

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université de 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

Option : Génétique et Physiologie

Thème :

Etablissement des profils génétiques à partir des traces de contact sur différents supports en utilisant le protocole d'extraction Chelex

Présenté par :

ZAOUI Mohamed Raouf

Soutenu le : 20/09/2015

Devant le Jury :

-Mme CHERRALLAH.A	MAA	UB1	Présidente
-Mme KESKAS.S	MAA	UB1	Examinatrice
-Mme GUESSAIBIA. N	MCB	UB1	Promotrice
-Mr DAHO. K	MSF	INCC-GN	Co-Promoteur
-Mr BRAHIM ERRAHMANI. M	MAA	UB1	Invité
-Mr LAZREG. S	MSF	INCC-GN	Invité

Promotion 2014-2015

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université de Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



UB1



INCC-GN

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Option : Génétique et Physiologie

Thème :

Etablissement des profils génétiques à partir des traces de contact sur différents supports en utilisant le protocole d'extraction Chelex

Présenté par :

ZAOUI Mohamed Raouf

Soutenu le : **20/09/2015**

Devant le Jury :

-Mme CHERRALLAH.A	MAA	UB1	Présidente
-Mme KESKAS.S	MAA	UB1	Examinatrice
-Mme GUESSAIBIA. N	MCB	UB1	Promotrice
-Mr DAHO. K	MSF	INCC-GN	Co-Promoteur
-Mr BRAHIM ERRAHMANI. M	MAA	UB1	Invité
-Mr LAZREG. S	MSF	INCC-GN	Invité

Promotion **2014-2015**

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, de m'avoir donné l'opportunité de mener à bien ce modeste travail.

Mes remerciements s'adressent d'abord aux membres du jury, Mme CHERRALLAHA, Présidente et Mme KESKAS S, pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Je tiens à remercier ma promotrice, Mme GUESSAIBIA N, pour avoir accepté de m'encadrer, de me conseiller au quotidien et qui a toujours su diriger avec sagesse mon thème. Un immense merci pour sa disponibilité à toute heure, pour sa gentillesse et son écoute qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Ce mémoire a été effectué au sein de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie de la gendarmerie nationale, Bouchaoui. Je tiens à adresser mes vifs remerciements à son directeur général, et au chef du laboratoire, commandant BOUSAUFI A, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe avec simplicité et ouverture d'esprit.

J'adresse aussi des remerciements tous particuliers à Mr DAHO k, responsable de la qualité et spécialiste en analyse d'ADN au sein du même laboratoire, pour ses compétences pédagogiques et scientifiques, ses précieux conseils, son ouverture d'esprit, son encouragement, sa franchise, sa disponibilité et pour le temps qu'il m'a bien consacré. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

Un immense merci au commandant Mr Lazreg S, pour m'avoir donné de son temps et pour l'intérêt qu'il a accordé à mon travail.

Je tiens à remercier aussi tous mes enseignants qui ont participé à ma formation tout au long de mon cursus, sans oublier Mr Brahim Errahmani M, pour l'aide qu'il m'a apportée lors des analyses statistiques

Mes derniers remerciements s'adressent à toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin à la réalisation de travail.

Dédicace

Je dédie cet humble mémoire :

À mon père, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour lui. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices qu'il a consentis pour mon éducation et ma formation.

À la prunelle de mes yeux, celle qui m'a donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. À toi ma chère mère. Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je porte pour elle. À toi ma chère mère.

À ma sœur et mes chers frères chacun par son nom, je dédie ce travail dont le grand mérite leur revient en premier lieu pour leurs aides et encouragements.

À tous les membres de ma famille, petits et grands, Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

À mes aimables ami(e)s et mes collègues d'études qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont apporté beaucoup de joie et de plaisir. je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Raouf

Résumé

Au cours de ces dernières années, des milliers de crimes ont été résolus grâce aux progrès faits par les techniques de biologie moléculaire, permettant ainsi l'identification rapide, et précise des individus à partir des traces biologiques prélevées de scènes de crimes. Ces techniques ne donneront leurs fruits qu'après l'application de techniques d'extraction de l'ADN adéquates, donnant lieu à des quantités d'ADN suffisantes et avec une meilleure qualité afin d'établir des profils génétiques exploitables.

Dans cette étude, l'ADN a été extrait par la méthode Chelex à partir des traces de cellules épithéliales et de salive sur trois types de supports, à savoir, mégots de cigarettes, chewing-gums et col de chemises, afin d'évaluer le rendement quantitatif et qualitatif de cette technique en matière d'ADN récupéré à partir des traces de contact.

Les résultats obtenus montrent que les quantités d'ADN récupérées à partir des traces de salive sont amplifiables et supérieures à celle recommandé par le fabricant du kit d'amplification utilisé durant cette étude (Identifiler plus, ABI, USA), tandis que les quantités d'ADN récupérées à partir des traces de cellules épithéliales déposées sur les chemises sont inférieures à la norme déterminée par le fabricant du kit, ceci est dû à la présence des inhibiteurs sur ce type de support.

Enfin, presque toutes les quantités d'ADN obtenues à partir du matériel biologique sur différents supports ont donné des profils génétiques complets et interprétables sauf ceux obtenus sur les chemises qui ont donné deux profils partiels contre trois profils complets.

Mots clés : Profils génétique, Extraction d'ADN, Traces de contact, Cellules épithéliales, Salive, Chelex, Identifiler Plus, Inhibiteurs.

Abstract

During the last few years, thousands of crime had ben solved because of the progress made in molecular biology field, allowing the identification of individuals with great precision and in a record timing from just a tiny amount of biological materil recovered from the crime scene. Application of these techniques would have given no such a great results without an adequate extraction method that yield sufficient and pure DNA amount to generate exploitable DNA profiles.

Over the course of this study, DNA materiel from traces of epithelial cells and saliva on different type of substrate including cigarette butts, chewing-gums and garment, has been extracted using Chelex extraction technique, in order to assess the quantitative and the qualitative DNA yield of this technique.

Results show that the amount of DNA obtained from saliva is amplifiable and greater than that recommended by the manufacturer of the amplification Kit used during this study (identifiler plus, ABI, USA). However, DNA results obtained from epithelial cell on the pieces of garment was a little less than the standard DNA amount required (identifiler plus, ABI, USA),this is due to the presence of inhibitors in this type of substrate.

Finally, almost all DNA materiel recovered from different type of substrate have given full DNA profiles, whereas DNA amount extracted from biological materiel on the pieces of garment have yielded two partial DNA profile against three full DNA profile.

Keywords : DNA profiles, DNA extraction, Traces of contact, Epithelialcells, Saliva, Chelex, Identifiler Plus, Inhibitors.

ملخص

خلال السنوات الأخيرة تمّ حلّ الألاف من الجرائم، بفضل التقدم المحرز في تقنيات البيولوجية الجزيئية، التي تسمح بتحديد هوية الأفراد في توقيت قياسي و بدقّة كبيرة انطلاقا من آثار بيولوجية ضئيلة يتمّ جمعها من مسرح الجريمة، هذه التقنيات لن تعطي ثمارها إلا بتطبيق طريقة ملائمة لاستخلاص الحمض النووي، التي تقوم بتوفير كميات مناسبة و ذات جودة عالية من الحمض النووي، لتمنح في الأخير بصمة وراثية واضحة.

في هذه الدراسة، تمّ استخلاص الحمض النووي، من آثار اللعاب والخلايا الظاهرية على مستوى ثلاثة ركائز تتمثل في أعقاب السجائر، العلكة و القمصان، بواسطة تقنية Chelex، وذلك من أجل تقييم المردود الكميّ و النوعي للحمض النووي المستخلص من آثار اللّمس بهذه التقنية.

أظهرت النتائج أنّ كميات الحمض النووي المستخلصة من آثار اللعاب معتبرة و أكبر من تلك الموص بها من قبل الشركة المصنعة لمعدّات التضخيم المستعملة في هذه الدراسة (identifiler plus, ABI, USA). في حين أنّ كميات الحمض النووي المستخلصة من آثار الخلايا الظاهرية في القمصان هي أصغر من تلك التي تمّ تحديدها من قبل نفس الشركة المصنعة لمعدّات التضخيم، و يرجع ذلك إلى وجود مثبطات في هذا النوع من الركيزة.

أخيرا، معظم كميات الحمض النووي التي تمّ الحصول عليها من المواد البيولوجية في مختلف الركائز، أعطت مواصفات جينية كاملة، باستثناء المواد البيولوجية المستخرجة من القمصان، والتي أعطت ثلاثة مواصفات جينية كاملة و اثنان جزئية.

كلمات البحث : المواصفات الجينية، استخلاص الحمض النووي، آثار اللّمس، الخلايا الظاهرية، اللعاب، Chelex، Identifiler plus ، المثبطات.

Liste des Figures

Figure 1: Schéma explicatif du polymorphisme d'un seul nucléotide(SNP).....	07
Figure 2: Présentation schématique des étapes de l'extraction chelex.....	12
Figure 3: Evolution de la quantité d'amplicons en fonction du nombre de cycles de PCR présentée en échelle linéaire.....	13
Figure 4 : Schéma explicatif du principe de la sonde Taq Man.....	15
Figure 5 : Schéma d'instruments de l'électrophorèse capillaire utilisé pour l'analyse de l'ADN.....	17
Figure 6: Profilage des STRs autosomes sur deux loci D13S71 et D7S820.....	18
Figure 7: Préparation des échantillons.....	23
Figure 8 : Paramètres du système RT-PCR 7500.....	27
Figure 9 : Paramètres d'amplification par le kit Identifier plus.....	29
Figure 10 : Courbe des standards.....	32
Figure 11: Comparaison des concentrations moyennes de l'ADN des mégots de cigarettes appartenant aux 3 participants.....	36
Figure 12 : Comparaison des concentrations moyennes de l'ADN des 5 chewing-gums appartenant aux 3 participants.....	36
Figure 13 : Comparaison des concentrations moyennes de l'ADN des 3 supports appartenant au 2ème participants.....	38
Figure 14 : Profil génétique complet obtenu à partir de l'échantillon P1M1après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® Identifier PLUS®.....	40
Figure 15 : Profil génétique complet obtenu à partir de l'échantillon P2C1 après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® Identifier PLUS®.....	41

Figure 16 : Profil génétique partiel obtenu à partir de l'échantillon P2C2 après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®.....42

Figure 17 : Profil génétique complet obtenu à partir de l'échantillon P3S1 après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®.....43

Figure 18 : Profil génétique d'allelic ladder du kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®.....44

Liste des Tableaux

Tableau I : Liste des loci analyses sur l'ADN autosomal.....	06
Tableau II : Codification des supports.....	20
Tableau III : Séries d'extraction des échantillons prélevés de différents supports.....	22
Tableau IV : Plan de la plaque de quantification.....	26
Tableau V : Calcul du volume total du Master Mix.....	26
Tableau VI : Plan des échantillons d'amplification.....	28
Tableau VII : Calcul du volume total du Master Mix.....	28
Tableau VIII : Plan des échantillons amplifiés à séparer par électrophorèse capillaire.....	30
Tableau IX : Préparation de la solution d'électrophorèse capillaire.....	30
Tableau X : Concentrations d'ADN obtenues à partir de trois Participants volontaires après dépôt des traces de contacts sur trois types de supports.....	33
Tableau XI: Concentrations moyennes d'ADN et degrés de signification correspondants aux échantillons de chaque support pour les 3 participants.....	35
Tableau XII: Résultats des profils d'ADN à partir des mégots de cigarettes.....	45
Tableau XIII: Résultats des profils d'ADN à partir des morceaux de chemises.....	45
Tableau XIV: Résultats des profils d'ADN à partir des chewing-gums.....	45

Liste des abréviations

ABI	Applied Biosystems
ADN	Acide Désoxy Ribonucléique
ADN mt	Acide Désoxy Ribonucléique mitochondrial
ARN	Acide Ribo Nucléique
ANOVA	Analyse of Variance
°C	Degré Celsius
CCD	Charge Coupled Device
cm	Centimètre
dNTP	desoxynucleoside triphosphate
HV	Hyper Variable region
Kpb	Kilo volt
Kv	Kilo volt
ml	millilitre
ng	nano-gramme
Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PK	Protéinase K
POP	Performance Optimized Polymere
QPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RBS	Réactif Biologique Séquentiel
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	rotation par minute
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction

SNP	Single Nucléotide Polymorphisme
STR	Short Tandem Repeats
Taq	Thermus aquaticus
UV	Ultraviolet
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
µl	microlitre

Glossaire

Allèles : Sont les différentes versions d'un même gène, occupants une place précise sur un chromosome, qui peuvent varier d'un individu à l'autre suite à une mutation, ou une recombinaison génétique.

Allelic ladder : Composé de fragments d'ADN qui représentent des allèles communs à un locus.

Amorce : C'est une courte séquence d'ADN, complémentaire du début d'une matrice, et nécessaire pour initier la réplication par une ADN polymérase.

Amplicon : C'est un fragment d'ADN amplifié par PCR.

Criminalistique : C'est la collecte d'indices sous toutes ses formes et son analyse pour déterminer et identifier le ou les auteurs d'une infraction.

Criminologie : Etude scientifique de l'ensemble du phénomène criminel, sa démarche consiste à constater et répertorier les manifestations du crime, à identifier les conditions qui favorisent le passage à l'acte criminel, à analyser la personnalité du criminel et l'attitude de sa victime et à évaluer la réaction sociale face à la criminalité.

Chélation : (Prononcer kélassion, du grec khêlê : « pince ») est un processus physico-chimique au cours duquel est formé un complexe, le chélate, entre un ligand, dit chélateur (ou chélatant), et un cation (ou atome) métallique.

Electrophorèse capillaire : Se définit comme une technique de séparation électrophorétique effectuée dans un tube de diamètre interne < à 100 µm, rempli d'un milieu électrolyte. Cette nouvelle technique permet la séparation rapide de molécule très variée, avec une grande résolution.

Eléctrophérogramme : C'est un condensé de résultats d'une analyse effectuée par séquençage automatique d'électrophorèse. Les électrophérogrammes peuvent être utilisés pour dériver des résultats d'un test de paternité.

Génome : C'est l'ensemble du matériel génétique d'un organisme.

Inhibiteurs : Des substances qui empêchent ou interfèrent avec la réaction de polymérase en chaîne.

Le chélate : C'est un corps qui possède la capacité de fixer des cations métalliques en constituant un complexe stable non ionisé, non toxique et facilement éliminé.

Locus : C'est un emplacement physique précis et invariable sur un chromosome.

PCR multiplex : C'est une technique de biologie moléculaire qui sert à amplifier plus d'un amplicon simultanément en utilisant plusieurs paires d'amorces dans un mélange réactionnel.

Profil génétique : Correspond au résultat d'une analyse génétique, qui permet à chaque être humain d'être génétiquement unique.

Protéinase K : Dans un tampon d'extraction, la PK inactiver les nucléases et aide à la lyse des globules blancs pour libérer l'ADN nucléaire.

Rendement : Exprimé de façon concrète et générale sous la forme d'un ratio entre le résultat obtenu et le nombre d'outils nécessaires à son efficacité.

Science forensique : Est défini comme l'ensemble des principes scientifiques et des techniques appliqués à l'investigation criminelle.

Table des matières

Introduction.....	01
--------------------------	-----------

Chapitre I : Recherche bibliographique

I-Génome humain.....	03
I.1-ADN nucléaire.....	03
I.2-ADN mitochondrial.....	03
II-Les marqueurs utilisés pour l'identification génétique.....	04
II.1-Polymorphisme génétique.....	04
II.1.1-Polymorphismes de longueur « RFLP ».....	04
II.1.2-Polymorphismes de répétition.....	04
II.1.2.1-Les Minisatellites.....	05
II.1.2.2-Les Microsatellites.....	05
II.1.3-Polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP).....	07
III- Traces biologiques d'ADN et empreinte génétique.....	07
III.1-Source d'ADN.....	08
III.1.1-Trace de salive.....	08
III.1.2-Trace de cellules épithéliales.....	08
III.2-Les Facteurs influent sur les traces biologiques.....	09
IV-Analyse de l'ADN.....	09
IV.1-Extraction de l'ADN.....	09
IV.1.1-Technique utilisées pour l'extraction d'ADN.....	10
IV1.1.1-Méthode d'extraction organique 'phénol-chloroforme'.....	10
IV1.1.2-Méthode d'extraction inorganique 'Chelex'.....	10
IV1.1.2.1-Composition de chelex.....	11
IV1.1.2.2-Principe de chelex.....	11
IV1.1.2.3-Les étapes de l'extraction chelex.....	11
IV.1.1.3-L'extraction en phase solide.....	12
IV.2-Quantification de l'ADN par PCR en temps réel.....	12
IV.2.1-Les étapes de la PCR en temps réel.....	13
IV.2.2-Principe de la sonde Taq Man.....	14

IV.3-Amplification par PCR.....	15
IV.3.1-Les étapes de la PCR.....	16
IV.3.2-Les Inhibiteurs de la PCR.....	16
IV.4-Séparation et Détection des produits de la PCR par Electrophorèse capillaire.....	16
IV.5-Etablissement des profils génétiques.....	18

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I- Préparation des échantillons sur différents supports.....	19
I.1-Matériel.....	19
I.2- Méthodes.....	19
I.2.1-Préparation des mégots.....	19
I.2.2-Préparation des chewing-gums.....	20
I.2.3-Préparation des chemises.....	20
I.2.4-Préparation des Prélèvements de référence.....	20
II-Examen et mise en tube.....	21
II.1-Matériel.....	21
II.1.1-Matériel et équipements.....	21
II.1.2-Solutions et réactifs.....	21
II.2- Méthodes.....	21
III-Extraction d'ADN nucléaire.....	24
III.1-Matériel.....	24
III.1.1-Matéiel et équipements.....	24
III.1.2-Réactifs et solutions.....	24
III.2-Méthodes.....	24
III.2.1-L'étape de pré-lyse.....	24
III.2.2-L'étape de lyse et purification.....	24
IV-Quantification d'ADN.....	25
IV.1-Matériel.....	25
IV.1.1-Matériel et équipements.....	25

IV.1.2-Réactifs et solution.....	25
IV.2-Methodes.....	25
V-Amplification d'ADN.....	27
V.1-Matériel.....	27
V.1.1-Matériels et équipements.....	27
V.1.2-Réactifs et solutions.....	27
V.2-Methodes.....	27
VI- Electrophorèse capillaire.....	29
VI.1-Matériel.....	29
VI.1.1-Matériel et équipements.....	29
VI.1.2- Réactifs et solutions.....	29
VI.2-Méthodes.....	29
VII-Validation des profils génétiques.....	31
VIII-analyse statistique.....	31

Chapitre III : Résultats et Discussion

I-Résultats et discussion de la quantification.....	32
I.1-Courbe des standards.....	32
I.2-L'effet du participant sur le rendement d'ADN extrait par chelex.....	34
I.2.1-Mégots de Cigarettes.....	35
I.2.2-Chewing-gums.....	36
I.3-L'effet de support sur le rendement d'ADN extrait par chelex.....	37
I.3.1-Comparaison entres les supports du 1er Participant.....	37
I.3.2-Comparaison entre les supports du 2ème Participant.....	37
I.3.3-Comparaison entre les supports du 3ème Participant.....	38
II-Résultats et discussion des profils d'ADN.....	39
Conclusion.....	47

Références Bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

De nos jours l'empreinte génétique est considérée comme l'un des outils les plus importantes dans les enquêtes judiciaires. Cette importance est due au caractère, d'individualité que la molécule d'ADN possède. Autrement dit, chaque individu, (à l'exception des jumeaux monozygotes), est unique au niveau de sa structure génétique (Blandin P, 2004).

Jusqu'au milieu des années 80, l'identification des criminels à partir de traces biologiques était surtout basée sur l'analyse des groupes sanguins et des polymorphismes protéiques et enzymatiques. Cependant, ces techniques ne permettaient en aucun cas d'identifier une personne avec certitude, ainsi en 1985, une étape décisive est franchie suite aux travaux menés par Sir Alec Jeffreys. Ce dernier a développé une technique permettant d'établir un profil génétique propre à chaque individu (Josette, 2009).

L'ADN étant identique dans chaque cellule d'un individu, il est donc possible d'établir une empreinte génétique à partir de toute sécrétion ou tissu du corps humain. Ce moyen d'investigation est aujourd'hui incontournable, aussi bien pour les recherches civiles en paternité que pour les enquêtes judiciaires. Après la découverte de la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) (K. Mullis, 1985), le domaine d'analyse de l'ADN est révolutionné, cette technique permettant d'augmenter de façon considérable la quantité d'ADN analysée à partir de prélèvements contenant peu de matériel génétique grâce aux propriétés des DNA polymérase thermostables (Saiki et al, 1985).

En criminalistique, toute trace de matériel biologique peut faire l'objet d'une analyse permettant l'identification fiable de l'auteur d'un crime ou d'une victime de catastrophe de masse. Les échantillons biologiques analysés proviennent de sources diverses incluant le sang, le sperme, la salive et les cellules épithéliales, ces échantillons sont retrouvés sur différents types de supports tels que le bois, les vêtements, les mégots de cigarettes... etc.

