

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
UNIVERSITE SAAD DAHLEB- BLIDA  
FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLOME DE MASTER EN SCIENCE DE LA NATURE  
ET DE LA VIE

Spécialité: génétique et physiologie  
Filière : Biologie

# Optimisation Quantitative et Qualitative de L'ADN obtenu à partir de la brosse à dents pour établir une empreinte génétique

Présenter par

ABDEMEZIANE karima

Le: 03.07.2013

Soutenu devant le jury:

- M <sup>r</sup> M <sup>ed</sup> SAID.R	MAA	USDB	President
- M <sup>me</sup> GUESSAIBIA. N	MCB	USDB	Promotrice
- M <sup>elle</sup> BELABAS.S	Ingénieur d'état	LPS/ADN	Co-promotrice
- M <sup>r</sup> BENSAAD.A	MCB	USDB	Examinateur
- M <sup>me</sup> CHERRALLAH	MAA	USDB	Examinatrice

LABORATOIRE DE BIOLOGIE LEGALE-  
POLICE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

*: Je tiens à dédier ce travail à*

*tous particulièrement à mon frère décédé ABDEMEZIANE Mohamed Tarek*

*Je veux lui dire que Depuis que tu es parti je t'ai jamais oublié*

*Les seuls souvenirs de toi qu'ils me restent*

*Sont gravés dans mon cœur et à jamais dans ma tête*

*.Je t'aime Tarek*

*À tous ceux qui me sont chers, à ma source de fierté et à qui je dois ce travail, les deux personnes irremplaçables et inégalables qui ont rempli ma vie d'encouragement, d'affection et de sacrifices, à vous mes chers parents, qui me soutiennent à tout moment que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pour que vous puissiez assister à d'autres succès .inch'allah. Je t'aime maman, je t'aime papa*

*À ma chère sœur Leïla et son mari, mes chers frères Sadaoui, Walid et Saber, et a leurs femmes, A tous mes neveux Tarek, Yaccer, Hani, et Mohamed et mes nièces Achwak et Hanane et a toute ma grande famille*

*Une spéciale dédicace à celui qui va m'accompagner pour le reste de ma vie, mon souhait c'est .qu'il va continuer à ma courgée, mon futur mari, je le remercie par cette occasion*

*Une autre personne chère à mon cœur, amie, la cause du mon choix à cette spécialité : Wacila Remadni, je veux lui dire merci, je t'ai pas oublié, bien qu'on n'ait pas trop parlé dans cette .dernière période mais je t'aime ma sœur*

*À tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin à la réalisation de ce travail, ne serait-ce que .par humble présence*

*...À eux tous, je dédie ce mémoire*

*Cordialement*

*ABDEMEZIANE Karima*

En préambule à ce mémoire, je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

En premier lieu, je remercie **Dieu** de m'avoir donné la force, le courage, et la chance d'avoir accomplie ce travail.

Je témoigne ma reconnaissance à mon université pour la formation qui m'a été prodiguée, ainsi qu'à tous les professeurs qui m'ont transmis leur science.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur: **A.FERRAG**, chef de la sous direction de la police scientifique et technique, qui ma permis d'effectuer mon stage au sein de son établissement qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect.

Il m'est impossible d'exprimer toute ma gratitude au Madame **N.GUESSAIBIA**, ma promotrice, je lui rends un hommage appuyé pour avoir accepté la charge de promotrice malgré ces préoccupations, je vous remercie pour votre conseils scientifiques, votre regard critique à la rédaction de ce manuscrit, je lui suis infiniment gré pour m'avoir corrigé et juger mon travail de manière très complète, cela ne rajoute qu'une ligne à la longue liste des choses pour les quelle je lui suis redevable, Je réitère mes sincères remerciements et mes gratitudes

Mon remerciement s'adresse également à mon encadreur de stage M<sup>lle</sup> **S.BELABAS** pour m'avoir accepté comme stagiaire, j'ai vue dans cette personne le vrai niveau de professionnalisme ,le sérieux , et le plus important leur passion à son travail, je voudrais vous remercie de m'apprendre la pratique que j'ai beaucoup apprécié pendant ces trois mois, J'ai beaucoup apprécié aussi sa disponibilité et son engagement constant jus qu'a la fin. Merci pour vos réponses et votre aide, j'espère avoir gardé de bonnes impressions.

Je remercie également La Commissaire Madame: **S. BELKHIRAT** la chef service de laboratoire de biologie légal pour toute l'attention qu'elle ma prêtée au bon déroulement de mon stage et pour avoir mis à ma disposition les moyens et matériel indispensable à la réalisation de ce travail, et Madame: **IZITI** la chef service de Laboratoire de Toxicologie de Police Scientifique et Technique.

Je remercie également Madame **N. ATIF** et son mari monsieur **L. ATIF** les deux médecins en épidémiologie à CHU F. Fanon Blida et son aide en statistique.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de laboratoire de la police scientifique et technique, un grand merci à tous les membres du laboratoire que j'ai pu côtoyer et qui par leur disponibilité et leur bonne humeur ont permis de travailler dans une ambiance joyeuse et conviviale: Officier **A. ZEKRI**, je la dit Merci Amel pour votre aide, votre accompagnement, votre gentillesse aussi je vous souhaite tous le bonheur du monde dans votre prochaine vie.

Et à **MR. A. MAMOUNI.**, et l'officier **Sohila.**

Je ne pourrais continuer ces remerciements sans me tourner vers mon enseignante Madame **L. SAADI** la présidente de membre du jury et de l'honneur quelle ma fait de juger ce travail J'adresse particulièrement mes remerciements aux membres du Jury Monsieur **A. BENZAAD** et Madame **A. CHARALLAH**. Je leur suis très reconnaissante du temps qu'ils y ont consacré pour leur examen critique de ce travail je profite cette occasion pour leur adresser mes sincères respects.



## GLOSSAIRE

**DNA away:** Pour éliminer toutes traces d'ADN sur les stations de travail sur les paillasses et l'équipement.

**Empreinte digitale :** est le résultat de l'apposition d'un doigt sur un support après encrage de celui-ci.

**PCR-multiplex:** L'amplification simultanée de plusieurs STRs par polymérisation en chaîne.

**Science forensique:** est l'application de différentes méthodes pour résoudre des questions dans le domaine criminel ou légal.

**Stutters:** des produits secondaires non désirés, apparaissent de façon aisément reconnaissable sur les profils ADN sous la forme de pic de taille réduite correspondant à un allèle ayant un élément répétitif de moins que l'allèle nominal.

**Tube passoire:** tube eppendorf Perforer avec une aiguille hypodermique stérile et qui est introduit après dans un nouveau tube eppendorf identifié (qui servira de réservoir de lysat).

## Liste des tableaux

<u>Tableau I</u> : Caractéristiques des loci du système CODIS.....	11
<u>Tableau II</u> : La cible de la sonde Taq man.....	24
<u>Tableau III</u> : Dilution en série de l'ADN Témoin.....	25
<u>Tableau IV</u> : Mixe pour la quantification ADN .....	26
<u>Tableau V</u> : Conditions thermique des différentes phases de la PCR réalisée.....	28
<u>Tableau VI</u> : Résultats de la quantification de l'ADN extrait à partir des échantillons de salive.....	33
<u>Tableau VII</u> : comparaison dans la composition entre les deux kits amplifications utilisés AmpFISTER Identifier, et AmpFISTER Identifier plus.....	Annexes
<u>Tableau VIII</u> : Loci amplifiés et fluorochromes utilisés par le kit AmpFISTR Identifier et AmpFISTR Identifier plus.....	Annexes
<u>Tableau IX</u> : Les paramètres de migration sur ABI PRISM® 3130 xl.....	Annexes
<u>Tableau X</u> : Conditions de cycle pour cycleur thermique 7500 Fast.....	Annexes
<u>Tableau XI</u> : Recommandations générale pour la conception des amorces PCR...	Annexes

## **La Liste des abréviations**

ADN: Acide Désoxy Ribonucléique.

AE: tampon d'élution

AL: Buffer Lysis

ATL: Buffer Tissue Lysis

AW1: Buffer Wash 1

AW2: Buffer Wash 2

ARN: Acide ribonucléique

CCD: Charge-Coupled Device

Codis: Combined DNA Index System

DTT: dithiothréitol

EDNAP: European DNA profiling

FBI: Federal Bureau of Investigation

FTA: Fast Technology for Analysis

IPC: Internal PCR Control.

ISFG: International Society of Forensic Haemogenetics

Kpb: kilo paire de bases.

NaCl: Chlorure de Sodium.

ng : nano gramme.

Pb : paires de bases.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PH: Potentiel d'Hydrogène.

PK: Protéinase K.

POP4: Performance Optimized Polymer 4

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism.

RFU: Relative Fluorescence Unit.

Rpm: rotation par minute.

Tr/min: tour par minute.

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate.

STR: Short Tandem Repeat.

VNTR: Variable Number Tandem Repeat.

## Liste des figures

<u>Figure1</u> : Structure de l'ADN.....	2
<u>Figure2</u> : La structure des trois locus STR les plus utilisés en génétique criminalistique.....	6
<u>Figure3</u> : Idiogramme des positions des 13 loci du système CODIS plus les deux locus D19S433 et D2S1338 sur les chromosomes .....	12
<u>Figure4</u> : Fluide Oral.....	14
<u>Figure5</u> : Glandes salivaires.....	14
<u>Figure6</u> : Une partie d'une chaîne d'amidon par des flèches indiquant les points d'action de L'enzyme alpha-amylase.....	18
<u>Figure7</u> : Diagramme de la chimie de taq man.....	24
<u>Figure 8</u> : Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour l'amplification d'une séquence d'ADN.....	29
<u>Figure 9</u> : Résultats du test préliminaire avec le phadebas.....	31
<u>Figure10</u> : Diagrammes de barre des quantités d'ADN obtenue par deux types.....	34
<u>Figure11</u> : profil d'un témoin négatif T.....	37
<u>Figure12</u> : de ladder d'identifier plus.....	38
<u>Figure13</u> : profil de ladder d'identifier.....	39
<u>Figure14</u> : Profile génétique des STR obtenus pour un échantillon de salive d'individu "I" GeneMapper® avec le kit identifier.....	40
<u>Figure15</u> : Profile génétique des STR obtenus pour un échantillon de salive d'individu " II" GeneMapper® avec avec le kit identifier.....	41
<u>Figure16</u> : Profile génétique des STR obtenus pour un échantillon de salive d'individu " III" GeneMapper® avec le kit identifier.....	42
<u>Figure17</u> : Profile génétique des STR obtenus pour un échantillon de salive d'individu. "IV" GeneMapper® avec le kit identifier.....	43

<u>Figure18</u> : nombre de loci obtenu par le kit d'amplification Identifier par les deux Méthodes d'extractions.....	45
<u>Figure19</u> : nombre de loci obtenu par le kit d'amplification Identifier plus par les deux méthodes d'extractions.....	45
<u>Figure20</u> : profil de l'individu II obtenu par l'extraction organique par le kit identifier.....	46
<u>Figure21</u> : profil de l'individu II obtenu par l'extraction organique par le kit identifier plus.....	47
<u>Figure22</u> : profil de l'individu II obtenu par l'extraction Qiagen.....	48
<u>Figure23</u> : Drop out.....	50

## Sommaire:

### INTRODUCTION

### **Chapitre I: BIBLIOGRAPHIE**

I. Généralité sur L'ADN.....	1
I.1:Historique.....	1
I.2:structure.....	1
II : Génome humain.....	2
II.1.Les Minisatellites.....	3
II.2.Les STR ou microsatellites.....	3
II.2.1. Localisation, structure, et nomenclature des STR.....	3
III. Empreinte génétique.....	6
II.1.Définition.....	6
IV. Le polymorphisme.....	8
V. Les banques de données d'empreintes génétiques.....	9
VI. La salive est une source d'ADN.....	13
VI.1.1Milieu buccale.....	13
VI.2.Fluide oral.....	13
VI.3.Composition de la salive.....	14
VI.4.Intérêt de la salive en médecine légale :apport en criminalistique.....	15

### **Chapitre II: MATERIELS ET METHODES**

II.1Materiel d'étude .....	17
II.2 Emballage et transport d'échantillon .....	17

II.3. : Test de phadebas.....	18
II.4 Extraction et purification de l'ADN.....	19
II.4.1. Extraction organique de l'ADN et purification par précipitation (phénol chlorophorme).....	20
II.5 Extraction et purification par kit Quiagen.....	22
II.6 Quantification de l'ADN (PCR en temps réel).....	23
II .7.Génotypage de l'ADN par les STR.....	26
II.7.1Amplification des marqueurs génétiques par réaction de polymérisation en chaîne(PCR).....	26
II.8 : Séparation des produits d'amplification des STR sur séquenceur automatique à 16capillaires.....	29
II.8.1 Lecture des résultats de l'amplification des STR.....	30

### **Chapitre III:RESULTATS ET DISCUSSION**

III 1:Test préliminaire de phadebas .....	31
III 2: Quantification de l'ADN extrait à partir de la salive (comparaison).....	32
III3: Génotypage de l'ADN par STR.....	35
III 4 : profils génétiques.....	37

### **CONCLUSION**

### **REFERENCES Bibliographiques**

### **ANNEXES**





## Résumé

L'empreinte génétique, est le résultat d'une analyse génétique, rendant possible l'identification d'une personne à partir d'une petite quantité de ses tissus biologiques. Dans l'identification humaine, la brosse à dents de la victime est un objet personnel précieux ou se dépose du matériel cellulaire qui contient de l'ADN à partir duquel un profil de référence peut être produit, un profil qui nous permet de faire une comparaison directe avec le profil d'un corps non identifié. Ce travail a été effectuée avec un prélèvement de cinq faisceaux de poils de la brosse à dents, de prime à bord nous avons testé les poils avec le phadebas qui atteste la présence ou l'absence de la salive. Dans certains cas le test se révèle négatif, ceci confirme que c'est le cumul des cellules épithéliales sur la brosse à dents qui nous permet d'obtenir de l'ADN et par conséquent un profil génétique. La période minimale d'utilisation de la brosse à dents pour garder suffisamment de cellules pour le génotypage a également été étudiée. Nous avons également testé deux méthodes d'extraction d'ADN couramment utilisés: extraction organique au phénol et une extraction par Kit QIAGEN, pour explorer l'efficacité de ces deux méthodes d'extractions. Lors de cette expérience, les quatre bénévoles qui font partie de la même famille brossent leurs dents pour; 1 j, 7 j, 14 j, la quantité d'ADN récupéré a été quantifiée par PCR quantitative en temps réel, et le profilage (génotypage) de chaque échantillon est effectué avec deux kits d'amplifications Identifier et Identifier plus. Les données ont montré l'efficacité des deux méthodes d'extraction dans le rendement de l'ADN en matière de pureté, le kit QIAGEN nous a donné des quantités plus remarquables que l'extraction organique mais cette reste dernière reste toujours robuste, toutes les brosses à dents génère des profils complets, même avec une quantité de 0.0125 ug/µl. on a prouvé aussi le lien de parenté entre les membres de la même famille.

**Mots clés :** Empreinte génétique, Profil génétique, Phadebas, Kit QIAGEN, Génotypage, Extraction Organique, Identifier, Identifier plus.

## Summary

The DNA imprint is the result of genetic analysis, making it possible to identify a person from a small amount of biological tissues. In human identification, the toothbrush of the victim is a valuable personal item that removal of cellular material contains DNA from which a reference profile can be produced, a profile that allows us to make a comparison direct with the profile of an unidentified body. This study with a sample of five bundles of bristles of a toothbrush, premium brand we tested hair with Phadebas, which indicates the presence or absence of saliva. In some cases the test is negative; this confirms that it is the accumulation of epithelial cells on the toothbrush that allows us to obtain DNA and thus a genetic profile. The minimum period of use of the toothbrush to keep enough cells for genotyping was also studied. We also tested two DNA extraction methods commonly used: organic phenol extraction and extraction with QIAGEN kit to explore the effectiveness of these two methods of extraction. In this experiment, four volunteers who are part of the same family to brush their teeth, 1 d, 7 d, 14 d, the amount of DNA recovered was quantified by quantitative real-time PCR, and profiling (genotyping ) of each sample was carried out with two kits amplifications Identifiler and Identifiler plus. The data showed the effectiveness of two methods of extracting the DNA yield for purity, QIAGEN has given us the most remarkable quantities of organic extraction but this is last remains robust, all toothbrushes generates complete profiles, even with an amount of 0.0125 ug / $\mu$ l . Was also demonstrated the relationship between members of the same family.

Keywords: DNA imprint, Genetic profile, Phadebas, QIAGEN, Genotyping, Organic extraction, Identifiler, Identifiler plus.

## ملخص

البصمة الوراثية هي نتيجة تحاليل جينية، و التي تسمح لنا بتحديد هوية شخص ما ابتداءا من كمية صغيرة من أنسجته البيولوجية . في تحديد الاشخاص ،تعتبر فرشاة أسنان الضحية اداة قيمة والتي تحتوي على مواد خلوية اين نجد الحمض النووي ال ADN و الذى من خلاله يمكن وضع مقارنة مباشرة مع الجثة المجهولة الهوية. هذه الدراسة أقيمت على عينة من خمسة حزم من شعيرات فرشاة الأسنان، وبداية استعملنا اختبار ال Phadebas ، والذي يدل على وجود أو عدم وجود اللعاب. في بعض الحالات نجد الاختبار سلبي، وهذا ما يؤكد أن تراكم الخلايا على فرشاة الأسنان هو الذي يسمح لنا بالحصول على الحمض النووي ال ADN وفيما بعد البصمة الوراثية. في نفس الوقت قمنا بدراسة المدة الاقصر في استخدام فرشاة الأسنان وهل تحتوى ما يكفي من خلايا بيولوجيا للتحليل. اخترنا أيضا طريقتين لاستخراج الحمض النووي شيوعا: الاولى هي الاستخراج " العضوي" بالفينول و الطريقة الثانية هي طقم "QIAGEN". لاستنباط فعالية كل طريقة في هذه التجربة ، لدينا أربعة متطوعين و الذين هم من نفس العائلة خضعوا لاختبار لتنظيف أسنانهم في، 1 يوم ، 7 يوم ، 14 يوم ،حسبت كمية الحمض النووي ال ADN عن طريقة ال " PCR " temps réel و التتميط (التتميط الجيني) لكل عينة أجريت مع مجموعتين: Identifiler plus و Identifiler . أظهرت البيانات فعالية الطريقتين للاستخراج الحمض النووي في حالة "نقاء" ،اضافة ان ال "QIAGEN" أعطانا كميات اكثر من الاستخراج " العضوي" الا ان هذه الاخيرة تبقى طريقة قوية و يعتمد عليها، اضافة ان كل فرشاة أسنان اعطتنا صورة الجينية كاملة حتى مع اصغر كمية 0.0125 ميكروغرام / ميكروليتر ولقد اثبتنا ايضا صلة القرابة بين أفراد العائلة.

