



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique et Physiologie

Thème

Optimisation du protocole d'extraction différentielle de l'ADN à partir d'échantillons prélevés de cas d'agressions sexuelles.

Réalisé par

M^{elle} BETROUNI Amira

&

M^{elle} LAIB Kenza

Devant le jury composé de :

Présidente	M^{me} GUESSAIBIA N.	MCB	USDB 1
Examineur	M^r MOHAMED SAID R.	MCB	USDB 1
Promoteur	M^r BRAHIM ERRAHMANI M.	MCA	USDB 1
Co-promoteur	M^r AGGOUNE A.	MSC	INCC/GN

Promotion 2016

Remerciements

Nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience ainsi que la force afin de réaliser ce travail.

Nous exprimons toute notre reconnaissance aux membres du jury: La présidente, M^{me} Guessaibia, maître de conférences au département de biologie pour avoir bien voulu nous faire l'honneur de présider ce jury. L'examineur, M^r Mohamed Said, maître de conférences au département de biologie pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tenons tout particulièrement à remercier et à exprimer notre profond respect et gratitude envers notre promoteur le professeur Brahim Errahmani, maître de conférences à l'université Blida1 pour ses conseils, son soutien et son aide dans l'accomplissement de ce travail, Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

Nous tenons aussi particulièrement à remercier notre co-promoteur le commandant Aggoun Abdennacer pour nous avoir si aimablement accueillies dans le département de biologie de l'INCC. Nous le remercions infiniment pour les précieux conseils qu'il nous a donné, son aide sans limite dans notre tâche, sa générosité dans le travail et surtout ses qualités humaines. Nous essaierons d'être dignes de la chance qu'il nous a donné, et de la confiance qu'il nous a accordé.

Nous sommes enfin très heureuses d'exprimer tous nos remerciements et notre gratitude au directeur général de l'INCC, le colonel Sid-Ahmed Berroumana, ainsi qu'au chef de département de biologie le commandant Boussoufi Ahmed, pour nous avoir reçues et acceptées au sein de leur équipe,

Enfin, un grand remerciement à tous ceux qui nous ont encouragés et soutenus durant cette période sans oublier le colonel Belhafssi EL-Hadi qui nous a aidé à rejoindre l'INCC et donné donc la chance de travailler dans une institution hors du commun.

Merci

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à

*Mes très chers parents
qui sont toujours dans mon cœur, qui ont consacré leur vie à mon
éducation et ma réussite, qui m'ont encouragé dans les moments les
plus difficiles de ma vie. Vous m'avez donné la vie, la tendresse et
le courage pour réussir.*

*Tout ce que je peux vous offrir ne pourra vous exprimer l'amour et
la reconnaissance que je vous porte. J'espère que le Seigneur vous
donnera longue vie et bonne santé.*

*Une dédicace vraiment spéciale pour des personnes très chers dans
mon cœur : mes grands-parents paternels et mon grand-père
maternel; malgré votre absence vous êtes toujours présents et vous
serez dans mon cœur pour l'éternité, reposez en paix, Inchallah le
paradis sera votre destin.*

A ma grand-mère maternelle

*A ton courage, ta sympathie, ta tendresse, et puisse Allah le tout
puissant te donner longue vie et bonne santé.*

Mes frères

Mehdi, Ahmed, Mohamed.

*A tous les membres de ma famille petits et grands
ainsi qu'à mon binôme Kenza à qui je souhaite une vie pleine de
bonheur et de succès. Ainsi que sa famille.*

Toutes mes amies en particulier

Abir, Aicha

*Toutes les étudiantes de l'option Génétique et physiologie promotion
2015.*

*A toutes les personnes qui ont participé de loin ou de près à la
réalisation de ce travail.*

Tous ceux qui m'aiment et que j'aime.

Amira



Dédicaces

Pour cette occasion et à travers ce modeste travail je remercie tout d'abord Dieu Clément et Miséricordieux,

Je dédie cet ouvrage à tous les corps médicaux, qui travaillent jour et nuit et grâce auxquels j'ai reçu une belle leçon de courage. Que Dieu leur vienne en aide dans leur noble métier.

Je dédie ce travail à ma mère le symbole de la tendresse, à mes frères et sœurs.

Ainsi qu'à mon binôme Amira à qui je souhaite une vie pleine de bonheur et de succès. Ainsi que sa famille.

Tous mes amis

Toutes les étudiantes de l'option Génétique et Physiologie promotion 2015.

A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Kenza



Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADNmt : ADN mitochondrial.

DTT : Dithiothréitol.

EDTA : Acide Etylènediamine Tétra Acétique.

E : Epithéliale.

ES: Mélange de cellules épithéliales et spermatiques.

E-5 : Fraction épithéliale incubée à 5 minutes.

E-10 : Fraction épithéliale incubée à 10 minutes.

E-15 : Fraction épithéliale incubée à 15 minutes.

S-5 : Fraction spermatique incubée à 5 minutes.

S-10 : Fraction spermatique incubée à 10 minutes.

S-10 : Fraction spermatique incubée à 10 minutes.

E-5A : Fraction épithéliale (ADN des cellules épithéliales) incubée à 5 minutes et filtrée sur Amicon.

E-10A : Fraction épithéliale (ADN des cellules épithéliales) incubés à 10 minutes et filtrés sur Amicon.

E-15A : Fraction épithéliale (ADN des cellules épithéliales) incubée à 15 minutes et filtrée sur Amicon.

HLA: Human Leukocyte Antigen.

Kb: kilo base.

µL: Microlitre.

M : mol.

mg : Milligramme.

mL : Millilitre.

µM : Micromole.

mM : Millimole.

ng : Nanogramme.

pb : Paire de bases.

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction en Chaîne de Polymérase).

P/C : Phénol et Chloroforme.

PK: Protéinase K

PSA : Prostate Specific Antigen

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism.

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate.

STR : Short Tandem Repeat.

SPZ : Spermatozoïde.

T : Thymine.

TBE : Tris Acide Borique et EDTA.

TE : Tris EDTA.

Tris : Tris (Hydroxyméthyle) Aminométhane.

VNTR: Variable Number of Tandem Repeats.

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
1	Epithélium stratifié de la cavité buccale (Marieb et al., 2014)	7
2	La composition du spermatozoïde humain (Refaat, 2014)	8
3	Identification positive de sperme par la révélation de la phosphatase acide (Refaat, 2014)	9
4	Spermatozoïdes humains révélés par « Christmas tree stain » (Nuclear Fast Red et picroindigocarmin), grossissement d'origine 1000x (Stuart et al., 2014)	10
5	Spermatozoïde humain et les cellules épithéliales nucléées révélées par « Christmas tree stain » (Nuclear Fast Red et picroindigocarmin), grossissement d'origine 1000x (Stuart et al., 2014)	11
6	Processus d'extraction différentielle utilisé pour séparer les spermatozoïdes des cellules épithéliales féminines (Butler, 2011)	16
7	Modèle graphique de la PCR en temps réel	17
8	Le principe de la sonde TaqMan (NCBI) (Tran, 2008)	18
9	Exemple d'empreinte génétique	20
10	Les solutions de coloration	23
11	Manière de déposer le sperme sur le frottis buccal	25
12	La série des standards préparés	33
13	La plaque de la RT-PCR	33
14	Cellules épithéliales en solution observées sous microscope photonique au Gx40.	39
15	Spermatozoïdes dilués à $1/10^{\text{ème}}$ observés sous microscope photonique au Gx40.	40
16	Cellules épithéliales diluées à $1/10^{\text{ème}}$ observées sous microscope photonique au Gx40.	40
17	Cellules spermatiques diluées à $1/100^{\text{ème}}$ observées sous microscope photonique au Gx40.	41
18	Mélange de cellules épithéliales et spermatiques observées sous microscope photonique au Gx40.	41
19	Cellules spermatiques observées sur cellule de Malassez sous microscope photonique au Gx40.	44
20	Cellules spermatiques observées sous microscope photonique au Gx40 avec un temps d'incubation de 5 min	46
21	Cellules spermatiques observées sous microscope photonique au Gx40 avec un temps d'incubation de 10 min	46

22	Cellules spermatiques observées sous microscope photonique au Gx40 avec un temps d'incubation de 15 min	47
23	Cellules spermatiques observées sous microscope photonique au Gx40 (référence S+).	47
24	Cellules spermatiques observées sur cellule de Malassez sous microscope photonique au Gx40 avec un temps d'incubation de 5 min	48
25	Cellules spermatiques observées sur cellule de Malassez sous microscope photonique au Gx40 avec un temps d'incubation de 10 min	48
26	Cellules spermatiques observées sur cellule de Malassez sous microscope photonique au Gx40 avec un temps d'incubation de 15 min	49
27	Quantités moyennes de spermatozoïdes des 4 séries.	51
28	Concentrations moyennes d'ADN ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) des 4 séries.	52
29	Corrélations entre la concentration recueillie d'ADN et le nombre initial de spermatozoïdes pour les échantillons contrôle et à 5, 10 et 15 mn d'incubation	53
30	Graphe récapitulatif des concentrations recueillies d'ADN et du nombre initial de spermatozoïdes des 4 échantillons	54
31	Concentrations moyennes d'ADN ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) des 3 séries de cellules épithéliales (A) filtrées à l'amicon	55

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
1	Les rendements typiques de l'ADN extrait de divers matériaux biologiques (Butler, 2011)	6
2	Analyse du polymorphisme du chromosome Y	14
3	Préparation de tampon d'extraction classique	Annexe 2
4	Plans de travail de l'étape de la RT-PCR (neuvième étape)	Annexe 3
5	Plans de travail de l'étape de la RT-PCR (étape finale).	Annexe 4
6	Plans de travail de l'étape de la pré-amplification (étape finale).	Annexe 5
7	Plans de travail de l'étape d'amplification (étape finale).	Annexe 6
8	Résultats de la RT-PCR pour les concentrations d'ADN des échantillons de la fraction masculine (9 ^{ème} étape)	45
9	Dénombrement des spermatozoïdes ($\times 10^6$) sur cellule de Malassez (étape finale)	50
10	RT-PCR pour les échantillons de la fraction masculine (étape finale)	51
11	RT-PCR pour les échantillons de la fraction féminine (étape finale)	54

GLOSSAIRE

- ✚ **ADN mitochondrial (ADNmt, mtDNA):** ADN contenu dans la mitochondrie. Il constitue le génome mitochondrial, indépendant de celui du noyau. L'ADN mitochondrial est hérité de la mère.
- ✚ **Allèle:** une forme alternative (séquence alternative) au locus d'un gène. Chez les organismes diploïdes, chaque allèle d'un même gène provient l'un du père et l'autre de la mère. La notion d'allèle peut être étendue à des séquences présentes dans les régions intergéniques.
- ✚ **Azoospermie (Asoospermatisme):** absence de spermatozoïdes dans le sperme.
- ✚ **DTT :** un agent réducteur de molécules disulfides en dithiol ce qui permet la libération de l'ADN des protéines qui le protègent, comme il aide à la dégradation des protéines par les protéinases.
- ✚ **EDTA :** empêche les nucléases de dégrader l'ADN par l'association de ces molécules aux ions bivalents (Mg^{+2}) qui forment un cofacteur à ces enzymes.
- ✚ **Lysats :** le produit résultant après une lyse.
- ✚ **NaCl :** chlorure de sodium, se trouve à une concentration bien déterminée dans le tampon de lyse pour assurer que les protéines et les contaminants qui peuvent être existants dans les échantillons ont été séparés dans le milieu organique loin de l'ADN qui se trouve dans le milieu aqueux, le pH a un rôle dans cette opération.
- ✚ **Oligospermie:** diminution anormale du nombre des spermatozoïdes dans le sperme.
- ✚ **Orchidectomie:** Incision chirurgicale du testicule.
- ✚ **Protéinase K :** hydrolyse et décompose les histones, préférable pour la procédure d'extraction d'ADN, comme elle agit activement en présence de SDS et n'est pas négativement influencée par la présence de l'EDTA.
- ✚ **PSA :** L'antigène prostatique spécifique (prostate-specific antigen) est une protéine fabriquée exclusivement par la prostate. Il sert à liquéfier le sperme afin de faciliter le déplacement des spermatozoïdes, le PSA est utilisé comme un marqueur d'identification du sperme dans les laboratoires de criminalistique.
- ✚ **SDS :** ces molécules favorisent la dissociation des parois des cellules, elles séparent les histones des molécules d'ADN et elles dénaturent ces derniers, elles détruisent les composants secondaires des protéines ce qui diminue leurs capacités de solubilité et leur persistance dans le milieu aqueux.

- ✚ **Sperme** : C'est un liquide alcalin qui dilue et transporte les spermatozoïdes, les substances les plus importantes qu'il contient sont des nutriments, des prostaglandines et des substances chimiques antibiotiques (Marieb et al., 2015)
- ✚ **Tris-HCl** : interagit avec les lipopolysaccharides qui se trouvent sur la paroi externe des cellules ce qui permet leur perméabilité, et augmente le taux d'entrée de l'EDTA à l'intérieur de la cellule.
- ✚ **Température de fusion (T_m)**: Température à laquelle la moitié d'une population de molécules d'acides nucléiques doubles-brins est dissociée en simples-brins. Elle est considérée comme la température de fusion pour cette espèce d'acide nucléique.
- ✚ **Vasectomie**: Résection partielle ou totale des canaux déférents.

Mots clés : extraction différentielle, agression sexuelle, spermatozoïdes, cellules épithéliales vaginales.

RÉSUMÉ

Cette étude a comme objectif d'optimiser une méthode efficace pour isoler l'ADN de sperme à partir d'un échantillon de fluide contenant des cellules épithéliales vaginales. Ce type d'extraction différentielle de l'ADN spermatique et de l'ADN épithélial est appliqué à des échantillons prélevés de cas d'agressions sexuelles.

L'échantillon étudié est une tache mixte préparée à partir d'un mélange de deux échantillons : des cellules épithéliales buccales prélevées par écouvillon (frottis jugal) et du sperme afin d'approcher un mélange semblable à celui des frottis vaginaux post-coïtaux après l'acte de l'agression sexuelle.

La méthode classique d'extraction différentielle de l'ADN utilisée à l'INCC est considérée comme inefficace suite aux expériences réalisées dans cette étude.

Une méthode modifiée d'extraction différentielle de la procédure, réalisée en deux étapes, a été jugée convenable pour séparer l'ADN des spermatozoïdes et l'ADN des cellules épithéliales vaginales des taches mixtes.

En première étape de digestion, les cellules épithéliales buccales des taches mixtes ont été lysées avec la protéinase K et le SDS et les têtes des spermatozoïdes restants dans la solution lysée ont été recueillies par centrifugation.

En deuxième étape de digestion, les têtes des spermatozoïdes ont été lysées avec un tampon contenant la protéinase K, le SDS et le DTT en tant qu'agent réducteur. Les fractions d'ADN extraites des deux solutions de lyse ont été enrichies, l'une avec de l'ADN de spermatozoïdes et l'autre avec de l'ADN de cellules épithéliales.

Un examen cytologique a été réalisé pour la mise en évidence des spermatozoïdes et a montré une absence totale de spermatozoïdes par la méthode d'extraction usuelle. Il a donc fallu mettre au point un tampon modifié, contenant les mêmes composants mais à des concentrations différentes, il a été suivi d'un lavage pour aboutir à l'obtention d'un nombre significatif de spermatozoïdes, suffisamment élevé pour l'extraction d'une quantité d'ADN appréciable ayant permis de poursuivre les opérations de PCR, d'électrophorèse capillaire puis d'établir des profils génétiques attendus.

Keywords: differential extraction, sexual assault, spermatozoids, vaginal epithelial cells.

Abstract

This study has as objective to optimize an effective method to isolate DNA of sperm from a sample of fluid containing vaginal epithelial cells. This type of differential extraction of sperm DNA and epithelial DNA is applied to samples collected from cases of sexual assaults.

The sample is a mixed stain prepared from a mixture of two samples: buccal epithelial cells collected by swab (cheek-swab) and sperm to approach a similar mixture to that of post-coital vaginal smear following an act of sexual assault..

The conventional method of differential extraction of DNA used in the NCIC is considered ineffective from the experiments performed in this study.

A modified method of differential extraction of the two-step procedure was deemed suitable for separating sperm DNA and the DNA of vaginal epithelial cells mixed stains.

As a first step of digestion, buccal epithelial cells mixed stains were lysed with proteinase K and SDS, and the heads of the sperm remaining in the lysed solution were collected by centrifugation.

In the second digestion step, sperm heads were lysed with a buffer containing proteinase K, SDS and DTT as the reducing agent. The DNA fractions extracted from two lysed solutions were enriched with one sperm DNA and the other with the DNA of epithelial cells.

Cytological examination was performed for the highlight of the sperm and showed a complete lack of sperm by the usual extraction method. It was therefore necessary to develop another buffer containing the same components but in different concentrations, followed by washing to result in obtaining a significant number of sperm, a sufficient number for the extraction of a significant amount of DNA that has resulted in continued operations PCR, capillary electrophoresis and then to establish genetic profiles.

ملخص

هذه الدراسة تهدف إلى إيجاد طريقة فعالة لعزل الحمض النووي للحيوانات المنوية من عينة مختلطة من السوائل التي تحتوي على الخلايا الطلائية المهبلية، وهذا النوع من الاستخلاص التفاضلي للحمض النووي للحيوانات المنوية والحمض النووي للخلايا الطلائية يتم تطبيقه على عينات مأخوذة في حالات الاعتداء الجنسي.

العينة المدروسة هي عبارة عن بقعة مختلطة التي تم تحضيرها انطلاقاً من خليط لعينتين: الخلايا الطلائية المبطنة لجدار الفم من الداخل المأخوذة بواسطة الأعواد القطنية (مسح فموي) والسائل المنوي من أجل الاقتراب من خليط مماثل لذلك الخليط المأخوذ من المسحات المهبلية المولية لجماع الاعتداء الجنسي.

تعتبر الطريقة الكلاسيكية لاستخلاص التفاضلي للحمض النووي المستعملة في المعهد الوطني للأدلة الجنائية وعلم الإجرام غير ناجحة من خلال التجارب المحققة في هذه الدراسة.

الطريقة المغيرة لمنهجية الاستخلاص التفاضلي للحمض النووي المكونة من خطوتين اعتبرت المناسبة لفصل الحمض النووي للحيوانات المنوية و الحمض النووي للخلايا الطلائية المهبلية للبقعة المختلطة.

كخطوة أولى من عملية الهضم، تم تمزيق الخلايا الطلائية المبطنة لجدار الفم للبقع المختلطة بواسطة البروتينيز "ك" و الاسدييس، و رؤوس الحيوانات المنوية المتبقية في المحلول تم جمعها بواسطة عملية الطرد المركزي.

في الخطوة الثانية للهضم تم تحليل رؤوس الحيوانات المنوية بواسطة محلول يحتوي على البروتينيز "ك" و الاسدييس لذي تي كي عامل مرجع. جزئي الحمض النووي المستخلص من محلولي التمزيق غنيين الأول بالحمض النووي للحيوانات المنوية والثاني بالحمض النووي للخلايا الطلائية.

تم إجراء فحص خلوي للكشف عن الحيوانات المنوية هذا الفحص أظهر غياباً تاماً للحيوانات المنوية بطريقة الاستخلاص المعتادة، مما استلزم استعمال محلول آخر يحتوي على نفس المكونات و لكن بتركيز مختلفة، يليه غسل للحصول على عدد كبير من الحيوانات المنوية بما فيه الكفاية لاستخلاص كمية كافية من الحمض النووي الذي التي تسمح باستمرار عمليات التفاعل المتسلسل الكمي و الهجرة الكهربائية الشعرية وتحديد السمات الوراثية.

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre I : Rappels bibliographiques	
I.1 Code génétique	3
I.2 Organisation de l'ADN dans les chromosomes	3
I.2.1 L'ADN mitochondrial	3
I.2.2 L'ADN non codant	4
I.2.3 L'ADN satellite	4
I.2.4 L'ADN répétitif dispersé	4
I.3 Le polymorphisme génétique	4
I.4 Le profil génétique	4
I.5 Les VNTRs	5
I.6 Les STR : Short Tandem Repeat ou microsatellites	5
I.6.1 Classification des STR	5
I.7 SNP: Single nucleotide polymorphisme	5
I.8 Traces biologiques comme source d'ADN	5
I.9 Caractéristiques et particularités d'échantillons judiciaires en cas d'agressions sexuelles	6
I.10 Le tissu épithélial	7
I.10.1 Classification des épithéliums	7
I.11 Le fluide séminal	7
I.12 Les cellules de sperme	8
I.13 Tests de confirmation de sperme	9
I.14 Les prélèvements en vue de l'identification	10
I.15 Détection des spermatozoïdes (examen cytologique)	11
I.16 L'isolement de l'ADN des taches de sperme	12
I.17 Le challenge de la lyse différentielle	12
I.18 Causes pouvant être à l'origine de l'absence de spermatozoïdes dans des prélèvements de victimes de viols	12
I.19 Les mélanges d'ADN	13
I.20 Le chromosome Y	13
I.21 Méthodes d'extraction d'ADN	14
I.21.1 Méthode organique (au Phénol-Chloroforme)	15
I.21.2 Extraction différentielle	15
I.22 Real Time PCR ou PCR en Temps Réel	16
I.22.1 Principe	16
I.22.2 Principe de la sonde Taq Man	17
I.23 Polymerase Chain Reaction (PCR)	18

I.23.1 Principe	18
I.23.2 Les étapes de la PCR	18
I.24 L'électrophorèse capillaire	19
I.25 Profils génétiques	19

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1 Préparation des échantillons	22
II.1.1 Matériel	22
II.1.1.1 Matériel biologique	22
II.2 Première étape	22
II.2.1 Préparation des échantillons de sperme et de cellules buccales	22
II.2.2 Coloration des cellules	23
II.2.3 Observation microscopique des cellules épithéliales et des spermatozoïdes	23
II.3 Deuxième étape	24
II.4 Troisième étape	25
II.5 Quatrième étape	27
II.6 Cinquième étape	27
II.7 Sixième étape	28
II.8 Septième étape	29
II.8.1 Préparation du nouveau tampon	29
II.8.2 Procédure de la lyse cellulaire (étape douce)	29
II.8.3 Etapes de lavage	30
II.9 Huitième étape : test de la pureté des échantillons traités par l'ancien tampon de digestion	30
II.10 Neuvième étape	31
II.10.1 Etape de digestion douce	31
II.10.2 La fraction spermatique	31
II.10.3 La fraction épithéliale	32
II.10.4 Quantification par la RT-PCR	32
II.11 Dixième étape (étape finale)	34
II.11.1 Etape de digestion douce	34
II.11.2 Test de confirmation	34
II.11.3 Les dilutions pour le calcul du nombre de spermatozoïdes	34
II.11.4 La fraction spermatique	34
II.11.5 La fraction épithéliale	34
II.11.6 Quantification par la RT-PCR	35
II.11.7 L'étape de pré-amplification	35
II.11.8 L'étape de post-amplification	36
II.11.9 Séparation et détection des fragments d'ADN amplifiés	37

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1 Résultats expérimentaux et discussion	39
--	-----------

III.1.1 Première étape	39
III.1.2 Deuxième étape	40
III.1.3 Troisième étape	42
III.1.4 Quatrième étape	42
III.1.5 Cinquième étape	43
III.1.6 Sixième étape	43
III.1.7 Septième étape	43
III.1.8 Huitième étape	44
III.1.9 Neuvième étape	44
III.1.9.1 Observation microscopique	44
III.1.9.2 Amplification par la RT-PCR	44
III.1.10 Dixième étape	45
III.1.10.1 Test de confirmation	44
III.1.10.2 Observation des spermatozoïdes sur cellule de Malassez sans coloration et sans séchage	47
III.1.10.3 Dénombrement des spermatozoïdes	49
III.1.10.4 Amplification par la RT-PCR	51
III.1.10.5 Post amplification	55

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

L'étude des séquences non codantes a été à la base de la notion de polymorphisme qui constitue la base des moyens d'identification utilisés dans le domaine médico-légal. En effet, une cellule prélevée sur une personne en contient l'ensemble de l'information génétique, l'ADN non codant et des informations beaucoup plus précises fournies par l'ADN codant liées par exemple à des caractéristiques physiques ou des maladies génétiques (Coquoz et al., 2007).

Les séquences de nucléotides de nos ADN présentent des variations interindividuelles. Si l'on compare l'ADN de deux personnes prises au hasard, on trouve en moyenne une différence tous les 1200 nucléotides (Sachidanandam., 2001).

L'analyse de l'ADN a consacré l'ouverture du monde policier aux universitaires. La réalisation d'analyses des traces biologiques et leur interprétation requièrent des compétences hautement spécialisées et une formation universitaire dans le domaine correspondant. Cette analyse est l'un des nombreux outils utilisés par le système judiciaire pour remplir sa mission (Coquoz et al., 2007).

Les sciences forensiques ou les sciences légales incluent la maîtrise de plusieurs branches de la science et des techniques, dès lors qu'elles peuvent apporter quelques lumières à des questions judiciaires. Cela peut donc concerner toutes les disciplines scientifiques (Coquoz et al., 2007).

Avant les années 1980, l'identification du génotype d'un individu était basée habituellement sur divers composants d'un gène comme les protéines ou les enzymes; la découverte des premiers marqueurs génétiques pour le groupe sanguin ABO par Landsteiner en sont des exemples classiques dont on déduit les génotypes de la réaction des produits de gènes avec certains produits chimiques. Mais si les gènes avaient été vraiment connus et les techniques d'analyse disponibles, leur analyse aurait également pu se faire directement sur l'ADN du gène correspondant. Cette dernière a comme avantage d'être en mesure d'identifier les allèles dans les sections d'ADN qui ne codent pas pour une chaîne polypeptidique (Coquoz et al., 2006).

C'est en 1985 que Jeffrey décrit des régions génomiques très polymorphes, formées par de courtes séquences d'ADN qui se répètent en tandem. C'est en 1988, avec l'avènement de la PCR (Polymerase Chain Reaction), que la technologie génétique a fait un grand pas en avant (de Mazancourt et al., 2006).

Introduction

A la suite de ces nouveaux progrès, le nombre de loci génétiques pouvant être détectés a augmenté de façon exponentielle et a bientôt conduit à l'identification des gènes troubles qui étaient restés un mystère jusque là.

Le sperme est considéré comme le plus important des liquides biologiques retrouvés au niveau de scènes de crime par sa qualité qui non seulement permet d'identifier le coupable mais aussi de prouver l'agression sexuelle vis à vis de la victime (Hunt et al., 1996)

Nous sommes confrontés à une première difficulté due au fait que le sperme retrouvé dans la majorité des cas est mélangé à des sécrétions vaginales. Il existe cependant une méthode permettant de séparer les deux types de cellules et récupérer leur ADN. On peut donc obtenir les deux profils d'ADN à partir de ce mélange de sécrétions.

Une autre difficulté est liée au protocole utilisé à l'INCC pour l'extraction différentielle qui s'est révélé inefficace, d'où la mise au point dans la présente étude d'un procédé modifié qui a été utilisé pour optimiser l'extraction d'ADN à partir des fluides mélangés contenant des cellules épithéliales et spermatiques de cas d'agressions sexuelles, suivi par le typage d'ADN à base de PCR.

I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.1 Code génétique

L'ADN est constitué de millions de nucléotides dont l'enchaînement précis détermine l'information génétique de chaque organisme (Farce, 2000). Il est le support de l'information génétique, il porte toutes les informations dont l'organisme a besoin pour fonctionner et se reproduire.

I.2 Organisation de l'ADN dans les chromosomes

Le génome humain se représente en deux copies complémentaires contenant environ 3,2 milliards de paires de bases (pb) organisées en 23 chromosomes ; chaque chromosome a son exemplaire, l'un exemplaire hérité de la mère et l'autre du père, soit un total de 46 chromosomes (Goodwin et al., 2011). Vingt-deux paires sont appelées autosomes, la vingt-troisième est constituée par les chromosomes sexuels X et Y (Ameziane et al., 2005).

Chaque chromosome contient une seule molécule d'ADN. L'ADN déroulé d'un noyau de cellule humaine mesurerait environ 1,8 m : chaque molécule d'ADN est enroulée et compactée en plusieurs étapes, grâce à l'association de différentes protéines, et loge dans un noyau de 6 μm de diamètre. L'ADN est composé d'une variété de séquences codantes ou non et répétées ou non (Farce, 2000).

Le génome humain est constitué de deux génomes distincts :

- Le génome nucléaire situé dans le noyau de la cellule (souvent appelé par défaut le génome humain).
- le génome mitochondrial localisé dans les mitochondries (Ameziane et al., 2005).

I.2.1 L'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est principalement localisé dans la mitochondrie. Il est présent à de multiples exemplaire dans chaque cellules contrairement à l'ADN nucléaire. Cette caractéristique est d'un grand intérêt pour les sciences forensiques.

L'ADNmt peut être une solution de secours dans le cas où l'ADN nucléaire est en quantité insuffisante (cas d'une trace biologique ne contenant que quelques cellules).

L'ADNmt est hérité uniquement par la mère biologique (Coquoz et Taroni, 2006).

I.2.2 L'ADN non codant

Il représente une proportion très importante de tous les génomes eucaryotes, c'est l'ensemble des séquences du génome qui ne sont pas traduites en protéines. Une grande partie de cet ADN non codant contient des séquences courtes et répétées plusieurs fois, pouvant se présenter en succession directe l'une après l'autre (répétition en tandem), ou pouvant être dispersées à travers le génome (Turner et al., 2002)

I.2.3 L'ADN satellite

C'est un ADN hautement répétitif dans le génome eucaryote, constitué de très courtes séquences de 2 à 20-30 pb répétées. Cet ADN se trouve généralement près des centromères des chromosomes. Son hypervariabilité constitue la base de la technique d'empreinte ADN (Turner et al., 2002).

I.2.4 L'ADN répétitif dispersé

La plus connue de ces séquences chez l'homme est l'élément Alu, SINE (élément dispersé court) de 300 pb qui revient entre 30 000 et 50 000 fois (Turner et al., 2002).

I.3 Le polymorphisme génétique

Les êtres humains appartiennent à la même espèce animale. Ils sont de ce fait génétiquement très proches, une écrasante partie de l'ADN (plus de 99,7%) est commune aux individus, seule la faible fraction ($\approx 0,3\%$, environ 10 millions de nucléotides) diffère entre les personnes créant de ce fait la biodiversité qui rend chaque humain unique.

Ces régions variables de l'ADN offrent la possibilité d'en utiliser l'information à des fins d'identification. Des méthodes ont été mises au point pour localiser et caractériser cette variation génétique au niveau de sites spécifiques dans le génome humain. Le polymorphisme est alors la base des moyens d'identification par les empreintes génétiques, qui sont constituées par plusieurs marqueurs génétiques (Mansuet-Lupo et al., 2007).

I.4 Le profil génétique

L'empreinte génétique ou le typage de l'ADN (profilage) a été décrite dès 1985 par le généticien anglais Jeffrey qui avait constaté les répétitions multiples des séquences d'ADN de façon adjacente, et différentes d'un échantillon à l'autre (Butler, 2011).

I.5 Les VNTRs (Variable Tandem Number Repeat ou minisatellites)

Les VNTRs sont des séquences répétées d'ADN en nombre variable de répétitions en tandem. Ce sont les premières séquences décrites par Jeffrey, l'élément répétitif étant constitué de quelques nucléotides à plusieurs centaines de bases (Mansuet-Lupo et al., 2007).

I.6 Les STR (Short Tandem Repeat ou microsatellites)

Ils ont été décrits plus tard par Weber en 1989. Les STR sont uniformément répartis dans l'ensemble du génome humain à raison d'un tous les 10 Kb en moyenne. Ils ont un élément répétitif constitué de moins de six nucléotides, généralement quatre (Mansuet-Lupo et al., 2007)

I.6.1 Classification des STR

Les STRs sont classés selon leurs motifs en 3 catégories :

- Les répétitions « simples »: contenant des unités de même séquence et longueur (exemple :motif [AATG] du locus TPOX).
- Les répétitions « composées » : comprenant au moins 2 unités "simples" adjacentes (exemple: [AGAT], [TCTA] du locus D3S1358).
- Les répétitions « complexes » : se composant d'unités répétitives différentes et de longueur variable avec diverses séquences intercalées entre les blocs (exemple:[TTTC] 3 TTTTTTCT [CTTT]_nCTCC [TTCC]₂ pour le locus FGA (El Ossmani et al., 2007).

I.7 SNP(Single nucleotide polymorphism)

C'est un type de polymorphisme de l'ADN dans lequel deux allèles d'un gène particulier d'un individu diploïde différent sur un segment donné par une seule paire de bases. De même, dans une population, des séquences d'ADN alternatives peuvent exister pour un même gène se présentant sous forme de différents allèles. Ce gène est dit polymorphe et c'est la mutation qui est derrière ce polymorphisme (Turner et al., 2002).