Les techniques d'analyse de l'ADN sont alors devenues une aide irremplaçable, en raison de leur rapidité, de leur capacité à déterminer simultanément les empreintes génétiques d'un grand nombre de personnes et de leur utilisation sur des quantités restreintes et parfois dégradées de matériel biologique.

Introduction

Le principal objectif de notre travail qui a été réalisé au niveau du laboratoire d'identification génétique, consiste d'abord à l'établissement des profils génétiques à partir de traces de contact (traces de cellules épithéliales et de salive) sur différents supports tels que : les mégots de cigarettes, chewing-gums, et chemises en tissu, en utilisant le protocole d'extraction Chelex.

La récupération de l'ADN à partir des traces de contacts est fortement variable et elle dépend d'une large gamme de facteurs, entre autre les caractéristiques du donneur, du support et l'environnement, ensuite, cette étude consiste à l'évaluation de l'effet du donneur du matériel biologique et l'effet de support du matériel biologique sur le rendement d'ADN extrait par la technique d'extraction Chelex.

Chapitre I :
Synthèse

BIBLIOGRAPHIQUE

Le matériel génétique humain contient un certain nombre d'informations tout à fait particulières, qui le rendent intéressant en tant qu'objet d'analyse. L'ADN présente également un intérêt pour l'analyse criminalistique dans la mesure où des analyses ADN sont susceptibles de constituer un apport essentiel dans un dossier judiciaire. Nous aborderons dans cette partie un petit rappel sur l'ADN ainsi qu'une vue sur le processus d'analyse génétique.

I-Génome humain :

Le génome humain, constitué de 6 milliards de paires de bases comporte environ 35000 gènes (International Human Genome Mapping Consortium, 2001 ; Venter et al, 2001). Cependant l'ADN est constitué de deux parties distinctes, la première contient des régions codantes, ces régions sont responsables de l'expression des protéines, alors que la deuxième partie qui contient des régions non codantes, représente plus de 90% du génome, c'est à dire ne comporte pas d'information en rapport direct avec la synthèse de protéines. Une grande partie de cette séquence d'ADN non codante est répétitive, la même séquence est répétée à plusieurs reprises que ce soit en tandem ou dispersé dans le génome (Venter et al, 2001).

Certaines parties non codantes de l'ADN sont semblables chez tous les êtres humains, alors que d'autres varient considérablement d'une personne à une autre. C'est cette variabilité qui permet de distinguer des individus grâce à l'analyse d'ADN (Butler, 2005).

I.1-ADN nucléaire :

L'ADN nucléaire est localisé essentiellement dans le noyau des cellules, répartis sur 46 chromosomes. Chaque cellule somatique nucléée d'un être humain contient 23 paires de chromosomes; 22 paires d'autosomes et 1 paire de chromosome sexuels, XX pour une femme et XY pour un homme (Mader, 2010).

I.2-ADN mitochondrial :

L'ADN mitochondrial (ADN mt), présent dans le cytoplasme, permet d'établir une lignée maternelle, et peut également être utilisé pour l'expertise génétique, il s'agit d'une petite molécule circulaire et monocaténaire de 16569pb qui code pour des chaînes polypeptidiques nécessaires au fonctionnement de la mitochondrie et pour des ARN (Loistron, 2009).

Deux régions d'ADN mt retrouvées dans la région de contrôle sont avérées fortement polymorphes, dans la population humaine, celles-ci sont : la région hypervariable I (HV1), avec une longueur de 342 pb, et la région hypervariable II (HV2), avec une longueur de

268pb. L'analyse de ces deux régions se fait par séquençage et les résultats sont obtenus par comparaison avec une séquence de référence (Doutremepuich, 2012).

II-Les marqueurs utilisés pour l'identification génétique

II.1-Polymorphisme génétique

Le polymorphisme est l'existence pour de nombreux loci chez l'homme, de deux allèles ou plus s'exprimant avec une fréquence non négligeable dans la même population. Plus d'un 1/3 des gènes sont polymorphes (Makri-mokrane,2006).

Tous les individus qui composent l'espèce humaine sont génétiquement très proches les uns des autres mais la présence d'un grand polymorphisme dans l'information génétique crée une biodiversité qui rend chaque être humain unique (Mansuet-Lupo et al, 2007).

II.1.1-Polymorphismes de longueur « RFLP » :

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) résulte de variations individuelles de la localisation de sites de restriction pour une enzyme donnée. Il peut être dû soit à une création ou une suppression d'un site de restriction en relation avec une mutation soit par insertion ou une délétion d'ADN.

Ces polymorphismes sont révélés par la méthode du Southern blot après digestion enzymatique de l'ADN extrait afin d'observer, grâce à leur reconnaissance par une sonde marquée, des fragments différents par leur longueur (Botstein et al, 1980) ;(Wyman et al, 1980).

II.1.2-Polymorphismes de répétition

Les séquences répétitives représentent environ 50% du génome humain. Ces séquences montrent une très grande variabilité dans le nombre de répétitions dites en tandem de la séquence noyau, et elles sont réparties dans tout le génome.

Selon la structure et le nombre de répétitions du motif de base formant le polymorphisme, on distingue les minisatellites (ou VNTR, variable number of tandem repeats, en français : nombre variable de répétitions en tandem) et les microsatellites (ou STR, short tandem repeats, en français : courtes répétitions en tandem) (Petkovski , 2006).

Les VNTR et les STR sont transmis de façon stable selon les lois mendéliennes.

II.1.2.1-Les Minisatellites

La découverte des minisatellites par Alec Jeffreys en 1985 a révolutionné l'utilisation de l'ADN en matière d'identification et de filiation. Le motif de base de ces marqueurs, également appelés VNTR, compte entre 9 et 100 pb. Il est réitéré entre deux et quelques centaines de fois à chaque locus (Tautz, 1993), générant ainsi des fragments de 500 pb à 20 kpb en taille. Les minisatellites se trouvent plus fréquemment dans les régions proches des télomères mais ils peuvent être aussi présents sur d'autres sites chromosomiques (Petkovski, 2006). Ils sont instables et le nombre d'exemplaires d'une séquence donnée change souvent d'une génération à l'autre suite à des recombinaisons méiotiques ("crossing-over") inégales et des conversions génétiques (Karp, 2010).

II.1.2.2-Les Microsatellites

Les séquences microsatellites, aussi nommés STR (Short Tandem Repeats), sont des séquences courtes d'une longueur de 2 à 6 paires de bases, répété entre 20 et 50 fois à chaque locus, ce qui crée des allèles de taille variable (entre 50 et 500 paires de base) (Petkovski, 2006).

Les STRs sont souvent divisés en plusieurs catégories en fonction du modèle de répétition. La structure des STR peut être simple ou complexe, les STR simples contiennent des unités de longueur identiques, ils permettent une standardisation facile et montrent un taux de mutation plus faible. Alors que les STR complexes peuvent contenir plusieurs blocs de répétition montrant une grande variabilité et sont de ce fait plus informatifs (Butler 2012).

La facilité, la rapidité et la fiabilité des réactions PCR pour les microsatellites STR, ainsi que la faisabilité de ces derniers sur absolument toutes sortes de taches ou de traces biologique ont imposé ces systèmes pour établir les fichiers des empreintes génétiques, pour les affaires criminelles et les tests de paternité. A la fin de la décennie, les STR sont devenues l'outil standard de tous les laboratoires de criminalistique dans le monde.

Le domaine criminalistique s'intéresse à analyser 15 STR autosomaux localisés sur tout le génome, qui sont représentés dans le tableau I.

Tableau I : Liste des loci analysés sur l'ADN autosomal (Doutremepuich, 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
THO1	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

II.1.3-Polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP)

Les SNPs sont des marqueurs bi alléliques correspondant à la substitution d'un seul nucléotide à une position spécifique dans le génome, ce qui crée des allèles différents. Le SNP est donc un polymorphisme de séquence (Loistron, 2009).

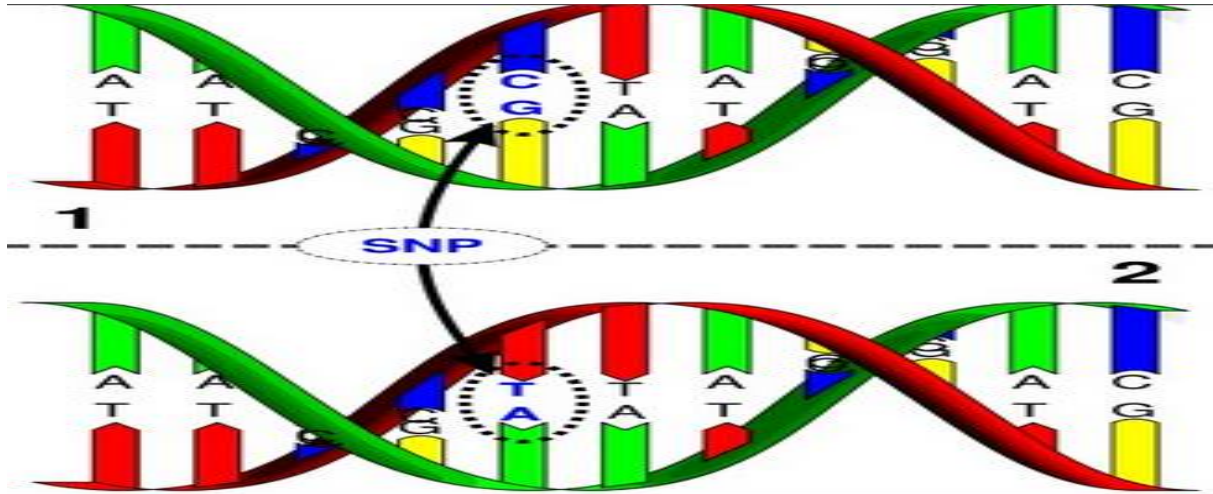


Figure 1: Schéma explicatif du polymorphisme d'un seul nucléotide(SNP). (Anonyme 1)

Les régions d'ADN ciblées pour l'analyse de SNP sont de petites tailles, ce qui se révèle intéressant pour l'analyse de molécules d'acides nucléiques fragmentées. Ceci est particulièrement important en criminalistique pour l'identification génétique. Ces marqueurs peuvent être aussi utilisés pour la détermination d'origine ethnique d'une personne. Les SNP présentent un taux de mutation bien inférieur à celui des microsatellites (STR), pour cela ils sont considérés comme des marqueurs génétiques stables (Keyser and Petkovski, 2006).

III-Traces biologiques d'ADN et empreinte génétique

En criminalistique, les traces biologiques exploitables correspondent à des substances issues des êtres vivants, échangées ou laissées sur une scène de crime. Dans le cadre de crimes de sang, d'agressions sexuelles ou de cambriolages, à titre d'exemple, les enquêtes s'intéressent particulièrement à des traces qui pourraient être détectées lors de l'investigation des lieux. Le laboratoire en charge devra alors déterminer si la trace est de nature biologique. L'étape suivante est alors de mettre en évidence la présence d'ADN par quantification, puis amplifier cet ADN, et enfin en dernière phase de l'analyse, d'individualiser cette trace en réalisant un typage génétique (Goodwin et al, 2007) ; (Frumkin et al, 2010).

L'obtention d'un profil ADN ou empreinte génétique sur une trace biologique nécessite une comparaison avec des prélèvements effectués sur une personne témoin, suspect ou victime afin d'identifier l'auteur.

III.1-Source d'ADN :

L'ADN d'une personne peut être transféré par contact sur des objets ou sur des personnes. Cet ADN provient des cellules issues de différentes matrices, le sang, le sperme, les éléments pileux, les cellules épithéliales (Doutremepuich et al 2010).

III.1.1-Trace de salive :

Au cours des dernières années la salive est devenue une très importante trace biologique pour les chercheurs du domaine forensique. Ce fluide corporel a gagné une popularité dans l'enquête médico-légale et judiciaire en raison de sa collection facile, sa manipulation facile et surtout bénéficie d'un stockage simple et à faible coût (Pereira.C, 2014).

L'ADN génomique peut être extrait à partir de la salive trouvée sur un grand choix de surfaces comme le chewing-gum, les mégots de cigarettes, les timbres-poste et la peau humaine. Le taux de succès de l'ADN de la salive est variable car il est impossible de deviner la quantité de cellules buccales dans la bouche (Blandin P, 2004).

III.1.2-Trace de cellules épithéliales

La trace ADN est définie comme une petite quantité d'ADN transféré lorsque les cellules épidermiques desquamées hors de la surface de la peau sont portées sur une surface secondaire par la sueur ou à l'abrasion. Les traces ADN sont souvent détectées sur les vêtements portés et les objets touchés qui sont par la suite examinés dans les laboratoires médico-légaux, de ce fait les cellules épithéliales sont la forme la plus commune de traces ADN (Petricevic et al, 2006).

La quantité de matière cellulaire transférée dépend de la durée pendant laquelle la peau est en contact avec l'objet (Goodwin et al, 2007).

III.2-Les Facteurs influent sur les traces biologiques

L'ADN des cellules déposées sur un objet ou une personne est soumis à des agressions environnementales qui peuvent dégrader l'ADN. Ces principaux facteurs sont : l'humidité et l'eau, les acides humiques contenus dans la terre, la chaleur et le feu. Malgré les agressions environnementales, les techniques d'analyses permettent d'obtenir des résultats valables (Doutremepuich 2012).

IV-Analyse de l'ADN

L'identification génétique a révolutionné au cours des 20 dernières années, grâce à l'automatisation, la sensibilité et la rapidité des techniques qui permettent l'analyse de l'ADN et l'obtention des profils génétiques (Blandin P, 2004).

L'analyse de l'ADN dans le domaine médico-légale déroule en quatre étapes successives et indispensables, d'abord l'extraction de l'ADN, puis une quantification de l'ADN, ensuite l'amplification par PCR, et enfin la séparation et la détection des fragments d'ADN amplifiés par électrophorèse capillaire.

IV.1-Extraction de l'ADN

Un échantillon biologique obtenu à partir d'une scène du crime tel que le sang, la salive ou tout autre liquide corporel, ou un échantillon de référence biologique récupéré du suspect ne contient pas l'ADN pur. L'ADN est empaqueté et protégé dans la cellule par des protéines, ces protéines et d'autres matériaux cellulaires sont considérés comme des inhibiteurs qui peuvent empêcher le processus de l'analyse d'ADN. Pour cette raison il y a trois étapes dans le processus d'extraction d'ADN. D'abord la rupture des membranes cellulaires, ce qui entraîne la lyse cellulaire pour libérer les molécules d'ADN, la séparation de l'ADN de la protéine dénaturée et d'autres composants cellulaires, et enfin retirer l'ADN dans un format compatible avec les applications en aval, telles que l'amplification par PCR (Goodwin et al, 2007).

IV.1.1-Technique utilisées pour l'extraction d'ADN

Dans les deux dernières décennies, un certain nombre de méthodes d'extraction, ont été développées dans le domaine criminalistique pour faire face à la grande variété de substrats d'extraction rencontrés dans la scène de crime. En générale les trois méthodes les plus utilisées, l'extraction organique phénol chloroforme, l'extraction Chelex® 100 et l'extraction QIAamp® à base de silice. En effet, notre étude a pour but d'évaluer la performance de la méthode d'extraction chelex.

IV1.1.1-Méthode d'extraction organique 'phénol-chloroforme'

L'extraction phénol-chloroforme fonctionne très bien pour la récupération de l'ADN double brin de haut poids moléculaire à partir de presque tous les types courants d'échantillons médico-légaux. Cependant, la méthode prend du temps, implique l'utilisation de produits chimiques dangereux et nécessite de multiples transferts d'échantillon entre les tubes ainsi qu'une étape de précipitation finale, augmentant potentiellement le risque de contamination et confusion des échantillons.

Néanmoins, cette technique est employée aujourd'hui comme un dernier recours pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons délicats, car elle produit un bon rendement d'ADN avec haute qualité et excellente pureté. À cet égard, l'extraction de phénol-chloroforme demeure l'étalon-or par lequel de nouvelles méthodes sont jugés (Rapley et al 2007).

IV1.1.2-Méthode d'extraction inorganique 'Chelex'

La méthode d'extraction Chelex est une méthode simple, plus rapide et n'utilise pas de solvants toxiques par rapport à la méthode d'extraction organique. Cette technique a été introduite en 1991, le procédé nécessite moins d'étapes, ce qui minimise les risques de contamination croisée. Par contre l'extraction Chelex présente certains inconvénients, car le produit extrait n'est pas aussi pur ou concentré que l'ADN organiquement extrait (Geberth V, 2006).

IV1.1.2.1-Composition de chelex

Le Chelex® 100 est une résine échangeuse d'ion ajoutée sous forme de suspension aux échantillons simples comme les taches de sang, ou les prélèvements buccaux qui appartiennent aux victimes et aux suspects. Cela permet d'obtenir un produit stable d'ADN de faible poids moléculaire.

Le Chelex est composé de copolymères de styrène di-vinylbenzène contenant des ions iminodiacétates appariés qui agissent comme des groupes chélateurs en liants des ions de métal polyvalents tels que le magnésium Mg^{2+} (Butler 2011).

IV1.1.2.2-Principe de chelex

Le chelex est chargé négativement et contient des billes qui s'attachent avec un cofacteur des DNase et RNase qui sont des endonucléases de la cellule, afin d'empêcher l'action de ces endonucléases sur notre ADN qui ont une grande affinité au cofacteur qui est le Mg^{2+} , et puisque chelex séquestre le Mg^{2+} , la formation du dimère (DNase – Mg^{2+}) ou bien (RNase – Mg^{2+}) n'est pas réalisé et par conséquent l'ADN reste non dégradé (Rapley et al, 2007).

IV1.1.2.3-Les étapes de l'extraction chelex

La procédure d'extraction est très simple ; la Chelex Résine 100, qui est fournie sous forme de billes, est transformée en suspension à 5% par utilisation de l'eau distillée. Le matériel cellulaire est incubé avec la suspension de Chelex à $56^{\circ}C$ pendant 30 minutes, la protéinase K, qui digère la plupart de protéine cellulaire, est souvent ajoutée en ce moment, Ceci est suivi par une incubation de 10 minutes à $100^{\circ}C$ de sorte que toutes les cellules sont rompues et que toutes les protéine sont dénaturées ,par la suite le tube d'extraction est centrifugé pour sédimenter simplement le Chelex et la protéine dénature au fond du tube, en ne laissant que la solution aqueuse contenant l'ADN à utiliser dans la PCR (Goodwin et al, 2007).

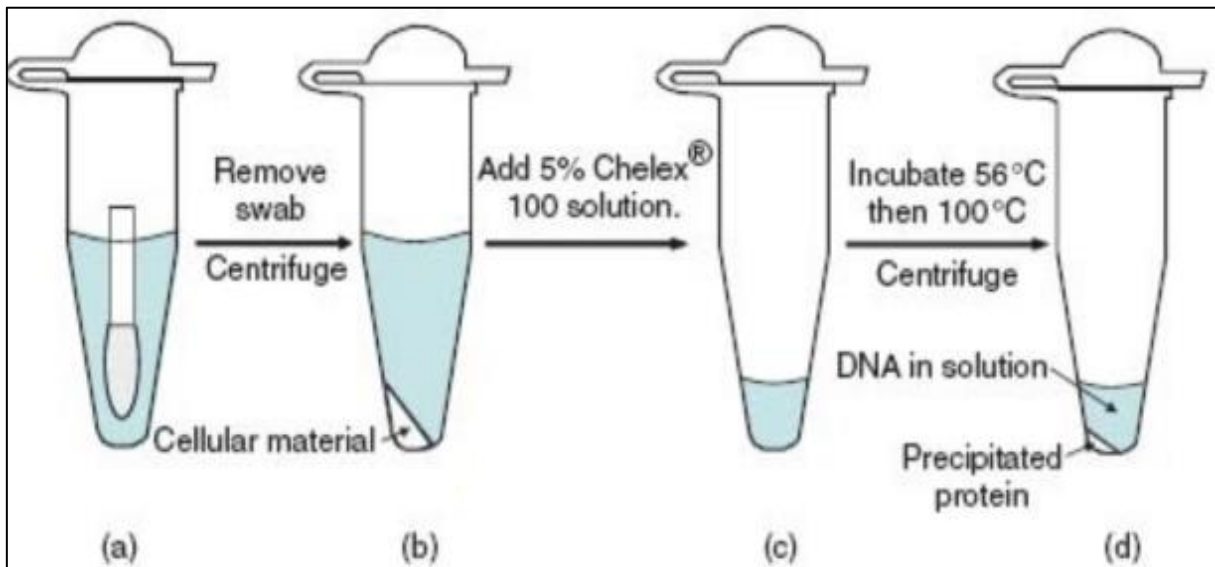


Figure 2: Présentation schématique des étapes de l'extraction chelex (Goodwin et al 2007).