كلمات البحث : بصمة الحمض النووي ، الصورة الجينية ، التتميط الجيني ، استخراج العضوية ، QIAGEN ,Identifiler, Identifiler plus ,Phadebas,

Chaque individu se distingue de ses « semblables » par un ensemble de caractéristiques morphologique et biologiques qui rendent son identification possible. La recherche de tels éléments spécifiques et propres à un individu a, de tous temps, stimulé l'évolution scientifique de la criminalistique.

Lors d'un crime ou un délit, les traces de matériel biologique trouvées sur les lieux font depuis fort longtemps l'objet d'analyse dont les résultats constituent un moyen de preuve pour la justice. Il s'agit le plus fréquemment de sang, sperme, salive ou fragment de tissu humain.

Le domaine des traces biologiques indiciaires a donné lieu à des recherches intensives au cours de ces dernières décennies afin de trouver, dans les traces citées déjà ou d'autres échantillons biologiques, des caractéristiques individuelles spécifiques qui renferment un potentiel de différenciation assez grand, tout en étant suffisamment stables par rapport aux influences environnementales auxquelles ces traces, de par leur nature, peuvent être exposées.

Si ces indices biologiques sont exploitables de puis un peu plus d'un siècle grâce à des méthodes essentiellement microscopiques, biochimiques ou immunologiques, c'est beaucoup plus récemment qu'ils ont été mis à profit pour établir des empreintes génétiques.

L'utilisation des empreintes génétiques apporte en effet une précision encore inégalée dans l'identification des auteurs de crimes et dans la mise hors de cause des innocents.

L'un des principaux atouts de l'identification par empreintes génétiques tient à sa possibilité d'effectuer un examen à partir de n'importe quel produit biologique (s'il contient suffisamment de cellules) et sur des échantillons de très petites tailles.

L'objectif de ce modeste travail, est d'optimiser la quantité et la qualité d'ADN obtenus à partir de la brosse à dent sachant que cette dernière est un outil à conviction en criminologie, et ceci du fait que la brosse à dent est une bonne source d'ADN cumulé, Cette étude est effectuée avec un prélèvement de cinq bandes de poils de la brosse à dents, (nombre minimale), on commence tout d'abord par le test de Phadebas, qui nous indique la présence ou l'absence de la salive (test spécifique à l'alpha amylase), nous avons choisi quatre volontaires de la même famille, qui se sont brossés les dents dans des intervalles de temps différents ou le prélèvement de l'ADN a été fait en: 1 j, 7 j, 14 j, pour voir l'influence de facteur temps sur le cumul de l'ADN, sachant que la brosse à dents est soumise à les principaux ennemis de l'ADN qui sont; la chaleur et l'humidité. On a effectué l'extraction du matériel génétique par deux méthodes; Extraction Organique au "Phénol Chloroforme" et

L'extraction par kit "Qiagen" pour comparer le rendement quantitatif de chaque type d'extraction. L'ADN de chaque échantillon est quantifié par la PCR en temps réel après, il est génotypé par deux kits d'amplifications Identifiler et Identifiler plus, pour voir aussi l'affinité de chaque kit d'amplification à notre ADN.

Dans cette étude, nous avons procédé à la comparaison quantitative et qualitative de l'ADN obtenu, sachant que l'ADN pourrait être inhibée par le dentifrice ou bien dégradé par l'état humidifié quotidien de la brosse à dents et dans ce cas n'aboutit à aucune amplification ou dans le meilleur des cas on obtient des profils partiels ou des phénomènes de perte d'allèle (allèle drop out) et l'apparition des pics artefacts (effet stochastique de la PCR).

**I. GÉNÉRALITÉS SUR L'ADN****I.1.Historique**

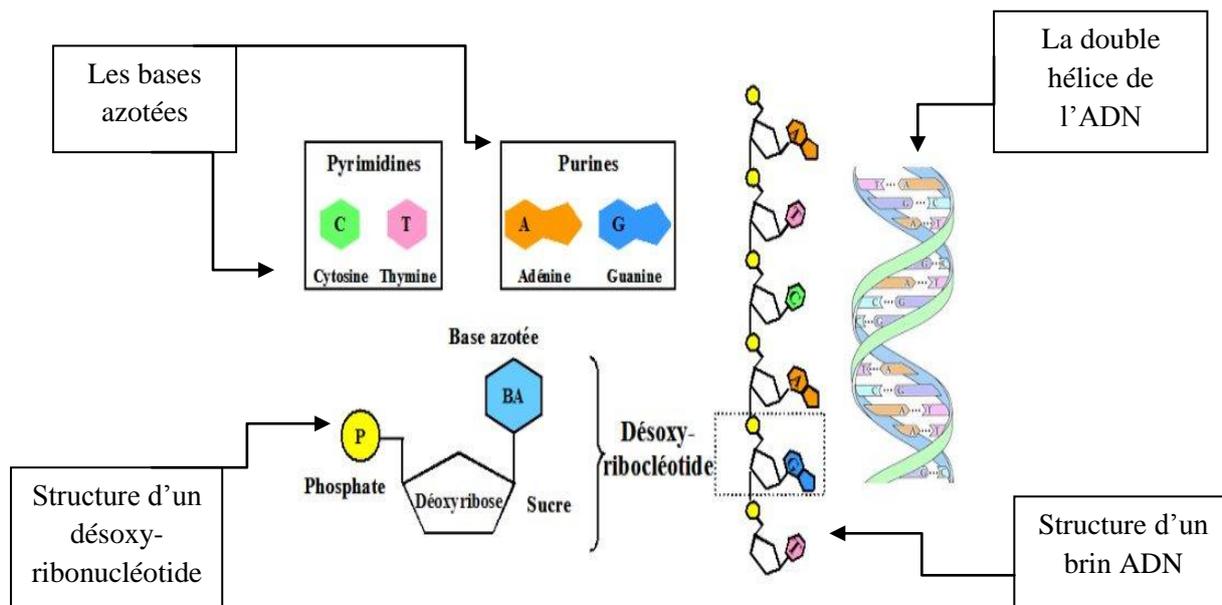
Jusqu'au milieu des années 80, la criminalistique avait essentiellement recours à l'analyse de substances faisant partie des groupes sanguins et des polymorphismes enzymatiques et protéiques. Les performances étaient médiocres du fait, notamment, de la nature des échantillons biologiques à analyser et ne permettaient pas d'identifier une personne avec certitude.

Une étape décisive a été franchie en 1985 grâce à l'introduction d'une technique d'analyse de l'ADN, développée par Alec JEFFREYS et ses collaborateurs : elle permet d'établir, à partir du patrimoine génétique, une combinaison alphanumérique individuelle spécifique. Comme la substance ADN, porteuse de ce patrimoine, est présente dans chaque noyau cellulaire d'un individu, il est possible d'établir un profil génétique à partir de toute sécrétion ou tissu du corps humain.

Perfectionné au fil des années, ce moyen d'investigation et de preuve est devenu incontournable, non seulement pour les recherches civiles en paternité mais aussi, et surtout, pour les enquêtes criminelles. (Cabal, 2001)

**I.2.Structure de l'ADN**

La molécule de l'ADN est organisée sous forme d'hélice double brin, formée de la succession de nucléosides phosphates. Chaque nucléoside phosphate est constitué d'un sucre, d'une base qui peut être une base purique ou pyrimidique, et d'un groupement phosphate illustré en (figure 1).



**Figure 1 : Structure de l'ADN**

(Schéma d'après [www.exobio.cnrs.fr](http://www.exobio.cnrs.fr))

**II. Le Génome humain:**

Longtemps, les généticiens ont estimé le nombre de gènes humains aux alentours de 100.000. Bien que basée sur certains résultats, cette estimation n'était en réalité qu'une supposition. Imaginer la surprise des chercheurs quand il s'est avéré que ce nombre n'était qu'environ 25.000. Cela représente que deux fois le nombre de gènes de la drosophile et moins de gènes que le riz. Il est clair que la complexité d'un organisme ne dépend pas seulement du nombre de gènes dans son génome.

Quand on analyse les séquences génomiques, on découvre des régions qui codent des protéines et d'autres qui n'en codent pas. Les chercheurs le savaient depuis longtemps, mais ils ne connaissaient pas l'ampleur et la nature de l'ADN non codant.

Une des caractéristiques les plus frappantes est la quantité d'ADN non codant. Le projet de Génome Humain en a donné une image particulièrement étonnante. Chacune de nos cellules contient environ deux mètres d'ADN qui est entassé, mais, sur ces deux mètres, deux centimètres seulement sont consacrés aux gènes! Près de 99% de l'ADN de nos cellules ne codent pas des protéines.

Les véritables gènes forment des paquets disséminés dans le génome humain dans une masse beaucoup plus grande d'ADN non codant, comme des oasis isolées dans un désert. (Georges et al, 2011).

On dit que l'ADN non codant transcriptionnellement est inactif. Un composant majeur des séquences non codantes du génome humain sont des éléments de séquences répétitifs, de type, de composition et de longueurs variés, parmi eux :

### **II.1. Les Minisatellites**

Le motif de base de ces marqueurs également appelé **VNTR** (Variable Number Tandem Repeat), est supérieur à 6 nucléotides et peut atteindre 100 pb. Il est réitéré entre deux et quelques centaines de fois à chaque locus générant ainsi des fragments de 500 à 20 kpb. Les VNTR sont détectés par hybridation avec des sondes (Butler, 2003).

### **II.2. Les STR ou microsatellites**

Les courtes répétitions en tandem (STR) ont été utilisées pour la première fois en médecine légale au début des années 1990. A la fin de la décennie, elles sont devenues l'outil standard de tous les laboratoires de criminalistique dans le monde. La facilité, la rapidité et la fiabilité des réactions PCR pour les microsatellites STR, ainsi que la faisabilité sur absolument toutes sortes de taches ou de traces biologiques (indifféremment de la qualité ou de la quantité d'ADN) ont imposé ces systèmes pour établir les fichiers des empreintes génétiques, pour les affaires criminelles et les tests de paternité.

#### **II.2.1. Localisation, structure, et nomenclature des STR**

Les STR ou microsatellites sont des polymorphismes de répétition. Ils sont constitués de motifs nucléotidiques de 2 à 6 pb répétés de 2 à 100 fois les uns à la suite des autres, générant des allèles variant en taille entre 50 et 500 pb. Ils sont localisés dans les régions non codantes de l'ADN nucléaire au niveau des chromosomes et présentent une distribution plutôt uniforme sur le génome avec la présence d'un locus toutes les 6 à 10 kpb (Weber et al, 1993 ; Tautz, 1989). Le nombre de répétitions des STR autosomaux est très variable d'un individu à l'autre en raison du brassage génétique qu'ils subissent, cette variabilité semble principalement liée à des dérapages de réplication (Petkovski, 2006). Leur pouvoir de discrimination élevé fait de ces polymorphismes des marqueurs de choix pour l'identification individuelle des individus.

Actuellement, plus de  $10^4$  STR ont été découverts, mais seulement 20 environ sont couramment analysés dans le domaine médico-légal (Ruitberg et al, 2001).

La nomenclature utilisée pour la dénomination des allèles STR a été codifiée, en octobre 1993, par les organisations professionnelles pertinentes, en l'occurrence l'International Society of Forensic Haemogenetics (ISFG). Les loci STR sont généralement nommés de deux façons. Si le locus fait partie d'un gène codant pour les protéines, le nom des loci STR sont désignés par l'abréviation de ce gène. Par exemple, le vWA et le FGA sont nommés d'après le facteur de von Willebrand et le gène humain du  $\alpha$ -fibrinogène respectivement. Si les loci STR n'ont pas de lien avec des gènes de fonction connue, leurs nomenclatures sont basées sur la position du locus sur chromosome et l'ordre dans lequel ils ont été découverts. Le nom de ces loci commence toujours par 'D' pour séquence d'ADN, suivie du nom de chromosomes et de la lettre 'S' pour le numéro de séquence. Ainsi, D18S51 est un marqueur d'ADN situé sur chromosome 18 et a été la 51<sup>ème</sup> séquence identifié sur ce chromosome (Andrei, 2007).

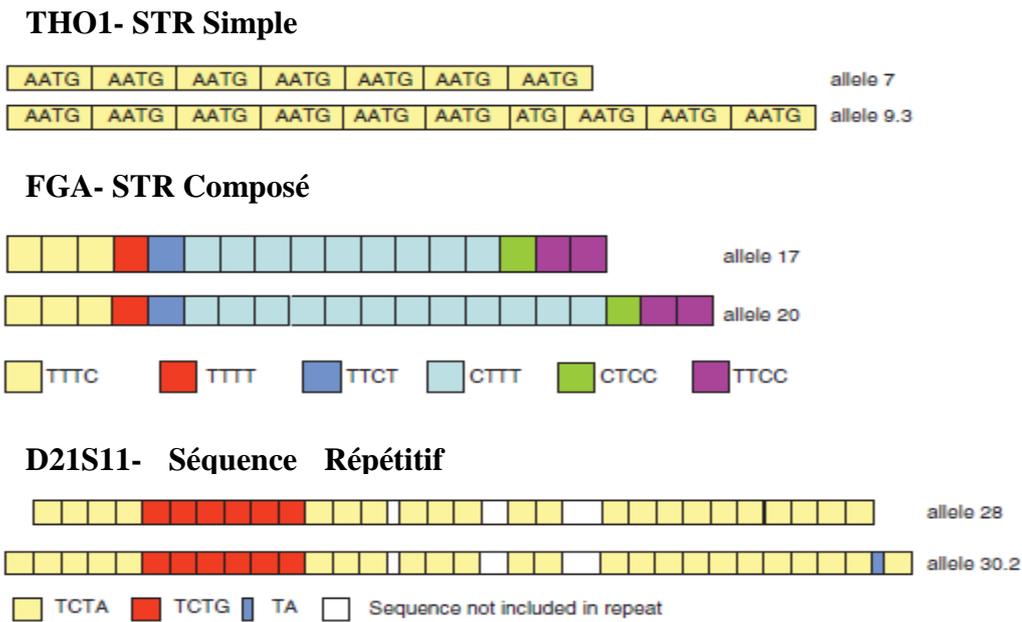
Dans cette nomenclature, Les STR sont désignés par le nombre de répétitions qu'ils contiennent. Quand un allèle n'est pas conforme au motif répété du système, il devrait être désigné par le nombre d'unités de répétition complète et le nombre de paires de base de la répétition partielle. Ces deux valeurs doivent être séparées par un point décimal. Par exemple, le STR TH01 est composé de l'élément répétitif (AATG). L'allèle 10 a donc la séquence (AATG)<sub>10</sub>. Il existe toutefois un allèle assez fréquent qui présente une paire de base de moins que l'allèle 10, en raison de la perte d'une adénine sur la septième unité de répétition. Ce locus STR correspond à l'allèle 9+3 paire de base, d'où la dénomination allèle 9.3. L'ISFG recommande aussi d'utiliser des échelles alléliques contenant les allèles les plus fréquents.

Les STR peuvent contenir des répétitions en tandem de courts motifs dinucléotidiques, trinuécléotidiques, tétranucléotidiques, pentanucléotidiques ou encore hexanucléotidiques. La structure des STR varient non seulement en fonction de la longueur et du nombre d'unité de répétition mais également de l'irrégularité des séquences et la disposition des unités répétitifs.

La structure des STR peut être simple ou complexe. Les STR complexes montrent une grande variabilité et sont de ce fait plus informatifs, alors que les STR simples permettent une standardisation facile et montrent un taux de mutation plus faible. Les taux de mutation des STR sont très variables et dépendent principalement de la structure et la longueur du marqueur. Les microsatellites STR sont divisés en plusieurs catégories basées sur le modèle

de répétition et peuvent être classées soit comme (Bär, et al 1997 ; Gill, P. et al. 1997) (Figure2).

- ◆ des contenants des unités de répétition de longueur et de séquence identique. Par exemple le STR THO1 est composé de l'élément répétitif AATG. l'allèle 7 du locus THO1 a donc la séquence (AATG)<sub>7</sub>.
- ◆ des STR simples avec des répétitions non consensus. Par exemple l'allèle 9.3 du locus STR THO1 qui présente la composition (AATG)<sub>6</sub>(ATG)<sub>1</sub>(AATG)<sub>3</sub>. Ce locus contient donc une variante raccourcie (ATG) de l'élément répétitif.
- ◆ des STR composés contenant des répétitions de deux ou plusieurs unités simples adjacentes. Par exemple l'allèle 17 du STR FGA:(TTTC)<sub>3</sub>(TTTT)<sub>1</sub>(TTCT)<sub>1</sub>(CTTT)<sub>9</sub>(CTCC)<sub>1</sub>(TTCC)<sub>2</sub>.
- ◆ des STR composés avec des répétitions non consensus. Par exemple l'allèle 26.2 du STR FGA : (TTTC)<sub>3</sub>(TTTT)<sub>1</sub>(TT)(CTTT)<sub>19</sub>(CTCC)<sub>1</sub>(TTCC)<sub>2</sub>.
- ◆ des STR complexes contenant plusieurs blocs répétitifs renfermant différentes unités de longueur variable séparées par des séquences intercalaires. Par exemple l'allèle 28 du locus STR D21S11 :(TCTA)<sub>4</sub>(TCTG)<sub>6</sub>(TCTA)<sub>3</sub>TA(TCTA)<sub>3</sub>TA(TCTA)<sub>3</sub>TCA(TCTA)<sub>2</sub>TCCA(TCTA)<sub>10</sub>.
- ◆ des STR complexes hypervariable contenant des répétitions non consensus de longueur et de séquence variable ainsi que de nombreuses séquences intercalaire entre les différents blocs répétitifs. Le locus SE33 appelé également ACTBP2 est un STR complexes hypervariable, il présente une séquence répétitive tellement complexe et irrégulière qu'il est difficile de l'accommoder à une nomenclature. Ce marqueur est peu utilisé en génétique criminalistique.



**Figure 2:** La structure des trois locus STR les plus utilisés en génétique criminalistique (Goodwin et al, 2011)

**III. Empreinte génétique**

**II.1. Définition**

Deux humains ont généralement une large majorité de leur séquence d'ADN commune. Certaines de ces séquences permettent la fabrication des protéines appelées gènes. Il serait beaucoup trop long et coûteux de procéder, pour l'établissement d'une comparaison, à l'examen de la totalité de la chaîne d'ADN contenue dans une cellule. Mais il existe sur l'ADN des portions qui ne codent pour aucune protéine. Certaines d'entre elles sont

Spécifiques à chaque individu et constituent son empreinte génétique. La détermination d'une empreinte génétique se fait prioritairement sur l'ADN nucléaire. Les empreintes génétiques sont utilisées en médecine légale pour identifier ou innocenter des suspects, Il est possible d'établir un profil génétique à partir de toute sécrétion ou de tout tissu du corps humain. Les traces biologiques les plus fréquemment rencontrées et analysées en sciences forensiques sont le sang et le sperme. D'autres échantillons biologiques peuvent aussi constituer une source possible d'ADN, tels que la salive, les os et tissus musculaires (Butler, 2003).