I.8 Traces biologique comme source d'ADN

Une grande variété du matériel cellulaire peut être récupérée sur des scènes de crimes, à partir de sang, de salive, de sperme ou d'un cheveu qui a une racine. Chaque cellule nucléée

contient deux copies du génome d'un individu et peut être utilisée pour générer un profil d'ADN dans des conditions optimales. Dans la pratique, 15 cellules ou plus sont nécessaires pour générer un profil d'ADN de haute qualité. Un échantillon judiciaire fortement dégradé, même soumis à la haute sensibilité de profilage de l'ADN peut ne pas générer de profil d'ADN. Les échantillons de référence proviennent en général d'un frottis jugal ou d'un prélèvement de sang (Goodwin et al., 2007).

Les rendements typiques d'ADN extrait de divers matériaux biologiques sont indiqués dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Rendements typiques de l'ADN extrait de divers matériaux biologiques (Butler, 2011).

Type d'échantillon	Quantité d'ADN
Sang liquide	20 à 40 mille ng.mL ⁻¹
Tache de sang	250 à 500 ng.cm ⁻²
Spermeliuide	150 à 300 mille ng.mL ⁻¹
Frottis vaginal post-coïtal	10 à 3000 ng par écouvillon
Poil (avec la racine)	1 à 750 ng par racine
Salive liquide	100 à 1500 ng par écouvillon
Urine	1 à 20 ng.mL ⁻¹
Os	3 à 10 ng.mg ⁻¹
Tissus	50 à 500 ng.mg ⁻¹

I.9 Caractéristiques et particularités d'échantillons judiciaires en cas d'agressions sexuelles

Il s'agit soit d'un lavage vaginal, d'écouvillons vaginaux et/ou buccaux, d'écouvillons cutanés et de sang prélevé sur tube EDTA, de la victime pour comparaison.

Les échantillons contenant des mélanges de cellules épithéliales et de spermatozoïdes posent problème et doivent passer par une digestion séquentielle pour séparer l'ADN provenant des deux types de cellules (Gill et al., 1985).

Une digestion douce des cellules épithéliales vaginales est effectuée en profitant de la résistance de la membrane des spermatozoïdes, grâce à des protéines riches en ponts disulfures qui les renforcent. Les spermatozoïdes résistent assez bien aux détergents et aux enzymes utilisés pour dissoudre les traces. Une fois l'ADN des cellules épithéliales mis en

solution, le surnageant est retiré et le culot contenant les spermatozoïdes est traité avec une solution de lyse plus agressive contenant du DTT (Coquoz et Taroni, 2006).

I.10 Le tissu épithélial

(*epi* : sur, dessus), ou épithélium, c'est un feuillet de cellules qui recouvre une surface de l'organisme ou qui en tapisse une cavité.

I.10.1 Classification des épithéliums

- **L'épithélium simple** comporte une seule couche de cellules ; comme il forme une barrière mince, il est caractéristique des organes qui ont des fonctions d'absorption, de sécrétion et de filtration.

- **L'épithélium stratifié** est une superposition d'au moins deux couches de cellules; on le rencontre en général dans des parties qui ont besoin d'être protégées contre la friction telles la surface de la peau et l'intérieur de la bouche (Figure1) (Marieb et al., 2014).

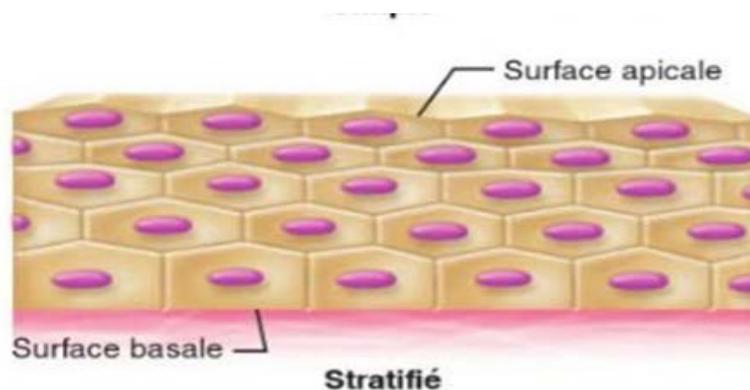


Figure 1 : Epithélium stratifié de la cavité buccale (Marieb et al., 2014)

I.11 Le fluide séminal

Le sperme ou liquide séminal est le fluide corporel le plus utilisé en médecine légale. Il est produit par les mâles post-pubères et éjaculé après stimulation sexuelle. C'est un mélange semi-liquide de cellules, d'acides aminés, de sucres, de sels, d'ions, et d'autres matières organiques et inorganiques, élaboré comme une masse gélatineuse hétérogène apportée par les vésicules séminales, la prostate et des glandes de Cowper.

Les volumes d'éjaculat des mâles humains vont de 2 à 6 mL et contiennent typiquement entre 100 et 150 millions de spermatozoïdes par mL.

Certains états pathologiques comme les maladies génétiques, l'abus d'alcool ou de drogues, une exposition prolongée à certains produits chimiques et les procédures de chirurgie électorale peuvent entraîner une réduction ou une absence totale de spermatozoïdes (Stuart et al., 2014).

I.12 Les cellules de sperme

Le principal composant cellulaire du sperme est le spermatozoïde ou cellule spermatique, dont la structure flagellée est d'environ 55 μm de longueur. La tête du spermatozoïde humain est généralement de forme ovoïde, elle contient le noyau cellulaire. Ses dimensions approximatives sont de 4,5 μm de longueur, 2,5 μm de largeur et 1,5 μm d'épaisseur.

La partie antérieure de la tête est coiffée avec l'acrosome (Figure 2), structure riche en enzymes aidant à la pénétration dans la paroi cellulaire de l'ovule lors de la fertilisation. Une queue flagellée est fixée à la tête par une courte pièce intermédiaire et représente environ 90% de la longueur totale d'un spermatozoïde (Stuart et al., 2014)

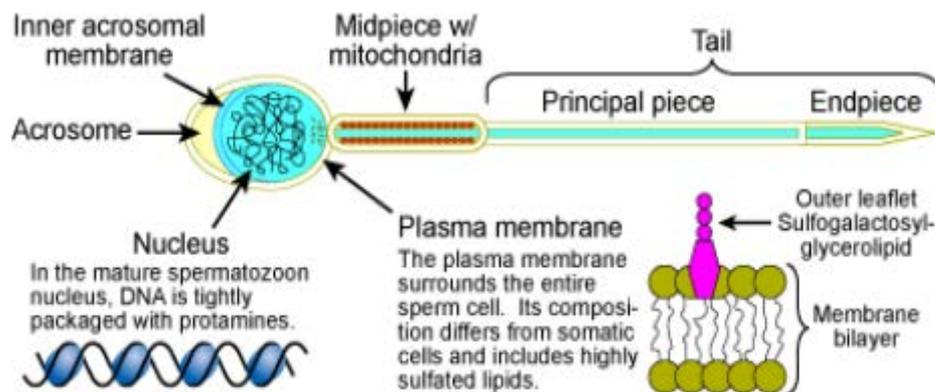


Figure 2: La composition du spermatozoïde humain (Refaat, 2014).

I.13 Tests de confirmation de sperme

Une identification positive de sperme peut être une preuve extrêmement importante pour étayer une allégation d'agression sexuelle, deux tests présomptifs et définitifs sont utilisés. Il s'agit de tester la présence de phosphatase acide à des concentrations élevées dans le liquide séminal (Figure 3). D'autres fluides corporels tels que la salive et les sécrétions vaginales contiennent cette enzyme mais à des concentrations beaucoup plus faibles et peuvent donc donner un résultat positif.



Figure 3 : Identification positive de sperme par la révélation de la phosphatase acide (Refaat, 2014).

Un autre marqueur pour identifier le sperme est la protéine P30 qui est un antigène spécifique de la prostate (PSA). L'avantage de l'utilisation du PSA par rapport à la réaction impliquant la phosphatase acide est que le PSA est produit indépendamment de la production de spermatozoïdes, il peut donc être utilisé pour les deux échantillons spermatique et azospermique. Un test définitif implique la coloration des spermatozoïdes et leur visualisation à l'aide d'un microscope à haute puissance (Goodwin et al., 2007).

Les techniques de coloration aident grandement l'œil exercé à distinguer les spermatozoïdes à partir des matières étrangères telles que les cellules épithéliales.

La technique de coloration la plus couramment rencontrée utilise le picroindigocarmin (PIC) et le colorant Nuclear Fast Red, elle est familièrement appelée « **Christmas tree stain** » et a été spécifiquement développée pour la visualisation des spermatozoïdes.

Les parties des spermatozoïdes sont singulièrement colorées et contrastent avec les couleurs prises par les cellules épithéliales:

- Les têtes des spermatozoïdes, ovoïdes de forme, se retrouvent avec la portion antérieure rose et la partie postérieure rouge ou violet foncé et souvent brillante (Figure 4).
- Les queues des spermatozoïdes se colorent en jaune-vert avec la pièce intermédiaire en bleu.
- Les cellules épithéliales prennent également la tâche et apparaissent en bleu-vert avec des noyaux rouges (Figure 5) (Stuart et al., 2014).

Les colorants utilisés en microscopie photonique sont des substances organiques naturelles ou synthétiques destinées à donner une coloration durable aux matières qu'ils imprègnent. La plupart des colorants utilisés en microscopie ont été mis au point par des fabricants de vêtements au milieu des années 1800. De nombreux composés utilisés comme colorants portent une charge négative (colorant acides) ou positive (colorants basiques); dans les tissus, ils se lient aux macromolécules de charge opposée (Marieb et al., 2014).

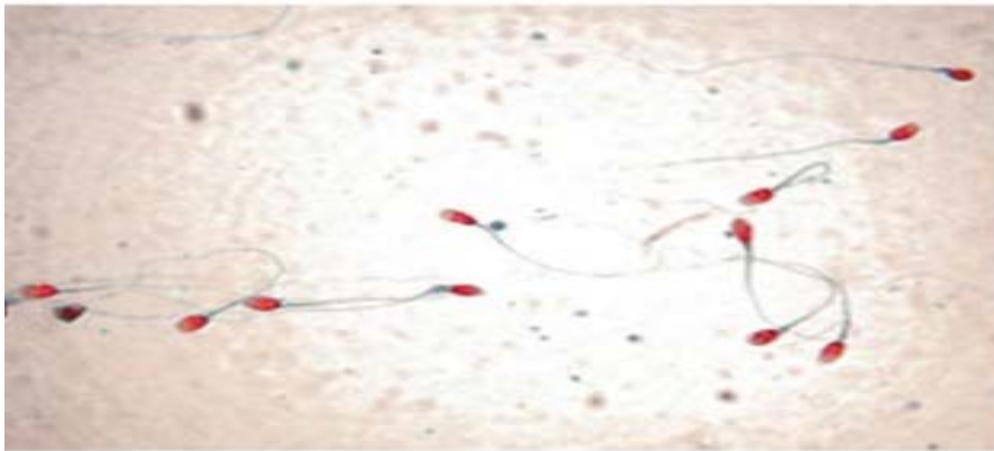


Figure 4 : Spermatozoïdes humains révélés par « Christmas tree stain » (Nuclear Fast Red et picroindigocarmin), grossissement d'origine 1000x (Stuart et al., 2014)

I.14 Les prélèvements en vue de l'identification

Le prélèvement doit être réalisé à l'aide d'écouvillons vaginaux, buccaux, anaux ou cutanés en fonction du contexte. Des écouvillons seront prélevés sur chaque site d'intérêt. Ils seront idéalement séchés avant d'être réenchâssés. Cependant, en cas d'activité importante et de va et vient dans la pièce, il sera préférable de les réenchâsser sans délai pour limiter le risque de contamination par un autre ADN.

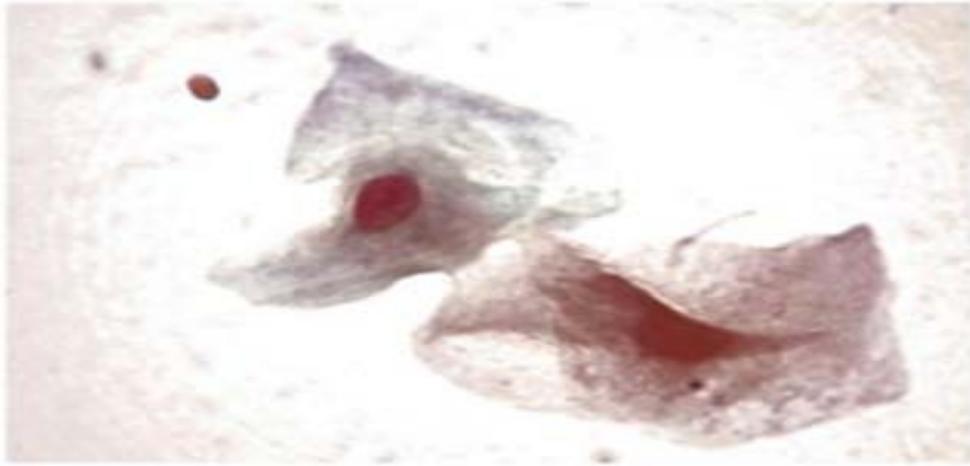


Figure 5 : Spermatozoïde humain et les cellules épithéliales nucléées révélées par « Christmas tree stain » (Nuclear Fast Red et picroindigocarmin), grossissement d'origine 1000x (Stuart et al., 2014)

Si on ne peut les sécher, on se doit de les mettre immédiatement en congélation. Il faut toutefois noter que la décongélation accélérée provoque des phénomènes de lyse néfastes de l'ADN. Des résultats d'excellente qualité ont été obtenus en réalisant des lavages vaginaux ayant subi une congélation.

En pratique, si la chaîne du froid n'est pas respectée, ce type de prélèvement par lavage donne des résultats non fiables. Le prélèvement de la victime (sang sur n'importe quel tube, salive, carte FTA des enquêteurs) est indispensable pour en avoir le profil génétique qui permettra de faire la part de la contribution de l'ADN de la victime et de celle du violeur dans un mélange (de Mazancourt et al., 2006).

I.15 Détection des spermatozoïdes (examen cytologique)

L'examen au microscope optique devrait être systématique à partir des écouvillons prélevés sur les victimes d'agression sexuelle. Sur le plan technique, l'examen cytologique nécessite la réalisation de frottis avec étalement sur lame et coloration par la technique de Papanicolaou (de Mazancourt et al., 2006)..

Il faut d'abord faire une digestion enzymatique des cellules épithéliales de la victime par la protéinase K, suivie d'une cyto centrifugation qui facilite l'observation nette des spermatozoïdes qui sont petits par rapport aux cellules épithéliales. Sachant qu'à cette étape de digestion les spermatozoïdes sont dépourvus de flagelles qui se dégradent par le PK (de Mazancourt et al., 2006).

I.16 L'isolement de l'ADN des taches de sperme

Chez une personne normale le nombre de spermatozoïdes est de 20 à 120 millions par mL d'éjaculat. Un rendement de 100-300 pg d'ADN par mL d'éjaculat peut être attendu.

En cas d'azoospermie, l'éjaculat contient environ 5000 globules blancs par mL, ce qui peut être suffisant pour la réalisation d'une PCR fiable (Hochmeister, 1995).

I.17 Le challenge de la lyse différentielle

Une fois que l'examen cytologique des spermatozoïdes est trouvé positif, on peut poursuivre les analyses et avoir les empreintes génétiques de l'auteur du viol. L'étape de séparation des cellules et d'extraction d'ADN de la trace est l'étape la plus difficile. En effet, les échantillons biologiques en mélange sont en quantité souvent 5000 fois inférieure à ceux ordinairement adressés aux laboratoires hospitaliers.

Il faut prendre en considération le temps écoulé entre le rapport en cause et le prélèvement de l'échantillon. De même, faire une extraction d'un même type cellulaire n'est pas aussi difficile qu'une extraction d'ADN d'un mélange de cellules de la victime et de l'auteur du viol, ce qui rend la séparation des cellules spermatiques et épithéliales une étape cruciale en cas de prélèvement vaginaux. Si le nombre de spermatozoïdes est minoritaire, leurs caractéristiques génétiques peuvent ne pas apparaître après analyse (de Mazancourt et al., 2006).

I.18 Causes pouvant être à l'origine de l'absence de spermatozoïdes dans des prélèvements de victimes de viols

- Lorsque l'intervalle de temps après l'acte d'agression sexuelle est important (de quelques heures à plusieurs heures).
- Lorsque l'agresseur a une azoospermie, une oligospermie, une vasectomie ou une orchidectomie.
- En cas de pénétration sans éjaculation.
- En cas de pénétration digitale.
- L'utilisation de préservatif.
- L'utilisation de toilette après le rapport.
- L'utilisation de spermicides.

- En cas de menstruations.
- En cas d'inflammation vaginale

Par ailleurs, dans la bouche, les spermatozoïdes sont rapidement détruits par les enzymes salivaires, et dans l'anus, ils sont rapidement détruits par les enzymes bactériennes (de Mazancourt et al., 2006).

I.19 Les mélanges d'ADN

En cas d'agression sexuelle, les prélèvements vaginaux contiennent à la fois des cellules de la victime et de son agresseur. La mise en évidence est possible car on retrouve plus de deux allèles pour un STR. Pour la détermination du profil ADN de chacun, on doit réaliser une extraction différentielle qui, dans un premier temps se déroule dans des conditions « douces » afin d'obtenir l'ADN des cellules épithéliales féminines; puis dans un deuxième temps, grâce à des agents chimiques plus agressifs notamment le DTT (1,4-Dithiothreitol) détruisant la membrane des spermatozoïdes ce qui permet l'extraction de l'ADN nucléaire des cellules masculines.

Il est donc possible d'obtenir de façon distincte le profil ADN des spermatozoïdes et celui des cellules féminines à partir d'un mélange. Si l'ADN est en petite quantité, représentant moins de 10% du mélange, il peut être difficile à mettre en évidence. Si l'ADN minoritaire est d'origine masculine, il faut réaliser une analyse des marqueurs du chromosome Y, procédure la plus performante dans ce genre de situation (Mansuet-Lupo et al., 2007).

I.20 Le chromosome Y

Les STR de ce chromosome sont étudiés dans un test de paternité; dans le cas où l'enfant est de sexe masculin et que les STR des autosomes sont incompatibles, on pense à des mutations qui se présentent, et puisque le fils possède les mêmes allèles que son père, le chromosome Y se transmet sous forme d'haplotype (Tableau 2) (Mansuet-Lupo et al., 2007).

Le tableau 2 montre le résultat dans le cadre d'une recherche de paternité de 16 marqueurs du chromosome Y chez un père putatif et un enfant. On confirme la paternité car tous les marqueurs sont identiques entre le père et le fils. Les deux allèles pour le marqueur DYS385 correspondent à une duplication allélique, normale à ce locus. Les STR Y ne

permettent donc pas d'identifier un individu, mais au moins une lignée paternelle (Mansuet-Lupo et al., 2007).

Tableau 2 : Analyse du polymorphisme du chromosome Y

Marqueur	Père	Fils
DYS465	15	15
DYS389I	12	12
DYS390	24	24
DYS389II	29	29
DYS458	14	14
DYS19	13	13
DYS385	17_19	17_19
DYS393	13	13
DYS391	10	10
DYS439	10	10
DYS635	22	22
DYS392	11	11
Y_GATA_H4	11	11
DYS437	14	14
DYS438	10	10
DYS448	20	20

Dans les affaires d'agressions sexuelles, les STRY apportent surtout des informations supplémentaires pour la discrimination de deux ou plusieurs agresseurs (de Mazancourt et al., 2006).

I.21 Méthodes d'extraction de l'ADN

L'ADN est la molécule essentielle de tous les organismes vivants. Elle porte l'information génétique faisant d'un organisme ou d'une cellule ce qu'elle est.

L'extraction de cette molécule à partir d'un matériel biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité des débris cellulaires. En général, les méthodes les plus utilisées sont l'extraction organique au phénol-chloroforme et l'extraction différentielle.

I.21.1 Méthode Organique (au Phénol-Chloroforme)

L'extraction organique, parfois appelée extraction au phénol-chloroforme, est utilisée depuis de nombreuses années pour l'extraction d'ADN de poids moléculaire élevé à partir de presque tous les types d'échantillons.

Elle implique l'addition en série de plusieurs produits chimiques. Au début, le sodium dodécyl sulfate (SDS) et la protéinase K sont ajoutés pour briser et ouvrir les membranes cellulaires et décomposer les protéines qui protègent les molécules d'ADN alors que ces dernières sont dans les chromosomes. Ensuite, un mélange phénol-chloroforme est ajouté pour séparer les protéines de l'ADN. Ce dernier est plus soluble dans la portion aqueuse du mélange organique aqueux et l'ajout d'éthanol en induit sa précipitation.

Bien que cette méthode fonctionne pour la récupération d'ADN de poids moléculaire élevé, elle nécessite du temps et l'utilisation de produits chimiques dangereux, exige le transfert de l'échantillon entre des tubes multiples, ce qui augmente le risque d'erreurs ou de contamination (Butler, 2011).

I.21.2 Extraction différentielle

L'extraction différentielle (Figure 6), décrite en 1985 par Gill et ses collègues, est une version modifiée de la méthode d'extraction organique qui sépare les cellules épithéliales des spermatozoïdes.

Cette méthode est couramment utilisée de nos jours par les laboratoires de criminalité médico-légale pour isoler la fraction féminine de la fraction masculine dans les cas d'agressions sexuelles où nous avons un mélange d'ADN des deux sexes.

La séparation de la fraction masculine permet d'interpréter beaucoup plus facilement le profil ADN de l'auteur dans une affaire de viol. La procédure d'extraction différentielle implique préférentiellement la rupture des cellules épithéliales féminines par l'incubation des deux fractions avec une protéinase K mélangée avec le SDS. Les noyaux des spermatozoïdes sont par la suite lysés par un traitement contenant un mélange de SDS, de protéinase K et de dithiothréitol (DTT) qui est responsable de la rupture des ponts disulfures des protéines qui composent les membranes des spermatozoïdes (Butler, 2011).

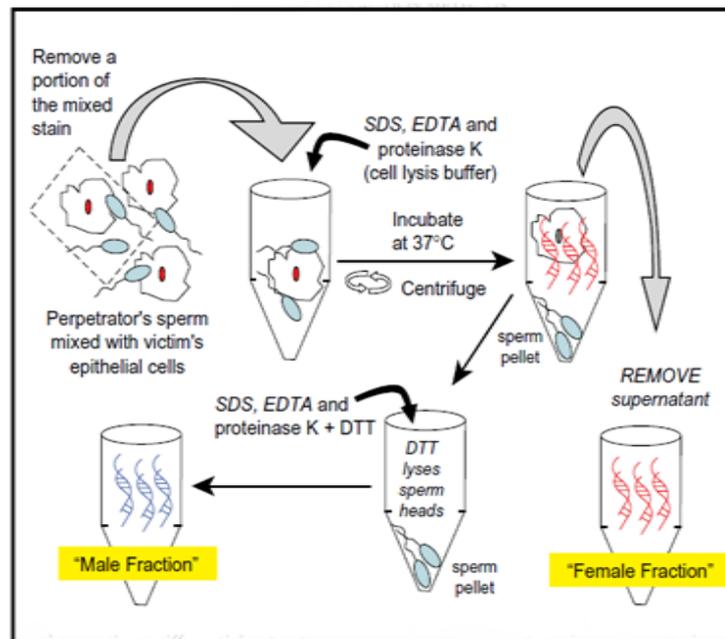


Figure 6 : Processus d'extraction différentielle utilisé pour séparer les spermatozoïdes des cellules épithéliales féminines (Butler, 2011).

I.22 Real Time PCR ou PCR en Temps Réel

I.22.1 Principe

La PCR en temps réel (Figure 7) combine l'amplification avec la détection et la quantification d'un signal fluorescent (Poitras et al., 2002). Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes :

- Phase de bruit de fond

La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond et donc la fluorescence générée.

- Phase exponentielle

La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.

- Phase de plateau (ou de saturation)

Certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle (Poitras et al., 2002).

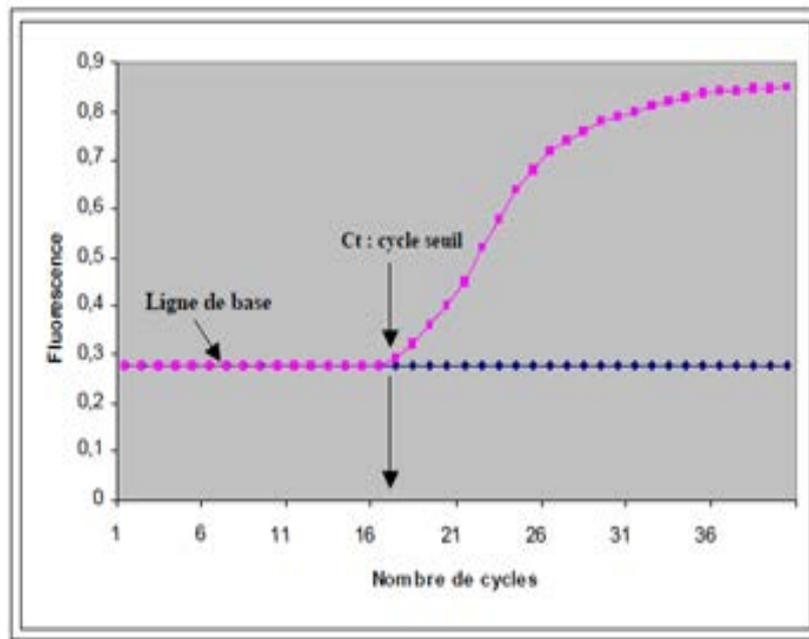


Figure 7 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles : l'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base (Poitras et al., 2002).

I.22.2 Principe de la sonde Taq Man

C'est la première chimie qui a été utilisée avec l'instrument précurseur qu'a été le 7700. La sonde Taqman (Figure 8) est spécifique d'une partie interne au fragment d'ADN amplifié. Cette sonde est marquée en 5' par une molécule fluorescente appelée Reporter et en 3' par le Quencher. De par sa proximité, le Quencher absorbe la fluorescence du Reporter.

Au cours de la polymérisation l'activité 5'>3' de la Taq polymérase dégrade la sonde Taqman, donc le Reporter n'étant plus attaché au Quencher, son émission de fluorescence est augmentée. La dégradation de la sonde est proportionnelle à l'augmentation de la fluorescence du Reporter et proportionnelle au nombre de copies effectuées (Tran, 2008).

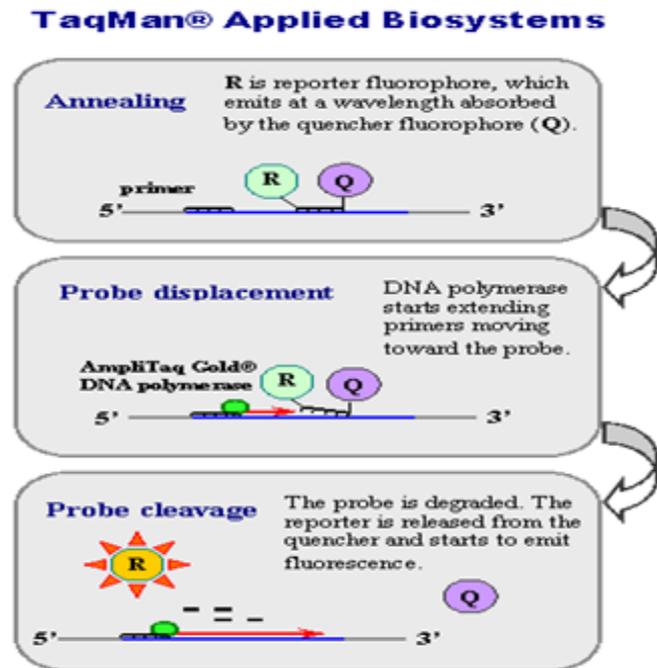


Figure 8 : Le principe de la sonde TaqMan (NCBI) (Tran, 2008).

I.23 Polymerase Chain Reaction(PCR)

I.23.1 Principe

La PCR permet en quelques heures la synthèse de milliers de copies d'une séquence spécifique inférieure ou égale à 2 kb d'ADN à l'aide d'une enzyme, la Taq polymérase (Grunenwald, 2014).

I.23.2 Les étapes de la PCR

Environ une trentaine de cycle sont en principe effectués dans une expérience de PCR classique. Chaque cycle comprend trois étapes de quelques secondes, fonction de la température :

La dénaturation

L'ADN template est chauffé à 94°C, ses deux brins se séparent (dénaturation).

L'hybridation (50-65°C)

En diminuant la température, les amorces s'apparient (s'hybrident) par complémentarité à leurs séquences cibles sur l'ADN.

L'élongation (72°C)

A cette température, la Taq synthétise les brins d'ADN complémentaires en ajoutant des desoxynucléotides triphosphates à la suite des amorces. Le temps d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier et de la vitesse de polymérisation de l'enzyme. La Taq ajoute environ 1000 nucléotides par minute (Iglesias, 2009).

I.24 L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (CE) est la principale méthode utilisée par les laboratoires de police scientifique pour séparer et caractériser les allèles des STR. Sa particularité réside dans le fait qu'elle est réalisée dans un tube presque aussi fin qu'un cheveu, aussi appelé capillaire. Grâce à cette technique, on peut obtenir un résultat plus rapide, puisqu'on peut travailler à des tensions plus élevées de quelques dizaines de milliers de volts (Coquoz et Taroni, 2006).

L'utilisation d'une solution visqueuse de polymère est nécessaire pour obtenir un effet de tamisage moléculaire. Les molécules sont ensuite détectées par absorption, fluorescence ou encore spectrométrie de masse.

La difficulté réside dans le fait qu'on ne peut analyser qu'un seul échantillon par capillaire; c'est pourquoi des appareils multi capillaires ont été créés, ils peuvent réaliser une centaine d'analyses en parallèle (Coquoz et Taroni, 2006).

I.25 Profils génétiques

Les troupes reçues au laboratoire d'identification génétique permettent de réaliser une caractérisation complète d'un profil génétique. L'analyse des microsatellites implique, après réaction d'amplification, une séparation des fragments amplifiés afin de déterminer leur taille (figure 9).

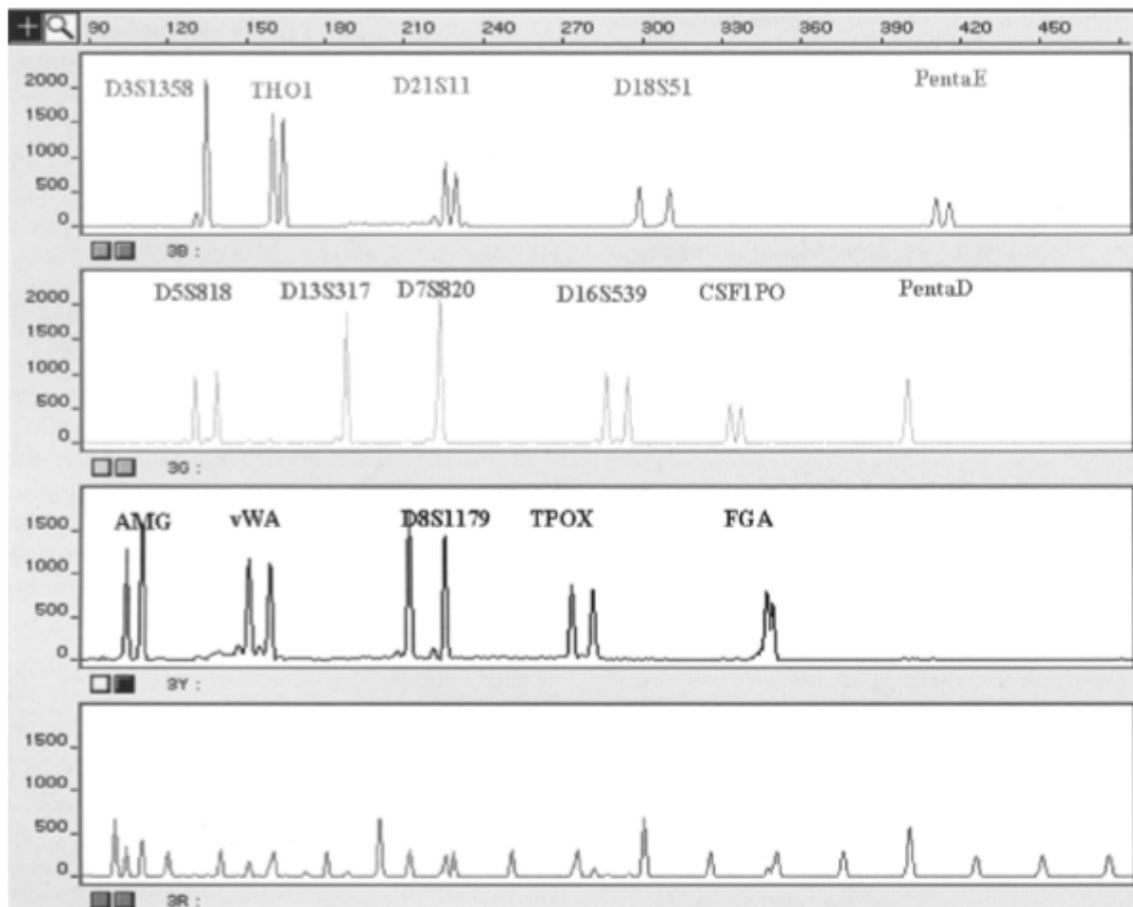


Figure 9 : Exemple d'empreinte génétique.

