffrey Vibrac,2 Aurélien Rubio,3* Marie-Thérèse Thévenot,1 and Laurent Pène1** .Les nouvelles technologies d'analyses ADN au service des enquêtes judiciaires 2017doi: 10.1051/medsci/20173311014.
https://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/9660/MS_2017_11_971.html?sequence=21&isAllowed=y
- 38) **François-Xavier Laurent , Jalby C** La police technique et scientifique . Paris: : PUF; , 2014 : 128 p

- 39) **François-Xavier Laurent Mulero JJ, Chang CW, Lagacé RE, et al.** Development and validation of the AmpFSTR MiniFiler™ PCR amplification kit: a MiniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA . Minifiler kit validation. *J Forensic Sci.* 2008; ; 53 : :838.–852.
- 40) **François Daoust**, Sur les traces de la police technique et scientifique (2020), pages 11 à 24. Chapitre 1. Aux origines de la criminalistique
- 41) **Gonçalves 5- A.B.R, C.F. de Oliveira, E.F. Carvalho, D.A. Silva/ 1875-1768/ © 2017 Elsevier B.V.** Comparison of the sensitivity and specificity of colorimetric and immunochromatographic presumptive methods for forensic semen detection
- 42) **HaoFan J .YouChu** . A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* Volume 5, Issue 1, 2007, Pages 7-14
[https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(07\)60009-6](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(07)60009-6)
- 43) **Henrik Berg Rasmussen** (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, Gel Electrophoresis- Principles and Basics, 315-3.
- 44) **Hill, C.R., Duewer, D.L., Kline, M.C., Coble, M.D., Butler, J.M.** (2013) U.S. population data for 29 autosomal STR loci. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7: e82-e83
- 45) **Honghua Li, Ulf B. Gyllensten, Xiangfeng Cui, Randall K. Saiki, Henry A. Erlich & Norman Arnheim.** Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells *Nature* volume 335, pages414–417 (1988)
<https://www.nature.com/articles/335414a0>.
- 46) **Investigator® IDplex Plus and IDplex GO! Kits | QIAGEN / AmpFSTR Identifier PCR Amplification Kit / AmpFLSTR™ MiniFiler™ PCR Amplification Kit**
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=4c183885-ca73-4b45-af3a-847b4538196a&lang=en>
- 47) **Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL.** Individual-specific fingerprints of human DNA . *Nature.* 1985; ; 316 : :76.–79.
- 48) **Jean Longtin , Bouchra Serhir ,Philippe Dufresne ,Élyse Boivin ,France Corbeil, Sadjia Bekal ,Sandrine Moreira ,Marc-Christian** . VÉRIFICATION ET VALIDATION DES MÉTHODES ANALYTIQUES/Institut national de santé public Québec PR-GQ-011 Version 05 Page 1 de 14.
- 49) **Kahn, A,** Hybridation moléculaire : Polymorphisme de restriction (RFLP), *Med Sci* (Paris), 1986, Vol. 2, N° 3; p.152-3 Hybridation moléculaire : Polymorphisme de restriction (RFLP)