Le typage de l'ADN par analyse des traces biologiques( que l'on appelle plus communément "DNA profiling" est ainsi une technique standardisée qui est aujourd'hui, devenue très courante lors des investigations criminelles étant donné que des résultats rapides et fiables peuvent être obtenus à partir de n'importe quelle source de matériel biologique à la seule condition qu'elle renferme des cellules nucléées contenant de l'ADN génomique (Shneider.1997).

En effet, par contraste avec les analyses conventionnelles de groupage sanguin, qui dépendent de la disponibilité de sang ou de sérum sanguin, les résultats de typage de l'ADN ne dépendent pas de la nature du matériel biologique ou de type cellulaire analysé puisque l'information génétique en totalité est obtenue dans chacune des cellules somatiques d'un individu donné. Ainsi le même type d'ADN (génotypes) d'un individu donné peut être établi à partir de n'importe quel tissu, que ce soit du sang, du sperme, des cheveux, de la peau, des os.... Alors même que l'analyse des marqueurs protéiques (groupes sanguin) n'est restreinte qu'aux cellules où ces protéines sont exprimées et sécrétées dans le liquide humain (le sang en l'occurrence) de plus l'ADN présente l'avantage d'être physiquement beaucoup plus résistant à la dégradation (Hochmeister.1996)

La majorité des systèmes de typage utilisés dans un contexte médico-légale sont basées sur la notion de loci génétiques composés de séquences d'ADN répétées en tandem.

Compte tenu de la longueur et de la distribution des séquences répétées cœurs, les systèmes peuvent être globalement classifiés en minisatellites (systèmes de loci unique ou multiples) et microsatellites (Systèmes des STR).

La variation entre les individus, que ce soit pour les minisatellites ou les microsatellites, n'est pas seulement basée sur des différences dans la séquence d'ADN elle-même (c'est à dire dans des différences de la répétition cœur), mais surtout sur le nombre d'élément répété cœur organisée en tandem (Brown, 2004)

Les critères de sélection des systèmes de typage appropriés diffèrent selon le but escompté et varient ainsi selon que l'on veut les utiliser dans le cadre de test de paternité (identification d'un ascendant ou d'un descendant) ou alors dans le cadre de l'identification de traces (implication ou exclusion d'un suspect) (Schneider, 1997).

Le typage génétique des systèmes de locus unique dépend généralement de la disponibilité de quantité importante (microgramme) d'ADN de haut poids moléculaire (ADN génomique) et est réalisé par une digestion à l'aide d'enzyme de restriction, suivie d'une séparation électrophorétique des fragments générés sur un gel d'agarose, le transfert de ces fragments séparés sur une membrane (Southern Blot), l'hybridation avec une sonde d'ADN marquée spécifique du minisatellite, et enfin une détection auto-radiographique ou enzymatique des fragments d'ADN polymorphes, ces systèmes sont donc hypervariables avec plus de 100 allèles par locus (Martin et al, 2001).

#### **IV. Le polymorphisme**

la portion non codante du génome n'est globalement pas sous le contrôle de la pression sélective, et ainsi, la plupart des "mutations" dans ces régions non codantes sont habituellement conservées et transmises à la descendance, générant alors une extraordinaire variabilité génétique en dehors des régions codantes du génome humain, par simple voie de conséquence, ces régions se révèlent être extrêmement informative dans le cadre d'une approche d'individualisation génétique (identification individuelle), sans pourtant toutefois avoir aucune utilité ou répercussion quant à la "personnalité" propre d'un individu donné (Schneider, 1997).

Ces variations constituent ce qu'on appelle des polymorphismes (Coquos, 2003)

Le polymorphisme de l'ADN est utilisé comme marqueur génétique d'identification d'individus dans de nombreux domaines. Au sein d'une population (Denis, 2004).

Au début de l'identification humaine, quatre STRs furent analysés THO1, FES/FPS, VWA, F13A1, puis il y eut la seconde génération de multiplexe : SGM utilisant 6 STRs, en plus d'un marqueur d'identification sexuel. Ces STRs sont : THO1, VWA, FGA, D8S1179, D18S51, et D21S11, ainsi que le marqueur de l'Amelogénine. Puis il y eut passage à l'analyse de 13 STRs qui sont : CSF1PO, TPOX, THO1, VWA, FGA, D8S1179, D18S51, et D21S11, D3S1358, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, auxquels est rajouté le marqueur sexuel, Amelogénine (Butler, 2003).

**V. Les banques de données d'empreintes génétiques**

Le terme de "banque de données" ou "base de données" est le terme technique usuellement choisi pour décrire une collection organisée d'informations destinées à être facilement retrouvées. Dans le langage courant, c'est plutôt le terme de "fichier" qui est privilégié pour une telle collection. Pour alléger le propos, c'est ce dernier terme qui va être utilisé (Coquoz, 2003).

Les systèmes de typage d'ADN, outre leur application primordiale d'individualisation génétique, ont vu émerger une application peut-être encore plus importante dont L'EDNAP soulignait dès sa constitution l'intérêt et l'importance, celle d'une interconnexion entre polices et d'un échange d'information fructueux entre laboratoires d'un même pays ou entre pays. A partir de là, et pour parer à une criminalité toujours plus forte, jaillit l'idée de constituer, en plus ou alors simplement en lieu et place des fichiers usuels d'empreintes digitales notamment la constitution de banques spécifiques dites d'empreintes génétiques qui consisteraient à typer des criminels ou des délinquants récidivistes, disposant alors pour ces individus d'un signalement "génétique" invariable (Martin et al., 2001).

La première banque de données des empreintes génétiques par l'utilisation des STR's à ainsi vu le jour en Grande-Bretagne en 1995, initiative à laquelle se joignirent bientôt en 1998 d'autres pays Européens, (Autriche, Allemagne et Pays-Bas) en constituent également leurs propres banques. En 1999, se rallièrent à cet énorme effort la Finlande et la Norvège, puis en 2000, ainsi que certains autres pays (Martin et al., 2001).

Il n'en demeure pourtant pas moins que les modalités d'obtention de ces données génétiques diffèrent sensiblement d'un pays à l'autre, et ce en raison des systèmes juridiques et législatifs en vigueur (Martin et al. 2001).

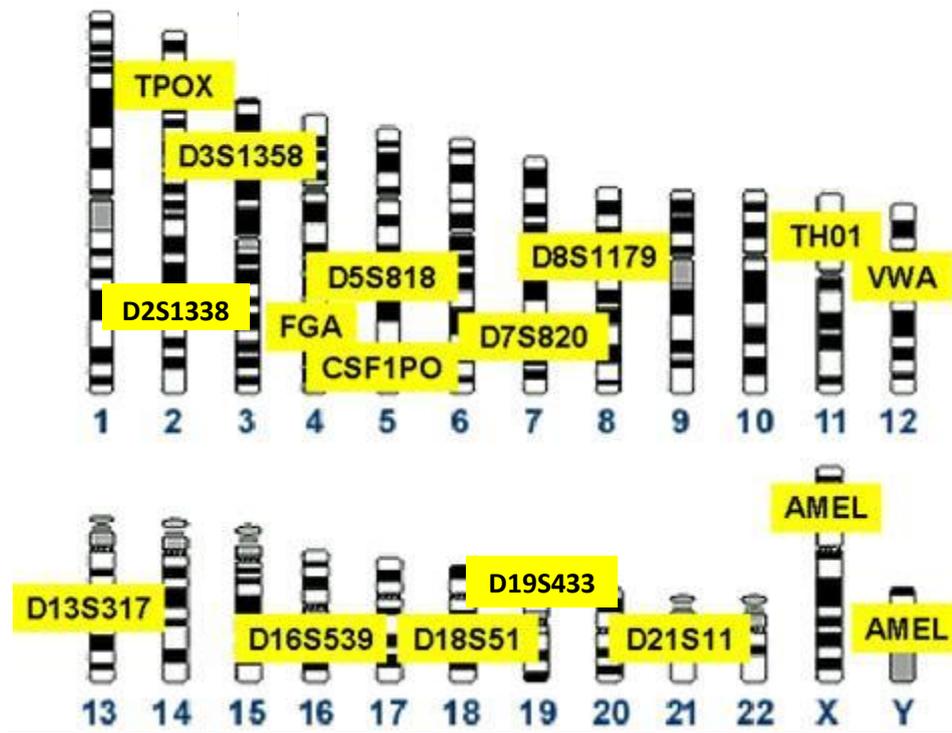
En Europe, par exemple, en plus du test du sexe amélogénine, est utilisé un groupe commun de 7 loci STR's: D3S1358, FGA, D8S1179, THO, VWA, D18S51, et D21S11, à l'exception de l'Allemagne qui préfère utiliser le système de STR's : THO1, FGA et D21S11, mais complété du locus très polymorphe SE33 (Martin et al., 2001).

Les Etats-Unis ont, quant à eux, adopté leur propre groupe de STR's, qui inclut, en plus de tous les marqueurs utilisés dans les banques de données en Europe, d'autres loci, constituant

ainsi le système CODIS (pour "COmbined DNA Index System") utilisé par le Bureau Fédérale d'Investigation( I") et composé des 13 STR's autosomiques:TPOX, D3S1358, FGA, CSF1PO, D5S818, D7S820,D8S1179, THO1, VWA, D13S317, D16S359, D18S51 et D21S11,ainsi que le système de gènes homologues AmélogénineX-Y(**TableauI**) (Ricci et al.,2003).

**Tableau I : Caractéristiques des loci du système CODIS (" COmbined DNA Index System")  
(Ricci et al., 2003)**

Locus	Localisation chromosomique	Séquences des amorces (5' >3')	Taille des allèles (pb)	Séquence répétées
<b>TPOX</b>	2p23-2pter	A - ACTGGCACAGAACAGGCACTTAGG B - GGAGGAACTGGGAACACACAGGT	232-248	(AATG) <sub>n</sub>
<b>D3S1358</b>	3p	A - ACTGCAGTCCAATCTGGGT B - ATGAAATCAACAGAGGCTTG	123-135	TCTA (TCTG) <sub>1-3</sub> (TCTA) <sub>n</sub>
<b>FGA</b>	4q28	A - GCCCCATAGGTTTTGAACTCA B - TGATTTGTCTGTAATTGCCAGC	176-224	(TTTC) <sub>3</sub> TTTT TTCT (CTTT) <sub>n</sub> CTCC (TTCC) <sub>2</sub>
<b>CSF1 PO</b>	5q33.3-34	A - AACCTGAGTCTGCCAAGGACTAGC B - TTCCACACACCACTGGCCATCTTC	299-323	(AGAT) <sub>n</sub>
<b>D5S818</b>	5q23.3-32	A - GGGTGATTTTCTCTTTGGT B - TGATTCCAATCATAGCCACA	149-161	(AGAT) <sub>n</sub>
<b>D7S820</b>	7q	A - TGTTCATAGTTTAGAACGAACACTAACG B - CTGAGGTATCAAAAACCTCAGAGG	198-222	(GATA) <sub>n</sub>
<b>D8S1179</b>	8q24.21	A - TTTTTGTATTTTCATGTGTACATTCG B - CGTATCCCATTGGCGTGAATATG	127-163	(TCTR) <sub>n</sub> with R = AorG
<b>TH01</b>	11p15-15.5	A - GTGGGCTGAAAAGCTCCCCGATTAT B - GTGATTCCCATTGGCCTGTTCTC	154-178	(AATG) <sub>n</sub>
<b>vWA</b>	12p1 2-pter	A - CCCTAGTGGATGATAAGAATAATCAGTATG B - GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG	134-162	TCTA (TCTG) <sub>3-4</sub> (TCTA) <sub>n</sub>
<b>D1 3S31 7</b>	1 3q22-31	A - GTTGCTGGACATGGTATCACAG B - TCAGAGAGCTTGAATTGTTGGT	245-261	(GATA) <sub>n</sub>
<b>D1 6S359</b>	1 6q22-24	A - ACTCTCAGTCCTGCCGAGGT B - TGTGTGTGCATCTGTAAGCATG	350-370	(AGAT) <sub>n</sub>
<b>D18S51</b>	18q21.3	A - CAAACCCGACTACCAGCAAC B - GAGCCATGTTTCATGCCACTG	274-318	(AGAA) <sub>n</sub>
<b>D21 S1 1</b>	21 q1 1 .2-q21	A - ATATGTGAGTCAATTCCCCAAG B - TGTATTAGTCAATGTTCTCCAG	214-240	(TCTA) <sub>n</sub> (TCTG) <sub>n</sub> [(TCTA) <sub>3</sub> TA(TCTA) <sub>3</sub> TCA (TCTA) <sub>2</sub> TCCA TA ] (TCTA) <sub>n</sub>
<b>H UMAMGXA HUMAMGY</b>	Xp22.1 -p22.3 Xp22.1 -p22.3	A - CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG B - ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG	106-112	-



**Figure3:** Idiogramme des positions des 13 loci du système CODIS plus les deux loci D19S433 et D2S1338 sur les chromosomes.

Les résultats des analyses par les STR sont analysés et interprétés en utilisant les statistiques, les probabilités et la génétique des populations. La fréquence, dans une population, de chaque allèle STR d'un jeu standard de marqueurs a été évaluée dans de nombreux groupes de la population aux Etats-Unis et dans le monde. En, utilisant cette information, la probabilité d'avoir une recombinaison de ces treize allèles peut être calculée. Par exemple, si un allèle au locus 1 est porté par une personne sur 333 et qu'un allèle au locus 2 est porté par 1 personne sur 83, la probabilité qu'une personne porte les deux allèles est égale au produit des probabilités individuelles multiplié par 2 c'est à dire environ:  $1/14\ 000$  ( $1/333 * 1/83 * 2$ ). Cette probabilité peut ne pas être convaincante, mais si un allèle d'un 3<sup>em</sup> locus (porté par une personne sur 100) et un allèle d'un 4<sup>em</sup> (porté par une personne sur 25) sont inclus dans le calcul, la fréquence combinée atteint presque 1 sur 70 millions, Ainsi, seulement 4 personnes aux Etats-Unis porteront cette combinaison d'allèles. Quand le génotype des allèles des treize loci STR du panel CODIS (26 allèles en tout) est réalisé pour produire le profil STR complet, la probabilité de retrouver la même combinaison est de 1 sur 100 milliards. Or, la population de la planète

étant d'environ 6 milliards d'habitants, il est facile de voir que l'analyse STR est un test très puissant d'identification des personnes (Klug, 2006).

## **VI. La salive est une source d'ADN**

### **VI.1.1 Milieu buccale**

La cavité orale est à la fois ouverte sur le milieu extérieur et sur le milieu intérieur. Elle doit donc se comporter comme une véritable interface, traitant tout ce qui y transite pour le rendre acceptable par l'organisme. Qui plus est, la bouche est le siège de plusieurs fonctions spécifiques comme l'élocution et l'expression du visage par exemple. Pour répondre à ces exigences, l'ensemble des partenaires de cet environnement particulier interagit, donnant un ensemble extrêmement évolutif. Les sécrétions salivaires, spécifiques selon leur origine, sont un contributeur majeur de l'écosystème buccal. Si leur étude particulière est essentielle pour connaître la physiologie et la physiopathologie salivaire, il est nécessaire de comprendre comment les produits de ces sécrétions se comportent dans le fluide oral qui habite la cavité buccale. Ce fluide oral est lui-même l'un des éléments d'un ensemble plus complexe appelé milieu buccal qui intègre tous les éléments anatomiques de la bouche, mais aussi tout ce qui rentre et qui sort de cet espace (micro-organismes, aliments, air, polluants atmosphériques, etc.). Comment le fluide oral interagit-il avec les dents, avec les muqueuses ?

Le concept de milieu buccal s'inspire de celui de milieu intérieur. Il faut le voir comme un espace, voire comme un sas, siège d'interactions entre ses constituants.

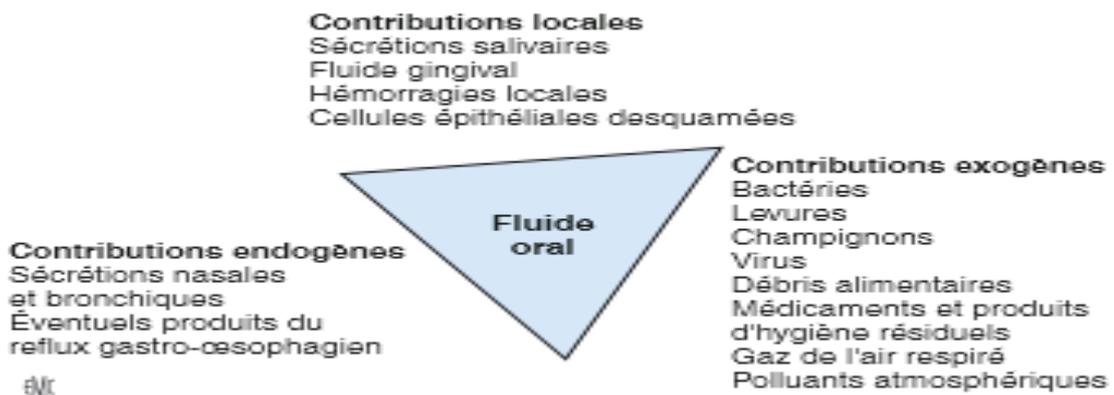
Appartiennent au milieu buccal les éléments anatomiques qui l'occupent et le bordent (dents, langue, lèvres, joues, palais, plancher, gencives, muqueuses), les sécrétions

Salivaires, les produits apportés par le fluide gingival, la flore microbienne résidente ou en transit, les aliments de passage et retenus, l'air inspiré et expiré. Des interactions entre tous ces partenaires dépendent l'état physiologique ou pathologique des dents, du parodonte et des muqueuses. (Pellat B, 2010)

### **VI.2 Fluide oral**

Le fluide oral mérite une étude particulière. En effet, c'est lui qui est en interaction avec tous les partenaires du milieu buccal (**Figure 4**). Contrairement aux sécrétions salivaires qui sont normalement aseptiques, le fluide oral recèle entre  $4,3 \times 10^6$  et  $5,5 \times 10^9$  micro-organismes par ml. On y identifie aussi un certain nombre de constituants d'origine sérique et tissulaire

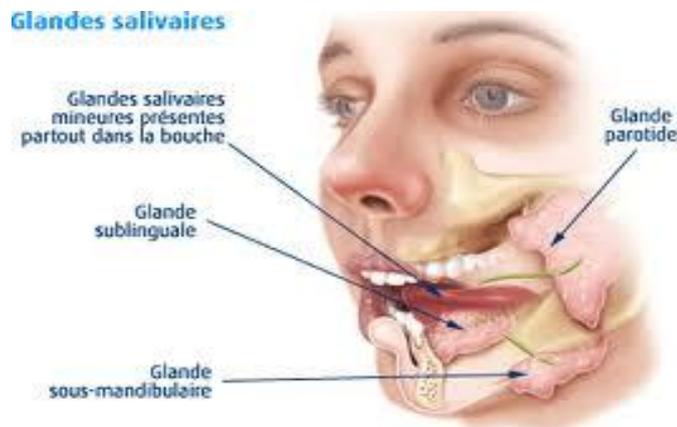
absents des sécrétions salivaires, comme par exemple des immunoglobulines G, de la sérumbumine, de la macroglobuline ou des peptides de collagènes, apportées par le fluide gingival. Même les protéines salivaires soutiennent ce concept ; par exemple, la concentration en histatines du fluide oral est six fois inférieure à celle de la salive parotidienne. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce point particulier. Le fluide oral abrite aussi des restes de cellules provenant de la desquamation de l'épithélium oral, des débris alimentaires, des substances issues des sécrétions bronchiques ou nasales, voire œsophagiennes en cas de reflux gastro-œsophagien, de produits sanguins en cas d'hémorragie.