Les STR sont amplifiés à l'aide d'amorces fluorescentes. Les 4 pistes correspondent à une séparation artificiellement réalisée par le logiciel d'analyse.

La piste inférieure correspond au marqueur de taille qui permet ensuite de décrire chaque allèle selon une nomenclature internationale.

Les indications D3S1358, TH01 etc. correspondent aux noms de codes des STR (de Mazancourt et al., 2006).

L'analyse d'une quinzaine de microsatellites permet aujourd'hui de discriminer un sujet parmi plusieurs centaines de milliards, on peut par conséquent affirmer pratiquement avec certitude l'identité de l'auteur d'une trace biologique, ou une relation de filiation.

Cette puissance de discrimination autorise la mise en place de fichiers d'empreintes génétiques et l'identification par ces fichiers des auteurs de faits (de Mazancourt et al., 2006).

II. MATERIEL ET METHODES

Le travail présenté dans cette partie a été réalisé au Laboratoire d'Identification Génétique du Département de Biologie de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale (INCC/GN) à Bouchaoui, Alger.

L'objectif a été d'optimiser le protocole d'extraction différentielle d'ADN à partir d'échantillons prélevés sur une victime d'agression sexuelle. Les échantillons de travail devant présenter la plus grande similarité avec ceux prélevés dans des cas réels d'agressions sexuelles, des frottis jugaux ont été effectués sur différentes personnes consentantes, volontaires et anonymes de sexe féminin in situ. Un volume bien déterminé de sperme est déposé sur chaque frottis, les mélanges sont ensuite traités suivant un protocole optimisé.

II.1 Préparation des échantillons

II.1.1 Matériel

II.1.1.1 Matériel biologique

Des échantillons de sperme d'un donneur connu sont mis en tubes et stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation dans les diverses étapes de ce travail.

Au vu de leurs similitudes histologiques et de leur perméabilité aux substances chimiques (Hulme et al., 2012), les échantillons des cellules buccales de plusieurs personnes volontaires ont été utilisés en remplacement des cellules vaginales. Les frottis jugaux sont effectués à l'aide d'écouvillons de prélèvements en fibre et séchés pendant toute une nuit.

II.2 Première étape

Cette 1^{ère} étape consiste en une coloration des cellules épithéliales et des spermatozoïdes pour les observer ensuite au microscope, la méthode utilisée est dite « Christmas tree stain ».

II.2.1 Préparation des échantillons de sperme et de cellules buccales

Trois échantillons de frottis buccaux sont séchés pendant toute une nuit, puis placés dans un tube de 2,2 mL. Ils sont mis en solution par ajout de 200 μL d'eau ultra pure puis passés au vortex un peu plus de 30 secondes pour libérer les cellules épithéliales.

Une 1^{ère} dilution de sperme au $1/10^{\text{ème}}$ est opérée par ajout de 10 μL de sperme à 90 μL d'eau ultra pure. La solution est passée au vortex 30 secondes.

Les trois solutions de cellules épithéliales sont passées au vortex puis 10 μL de chacune est déposée sur une lame de microscope. Le même volume est prélevé de la solution de sperme dilué au $1/10^{\text{ème}}$ pour être déposé sur la quatrième lame. Afin de fixer le matériel biologique sur la lame en verre, les lames sont placées sur une plaque chauffante à 90°C .

II.2.2 Coloration des cellules

Les solutions de coloration ont été préparées à base de poudre dissoute à l'eau ultra pure (Annexe 1).

Trente μL de solution d'iode de Gram (Gram's iodine) sont incorporés aux traces séchées des différentes lames. Après 1 à 3 mn, les lames sont rincées à l'eau ultra pure.

Trente μL de liquide Fast Red sont incorporés à la tâche puis la lame est de nouveau rincée après 5 à 20 min.

Trente μL de micro-indigocarmin (sulfoindigotate de sodium en association avec l'acide picrique) y sont de nouveau incorporés, les lames sont ensuite secouées 15 à 30 s puis rincées à l'éthanol absolu.



Figure 10 : Les solutions de coloration.

II.2.3 Observation microscopique des cellules épithéliales et des spermatozoïdes

L'huile de paraffine est ajoutée (huile à émersion \approx 1 goutte) aux traces séchées et colorées sur lames qui vont être recouvertes de lamelles.

II.3 Deuxième étape

- **Série A**

Le but, cette fois-ci, est d'obtenir des cellules épithéliales et spermatisées moins concentrées pour en faciliter le dénombrement.

- La solution initiale des cellules épithéliales est diluée au $1/10^{\text{ème}}$ par prélèvement de 10 μL rajoutés à 90 μL d'eau ultra pure. La solution est passée au vortex environ 30 s.

- La solution initiale de sperme au $1/10^{\text{ème}}$ est diluée au $1/100^{\text{ème}}$ par prélèvement de 10 μL rajoutés à 90 μL d'eau ultra pure. La solution est passée au vortex environ 30 s.

Trois lames sont préparées; sur chacune d'elles est déposée une goutte de 10 μL d'une des solutions des cellules épithéliales au $1/10^{\text{ème}}$.

Trois autres lames sont préparées, sur chacune d'elles est déposée une goutte de 10 μL de la solution de sperme au $1/100^{\text{ème}}$.

Sur 2 autres lames est déposé le mélange de 10 μL de la solution diluée des cellules épithéliales et 10 μL de la solution diluée de sperme. Le tout est soigneusement homogénéisé en mélangeant les deux types de cellules à l'aide d'une micropipette.

Sur 2 autres lames va être déposé le mélange de 5 μL de la solution diluée des cellules épithéliales et 5 μL de la solution diluée de sperme. Les deux fractions sont ensuite mélangées sur lame, de la même façon, avec une micropipette.

Les opérations de la 1^{ère} étape (II.2.2 et II.2.3) sont répétées à l'identique.

- **Série B**

Le but consiste ici à tester la fragilité des deux fractions.

Six taches sont déposées sur 6 lames en utilisant cette fois-ci les mêmes solutions restées 24 heures à température ambiante afin d'en tester la sensibilité.

Dix μL de solution des cellules épithéliales au $1/10^{\text{ème}}$ sont déposés sur une lame.

Cinq μL de solution des cellules épithéliales et 5 μL de solution de sperme au $1/100^{\text{ème}}$ sont déposés sur 3 différentes lames, un mélange est opéré sur lame par micropipette.

Cinq μL de solution de sperme au 1/100^{ème} sont déposés sur 2 autres lames.

Dix μL de solution de sperme sont déposés sur 2 dernières lames.

II.4 Troisième étape

Cette étape consiste en la préparation du tampon de travail utilisé dans la 1^{ère} phase de digestion (la lyse douce) et son utilisation dans la lyse des échantillons préparés au laboratoire. Le protocole suivi est celui préconisé par l'INCC (annexe 2).

Chaque solution est préparée de façon indépendante selon les spécifications du tableau (annexe 2) puis complétée à l'eau ultra pure. Un barreau magnétique et une plaque chauffante sont utilisés afin de dissoudre la poudre. Chaque solution est filtrée à l'aide d'un filtre de Nalgen.

Le volume total de tampon est obtenu après un mélange des quatre solutions (EDTA, SDS, Tris HCl, NaCl et NaOH), le pH est ajusté à 8,5. Le tampon est conservé à température ambiante.

- **Série A**

Ici, c'est l'optimisation du temps d'incubation qui est recherché.

Huit échantillons sont préparés dont 5 sont des mélanges effectués par dépôt de 3 μL de sperme par micropipette sur le frottis buccal de chaque échantillon de façon à y être absorbé.

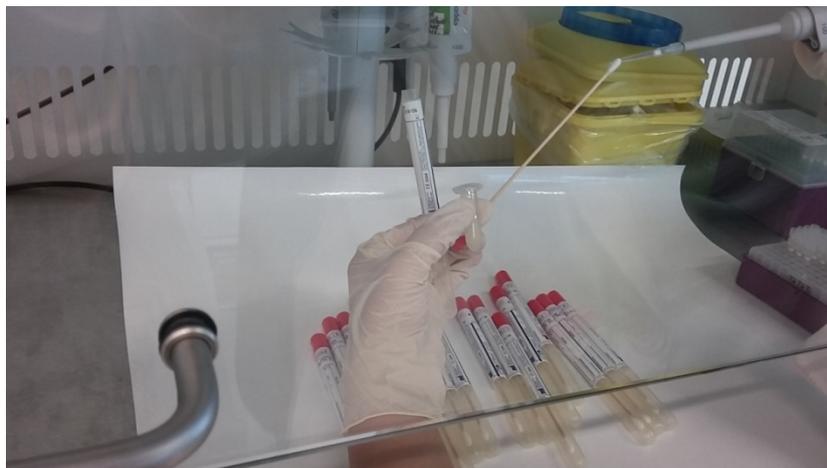


Figure 11 : Manière de déposer le sperme sur le frottis buccal.

- Les écouvillons sont placés dans des tubes de 1,6 mL.
- Rajout de 300 μ L de tampon d'extraction et 30 μ L de protéinase K.
- Passage des tubes au vortex pendant 30 s et incubation dans un bain marie agitateur à 56°C pendant 10 mn.
- Un 1^{er} prélèvement de 30 μ L de chaque tube est effectué pour observation microscopique.
- Les échantillons sont de nouveau incubés 20 et 30 mn.
- Un échantillon (E-) est préparé en plaçant l'écouvillon dans le tampon sans ajout de la protéinase K.
- Un échantillon (E+) est préparé en plaçant l'écouvillon du frottis buccal dans un tube contenant 300 μ L d'eau ultra pure avec ajout de 30 μ L de protéinase K.
- Un autre échantillon (S+) est préparé par dépôt de 3 μ L de sperme sur un écouvillon par micropipette de façon à ce qu'il soit absorbé avec ajout de 300 μ L d'eau ultra pure en place du tampon et 30 μ L de protéinase K pour en tester l'effet sans tampon.
- L'observation au microscope est effectuée après coloration au « Christmas tree stain ».
- Les tubes sont passés au vortex pendant 30 s.
- Les échantillons sont ensuite incubés dans un bain marie agitateur à 56°C pendant 10 mn.
- Un volume de 30 μ L est prélevé de chaque tube pour observation microscopique.
- Une réincubation des échantillons est réalisée, l'opération est refaite à 20 et 30 mn.

- **Série B**

Il nous a semblé que le volume de la PK est élevé ce qui peut être agressif pour les spermatozoïdes qui peuvent être en faible volume. On augmente donc dans cette étape le volume du sperme et on diminue le volume de la PK.

Une même série a été effectuée en répétant la même opération comme celle effectuée pour les 5 premiers échantillons de la série A mais cette fois -ci avec 20 μ L de sperme et 10 μ L de PK.

Remarque :

- Les solutions de coloration sont de nouveau préparées pour éviter une possible contamination.
- Le pH du tampon est aussi contrôlé pour s'assurer de sa stabilité tout au long des essais.

II.5 Quatrième étape

Préparation de 2 nouvelles séries pour tester l'effet de l'écouvillon sur la libération des spermatozoïdes et des cellules épithéliales

- **Série A**

Vingt μL de sperme sont ajoutés à 300 μL d'eau ultra pure (S1).

Vingt μL de sperme sont déposés sur écouvillon puis mis dans un tube contenant 300 μL d'eau ultra pure (S+).

Vingt μL de sperme sont déposés sur écouvillon. Celui-ci va être coupé au bistouri puis placé dans un tube contenant 300 μL d'eau ultra pure (S).

- **Série B**

Un 1^{er} frottis jugal est placé dans un tube contenant 300 μL d'eau ultra pure.

Un 2^{ème} frottis jugal est préparé, l'écouvillon est coupé au bistouri.

Les 5 échantillons des 2 séries sont passés au vortex, pour libérer les cellules des fibres de coton de l'écouvillon et les homogénéiser. Une goutte de chaque échantillon est déposée sur lame, séchée sur plaque chauffante puis colorée au « Christmas tree stain ».

II.6 Cinquième étape

Deux nouvelles séries A et B de 9 échantillons chacune sont préparées.

- **Série A** : E1-E9 (frottis jugaux).
- **Série B**: S1-S9

- 20 μL de sperme sont déposés sur écouvillon à l'aide d'une micropipette de façon à ce qu'ils soient absorbés. Chaque échantillon est placé dans un tube.
- Trois cents μL de tampon et 10 μL de PK y sont incorporés.
- Le temps d'incubation est testé dans la première phase de lyse pour les cellules épithéliales et les spermatozoïdes (de façon séparée).
- * **Frottis jugaux (échantillons de cellules épithéliales)** : 3 échantillons sont incubés à 5 mn (E1-E3), 3 à 10 mn (E4-E6) et les 3 derniers à 15 mn (E7-E9) dans un bain marie agitateur à 56°C.
- * **Echantillons du sperme** : 3 échantillons sont incubés à 5 mn (S1-S3), 3 à 10 mn (S4-S6) et les 3 derniers à 15 mn (S7-S9) dans un bain marie agitateur.
- Les écouvillons sont placés dans des spins basket puis centrifugés à 1000 g pendant 5 mn.
- On retire les surnageants puis on garde environ 50 μL dans chaque tube afin d'éviter de pipeter la tâche blanchâtre se trouvant au fond.
- Le culot de chaque échantillon est passé au vortex.
- L'examen au microscope se fait après dépôt de 5 μL de chaque échantillon sur lame, séchage à 56°C et coloration.

II.7 Sixième étape

Deux séries sont réalisées pour tester l'efficacité de la PK sur la digestion des cellules épithéliales et des spermatozoïdes.

- Première série (A) : on utilise la PK avec le tampon
 - Deuxième série (B) : on utilise la PK avec de l'eau ultra pure (en place du tampon).
 - **Série A** (6 échantillons)
- Le 1^{er} échantillon (S) est préparé par dépôt de 20 μL de sperme sur écouvillon.
 - les 5 autres (ES1-ES5) sont préparés par dépôt de 20 μL de sperme sur des frottis jugaux.

Ces échantillons sont placés dans des tubes contenant 300 μL de tampon et 10 μL de PK puis passés au vortex.

- **Série B**

Mêmes préparations que pour la série A précédente : échantillons S' et ES1'-ES5'.

- Les 2 séries sont incubées 15 min à 56°C.
- Les écouvillons sont placés dans des spins basket puis centrifugés à 1000 g pendant 5mn.
- On retire les surnageants puis on garde environ 50 µL dans chaque tube comme précédemment.
- Le culot de chaque échantillon est passé au vortex.
- L'examen au microscope se fait après dépôt de 5 µL de chaque échantillon sur lame, séchage à 56°C et coloration.

II.8 Septième étape

Le tampon utilisé pour séparer la fraction épithéliale de la fraction spermatique n'ayant pas donné les résultats escomptés, un tampon modifié proposé par l'INCC est utilisé pour la première étape dite « étape douce ». Il contient les mêmes composants (au même pH) mais à des concentrations différentes.

Un autre tampon est utilisé pour le lavage des spermatozoïdes après la 1^{ère} étape de digestion (au pH 7,5).

II.8.1 Préparation du nouveau tampon

* **Tampon de lyse** (proposé par l'INCC) : 10 mM tris HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl et 1% SDS à pH 8,5.

- Après pesage des 4 composants puis mise dans un bécher, ajout d'eau ultra pure à un volume de 500 mL (annexe 2). Après dissolution sur plaque chauffante, le pH est ajusté (par ajout de NaOH à 8,5).

* **Tampon de lavage** : 10 mM tris HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl et 1% SDS à pH 7,5.

II.8.2 Procédure de la lyse cellulaire (étape douce)

Cette étape consiste à tester l'efficacité du nouveau tampon

- Sur 5 prélèvements de frottis jugaux sont déposés 20 µL de sperme pour y être absorbés.

- Les écouvillons sont mis en tube avec 300 μL de tampon et 10 μL de protéinase K.
- Les échantillons sont passés au vortex, puis mis dans un agitateur pendant 15 mn pour en libérer le maximum de cellules (épithéliales et spermatisques). Ils sont ensuite incubés à 56°C pendant 15 mn dans un bain marie agitateur.
- Les spins baskets sont utilisés pour assurer la filtration de la totalité du contenu de l'écouvillon au moment de la centrifugation (1000 g pendant 5 mn).
- Les surnageants (fractions épithéliales) sont retirés, placés dans des tubes et stockés à -20°C (50 μL sont conservés dans les tubes pour préserver la tache blanchâtre tout juste visible).

II.8.3 Etapes de lavage

- Cinq cents μL du tampon de lavage sont ajoutés aux culots.
- Les échantillons sont passés au vortex afin de détacher la tâche du fond des tubes (le contenu devient une suspension), puis centrifugés à 1000 g pendant 3 mn.
- Le surnageant est éliminé de chaque tube pour n'en garder qu'environ 50 μL .
- Cette étape de lavage est répétée 3 fois.
- Une goutte d'environ 3 à 5 μL de chaque échantillon est déposée sur lames qui seront séchées sur plaque chauffante, les taches résultantes colorées puis passées à l'examen microscopique.

II.9 Huitième étape : test de la pureté des échantillons traités par l'ancien tampon de digestion.

Les culots des échantillons traités avec l'ancien tampon dans la série A de la troisième étape et qui ont été stockés à -20°C sont récupérés. Ils subissent 3 lavages avec le même protocole que l'étape précédente.

- Une goutte d'environ 3 à 5 μL de chaque échantillon est déposée sur lames qui seront séchées sur plaque chauffante, les taches résultantes colorées puis passées à l'examen microscopique.

II.10 Neuvième étape

Cette étape consiste à tester le temps d'incubation dans le bain marie agitateur avec le nouveau tampon.

II.10.1 Etape de digestion douce

- Préparation de 15 échantillons par ajout de 10 μL de sperme aux frottis jugaux.
- Une 1^{ère} lyse est réalisée selon le même protocole que celui de la 7^{ème} étape.
- Trois groupes de 5 échantillons chacun sont incubés 5, 10 et 15 mn respectivement.
- Trois échantillons sont réalisés par ajout de 10 μL de sperme dans des tubes contenant 310 μL d'eau ultra pure. Ces échantillons sont utilisés comme références (S1+, S2+, S3+).
- Le tout est centrifugé, lavé 3 fois pour aboutir à des solutions à 2 fractions
 - a) Le surnageant considéré comme fraction épithéliale (ADN épithélial).
 - b) Le culot contenant les spermatozoïdes.

Une observation au microscope est opérée avec comptage des spermatozoïdes grâce à des cellules de Mallassez (hématocytomètre).

II.10.2 La fraction spermatique

Réactifs : protéinase K stockée à -20°C , Chelex 5% stocké à 4°C , DTT stocké à -20°C .

- **Méthode du travail**

- Deux cent μL de Chelex, 2 μL de PK, 7 μL de DTT sont ajoutés aux tubes contenant les culots (fraction spermatique). Même procédé pour les tubes de sperme pur.
- Un échantillon de contrôle positif (TEX S) est préparé en mélangeant 200 μL de Chelex à 2 μL de PK et 7 μL de DTT.
- Les échantillons sont passés au vortex pendant 30 s, incubés pendant 2 heures à 56°C au bain marie, puis passés de nouveau au vortex.
- Ils sont placés pendant 8 mn sur plaque chauffante réglée à 100°C puis de nouveau passés au vortex et centrifugés pendant 3 min à 13 000 g.

- Le surnageant contenant l'ADN des cellules spermatiques est récupéré dans des tubes de 1,5 mL, les culots contenant les billes de Chelex sont éliminés.
- Trois μL du surnageant récupéré sont prélevés de chaque échantillon pour l'étape de quantification de l'ADN des cellules spermatiques. Les restes du surnageant (extractomes) sont stockés à -20°C .

Remarque : Le Chelex est passé au vortex à chaque utilisation.

II.10.3 La fraction épithéliale

Réactifs : protéinase K stockée à -20°C , Chelex 5% stocké à 4°C .

- **Méthode de travail**

- Deux cent μL du Chelex et 10 μL de PK sont ajoutés aux tubes contenant les surnageants (fraction épithéliale).
- Un échantillon de contrôle positif (TEX E) est préparé en mélangeant 200 μL de Chelex à 10 μL de PK.
- Les échantillons sont passés au vortex pendant 30 s, incubés pendant 30 mn à 56°C au bain marie, puis passés de nouveau au vortex.
- Ils sont de nouveau incubés pendant 8 mn sur plaque chauffante à 100°C puis passés au vortex 10 s et centrifugés 3 min à 13 000 g.
- Le surnageant contenant l'ADN des cellules épithéliales est récupéré dans des tubes de 1,5 mL, les culots contenant les billes de Chelex sont éliminés.
- Le surnageant récupéré est destiné en l'état à la quantification.

II.10.4 Quantification par la RT-PCR

La quantification de l'ADN est réalisé par la RT-PCR en utilisant le Kit Quantifiler Human.

- **Réactifs**

- Master mixture : contient la Taq Gold polymérase, tampon, sels, MgCl_2 , dNTPs
- Primer mix : contient des oligonucléotides conçus pour amplifier un ensemble de loci STR, une de chaque paire d'amorces marquée avec un colorant fluorescent (Butler, 2011).

- ADN standard : mélange de fragments d'ADN synthétique de taille connue, marqués avec un colorant particulier (Coquoz et Taroni, 2006).

- **Méthode de travail**

1) Une série de différents dilutions de l'ADN standard a été préparée :

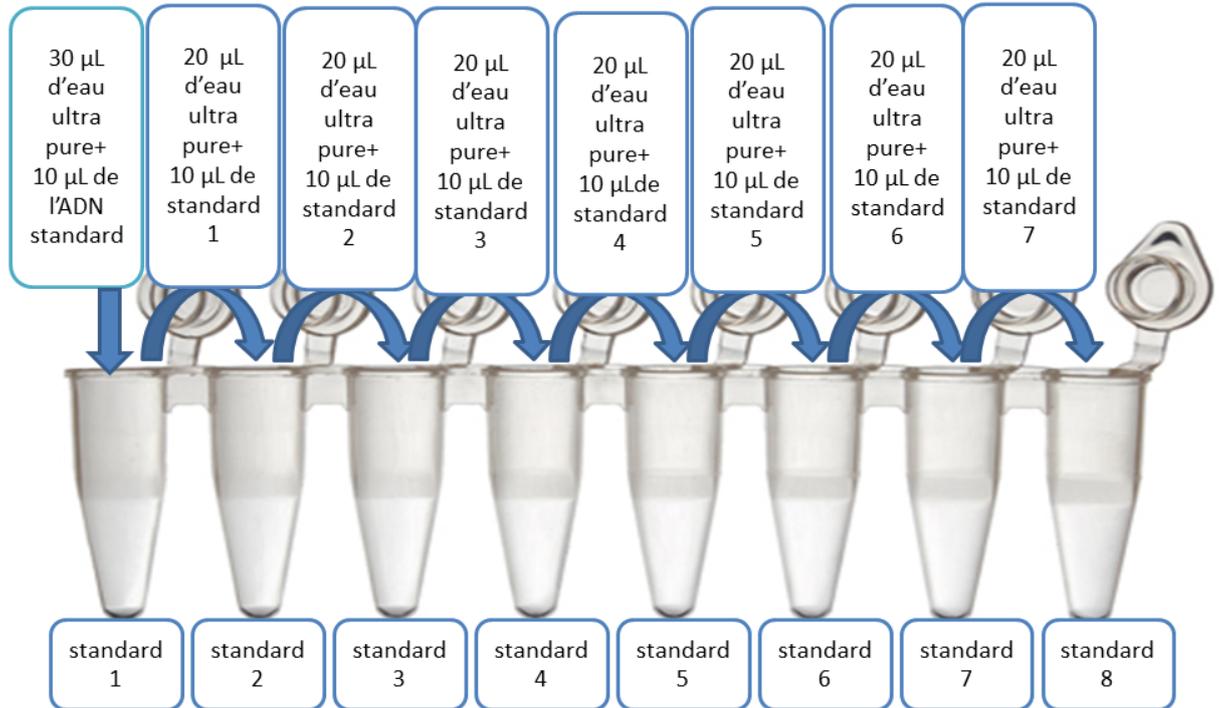


Figure 12 : La série des standards préparés

2) Préparation du réactif master mix : 12,5 mL de la réaction mix + 10, 5 de primer mix sont déposés dans un tube puis passés au vortex.

3) La préparation de la plaque de PCR :



Figure 13 : La plaque de la RT-PCR.

Les puits de la plaque sont remplis par le réactif master mix, les extractomes, les standards, les contrôles positifs (tex) et les contrôles négatifs (TQ). Le plan de travail est présenté en annexe 3).

4) Après remplissage de tous les puits, la plaque est recouverte par un plastique solide, centrifugée pendant 15 s, puis placée sur un autre portoir spécifique pour le lancement de la PCR.

Note : les produits de la RT-PCR sont stockés à 4°C.

II.11 Dixième étape (étape finale)

II.11.1 Etape de digestion douce

Même procédé qu'en II.10.1 mais avec 21 échantillons (3 groupes de 7)

II.11.2 Test de confirmation

Cette étape consiste à confirmer que toutes les cellules épithéliales ont été lysées.

Trois μL de chaque échantillon (fraction spermatique et sperme pur) sont déposés sur des lames qui sont séchées et colorées.

Une goutte d'huile de paraffine est déposée sur chaque lame qu'on recouvre d'une lamelle (pour éviter les bulles d'air). Les lames passent à l'examen microscopique.

II.11.3 Les dilutions pour le calcul du nombre de spermatozoïdes

Deux μL du culot (fraction spermatique) de chaque échantillon avec 18 μL d'eau ultra pure sont déposés dans des tubes de 1,5 mL afin d'en dénombrer les cellules spermatiques.

II.11.4 La fraction spermatique

Le même protocole que celui de la 9^{ème} étape y est appliqué (sous paragraphe II.10.2)

II.11.5 La fraction épithéliale

- La filtration de la fraction E

Le même protocole que celui de la 9^{ème} étape y est appliqué (sous paragraphe II.10.3) mais avec 50 μL seulement prélevés de chaque échantillon (les surnageants), mis en tube et

destinés en l'état à la quantification. Le reste de la fraction épithéliale est filtré dans des tubes Amicon afin d'en éliminer les impuretés et le reste du tampon.

Cette étape consiste à éliminer le maximum d'inhibiteurs de la RT-PCR en diminuant la concentration d'EDTA.

Environ 300 μL du reste de la fraction épithéliales sont mis en tube de type Amicon, complétés par 4 mL d'eau ultra pure puis centrifugés 7 mn à 13 000 g.

Deux cents μL de la fraction épithéliale purifiée de chaque échantillon sont mis en tube desquels 3 μL sont respectivement aliquotés et placés dans d'autres tubes pour l'étape de quantification.

Résultat : 42 échantillons de la fraction E destinés à la quantification dont 21 purifiés sur tubes Amicon.

II.11.6 Quantification par la RT-PCR :

Le même protocole que celui de la 9^{ème} étape y est appliqué. Le plan de travail est présenté en annexe 4.

II.11.7 L'étape de pré-amplification

Cette étape consiste en la préparation du milieu réactionnel d'amplification suivant des volumes bien définis pour chaque réactif selon les directives du manuel technique du kit Power Plex® ESI 16 System. Après dilutions par extractomes, 23 échantillons ont été choisis pour l'étape de pré amplification.

- **Réactifs utilisés**

Master Mix, primer mix, standard de taille.

- 1) Préparation du réactif master mix : 54 μL de la réaction mix et 27 μL de primer mix sont déposés dans un tube de 1,5 mL puis passés au vortex.

Deux échantillons contrôles sont préparés :

Le contrôle négatif qui permet de détecter une contamination éventuelle des réactifs. Cet échantillon ne doit contenir aucun ADN. Il est préparé en ajoutant 7 μL d'eau ultra pure à 3 μL de master mix.

Le contrôle positif qui permet d'estimer le taux d'erreur et de s'assurer des bonnes conditions de déroulement de la réaction d'amplification. Il est préparé en diluant 1 μL d'ADN contrôle (à $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) dans 349 μL d'eau ultra pure.

- **La méthode de travail**

- 1) Préparation de la plaque :

Le plan de travail est présenté en annexe 5.

Trois μL du réactif master mix sont placés dans chaque puits.

Sept μL d'ADN dilué y sont ajoutés près passage au vortex.

Après remplissage de tous les puits de la plaque, celle-ci est recouverte par un plastique solide. Après passage en centrifugeuse pendant 15 s, elle est placée dans le thermocycleur.

II.11.8 L'étape de post-amplification

Cette étape consiste en la séparation des STRs par le séquenceur. Son but est de dénaturer les fragments d'ADN en séquence monocaténares.

- **Réactifs**

Formamide : il permet de réduire la température de dénaturation de l'ADN (Popescu, 1998).

Standard de taille

Ladder : mélange artificiel des allèles communs présents dans la population humaine pour un marqueur STR particulier (Sajantila et al., 1992). Ils sont générés avec les mêmes amorces que les échantillons testés et donnent ainsi une taille de l'ADN de référence pour chaque allèle inclus dans l'échelle. Ces échelles alléliques servent de standard pour chaque locus STR.

- **Le protocole de préparation des échantillons pour l'électrophorèse capillaire**

- **Préparation du réactif**

Un tampon mixte est préparé par mélange de 340 μL de formamide et 34 μL de standard de taille (après l'avoir passé au vortex pendant 30 s)

- **La méthode de travail**

Le plan de travail est présenté en annexe 6.

Dépôt de 11 μL du tampon mixte dans chaque puits de la plaque avec ajout d'1 μL d'ADN d'un des échantillons.

Les puits vides sont remplis d'eau ultra pure (12 μL) afin d'éviter tout dommage aux capillaires (voltage très élevé).

- 1) Après remplissage de tous les puits, un septum plat, propre et sec de caoutchouc est fixé sur la plaque qui est brièvement centrifugée (≈ 15 s) (quick spin) afin d'en faire migrer le contenu vers le fond des puits et éliminer les bulles d'air.
- 2) La plaque est soumise à un choc thermique sur plaque chauffante à 95°C pendant 3 à 5 min pour en dénaturer les fragments amplifiés.
- 3) Elle est ensuite placée sur un support préalablement congelé à -20°C pendant 3 à 5 min (la chute brusque de température devant maintenir les fragments sous la forme dénaturée)
- 4) La plaque est ensuite recouverte d'un plastique solide avant d'être placée dans le séquenceur.
- 5) En dernière étape, elle passe dans un automate (électrophorèse capillaire)

II.11.9 Séparation et détection des fragments d'ADN amplifiés

Le séquenceur utilisé à l'INCC est l'ABI Prism 3130 XL Genetic Analyzer d'Applied Biosystems. Le système automatisé permet à la plaque comprenant les 96 puits d'être en vis-à-vis d'une tête à 16 capillaires disposés en parallèle et remplis d'un polymère POP 4 (Performance Optimised Polymere 4) de faible viscosité, jouant un rôle de tamis moléculaire. L'électrophorèse a lieu dans ces tubes capillaires sous un champ électrique de 3 kV pendant 5 s. Les données sont ensuite collectées par logiciel (Data Collection v3.0).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Résultats expérimentaux et discussion

La technique de coloration «Christmas tree strain» utilisée tout au long de ce travail nous a permis de mettre en évidence les cellules épithéliales et les spermatozoïdes pour chaque type séparé. Elle nous a aussi permis de bien distinguer ces 2 types de cellules lorsque ces dernières étaient mélangées, sans risque de confusion entre les noyaux des cellules épithéliales colorés en marron foncé et les têtes des spermatozoïdes colorés en rouge brillant.

Nos préparations des deux types de cellules E et S à différentes concentrations ont généré des échantillons similaires aux prélèvements vaginaux de cas d'agressions sexuelles qui, eux, peuvent être mélangés aux spermatozoïdes (fluide mixte) avec des cellules épithéliales majoritaires.

III.1.1 Première étape

Le passage à l'examen microscopique a montré un nombre énorme de cellules épithéliales juxtaposées et concentrées (Figure 14) et une saturation des spermatozoïdes (Figure 15).