- 50) **Laurence Labat, Marc Deveaux et Jean-Pierre Dubost** . Applications de l'électrophorèse capillaire en toxicologie clinique et médico-légale. Capillary electrophoresis applications in clinical and forensic toxicology *Ann Toxicol Anal.* 2000; 12(3): 179-195
- 51) **LE PARISIEN MAGAZINE**. Ces flics de l'ombre traquent l'ADN/ Prélèvements sur un sousvêtement grâce à une nouvelle technique : le sperm tracker. Bruno Amsellem 2016 <https://www.leparisien.fr/week-end/le-parisien-magazine-ces-flics-de-l-ombre-traquent-l-adn-25-11-2016-6369903.php>.
- 52) **NCBI** (2017). Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Dans : NCBI. [Consulté le 27 mars 2018]. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>.
- 53) **Paul Redhead , Melanie K. Brown / 2012** Forensic Science Society. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved The acid phosphatase test two minute cut-off: An insufficient time to detect some semen stains.
- 54) **Petkovski E .C.Keyser-Tracqui E.Crubézy R.Hienne B.Ludes** MALDI-TOF MS analysis of Y-SNPs in ancient samples International Congress Series Volume 1288, April 2006, Pages 25-27
- 55) **Poitras Elyse et Alain Houde** . La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* Vol.2, No 2, December 2002. pp.2-11 By The Moroccan Society of Biology in Canada.
- 56) **Pr Ivan Ricordel**(Directeur honoraire du Laboratoire de toxicologie de la Préfecture de Police (INPS-Paris) 2011 , 2015 L'expertise en police scientifique. Chapitre 9. Les microsatellites au service de la justice P (237-238-240-241-242-243-244)(248-249-250-251-252-253-254) https://www.biusante.parisdescartes.fr/ressources/pdf/histmed-asclepiades-pdf-expertise_police_scientifique.pdf
- 57) **QIAamp® DNA Investigator Handbook** – QIAGEN <https://www.qiagen.com/ko-us/products/human-id-and-forensics/investigator-solutions/qiaamp-dna-investigator-kit/>
- 58) **Quantifiler™ Human DNA** Quantification Kit - Thermo Fisher /Catalogue <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4343895>
- 59) **Randall K. Saiki, Stephen Scharf, Fred Faloon, Kary B. Mullis, Glenn T. Horn, Henry A. Erlich**, Norman Arnheim. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985 Dec 20;230(4732):1350-4. doi: 10.1126/science.2999980.
- 60) **Rasmussen H** .Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting Published 4 April 2012 *Biology*

DOI:10.5772/37724 15

- 61) **Robert J** Gene polymorphisms /Bulletin du Cancer livre (Volume 97, Issue 11, November 2010, Pages 1253-1264) Doi :10.1684/bdc.2010.1203
- 62) **Russell Higuchi, Carita Fockler, Gavin Dollinger & Robert Watson.** Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio/Technology* volume 11, pages1026–1030 (1993)
- 63) **Rym Kefi, Bertrand Mafart, Jean Louis Spadoni, Alain Stevanovitch, Éliane Béraud-Colomb.** Application de la technique de PCR en temps réel à l'étude de l'ADN ancien. *Comptes Rendus Palevol* .Volume 2, Issue 2, March 2003, Pages 125-132 [https://doi.org/10.1016/S1631-0683\(03\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S1631-0683(03)00029-0)
- 64) **Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, et al.** A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001;409:928-933
doi: 10.1038/35057149.
- 65) **Saiki R.K, Scharf .S, Faloona. F, Mullis K.B, Horn G.T, Erlich H.A, Arnheim .N .** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 1985, 230(4732), p. 1350.
- 66) **Silvester Reshma, Alexander Deborah, Anthony Ally C., Hatha, Mohamed** (2017). GroEL PCR- RFLP – An efficient tool to discriminate closely related pathogenic *Vibrio* species. *Microbial Pathogenesis*. Volume 105, 196-200.
- 67) **Schneider PM, Fimmers R, Keil W, et al.** The german stain commission: recommendations for the interpretation of mixed stains . *Int J Legal Med*. 2009; ; 123 : :1.5.
- 68) **Sullivan K M , A Mannucci, C P Kimpton, P Gill A** rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques* 1993 Oct;15(4):636-8, 640-1.
- 69) **TILL, I, VALDEYRON, G., et GOUYON, P. H. 1989.** Polymorphisme pollinique et polymorphisme gCnCtique. *Can. J. Bot.*67 : 538-543. Polymorphisme pollinique et polymorphisme génétique
- 70) **Thomas Curran** , Division des sciences et de la technologie ,Septembre 1997/ L'ANALYSE GÉNÉTIQUE EN CRIMINALISTIQUE :TECHNOLOGIE ET APPLICATION/ BP-443F
- 71) **Vassias I.** Principe de l'amplification en chaîne par polymérase - 16/01/12[90-60-0015-A] - Doi : 10.1016/S2211-9698(12)56773-7 .UMR 218 Institut Curie/CNRS, Centre de Recherche, 26, rue d'Ulm, 75005 Paris, France
- 72) **Willott G M, J E Allard** Spermatozoa--their persistence after sexual intercourse *Forensic Sci Int*. 1982 Mar-Apr;19(2):135-54. doi: 10.1016/0379-0738(82)90040-8.