IV1.1.3-L'extraction en phase solide

L'extraction à base de silice QIAamp® implique la membrane de gel de silice qui se lie spécifiquement à l'ADN en présence de tampon de lyse à base de guanidine, tandis que les inhibiteurs de PCR sont éliminés au cours des lavages ultérieurs, en laissant l'ADN dans l'éluant (Rapley et al 2007).

IV.2-Quantification de l'ADN par PCR en temps réel

Après l'extraction de l'ADN une mesure précise de la quantité d'ADN est nécessaire, car l'addition d'un surplus ou pas assez d'ADN à une réaction d'amplification peut affecter les résultats et fausser l'interprétation des profils génétiques obtenus.

La technologie de PCR en temps réel (ou QPCR pour quantitative PCR) a connu un essor considérable au cours de ces dernières années, 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, en observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle (Elyes,2002).

IV.2.1-Les étapes de la PCR en temps réel

La PCR en temps réel se déroule en 3 phases :

- La phase exponentielle: une fluorescence est détectée et son augmentation est proportionnelle à l'augmentation du produit PCR.
- La phase linéaire: certains composants ne se trouvent plus en quantité suffisante pour continuer la réaction.
- La phase plateau : le signal émis et la concentration d'amplicons restent constants (Pascal, 2007).

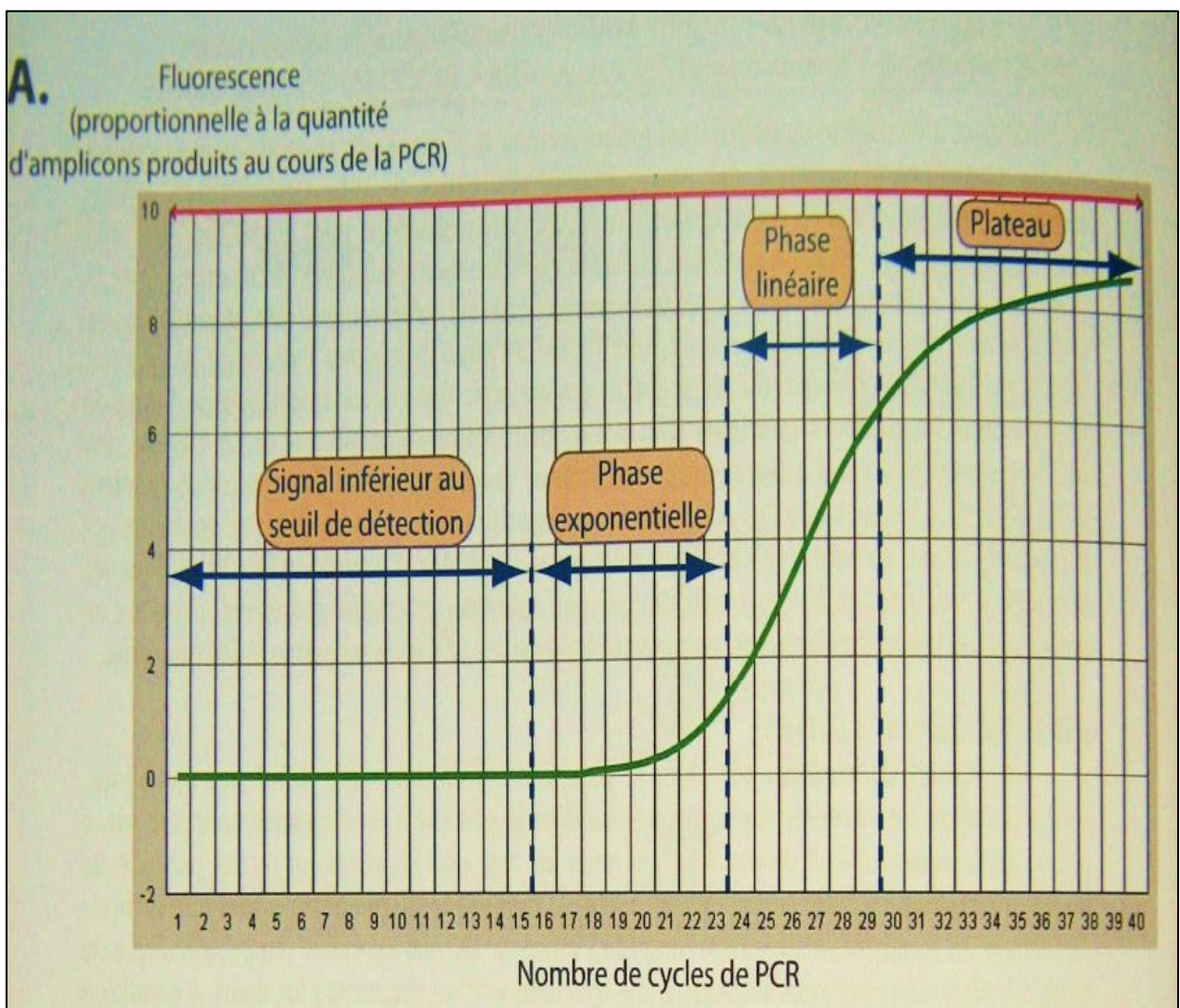
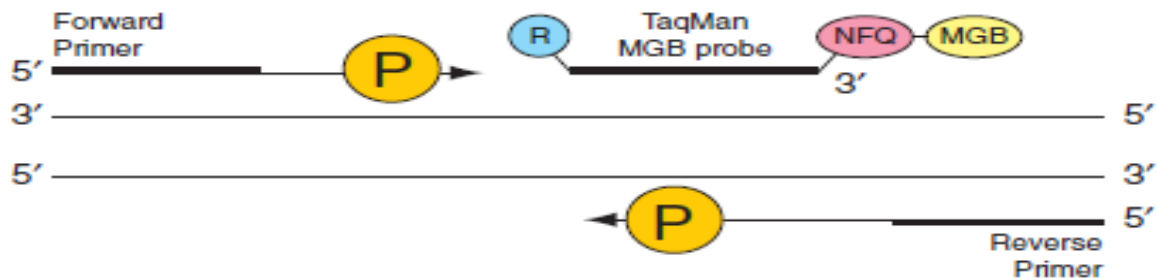


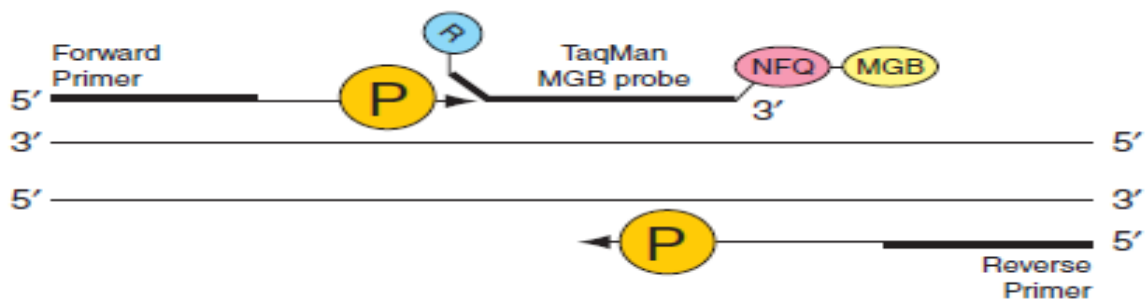
Figure 3: Evolution de la quantité d'amplicons en fonction du nombre de cycles de PCR présentée en échelle linéaire (Pascal, 2007).

IV.2.2-Principe de la sonde Taq Man

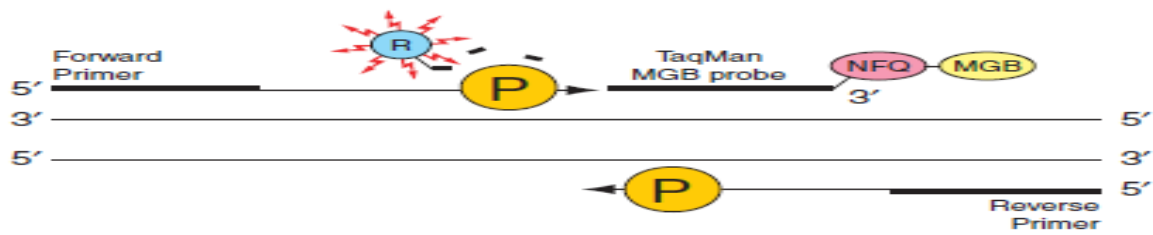
Une sonde, appelée sonde TaqMan, est marquée par une molécule fluorescente en position 5' que l'on nomme « reporter ». En position 3' se trouve un « quencher » qui est un fluorochrome suppresseur absorbant la fluorescence émise par le reporter, tant que celui-ci est couplé à la sonde, il réémet cette énergie absorbée en énergie calorifique. La sonde s'hybride de manière spécifique avec sa séquence complémentaire. Durant l'élongation des brins, la Taq polymérase, qui possède une activité 5' exonucléasique, coupe la sonde et ainsi sépare le reporter du quencher qui ne peut alors plus absorber la fluorescence émise par le reporter. Celle-ci est détectée par l'appareil et l'augmentation de cette fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons (Dougoud, 2008).



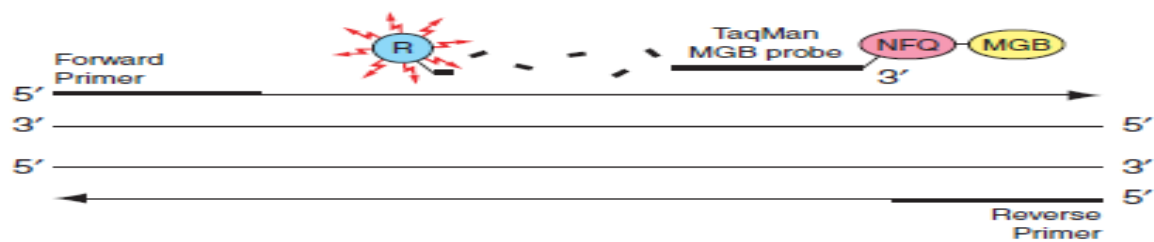
A. Polymérisation: un reporter (R) et un quencher (Q) sont liés aux extrémités 5' et 3' d'une sonde TaqMan.



B. Elongation: lorsque le reporter et le quencher sont liés à la sonde, l'émission du reporter est désactivée.



C. Clivage : à chaque cycle d'extension, la Taq polymérase clive le reporter de la sonde.



D. Polymérisation achevée : une fois séparé du quencher, le reporter émet une fluorescence caractéristique.

Figure 4 : Schéma explicatif du principe de la sonde Taq Man (Guide Quantifiler Kits, User Manual, 2012).

IV.3-Amplification par PCR

La PCR est une réaction de polymérisation en chaîne qui permet d'amplifier une région spécifique de l'ADN par une ADN polymérase thermostable provenant de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Taq) qui a été isolée à partir de sources thermales et sa polymérase possède la propriété de résister à plusieurs expositions successives à hautes températures, cette technique a révolutionné tous les domaines de la biologie moléculaire, y compris la génétique forensique (Goodwin et al, 2007).

L'amplification par PCR se déroule dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN (ADN matriciel), la Taq polymérase, le cofacteur Mg^{2+} , les amorces et les quatre désoxyribo Nucléosides Tri-Phosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon. Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température réitérés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur. Cet appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de température (Ameziane et al, 2005).

Les kits commerciaux utilisés au laboratoire de génétique forensique sont capables d'amplifier seize STRs simultanément ainsi que l'amélogénine, un marqueur permettant de déterminer le sexe d'un individu, on parle alors de PCR multiplex.

IV.3.1-Les étapes de la PCR

Les trois étapes constituant un cycle de PCR sont les suivantes:

- la dénaturation à 95 °C : qui permet une dissociation complète des deux brins d'ADN ;
- l'hybridation à une température qui sera définie selon la nature des amorces: cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces/matrice est réalisé ;
- l'élongation à 72 °C : qui correspond à la température de « travail » de l'ADN polymérase qui va synthétiser les brins complémentaires d'ADN à partir des extrémités 3'OH libres des amorces hybridées.

Les températures de dénaturation et de polymérisation sont fixes ; seule la température d'hybridation (Tm) pourra être modifiée pour chaque nouvelle PCR en fonction de la composition en nucléotides des amorces (Iglesias M, 2009).

IV.3.2-Les Inhibiteurs de la PCR

Le processus d'amplification par PCR peut être affecté ou empêché par des inhibiteurs tels que la mélanine, la myoglobine, les ions calcium, ainsi que les colorants des vêtements. Ces inhibiteurs peuvent soit dégrader l'ADN cible, soit empêcher la lyse cellulaire lors de l'extraction d'ADN, ou bien bloquer directement l'activité de l'ADN polymérase (Bessetti 2007).

IV.4-Séparation et détection des produits de la PCR par électrophorèse capillaire

Le produit d'une PCR est constitué d'un ou de plusieurs fragments d'ADN (la ou les séquences d'intérêt). La détection et l'analyse des produits peuvent être très rapidement réalisées par électrophorèse sur des systèmes automatisés, on utilise aujourd'hui un analyseur de fragment d'ADN (appareil d'analyse génétique ABI® Genetic Analyser 3130, par exemple). Cet appareil utilise le principe de l'électrophorèse capillaire. La détection des fragments est réalisée par une diode laser. Cela n'est possible que si la PCR est réalisée avec des amorces couplées à des fluorochromes (Iglesias M, 2009).

Le capillaire est un tube en verre très fin de 50 μm de diamètre et de 36 cm de long, recouvert d'un polyamide opaque sauf dans la région de détection, rempli de solution visqueuse d'un polymère POP4 (Performance Optimized Polymere 4), qui agit comme un gel en créant un environnement de tamisage pour des molécules d'ADN. Après l'application d'un courant électrique, les fragments d'ADN migrent dans les capillaires remplis de polymère, de la cathode vers l'anode selon une vitesse inversement proportionnelle à leurs taille.

Le séquenceur est relié à un ordinateur auquel sont transférées les données brutes de l'analyse électrophorétique, puis grâce un logiciel performant appelé « Gene Mapper » les données de l'électrophorèse capillaire son analysées et validées pour obtenir à la fin un profil génétique (Butler 2011).

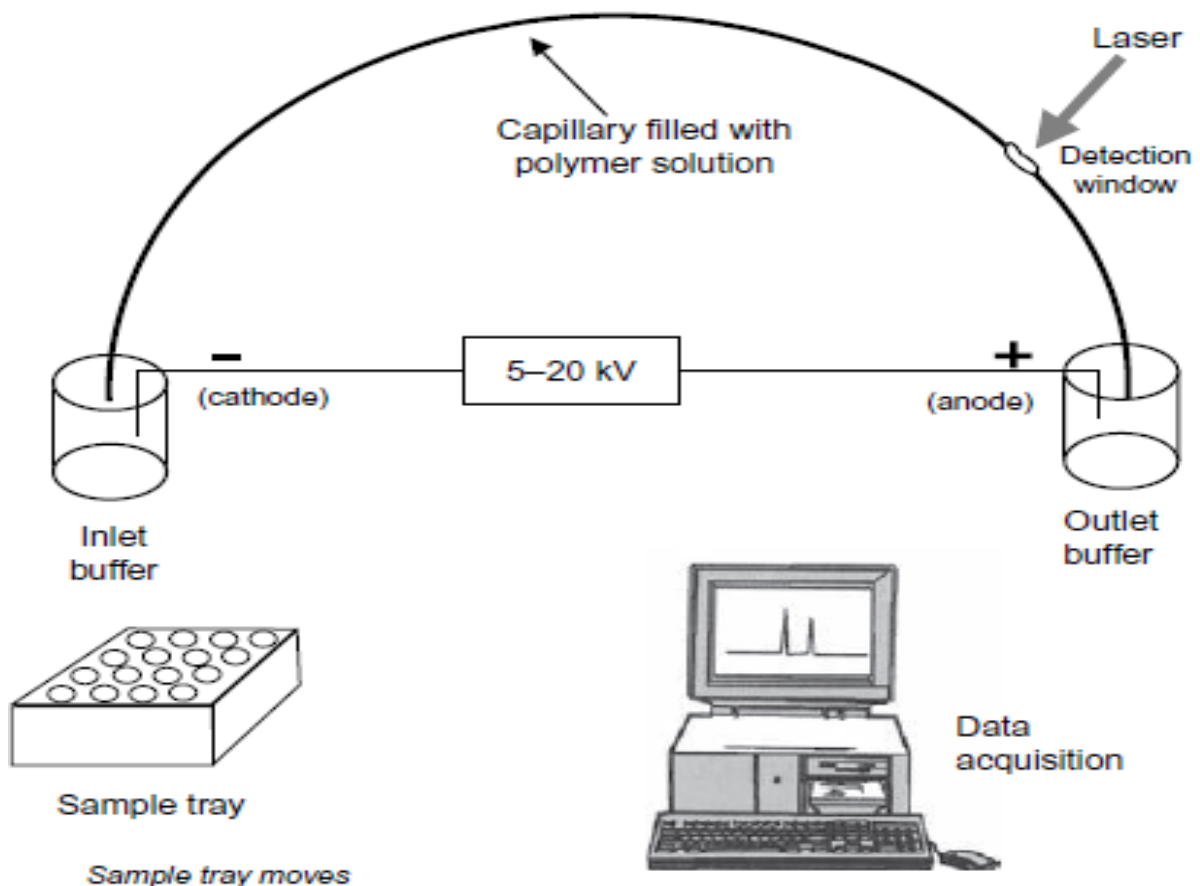


Figure 5 : Schéma d'instruments de l'électrophorèse capillaire utilisé pour l'analyse de l'ADN (Butler 2011)

IV.5-Etablissement des profils génétiques

Les profils génétiques correspondant aux produits PCR analysés par électrophorèse capillaire s'affichent sous forme d'électrophorégramme dans lequel les différents allèles sont représentés sous forme de pics, de tailles et de hauteurs proportionnelles à la quantité du produit de la PCR détecté.

Au-dessus de chaque série de pics, le nom des 16 marqueurs étudiés est mentionné. Pour chaque marqueur, il existe deux formes alléliques l'une d'origine paternelle, l'autre d'origine maternelle, ainsi, pour un marqueur donné, 1 à 2 pic peuvent être détectés. Dans le cas où l'on détecte un seul pic, on est en présence d'un sujet homozygote pour ce marqueur, autrement dit, cet individu a hérité le même allèle avec le même nombre de répétition du STR de ses deux parents. Par contre, la présence de deux pics révèle une hétérozygotie pour le marqueur en question, c'est-à-dire le sujet est porteurs de deux allèles avec un nombre différents de répétitions hérité de ses parents.

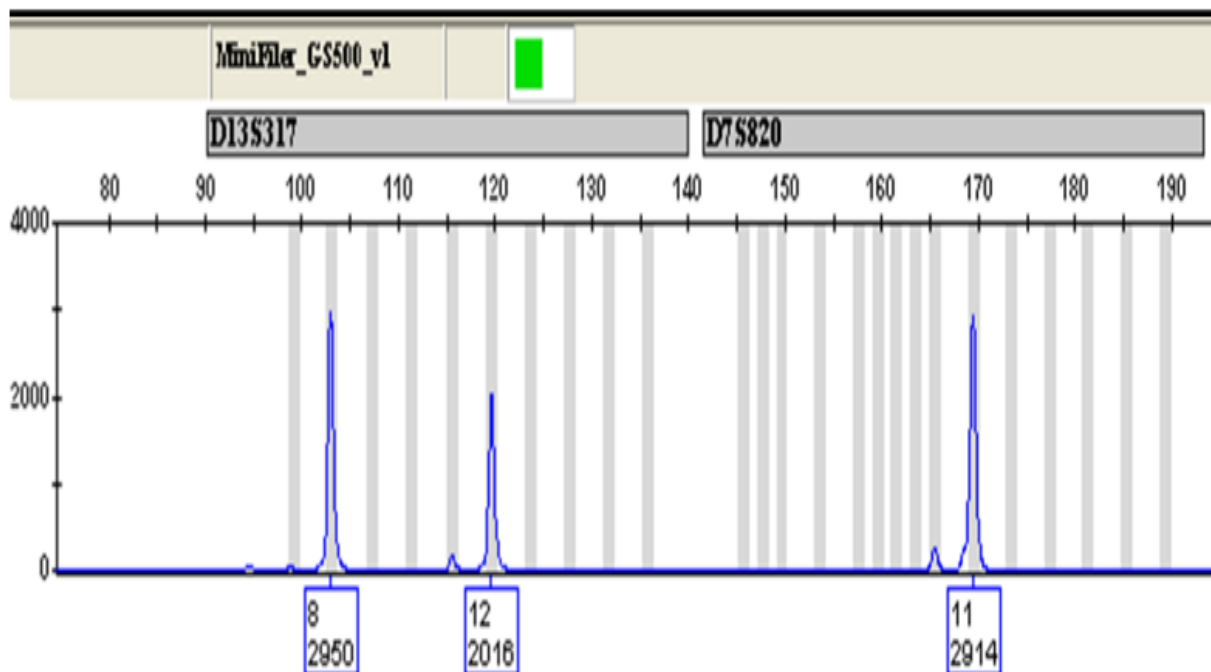


Figure 6: Profilage des STRs autosomes sur deux loci D13S71 et D7S820. (Anonyme2).