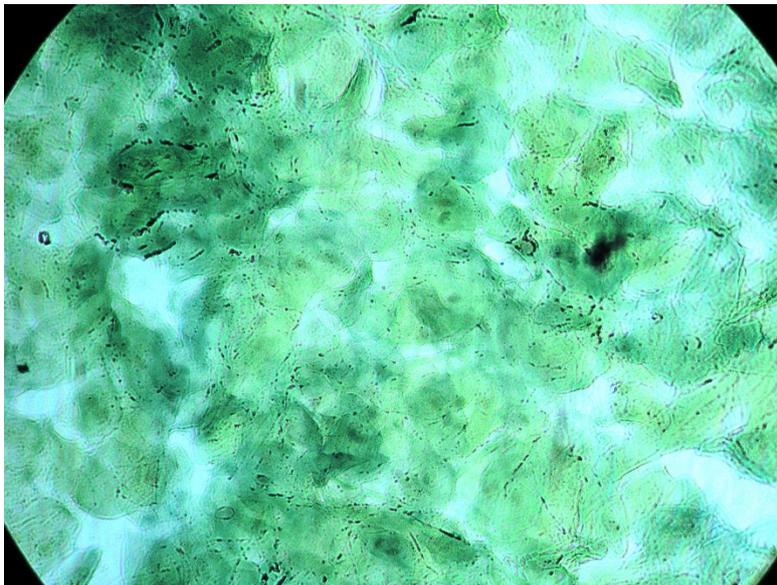


Figure 14 : Cellules épithéliales en solution observées sous microscope photonique au Gx40.

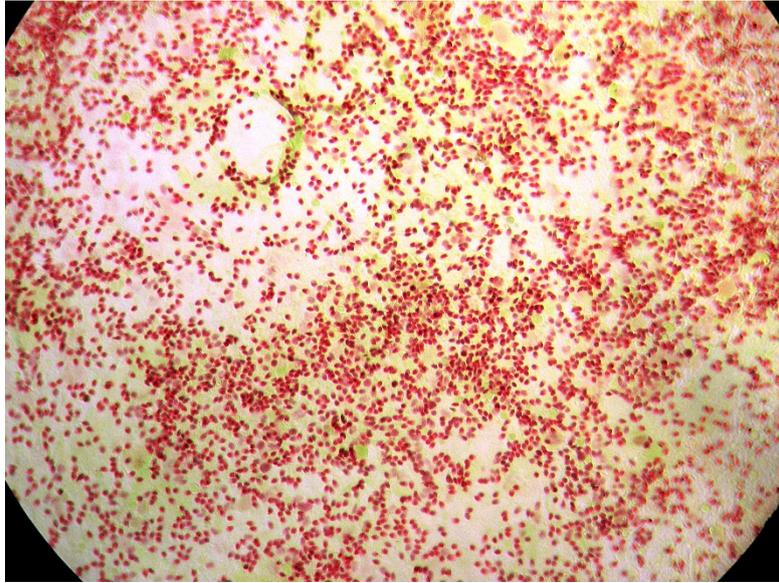


Figure 15 : Spermatozoïdes dilués au $1/10^{\text{ème}}$ observés sous microscope photonique au Gx40.

III.1.2 Deuxième étape

Séries A : L'examen microscopique montre cette fois-ci des cellules épithéliales moins concentrées, non juxtaposées avec des noyaux très clairs (Figure 16). Les spermatozoïdes, de même que le mélange, sont aussi moins saturés et dénombrables (Figures 17 et 18).

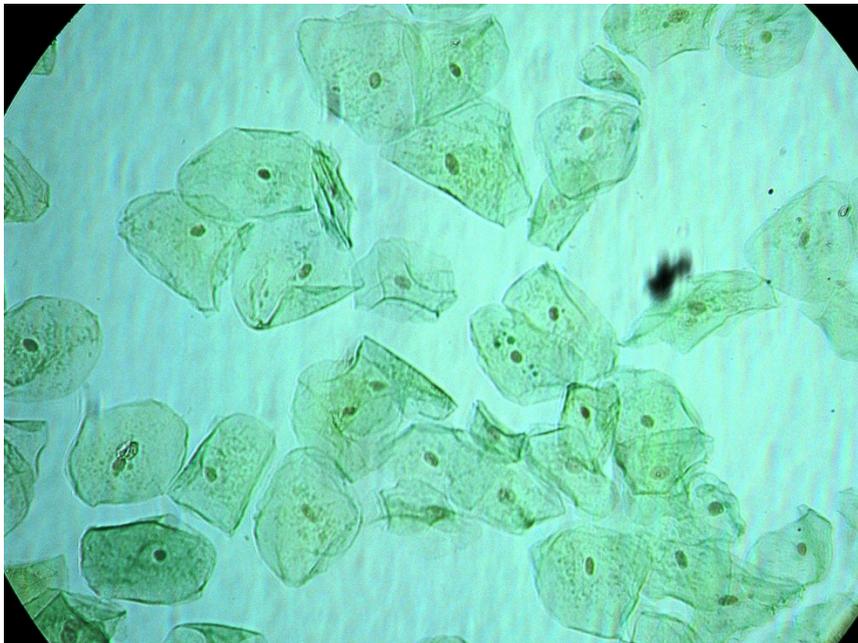


Figure 16 : Cellules épithéliales diluées au $1/10^{\text{ème}}$ observées sous microscope photonique au Gx40.

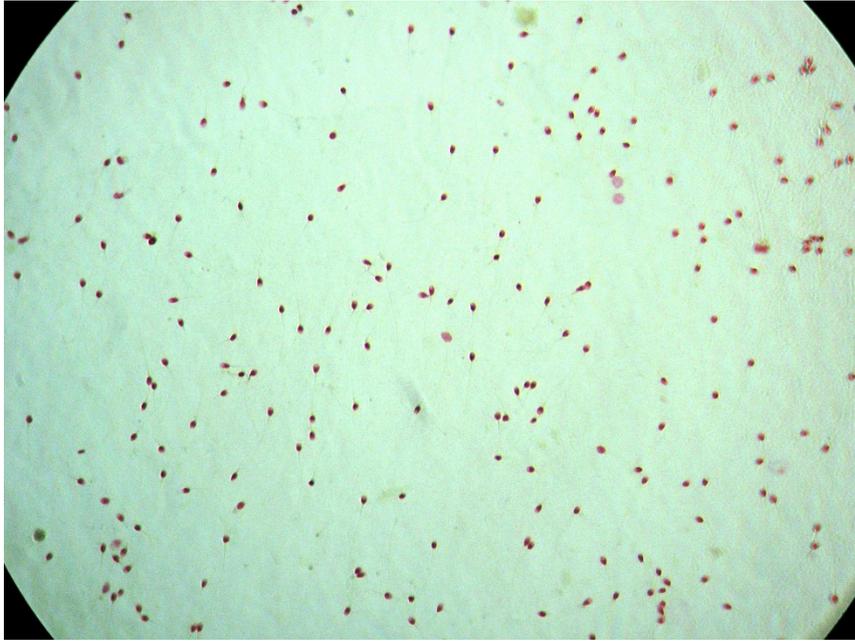


Figure 17 : Cellules spermatiques diluées au $1/100^{\text{ème}}$ observées sous microscope photonique au Gx40.

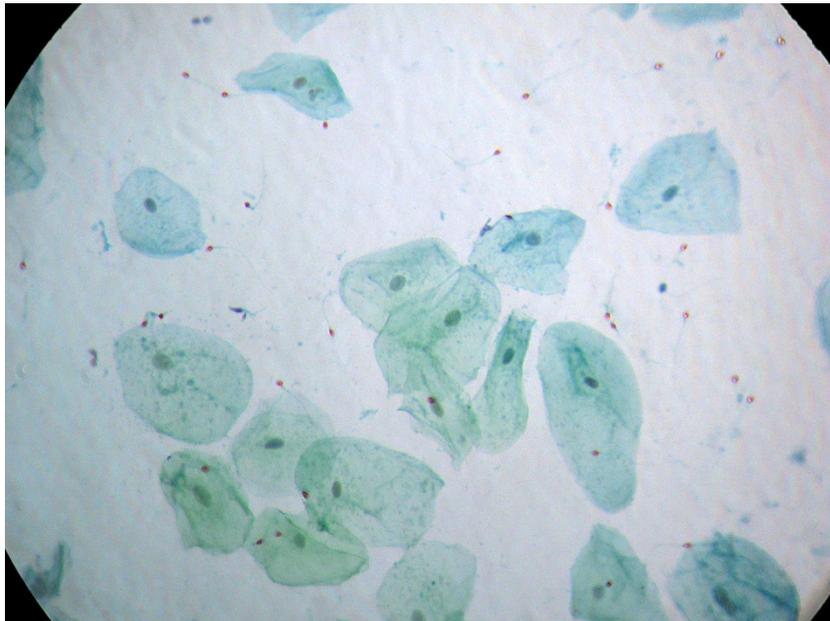


Figure 18: Mélange de cellules épithéliales et spermatiques observées sous microscope photonique au Gx40.

Série B : Après coloration et observation microscopique, les spermatozoïdes sont nettement observables et dénombrables alors que les cellules épithéliales ont disparu.

III.1.3 Troisième étape

Série A : Aucune cellule épithéliale ni cellule spermatique n'a été observée sur les 5 lames de mélange (E+S) ni à 10 mn, ni à 20 mn, ni à 30 mn.

Pour l'échantillon E+ : des cellules épithéliales sont nettement observables.

Pour l'échantillon S+ : des spermatozoïdes sont nettement observables.

Pour l'échantillon E : aucune cellule épithéliale n'a été observée.

Série B : Aucune cellule épithéliale ni cellule spermatique n'a été observée sur les 5 lames de mélange (E+S) ni à 10 mn, ni à 20 mn, ni à 30 mn.

Une cristallisation du SDS a été remarquée après sa décongélation (Annexe 17)

On voit donc ici que ce tampon classique de cette première étape de lyse dite «étape douce», utilisé dans les expériences préliminaires au Laboratoire d'Identification Génétique, n'a pas d'efficacité même à l'état frais contrairement à ce qui en était attendu ; perte d'efficacité aussi bien pour la conservation à 4°C qu'à -20°C.

III.1.4 Quatrième étape

Série A

- 1) S1 : un très grand nombre de cellules spermatiques a été observé.
- 2) S+ : Un très grand nombre de cellules spermatiques a été observé
- 3) S : Un grand nombre de spermatozoïdes difficilement observables à cause des ligaments du coton.

Série B

- 1) 1^{er} frottis : un nombre énorme de cellules épithéliales ont été observées.
- 2) 2^{ème} frottis : moins de cellules épithéliales ont été observées par rapport à celles avec écouvillon non coupé.

Il y a lieu de remarquer ici que déposer d'abord du sperme sur écouvillon puis plonger le tout dans de l'eau ultra pure ou ajouter directement le sperme à de l'eau ultra pure aboutissait

à des suspensions de même concentration. Ceci montre que l'utilisation des écouvillons ne semble pas avoir d'effet sur la libération des spermatozoïdes

III.1.5 Cinquième étape

Série A : aucune cellule épithéliale n'a été observée pour les échantillons de cellules épithéliales incubés à 5, 10 et 15 min.

Série B : un nombre très bas de spermatozoïdes a été observé (environ une dizaine) pour les échantillons de sperme incubés à 5 min. Ce nombre augmente très sensiblement pour l'incubation à 10 min pour devenir très élevé pour l'incubation à 15 min.

III.1.6 Sixième étape

Série A

Echantillon S : un nombre considérable de spermatozoïdes a été observé.

Echantillons ES1-ES5 : aucune cellule n'a été observée, ni épithéliale ni spermatique.

Série B

Echantillon S' : un nombre considérable de cellules spermatiques a été observé.

Echantillons ES1'-ES5' : un nombre considérable de cellules spermatiques et un nombre élevés de cellules épithéliales non digérées ont été observées. Les noyaux des 2 types de cellules sont visibles.

III.1.7 Septième étape

Un nombre considérable de cellules spermatiques a été observé dans les 5 lames mais pas d'observation de cellules épithéliales.

III.1.8 Huitième étape

Aucune cellule n'a été trouvée pour cette huitième étape.

III.1.9 Neuvième étape

III.1.9.1 Observation microscopique

Un nombre considérable de spermatozoïdes a été observé sur cellule de Malassez, difficilement dénombrables pour cause d'impuretés des colorants (Figure 19).

Les cellules spermatiques sont dispersées avec un nombre très élevé à la périphérie de la cellule et très bas au centre.

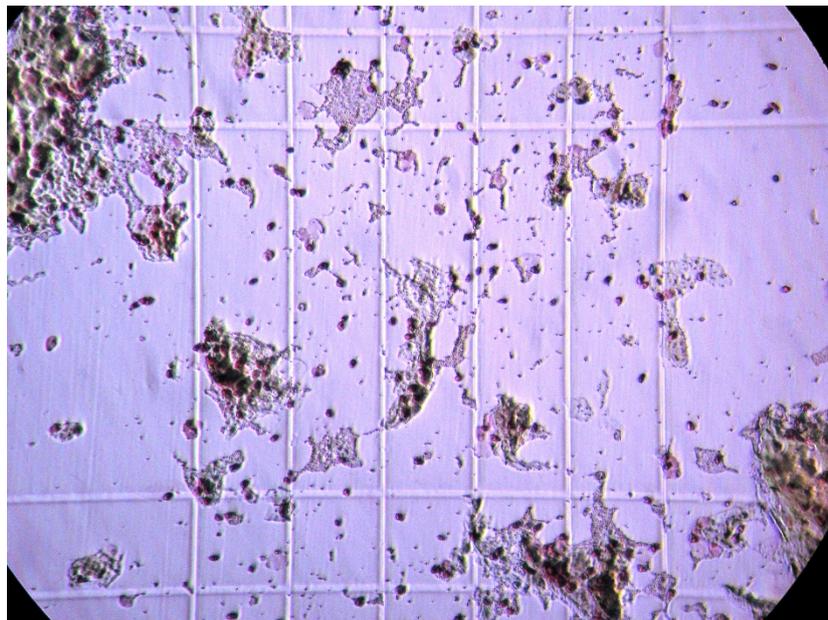


Figure 19 : Cellules spermatiques observées sur cellule de Malassez sous microscope photonique au Gx40.

III.1.9.2 Amplification par la RT-PCR : le tableau 8 représente la quantité d'ADN (en $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) des différents échantillons de sperme quantifié par RT-PCR (annexe 8)

Tableau 8: Résultats de la RT-PCR pour les concentrations d'ADN des échantillons de la fraction masculine (9^{ème} étape).

Temps d'incubation	Concentration d'ADN (ng.µL ⁻¹)			
	5 mn	10 mn	15 mn	Contrôle
S1	10,58	13,53	12,54	
S2	8,18	0,14	9,20	
S3	2,89	10,59	7,62	
S4	2,62	6,76	10,93	
S5	10,63	8,43	11,13	
S1+				22,30
S2+				28,23
S3+				26,97
$\bar{x} \pm ES$	7.0±1.8	7.9±2.2	10.3±0.9	25.8±1.8
Médiane	8.2	8.4	10.9	27.0
CV (%)	57.1	63.6	18.5	12.1

La quantité d'ADN des différents échantillons de la fraction féminine (ADN des cellules épithéliales) quantifiée par RT-PCR est non déterminée.

III 1.10 Dixième étape

III.1.10.1 Test de confirmation : aucune cellule épithéliale n'a été observée alors qu'un nombre considérable de cellules spermatiques est observable sur toutes les lames incubées à 5, 10 et 15 min (Figures 20-21-22).

Un nombre très élevé de spermatozoïdes a été observé dans les échantillons de référence (S1+, S2+, S3+) (Figure 23).

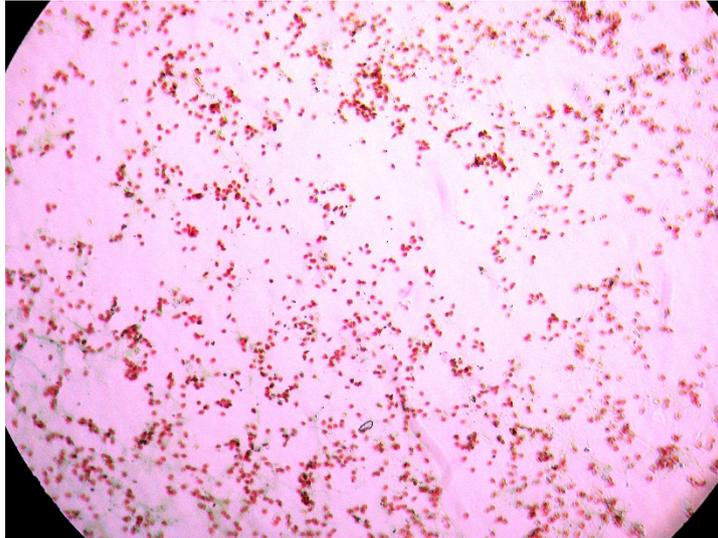


Figure 20 : Cellules spermatiques observées sous microscope photonique au Gx40 avec un temps d'incubation de 5 min.

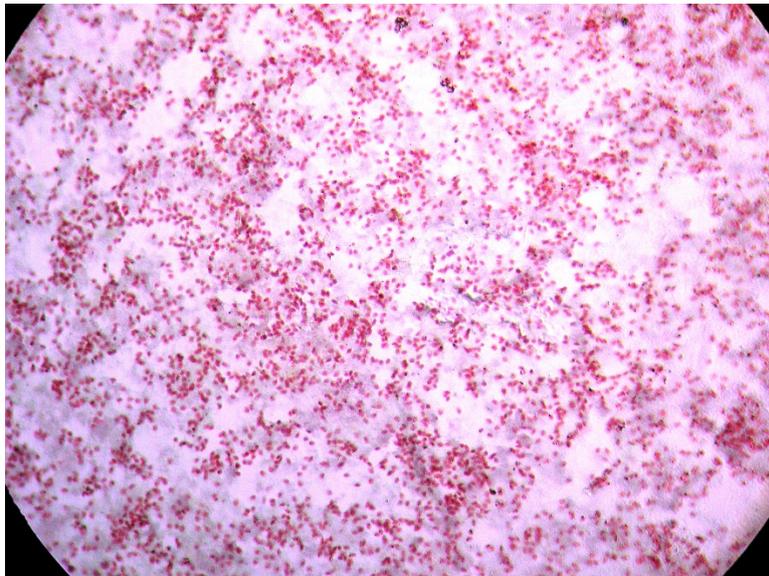


Figure 21 : Cellules spermatiques observées sous microscope photonique au Gx40 avec un temps d'incubation de 10 min.

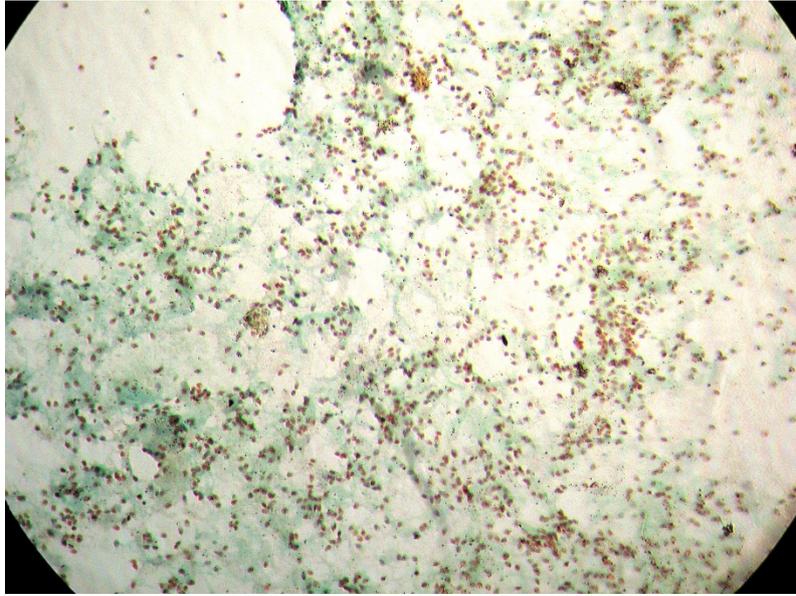


Figure 22 : Cellules spermatiques observées sous microscope photonique au Gx40 avec un temps d'incubation de 15 min.

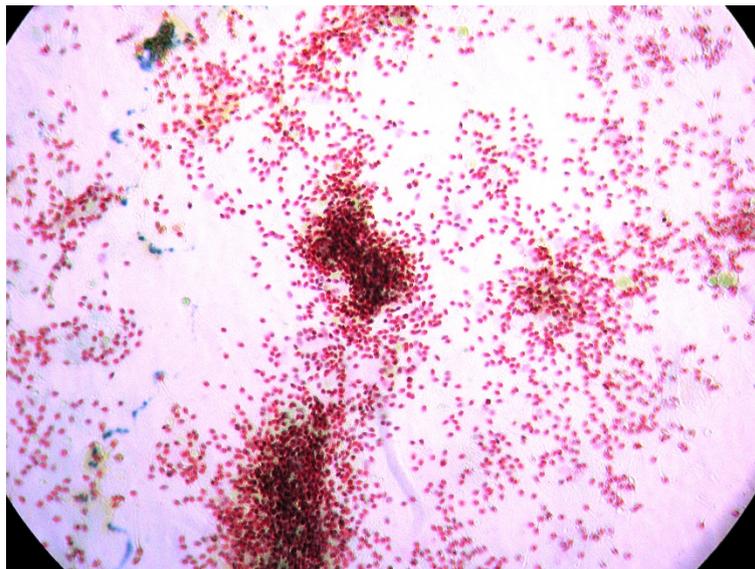


Figure 23 : Cellules spermatiques observées sous microscope photonique au Gx40 (référence S+).

III.1.10.2 Observation des spermatozoïdes sur cellule de Malassez sans coloration et sans séchage

L'utilisation d'une cellule de Malassez est basée sur un dénombrement de cellules baignant dans un volume liquide donné, or la coloration type « Christmas tree stain »

implique un séchage de l'échantillon rendant impossible cette méthode de comptage. Un comptage modifié sans coloration est donc nécessaire dans ce cas. Cette étape de coloration par « Christmas tree stain » reste toutefois la meilleure pour confirmer la lyse totale des cellules épithéliales et la persistance des spermatozoïdes.

Nous avons observé des spermatozoïdes dispersés de façon homogène sur toute la cellule, ce qui en permet le décombrement (Figures 24-26).

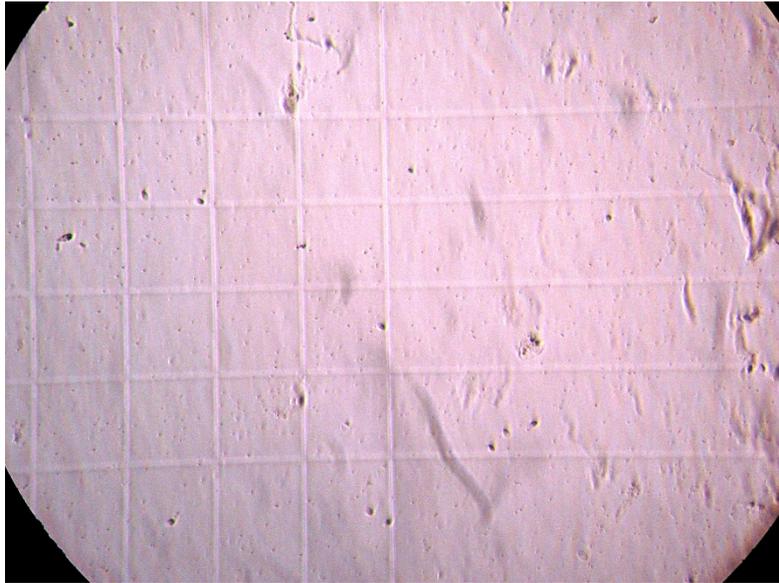


Figure 24 : Cellules spermatiques observées sur cellule de Malassez sous microscope photonique au Gx40 avec un temps d'incubation de 5 min.

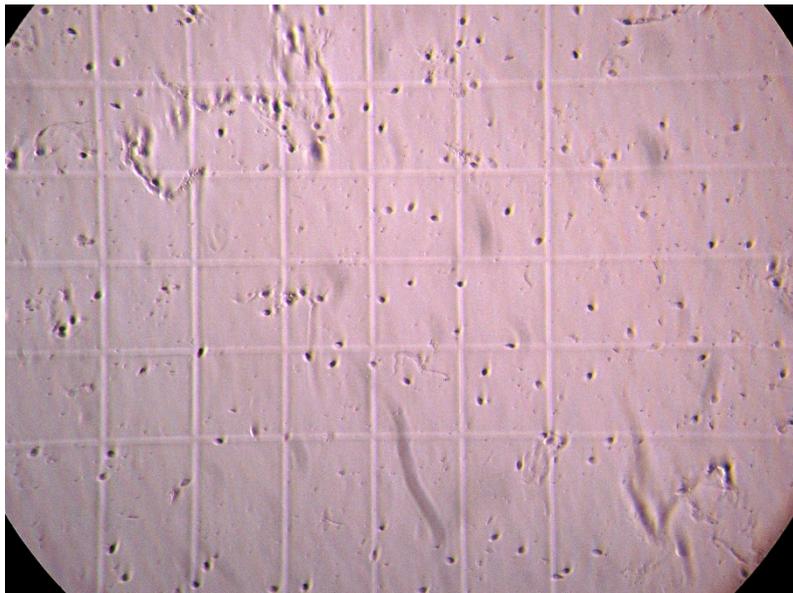


Figure 25 : Cellules spermatiques observées sur cellule de Malassez sous microscope photonique au Gx40 avec un temps d'incubation de 10 min.

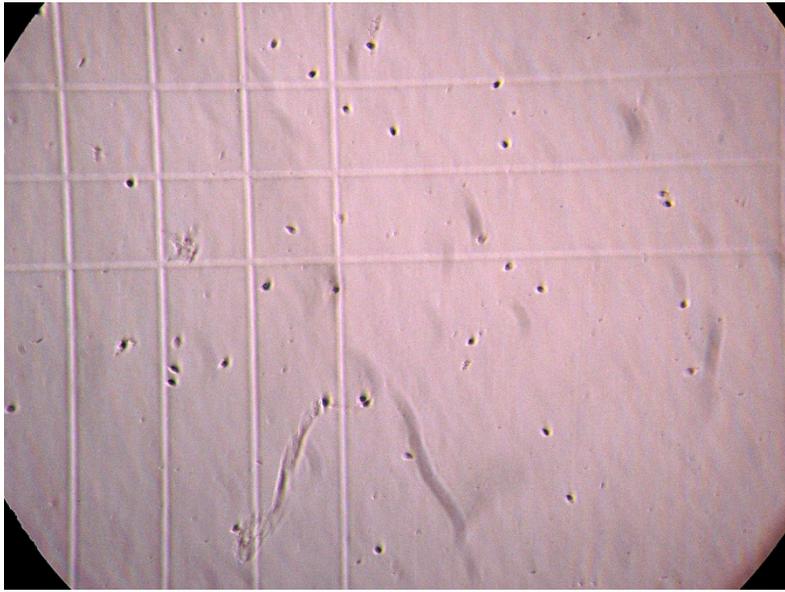


Figure 26 : Cellules spermatiques observées sur cellule de Malassez sous microscope photonique au Gx40 avec un temps d'incubation de 15 min.

III.1.10.3 Dénombrement des spermatozoïdes

Le dénombrement des spermatozoïdes sur cellule de Malassez (comptage sous microscope) a donné les résultats consignés dans le tableau 9.

Les concentrations moyennes, leurs logarithmes népériens (pour la normalisation), les médianes et les coefficients de variations (CV) ont été déterminés pour le groupe contrôle et dans ceux incubés à 5, 10 et 15 mn (annexe 9).

L'ordre de grandeur est de 8 millions de spermatozoïdes.mL⁻¹ pour le groupe contrôle et de 15 à 26 millions de spermatozoïdes.mL⁻¹ pour les groupes incubés à 5, 10 et 15 mn.

On observe une très forte variabilité du nombre de spermatozoides pour l'échantillon incubé à 5 mn (CV=90.7%) qui reste élevée pour le reste des échantillons (CV>42%).

Cette forte variabilité pourrait être due au pipetage réalisé de façon aléatoire dans un milieu qui peut demeurer inhomogène malgré l'agitation des échantillons. Ainsi, pour le même volume, le prélèvement peut se solder par une élévation du nombre de spermatozoïdes due à l'agrégat de ces derniers ou à contrario, par une baisse dans des zones plus clairsemées.

Tableau 9 : Dénombrement des spermatozoïdes ($\times 10^6$) sur cellule de Malassez (étape finale). **ES est l'erreur standard sur la moyenne**

Temps d'incubation	Nombre de spermatozoïdes ($\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)				p
	5 mn	10 mn	15 mn	Contrôle	
ES1	4,150	6,175	13,75		
ES2	5,675	35,00	5,700		
ES3	8,200	17,50	29,50		
ES4	6,625	35,75	16,75		
ES5	10,85	35,75	18,50		
ES6	38,00	24,50	5,375		
ES7	19,00	26,50	15,25		
S1+				6,150	
S2+				12,50	
S3+				5,000	
$\bar{n} \pm ES$ ($\times 10^6$)	13.2 \pm 4.5	25.9 \pm 4.2	15.0 \pm 3.1	7.9 \pm 2.3	0.053
Mediane ($\times 10^6$)	8.2	26.5	15.3	6.2	0.046
CV (%)	90.7	42.9	55.0	51.2	
$\overline{\text{Ln}(\bar{n})} \pm \text{Ln}(ES)$	16.1 \pm 0.3	16.9 \pm 0.2	16.4 \pm 0.2	15.8 \pm 0.3	0.065

Nous avons cherché à déterminer si le temps d'incubation influait sur les quantités de spermatozoïdes recueillies par des analyses de variance (ANOVA).

L'homogénéité des variances des quatre distributions a d'abord été établie par des tests de Levène ($F=0.82$, $p=0.50 \gg 0.05$ annexe 10).

La comparaison des quantités moyennes de spermatozoïdes dénombrés dans le groupe contrôle et les échantillons incubés à 5, 10 et 15 mn n'a pas mis en évidence de différences significatives ($F=3.04$, $p=0.053 > 0.05$).

Pour corroborer ces résultats en s'assurant de la normalisation des données, les logarithmes népériens des nombres de spermatozoïdes ont aussi été comparés par ANOVA. Là aussi, les variances ont été trouvées homogènes ($F=0.30$, $p=0.82$) et les différences entre les quatre échantillons non significatives ($F=2.82$, $p=0.065$).

Les distributions n'étant pas totalement normales, le test de la médiane (annexe 10) a toutefois mis en évidence une différence très légèrement significative entre les 4 échantillons pour le nombre de spermatozoïdes ($\chi^2=8.00$, $p=0.046 < 0.05$).

La médiane est légèrement mais significativement plus élevée que celle attendue pour l'incubation à 10 mn (résidu net +2.5), la distribution est légèrement décentrée vers les fortes valeurs pour ce temps d'incubation (nombre élevé de spermatozoïdes, figure 27).

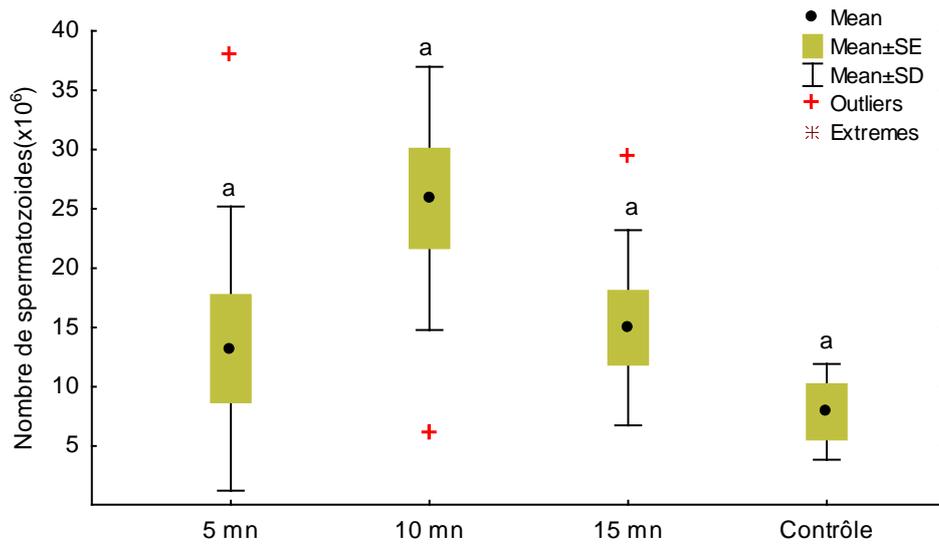


Figure 27 : Quantités moyennes de spermatozoïdes des 4 séries.

III.1.10.4 Amplification par la RT-PCR : les quantités d’ADN des différents échantillons du sperme quantifié par la RT-PCR sont consignés dans le tableau 10 (annexe 11).

Tableau 10 : RT-PCR pour les échantillons de la fraction masculine (étape finale).