73) **Yahia Mehdi Seddik Cherifi**. Analyses ADN en médecine-légale : revue générale et perspectives Conference: 1er congrès national « Les conduites médico-légales en Anatomopathologie et Anthropologie »At: Alger, Algérie April 2018.
https://www.researchgate.net/publication/324703143_Analyses_ADN_en_medecine-legale_revue_generale_et_perspectives.

Annexes

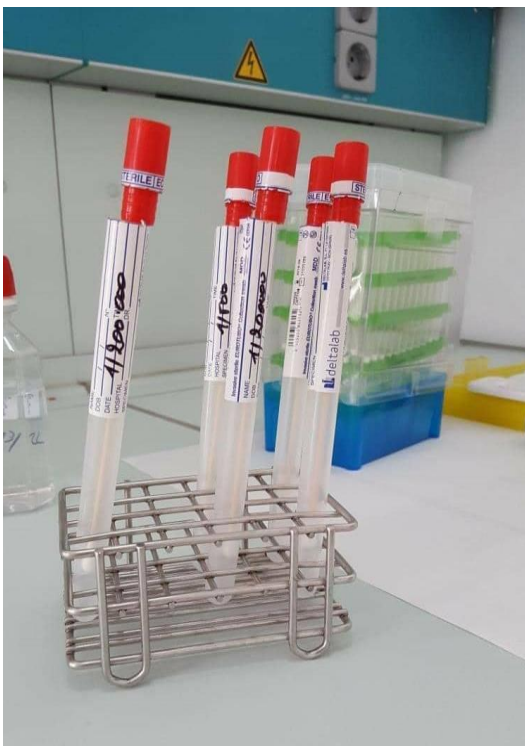
Préparation des échantillons



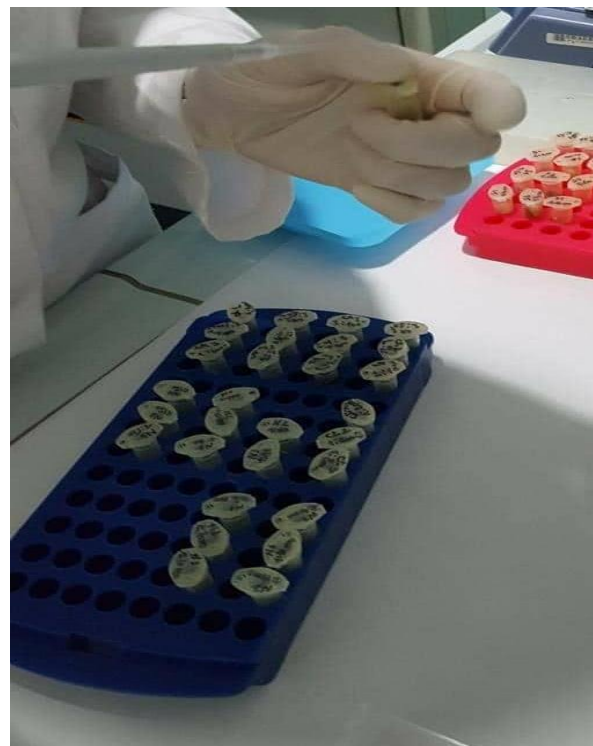
Micropipette (original)



supports coton et nylon (original)