**Figure4: Fluide Oral**

**VI.3.Composition de la salive**

La salive est un liquide sécrété par les glandes salivaires, destiné à humidifier les muqueuses de la bouche et à commencer la digestion des aliments



**Figure5: Glandes salivaires**

La sécrétion quotidienne varie suivant les individus entre 500 et 1.200 millilitres et s'effectue par acte réflexe (par contact avec des aliments, suite à une odeur ou à un souvenir...). Son composant principal est l'eau (à 99 %), mais la salive comporte aussi des ions (sodium, potassium, chlorure...) et des éléments organiques. Ainsi, elle contient de l'urée, du glucose, des hormones, de l'ARN et de nombreuses protéines, notamment des enzymes digestives (amylase, lipase). (Pellat B, 2010)

### VI.4.Intérêt de la salive en médecine légale :apport en criminalistique

La salive est un liquide contenant diverses protéines responsables de la digestion des aliments et notamment une enzyme, l'**amylase**, capable de digérer l'amidon. Ce liquide contient en outre quelques cellules décrochées des parois des glandes salivaires ou des parois buccales, à raison de quelques centaines de cellules par  $\mu\text{l}$ . (Cécile et al, 2008).

Les traces salivaires font partie des fluides corporels couramment rencontrés sur des scènes de crime. Elles peuvent constituer des éléments de preuve importants pour les enquêteurs judiciaires par l'intermédiaire de l'analyse ADN et ainsi identifier une victime ou un suspect ou disculper un innocent. La salive peut être retrouvée sur la peau de la victime, notamment dans le cadre de morsures, mais également sur divers éléments tels que des mégots de cigarettes, des enveloppes, des verres ou des denrées alimentaires.

La plupart des auteurs considèrent l'amylase comme un marqueur suffisamment spécifique pour tester la présence de salive, le seul autre fluide corporel humain qui contient de grandes quantités de cette enzyme étant le sur pancréatique. Un test simple et sensible pour la détermination de la présence de l'alpha-amylase est disponible en kit et permet d'identifier  $1 \times 10^{-6}$  de salive diluée, pouvant également la mettre en évidence sur des échantillons vieux de plusieurs années. (De Leo et al ,1985).

Les traces de salive séchée étant invisibles, cela rajoute encore plus à la difficulté de la reconnaître et de la collecter .L'ADN présent dans la salive sur la peau est particulièrement plus difficile à extraire que lorsque ce liquide est présent sur des effets vestimentaires, ou d'autre objets inanimés étant donné que le substrat sur lequel se dépose la salive, ne peut pas être soumis directement aux procédures d'extraction (Sweet et al ,1996)

Tout objet mis en contact avec les lèvres d'un buveur porte vraisemblablement des traces de salive du buveur et les chances de succès d'une analyse d'ADN sont élevées. De même, toute denrée alimentaire dans laquelle on croque à pleines dents, devrait porter des traces de salive du consommateur. Dans ce contexte, il vaut la peine de mentionner encore les brosse à dents. (Coquoz, 2003)

La brosse à dent est un échantillon qui comporte une certaine complication pour l'analyse et il n'est donc pas possible de garantir un taux élevé d'obtention d'ADN, le problème vient du dentifrice dont les composants interfèrent dans le processus analytique et empêchent l'obtention du profil génétique.

Pour prélever de la salive (prélèvements buccaux) il suffit juste de récupérer la salive après frottement de la joue contre les dents. Ce sont les prélèvements utilisés le plus couramment par la police dans le cas de la vérification de l'ADN d'un suspect. Cette extraction étant faisable à notre niveau.

Ce travail a été effectué au niveau de laboratoire de biologie légale, au centre de la police scientifique et technique de Châteauneuf. El-biar, Alger. Pendant une durée de trois mois.

L'objectif essentiel de ce travail est d'optimiser la quantité et la qualité de l'ADN présente dans une brosse à dents, puis qu'il s'agit d'un objet présent en salle de crime qui fait partie des affaires utilisées par la victime, cet ADN est nécessaire pour établir une empreinte génétique. En comparant le rendement de l'ADN dans les deux méthodes d'extractions, "l'extraction chimique" et "l'extraction organique", et de voir également à quel moment on obtient la meilleure quantité et qualité d'ADN en jouant sur le facteur "temps" en effectuant des prélèvements espacés dans des intervalles de temps.

Tout ceci est dans le but d'établir une empreinte génétique

### **I Matériel d'étude:**

Le matériel d'étude que nous avons utilisé, objet de ce travail, sont des supports de salive: "Les brosses à dents."

On avait quatre brosses dents à quatre volontaires appartenant à une même famille dont l'arbre généalogique est le suivant.

### **II Emballage et conservation des échantillons:**

Les traces biologiques doivent être considérées comme fragiles et instables et des mesures de préservation immédiates dès la découverte de telles traces sont essentielles.

L'ADN a 3 ennemis principaux :

- L'humidité
- La chaleur
- La lumière

### **Détection de la salive avec le test phadebas amylase Test:**

Ce test préliminaire permet de détecter la présence ou l'absence de traces biologiques sur nos échantillons. Dans ce dernier cas, il serait inutile de procéder à une analyse de L'ADN.

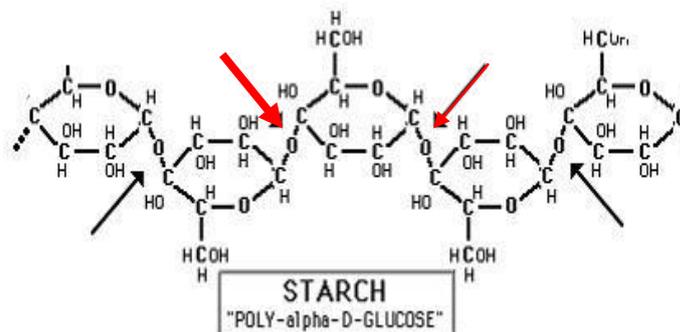
La substance la plus spécifique de la salive est une enzyme digestive qui transforme l'amidon en maltose, L'amylase ou (ptyaline), c'est aussi la principale enzyme salivaire (Camefort et Gama.1959).

Pour détecter cette enzyme salivaire, on utilise le Phadebas Amylase Test qui est une méthode appropriée à la détermination de l'activité de l' $\alpha$ -amylase dans le sérum, l'urine, la salive ou tout autre liquide biologique. Ce test permet donc d'affirmer ou non la présence de la salive.

### **a/ Principe:**

La pastille de Phadebas est un haut polymère insoluble d'amidon sur lequel est couplé un chromophore bleu, substrat pour l' $\alpha$ -amylase. Lorsqu'il est hydrolysé par l' $\alpha$ -amylase, ce substrat libère des fragments solubles et marqués par le colorant bleu qu'on retrouve donc dans le surnageant.

Il suffit donc d'observer l'intensité du bleu dans le surnageant après centrifugation des reste insolubles pour détecter la présence d' $\alpha$ -amylase et, par voie de conséquence, de salive



**Figure 6:** Une partie d'une chaîne d'amidon par des flèches indiquant les points d'action de l'enzyme  $\alpha$ -amylase.

### **I/Test de phadebas sur tube Falcon:**

- 1- Identifier un tube de type Falcon (15ml).
- 2- Réaliser obligatoirement un témoin positif (tache de salive) et un témoin négatif (eau distillée). Qui devront suivre le même traitement que tous les autres tubes.

- 3- déposer **5 faisceaux** environ de poil de brosse à dents et déposer dans le tube préalablement identifié. Dans des conditions stériles.
- 4- Ajouter **4ml** d'eau bi distillée et une tablette de phadebas.
- 5- Incuber **30 minutes à 37C°** sous agitation horizontale.
- 6- Ajouter **1ml de NaOH (0.5M)** pour arrêter la réaction, L' $\alpha$ -amylase étant une enzyme dont l'action optimal est à pH. Neutre (pH6.9).
- 7- Centrifuger **5min à 6000tr/min** afin d'obtenir le surnageant.

**Lecture:** Surnageant bleu = présence de salive.

Surnageant transparent= absence de salive.

### **Extraction et purification de L'ADN:**

L'étape d'extraction est primordiale car elle doit permettre de purifier des quantités faibles d'ADN à partir des substrats tout en limitant la présence d'inhibiteurs et en minimisant les risques de contaminations. Quel que soit le type de prélèvement, le principe des techniques d'extraction d'ADN est sensiblement le même et comprend quatre grandes étapes : la lyse des cellules, la dégradation des protéines libérées, la séparation des acides nucléiques des autres composants et la purification de l'ADN.

Mise en tubes:

- 1- Identifier les microtubes eppendorf en fonction des échantillons, en ajoutant un tube comme témoin négatif.
- 2- Stériliser des ciseaux dans l'eau, de l'eau de javel et de l'alcool afin d'éviter les contaminations ou d'utiliser des bistouris et de les changer à chaque fois.
- 3- Découper 5 faisceaux de poils de la brosse à dents de chaque volontaire dans une coupelle stérile.
- 4- A laide d'un écouvillon humidifié par l'eau autoclavée bi-distillée on prend les poils de la brosse à dents soigneusement.
- 5- Déposer l'échantillon dans le microtube qui lui convient (identifié préalablement) en découpant l'écouvillon juste sur la partie Coton.
- 6- Mettre la série d'échantillons dans un portoir.
- 7- Conserver les échantillons à l'abri de l'humidité, de la chaleur et de la lumière

**Extraction organique de L'ADN et purification par précipitation:****a/Principe:**

Le but de l'extraction est de détruire la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire des cellules en présence de DTT et de protéinase K qui digérera les protéines, le support, qui est les poils de la brosse à dents, et les éliminer par la réalisation de tube passoire.

La technique d'extraction organique d'ADN vise à séparer le matériel génétique des résidus protéiques. Elle est basée sur le principe de la solubilité différentielle des molécules d'acides nucléiques et de protéines entre deux phases non miscibles.

On utilise pour cela le mélange P:C:I (Phénol: Chloroforme: Isoamylalcool):

-Le phénol est un excellent agent organique déprotéinisant (dénaturant des protéines) dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles. Il permet donc de séparer efficacement l'ADN (hydrophile) des autres composés.

-Pour dissoudre les protéines, l'ajout du chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) force les débris membranaires lipidiques à aller dans la phase chloroformique hydrophobe.

-L'alcool isoamylique est un agent anti moussant.

La centrifugation permet la séparation des phases aqueuse et organique. Afin de prélever efficacement la phase aqueuse qui contient l'ADN.

**b/Lyse cellulaire:**

- 1- Déposer 400  $\mu\text{l}$  du tampon d'extraction dans le tube contenant l'échantillon.
- 2- Ajouter 12 $\mu\text{l}$  de Protéinase K (10 mg/ml) et 16 $\mu\text{l}$  de DTT.
- 3- Incuber à 37°C overnight ou 1-2 heures à 56°C.
- 4- Passer l'échantillon en tube passoire afin de récupérer le lysat. Perforer le tube avec une aiguille hypodermique stérile et l'introduire dans un nouveau tube eppendorf identifié (qui servira de réservoir de lysat).
- 5- Centrifuger pendant 3min à 13.000 tr/min.
- 6- Eliminer le tube contenant le support et conserver le microtube avec le lysat pour l'extraction.

**Extraction**

- 1-Déposer 500µl de mélange P:C:I (Phénol: Chloroforme: Isoamylalcool) dans le microtube contenant le produit de lyse.
- 2-Vortexer vigoureusement pour obtenir un mélange homogène de couleur blanche.
- 3- Centrifuger les échantillons pendant 3 min à 13.00 tr/min
- 4-Prélever la phase supérieure aqueuse contenant l'ADN (avec la micropipette de 200µl).Ne pas toucher l'interface en pipétant (ne pas pipeter le phénol).
- 5- Transférer la phase aqueuse dans un autre tube identifié (ne pas toucher l'interface protéique).
- 6- Déposer 500µl de mélange P:C:I.
- 7-Vortexer et centrifuger les échantillons pendant 3 min à 13.000 tr/min.
- 8- Prélever la phase supérieure aqueuse contenant l'ADN.

**Purification:**

Plusieurs techniques de purification des acides nucléiques sont disponibles:

L'ADN peut être purifié par de multiples précipitations à l'éthanol (milieu à haute force ionique) qui suffisent à débarrasser l'ADN des protéines contaminantes et des enzymes. C'est cette technique que nous avons utilisé:

- 1-Après phénolisation, déposer 1000 µl d'éthanol absolu (conservé à -20°C) dans le tube contenant la phase aqueuse.
- 2-Mélanger doucement par inversion.
- 3-Centrifuger à 10000 tr/min pendant 10 min.
- 4- Jeter l'éthanol (vider le tube).Cette étape doit être réalisée rapidement.
- 5-Ajouter 500 µl d'éthanol à 70°C.
- 6-Mélanger doucement par inversion.
- 7-Centrifuger à 10000 tr/min pendant 5 min.

8-Vider le tube.

9- L'ADN reste au fond du tube de façon compacte.

10-Faire évaporer l'éthanol restant dans le tube en l'exposant à une source de chaleur (40°C à 50°C) ou en le laissant sous hotte jusqu'à totale évaporation.

11-Remettre l'ADN en suspension dans 50µl l'eau ultrapure autoclavée.

### **Extraction et purification de l'ADN par kit Quiagen**

#### **a/Principe:**

Le but de l'extraction est de rompre la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire des cellules en présence de tampon ATL et de protéinase K qui dégrade les protéines. L'utilisation des tubes passoirs permet d'éliminer le support qui est les "poils de la brosse à dents". L'ajout d'éthanol absolu, solvant neutre qui agit en déshydratant la double hélice d'ADN, entraîne alors sa précipitation.

La purification de l'ADN basé sur l'adsorption de l'ADN se fait par une colonne QIAGEN standard pouvant être utilisée dans une micro-centrifugeuse. Cette colonne contient une résine de silice qui a pour rôle de retenir sélectivement les molécules d'ADN chargées négativement (par interaction électrostatiques). Ce kit emploie deux tampons qui permettent de laver l'ADN en éliminant les agents contaminants (ARN, reste de protéines, .....): la solution AW1 rend le milieu défavorable pour l'ADN (milieu organique), forçant l'ADN à se réfugier dans la membrane, et la solution AW2 moins organique qui stabilise les liaisons.

L'ADN est ensuite détaché de la colonne (élution) et entraîné par un tampon d'élution AE fourni dans le kit

### **b/protocole:**

-Préchauffer le tampon d'éluion AE jusqu'à 70°C

-Immerger l'échantillon dans 180 µl d'ATL pour libérer le matériel biologique du support, vortexer puis incuber pendant 10 mn à 85°C ;

-Centrifuger pour faire tomber les gouttes accumulées dans le capuchon ;

-Ajouter 20µl de PK, vortexer puis incuber 1 heure à 56°C ;

Passer l'échantillon en tube passoir pour récupérer le lysat; (perforer le tube avec une aiguille hypodermique stérile après l'avoir nettoyé avec un DNA away imbibé d'éthanol, et l'introduire dans un nouveau eppendorf identifié, ce dernier aura le rôle de réservoir du lysat;

-Centrifuger pendant 3 minutes à 13000 rpm.

-Ajouter 200 µl de tampon AL, incuber 10 minutes à 70°C; Centrifuger pour faire tomber les gouttes accumulées dans le capuchon

Ajouter 200 µl d'éthanol absolu, (L'ajout d'éthanol absolu, solvant neutre, qui agit déshydratant la double hélice d'ADN, entraînant alors sa précipitation.)

Vortexer, centrifuger 3 à 5 secondes, puis déposer le tout doucement au centre d'une colonne préalablement identifiée, sans toucher la membrane avec le cône de la pipette. -Centrifuger

1mn à 8000 rpm

-Eliminer le tube contenant l'éluât, transférer la colonne dans un nouveau tube et ajouter 500µl de tampon AW1. Centrifuger 1mn à 8000 rpm ;

-Eliminer le tube contenant l'éluât, transférer la colonne dans un nouveau tube et ajouter 500µl de tampon AW2, Centrifuger 3 mn à 13 000 rpm ;

Eliminer le tube contenant l'éluât, transférer la colonne dans un tube de

1,5 ml stérile préalablement identifié, puis ajouter 100 µl du tampon AE sur la colonne

Incuber 5 mn à température ambiante, Centrifuger 1 mn à 8000 rpm pour récupérer l'extractum.

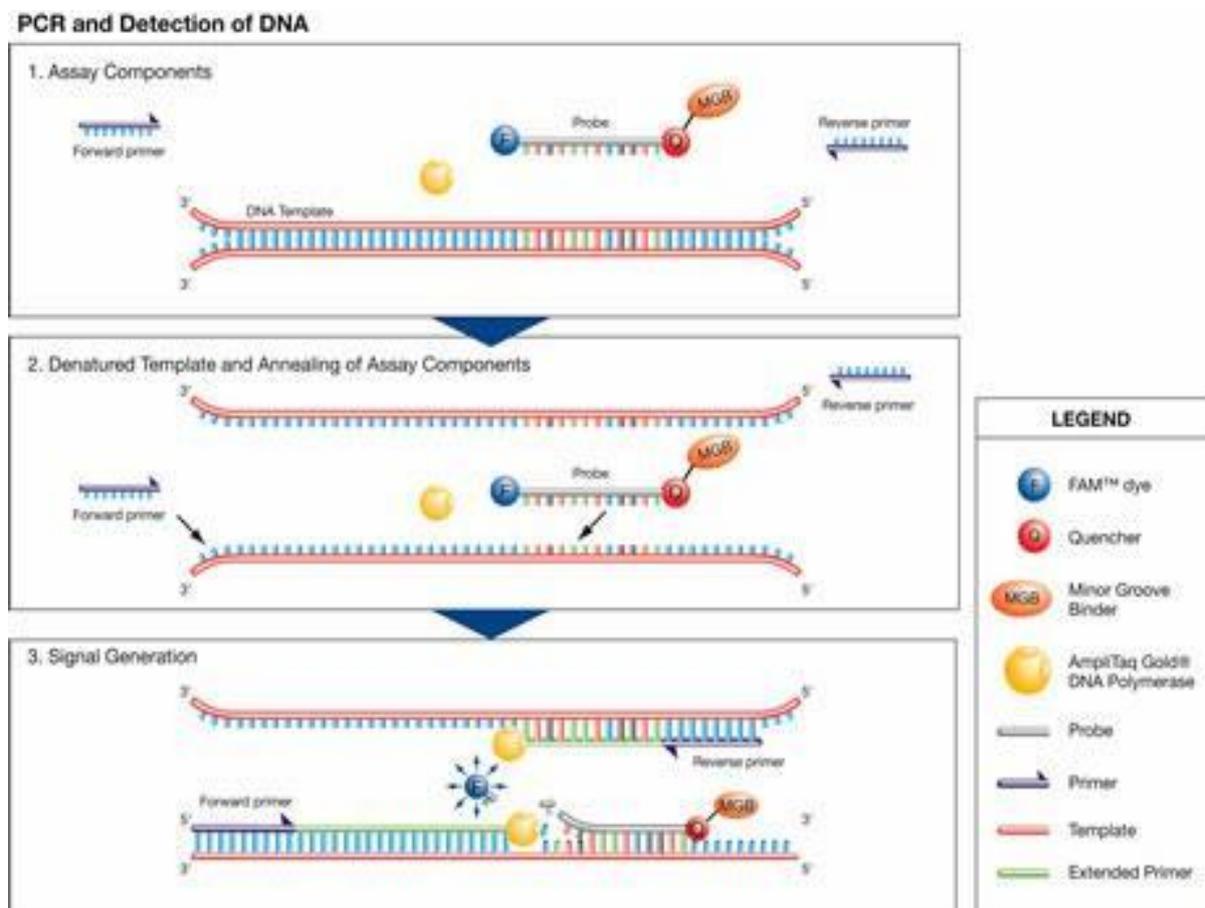
**Conservation des extraits d'ADN:** Les extractums doivent être conservés à 4°C.