Temps d’incubation	Concentration d’ADN du sperme (ng.µL ⁻¹)				p
	5 mn	10 mn	15 mn	Contrôle	
ES1	74,74	79,55	64,14		
ES2	109,11	84,02	56,58		
ES3	20,26	85,23	81,27		
ES4	96,25	93,05	80,50		
ES5	76,78	71,62	86,04		
ES6	62,82	67,94	67,64		
ES7	70,48	88,99	92,70		
S1+				133,38	
S2+				121,49	
S3+				75,85	
$\bar{x} \pm ES$	72.9±10.6	81.5±3.4	75.6±4.9	110.2±17.5	0.076
Médiane	74.7	84.0	80.5	121.5	0.59
CV (%)	38.6	11.1	17.2	27.5	

La variabilité des quantités recueillies d’ADN est élevée à 5 mn (CV=38.6%) mais elle tombe dans des limites acceptables pour le reste des échantillons (CV<28%).

L'effet du temps d'incubation sur les concentrations d'ADN recueillies a été testée par des analyses de variance (ANOVA). Des tests de Levene ont d'abord montré l'homogénéité des variances des concentrations d'ADN des quatre distributions ($F=1.77$, $p=0.18 > 0.05$, annexe 12).

La comparaison des concentrations moyennes d'ADN dans le groupe contrôle et les échantillons incubés à 5, 10 et 15 mn n'a pas montré de différences significatives ($F=2.66$, $p=0.08$, figure 28).

Là aussi, le test de la médiane n'a pas montré de différences significatives entre les 4 échantillons ($p=0.59 >> 0.05$).

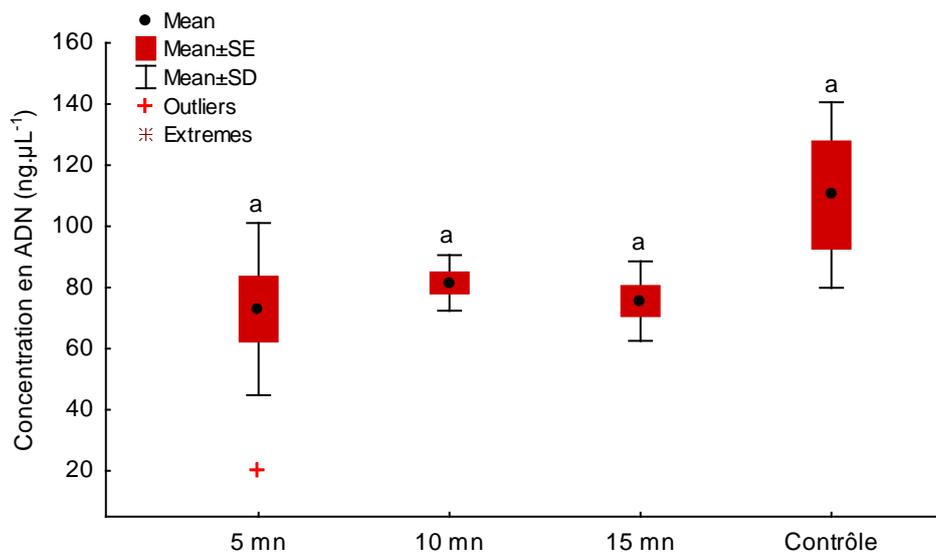


Figure 28 : Concentrations moyennes d'ADN (ng.µL⁻¹) des 4 séries.

La recherche de corrélations entre la quantité initiale de spermatozoïdes et les concentrations recueillies d'ADN s'est soldée par un résultat négatif, donc paradoxal car on aurait pu s'attendre à ce que plus le nombre initial de spermatozoïdes est élevé, plus il aboutit à une quantité finale d'ADN élevée. Nous n'avons trouvé aucune corrélation (annexe 13) entre le nombre de spermatozoïdes initial et les quantités récupérées d'ADN pour le groupe contrôle ($r=0.452$, $p=0.70 >> 0.05$), le groupe incubé à 5 mn ($r=-0.224$, $p=0.63$), à 10 mn ($r=0.116$, $p=0.81$) et à 15 mn ($r=0.622$, $p=0.14$).

Cette absence de corrélations est bien visualisée en figure 28 donnant les concentrations recueillies d'ADN en fonction du nombre initial de spermatozoïdes.

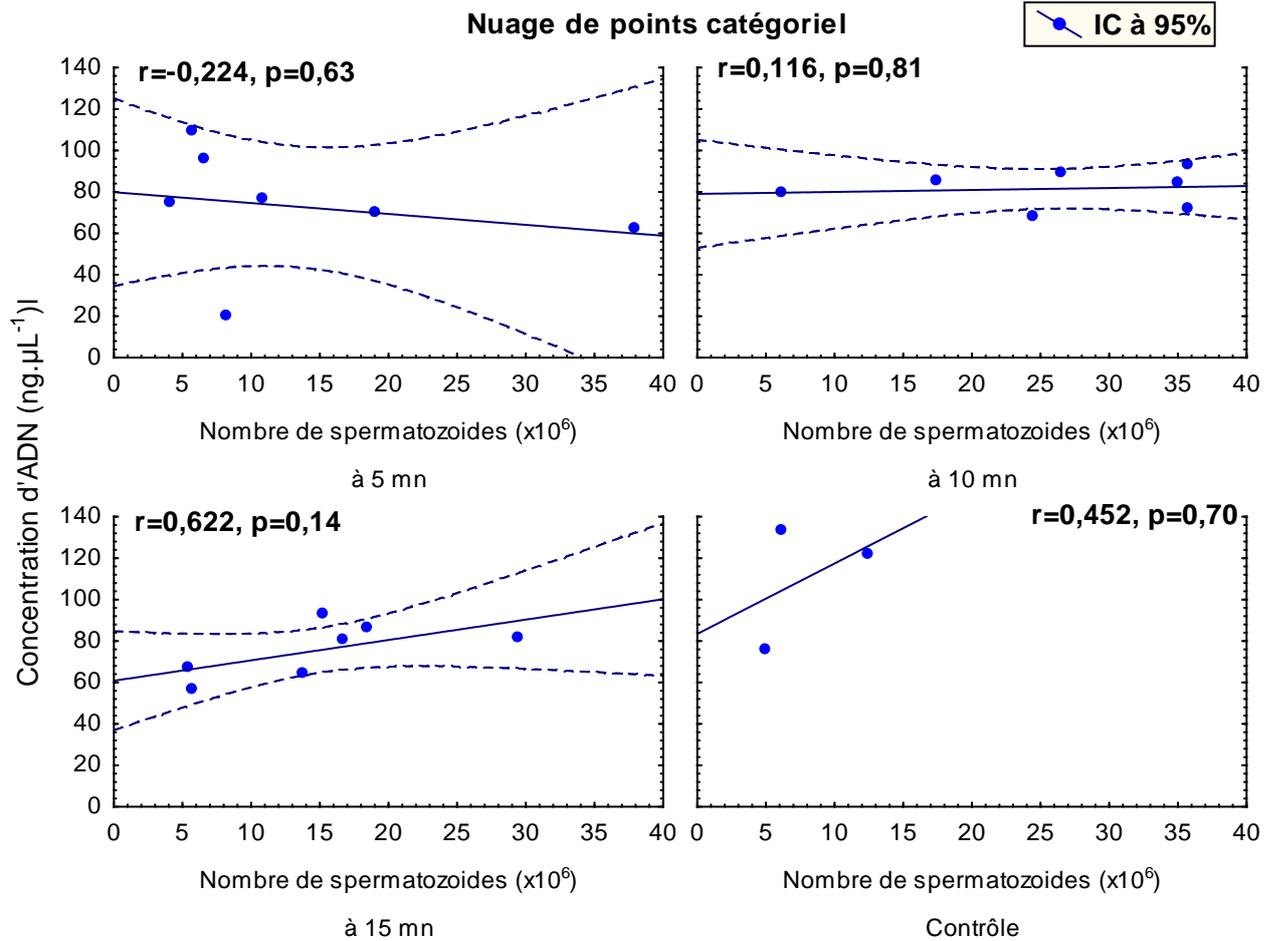


Figure 29 : Corrélations entre la concentration recueillie d'ADN et le nombre initial de spermatozoïdes pour les échantillons contrôle, à 5 mn, à 10 mn et à 15 mn d'incubation.

Cette particularité est encore plus visible dans le graphe récapitulatif des 4 séries (figure 30) où la concentration récupérée en ADN ne semble présenter aucun lien avec le nombre initial de spermatozoïdes.

Cette absence de corrélation pourrait être due à la lyse partielle des spermatozoïdes et à une résistance partielle à la digestion lors de la deuxième étape de lyse (DTT).

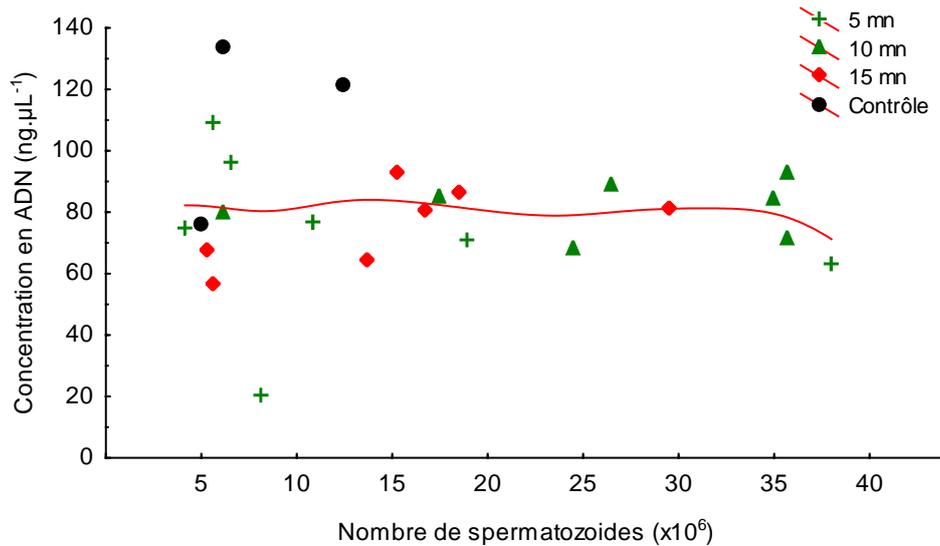


Figure 30 : Graphe récapitulatif des concentrations recueillies d’ADN et du nombre initial de spermatozoïdes des 4 échantillons.

Cellules épithéliales

Le tableau 11 regroupe les quantités d’ADN récupérées des différents échantillons de cellules épithéliales incubés à 5, 10 et 15 mn et quantifiées par la RT-PCR, avec calcul des moyennes, médianes et CV (annexe 14).

La variabilité est très élevée à 15 mn d’incubation (CV=83.3%) mais elle reste modérée et dans des limites acceptables pour les 2 autres temps d’incubation (CV<34%).

Tableau 11 : Résultats de la RT-PCR pour les échantillons de la fraction féminine (étape finale).

Temps d’incubation	Concentration d’ADN des cellules épithéliales (ng.µL ⁻¹)			p
	5 mn	10 mn	15 mn	
E1	397,15	313,69	367,71	
E2	499,01	244,41		
E3	399,55			
E4	247,72	438,60		
E5		460,63		
E6	247,46		21,99	
E7		214,41	241,30	
$\bar{x} \pm ES$	358±49	334±50	210±101	0.29
Médiane	397	314	241	0.72
CV (%)	30.4	33.3	83.3	

Là aussi, la recherche d'un effet du temps d'incubation sur les quantités recueillies d'ADN a été établie par analyse de variance. Des tests préliminaires de Levène ont montré une homogénéité des variances des 3 distributions ($F=0.49$, $p=0.63$, annexe 15).

La comparaison des concentrations d'ADN obtenues après des incubations de 5, 10, 15 mn n'a pas montré de différences significatives ($F=1.39$, $p=0.29$).

Les distributions s'écartant légèrement de la normalité, le test de la médiane n'a pas montré de différence significative entre les 3 échantillons ($p=0.72 \gg 0.05$) et ce, malgré un léger résidu positif pour le premier échantillon à 5 mn d'incubation (résidu +0.7, figure 31).

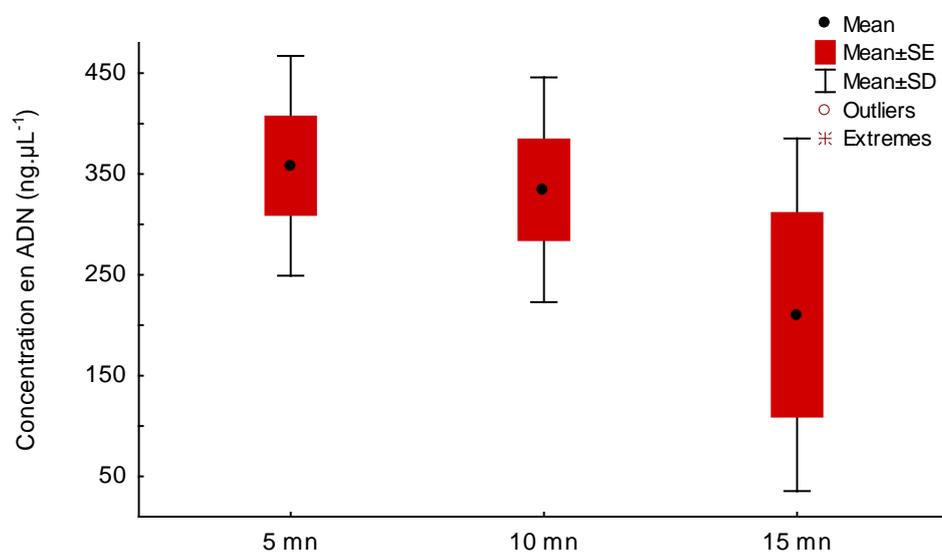


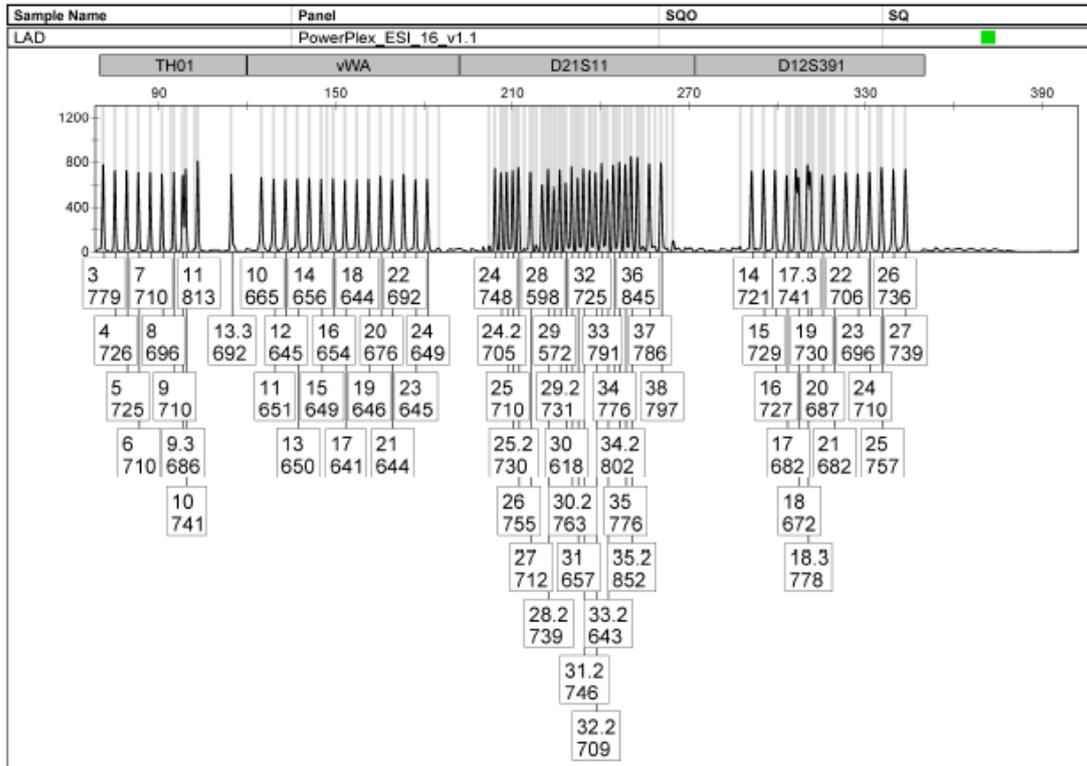
Figure 31 : Concentrations moyennes d'ADN ($\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$) des 3 séries de cellules épithéliales (A) filtrées à l'amicon.

III.1.10.5 Post amplification

A l'issue de notre expérimentation, nous avons pu générer des profils masculins et des profils féminins séparés et interprétables.

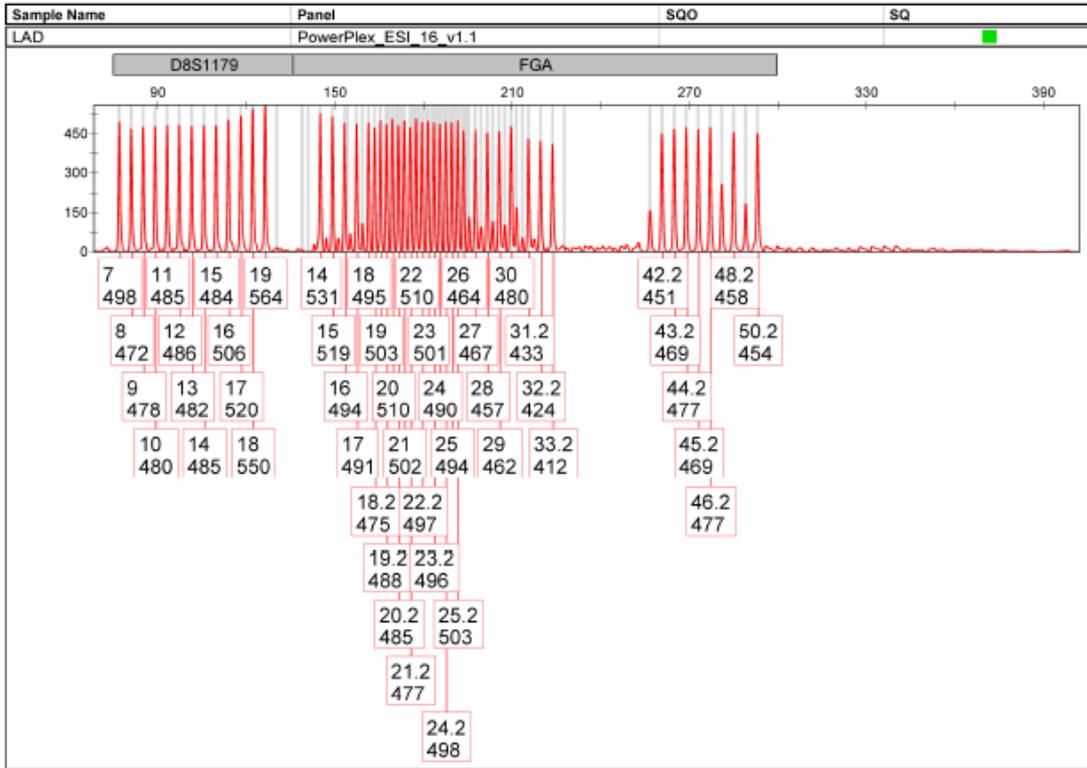
AB Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

FA-S2-T0687-AAN-



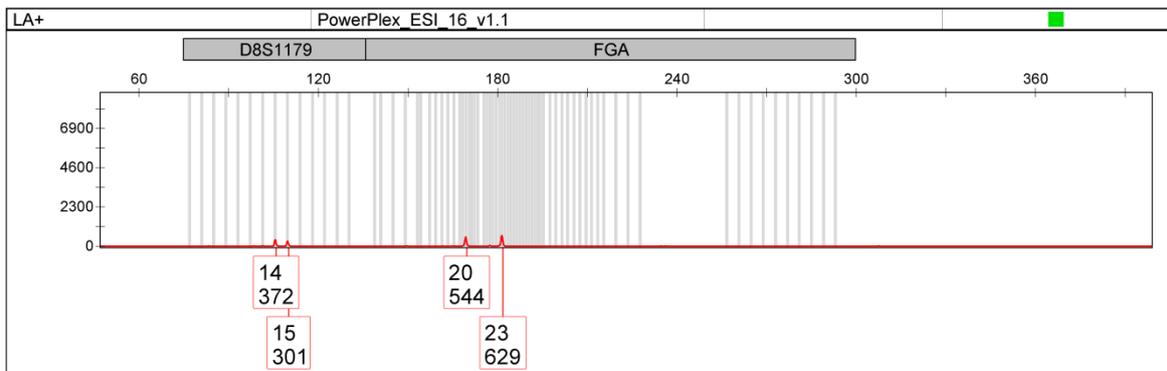
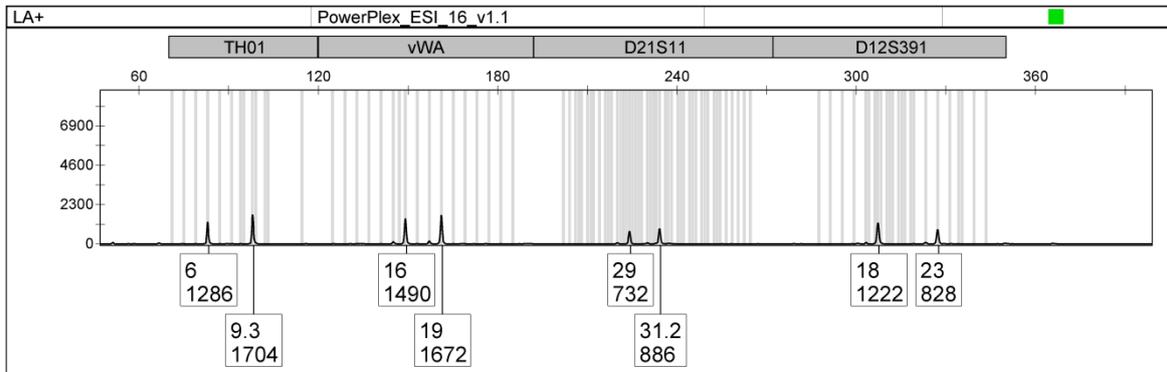
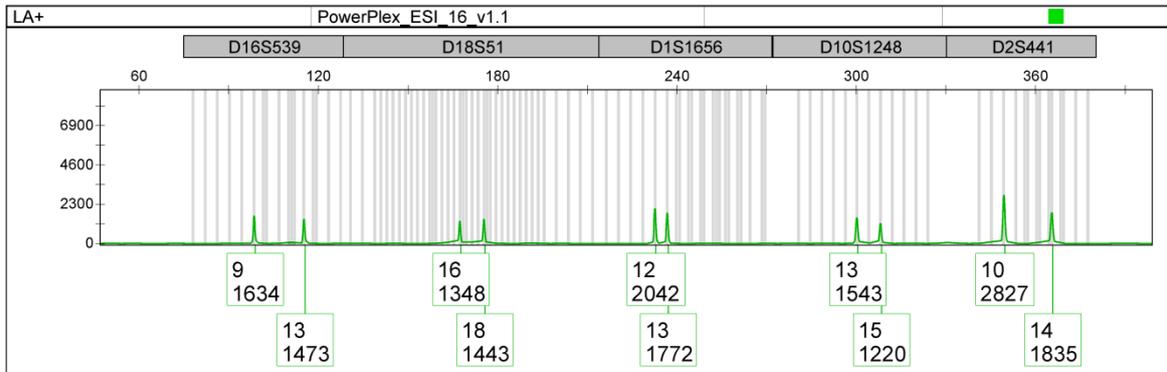
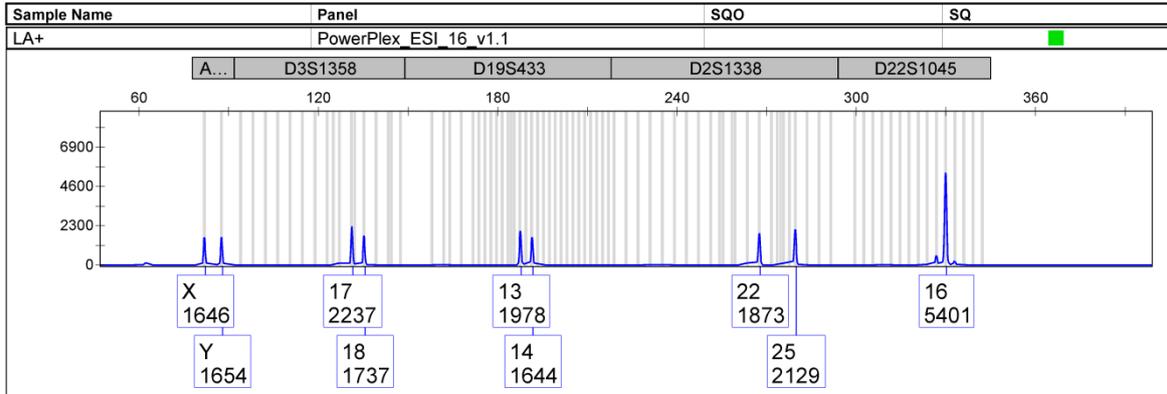
AB Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

FA-S2-T0687-AAN-



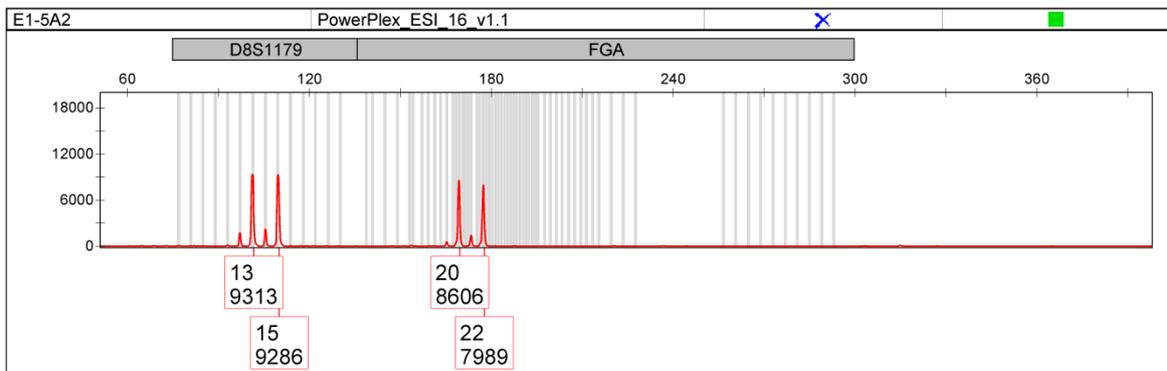
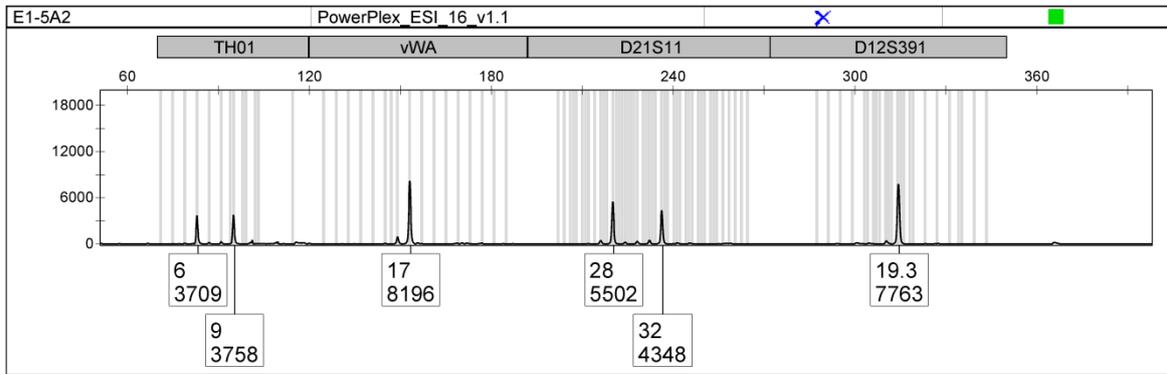
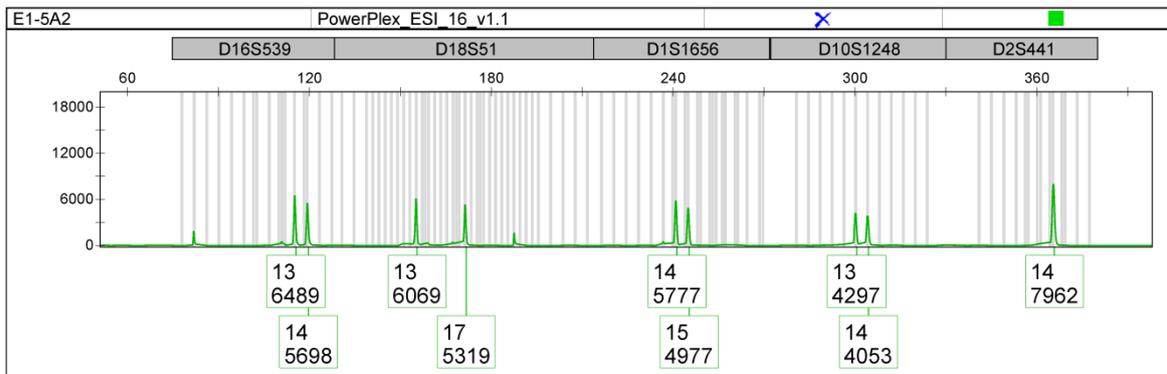
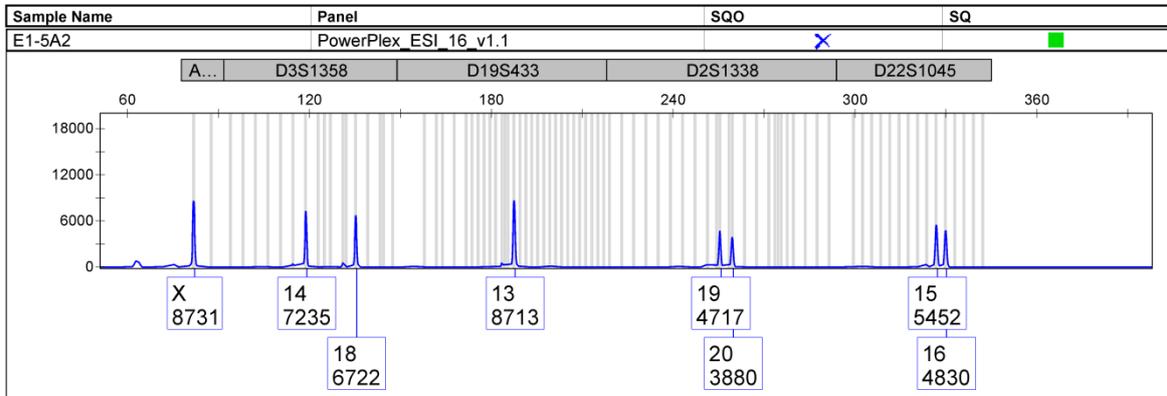
AB Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