Chapitre II :

Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'identification génétique, au sein de l'institut national de criminalistique et de criminologie de la gendarmerie nationale à Bouchaoui, Alger pendant une période de trois mois.

L'objectif de ce travail est d'établir des profils génétiques à partir des traces de contact sur différents supports tels que : mégots de cigarettes, chewing-gums, et chemises en tissu, en utilisant le protocole d'extraction Chelex «Étude du rendement ».

I-Préparation des échantillons sur différents supports

I.1-Matériel :

- Matériels biologiques (Traces de contacts) sur :
 - Mégots de cigarettes ;
 - Chemises en tissu ;
 - Chewing-gums.
- Prélèvement biologique de référence sur: écouvillons stériles.

I.2- Méthodes :

Dans cette étude 3 types de supports ont été utilisés et le dépôt du matériel biologique (traces de contact) a été effectué par trois participants volontaires après avoir signé un consentement.

Durant la préparation des supports qui portent le matériel biologique une attention particulière a été prise en considération pour éviter tout type de cross contamination afin d'atteindre cet objectif ; des gants, des masques et des charlottes stériles ont été utilisés durant toute la manipulation.

I.2.1-Préparation des mégots

Chaque participant a déposé volontairement des traces de contact sur 5 mégots de cigarettes avec un intervalle de temps de 30 min entre chaque déposition, tout en mettant le mégot de cigarette entre les lèvres du donneur pendant 10 min ; par la suite, on les a laissés sécher à une température ambiante et on les a emballés séparément dans des enveloppes en papier portants un numéro identifiant de chaque mégot et un code identifiant de chaque participant et conservés à une température de 4°C jusqu'à l'acheminement au laboratoire.

I.2.2-Préparation des chewing-gums

Chaque participant a mâché 5 chewing-gums pendant 5 à 10 min jusqu'à ce que tous les colorants soient dispersés avec un intervalle de temps de 15 min entre chaque chewing-gum ; par la suite, on les a laissés sécher à une température ambiante et on les a emballés séparément dans des enveloppes en plastique portant un numéro identifiant de chaque Chewing-gum ,et un code identifiant de chaque participant et conservés à une température de -20°C jusqu'à l'acheminement au laboratoire.

I.2.3-Préparation des chemises

Chaque participant a porté une chemise en tissu pendant 8 heures au minimum, ensuite chaque chemise de chaque participant a été emballée séparément dans une enveloppe en papier portant un numéro identifiant de chaque chemise et un code identifiant de chaque participant et conservée à température ambiante jusqu'à l'acheminement au laboratoire.

I.2.4-Préparation des Prélèvements de référence

Chaque participant a mis l'écouvillon dans sa bouche et écouvillonné pendant 5min, en suite chaque écouvillon portant un numéro identifiant et un code identifiant de chaque participant (voir Tableau II) a été conservé à une température de 4°C jusqu'à l'acheminement au laboratoire.

Tableau II : Codification des supports

	Mégots de cigarettes	Chewing-gums	Chemises	Prélèvements de référence
Participant N° 1	P1M1 P1M2 P1M3 P1M4 P1M5	P1S1 P1S2 P1S3 P1S4 P1S5	P1C1 P1C2 P1C3 P1C4 P1C5	P1R1
Participant N° 2	P2M1 P2M2 P2M3 P2M4 P2M5	P2S1 P2S2 P2S3 P2S4 P2S5	P2C1 P2C2 P2C3 P2C4 P2C5	P2R1
Participant N° 3	P3M1 P3M2 P3M3 P3M4 P3M5	P3S1 P3S2 P3S3 P3S4 P3S5	P3C1 P3C2 P3C3 P3C4 P3C5	P3R1

II-Examen et mise en tube

II.1-Matériel

II.1.1-Matériel et équipements :

Les équipements de mise en tube sont répertoriés en annexe 1.

II.1.2-Solutions et réactifs :

Solution RBS (25 MD, chemical products R.Bossghraef, Bruxcel Belgique).

II.2- Méthodes:

Avant de préparer les échantillons à partir des différents supports, le lieu et le matériel du travail ont été nettoyés et décontaminés conformément à la procédure établie par le laboratoire. A cet effet la solution RBS a été utilisée pour le nettoyage des paillasse et tout le matériel consommable a été décontaminé aux UV pendant 15 minutes avant chaque utilisation par le Cross-linker.

Avant de procéder aux prélèvements d'échantillons de chaque support, ces derniers ont été documentés et photographiés. Le prélèvement des échantillons a été effectué en traitant chaque support séparément. Les prélèvements de référence ont été traités en dernier lieu afin d'éviter toute contamination croisée.

- La moitié longitudinale de chaque mégot de cigarette a été découpée dans une boîte de pétri à l'aide d'un bistouri jetable et mise directement à l'aide d'une pince dans un tube eppendorf de 2 ml stérile et pré-identifié.
- Un morceau de 2cm² de chaque chewing-gum a été découpé dans une boîte de pétri à l'aide d'un bistouri jetable et mise directement à l'aide d'une pince dans un tube eppendorf de 2 ml pré identifié.

- Un morceau de 1cm² a été découpé à partir de 5 endroits différents du col de chaque chemise. Les mêmes endroits ciblés sont écouvillonnés à l'aide d'un écouvillon stérile après l'avoir imbibé par l'eau ultra-pure. Puis l'écouvillon et le morceau de tissu prélevés du même endroit choisi ont été mis directement dans le même tube ependorf stérile de 2 ml correspondant.
- Les écouvillons portant les prélèvements de référence ont été mis directement dans leurs tubes ependorf de 2 ml correspondants (voir tableau III).

Tableau III : Séries d'extraction des échantillons prélevés de différents supports

	Série N° :01 (Mégots de cigarettes)	Série N° :02 (Chewing-gums)	Série N° :03 (Chemises)	Série N° :04 (Prélèvements de référence)
Participant N° 1	15 P1M1 15 P1M2 15 P1M3 15 P1M4 15 P1M5	15 P1S1 15 P1S2 15 P1S3 15 P1S4 15 P1S5	15 P1C1 15 P1C2 15 P1C3 15 P1C4 15 P1C5	15 P1R1
Participant N° 2	15 P2M1 15 P2M2 15 P2M3 15 P2M4 15 P2M5	15 P2S1 15 P2S2 15 P2S3 15 P2S4 15 P2S5	15 P2C1 15 P2C2 15 P2C3 15 P2C4 15 P2C5	15 P2R1
Participant N° 3	15 P3M1 15 P3M2 15 P3M3 15 P3M4 15 P3M5	15 P3S1 15 P3S2 15 P3S3 15 P3S4 15 P3S5	15 P3C1 15 P3C2 15 P3C3 15 P3C4 15 P3C5	15 P3R1

Les étapes précédentes ont été résumées dans la figure 7:

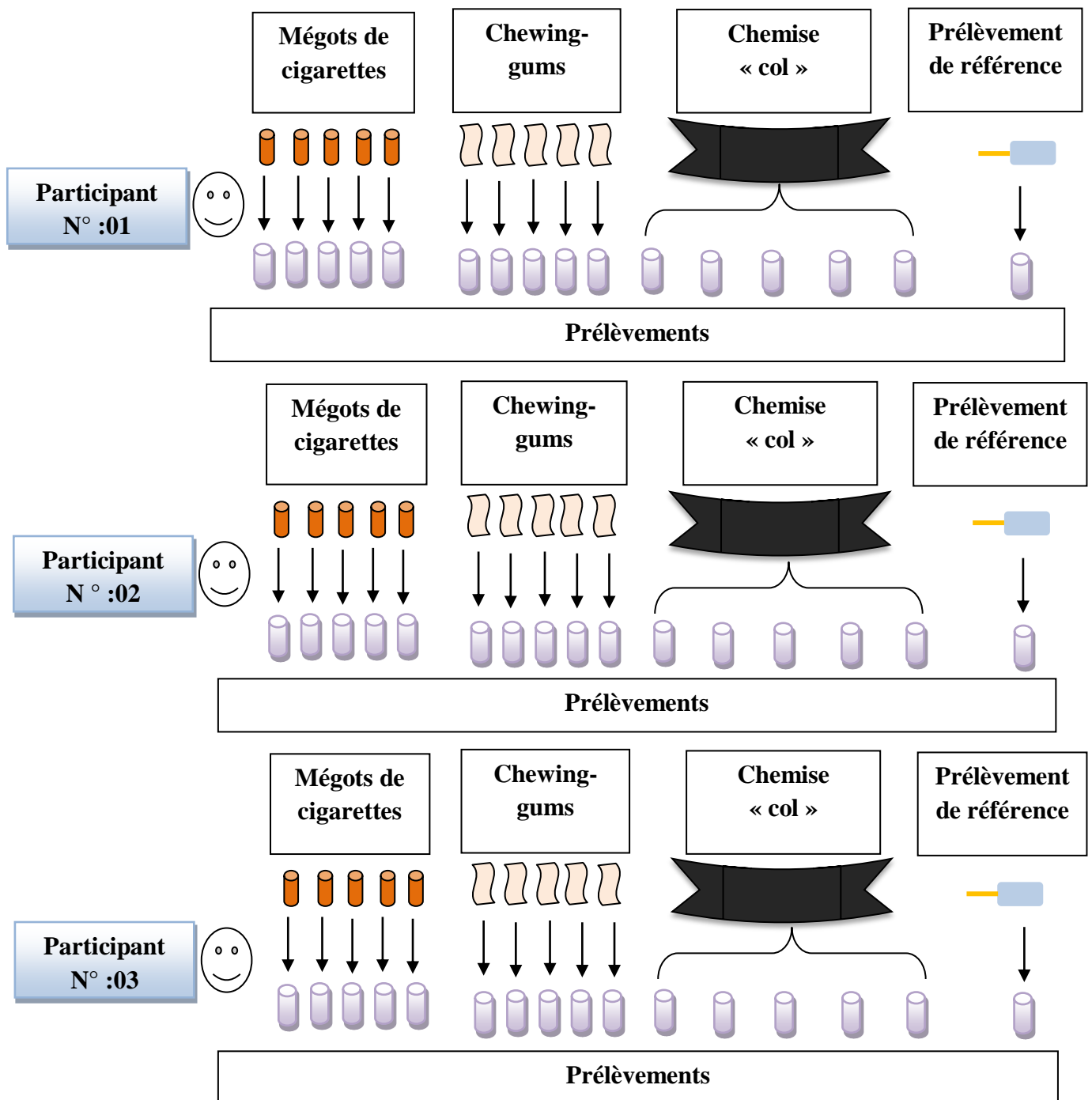


Figure 7: Préparation des échantillons (original 2015)

III-Extraction d'ADN nucléaire

III.1-Matériel

III.1.1-Matériel et équipements :

Les équipements d'extraction d'ADN nucléaire sont répertoriés en annexe 2.

III.1.2-Réactifs et solutions :

*Chelex 5% (Chelex 100 SEGMA, France) ;

*Protéinase K (Unité/mg 20, Germany) ;

*Eau ultra pure (produit par le système MiliQ-system Adventage millipore, France)

III.2-Méthodes :

Avant de procéder à l'extraction, les échantillons prélevés de chaque support ont été répertoriés dans des séries d'extraction selon le type de support. Un tube eppendorf de 2 ml vide a été réservé pour le témoin négatif de chaque série d'extraction afin de repérer toute source de contamination durant la procédure. Le témoin négatif a subi les mêmes traitements qu'un échantillon biologique, mais il ne contient que les réactifs et les solutions utilisées pour l'extraction.

III.2.1-L'étape de pré-lyse

- Passer au vortex le Chelex 5% avant chaque utilisation pendant 5 secondes;
- Ajouter 400µl du Chelex 5% à l'aide d'une pipette eppendorf;
- Ajouter 20µl du PK à l'aide d'une pipette eppendorf.

III.2.2-L'étape de lyse et purification

- Mélanger les tubes pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex afin d'homogénéiser les préparations, tout en veillant que le support est entièrement recouvert par la solution chelex;
- Incuber pendant 30minutes (minimum) à 56°C (+/- 3°C) au bain marie;
- Mélanger les tubes à l'aide d'un vortex pendant 30 secondes;
- Incuber les échantillons pendant 8minutes à 100°C au bain à sec;
- Mélanger les tubes à l'aide d'un vortex pendant 10secondes;
- Centrifuger pendant 3 minutes à une vitesse de 13000 rpm;

- Récupérer les surnagent (au minimum 150µl) à l'aide d'une micro pipette et le mettre dans un nouveau tube pré identifié de 1.5ml.

A la fin de l'extraction, 3µl de chaque échantillon ont été prélevés dans un tube pré-identifié de 0.6ml pour la quantification d'ADN extrait. Les échantillons d'ADN extrait sont été conservés à 4°C (+/- 3°C) au niveau du laboratoire.

IV-Quantification d'ADN

IV.1-Matériel

IV.1.1-Matériel et équipements :

Les équipements de quantification d'ADN sont répertoriés en annexe 3.

IV.1.2-Réactifs et solution :

-Kit de quantification "Quantifiler Human DNA" (Applied Biosystem, USA) contenant les réactifs suivant:

- Primers set: (Amorce) lies duSonde Taq man, plus control positif interne (IPC)
- ADN standard : ADN purifié à 200ng/µl
- Mélange réactionnel (Reaction mix) :Taq polymérase gold, dNTPs, Mg²⁺

-Eau ultra pure

IV.2-Méthodes:

Avant de procéder à la quantification, une série de 08 dilutions a été préparée à partir d'une solution mère d'ADN standard (200ng/µl). Cette série standard a été préparée selon les recommandations du producteur (voir annexe 4) et a pour but d'établir une courbe d'étalonnage, à partir de laquelle le logiciel SDS calcule la concentration d'ADN dans chaque échantillon.

La quantification des aliquotes prélevés de chaque échantillon d'ADN extraits et les aliquotes de chaque dilution de standard ont été lancés dans une plaque de 96 puits optique (voir tableau IV). Le dernier puits de la plaque 96 a été réservé pour le témoin négatif de la quantification (ne contenant que le master mix et l'eau ultra pure). Le témoin négatif a été traité de la même façon qu'un échantillon ADN.

Tableau IV : Plan de la plaque de quantification

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std.01	Std.01	15.P1M1	15.P2M4	15.P1C1	15.P2C4	15.P1S1	15.P2S4	15.P1R1			
B	Std.02	Std.02	15.P1M2	15.P2M5	15.P1C2	15.P2C5	15.P1S2	15.P2S5	15.P2R1			
C	Std.03	Std.03	15.P1M3	15.P3M1	15.P1C3	15.P3C1	15.P1S3	15.P3S1	15.P3R1			
D	Std.04	Std.04	15.P1M4	15.P3M2	15.P1C4	15.P3C2	15.P1S4	15.P3S2	Tex-15val-Ref			
E	Std.05	Std.05	15.P1M5	15.P3M3	15.P1C5	15.P3C3	15.P1S5	15.P3S3				
F	Std.06	Std.06	15.P2M1	15.P3M4	15.P2C1	15.P3C4	15.P2S1	15.P3S4				
G	Std.07	Std.07	15.P2M2	15.P3M5	15.P2C2	15.P3C5	15.P2S2	15.P3S5				TQ-
H	Std.08	Std.08	15.P2M3	Tex-15val-Meg	15.P2C3	Tex-15val-chem	15.P2S3	Tex-15val-Shw				

Après avoir préparé la gamme des standards, 12,5µl du mélange réactionnel et 10,5µl du primer ont été ajoutés à 2µl de chaque aliquote d'ADN extrait et à 2µl d'ADN standard de chaque dilution dans les puits correspondants.

Tableau V : Calcul du volume total du Master Mix

Volume PCR Reaction Mix pour 1 échantillon	Volume de Primer pour 1 échantillon	Volume total pour l'ensemble des échantillons (master Mix)
12,5µl	10,5µl	$(12,5\mu\text{l}) \times (n) + (10,5\mu\text{l}) \times (n) = V \text{ totale.}$ $(n) : \text{nombre totale des échantillons} = 69$ échantillons (52 échantillons y compris 04 blancs d'extraction) + (16 standards) + (01 contrôle négatif de quantification) $V \text{ total} = (12,5 \times 69) + (10,5 \times 69) = 862,5 + 724,5 = 1702\mu\text{l}$ du Master Mix

La quantification a été réalisée par le système RT-PCR 7500 fourni par la société Applied Biosystem (USA) selon les paramètres recommandés par le fournisseur (figure 8).

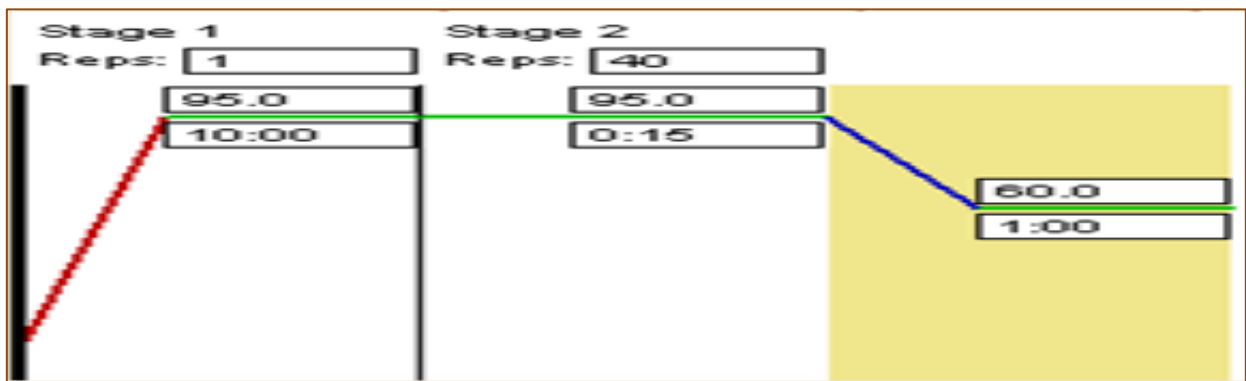


Figure 8 : Paramètres du système RT-PCR 7500

V-Amplification d'ADN

V.1-Matériel

V.1.1-Matériels et équipements :

Les équipements d'amplification d'ADN sont répertoriés en annexe 5.

V.1.2-Réactifs et solutions :

- kit identifier plus+ contenant :
 - Primers set : Amorces
 - ADN control: DNA 9947A (UK)
 - Mélange réactionnel (Reaction mix) :Taq polymerase gold, dNTPs, Cofacteur mg^{2+}
- Eau ultra-pure.

V.2-Méthodes :

Avant de procéder à l'amplification des échantillons, une étape de dilution des échantillons quantifiés a été réalisée afin d'avoir la concentration d'ADN optimum nécessaire pour établir un profil génétique complet et interprétable. Le rapport de dilution déterminant le volume d'eau ultra pure à ajouter à chaque échantillon est calculé automatiquement par le logiciel SDS pilotant le système RT PCR. Ce calcul est basé sur la concentration optimum (concentration finale : $0.1ng/\mu l$) d'ADN à amplifier recommandée par le producteur du kit ID+, la concentration initiale d'ADN calculée par le logiciel et le volume final d'ADN à amplifier ($10 \mu l$) recommandés par le fabricant du kit d'amplification utilisé (voir annexe 6).

A noter que les échantillons ayant une concentration d'ADN inférieure à celle recommandée par le fabricant du kit ID+ ont été amplifiés directement sans avoir été dilués.

L'amplification a été réalisée dans une série de tubes de 0.2 ml pré identifiés correspondant à chaque échantillon. Afin de tracer toute source de contamination par ADN étranger susceptible, un témoin négatif d'amplification, ne contenant que les réactifs et de l'eau ultra pure, a été inclus dans la série d'amplification. Le succès de la procédure d'amplification a été vérifié par l'amplification d'un ADN contrôle avec les échantillons dans la série d'amplification. Le témoin positif et le témoin négatif de l'amplification ont été traités de la même manière que les échantillons d'ADN extraits.

Tableau VI : Plan des échantillons d'amplification.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	15.P1M1	15.P2M4		15.P2C1		15.P1S1	15.P2S4		15.P1R1		AMP-15CLX	
B	15.P1M2	15.P2M5		15.P2C2		15.P1S2	15.P2S5		15.P2R1		AMP+15CLX	
C	15.P1M3	15.P3M1		15.P2C3		15.P1S3	15.P3S1		15.P3R1			
D	15.P1M4	15.P3M2		15.P2C4		15.P1S4	15.P3S2					
E	15.P1M5	15.P3M3		15.P2C5		15.P1S5	15.P3S3					
F	15.P2M1	15.P3M4				15.P2S1	15.P3S4					
G	15.P2M2	15.P3M5				15.P2S2	15.P3S5					
H	15.P2M3					15.P2S3						

Les échantillons d'ADN plus les contrôles ont été amplifiés par le kit d'amplification AmpFlSTR® Identifier PLUS® sur le système PCR GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems, UK) selon les recommandations du producteur dont 10 µl de chaque échantillon à amplifier, a été ajouté à 10.5µl du mélange réactionnel et à 5.5µl des primers.