### **Quantification de l'ADN par PCR en temps réel**

La quantité d'ADN présente dans un extrait varie fortement en fonction de la nature de l'échantillon et de la méthode d'extraction. Par conséquent, comme étape préalable à toute amplification nous avons réalisé la quantification de l'ADN présent dans les extraits de cellules épithéliales cumulées sur les poils des brosses à dents à l'aide de l'ABI Prism® 7500

Fast Sequence Detection System en utilisation le kit Quantifiler™ Human Quantification kit (Applied Biosystems), par la chimie Taqman.

La quantification par PCR en temps réel permet, outre l'estimation de la concentration de L'ADN présent dans l'extrait, d'évaluer la présence d'inhibiteurs a l'aide d'un témoin interne d'amplification qui sert à valider l'amplification. Le protocole est décrit en annexe 4. Au vu des résultats de quantification obtenus, les extraits des échantillons de cellules épithéliales ont été dilués pour obtenir une concentration optimale d'ADN lors de l'amplification (de 0.05 à 0.125ng/ul pour l'analyse STR).



**Figure 7 : Diagramme de la chimie Taq man**

**Tableau II: La cible de la sonde Taq man.**

Kit	Gène cible	Localisation du Gène	Longueur de l'amplicon	Région amplifiée	Ploidie
Quantifiler Human	Human telomerase reverse transcriptase gene(hTERT)	5p15.33	62pb	Intron	Cellule diploide

1-La sonde Taqman contient: à l'extrémité 5' le Reporter fluorochrome FAM et à l'extrémité 3' le Quencher (represseur).

2-En absence du gène cible le reporteur FAM n'émet pas de fluorescence (réprimé par le quencher).

3-En s'hybridant au gène cible, le FAM est clivé de la sonde, émission de la fluorescence et c'est cette fluorescence qui est quantifiée en Ct puis convertie en concentration ng/ul.(voir le diagramme).

L'IPC (internal pcr Control) est un ADN synthétique, son rôle est de détecter les inhibiteurs.

Protocole de la Quantification d'ADN sur cycleur thermique rapide en temps réel Applied Biosystems 7500 Fast.

b/ Mode opératoire

- Préparer des dilutions en série de l'ADN témoin telles que décrites au tableau ci-dessous. Passer au vortex pendant au moins 5s, puis centrifuger chaque solution brièvement avant de prélever un aliquot pour la dilution suivante.
- **Tableau III: Dilution en série de l'ADN Témoin.**

Dilution en série	ADN témoin	Diluant (eau MQ)
200 ng/μl	ADN non dilué	-
50 ng/μl	10μl	30μl
16.7 ng/μl	10μl	20μl
5.56 ng/μl	10μl	20μl
1.85 ng/μl	10μl	20μl
0.62 ng/μl	10μl	20μl
0.21 ng/μl	10μl	20μl
0.068 ng/μl	10μl	20μl
0.023 ng/μl	10μl	20μl

- Homogénéiser le mixe par retournement, passer au vortex les amorces avant usage afin d'éviter les différences de concentration de sel ;
- Préparer un mixe tel que décrit au tableau ci-dessous (mélange qui contient tous les composants nécessaires à la PCR à l'exception de la matrice d'ADN-échantillon) ;

**Tableau IV: Mixe pour la quantification ADN :**

<b>Composant</b>	<b>Volume par réaction de 25ul</b>	<b>Concentration finale</b>
Reaction mix: (Taq gold AND polymerase, dNTPS, Passive reference-ROX-)	12,5 µl	1x
Primers mix: (sonde TAQMAN -FAM, amorces, IPC-VIC	10,5 µl	1x
<b>Volume total du mixe</b>	<b>23 µl</b>	

- Mélanger soigneusement le mixe et en transférer 23µl dans une plaque PCR Fast ;
- Ajouter 2ul des dilutions d'ADN témoin, de l'échantillon inconnu et du diluant (eau Milli Q) pour le témoin négatif ;
- Centrifuger la plaque quelques secondes ;

Toutes les quantités sont exprimées en ng/µl .UNK : échantillon inconnu, NTC : Témoin négatif.

- Sceller la plaque avec un film transparent ;
- Placer dans le cycleur thermique puis lancer le logiciel 7500Fast-détection de séquence.

### **Génotypage de l'ADN par STR's**

#### **Amplification des STR's par PCR**

Les échantillons biologiques soumis pour expertise en science médico-légale (salive, sang, sperme.....) contiennent parfois des quantités insuffisantes d'ADN pour la détermination de profils génétiques par la méthode des RFLP (restriction fragment length polymorphisms). Il est maintenant possible de tirer profit de la présence dans le génome humain de courtes séquences répétitives appelées STR's pour "shortTandeml Repeat" hautement polymorphes quant au nombre de répétition.

L'amplification simultanée de plusieurs STRs par polymérisation en chaîne (PCR-multiplex) permet en effet d'obtenir un profil génétique, à partir d'une quantité infime d'ADN. L'utilisation d'un grand nombre de marqueurs de marqueurs STRs réduit à un niveau infinitésimal le risque de coïncidence.

Dans notre travail, la PCR a été réalisée en utilisant deux kits d'amplifications : le kit AmpFISTER Identifier, et le kit AmpFISTER Identifier plus sachant qu'il n'y a pas une grande différence entre ces deux kits d'amplifications sauf que le kit de AmpFISTER Identifier plus présente plus d'affinité en point de vue qui il est capable d'amplifier même les petits fragments d'ADN, donc il est puissant dans le cas où l'échantillon se trouve dégradé.

La gamme recommandée de l'ADN de l'échantillon d'entrée est d'environ 0,5 à 1,5 ng de l'ADN humain pour le kit AmpFISTER Identifier plus et 0,5 à 1,25 ng de l'ADN humain le kit AmpFISTER Identifier et ils ont tapé avec succès des échantillons contenant moins de 0,5 ng.

Par ces deux kits on a effectué une co-amplification de 15 loci STRs qui sont des répétitions tétranucléotides en tandem. Les analyses portent également sur le gène de l'amylogénine, marqueur spécifique du sexe .

Sans oublier aussi de parler sur une autre différence entre les deux kits d'amplification AmpFISTER Identifier, et AmpFISTER Identifier plus qui est au niveau de l'enzyme la Taq polymérase qui se trouve en solution avec le Master mix dans le kit AmpFISTER Identifier plus se qui lui donne un aspect un peu visqueux on comparant avec celle du kit AmpFISTER Identifier qui se retrouve en solution tout seul. et dans ce but le tableau II représente une comparaison dans la composition de chaque kit d'amplification.

### **Principe:**

La PCR est un processus enzymatique qui permet, à partir de très petites quantités d'ADN d'amplifier des fragments définis de la molécule d'ADN (Reynolds et al, 1991).

La réaction PCR consiste en une succession des cycles comprenant trois phases thermiques (**Tableau** ) réalisées successivement dans un même tube

**Phase de dénaturation:** par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN matrice et les linéariser.

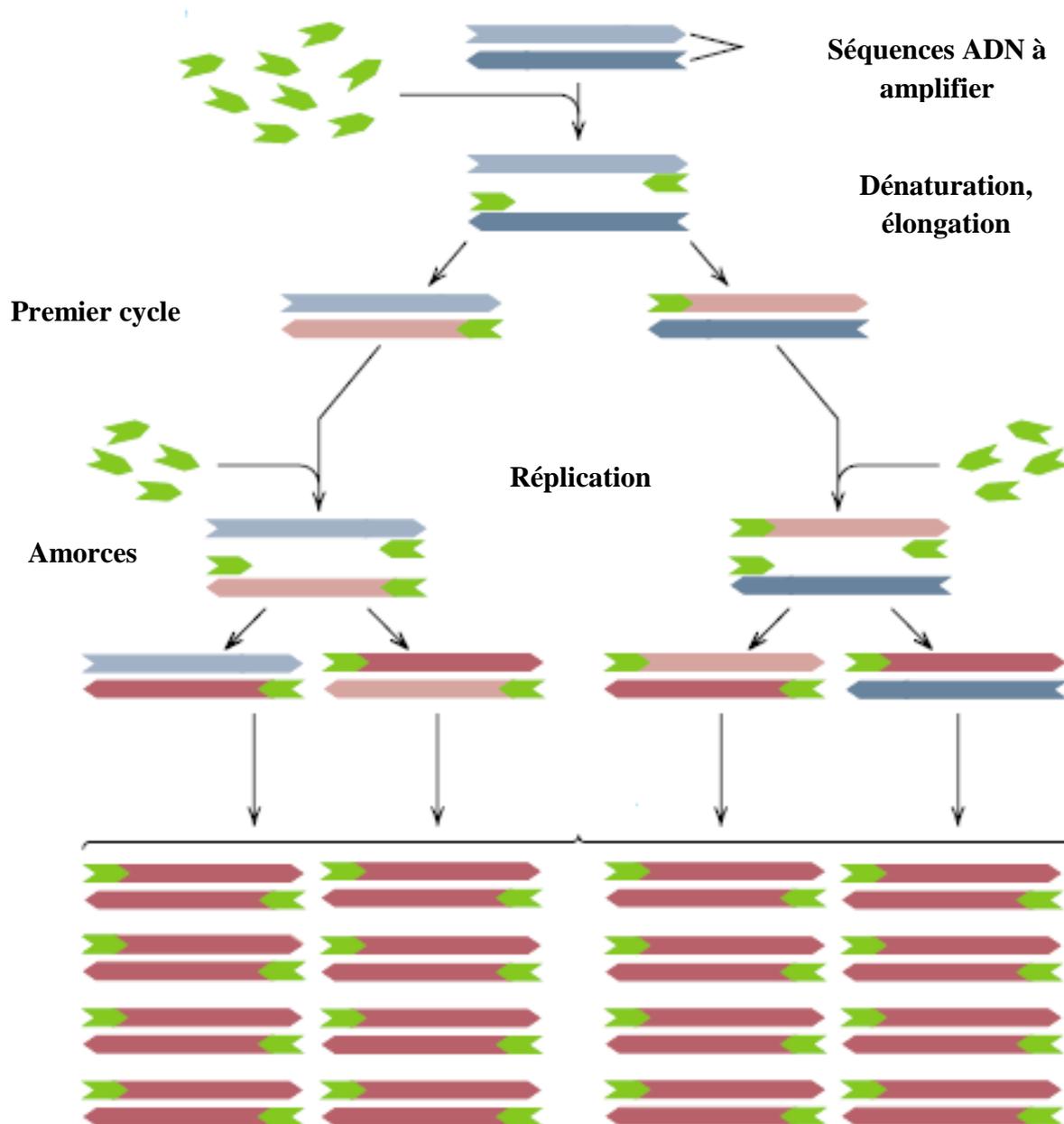
**Phase d'hybridation:** au cours de laquelle l'amorce va s'apparier à la séquence d'ADN matrice qui lui est complémentaire.

**Phase d'extension:** au cours de laquelle la Taq polymérase va synthétiser l'ADN à partir de l'extrémité 3'OH de l'amorce dans le sens 5'P vers 3'OH en incorporant successivement des dNTPs

**Tableau V: Conditions thermique des différentes phases de la PCR réalisée.**

(AmpFISTR® Identifier™ Kit user's guid).

<b><u>28 cycles</u></b>				
<b><u>Icubation initiale</u></b>	<b><u>Phase de dénaturation</u></b>	<b><u>Phase d'hybridation</u></b>	<b><u>Phase d'extention</u></b>	<b><u>Extention finale</u></b>
95°C 10min	94°C 1min	59°C 1min	72°C 1min	60°C 60min



**Figure 8:** Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour l'amplification d'une séquence d'ADN. Seulement les régions amplifiables sont visibles. Les amorces en vert sont complémentaires des séquences cibles en bleu. Les nouveaux fragments amplifiés sont en rose (Daniel et Elizabeth, 2009).

#### **Séparation des produits d'amplification des STR's sur séquenceur automatique:**

Les extraits d'ADN de salive ont été amplifiés en utilisant les deux kits: AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Identifier<sup>™</sup> Plus et AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Identifier<sup>™</sup> PCR Amplification (Applied Biosystems). Après amplification, les STR amplifiés sont séparés par électrophorèse capillaire placés dans

un séquenceur," ABI PRISM<sup>®</sup> 3130 xl" qui est un séquenceur contenant seize capillaires, ce qui permet d'analyser simultanément seize échantillons. Qui sont analysés par électrophorèse sur gel POP4 (Performance Optimized Polymer 4) de polyacrilamide, retenu dans un capillaire de 36cm.

**Lecture des résultats de l'amplification des STRs:**

La fluorescence émise par les amplicons marqués, générés lors de la PCR multiplex, au moment du bombardement par le faisceau laser du séquenceur, est captée par une caméra CCD (Charge Coupled Device)

Les données collectées par la caméra CCD lors de l'électrophorèse capillaire sont transmises au logiciel de lecture des résultats qui est dans notre cas GeneMapper Software Version 1.0.

La validation des résultats se fait selon les étapes suivantes :

- Assemblage des données ;
- Identification des pics ;
- Détermination de la taille des molécules ;
- Séparation par couleurs (fluorochromes) ;
- Comparaison au Ladder allélique;
- Assignation de la nomenclature de chaque allèle ;
- Validation des profils obtenus par un analyste

Chacun des marqueurs fluorescents émet son maximum de fluorescence à une longueur d'onde différente. Le marqueur 6-FAM émet à la plus courte longueur d'onde et est affiché en bleu, suivi par le VIC (vert), NED (jaune), PET (rouge), et LIZ (orange)

**Test préliminaire avec le phadebas:**

Le test préliminaire avec le phadebas que nous avons eu à utiliser dans le cadre de notre travail se voulait être un préalable et une condition sine qua non sans les lesquels aucune étape ultérieure de l'objectif que nous nous sommes assignés ne pouvait se faire.

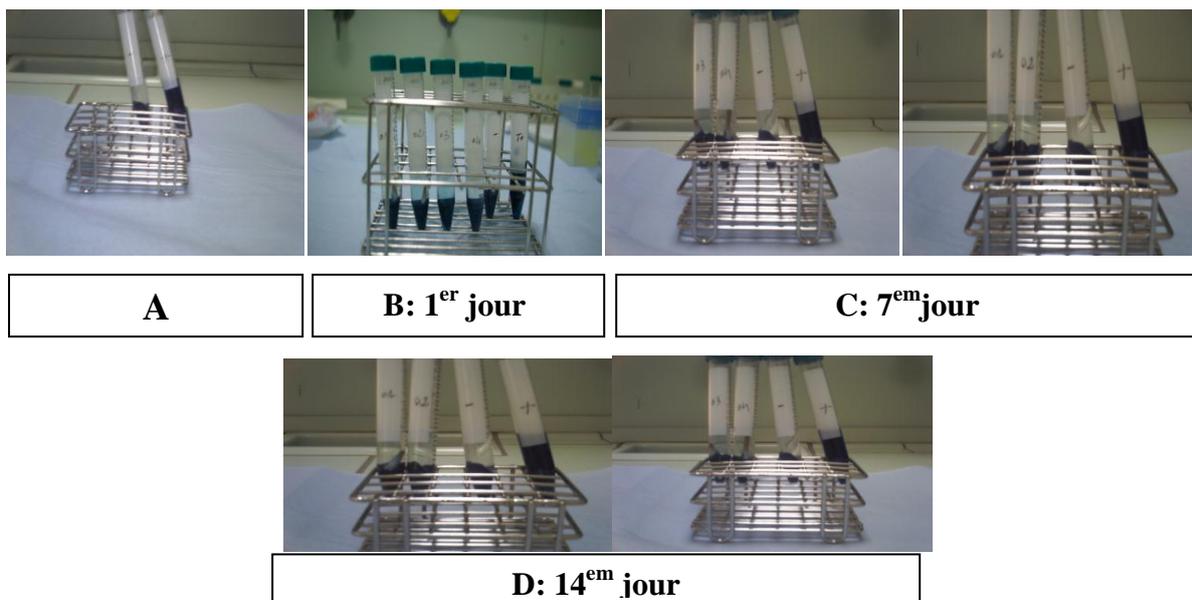
En effet, nous nous sommes attachés à conduire une procédure d'identification par empreinte génétique réalisée sur d'ADN extrait à partir d'un liquide corporel, en l'occurrence la salive.

Le test Phadebas Amylase se voulait être un moyen biochimique extrêmement simple d'usage et d'une facilité de mise en œuvre remarquable, pour la simple raison de sa disponibilité en kit standardisé et montrant ainsi tous les avantages de sensibilité et de reproductibilité.

Lors de notre étude, nous nous sommes intéressés à détecter la présence de traces biologiques de types "salive" dans nos échantillons, cinq faisceaux de poils de la brosse à dents pour quatre volontaires prélevés dans des intervalles de temps différents.

Les témoins utilisés ont en outre donné des résultats conformes (**figure13**) permettant de s'assurer que le processus d'analyse fonctionnait, c'est-à-dire une coloration bleue pour le témoin positif et un surnageant transparent pour le témoin négatif

Bien que les échantillons salivaires proviennent tous d'un même individu, nous avons pourtant remarqué que la coloration bleue positive et la coloration légèrement positive et le transparent du test variaient en intensité d'un échantillon à l'autre (figure).



**Figure 9: Résultats du test préliminaire avec le phadebas.**

A:Témoin du test: à gauche, surnageant transparent du témoin négatif; à droite, coloration bleu du témoin positif. B, C, D. (Echantillons analysés).