FA-S2-T0687-AAN-



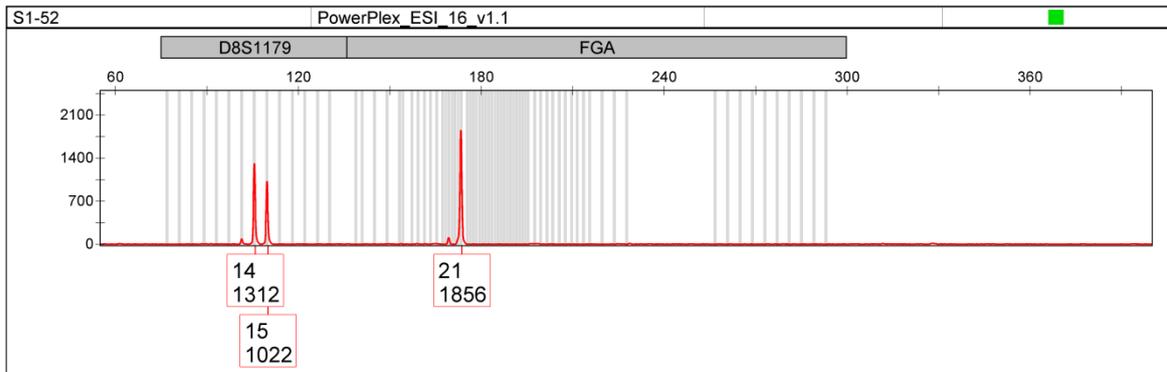
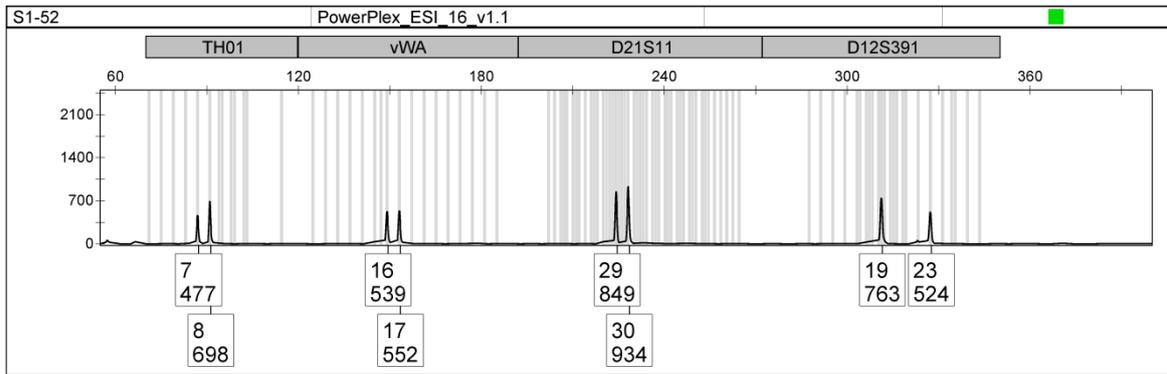
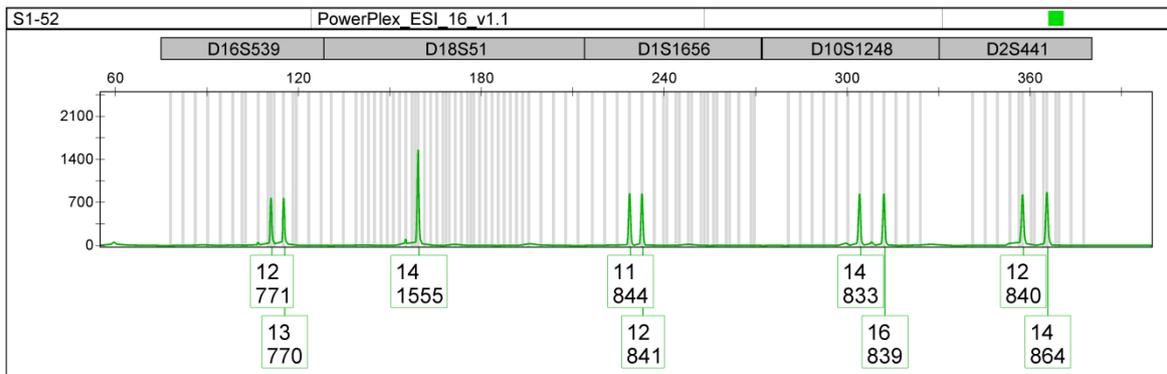
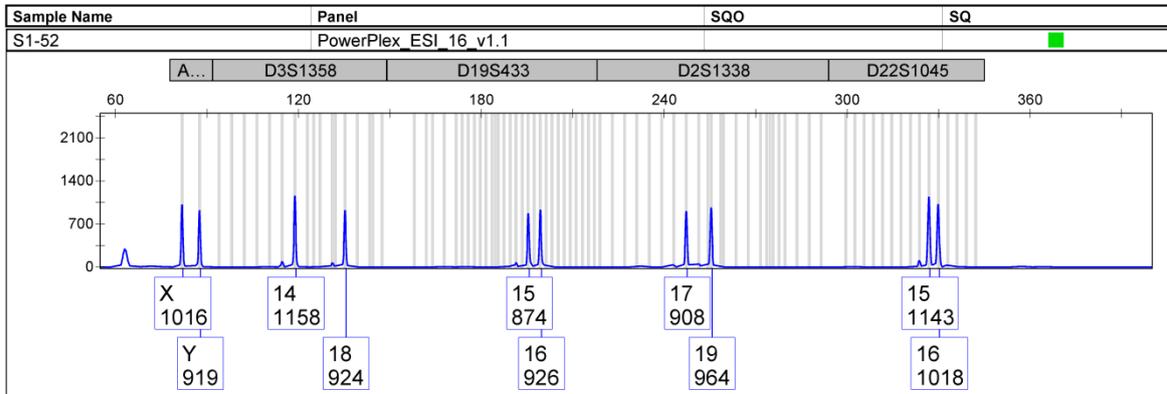
Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

FA-S2-T0286-AAN-1



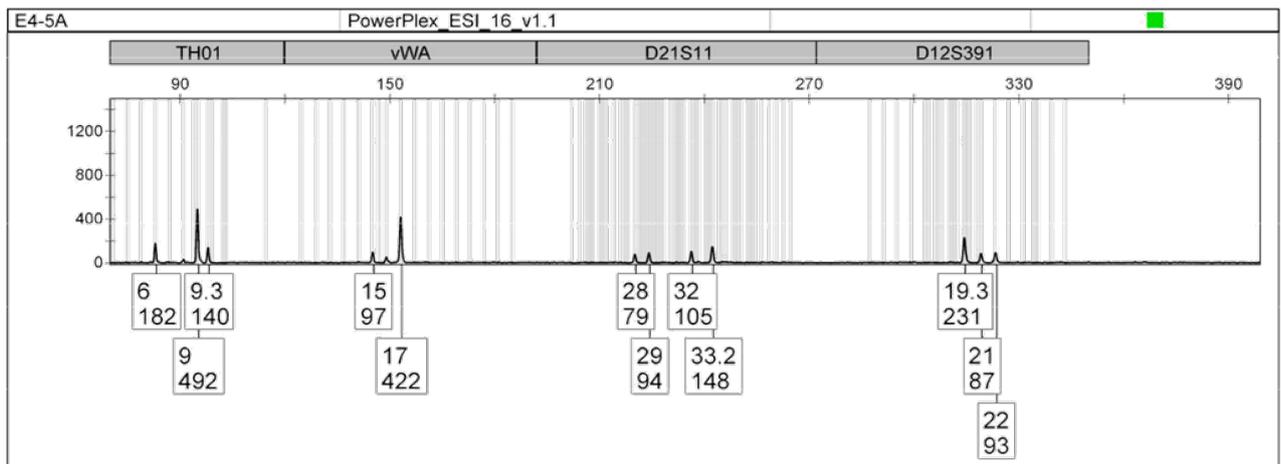
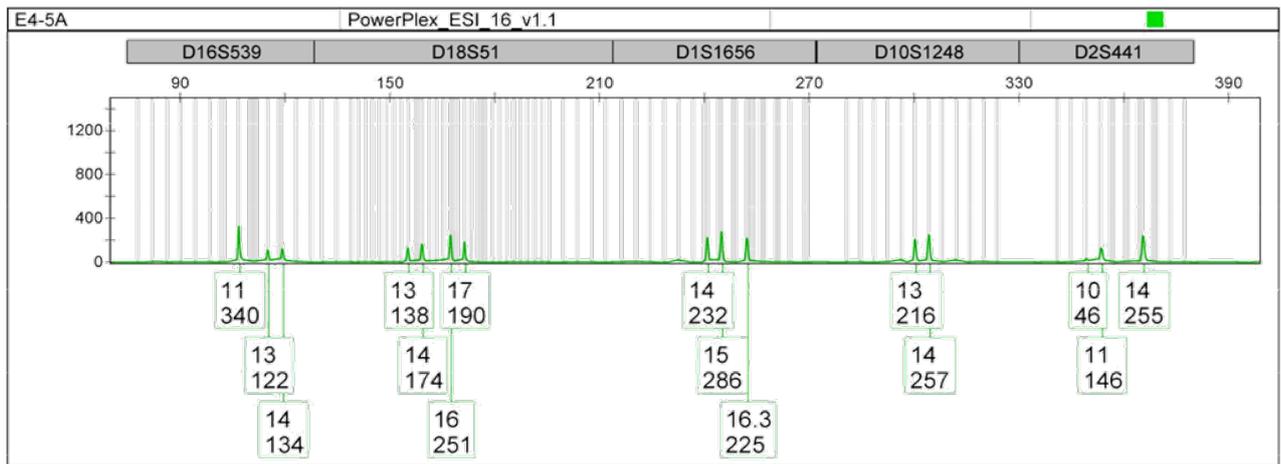
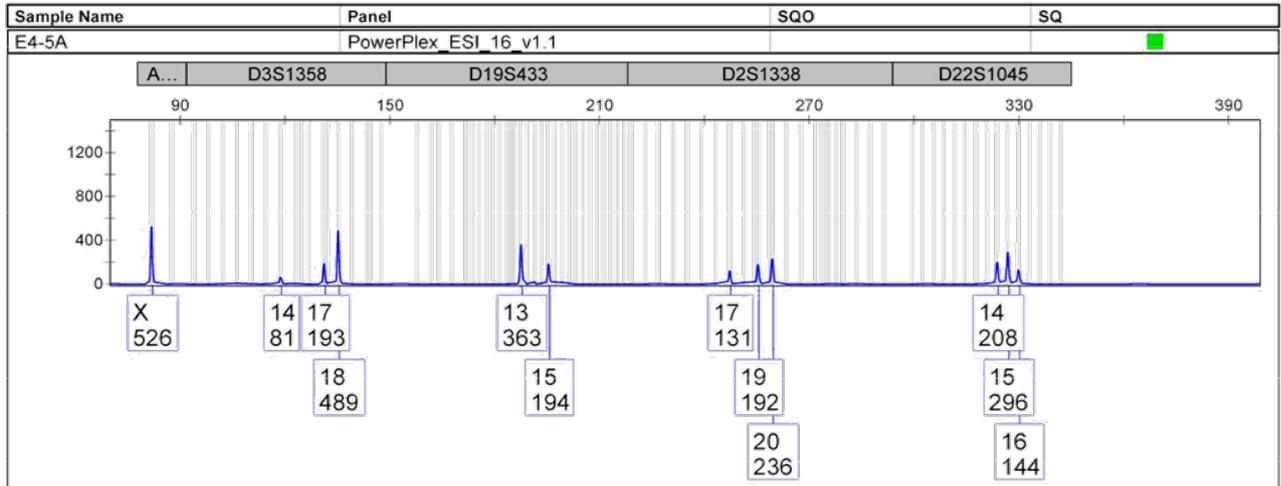
Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

FA-S2-T0687-AAN-



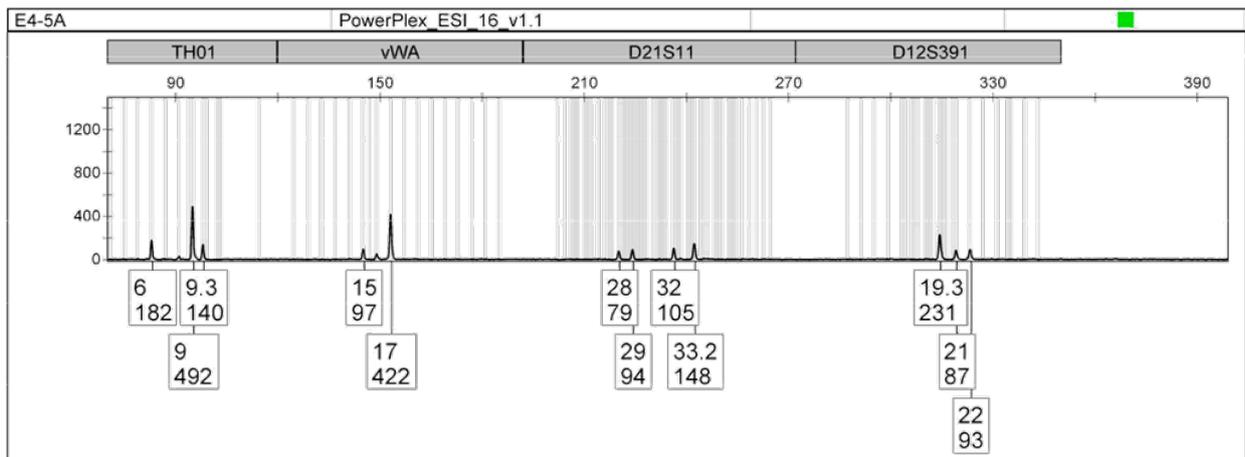
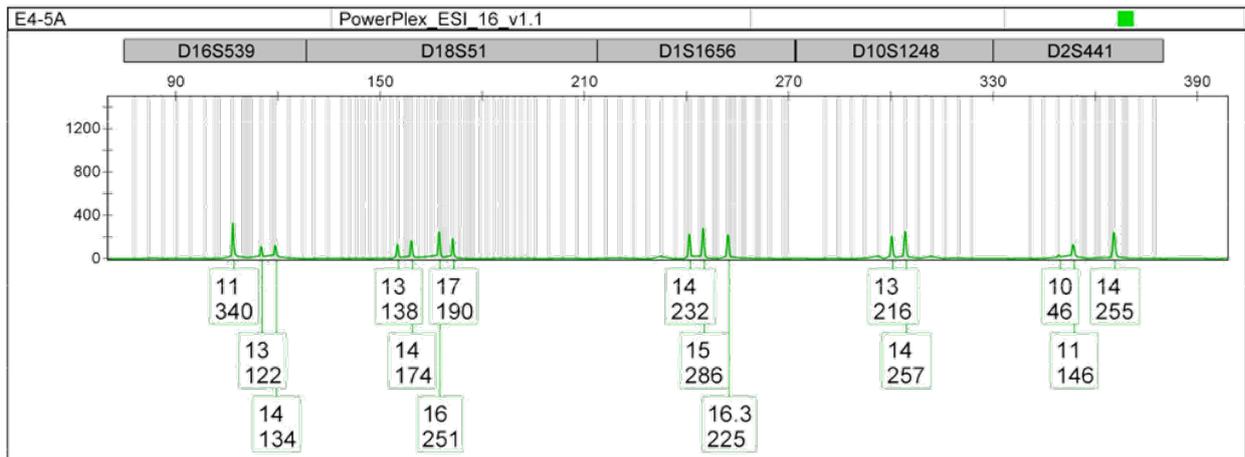
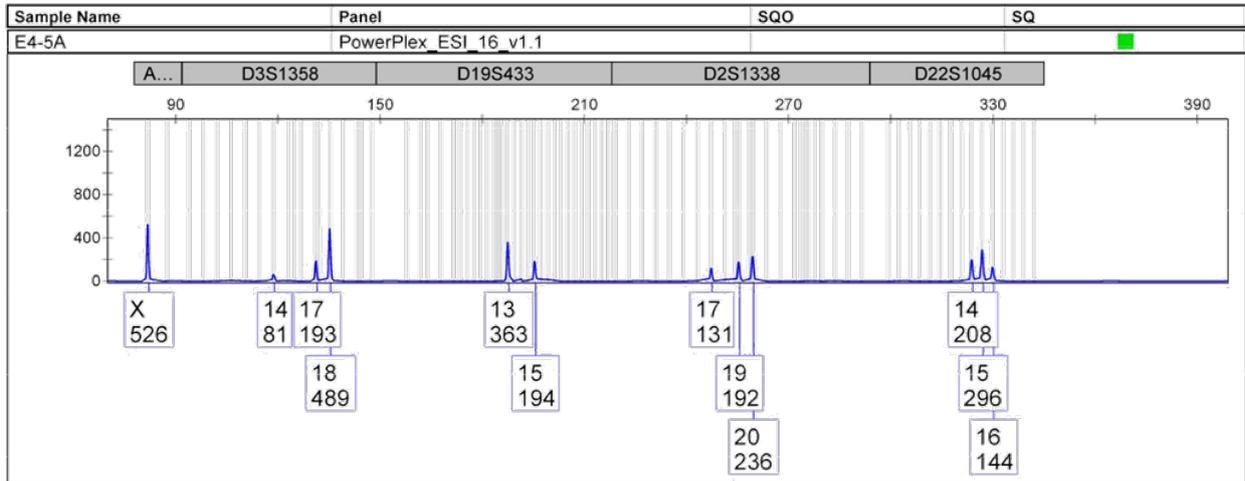
Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

FA-S2-T0286-AAN-1



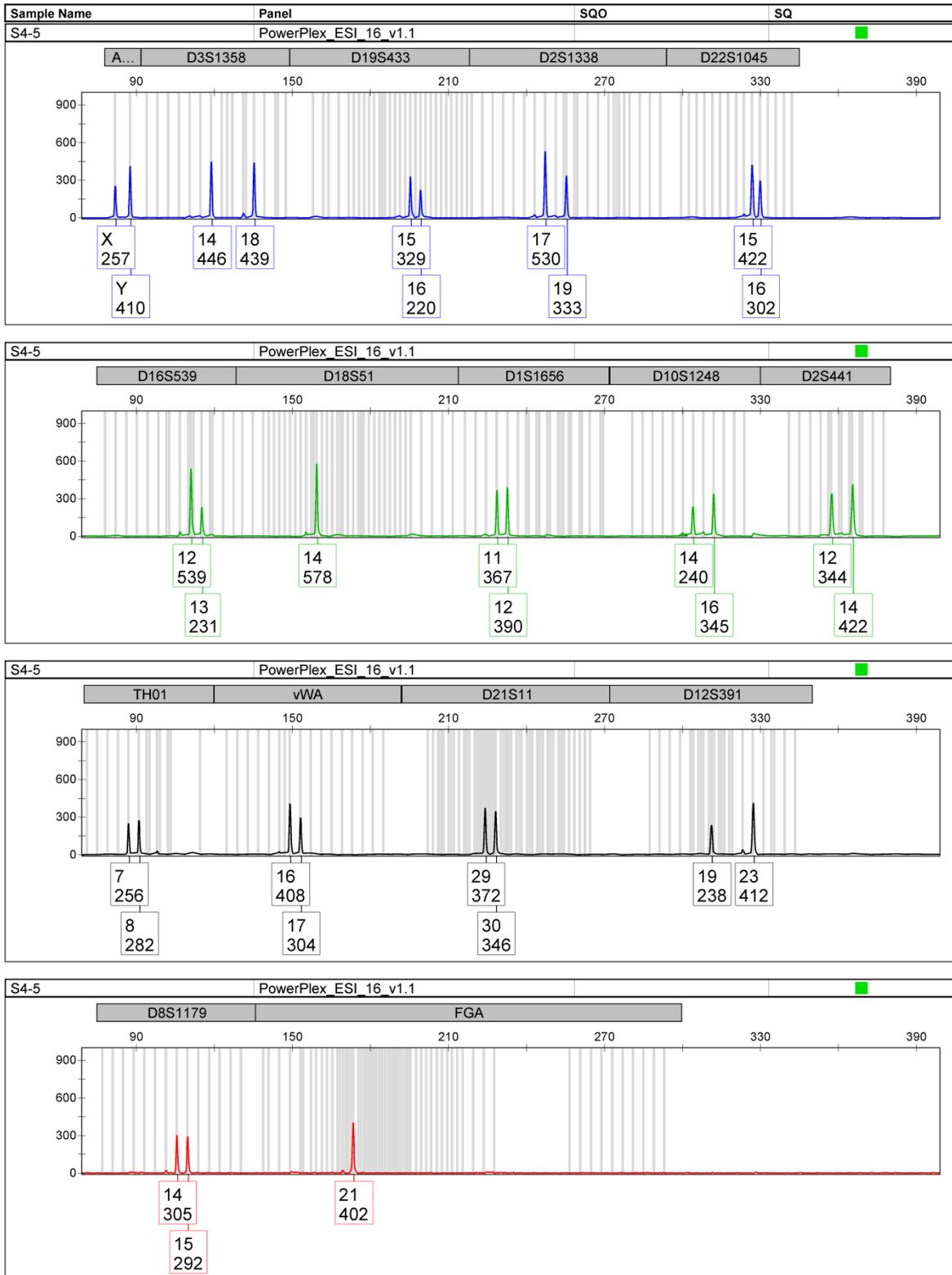
Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

FA-S2-T0286-AAN-1



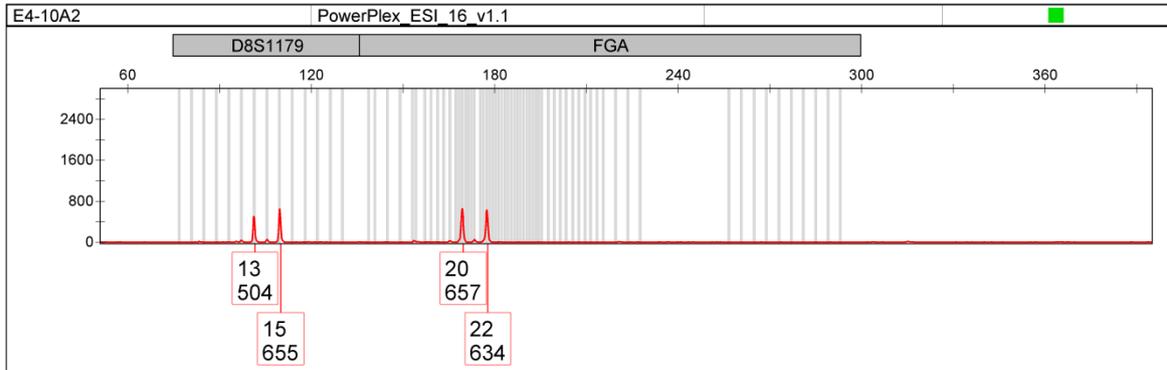
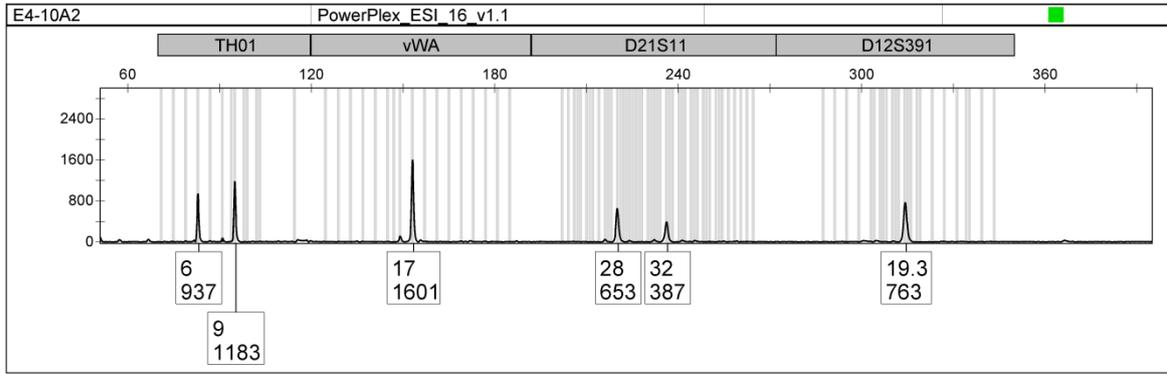
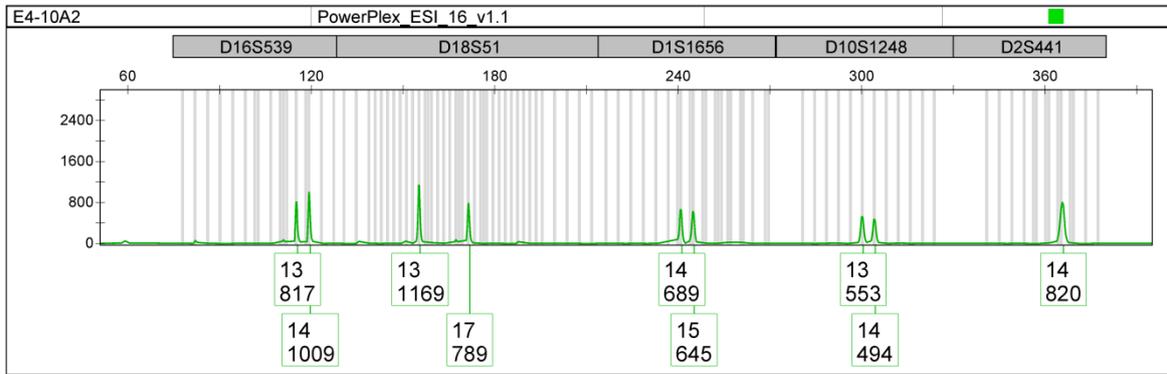
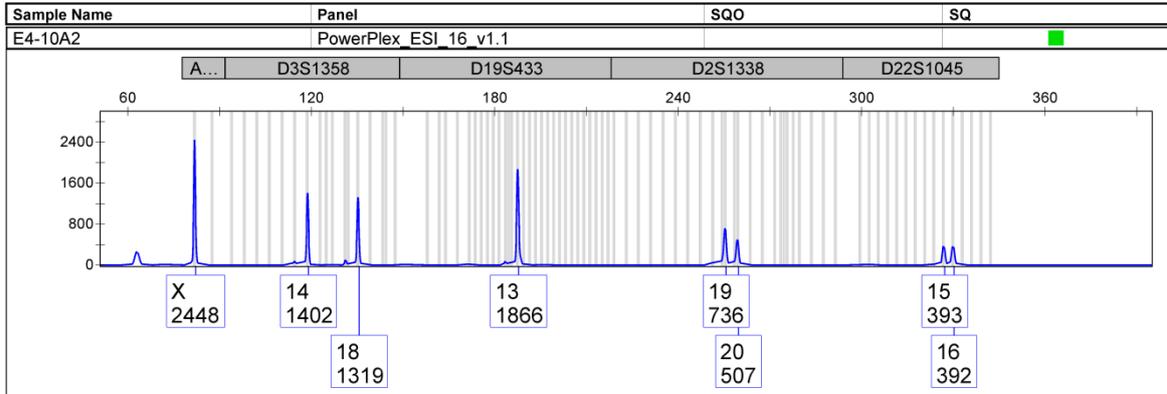
AB Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

FA-S2-T0286-AAN-1



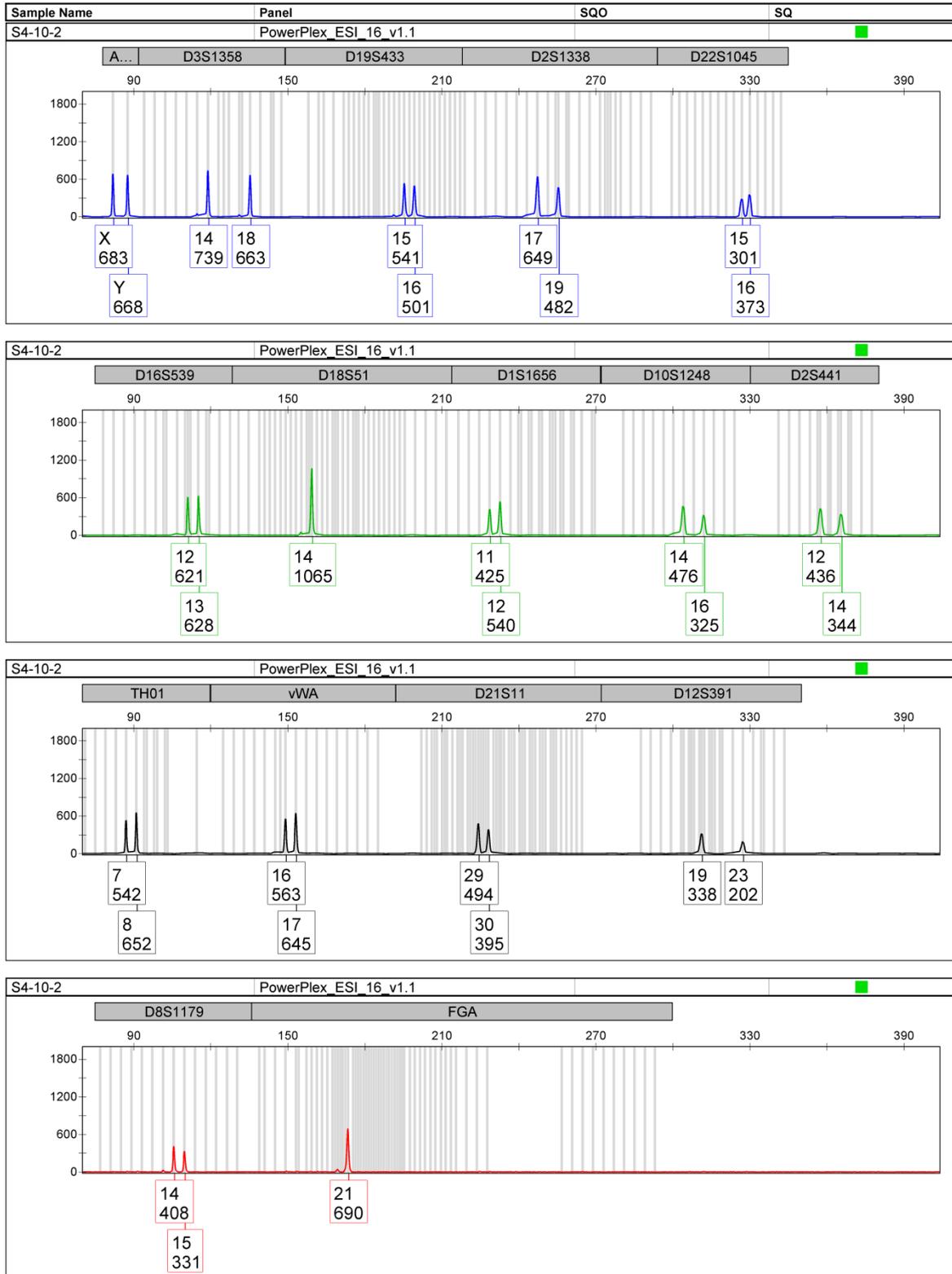
Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

FA-S2-T0286-AAN-1



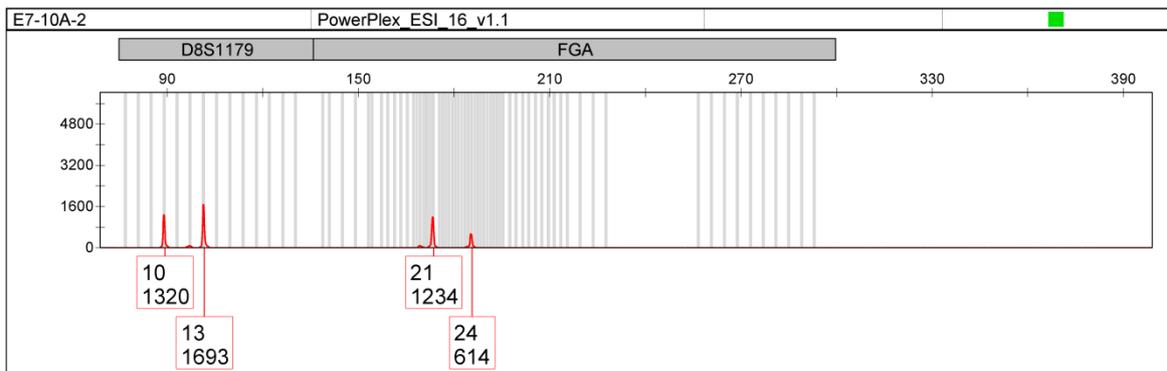
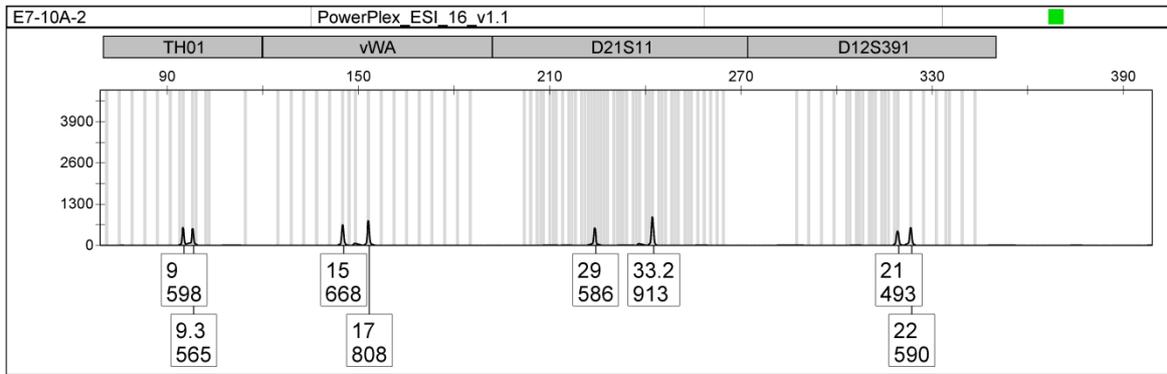
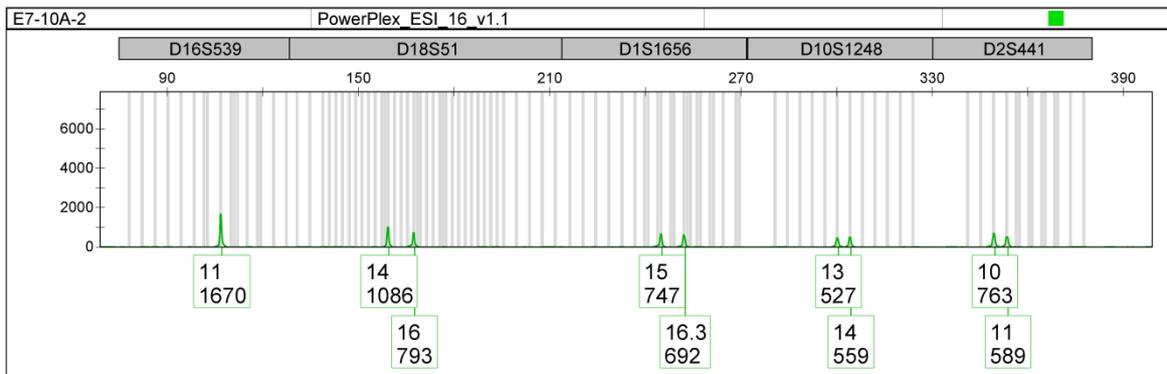
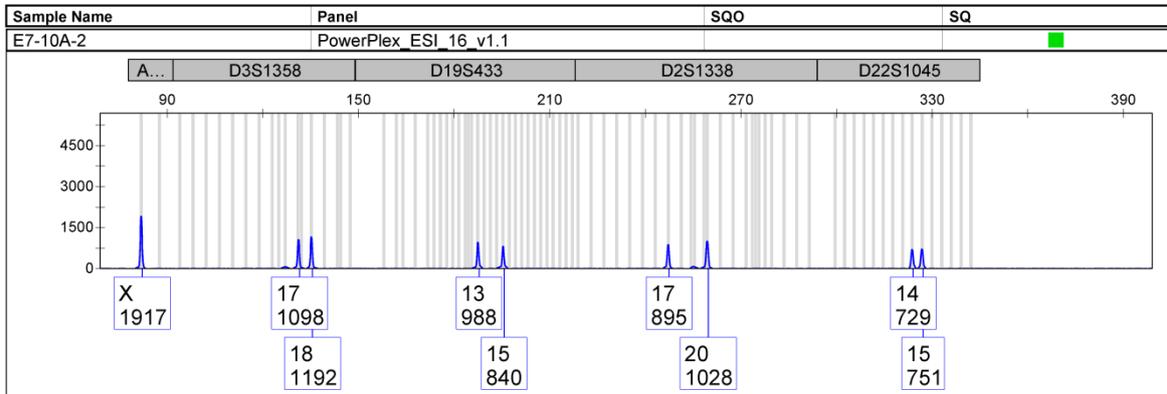
AB Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