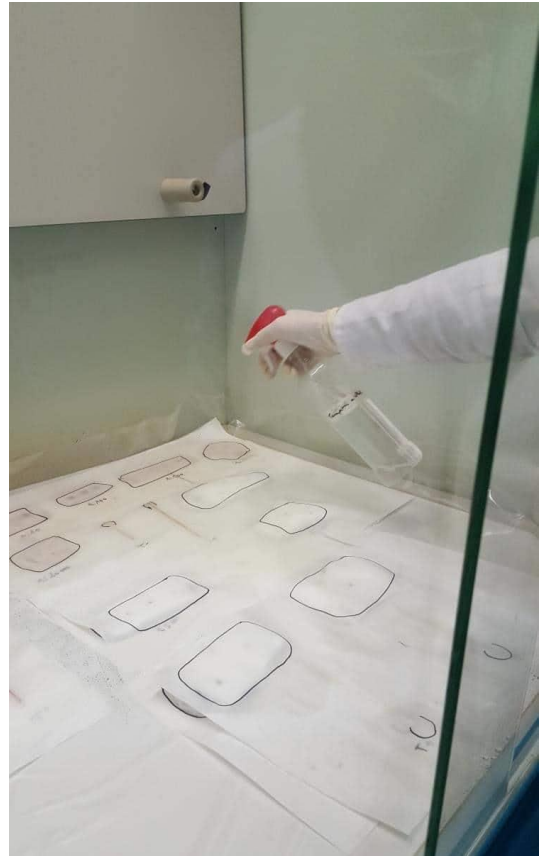


Les écouvillons (original)

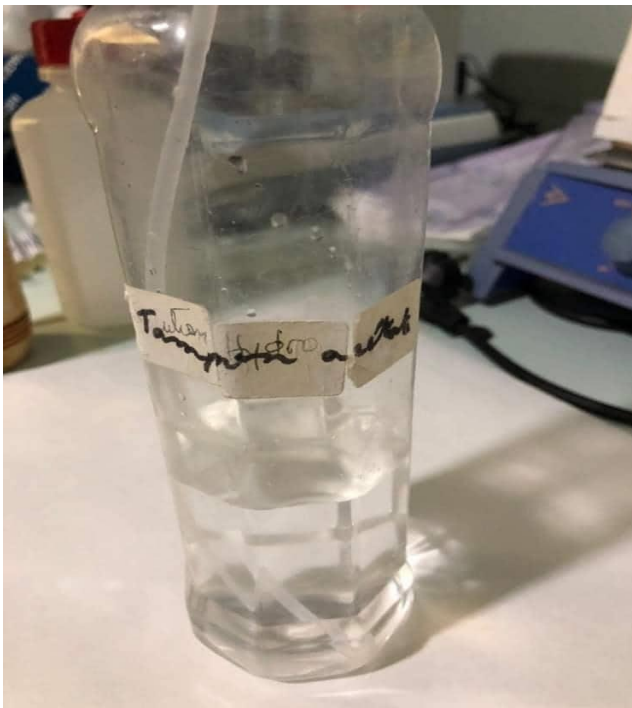


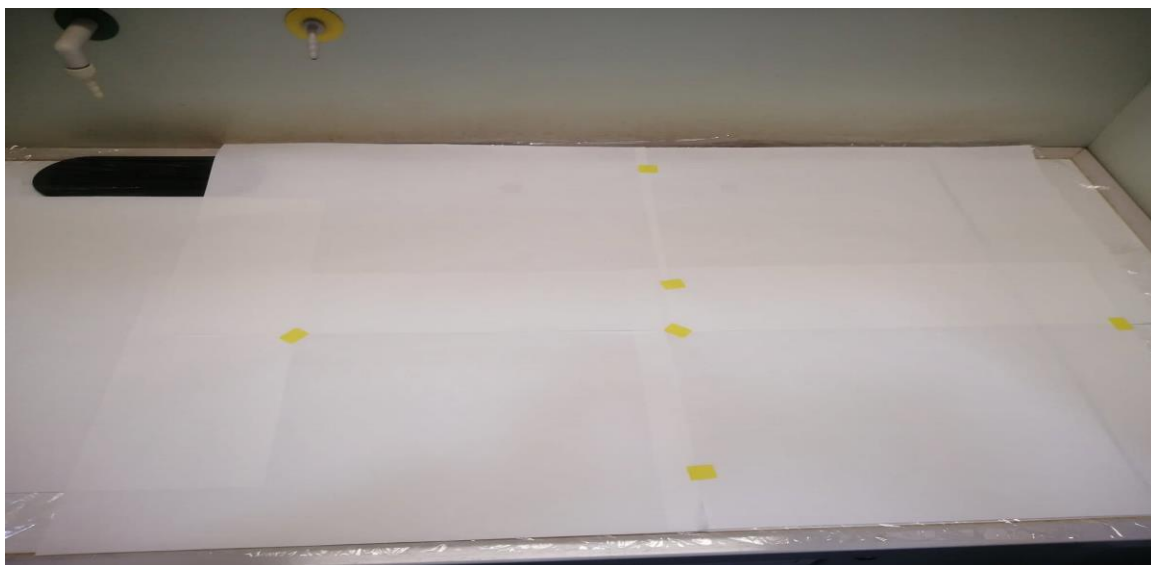
Portoir d'échantillons (original)