Tableau VII : Calcul du volume total du Master Mix

Master Mix 15µl x (n)	Volume totale du Master Mix
Réaction mix+ Primer	$(10,5\mu\text{l Reaction mix} + 5,5\mu\text{l Primer set}) \times (n)$ n : nombre des échantillons= 40 (38 échantillons + 1 témoin positif + 1 témoin négatif de l'amplification) $V \text{ total} = (10,5 + 5,5) \times 40 = 640\mu\text{l}$

L'amplification est effectuée dans le thermocycleur ABI 9700 selon les conditions d'amplification recommandées par le fournisseur dans un volume réactionnel d'amplification de 25 µl .Le programme d'amplification est le suivant :

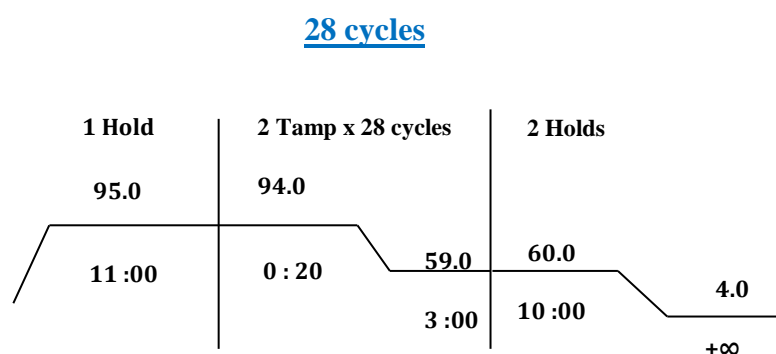


Figure 9 : Paramètres d'amplification par le kit Identifier plus

VI- Electrophorèse capillaire

VI.1-Matériel

VI.1.1-Matériel et équipements :

Les équipements d'électrophorèse capillaire sont répertoriés en annexe 7.

VI.1.2-Réactifs et solutions :

- Standard de taille (Gene Scan LIZ500 ABI, UK) ;
- Formamide ;
- Echèle allélique (Allelic leader).
- Blocchaufant
- Pop4 (ABI, USA) ;
- Buffer (Tompon EDTA (10x) ABI , USA ;
- Eau ultra-pure.

VI.2-Méthodes :

La séparation des produits amplifiés s'effectue en série dans une plaque de 96 puits contenant les échantillons test objets de cette étude. La série contient également, une échelle allélique dédiée pour chacun des 15 échantillons utilisés pour attribuer un numéro allélique (nombre de répétitions) de chaque fragment ADN amplifié ; et un standard de taille lancé avec chaque échantillon y compris l'échelle allélique pour assigner une taille (en paire de bases) pour chaque fragment d'ADN amplifié. Un control négatif ne contenant que le mélange réactionnel de la séparation est prévu pour tracer toute contamination susceptible par ADN étranger.

Tableau VIII : Plan des échantillons amplifiés à séparer par électrophorèse capillaire

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	15.P1M1	15.P2M4	15.P2C1	EAU	15.P1S1	15.P2S4	15.P1R1	EAU				
B	15.P1M2	15.P2M5	15.P2C2	EAU	15.P1S2	15.P2S5	15.P2R1	EAU				
C	15.P1M3	15.P3M1	15.P2C3	EAU	15.P1S3	15.P3S1	15.P3R1	EAU				
D	15.P1M4	15.P3M2	15.P2C4	EAU	15.P1S4	15.P3S2	AMP-15CLX	EAU				
E	15.P1M5	15.P3M3	15.P2C5	EAU	15.P1S5	15.P3S3	AMP+15CLX	EAU				
F	15.P2M1	15.P3M4	EAU	EAU	15.P2S1	15.P3S4	Post-15clx	EAU				
G	15.P2M2	15.P3M5	EAU	EAU	15.P2S2	15.P3S5	EAU	EAU				
H	15.P2M3	LAD	EAU	LAD	15.P2S3	LAD	EAU	LAD				

Avant de procéder à la séparation, 1 µl de chaque échantillon amplifié et 1 µl de chaque échelle allélique a été ajouté à 8.7 µl de formamide et 0.3µl de standard de taille.

Tableau IX : Préparation de la solution d'électrophorèse capillaire

Master Mix	Volume totale
{(8,7µl Formamide) x (n)} + {(0,3µl GS LIZ500) x (n)} → (n) nombres des échantillons = 45 (38 + 1 témoin négatif d'amplification + 1 témoin positif d'amplification + 1 T négatif de post amplification + 4 Allelic leader)	V totale = (8,7µl x 45) + (0.3µl x 45) = 391,5 + 13.5 = 405µl

Une fois les échantillons déposés dans les puits de la plaque de 96 puits, un choc thermique incluant une étape de chauffage à 95°C dans un bloc chauffant pendant 3 minutes suivi d'un refroidissement immédiat dans un cryobloc pendant 3 minutes est réalisé. Cette étape est importante pour garder les échantillons d'ADN amplifiés sous forme mono brins.

L'électrophorèse capillaire a été réalisée dans le système 3130xl Génétique Analyzer équipé de 16 capillaires à 36 cm de longueur. Les fragments d'ADN chargés négativement migrent du pôle négatif (cathode) vers le pôle positif (anode) selon leurs tailles, dans le polymère POP 4 remplies dans les capillaires sous l'effet d'un champ électrique appliqué à 15 kvolt, avec un temps d'injection de 5 secondes (Voir annexe 8).

Durant la séparation, la vitesse de migration des fragments d'ADN est inversement proportionnelle à la taille des molécules. Lors de leur passage par une fenêtre de détection, Les fragments d'ADN liés aux marqueurs fluorescents sont excités par un laser, ensuite la fluorescence émettée est captée par une camera CCD.

L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la taille des fragments d'ADN séparés.

A la fin du processus, les données brutes de la séparation sont collectées par le logiciel DATA collection (3130xl Data Collection v3.0 ABI, USA).

VII-Validation des profils génétiques

Les données brutes sont traitées par le logiciel Gene Mapper ID (v3.2 Applied Biosystems, USA) qui attribue à chaque fragment d'ADN d'intérêt (STR) :

- un numéro allélique en le comparant avec une échelle allélique.
- une taille en pb en comparaison avec un standard.

Les profils génétiques obtenus sont validés selon des paramètres fixés par le laboratoire après une étude de validation.

VIII-analyse statistique

Afin d'évaluer le rendement en ADN obtenu par la méthode d'extraction Chelex sur les échantillons de différents supports (mégots de cigarettes, chemises en tissu, chewing-gums), une comparaison des concentrations moyennes d'ADN a été établie en utilisant le test de Mann-Whitney ou l'ANOVA non paramétrique de Kruskal-Wallis. Les différences ont été jugées significatives à $p=0,05$ et mises en évidence par des tests post-hoc de comparaisons multiples. Les résultats sont exprimés sous forme $\bar{x} \pm ES$ (\bar{x} est la moyenne et ES, l'erreur standard sur la moyenne). L'analyse statistique a été établie sur Statistica 10.0 de Statsoft Inc, Tulsa, USA.

Chapitre III :

Résultats et Discussion

I-Résultats et discussion de la quantification

I.1-Courbe des standards :

La quantité d'ADN des échantillons inconnus est calculée à partir d'une série de dilution d'un ADN standard à concentration connue, la courbe standard est une droite générée par le logiciel donnant Ct (cycle de seuil) en fonction du log base 10 de la quantité de matrice initiale. Un résultat fiable est obtenu avec au moins six dilutions standards et un coefficient de détermination très proche de 1 (Stratagene, 2007).

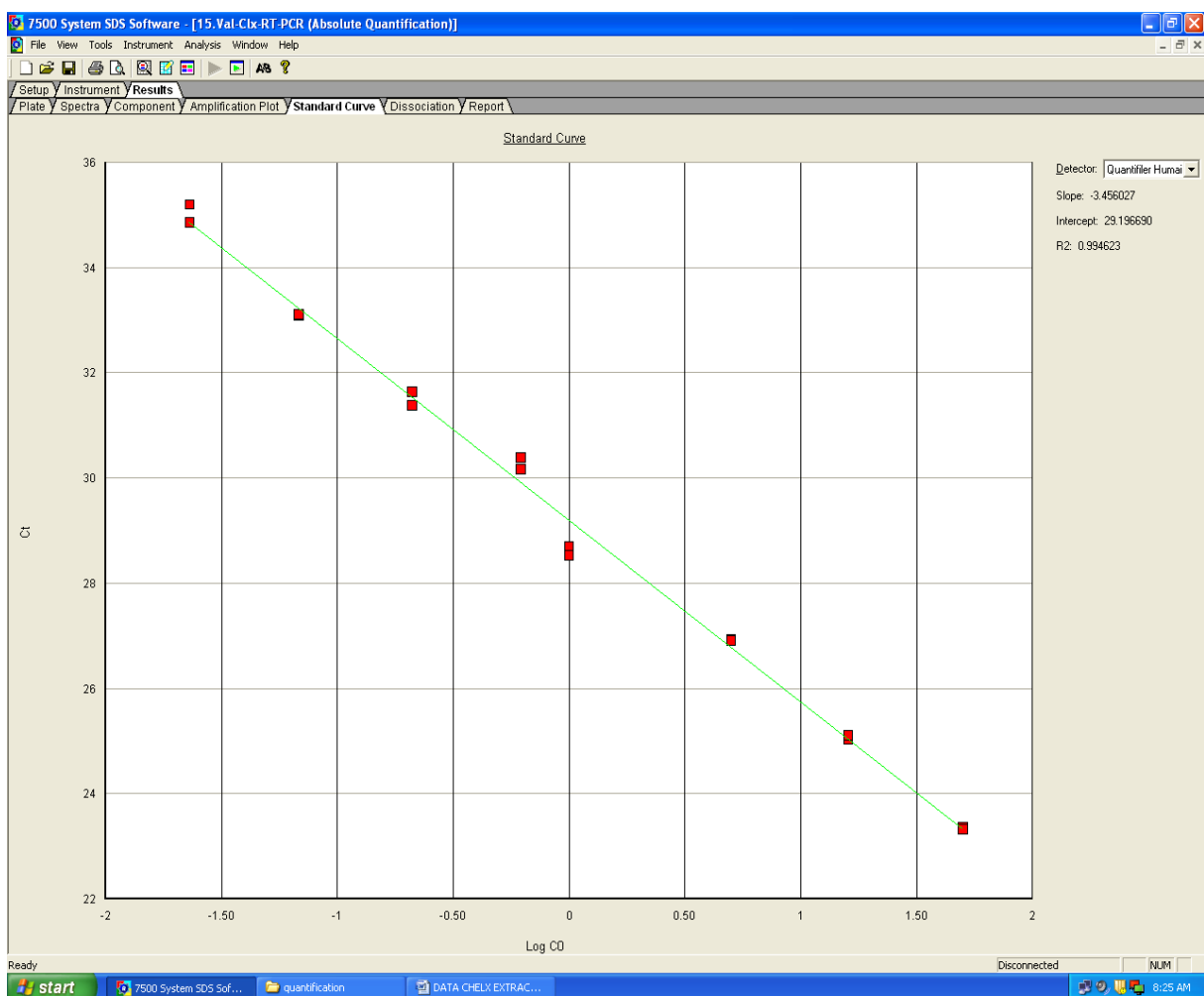


Figure 10 : Courbe des standards

La courbe standard générée à partir de cette quantification a été produite avec un coefficient de détermination $R^2=0.9946$, très proche de 1, signifiant des dilutions standard bien préparées et un RT-PCR fonctionnant correctement.

Après l'établissement de la courbe standard, et à l'aide du système RT-PCR 7500 ABI, les concentrations d'ADN qui correspondent aux échantillons analysés ont été obtenus (tableau X), comprenant 15 Mégots de cigarettes, 15 Chewing-gums et 15 morceaux de chemises, issus de l'extraction par la méthode Chelex.

Tableau X : Concentrations d'ADN obtenues à partir de trois Participants volontaires après dépôt des traces de contacts sur trois types de supports

	Mégots de cigarettes	Concentration d'ADN (ng/µl)	Chewing-gums	Concentration d'ADN (ng/µl)	Chemises	Concentration d'ADN (ng/µl)
Participant N° 1	P1M1	4,05	P1S1	1,28	P1C1	indéterminé
	P1M2	1,66	P1S2	1,01	P1C2	indéterminé
	P1M3	0,76	P1S3	1,81	P1C3	indéterminé
	P1M4	1,40	P1S4	1,49	P1C4	indéterminé
	P1M5	0,24	P1S5	1,58	P1C5	indéterminé
Participant N° 2	P2M1	1,89	P2S1	1,16	P2C1	0,05
	P2M2	0,62	P2S2	0,73	P2C2	0,02
	P2M3	0,77	P2S3	1,11	P2C3	0,03
	P2M4	1,53	P2S4	0,68	P2C4	0,03
	P2M5	0,48	P2S5	1,12	P2C5	0,06
Participant N° 3	P3M1	0,53	P3S1	1,59	P3C1	indéterminé
	P3M2	0,66	P3S2	1,04	P3C2	indéterminé
	P3M3	0,56	P3S3	0,93	P3C3	indéterminé
	P3M4	1,24	P3S4	0,98	P3C4	indéterminé
	P3M5	0,32	P3S5	0,56	P3C5	indéterminé

Ce tableau contenant les concentrations d'ADN obtenues à partir de trois Participants volontaires après dépôt des traces de contacts (matériels biologiques) sur trois types de supports (mégots de cigarettes, chewing-gums, chemises en tissu), de ce fait les concentrations d'ADN correspondant au participants N°1 varient entre 0,24 et 4,05(ng /µl) pour les mégots de cigarettes, et entre 1,01 et 1,81(ng /µl) pour les chewing-gums. D'autre part les concentrations d'ADN correspondant au participants N°2 varient entre 0,48 et 1,89(ng /µl) pour les mégots de cigarettes, entre 0,68 et 1,16(ng /µl) pour les chewing-gums, et entre 0,02 et 0,06(ng /µl) pour les morceaux de chemises. En ce qui concerne le participants N°3 leurs concentrations d'ADN varient entre 0,32 et 1,24(ng /µl) pour les mégots de cigarettes, et entre 0,56 et 1,59(ng /µl) pour les chewing-gums.

Puisque le processus d'amplification par PCR peut être affecté ou empêché par des inhibiteurs tels que les colorants des vêtements, les concentrations d'ADN qui concernent les échantillons de chemises du 1^{er} et 3^{ème} participants sont indéterminées. Ces inhibiteurs peuvent, soit empêcher la lyse cellulaire lors de l'extraction d'ADN, ou bien bloquer directement l'activité de l'ADN polymérase (Bessetti 2007).

Il y a lieu de signaler que toutes les quantités d'ADN récupérées à partir des échantillons de mégots de cigarettes et des chewing-gums (traces de salive) par la méthode d'extraction chelex sont des quantités amplifiables et supérieures à celle recommandée par le fabricant du kit d'amplification Identifier plus, qui exige d'utiliser 0,1 (ng/μl) d'ADN pour chaque échantillon, afin d'obtenir un profil d'ADN complet et interprétable. Tandis que les quantités d'ADN récupérées à partir des échantillons de chemise (traces de cellules épithéliales) sont inférieures à 0,1 (ng/μl), ceci est possible car la quantité d'ADN récupérée à partir des cellules épithéliales peut être extrêmement faible et difficile à quantifier (Goodwin et al,2007).

La récupération réussie de l'ADN à partir des traces de contact est fortement variable. Elle dépend apparemment d'une large gamme de facteurs, entre autres les caractéristiques du donneur, le support et l'environnement (Raymond et al, 2009). Alors que le principal objectif de cette étude est d'évaluer l'effet du donneur du matériel biologique et l'effet de support du matériel biologique sur le rendement d'ADN extrait par la technique d'extraction Chelex.

I.2-L'effet du participant sur le rendement d'ADN extrait par chelex.

Au cours de cette étude nous avons réalisés une comparaison des concentrations moyennes d'ADN par type de support pour les 3 participants, cette comparaison implique l'utilisation de l'ANOVA non paramétrique de Kruskal-Wallis (annexe 9).

Tableau XI: Concentrations moyennes d’ADN et degrés de signification correspondants aux échantillons de chaque support pour les 3 participants

	Mégots de cigarettes	Chewing-gums	Chemises
Participant 1	1.62±0.66	1.43±0.14	
Participant 2	1.06±0.28	0.96±0.10	0.038±0.016
Participant 3	0.66±0.15	1.02±0.17	
Degrés de signification	p=0.33	p=0.11	

D’après ce tableau les concentrations moyennes d’ADN qui correspondent aux mégots de cigarettes des 3 participants, varient entre 0.66±0.15 (ng/µl) et 1.62±0.66 (ng/µl), avec un degré de signification(p=0.33), d’autre part les concentrations moyennes d’ADN qui correspondent aux chewing-gums des 3 participants, varient entre 0.96±0.10 (ng/µl) et 1.43±0.14 (ng/µl), avec un degré de signification(p=0.11), en ce qui concerne les échantillons de chemises nous avons calculé la concentration moyenne d’ADN des 5 morceaux de chemise seulement pour le 2^{ème} participant et qui donnent une moyenne de 0.038±0.016 (ng/µl).

Alex Lowe et ces collaborateurs (2002), ont montré dans leur étude, qu’il y a une différence entre les individus dans leurs tendances à déposer l’ADN sur un élément, ce qui montre l’existence de bons donneurs du matériel biologique, et de mauvais donneurs. Sachant que le rendement en ADN varie selon le type et le nombre de cellules initiales dans l’échantillon (Guide QIAGEN, 2012).

I.2.1-Mégots de Cigarettes

La comparaison par ANOVA de Kruskal-Wallis des concentrations moyennes d’ADN des Mégots de Cigarettes appartenant aux 3 participants est apparue non significative (annexe 10) avec $H(2,n=15)=2,24$; $p=0,33$ ce qui signifie que les concentrations moyennes d’ADN des 3 participants sont comparables.

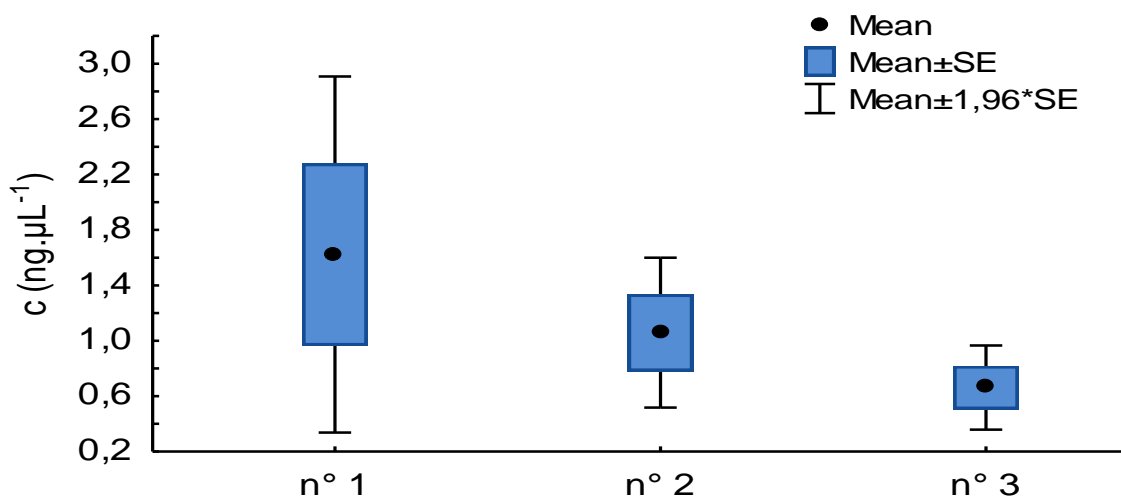


Figure 11: Comparaison des concentrations moyennes de l'ADN des mégots de cigarettes appartenant aux 3 participants

I.2.2-Chewing-gums

La comparaison par ANOVA de Kruskal-Wallis des concentrations moyennes d'ADN des chewing-gums appartenant aux 3 participants est apparue non significative (annexe 11), avec $H(2, n=15)=4,34; p=0,11$, ce qui signifie que les concentrations moyennes d'ADN des 3 participants sont comparables.