FA-S2-T0687-AAN-



AB Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

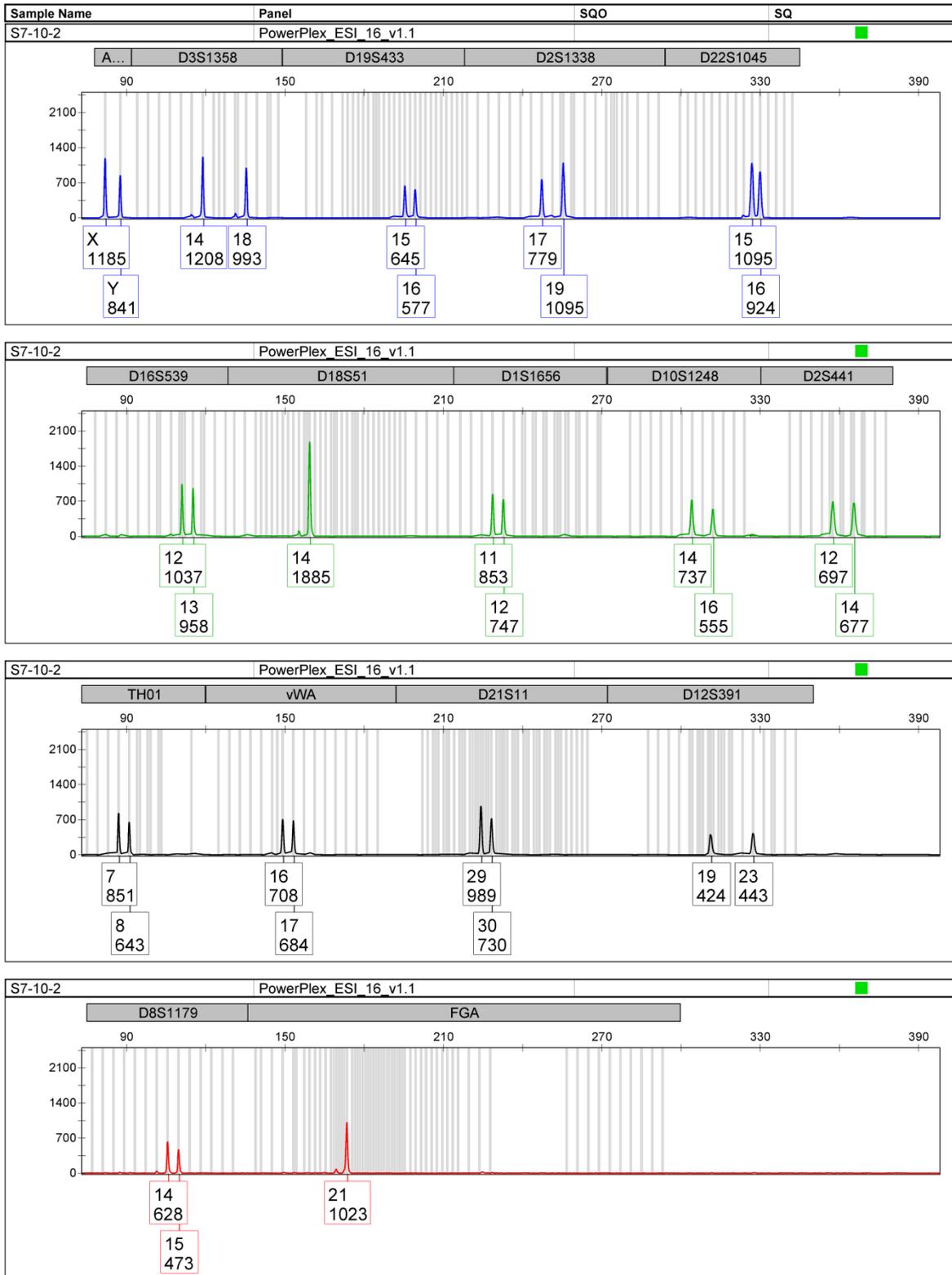
FA-S2-T0687-AAN-





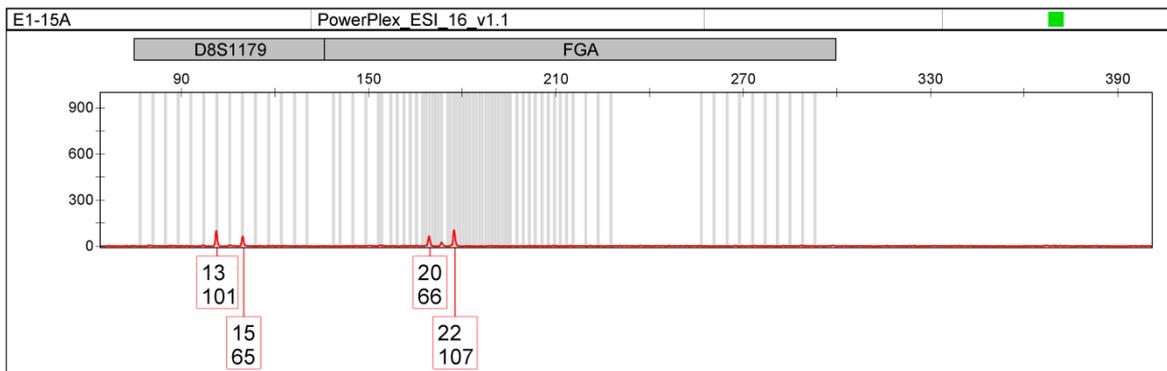
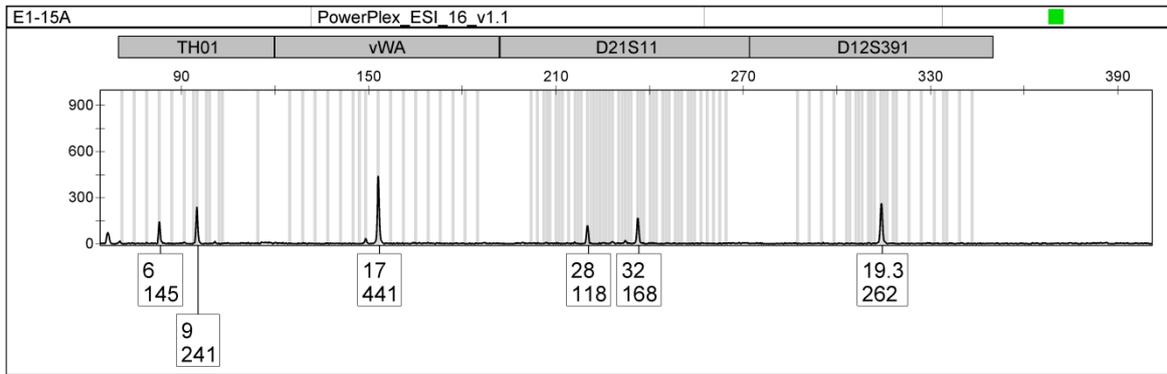
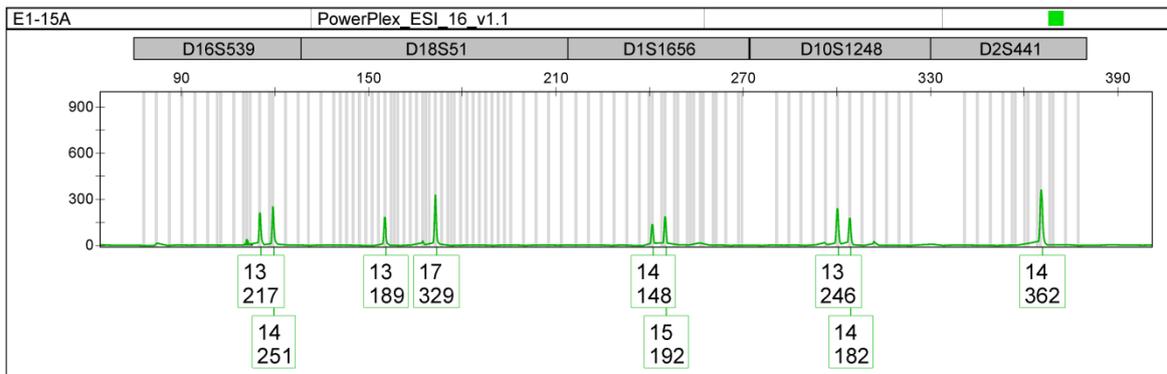
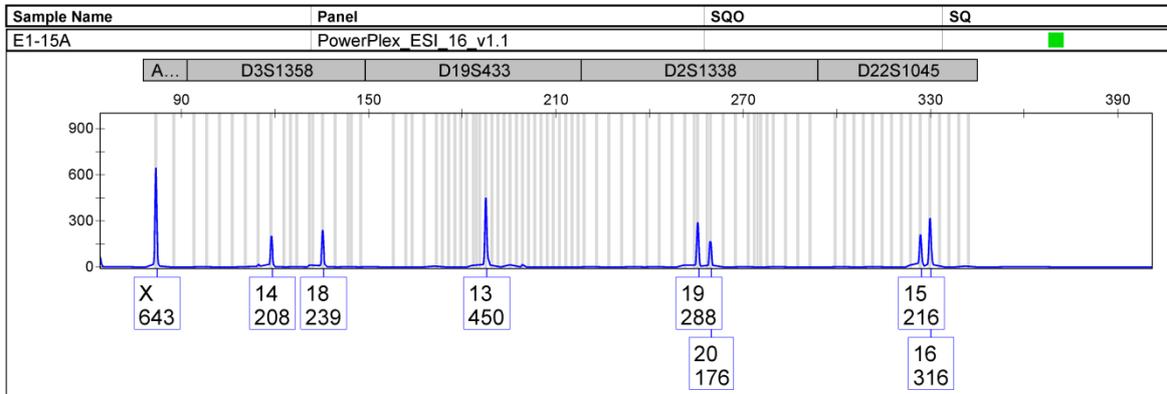
FA-S2-T0687-AAN-

GeneMapper ID v3.2



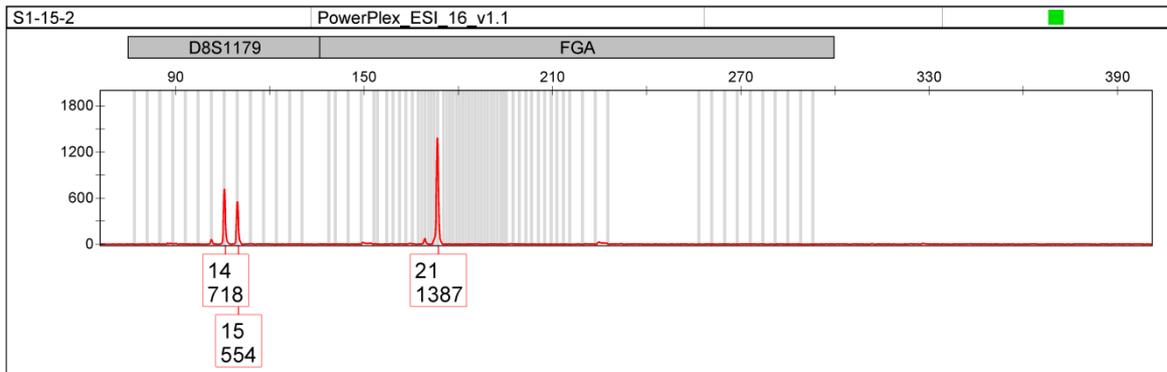
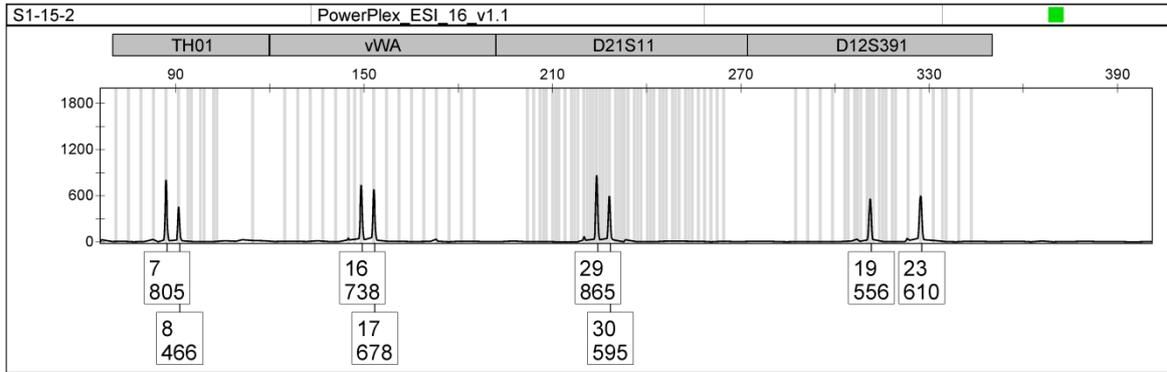
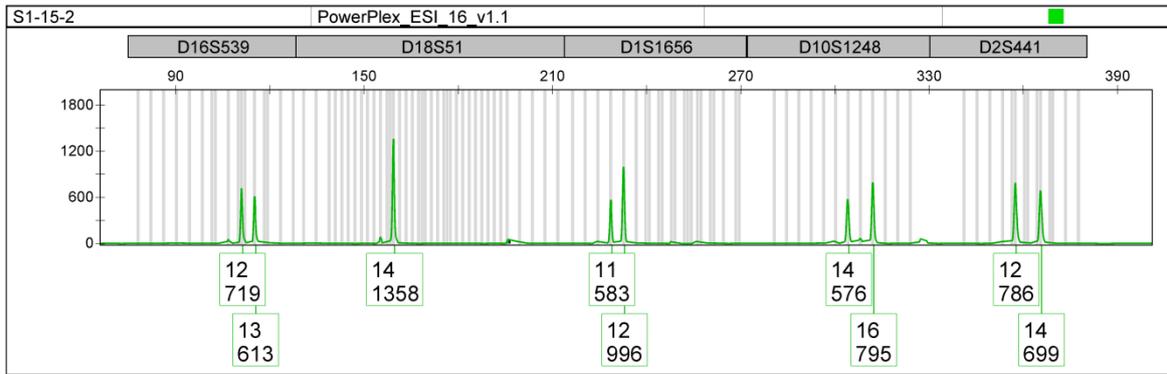
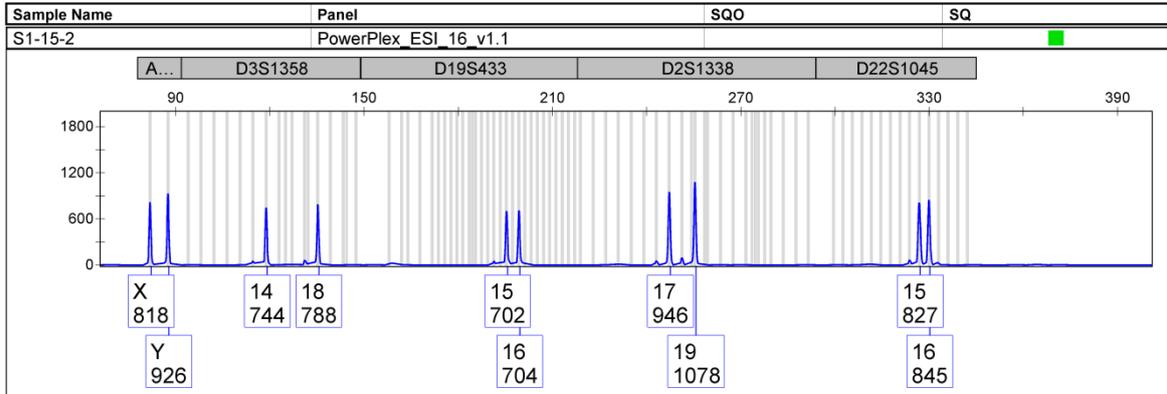
AB Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

FA-S2-T0286-AAN-1



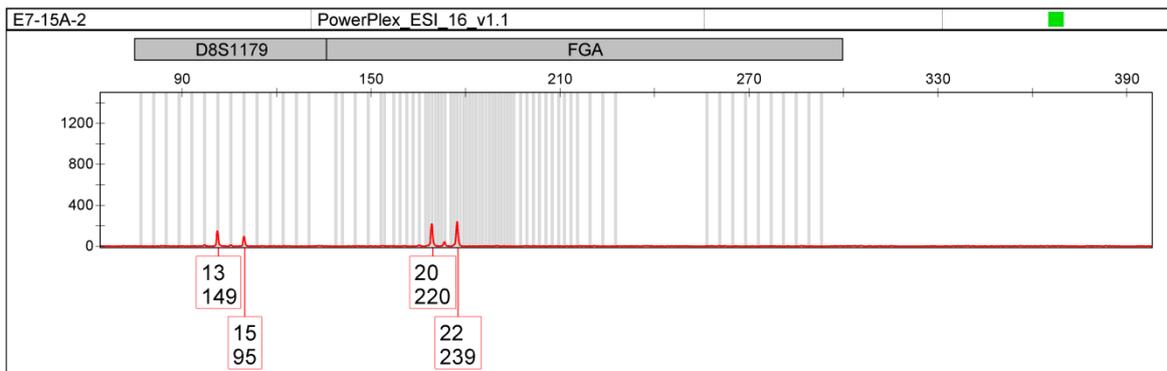
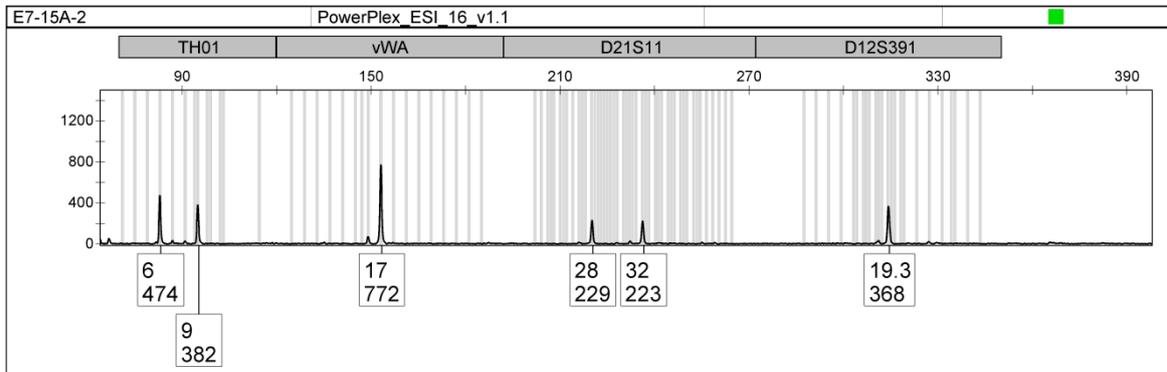
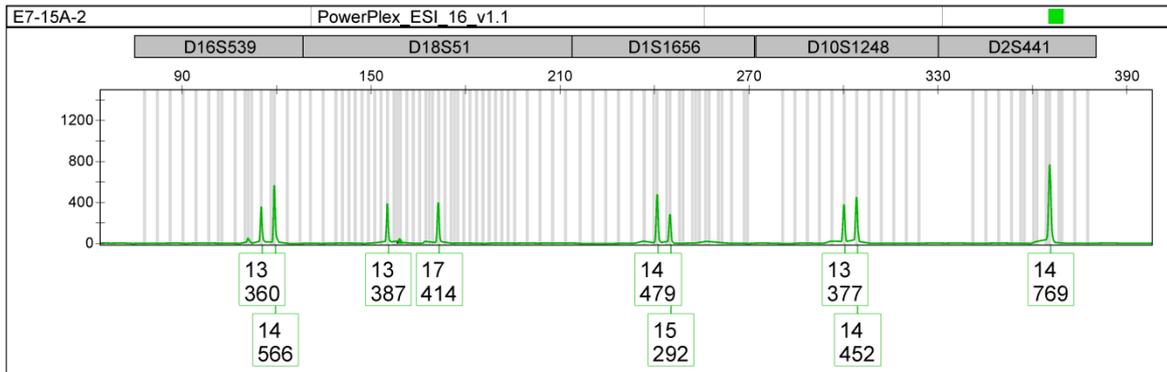
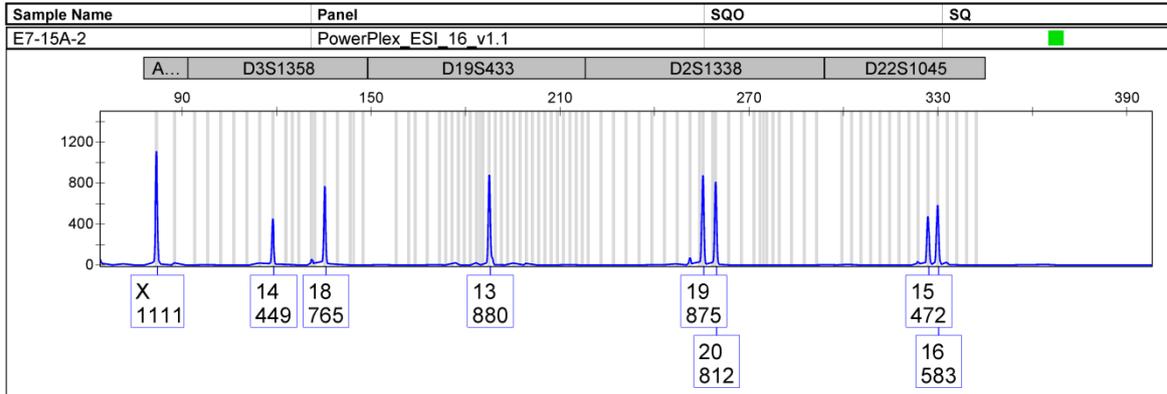
AB Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

FA-S2-T0687-AAN-



AB Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

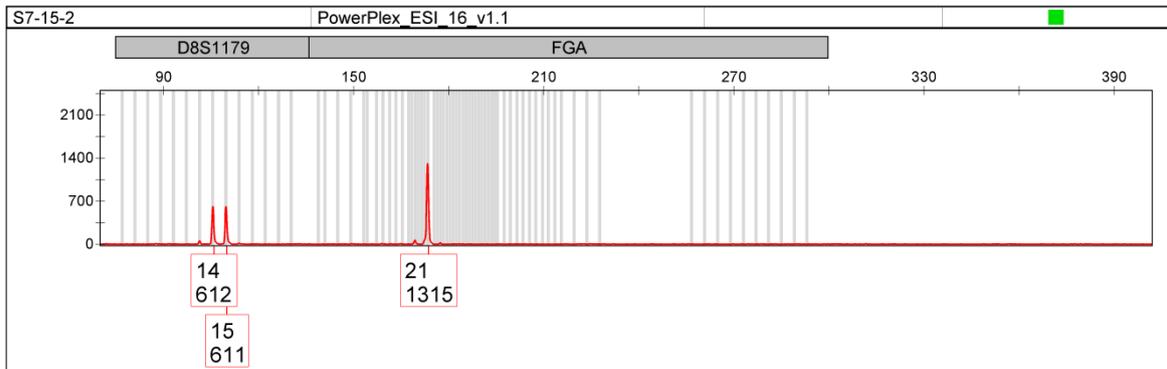
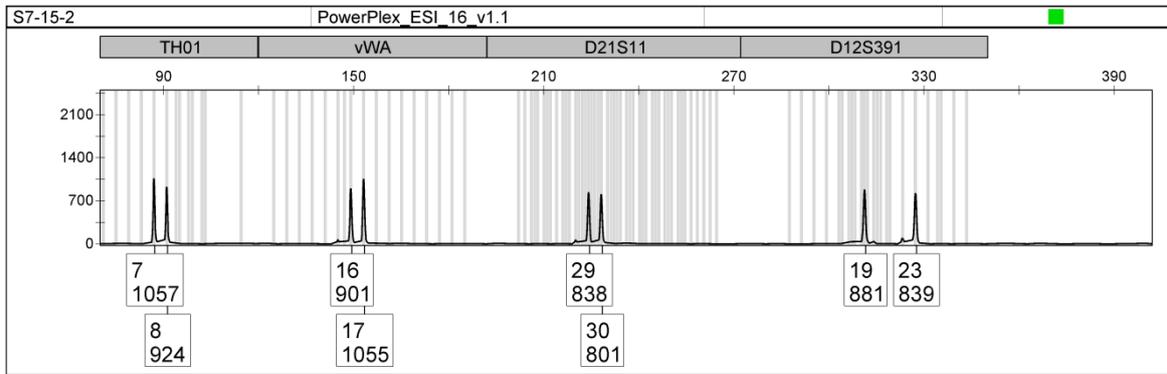
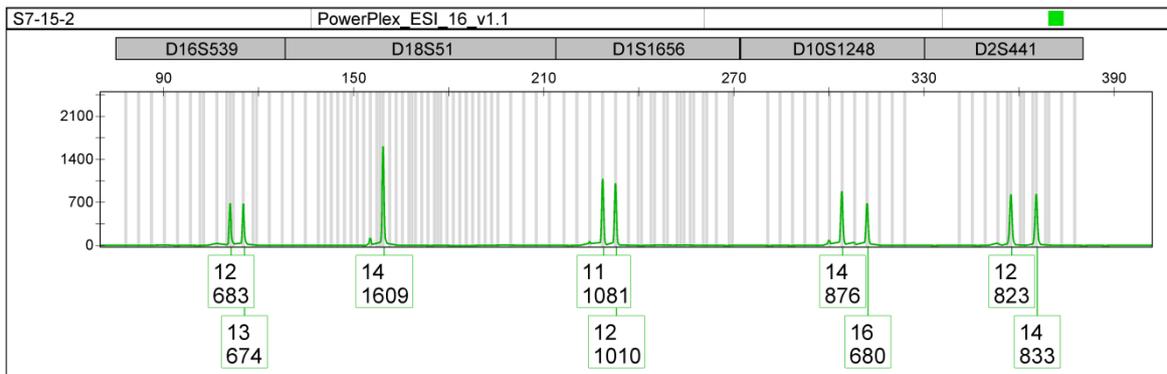
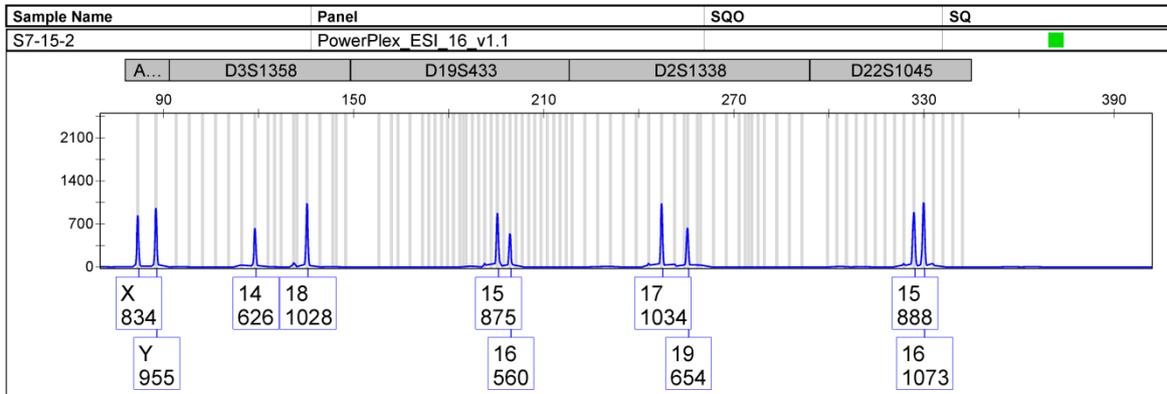
FA-S2-T0687-AAN-





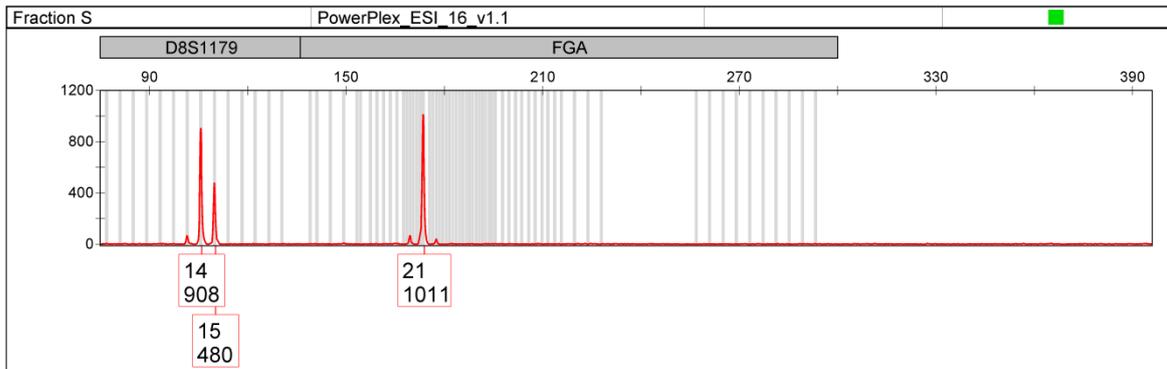
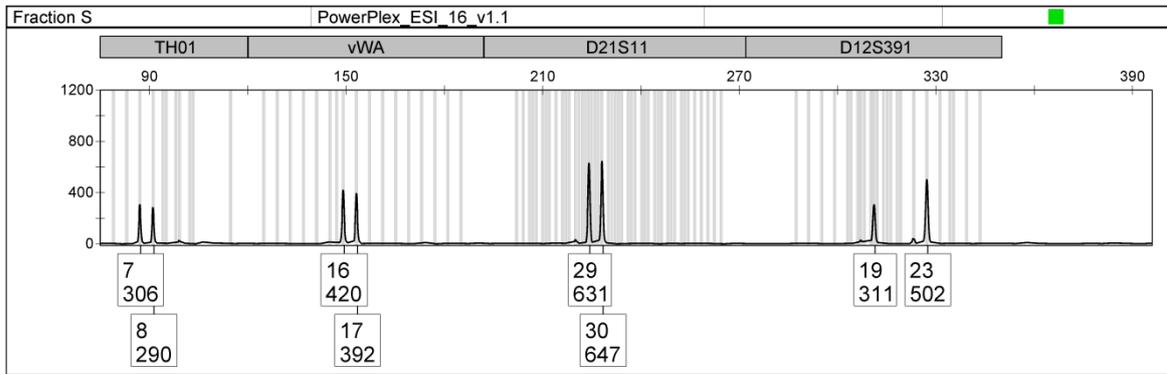
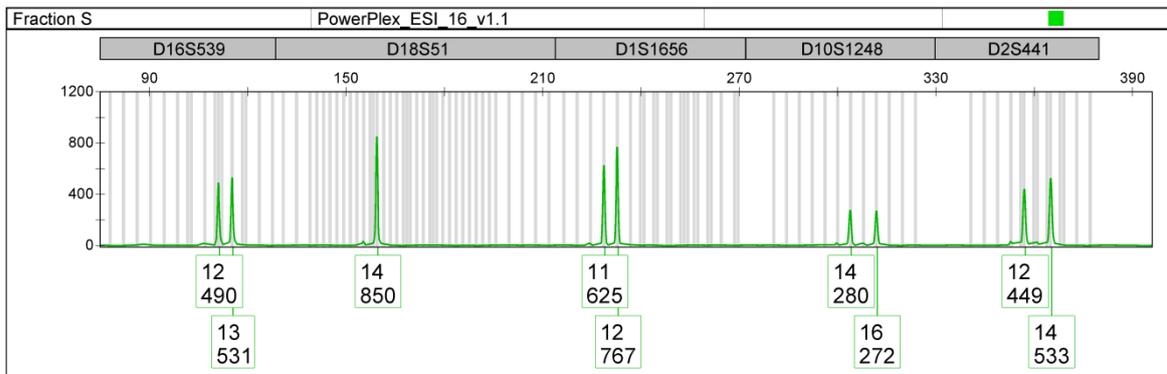
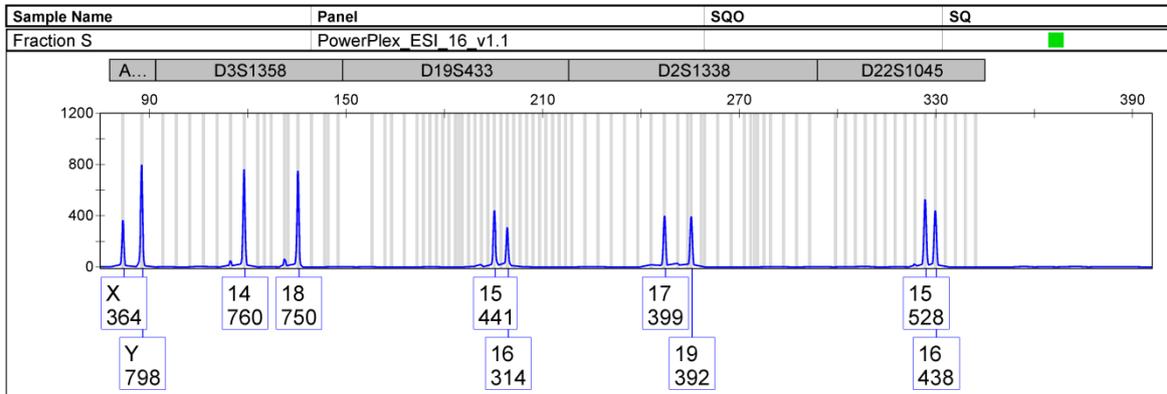
FA-S2-T0687-AAN-