Réalisation de la phosphatase acide

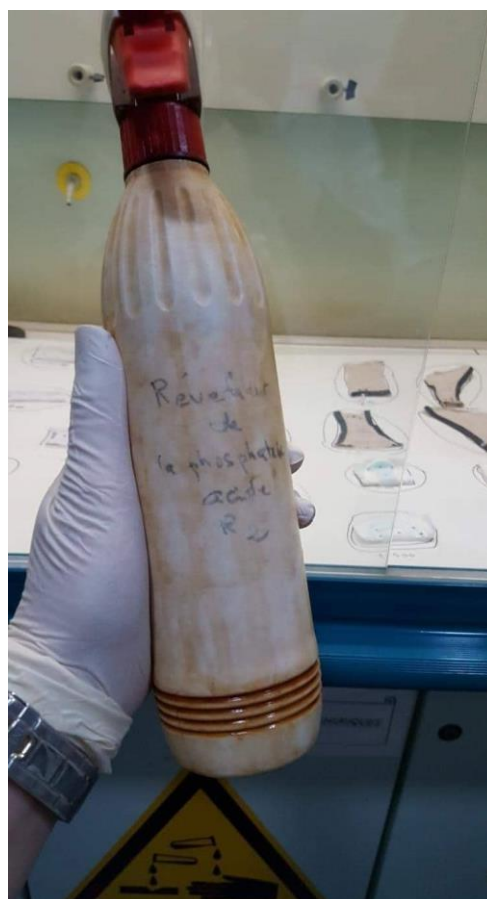


L'ajoute du tampon acétate (original)