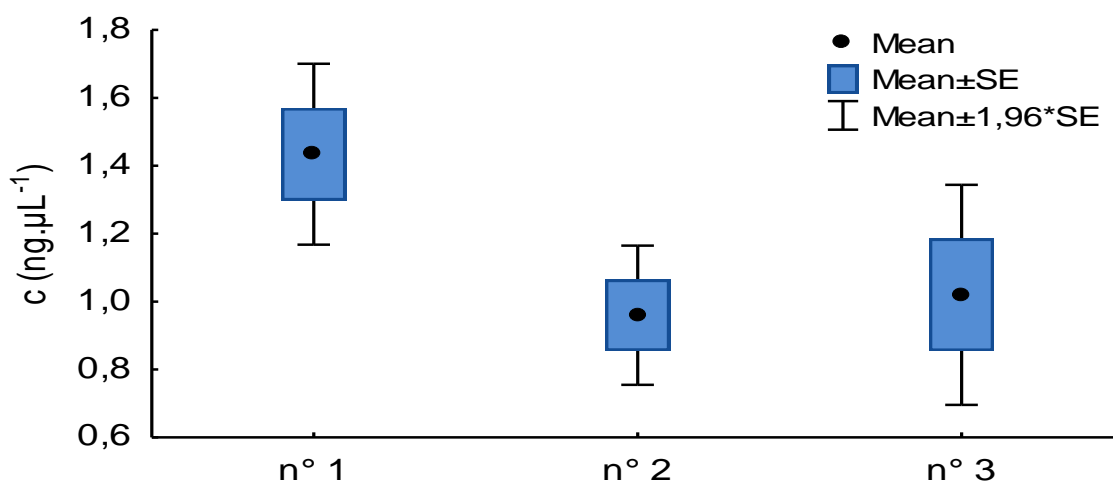


Figure 12 : Comparaison des concentrations moyennes de l'ADN des 5 chewing-gums appartenant aux 3 participants

Au vu des résultats obtenus, les quantités d'ADN récupérées à partir des échantillons de même support pour les 3 participants étaient très proches avec un degré de signification ($P > 0,05$), donc la particularité de participant n'a pas influencé sur le rendement d'ADN par chelex.

Nos résultats réfutent ceux obtenus par Lowe et al, cela peut être expliqué par les différentes méthodes d'extraction utilisées, car nous avons utilisé l'extraction chelex plutôt que Qiagen.

En général, le chelex a donné un bon rendement quantitatif d'ADN pour les 3 participants.

D'après ces résultats on peut utiliser le chelex pour extraire l'ADN de traces sur les différents donneurs qu'elle que soit leurs caractères biologiques (bon ou mauvais donneur).

I.3-L'effet de support sur le rendement d'ADN extrait par chelex.

Au cours de cette étude nous avons réalisé une comparaison des concentrations moyennes d'ADN par participant pour les 3 types de supports, cette comparaison implique l'utilisation de l'ANOVA non paramétrique de Kruskal-Wallis ou le test de Mann-Whitney.

Timothy J. Verdon et al (2013), ont constaté dans leur étude, que malgré leur utilisation de la même méthode d'extraction (chelex modifié) sur différents support tel que, bâche, contreplaqué et des feuilles de plastique, la quantité d'ADN obtenue à partir d'un support ne sera pas toujours comparable à celle obtenue d'un autre type de support.

I.3.1-Comparaison entre les supports du 1er Participant

La comparaison par test de Mann-Whitney des concentrations moyennes d'ADN des mégots de cigarettes et des chewing-gums pour le 1^{er} participant est apparue non significative (annexe 12), avec ($Z=-0,21$; $p=0,83$), ce qui signifie que les concentrations moyennes d'ADN obtenues à partir de ces supports sont comparables.

I.3.2-Comparaison entre les supports du 2ème Participant

La comparaison par ANOVA de Kruskal-Wallis des concentrations moyennes d'ADN de 3 supports pour le 2^{ème} participant est apparue très significative (annexe 13) avec, $H(2, n=15)=9,40$; $p=0,009$. La concentration en ADN de la chemise (0,038 ng/ μ l) est significativement plus basse que les deux autres concentrations (1,06 et 0,96 ng/ μ l).

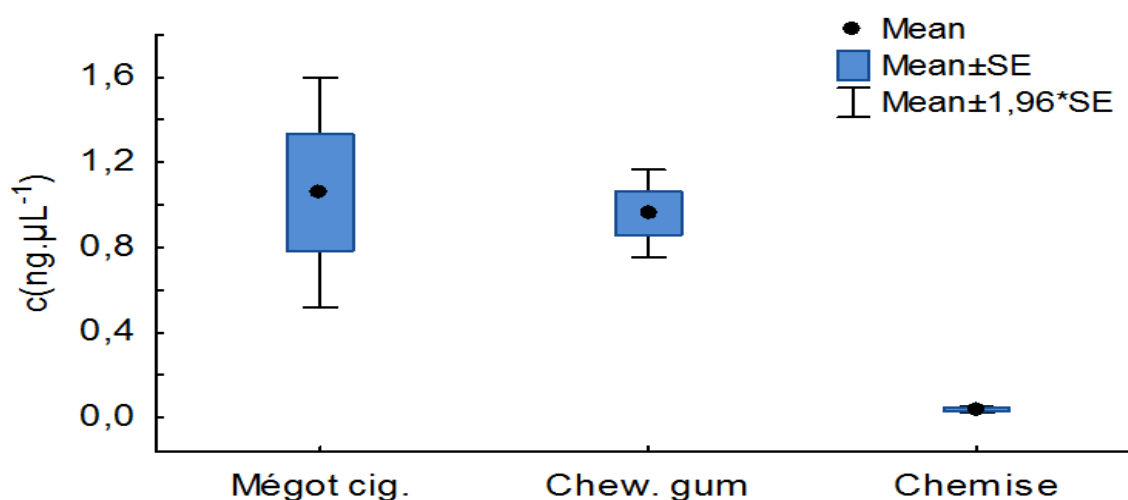


Figure 13 : Comparaison des concentrations moyennes de l'ADN des 3 supports appartenant au 2^{ème} participants

I.3.3-Comparaison entre les supports du 3ème Participant

La comparaison par test de Mann-Whitney des concentrations moyennes d'ADN des mégots de cigarettes et des chewing-gums pour le 3^{ème} participant est apparue non significative (annexe 14), avec ($Z=-1,36$; $p=0,17$), ce qui signifié que les concentrations moyennes d'ADN sont comparables.

Selon les résultats obtenus, le type de support n'a pas influé sur le rendement d'ADN par chelex au niveau du 1^{er} et 3^{ème} participant car les quantités d'ADN sont comparables, mais la comparaison des concentrations moyennes d'ADN de 3 supports pour le 2^{ème} participant elle a apparue très significative avec un degré de signification ($P < 0,05$), cela est expliqué par la concentration moyenne en ADN de la chemise ($0,038 \text{ ng}/\mu\text{l}$) qui est significativement plus basse que les deux autres concentrations moyenne en ADN ($1,06$ et $0,96 \text{ ng}/\mu\text{l}$) des mégots de cigarettes et des chewing-gums.

Nos résultats concordent avec les résultats obtenus par Timothy J. Verdon et al (2013), donc on constate que le type et la caractéristique de support joue un rôle dans le rendement d'ADN bien qu'on ait utilisé la même méthode d'extraction chelex.

II-Résultats et discussion des profils d'ADN

Après L'analyse des données brutes par le logiciel GeneMapper ID v3.2 (Applied Biosystems, USA), la fenêtre de graphe affiche des traces correspondants aux produits de PCR analysés par électrophorèse capillaire sous forme d'électrophorégramme où une série de pics est observée, représentant les différents allèles, de tailles et de hauteurs proportionnelles à la quantité du produit de la PCR détecté pour les échantillons de 3 Participants.

Le nom des 16 marqueurs étudiés est mentionné au-dessus de chaque série de pics. Chaque ligne de l'électrophorégramme est représentée par une couleur de fluorochrome différente (bleu, vert, noir, et rouge), les traits qui apparaissent en gris sont appelés (Bin) et correspondent à l'échelle allélique qui permet d'attribuer à chaque fragment d'ADN d'intérêt (STR) un numéro allélique.

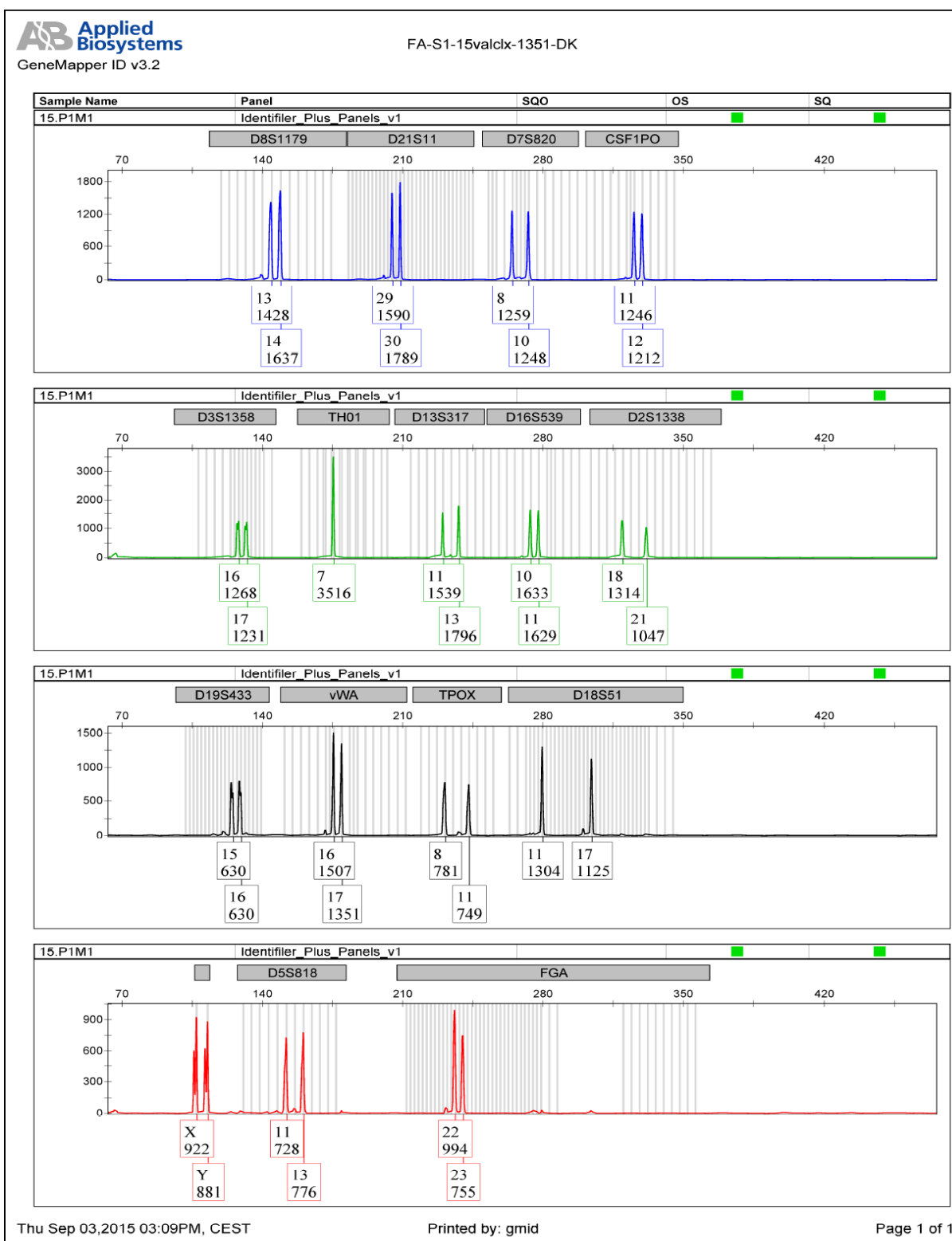


Figure 14 : Profil génétique complet obtenu à partir de l'échantillon P1M1 après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®.

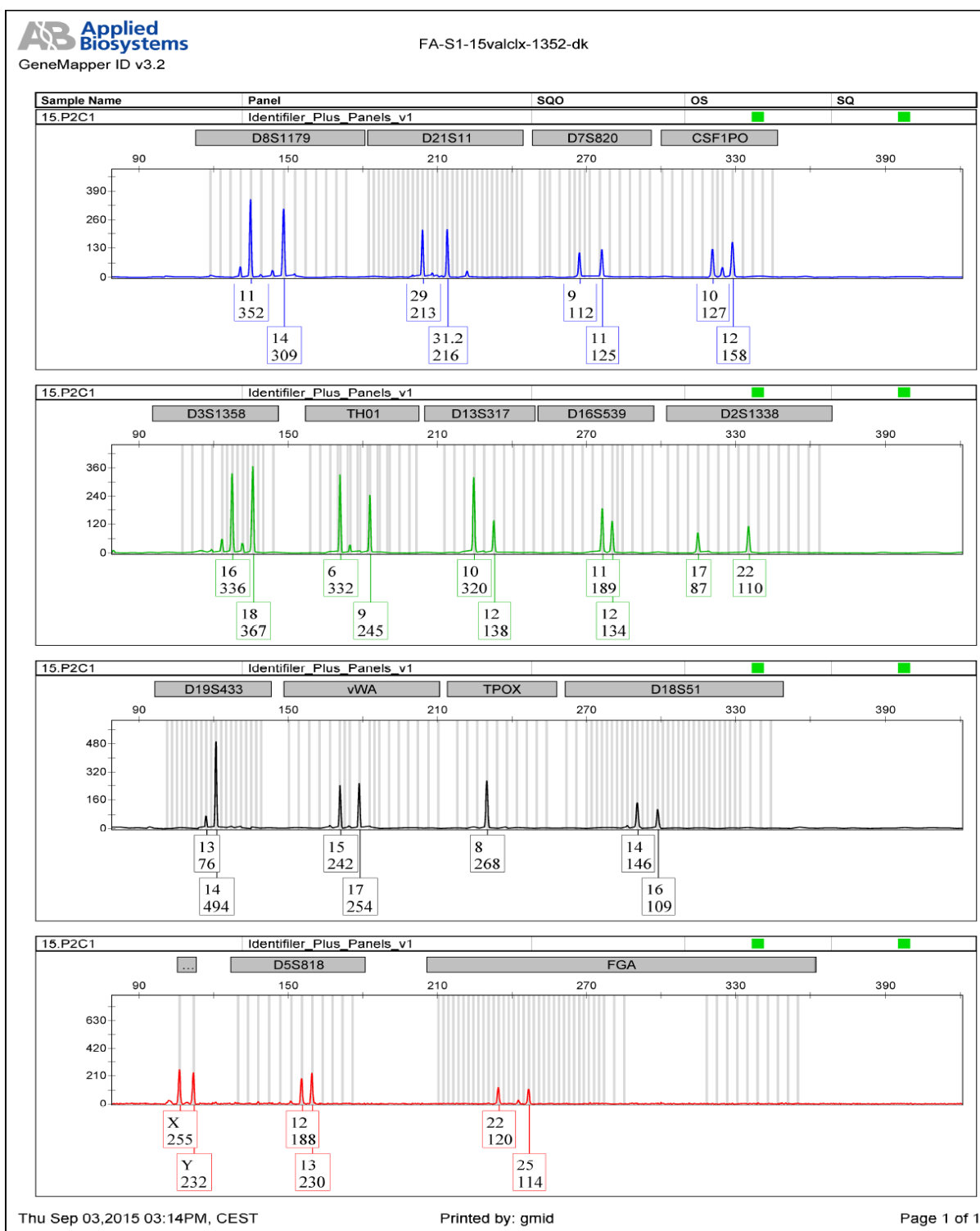


Figure 15 : Profil génétique complet obtenu à partir de l'échantillon P2C1 après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFlSTR® IdentifilerPLUS®.

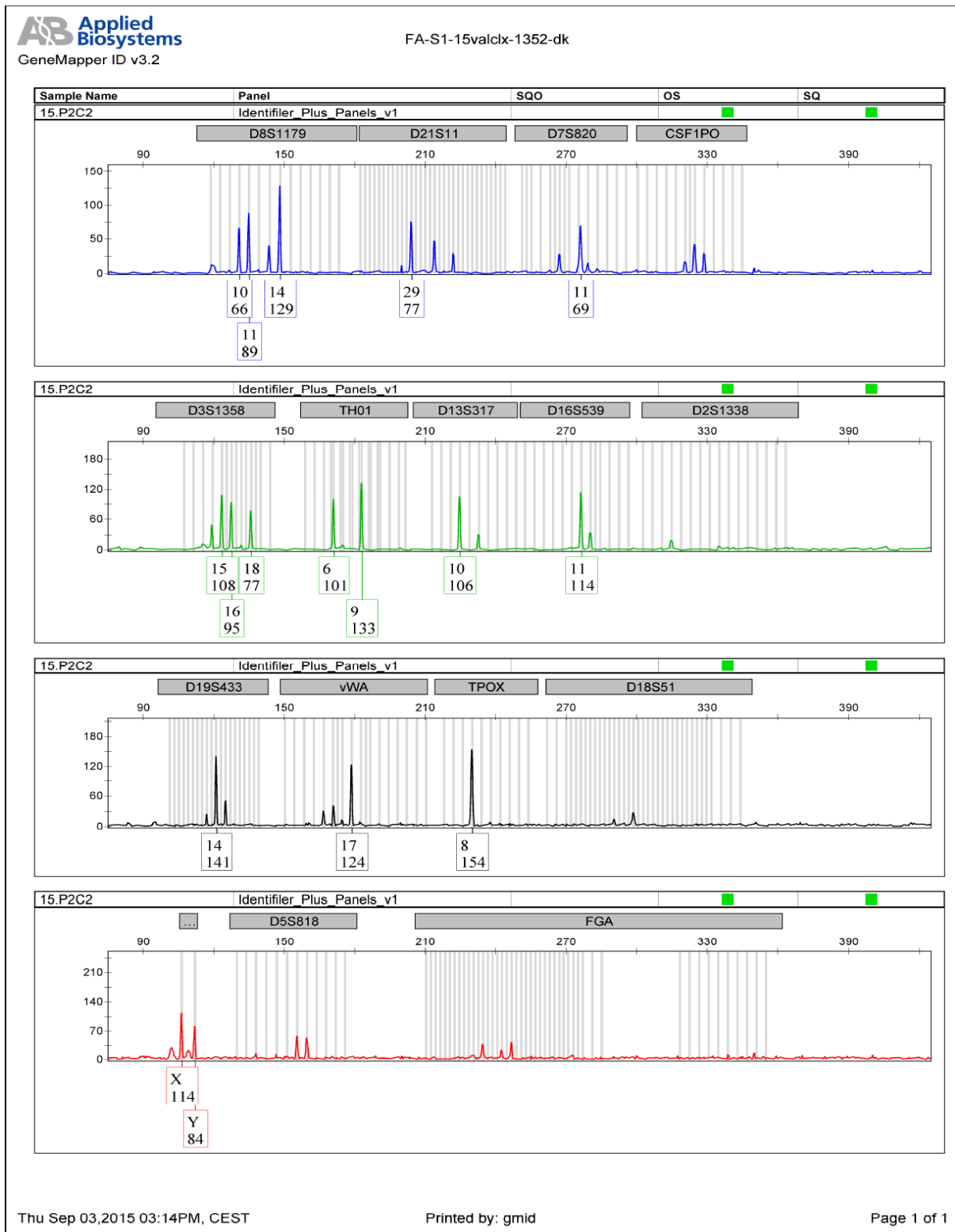


Figure 16 : Profil génétique partiel obtenu à partir de l'échantillon P2C2 après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®

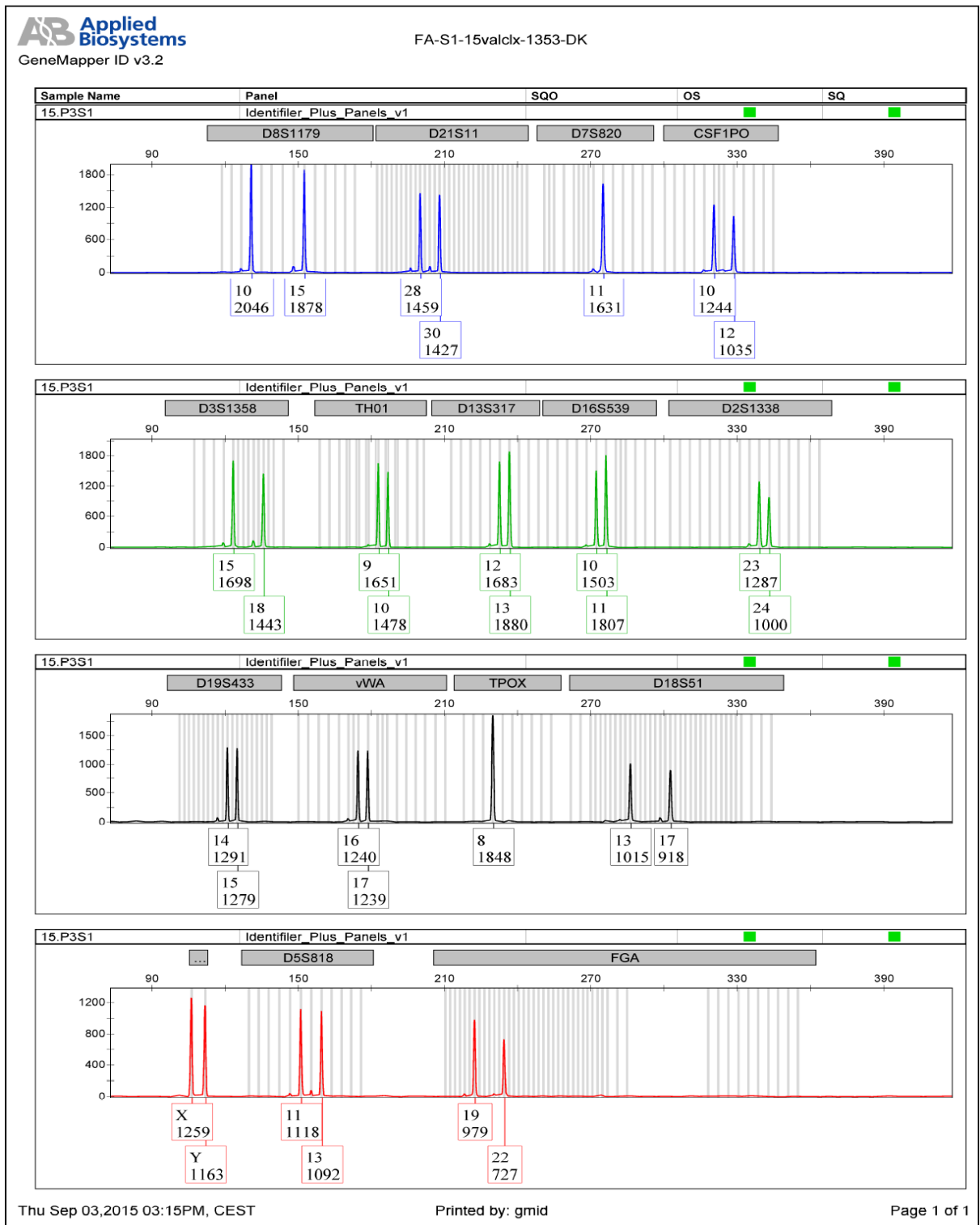


Figure 17 : Profil génétique complet obtenu à partir de l'échantillon P3S1 après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®.