Une explication à cette observation serait que la composition de la salive en enzyme amylolytique varie avec le débit sécrétoire (en grande partie contrôlé par le système nerveux autonome). La sécrétion salivaire chez une même personne n'est en effet pas et uniforme (Trois intervalles de temps pour le même individu: 1<sup>er</sup> jour, 7<sup>em</sup> jour, et 14<sup>em</sup> jour): elle est par exemple pratiquement nulle au cours du sommeil et réduite entre les repas.

En l'absence de stimulation, les glandes salivaires n'ont pas d'activité sécrétoire significative. Le débit sécrétoire salivaire sont sous la dépendance exclusive d'une commande nerveuse (Hérvé. G et al, 2001).

Une explication tout aussi plausible est due au simple fait que le dépôt de salive par brosse à dents suit le la durée et la façon de rinçage de cette dernière d'une personne à une autre, sans s'oublier aussi la quantité de la pâte de la dentifrice déposée sur la brosse de chaque personne.

L'essentiel de l'étude ne se résume pas à la présence ou l'absence de la salive, ce sont les cellules épithéliales et leur cumules qui justifient la présence du matériel génétique donc on conclue que la présence de la salive ne veut pas dire la présence de l'ADN, et l'absence de salive ne veut pas dire l'absence de l'ADN.

Enfin, pour le test phadebas, les résultats obtenus confirment que ce n'est pas uniquement la présence de la salive qui permet d'obtenir un profil génétique mais ce sont également les cellules épithéliales (muqueuses) qui permettent le cumul de l'ADN.

### **Quantification d'ADN extrait à partir de salive**

L'estimation de la quantité d'ADN à partir des extractions réalisées à partir de salive est indispensable car elle permet d'apprécier la "richesse" du notre échantillon en ADN. Elle est d'autant plus importante qu'elle permet ensuite d'ajuster les concentrations d'ADN dans des limites normalisées requises pour la réalisation de techniques ultérieures de biologie moléculaire, notamment la PCR.

La quantification d'ADN que nous avons réalisée fait suite aux divers protocoles d'extraction que nous avons mis en œuvre pour obtenir de l'ADN génomique total à partir de salive.

Il s'agit des deux méthodes d'extractions:

-Extraction organique au PCI (Phénol: chloroforme: Isoamylalcool), puis purification par précipitation à l'éthanol.

- Extraction par le kit Qiagen.

Les résultats de quantification que nous avons obtenus suite à la lecture des graphes de la PCR en temps réel sont représentés dans le Tableau et laisse ressortir plusieurs constatations. Les résultats de quantification que nous avons obtenus suite à la lecture des graphes de la PCR en temps réel dans le (**tableau X**) et laissent ressortir plusieurs constatations.

**Tableau VI: Résultats de la quantification de l'ADN extrait à partir des échantillons de salive:**

1er jour:			
Individus	Organique:	Quiagen:	Inibiteures
1	0.038 ng/ul	0.0125 ng/ul	-
2	1.0 ng/ul	1.2 ng/ul	-
3	0.4 ng/ul	0.9 ng/ul	-
4	1.6 ng/ul	3.9 ng/ul	-
Moyenne	0.75 ng/ul	1.50ng/ul	

7em jour:			
Individus	Organique:	Quiagen:	Inibiteures
1	0.088 ng/ul	0.16 ng/ul	-
2	0.076 ng/ul	0.5 ng/ul	-
3	0.087 ng/ul	0.8 ng/ul	-
4	0.3 ng/ul	0.15 ng/ul	-
Moyenne	0.13ng/ul	0.40ng/ul	

14 jour:			
Individus	Organique:	Quiagen:	Inibiteures
1	1.5 ng/ul	0.08 ng/ul	-
2	0.2 ng/ul	0.03 ng/ul	-
3	0.4 ng/ul	0.01 ng/ul	-
4	0.13 ng/ul	0.07 ng/ul	-
Moyenne	0.55ng/ul	0.047ng/ul	

Les résultats de la quantification de l'ADN extrait par deux protocoles d'extractions Organique et Qiagen à partir de cinq faisceaux de poils des brosses prélevés pendant des

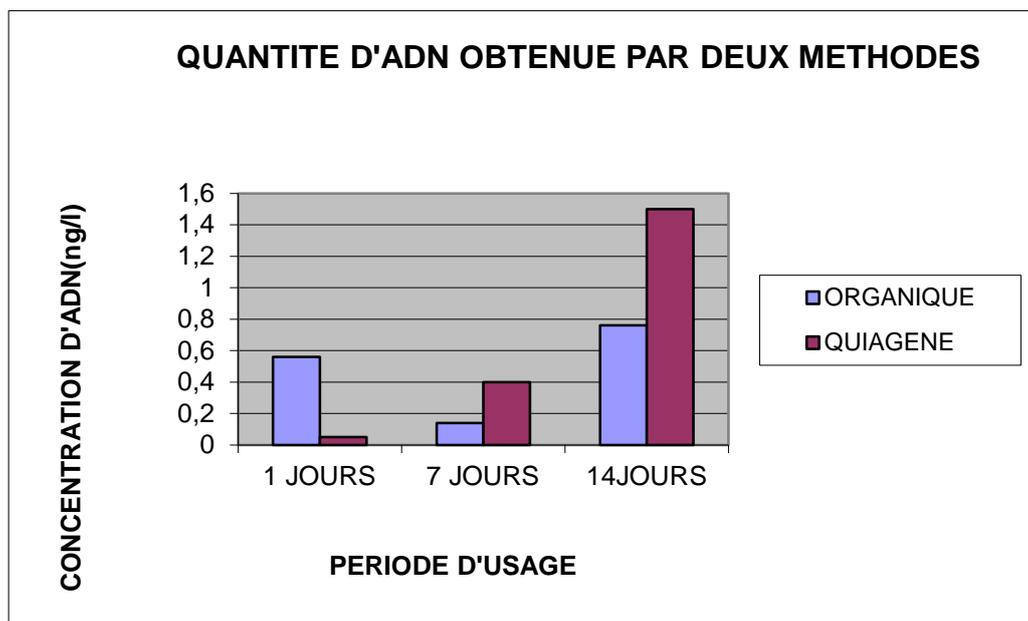
intervalles de temps différents sont représentés dans les tableaux comparatifs suivant: (les quantités d'ADN en ng/ul).

Les données de la quantification en temps réel montrent que les quantités d'ADN obtenues pour le premier jour et ceci pour les deux méthodes d'extraction n'enregistrent pratiquement pas de différences relativement plus importantes pour les individus I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, II<sub>1</sub>. Pour le septième jour, les concentrations sont plus importantes avec l'extraction Qiagen, notamment pour les individus I<sub>2</sub> et II<sub>1</sub>. Enfin pour le quatorzième jour, nous avons constaté que les concentrations sont plus importantes avec l'extraction organique et ceci confirme deux points :

1)- Pour le brossage des dents, durant quatorze jours nous avons noté et confirmé le cumul de l'ADN

2)-la méthode d'extraction qui est l'organique est plus efficace, ceci confirme que le PCI suivi de la précipitation à l'éthanol est efficace pour les grandes quantités d'ADN.

**Diagrammes de barre:**



**Figure10: Diagrammes de barre des quantités d'ADN obtenues par deux types d'extractions.**

Une quantité moyenne d'ADN légèrement plus importante pour l'extraction Qiagen, comparativement à l'extraction organique, bien que ce dernier protocole d'extraction permette parfois d'obtenir un meilleur rendement pour certains échantillons comme c'est le cas dans la série de quatorzième jour.

Les différences quantitatives de l'ADN obtenues à partir des brosses à dents, d'une personne à une autre dépend: de type et de la durée de brossage qui varie selon les individus et sans oublier aussi le facteur âge qui peut se manifester dans cette dernière. L'analyse d'un nombre plus important d'échantillons permettait de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

On remarque que notre support du matériel génétique qui sont les brosses à dents ont été très riches en pâte dentifrice, et en examinant les ingrédients de la pâte dentifrice, on trouve que le fluor est leur majeur composant, ce dernier est un élément chimique qui contribue à la prévention des caries.

Le fluor est l'atome le plus électronégatif de tout l'univers. Il agit exactement comme un super aimant qui attire à lui la majorité des autres atomes

Les enzymes que l'on retrouve dans toutes les cellules vivantes et que l'on peut considérer, nécessitent en leur centre actif des minéraux (comme le fer, le zinc, le cuivre, le molybdène, le magnésium, etc.) pour fonctionner. Comparons ces enzymes à des ouvriers professionnels et les minéraux aux outils de ces professionnels. Le fluor, comme super aimant, va attirer à lui les minéraux et empêcher les enzymes de fonctionner.

C'est le cas des enzymes qui assurent la réplication de l'ADN .donc le fluor est un inhibiteur de la réplication de l'ADN.

Mais malgré sa présence dans nos échantillons, l'inhibiteur de la PCR qui est le fluor n'est pas détecté.

Ce qui prouve le bon déroulement de l'extraction organique ou on a éliminé les inhibiteurs au cours des phénolyses

En certains cas la quantité de l'inhibiteur tellement est très importante que ce dernier va empêcher la réplication de l'ADN en même temps ce qui est détectable par le système de la PCR en temps réel.

### **Génotypage de l'ADN par STR's**

Après réalisation de la co-amplification des 15 loci STR, ainsi que du locus amélogénine, en utilisant les deux kit d'amplifications; le kit AmpFISTER Identifier et le kit AmpFISTER Identifier plus pour chaque échantillon cités précédemment, puis séparation des produits d'amplification sur séquenceurs automatique, 3130 XL, l'ordinateur collecte au fur et à mesure

les données brutes d'électrophorèse sur la base des spectres de fluorescence selon le fluorochrome couplé aux amorces.

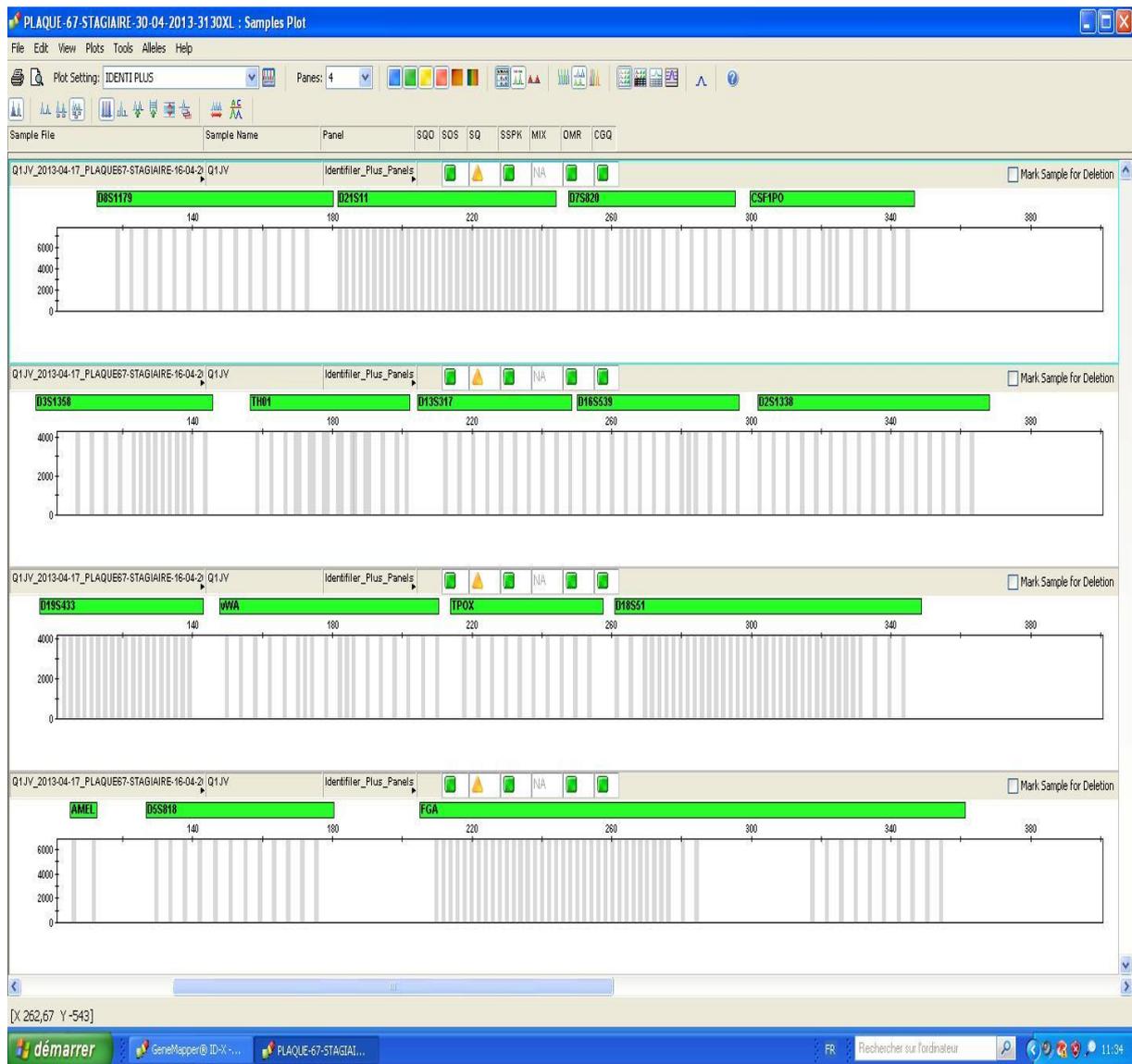
Ces données brutes se font chevaucher tous les quatre spectres de fluorochromes utilisés est ce n'est qu'en analysant ces données avec le logiciel GeneMapper® ID-X Software Version 1.0, que les pics correspondants aux STR amplifiés peuvent être identifiés par fluorochrome (par couleur) (**Figure19**).

La disponibilité d'un standard de taille LIZ-500(16 fragments d'ADN ayant des tailles respectives de 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490, et 500pb), rajouté à chaque échantillon déposé pour électrophorèse sur le séquenceur, permet au logiciel de calibrer de profil d'électrophorèse et ainsi d'estimer par comparaison la taille exacte de chacun des pics d'électrophorèse individualisés.

L'analyse par fluorochrome (par couleur) individuelle étant aisément réalisée par le logiciel GeneMapper® ID-X Software Version 1.0.

Dans le cas du témoin négatif en remarque l'absence totale des pics qui correspond au STR, que des pics orange de standard de taille LIZ.

**Profil génétique du témoin négatif**



**Figure11 : profil d'un témoin négatif T**

Ce résultat est compatible avec les résultats de la quantification où aucune quantité d'ADN n'a été détectée