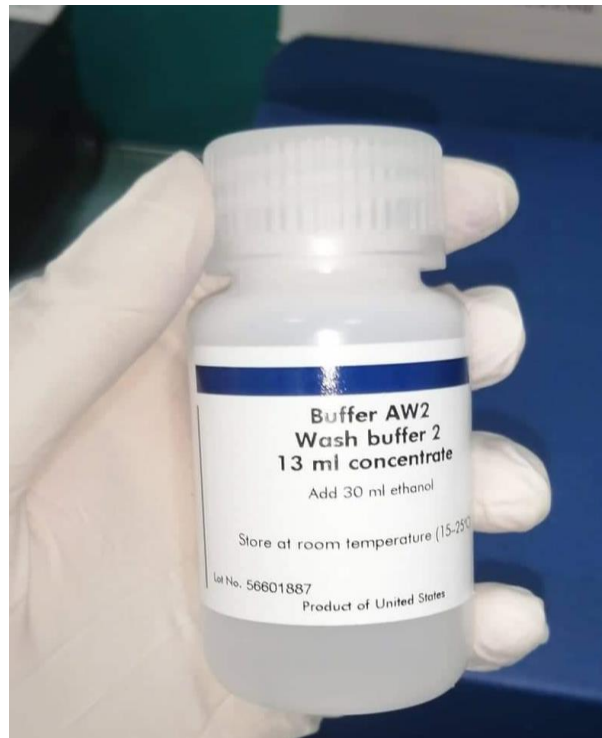
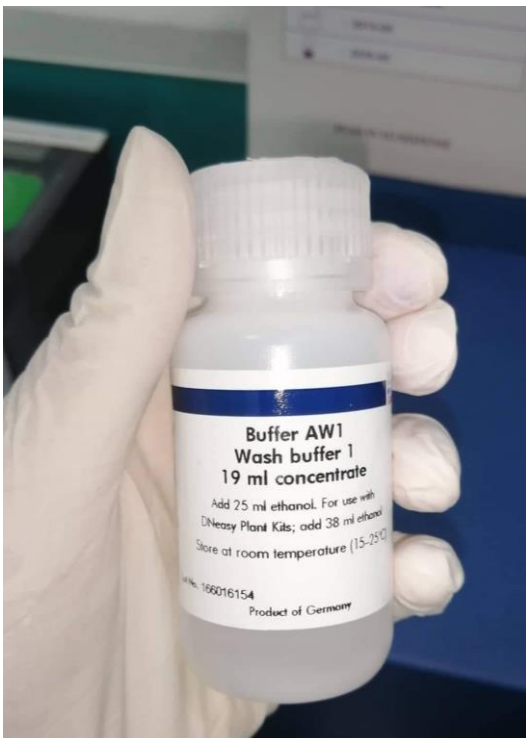
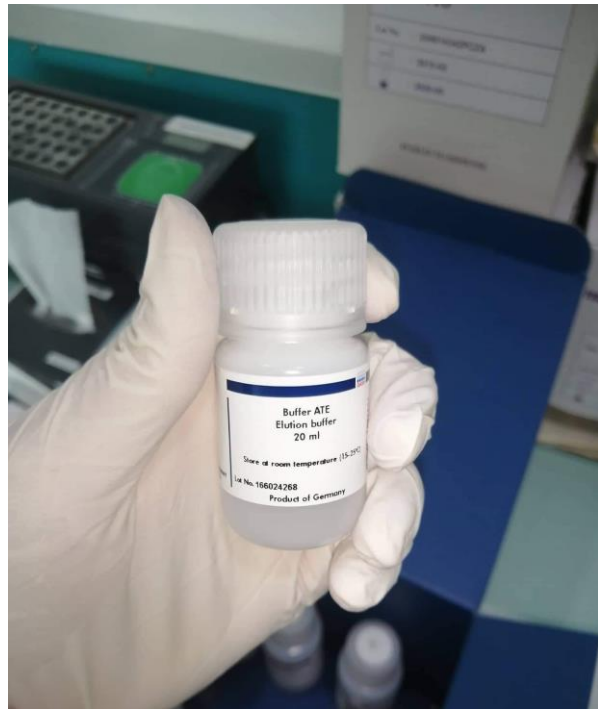
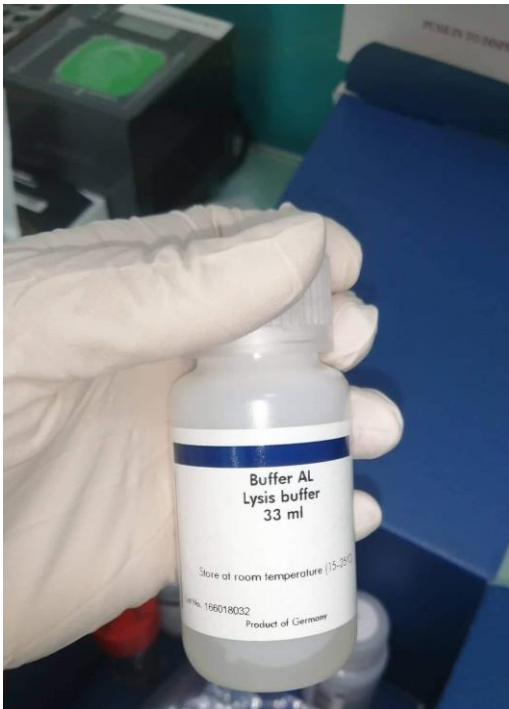