GeneMapper ID v3.2



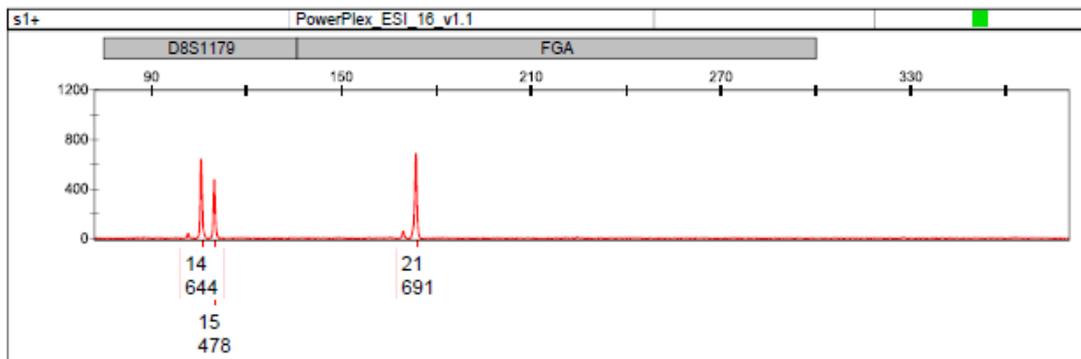
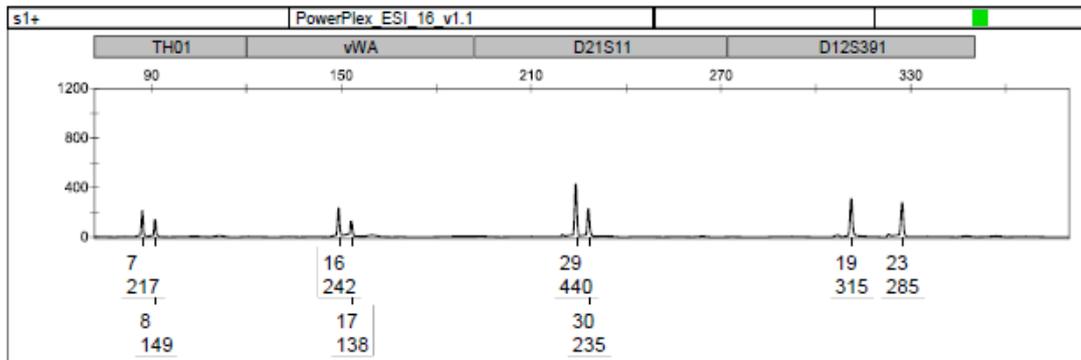
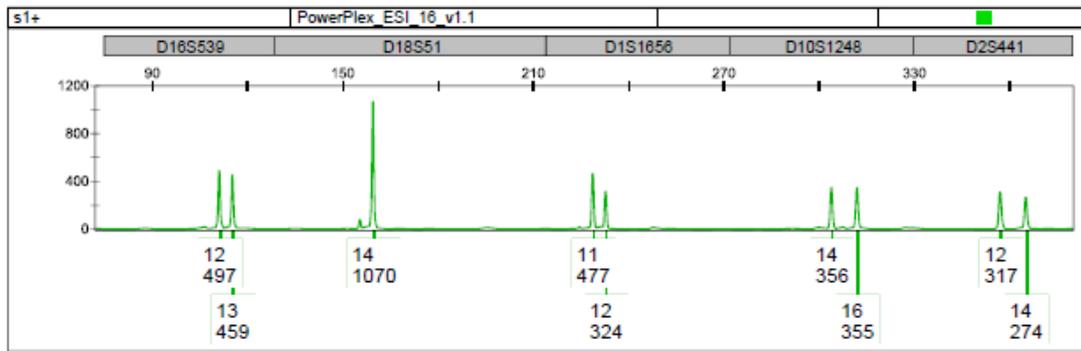
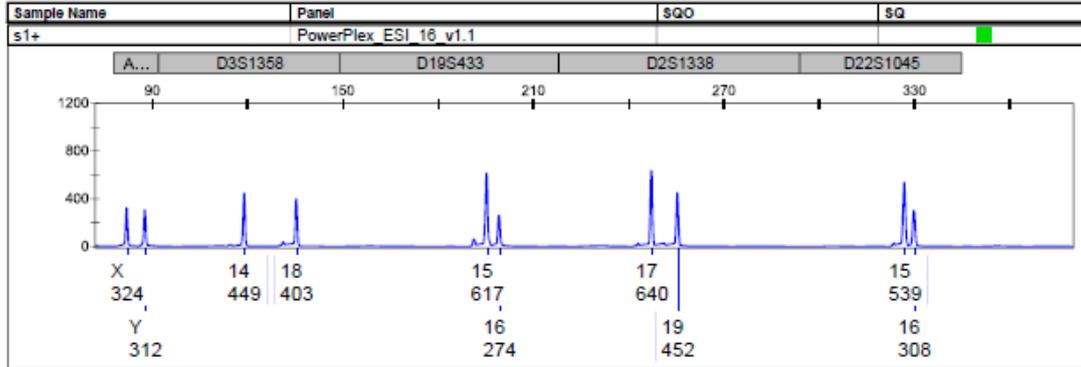
AB Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

VALIDATION EXT DIFF AAN - 01



Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

VALIDATION EXT DIFF AAN - 01



Sun Jun 05, 2016 05:39PM, CEST

Printed by: gmid

Page 1 of 1

Précis supplémentaire sur les diverses étapes

Le tampon classique n'ayant pas donné de résultats, nous avons modifié le protocole en diminuant d'abord la concentration de PK et en augmentant le volume de sperme pour éventuellement minimiser l'impact sur les spermatozoïdes et préserver leur capacité à résister au cours de la première étape de lyse en vue d'obtenir une fraction spermatique pure.

Cette modification du protocole (la concentration de PK et du sperme) a été vaine puisqu'elle a abouti à une perte totale des spermatozoïdes, laissant croire à une absence de lien entre la variation du volume de la PK et la dégradation des spermatozoïdes. Nous avons d'ailleurs tout le temps travaillé sous un pH maintenu à 8.5 (valeur optimale pour l'étape dite douce) en conservant les composants à température ambiante, vu que la conservation du SDS à -20°C provoquait sa cristallisation après décongélation.

Le tampon classique avait été trouvé optimal pour la lyse des cellules épithéliales qui ne sont pas mélangées avec les spermatozoïdes (frottis bucal seul), même au temps d'incubation le plus bas (5 mn). Il n'a cependant eu aucune action lytique sur les spermatozoïdes incubés à 5, 10 et 15 mn, mais non mélangés aux cellules épithéliales, contrairement aux mélanges des deux fractions épithéliale et spermatique dont les deux types de cellules disparaissent.

Une explication pourrait être l'action des lysosomes, abondants dans le cytoplasme des cellules épithéliales, et libérées sous l'action du tampon classique. Les lysosomes ont un pH acide qui participe à changer le milieu alcalin du tampon en un milieu acide, provoquant d'une part une action agressive sur les spermatozoïdes; les enzymes libérés des lysosomes pouvant d'autre part participer à la dégradation des spermatozoïdes. La PK seule n'effectue pas la dégradation des cellules épithéliales, on a constaté que les quatre composants EDTA, Tris HCl, NaCl et SDS jouaient un rôle important dans la lyse de ces dernières.

C'est face au peu de résultats concluants que nous avons élaboré le protocole modifié pour la procédure en deux étapes de l'extraction différentielle afin d'obtenir des lysats avec une quantité suffisante de spermatozoïdes pour la réalisation de profils fiables. Ce tampon modifié a fini par donner les résultats escomptés, premier résultat positif après les multiples reprises de l'expérience d'extraction différentielle.

Cette nouvelle procédure nous a donc permis de quantifier les extratomes d'ADN de la fraction spermatique, mais la fraction épithéliale n'a toujours pu être détectée par la RT-PCR. Il a donc fallu rechercher de nouveau une méthode pour la purifier en vue de la RT-PCR et de l'électrophorèse capillaire pour enfin aboutir à des profils ADN interprétables.

Malgré l'action bénéfique de l'EDTA qui empêche les nucléases libérées après la digestions des cellules épithéliales de dégrader l'ADN (par liaison de ses molécules aux ions bivalents qui jouent un rôle de cofacteur de ces enzymes), la quantité utilisée dans le nouveau tampon d'étape douce (1 mM)) a malgré tout provoqué une inhibition de la RT-PCR. C'est l'utilisation en parallèle des tubes Amicon qui a permis la purification des extractomes de la fraction féminine saturée par les molécules d'EDTA.

Enfin, et c'était le but recherché, le protocole modifié testé durant cette expérimentation nous a finalement permis l'obtention de profils génétiques complets, de bonne qualité et interprétables, avec 16 marqueurs, pour les deux sexes, et des RFU variant pour l'homme de 611 à 1609, et pour la femme de 3709 à 9313.

CONCLUSION

Conclusion

Le but de ce travail a été l'optimisation de l'extracton différentielle sur des échantillons se devant de présenter une certaine similarité aux échantillons prélevés dans des cas réels d'agressions sexuelles. C'est ainsi que des frottis jugaux ont été effectués sur différentes personnes consentantes, volontaires et anonymes de sexe féminin, in situ ; un volume bien déterminé de sperme était ensuite déposé sur chaque frottis puis les mélanges étaient traités suivant un protocole optimisé.

L'analyse a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les nombres des spermatozoïdes incubés à 5 mn, 10 mn et à 15 mn après la première étape de lyse douce.

Des quantités importantes d'ADN ont pu être récupérées des cellules spermatiques. L'ADN de la fraction féminine non filtrée n'a donné aucun résultat contrairement à celui de la fraction filtrée dont les résultats ont été satisfaisants pour aboutir (après électrophorèse) à des profils génétiques.

Il a été nécessaire de reproduire de multiples fois les expériences car le tampon de lyse utilisé à l'INCC ne donnait pas de résultats probants et interprétables, avec une impossibilité de séparer les deux fractions épithéliale et spermatique.

Il a été noté le caractère agressif de ce tampon classique, autant pour les cellules spermatiques qu'épithéliales lorsqu'elles étaient mélangées, de même que le caractère inhibiteur de l'EDTA, chélateur des Mg^{2+} .

Le tampon mis au point dans cette étude a permis la séparation des deux fractions épithéliale et spermatique, l'obtention de spermatozoïdes non lysés et l'aboutissement à des profils génétiques ADN de bonne qualité, parfaitement exploitables, féminins et masculins séparés.

Comme perspectives, il nous semble utile de proposer une étude similaire avec des échantillons réels de prélèvements vaginaux post-coïtaux, en coordination avec des services de gynécologie hospitaliers.

Nous préconisons de même l'utilisation d'échantillons de sperme à différentes concentrations pour cerner la quantité minimale nécessaire à l'obtention d'un profil ADN interprétable et enfin, la mise au point de plans d'expériences pour un tampon de lyse avec

EDTA à différentes concentrations pour déterminer la plage optimale de concentration favorisant la lyse des cellules épithéliales et minimisant l'inhibition de la RT-PCR.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ameziane Nedjma, Marc Bogard, Jérôme Lamoril (2005). Principes de Biologie Moléculaire en Biologie Clinique, Elsevier Masson.
2. Butler John M. (2011). Advanced topics in forensic DNA typing : Methodology. Gaithersburg, Maryland, USA.
3. Coquoz Raphaël, Taroni Franco (2006). Preuve par l'ADN : la génétique au service de la justice, PPUR Presses Polytechniques.
4. de Mazancourt Philippe, Geoffroy Lorrin de la Grandmaison, Marc Bailly, Michel Durigon, Hélène Pfitzinger (2006). Viols, sperme, spermatozoïdes, identification et paternité médicolégale, pp. 242–244.
5. El Ossmani H., Bouchrif.B., Talbi J., El Amri.H., Chafik.A. (2007). La diversité génétique de 15 STR chez la population arabophone de Rabat-Salé-Zemmour- Zaer. Antropo 15 : 15–62.
6. Farce, Marie-Hélène (2000). Génétique Moléculaire, Institut National de la Recherche Agronomique, Editions Quae, Milan.
7. Gill P., Jeffreys A.J., Werrett D.J. (1985). Forensic application of DNA 'fingerprints'. Nature. In : Sarah Bourgoïn (2000). Protocoles rapides pour la préparation d'ADN à partir d'échantillons caractéristiques de la Biologie Judiciaire, Québec.
8. Goodwin W., Linacre A., Sibte H. (2007). An Introduction To Forensic Genetics, John Wiley & Sons, 17.
9. Goodwin. W., Linacre A., Sibte.H. (2011). An Introduction to Forensic Genetics, John Wiley & Sons.
10. Grunenwald A. (2014). Etude de l'interaction entre ADN et apatites analogues au minéral osseux et dentaire – Implications pour la préservation de l'ADN ancien, son extraction, son analyse. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse.
11. Hochmeister, Manfred N. (1995).DNA technology in forensic applications, Institute of Legal Medicine, University of Berne.
12. Hulme Paul, Jennie Lewis, Geraldine Davidson (2012). Sperm elution : An improved two phase recovery method for sexual assault samples.
13. Hunt A.C., Corby C. and Dodd B.E. (). The Identification of Human Stains, a Critical Servey. Journal of Forensic Medicine. In : Refaat Mohamed Ahmed (2014). Pratical Techniques in Genetics Fingerprinting, Erriad.

14. Iglesias M. (2009). Ajout d'un contrôle d'inhibition dans les kits STR multiplex. Laboratoire Aurigen, Lausanne, p. 14 .
15. Mansuet-Lupo A., Rouger P., Van Huffel V. (2007). Les empreintes génétiques : état de l'art en 2007, techniques, applications et législation. Point about DNA profiling : Technologies, applications and legislation, Paris, 335–336.
16. Marieb Elaine N., Katja Hoehn (2014). Anatomie et Physiologie Humaines, Pearson Education France, 137–139.
17. Popescu Paul (1998). Techniques de Cytogénétique Animale, Editions Quae.
18. Poitras Elyse et Houde Alain (2002). La PCR en temps réel : Principes et Applications. Reviews in Biology and Biotechnology, vol. 2, n° 2, pp. 2–11.
19. Refaat Mohamed Ahmed (2014). Pratical Techniques in Genetics Fingerprinting, Erriad, page 58.
20. Stuart H. James, Jon J. Nordby, Suzanne Bell (2014). Forensic Science : An Introduction to Scientific and Investigative Techniques, Taylor & Francis, 220–223.
21. Sajantila A., Puomilahti S., Johnsson V. and Ehnholm C. (1992). Amplification of reproducible allele markers for amplified fragment length polymorphism analysis. In : John Marshall Butler (2011). Advanced Topics in Forensic DNA Typing : Methodology, Academic Press.
22. Tran N.U. (2008). Mise au point d'une technique de quantification des populations bactériennes et archaea de l'écosystème caecal du lapin par PCR en temps réel. Mémoire de l'Ecole Nationale Veterinaire, Toulouse.
23. Turner P.C., A.G. Mc Lennan, A.D. Bates and M.R.H. White (2002). L'essentiel en Biologie Moléculaire. Berti Editions, Paris., pp. 75, 77–79.

ANNEXES

Annexe 1 : Préparation des solutions

Gram's iodine: 300 mL d'eau distillée, 1.0 g d'I₂, 2.0 g de KI. Solution stocké à 4°C.

Nuclear Fast Red Stain : dans 100 mL d'eau distillée chaude, dissoudre 2,5 g de sulfate d'aluminium et 0,05 g de nuclear fast red. Après refroidissement, la solution est filtrée et stockée à 4°C.

Picroindigocarmin stain : 100 mL d'eau distillée chaude, 1,3 g d'acide picrique, 0,33 g d'indigo carmine. Refroidissement, filtration de la solution et stockage à 4°C.

Annexe 2 : Tableau 3 Préparation de tampon d'extraction classique

Réactif	Concentration	Volume	pH
EDTA (0,5M)	46,525 g.mol ⁻¹ (EDTA 372,2 g.mol ⁻¹) + 250 mL H ₂ O	12,5 mL	8
SDS (20%)	10 g (SDS 288,38 g.mol ⁻¹) + 50 mL H ₂ O	6,25 mL	8
Tris HCl (1M)	39,4 g (Tris HCl 157,6 g.mol ⁻¹) + 250 mL H ₂ O	50 mL	8
NaCl (5M)	73,05 g (NaCl 58,44 g.mol ⁻¹) + 250 mL H ₂ O	12,5 mL	8
Eau ultra pure		A compléter à hauteur de 250 mL	8

Annexe 3 : Tableau 4 Plan de travail de l'étape de la RT-PCR (neuvième étape)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de standard1	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de standard1	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de S1-5	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de S4-10	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de S2	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de E2-10	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de E5-15					
B	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de standard2	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de standard3	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de S2-5	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de S5-10	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de S3	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de E3-10	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de Tex S					
C	23µL du réactif master mix+ 2 µL de standard4	23µL du réactif master mix+ 2 µL de standard 4	23 µL du réactif master mix+ 2µL de S3-5	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de S1-15	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de E1-5	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de E4-10	23 µL du réactif master mix+ 2 µL de Tex E					
D	23 µL du réactif master mix+ 2 µL	23 µL du réactif master mix+ 2 µL	23 µL du réactif master	23 µL du réactif master	23 µL du réactif master	23 µL du réactif master	TQ= 23 µL du réactif					

H	11 μ L du tampon mixte+ 1 μ L d'ADN de S2+	11 μ L du tampon mixte+ 1 μ L de Ladder	11 μ L du tampon mixte+ 1 μ L de TEX S	11 μ L du tampon mixte+1 μ L de Ladder	11 μ L du tampon mixte+ 1 μ L de Ladder	11 μ L du tampon mixte+ 1 μ L de Ladde	11 μ L du tampon mixte+ 1 μ L de Ladder	11 μ L du tampon mixte+ 1 μ L Ladder
---	---	--	---	--	--	--	--	---

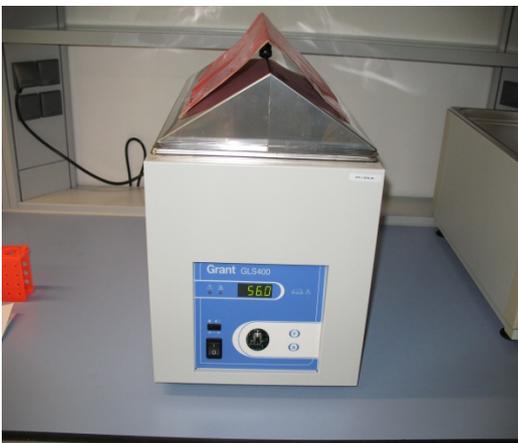
Annexe 7 : Appareillage



Bain à sec



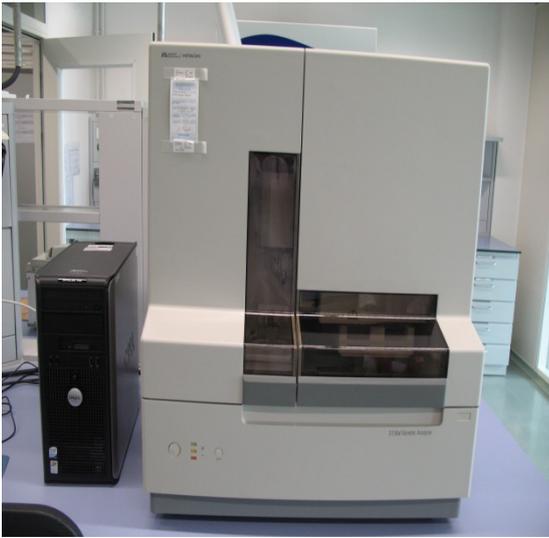
Cross-Linker



Bain marie



Centrifugeuse



Electrophorèse capillaire 3130 XL
Genetic Analyzer



Thermocycleur, PCR
GeneAmp®9700



RT-PCR 7500.



Hotte à flux laminaire.



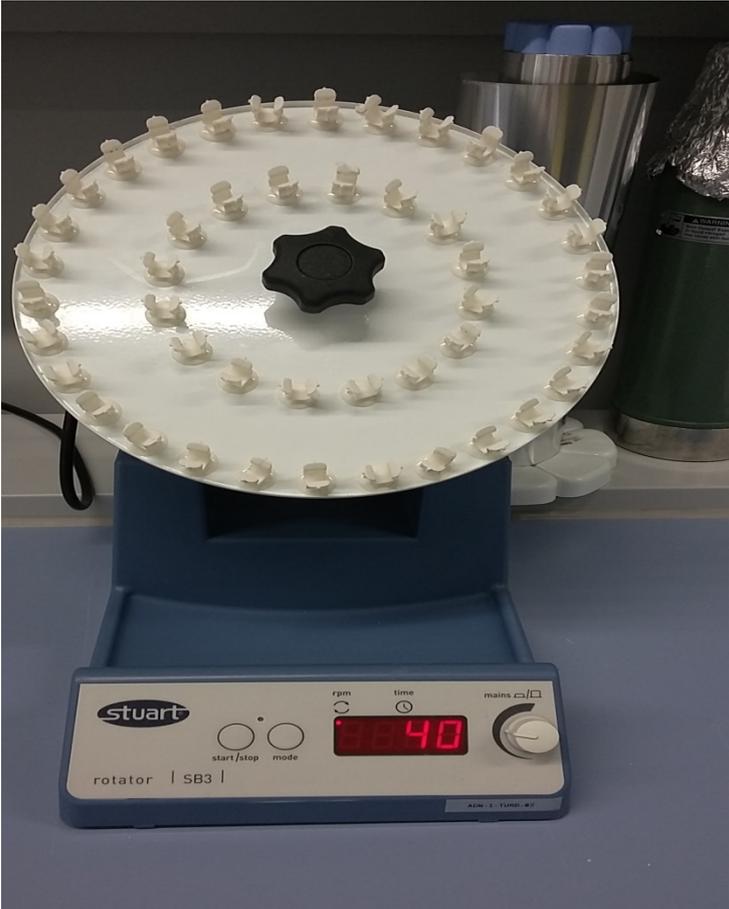
Cellule de Malassez



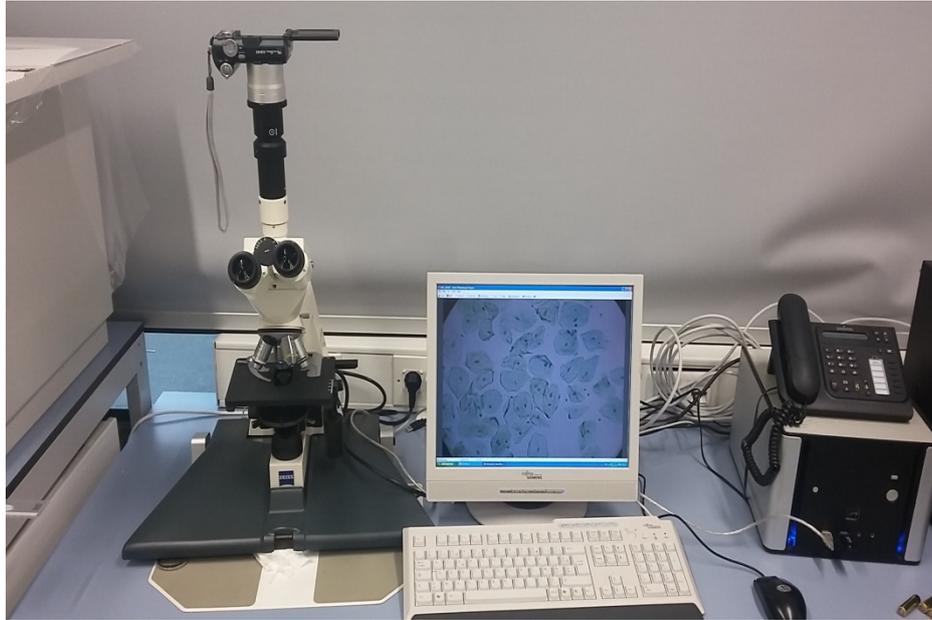
pH mètre



Balance



Rotateur



Microscope équipé d'un appareil photo



Plaque chauffante

Annexe 8 : Statistiques descriptives

Variable	Descriptive Statistics (Spreadsheet1)				
	Valid N	Mean	Standard Error	Median	Coef.Var.
c5	5	7,0	1,8	8,2	57,1
c10	5	7,9	2,2	8,4	63,6
c15	5	10,3	0,9	10,9	18,5
Contrôle	3	25,8	1,8	27,0	12,1

Annexe 9 : Statistiques descriptives des nombres de spermatozoïdes $\times 10^6$ (et de leurs logarithmes)

Variable	Descriptive Statistics				
	Valid N	Mean	Standard Error	Median	Coef.Var.
n5	7	13,2	4,5	8,2	90,7
n10	7	25,9	4,2	26,5	42,9
n15	7	15,0	3,1	15,3	55,0
Contrôle	3	7,9	2,3	6,2	51,2

Variable	Descriptive Statistics		
	Valid N	Mean	Standard Error
Ln(c5)	7	16,1	0,3
Ln(c10)	7	16,9	0,2
Ln(c15)	7	16,4	0,2
Ln(Contr)	3	15,8	0,3

Annexe 10 : Test de Levène, ANOVA et test de la médiane

Variable	Levene Test of Homogeneity of Variances							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Nbre	92,31	3,00	30,77	749,05	20,00	37,45	0,82	0,50
Ln(nbre)	0,13	3,00	0,04	2,87	20,00	0,14	0,30	0,82

Variable	Analysis of Variance							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Nbre	929,19	3,00	309,73	2038,71	20,00	101,94	3,04	0,053
Ln(nbre)	3,68	3,00	1,23	8,71	20,00	0,44	2,82	0,065

Dependent: Nbre	Median Test, Overall Median = 14,5000; Nbre Independent (grouping) variable: Ech Chi-Square = 8,000000 df = 3 p = ,046				
	5 mn	10 mn	15 mn	Contrôle	Total
<= Median: observed	5,0	1,0	3,0	3,0	12,0
expected	3,5	3,5	3,5	1,5	
obs.-exp.	1,5	-2,5	-0,5	1,5	
> Median: observed	2,0	6,0	4,0	0,0	12,0
expected	3,5	3,5	3,5	1,5	
obs.-exp.	-1,5	2,5	0,5	-1,5	
Total: observed	7,0	7,0	7,0	3,0	24,0

Annexe 11 : Statistiques descriptives des concentrations d'ADN

Variable	Descriptive Statistics				
	Valid N	Mean	Standard Error	Median	Coef.Var.
c5	7	72,9	10,6	74,7	38,6
c10	7	81,5	3,4	84,0	11,1
c15	7	75,6	4,9	80,5	17,2
Contr	3	110,2	17,5	121,5	27,5

Annexe 12 : Test de Levène, ANOVA et test de la médiane

Variable	Levene Test of Homogeneity of Variances Marked effects are significant at p < ,05000							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
c(ADN)	770,37	3,00	256,79	2895,65	20,00	144,78	1,77	0,18

Variable	Analysis of Variance Marked effects are significant at p < ,05000							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
c(ADN)	3230,8	3,0	1076,9	8107,0	20,0	405,4	2,66	0,076

Dependent: c(ADN)	Median Test, Overall Median = 80,0250; c(ADN) Independent (grouping) variable: Gr Chi-Square = 1,904762 df = 3 p = ,5924				
	5 mn	10 mn	15 mn	Contr	Total
<= Median: observed	5,00	3,00	3,00	1,00	12,00
expected	3,50	3,50	3,50	1,50	
obs.-exp.	1,50	-0,50	-0,50	-0,50	
> Median: observed	2,00	4,00	4,00	2,00	12,00
expected	3,50	3,50	3,50	1,50	
obs.-exp.	-1,50	0,50	0,50	0,50	
Total: observed	7,00	7,00	7,00	3,00	24,00

Annexe 13 : Corrélations de Pearson

Echant=Contrôle Correlations Marked correlations are significant at $p < ,05000$ N=3 (Casewise deletion of missing data)		
Variable	Nbre	Conc
Nbre	1,0000	,4524
	p= ---	p=,701
Conc	,4524	1,0000
	p=,701	p= ---

Echant=5 mn Correlations Marked correlations are significant at $p < ,05000$ N=7 (Casewise deletion of missing data)		
Variable	Nbre	Conc
Nbre	1,0000	-,2237
	p= ---	p=,630
Conc	-,2237	1,0000
	p=,630	p= ---

Echant=10 mn Correlations Marked correlations are significant at $p < ,05000$ N=7 (Casewise deletion of missing data)		
Variable	Nbre	Conc
Nbre	1,0000	,1157
	p= ---	p=,805
Conc	,1157	1,0000
	p=,805	p= ---

Echant=15 mn Correlations Marked correlations are significant at $p < ,05000$ N=7 (Casewise deletion of missing data)		
Variable	Nbre	Conc
Nbre	1,0000	,6223
	p= ---	p=,136
Conc	,6223	1,0000
	p=,136	p= ---

Annexe 14 : Statistiques descriptives (ADN des cellules épithéliales)

Descriptive Statistics					
Variable	Valid N	Mean	Standard Error	Median	Coef.Var.
c5	5	358	49	397	30,4
c10	5	334	50	314	33,3
c15	3	210	101	241	83,2

Annexe 15 : Test de Levène et analyse de variance

Levene Test of Homogeneity of Variances								
Marked effects are significant at $p < ,05000$								
Variable	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
c(ADN)	2897,6	2,0	1448,8	29490,0	10,0	2949,0	0,49	0,63

Analysis of Variance								
Marked effects are significant at $p < ,05000$								
Variable	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
c(ADN)	44058,6	2,0	22029,3	158439,5	10,0	15843,9	1,39	0,29

Median Test, Overall Median = 313,690; c(ADN) Independent (grouping) variable: Gr Chi-Square = ,6603175 df = 2 p = ,7188				
Dependent: c(ADN)	5 mn	10 mn	15 mn	Total
<= Median: observed	2,00	3,00	2,00	7,00
expected	2,69	2,69	1,62	
obs.-exp.	-0,69	0,31	0,38	
> Median: observed	3,00	2,00	1,00	6,00
expected	2,31	2,31	1,38	
obs.-exp.	0,69	-0,31	-0,38	
Total: observed	5,00	5,00	3,00	13,00

Annexe16 : réactifs, appareillages et équipements utilisés

- Masque, charlotte, gants
- Ecouvillons
- Tube de type Ependorff 2,2 mL
- Filtre Nalgen
- Bécher
- Cross linker
- Vortex
- Plaque chauffante
- Lames et lamelles
- Microscope équipé d'un appareil photo
- Eau ultra pure
- Des solutions de coloration (iode, indigo carmine, fast red).
- Balance
- Erlenmeyer et bécher
- Cuillères en métal

- Filtre de Nalgen
- pH mètre
- EDTA, SDS, Tris HCl, NaCl, NaOH.

Annexe 17: SDS cristallisé