Profil génétique du LADDER d'identifier plus

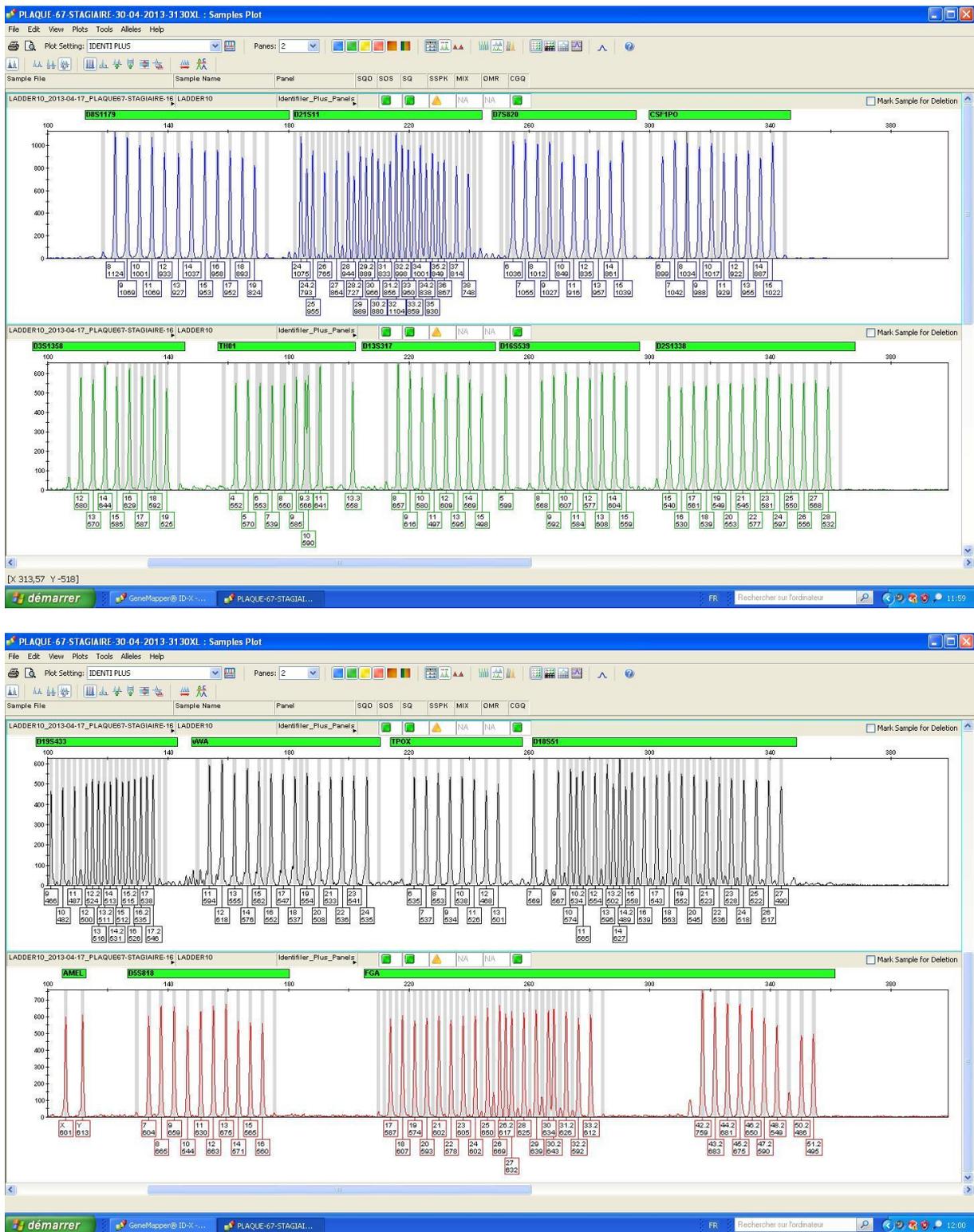


Figure 12: de ladder d'identifier plus

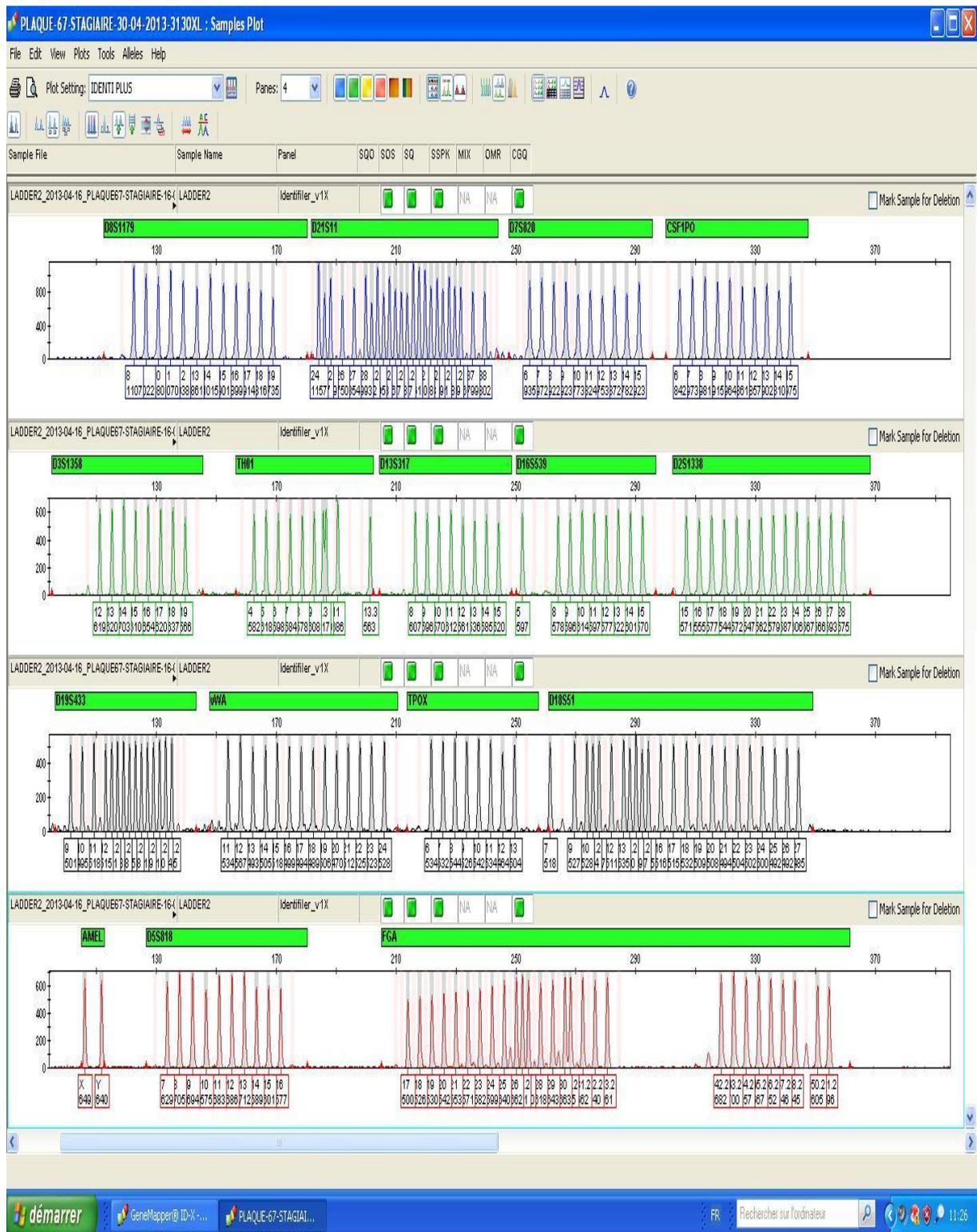


Figure 13: profil de ladder d'identifiler

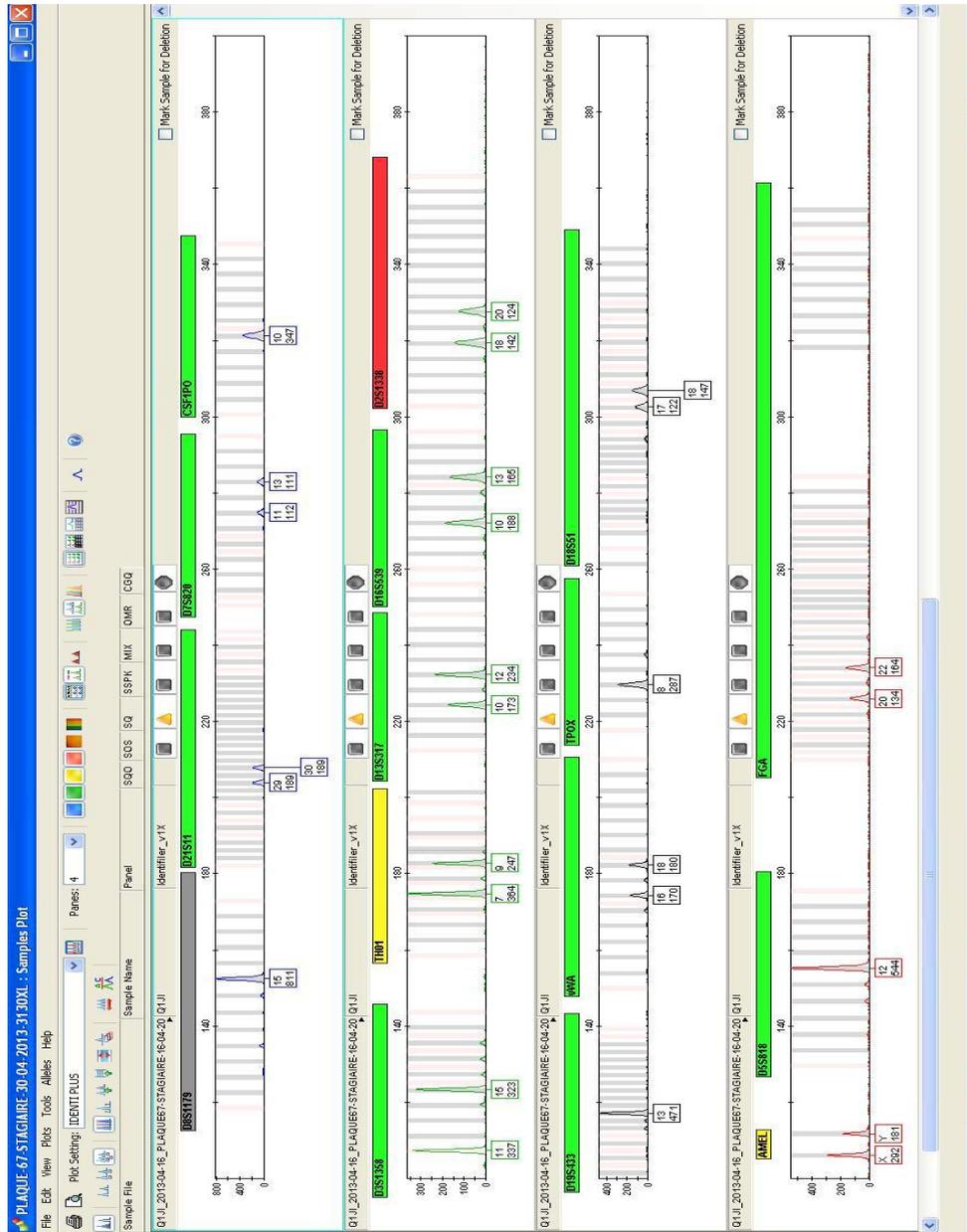


Figure 14 : Profil génétique des STR obtenus pour un échantillon de salive d'individu 1GeneMapper® avec le kit identifier

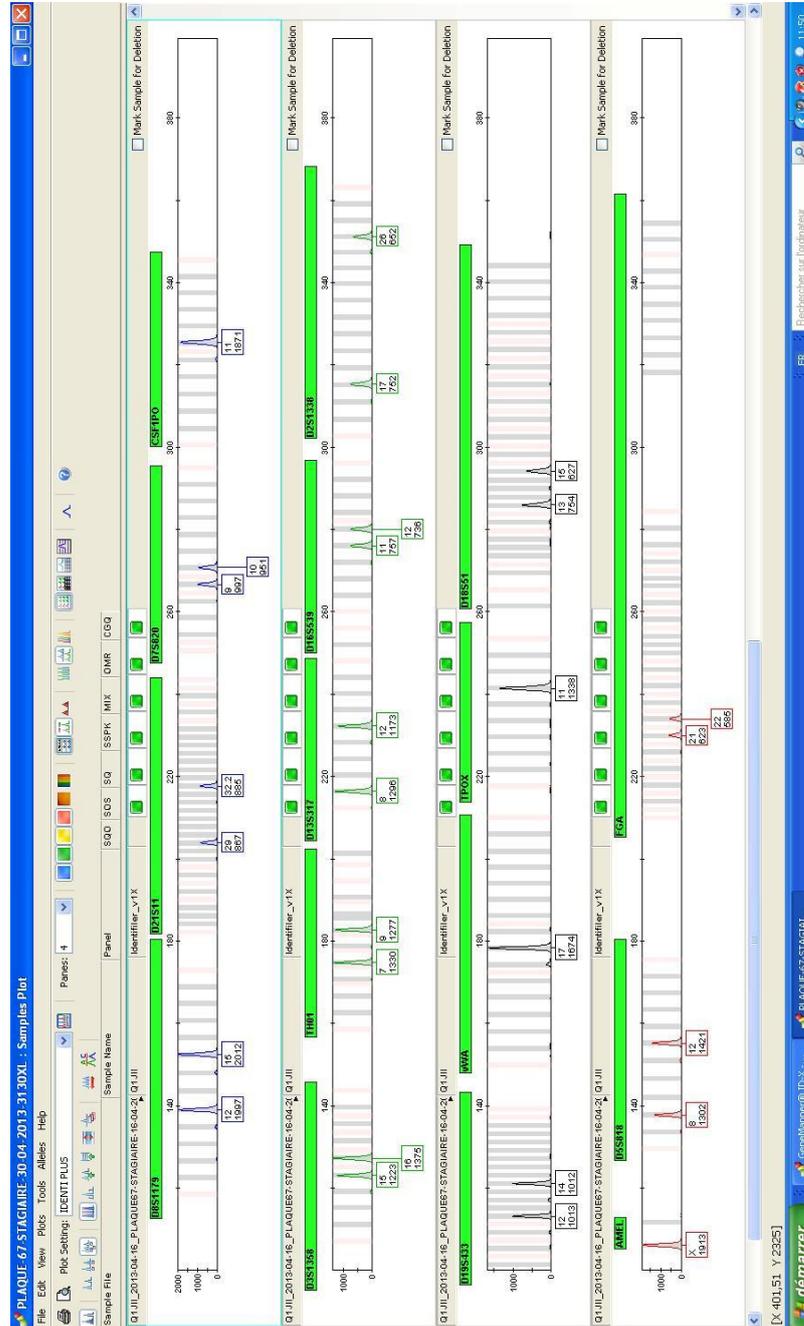


Figure 15 : Profil génétique des STR obtenus pour un échantillon de salive d'individu2 GeneMapper® avec le kit identifier

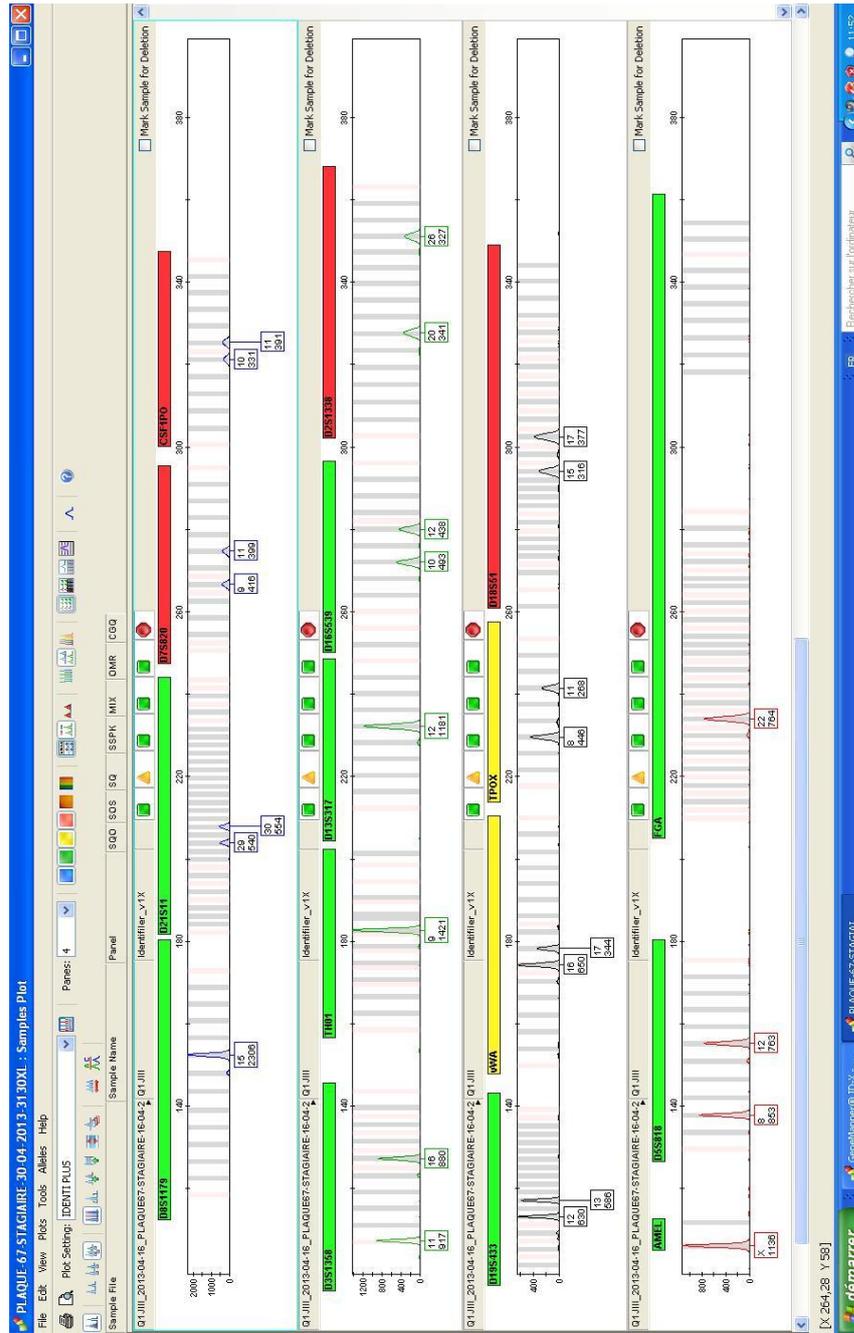
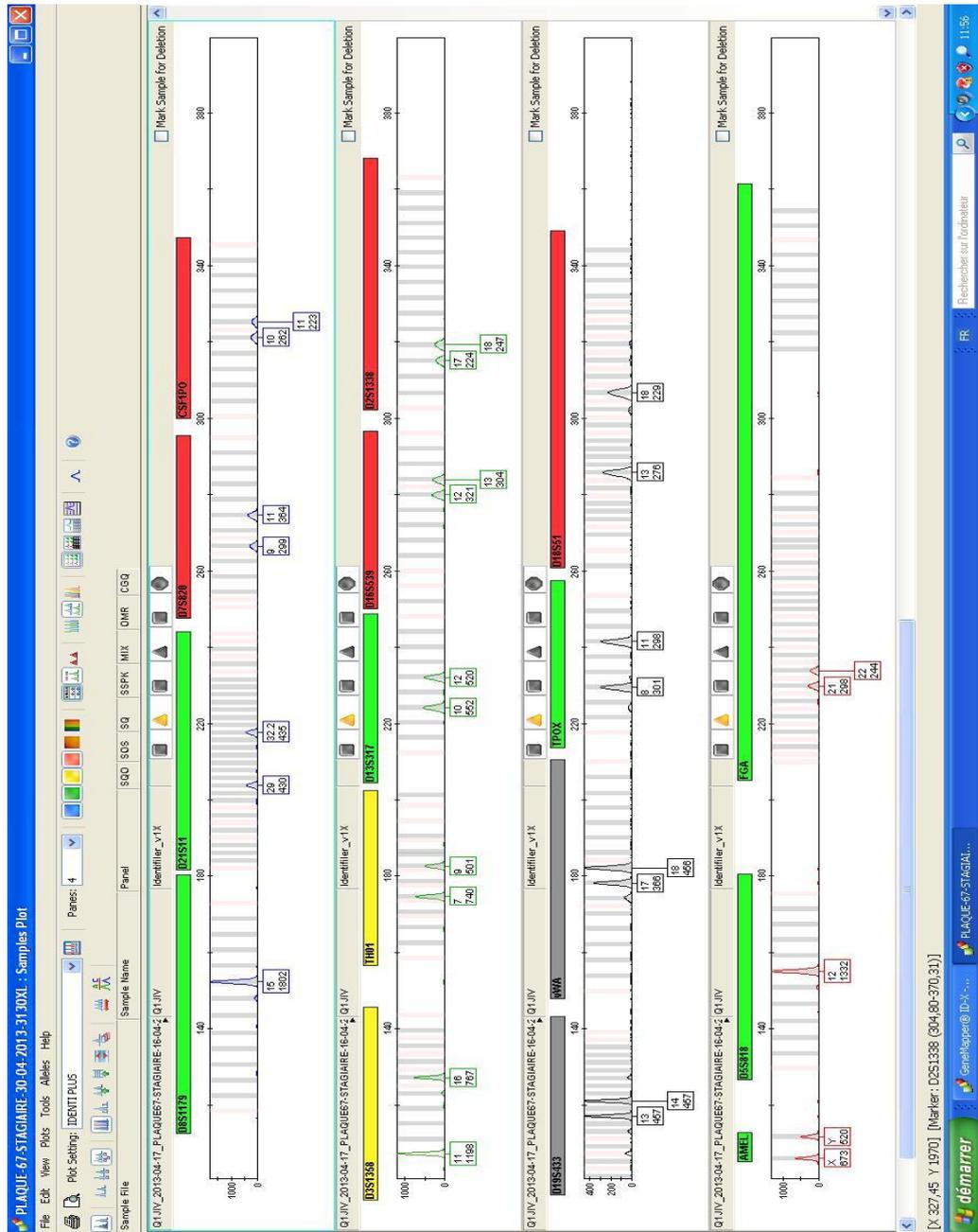


Figure 16: Profile génétique des STR obtenus pour un échantillon de salive d'individu 3 GeneMapper® avec le kit identifier



**Figure 17 :** Profil génétique des STR obtenus pour un échantillon de salive d'individu 4 GeneMapper® avec le kit identifier

La validation de ces génotypes n'est possible que si deux témoins utilisés ont donné des résultats conformes:

-Un témoin négatif donnant un résultat blanc.

-Un témoin positif (AmpFISTR control DNA 9947A de génotype connus pour ces STR) et dont les tailles des allèles générées sur logiciel génotyper doivent concorder avec celles attendue.

En effet:

Le profil obtenu après analyse du témoin négatif ne présente que les pics des primers et ceux du standard de taille, et n'individualise aucun pic correspondant aux STR du kit d'amplification, permettant d'exclure toute contamination détectable lors des manipulations.

Les génotypes obtenus pour le témoin positif (AmpFISTR Control DNA 9947A) pour chacun des STR du kit ont des tailles correspondantes à celles fournies dans la brochure explicative du kit (Tableau II).