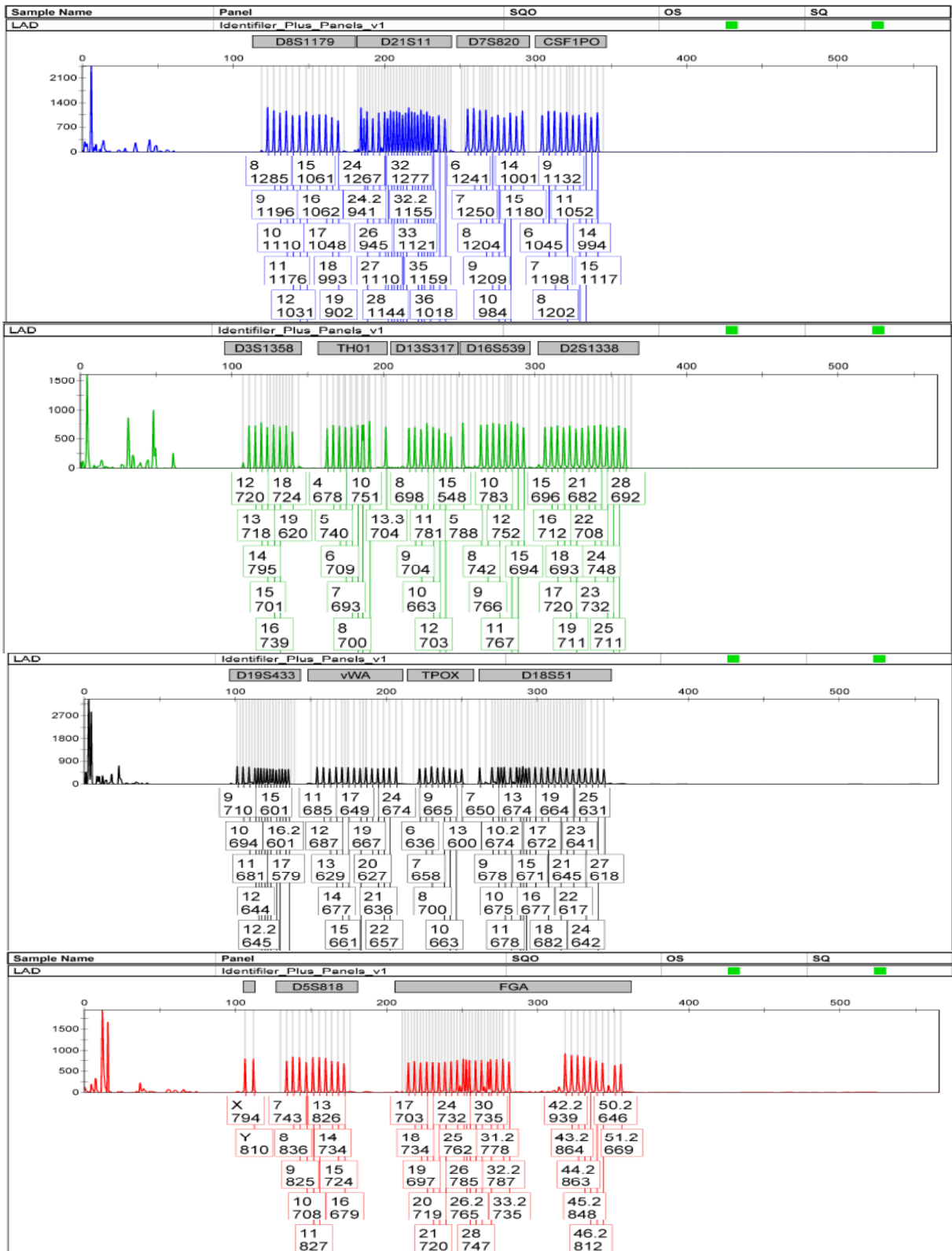


Figure 18 : profil génétique d'allelic ladder du kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®.

Les tableaux ci-dessous (XII, XIII et XIV) représentent les résultats de profils d'ADN obtenus à partir de différent supports et qui appartiennent aux 3 participants.

Tableau XII: Résultats des profils d'ADN à partir des mégots de cigarettes

	Participant 1	Participant 2	Participant 3
Nombres d'échantillons	5	5	5
Profils complets	5	5	5
Profils partiels	0	0	0
Pas de profils	0	0	0

Tableau XIII: Résultats des profils d'ADN à partir des morceaux de chemises

	Participant 1	Participant 2	Participant 3
Nombres d'échantillons		5	
Profils complets		3	
Profils partiels		2	
Pas de profils		0	

Tableau XIV: Résultats des profils d'ADN à partir des chewing-gums

	Participant 1	Participant 2	Participant 3
Nombres d'échantillons	5	5	5
Profils complets	5	5	5
Profils partiels	0	0	0
Pas de profils	0	0	0

Les mégots de cigarettes et les chewing-gums ont donné tous des profils génétiques complets exploitables et totalement interprétables pour les 3 participants donc à partir de 30 échantillons de traces de salive nous avons obtenus 30 profils complets cela montre un pourcentage de réussite de 100%. En revanche les échantillons de chemises concernant le 2^{ème} participant ont donné des profils moins bons, puisque 3 profils complets et 2 profils partiels ont été obtenus parmi les 5 échantillons de traces des cellules épithéliales ; cela indique un pourcentage de réussite de 60%.

En général notre méthode d'extraction chelex, nous a donné un bon rendement quantitatif et qualitatif d'ADN pour les traces de salive pour les différents types de supports, par rapport aux traces des cellules épithéliales.

Conclusion

Conclusion

L'identification génétique a révolutionné au cours des 20 dernières années, grâce à l'automatisation, la sensibilité et la rapidité des techniques qui permettent l'analyse de l'ADN et l'obtention des profils génétiques exploitables.

L'analyse d'ADN dans le domaine de génétique criminalistique débute principalement par une extraction d'ADN, à partir de traces biologiques localisées sur différents types de supports, récupérés sur une scène de crime.

Nous avons pu montrer dans notre travail, qu'à partir de traces de contact situées sur différents supports, tel que les mégots de cigarettes, les chewing-gums et les cols de chemises, nous pouvons extraire des quantités d'ADN suffisantes, afin d'obtenir des profils génétiques complets interprétables et exploitables.

Dans notre travail, nous avons choisi la méthode d'extraction d'ADN par la résine chelex 5% échangeuse d'ions, dans le but d'évaluer son rendement en matière de quantité et de qualité de l'ADN obtenu.

Nous avons également procédé à l'évaluation de l'effet du donneur du matériel biologique et de l'effet du support du matériel biologique sur le rendement d'ADN.

Les résultats obtenus montre que toutes les quantités d'ADN récupérées à partir des échantillons de mégots de cigarettes et des chewing-gums (traces de salive) sont des quantités amplifiables et supérieures à celle recommandée par le fabricant du kit d'amplification utilisé durant cette étude (Identifiler plus, ABI, USA) qui exige d'utiliser 0,1 ng/ μ l d'ADN pour chaque échantillon, afin d'obtenir un profil d'ADN complet et interprétable. Alors que les quantités d'ADN récupérées à partir des échantillons de chemise (traces de cellules épithéliales) sont inférieures à la norme déterminée par le fabricant du kit d'amplification, ceci est dû à la présence des inhibiteurs sur ce type de support.

Enfin, presque toutes les quantités d'ADN obtenues à partir du matériel biologique sur différents supports ont donné des profils génétiques complets et interprétables sauf ceux obtenus sur les chemises qui ont donné deux profils partiels contre trois profils complets

Il reste donc à perfectionner notre technique d'extraction d'ADN à partir d'autres types de supports afin d'élargir le champ d'action de cette méthode, ainsi que neutraliser l'effet des inhibiteurs afin d'obtenir de meilleurs résultats dans le domaine criminalistique.

Références

Bibliographiques

- 1- Ameziane, N., Bogard, M., Lamoril, J., (2005). Principe de biologie moléculaire en biologie clinique. Paris, Elsevier Masson, p.232-235.
- 2- Butler, J., (2005). Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. (2nd Ed.). Elsevier Academic Press, p3-15.
- 3- Butler, J., (2011). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. (1st Ed.). Elsevier Academic Press, p 32-33-142-143.
- 4- Butler, J.M., Hill, C.R., (2012). Biology and Genetics of New Autosomal STR Loci useful for Forensic DNA Analysis. Forensic Science.Rev, 24(1):15-26.
- 5- Blandin, P., (2004). Recherche d'ADN et Profils Génétiques, Institut de Médecine Légale STRASBOURG.Rev. Fr. Histotechnol, 17, n° 1, p 75 -78.
- 6- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet, 32(3):314–331.
- 7- Bessetti, J., (2007). An introduction to PCR inhibitors. Profiles in DNA, 10(1), 9–10.
- 8- Doutremepuich, C., Roca, I., Beaufils, M., Esponda, A., Said, G., (2010). Homicide Investigation: Anthropology and Genetic analysis for the crime scene in Forensic Genetic Research Progress Fabricio Gonzalez. Andrade Editor, Nova Publisher, p 73-90.
- 9- Doutremepuich, C., (2012). Les empreintes génétiques en pratique judiciaire. Bull. Acad. Natle Méd. 196, no 6, 1117-1130.
- 10- Dubourg, C., (2007). Polymerase Chain Reaction (PCR). [Page Web] Accès : http://www.med.univrennes1.fr/wkf/stock/RENNES20071031101610vdaavidPCR_2007.pdf
- 11- Elyse, P., Alain, H., (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. Reviews in Biology and Biotechnology. Vol.2, Canada .p2-11.
- 12- Frumkin, D., Wasserstrom, A., Davidson, A., Grafit, A., (2010). Authentication of forensic DNA Samples. Forensic Science International, 4: 95-103.
- 13- Geberth, V.J., (2006). Practical Homicide Investigation: Tactics, Procedures, and Forensic Techniques. Fourth edition, Published by CRC Press, p 544.
- 14- Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S., (2007). An Introduction to Forensic Genetics, Hoboken, New Jersey ; John Wiley & Sons Ltd, New Jersey, USA. p17-41.

- 15- Guide Quantifiler Kits, User Manual, (2012). Applied Biosystems, Life technologies, Pub. Nb 4344790, Rev. F, Foster City, CA 94404 USA. p 5-6.
- 16- Guide QIAGEN (2012). QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. Sample and Assay Technologies, Third Edition, www.qiagen.com
- 17- Iglesias M., (2009). Ajout d'un contrôle d'inhibition dans des kites STR multiplex. Laboratoire AURIGEN, Lausanne, p 7-8.
- 18- International HumanGenomeMapping Consortium, (2001). A physicalmap of the humangenome. Nature, 409(6822): p 934-41.
- 19- KARP, G., (2010). Biologie cellulaire et moléculaire : Concepts and experiments, (3^{ème} Ed), pp 410.
- 20- Keyser, C., Petrovki, E., (2006). Utilisation des SNP pour l'identification humaine. Spectra Analyse, n° 249, p 24–25.
- 21- Loistron, S., (2009). Les empreintes génétiques en médecine légale : réalisation, législation. Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes. p 18-27.
- 22- Lowe,A., Murray,C., Whitaker,J., Tully,G., Gill, P. The propensity of individuals to deposit DNA and secondarytransfer of lowlevel DNA fromindividuals to inert surfaces.Forensic Science International. Vol 129, p 25–34.
- 23- Mader, S., (2010). Biologie humain. (1^{er} Ed). Rue des Minimes 39, Bruxelles. p 378-379.
- 24- Makri, M.S., Tazir. M., (2006). Introduction à la génétique moléculaire. Université d'Alger, département de médecine. P 3.
- 25- Mansuet-Lupo, A., Rouger, P., Van Huffel, V., (2007). Les empreintes génétiques : état de l'art en 2007, techniques, applications et législation. Transfusion Clinique et Biologique, 14(3) :334–342.
- 26- Pascal, M., (2007). La PCR en temps réel, choix d'amorces et analyse des résultats. Laboratoire de pharmacologie-Toxicologie, INRA, Toulouse.
- 27- Pereira, C., (2014). The medico-legal importance and saliva criminalistics: systematization of its application in forensic science. Portuguese magazine of Stomatology, Dentistry and Maxillofacial Surgery.Vol 55, n° 1, P 3-6.

- 28- Petkovski,E (2006). Polymorphismes ponctuels de séquence et identification génétique. Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I. p 1-114.
- 29- Petricevic, S., Jo-Anne, B., Cockerton, S.L., (2006). DNA profiling of trace DNA recovered from bedding. *Forensic Science International*. Vol 159, p 21-26.
- 30- Rapley, R., Whitehouse, D., (2007). *Molecular Forensics*, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England, p 39-42.
- 31- Raymond J.J., Van Oorschot R.A., Gunn P.R., Walsh S.J., Roux C. Trace evidence characteristics of DNA: A preliminary investigation of the persistence of DNA at crime scenes. *Forensic Science International Genetics*. Vol 4, p 26-33.
- 32- Saiki R.R., Sharft S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of β globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis. *Science* 230. 1351-1354.
- 33- Stratagene Company (2007). *Introduction to Quantitative PCR Methods and Applications*, Guide 2007, Stragene, p11.
- 34- Tautz, D., (1993). Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences, *67*:21-8.
- 35- Timothy J. V., Mitchell R.J., Van Oorschot R. A., (2013). The influence of substrate on DNA transfer and extraction efficiency. *Forensic Science International Genetics*, Vol 7, P 167–175.
- 36- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science*: 291(5507):1304-51.
- 37- Wyman, A.R., White, R.A., (1980). Highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77(11) : 6754-8.

Annexes

Annexe 1 : Matériel et équipements d'examen et mise en tube

- | | |
|----------------------------|--------------------------------|
| -Appareille photo ; | -étiquettes; |
| -Bistouris stériles; | -pinces jetables en plastique |
| -Boîtes de pétri stériles; | -Cross-linker (BLX-E254 VILBER |
| -tubes eppendorf 2 ml | LOURMAT, France) |

Annexe 2 : Matériel et équipements de l'extraction d'ADN nucléaire

- | | |
|---|----------------|
| -Micropipettes et embouts de différents volume ; (eppendorf), | -Centrifugeuse |
| -Tubes eppendorf 2 ml ; 1.5 et 0.6ml. | -Bain marie ; |
| -Cross-likier | -Bain à sec ; |
| | -Vortex. |

Annexe 3 : Matériel et équipements de quantification d'ADN

- | | |
|---------------------------------------|--|
| - Micro pipette eppendorf, +embouts ; | - Système de PCR en Temp Real (7500 Real Time PCR, Applied Biosystem, USA) ; |
| - Tubes eppendorf 1.5 et 2ml ; | - Logiciel SDS (Vs1.2.3 Applied Biosystem, USA.) |
| - Plaque 96 well optique; | - Centrifugeuse ; |
| - Cross-linker | - Vortex. |

Annexe 4 : Préparation de la gamme standard

Standards	Facteur de dilution	Volume du standard	Concentration d'ADN (ng.µL-1)
STD 1	1/4	Tube1 :30µl eau ultra pure+ 10 µl (solution mère)	50
STD 2	1/3	Tube2 : 10 µl (Std1) +20µl eau ultra pure	16,7
STD 3	1/3	Tube3 : 10 µl (Std2) +20µl eau ultra pure	5,56
STD 4	1/3	Tube4 :10 µl (Std3) +20µl eau ultra pure	1,85
STD 5	1/3	Tube5 :10 µl (Std4) +20µl eau ultra pure	0,62
STD 6	1/3	Tube6 :10 µl (Std5) +20µl eau ultra pure	0,21
STD 7	1/3	Tube7 :10 µl (Std6) +20µl eau ultra pure	0,068
STD 8	1/3	Tube8 :10 µl (Std7) +20µl eau ultra pure	0,023

Annexe 5 : Matériels et équipements de l'amplification d'ADN

- Micro pipette eppendorf, embouts ;
- tubes eppendorf 1.5 et 0.2 ml ;
- Plaque 96 well.
- logiciel SDS
- Cross-linker
- Vortex;
- Centrifugeuse;
- Thermocycler 9700 (Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystem Sanghapoor);

Annexe 6: Dilution des échantillons quantifiés

position de l'échantillon dan la plaque 96 puit	Nom d'échantillon	Rapport de dilution AB 0.1 ng/µl	AB (10µl)	
			Volume d'eau	Volume d'échantillon
A3	15.P1M1	1 : 41	40	1
B3	15.P1M2	1 : 17	16	1
C3	15.P1M3	1 : 8	14	2
D3	15.P1M4	1 : 14	13	1
E3	15.P1M5	1 : 2	5	5
F3	15.P2M1	1: 19	18	1
G3	15.P2M2	1 : 6	10	2
H3	15.P2M3	1 : 8	14	2
A4	15.P2M4	1 : 15	14	1
B4	15.P2M5	1 : 5	8	2
C4	15.P3M1	1 : 5	8	2
D4	15.P3M2	1 : 7	12	2
E4	15.P3M3	1 : 6	10	2
F4	15.P3M4	1 : 12	11	1
G4	15.P3M5	1 : 3	8	4
F5	15.P2C1	1 : 0	0	10
G5	15.P2C2	1 : 0	0	10
H5	15.P2C3	1 : 0	0	10
A6	15.P2C4	1 : 0	0	10
B6	15.P2C5	1 : 1	0	10
A7	15.P1S1	1 : 13	12	1
B7	15.P1S2	1 : 10	9	1
C7	15.P1S3	1 : 18	17	1
D7	15.P1S4	1 : 15	14	1
E7	15.P1S5	1 : 16	15	1
F7	15.P2S1	1 : 12	11	1
G7	15.P2S2	1 : 7	12	2
H7	15.P2S3	1 : 11	10	1
A8	15.P2S4	1 : 7	12	2
B8	15.P2S5	1 : 11	10	1
C8	15.P3S1	1 : 16	15	1
D8	15.P3S2	1 : 10	9	1
E8	15.P3S3	1 : 9	16	2
F8	15.P3S4	1 : 10	9	1
G8	15.P3S5	1 : 6	10	2
A9	15.P1R1	1 : 64	63	1
B9	15.P2R1	1 : 80	79	1
C9	15.P3R1	1 : 26	25	1

Annexe 7 : Matériel et équipements d'électrophorèse capillaire

- Micro pipette eppendorf, embouts ;
- Tube eppendorf de 2ml ;
- Cryobloque ;
- Septa ;
- Plaque 96 puits.
- Cross-linker ;
- Vortex ;
- Séquenceur 3130 xl (Applied Biosystem, Japon)

Annexe 8 : Paramètre de séparation par électrophorèse capillaire

Run Module Editor

Run Module Description

Name:

Type:

Template:

Description:

Run Module Settings

Name	Value	Range
Oven_Temperature	60	18...65 Deg. C
Poly_Fill_Vol	6500	6500...38000 steps
Current_Stability	5.0	0...2000 uAmps
PreRun_Voltage	15.0	0...15 kVolts
Pre_Run_Time	180	1...1000 sec.
Injection_Voltage	1.2	1...15 kVolts
Injection_Time	18	1...600 sec.
Voltage_Number_Of_Steps	40	1...100 nk
Voltage_Step_Interval	15	1...60 sec
Data_Delay_Time	1	1...3600 sec.
Run_Voltage	15.0	0...15 kVolts
Run_Time	1500	300...14000 sec.