La sous presse



**l'ajout du révélateur de la
Phosphatase (Original 2022)**

EXTRACTION



Réactifs et kits d'extraction



Centrifugeuse

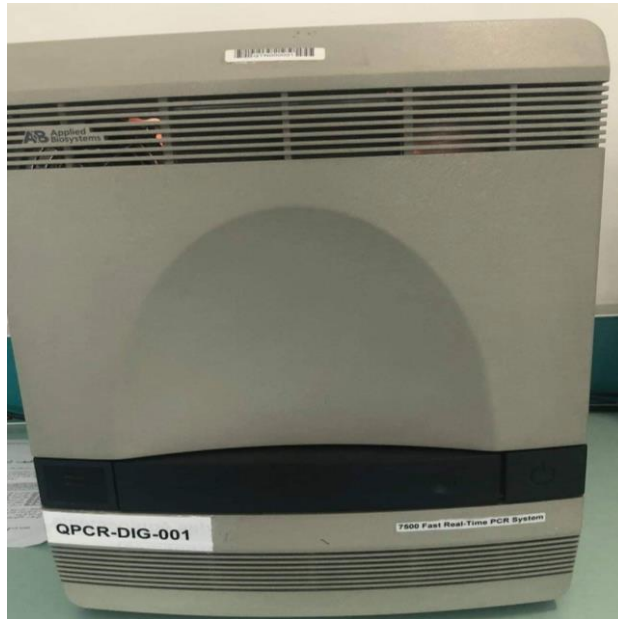


Agitateur

Quantification



Kits de quantification (quantifier human DNA)



**La real time PCR
Amplification**



Kit AmpFister indentifiler plus



kit AmpFLST MiniFiler PCR



plaque 96 puits (original)



cycle d'amplification

Post Amplification



Formamide (original)



cryobloc (original)



Le séquenceur 3130 xl (original)

Crimelite à différents longueur d'ondes





Tableau : Liste des loci analysés sur le chromosome X (Doutrempuich 2012)

Locus	Chr	Position	Taille des fragments	Motif répété	Échelle allélique
Amélogénine	X	Xp22.1 22.3			
DX S7132	X	Xq11.2	de 216 à 244 pb	(TCTA) _n	entre 10 et 17
DX S7423	X	Xq28	de 154 à 174 pb	(TCCA) _n TCTGTCCT (TCCA) _m .	entre 13 et 18
DX S8378	X	Xp22.31	de 158 à 182 pb	(CTAT) _n	entre 9 et 15
DX S10074	X	Xq12	de 104 à 172 pb	(AAGA) _n	entre 4 et 21
DX S10079	X	Xq12	de 290 à 333 pb	(AGAG) _n TGAAAGAG (AGAA) _m AGAG (AGAA) _p	entre 14 et 25
DX S10101	X	Xq26.2	de 216 à 261 pb	(AAAG) _n GAAAGAAG (GAAA) _m A (AAAG) _p AAGA (AAAG) _q AAAAAGAA (AAAG) _o AA	entre 24 et 35
DX S10103	X	Xq26.2	de 109 à 135 pb	(TAGA) _n CTGA (CAGA)(TAGA) _m (CAGA) _p (TAGA)	entre 15 et 21
DX S10134	X	Xq28	de 295 à 363 pb	(GAAA) _n GAGA (GAAA) AA (GAAA) GAGA (GAAA) _m GAGA (GACAGA) _p (GAAA) GTAA (GAAA) _q AAA (GAAA) _o AAA (GAAA) _r	entre 28 et 44.3
DX S10135	X	Xp22.31	de 273 à 375 pb	(AAGA) _n GAAAG (GAAA) _m	entre 13 et 39.2
DX S10146	X	Xq28	de 188 à 275 pb	(TTCC) _n T (TTCC) _m TTTC CTCCTTCC (TTCC) (TTCC) TTCTTTTC (TTCC) _p TTTCTT (CTTT) _q CTTC (CTTT) _o T (CTTT) _r	entre 24 et 46.2
DX S10148	X	Xp22.31	de 207 à 305 pb	(GGAA) _n (AAGA) _m (AAAG) _p N8 (AAGG) _q .	entre 13.3 et 38.1
HPRTB	X	Xq26.2	de 148 à 180 pb	(AGAT) _n	entre 9 et 17