Ok Cancel

Annexe 9 : Description statistique des 35 échantillons a analysé

Breakdown Table of Descriptive Statistics (Données.sta)						
Smallest N for any variable: : 35						
Individu	Type	c(ADN) N	c(ADN) Mean	c(ADN) Std.Err.	c(ADN) Std.Dev.	c(ADN) Coef.Var.
n° 1	Cigar.	5	1,62	0,66	1,47	90,4
n° 2	Cigar.	5	1,06	0,28	0,62	58,3
n° 3	Cigar.	5	0,66	0,15	0,35	52,3
n° 1	Chew.G.	5	1,43	0,14	0,30	21,2
n° 2	Chew.G.	5	0,96	0,10	0,23	24,4
n° 3	Chew.G.	5	1,02	0,17	0,37	36,2
n° 1	Chem.	0				
n° 2	Chem.	5	0,038	0,007	0,016	43,2
n° 3	Chem.	0				

Annexe 10 : ANOVA de Kruskal-Wallis pour les échantillons des mégots de cigarettes appartenant aux 3 participants

Type=Mégot cig. Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; c(ADN) (Données.sta) Independent (grouping) variable: Individu Kruskal-Wallis test: H (2, N= 15) =2,240000 p =,3263				
Depend.: c(ADN)	Code	Valid N	Sum of Ranks	Mean Rank
Ind. n° 1	1	5	48,00	9,60
Ind. n° 2	2	5	44,00	8,80
Ind. n° 3	3	5	28,00	5,60

Annexe 11 : ANOVA de Kruskal-Wallis pour les échantillons des chewing-gums appartenant aux 3 participants

Type=Chew. gum Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; c(ADN) (Données.sta) Independent (grouping) variable: Individu Kruskal-Wallis test: H (2, N= 15) =4,340000 p =,1142				
Depend.: c(ADN)	Code	Valid N	Sum of Ranks	Mean Rank
Ind. n° 1	1	5	57,00	11,40
Ind. n° 2	2	5	32,00	6,40
Ind. n° 3	3	5	31,00	6,20

Annexe 12 : Test de Mann-Whitney pour les échantillons du 1^{er} participant

Individu=Ind. n° 1 Mann-Whitney U Test (Données.sta) By variable Type Marked tests are significant at p <,05000										
variable	Rank Sum Mégot cig.	Rank Sum Chew. gum	U	Z	p-value	Z adjusted	p-value e	Valid N Mégot cig.	Valid N Chew.	2*1 sided exact p
c(ADN)	26,00	29,00	11,00	-0,21	0,83	-0,21	0,83	5	5	0,84

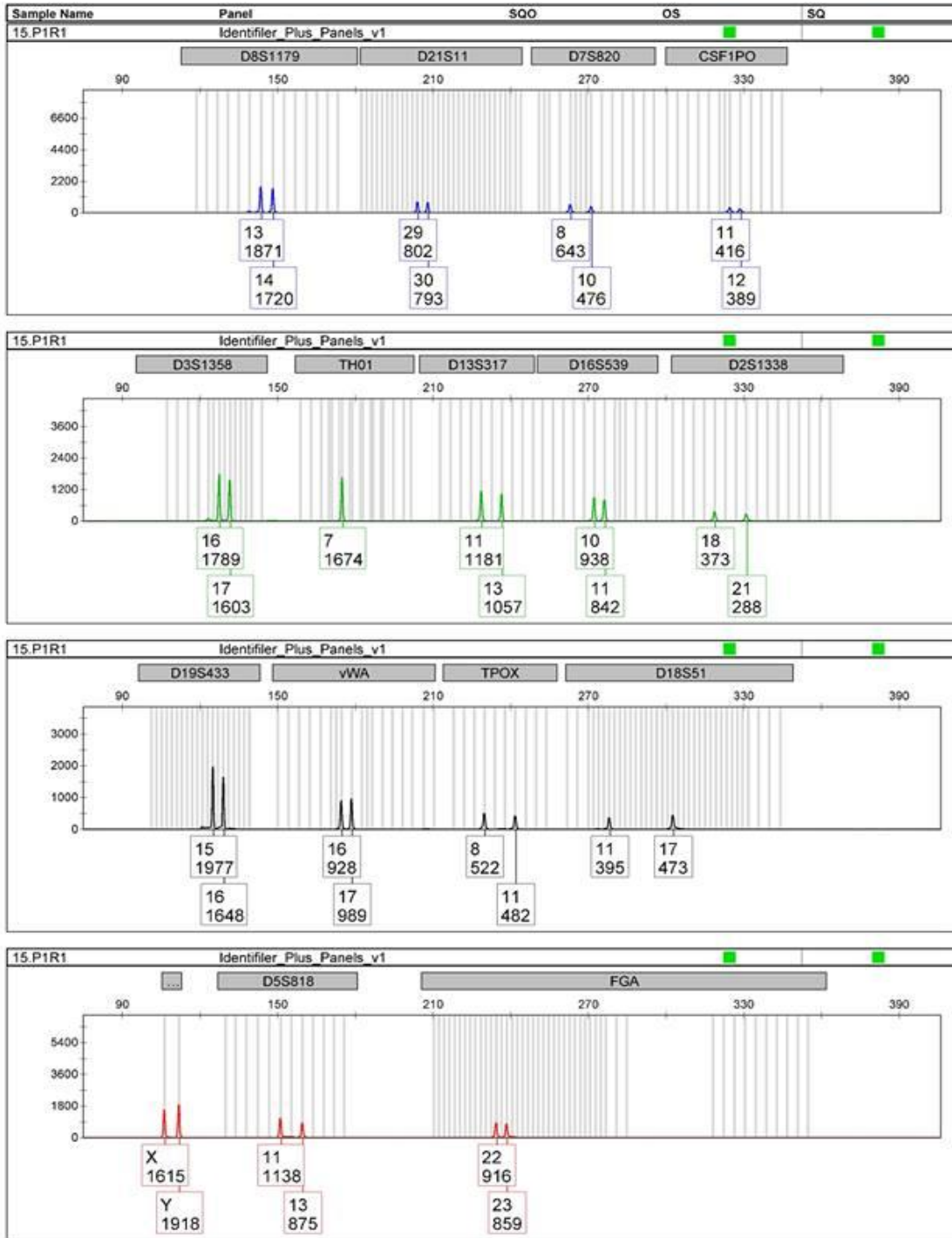
Annexe 13 : ANOVA de Kruskal-Wallis pour les échantillons du 2^{ème} participant

Individu=Ind. n° 2 Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; c(ADN) (Données.sta) Independent (grouping) variable: Type Kruskal-Wallis test: H (2, N= 15) =9,396780 p =,0091				
Depend.: c(ADN)	Code	Valid N	Sum of Ranks	Mean Rank
Mégot cig.	1	5	52,00	10,40
Chew. gum	2	5	53,00	10,60
Chemise	3	5	15,00	3,00

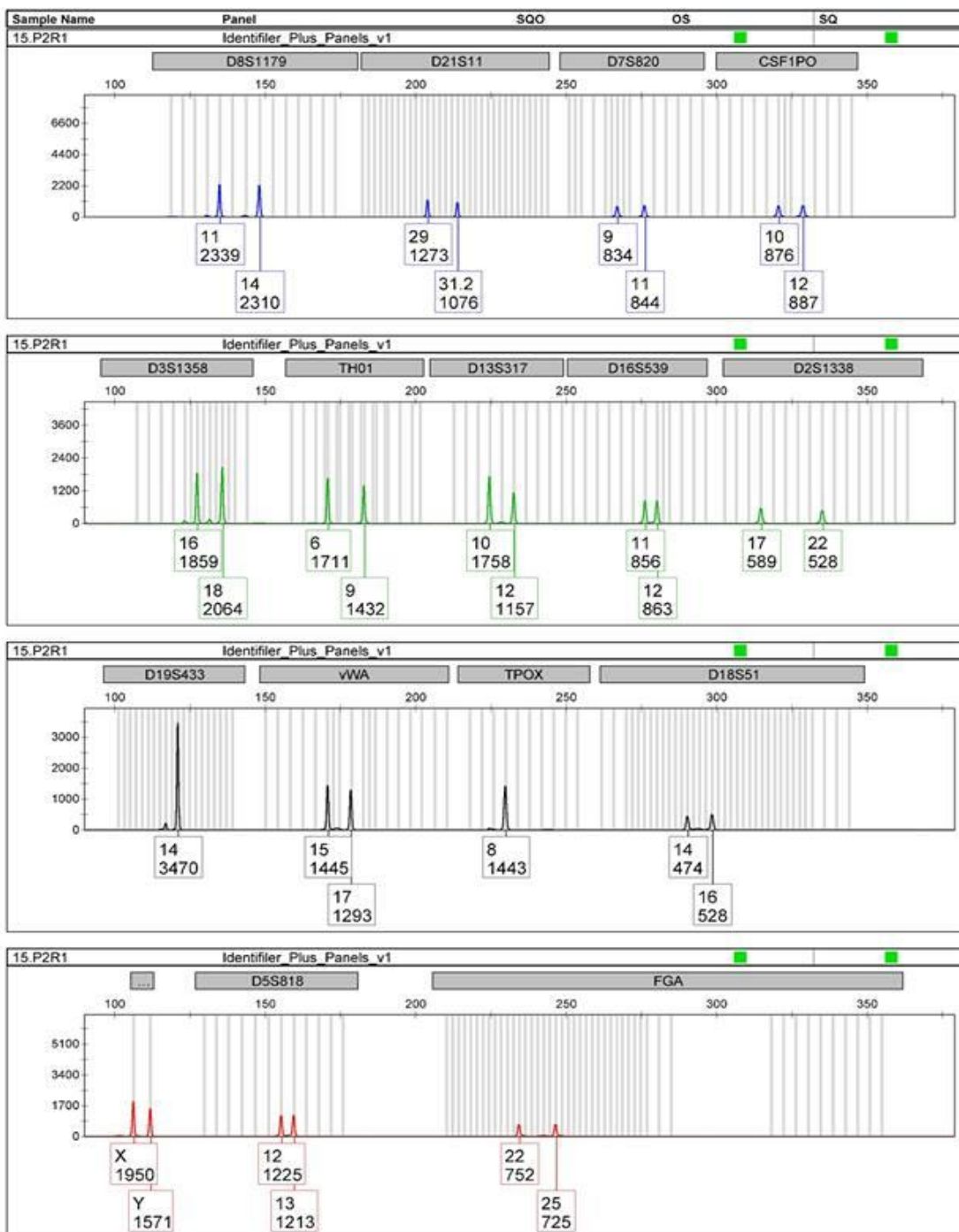
Individu=Ind. n° 2 Multiple Comparisons p values (2-tailed); c(ADN) (Données.st) Independent (grouping) variable: Type Kruskal-Wallis test: H (2, N= 15) =9,396780 p =,0091			
Depend.: c(ADN)	Mégot cig. R:10,400	Chew. gum R:10,600	Chemise R:3,0000
Mégot cig.		1,0000	0,0267
Chew. gum	1,0000		0,0216
Chemise	0,0267	0,0216	

Annexe 14 : Test de Mann-Whitney pour les échantillons du 3^{ème} participant

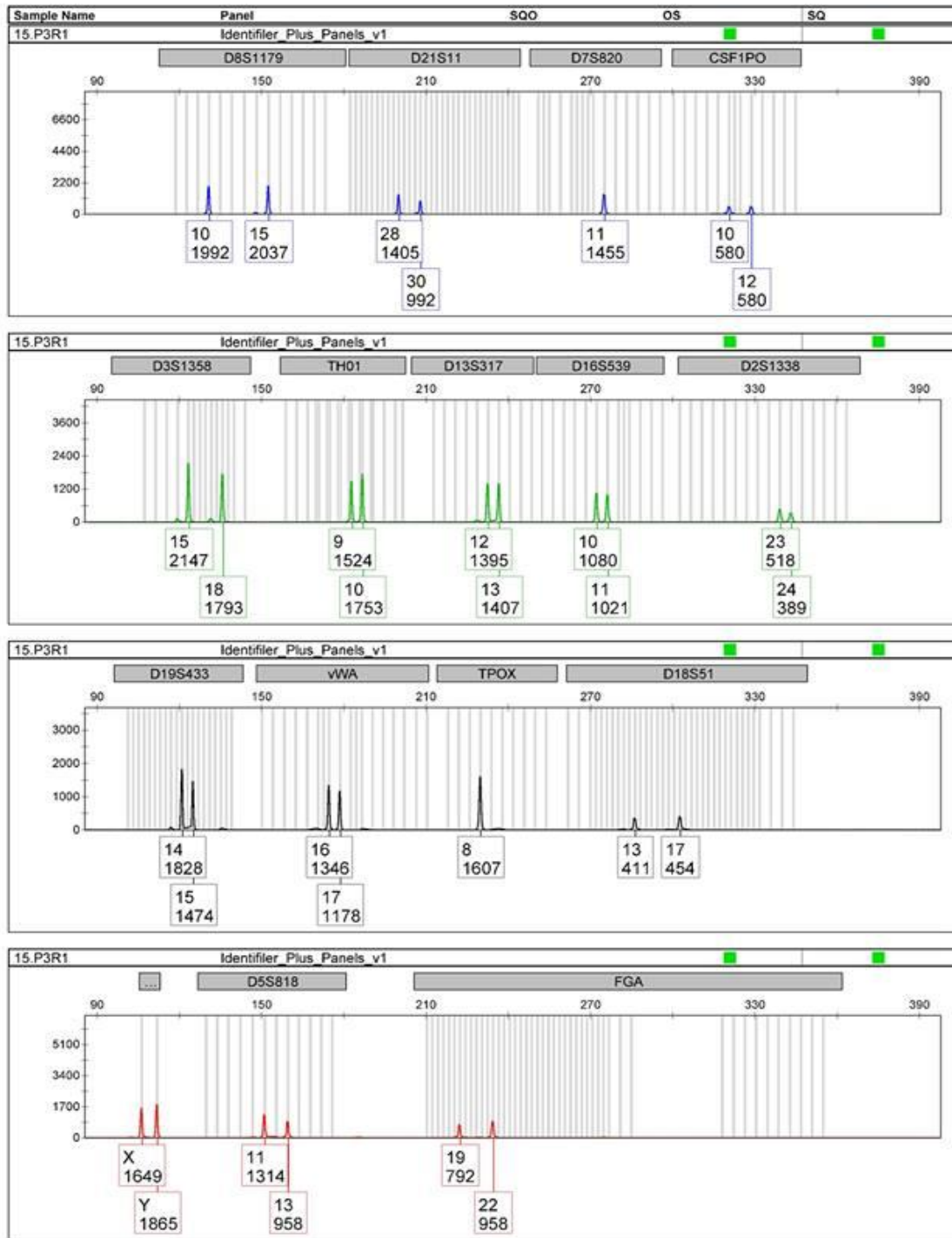
Individu=Ind. n° 3 Mann-Whitney U Test (Données.sta) By variable Type Marked tests are significant at p <,05000										
variable	Rank Sum Mégot cig.	Rank Sum Chew. gum	U	Z	p-value	Z adjusted	p-value	Valid N Mégot cig.	Valid N Chew. gum	2*1 sided exact p
c(ADN)	20,50	34,50	5,50	-1,36	0,17	-1,36	0,17	5	5	0,15



Annexe 15 : Profil génétique complet obtenu à partir de l'échantillon P1R1 après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®.

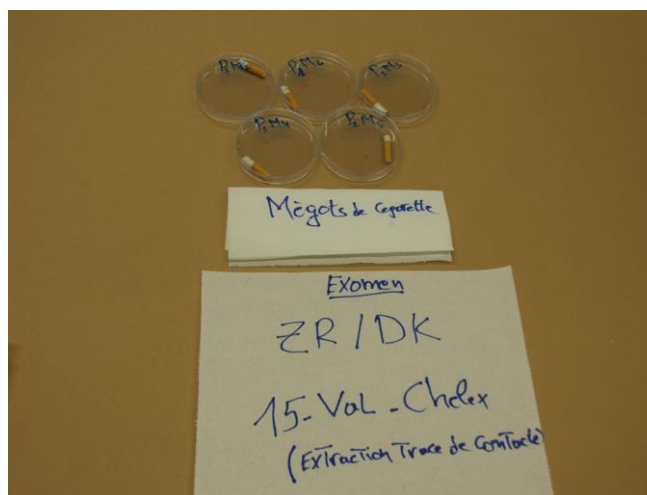


Annexe 16 : Profil génétique complet obtenu à partir de l'échantillon P2R1 après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®.



Annexe 17 : Profil génétique complet obtenu à partir de l'échantillon P3R1 après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®.

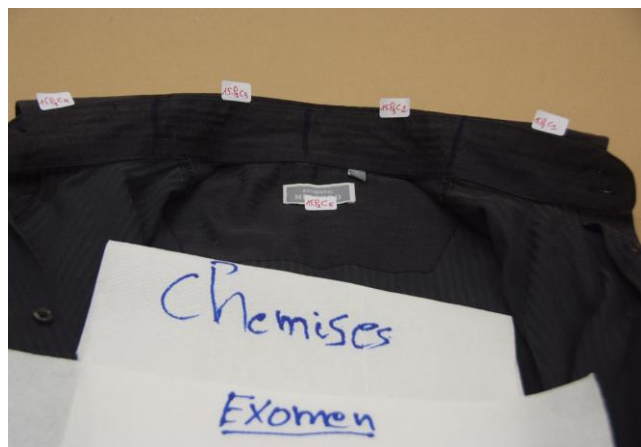
Annexe 18 : Préparation des échantillons



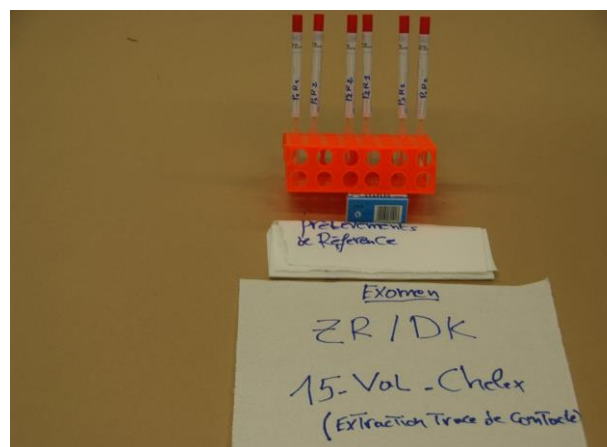
Traces de salive sur les mégots de cigarettes



Traces de salive sur chewing-gums



Traces de cellules épithéliales sur col de chemise



prélèvements de référence de la salive

Annexe 19 : Equipements utilisés durant le stage



Thermocycleur 9700



programme du thermocycleur



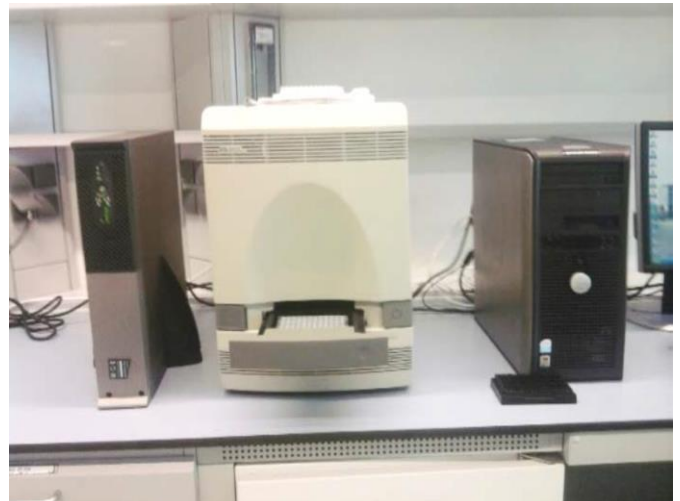
Incubateur



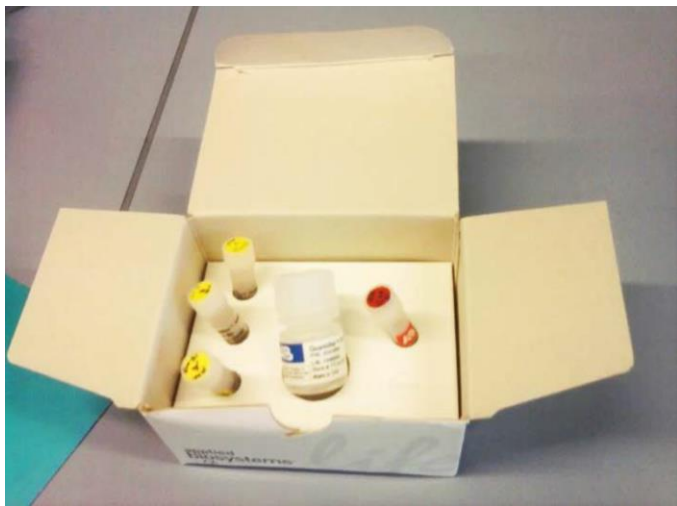
Centrifugeuse



Vortex



Système de PCR en Temp Real 7500



Kit de quantification "Quantifiler Human DNA"



Cross-linker