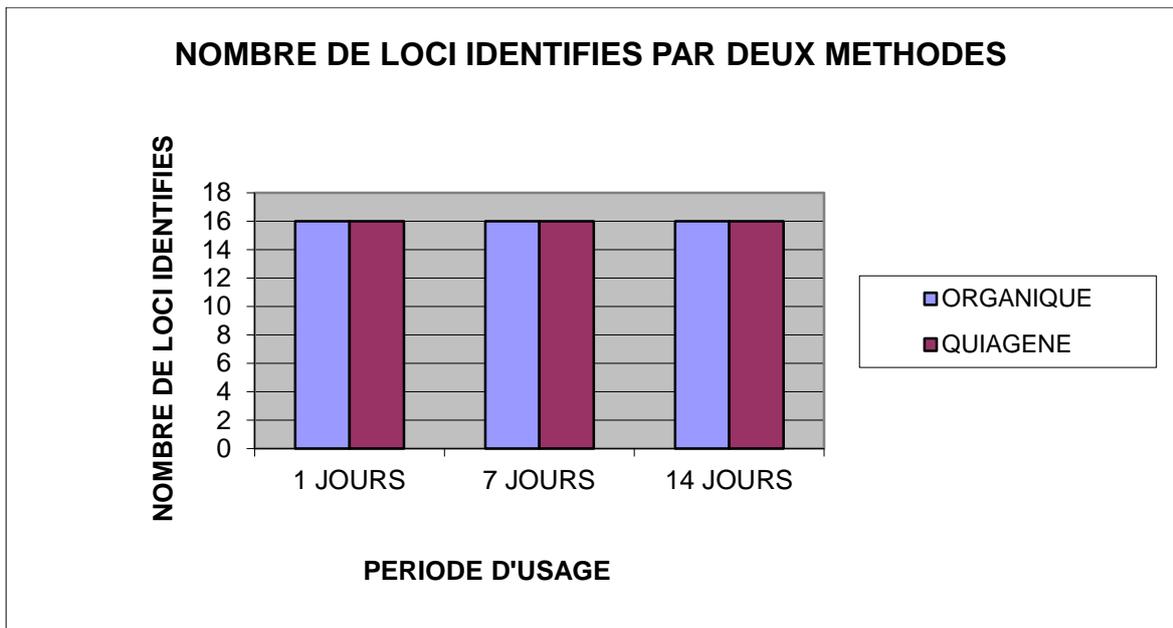
Au travers de nos expériences, nous avons pu montrer l'interprétabilité du profil obtenu pour notre échantillon de salive par:

-Tous les pics du standard de taille sont présents, et permettent ainsi un assignement correct de taille pour chacun des pics d'amplification STR.

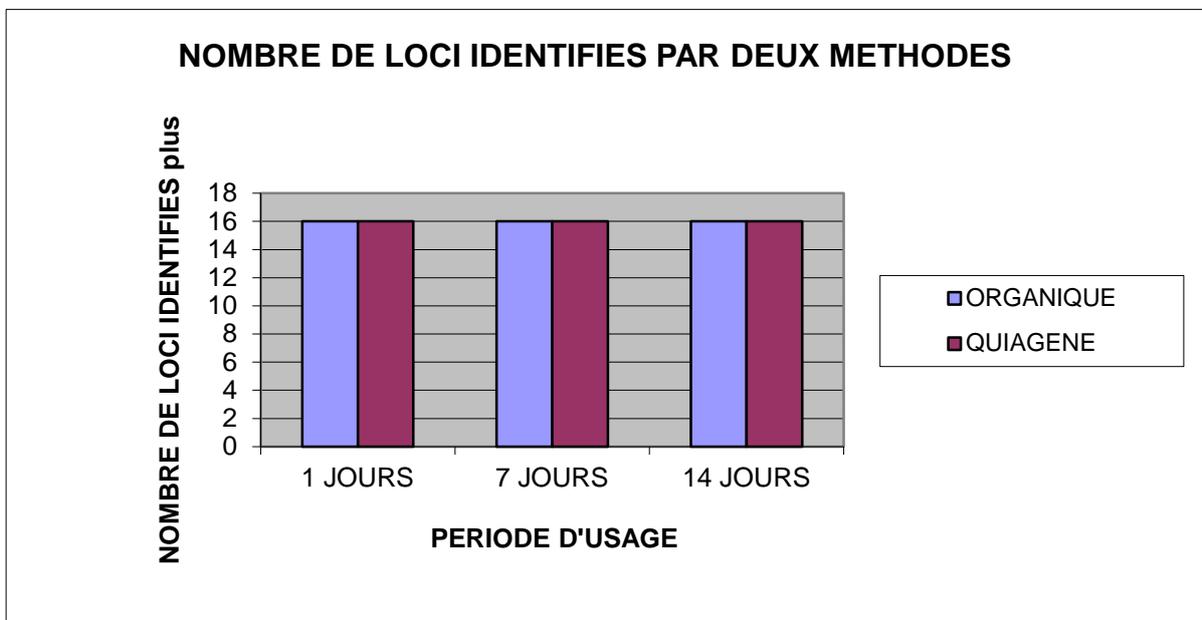
-Les témoins négatif et positif ont donné des résultats conformes.

-Le sexe étant également déterminé au cours du processus d'analyse (locus amélogénine), nous avons pu confirmer que l'échantillon analysé appartenait à un individu du sexe attendu.

Dans l'amplification des STR, on a utilisé deux kit d'amplification; le kit AmpFISTER Identifieler et le kit AmpFISTER Identifieler plus pour chaque échantillon mais nous avons pas retrouvé une différence remarquable entres ces deux kit d'amplifications on à obtenus les même STR avec des profiles identiques bien que le kit d' identifier plus est plus sensible que le kit d'identifier plus c'est à dire il est capable d'amplifier même les petits fragments d'ADN. Voir (**Figure18**) et (**Figure19**).

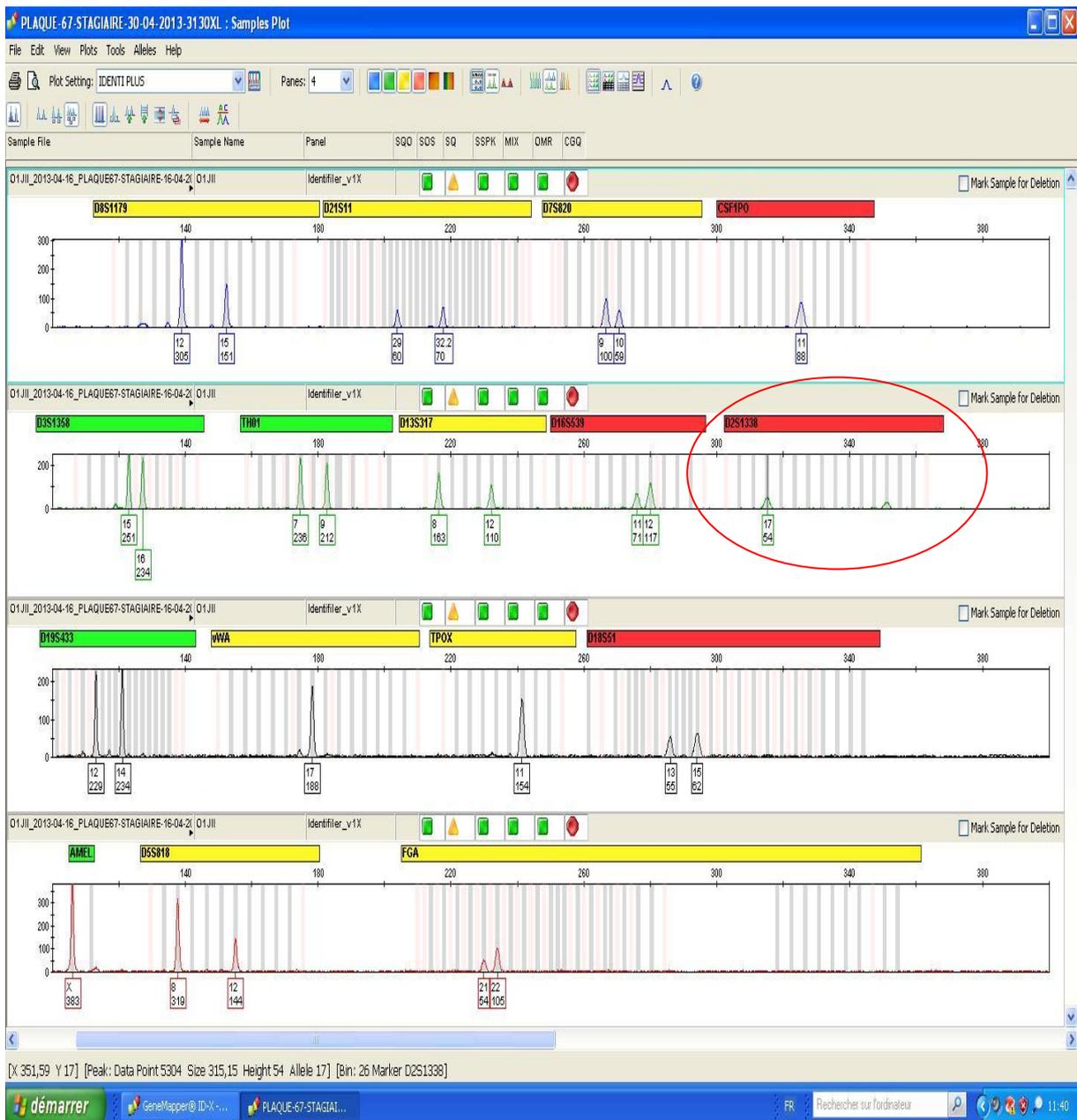


**Figure18:** nombre de loci obtenu par le kit d'amplification Identifier par les deux méthodes d'extractions.



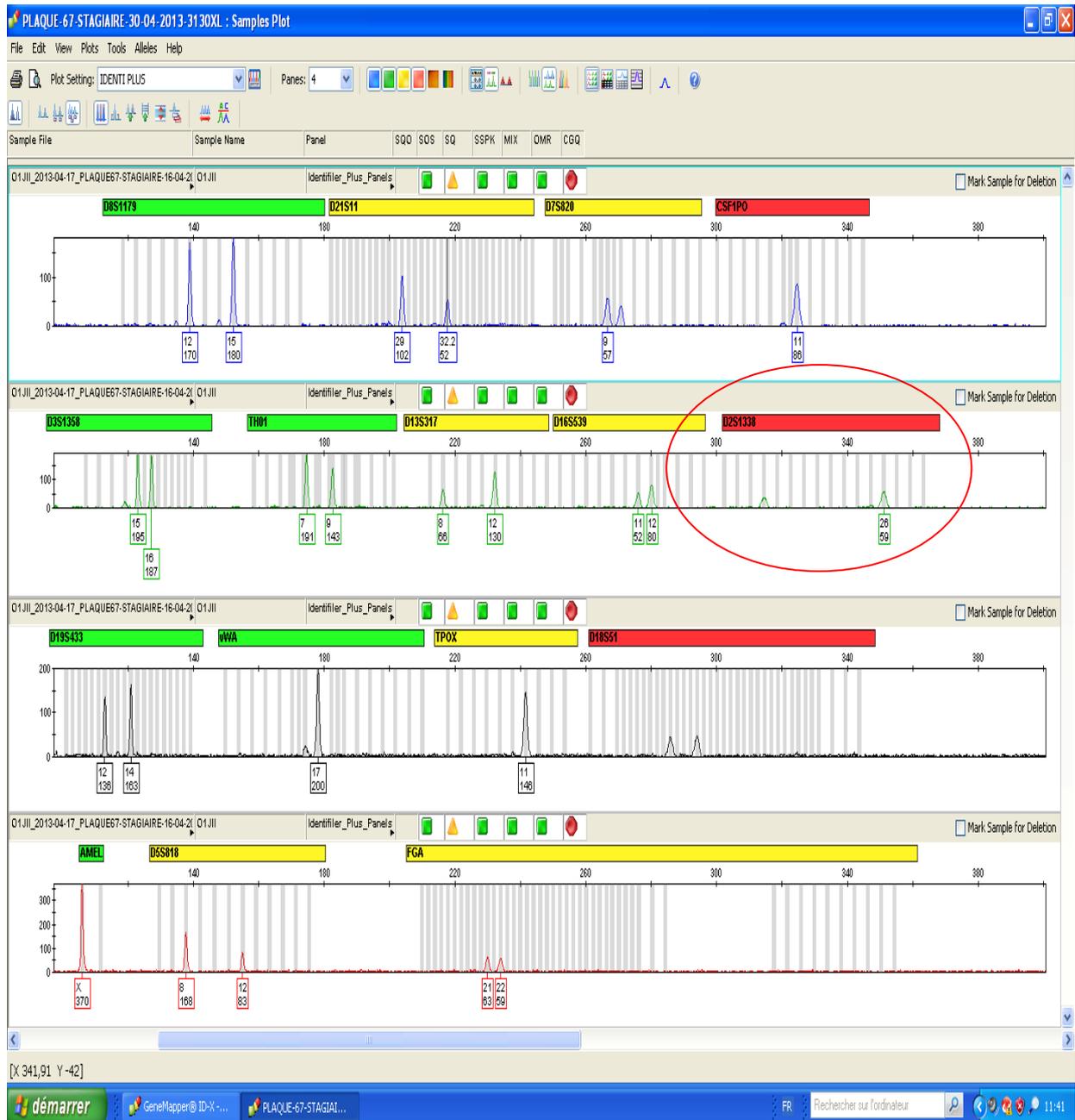
**Figure19:** nombre de loci obtenu par le kit d'amplification Identifier plus par les deux méthodes d'extractions.

Après notre analyse à l'ensemble des STR, nous avons révélé que pour tous les échantillons durant les trois périodes d'usages pour les deux méthodes d'extractions on a eu des profils complets sauf que, dans l'individu II au 1<sup>er</sup> jour avec l'extraction organique plus précisément dans le STR :D2S1338 avec le kit identifier allèle a 17 répétitions (**Figure20**),la première des chose qu'on peut la constater dans notre première observation que l'individu II est homozygote à l'allèle D2S1338.



**Figure 20:** profil de l'individu 2 obtenu par l'extraction organique par le kit identifier.

Et avec le kit de identifier plus on a trouvé un allèle 26 répétitions du même STR aussi qui est: **D2S1338 (Figure21)**.



**Figure 21: profil de l'individu 2 obtenu par l'extraction organique**

Même dans la deuxième observation si on n'avait pas la première, on peut dire aussi que l'individu est homozygote 26 pour le même STR: **D2S1338**.

Mais ce n'est pas le cas, avec la méthode d'extraction Qiagen on pu récupérer les deux allèles **D2S1338** (17 -26) en même profile (**Figure 22**) nous avons constaté un drop out pour deux systèmes.

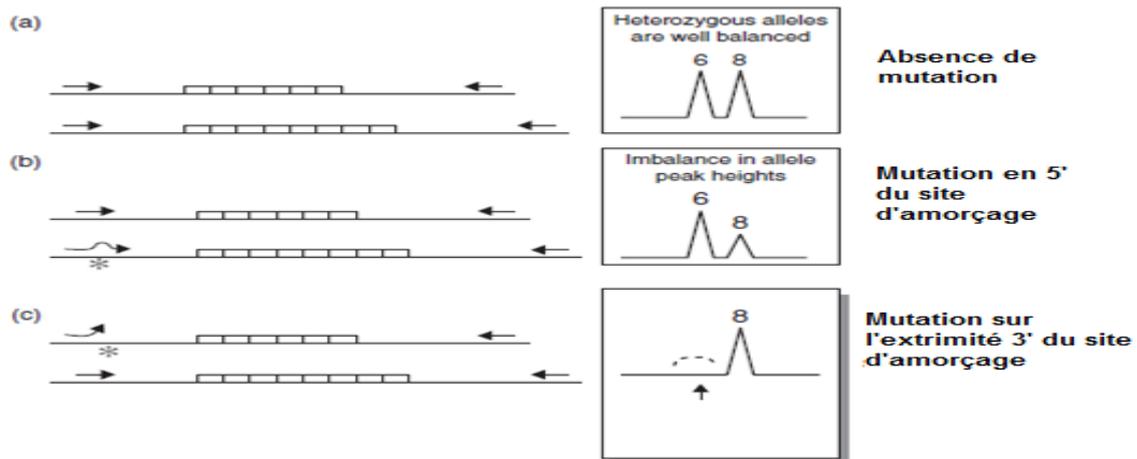


**Figure 22:** profil de l'individu II obtenu par l'extraction Qiagen

**Allèles nul et allèles drop out**

Les allèles nuls sont des allèles non amplifiés par PCR, probablement en raison de la présence d'une mutation dans la zone d'hybridation d'une amorce (**Figure 34**). Les insertions, délétions ou les changements de base à proximité de l'extrémité 3' de la zone d'hybridation des amorces sont les mutations les plus fréquemment décrites comme responsables des absences d'amplifications (Gusmão, L. et al. 2002). Cette non détection d'un allèle peut donner une fausse impression qu'un individu est de type homozygote alors que réellement il est de type hétérozygote pour un marqueurs donné. Les allèles nuls sont très difficile à détecter, mais leur forte prévalence à un locus peut être décelée par un excès d'homozygotie (Balding, D. J. 2005).

Dans les applications médico-légales, les allèles nuls ne posent aucun problème d'interprétation de profil ADN. En effet, pourvu que les amorces utilisées dans les kits multiplexes reste les même, on obtiendra toujours le même profil génétique après de multiples amplifications. Le profil génétique obtenu à partir d'une trace prélevée sur scène de crime sera toujours identique au profil génétique appartenant au suspect à condition que ce dernier soit à l'origine de la trace. Cependant, le phénomène des allèles nuls est particulièrement pervers dans les tests de paternité. Des erreurs exclusions peuvent survenir si l'allèle en commun entre le père et le fils est un allèle nul. Pour minimiser les risques des fausses exclusions dans les cas de recherche de filiation, la parade la plus évidente consiste à compléter le kit multiplexe avec une amorce adéquate pour l'allèle nul. Les amorces des STR sont alors présentes en plusieurs variantes dans le réactif PCR du kit multiplexe. De telles amorces sont dites amorces dégénérées (Coquoz, R. et Taroni, F., 2006). Mais ceci n'est bien sûr une solution que pour les allèles nuls déjà connus.



**Figure 23: Drop out**

Dans la (**figure 23**) illustration de l'effet des mutations au niveau des zones d'amorçage. (a) Les mutations localisées au niveau de l'extrémité 5' et au milieu du site d'amorçage affectent l'efficacité de l'amplification. (b) Par contre les mutations localisées au niveau de l'extrémité 3' du site d'amorçage produisant des allèles nuls (Butler, 2011)

La perte d'hétérozygotie ou allélique "drop out" est également un des artefacts fréquemment rencontré lors de l'analyse de STR sur de l'ADN dégradé et/ou en faible quantité. Cette absence d'amplification pour un seul des deux allèles affecte généralement l'allèle de plus haut poids moléculaire. Cependant dans le cas de l'utilisation de conditions de PCR comprenant un nombre de cycles plus important, l'allèle de plus petite taille peut également être affecté (Balding, D. J. 2005). Ce phénomène est pris en compte lors de l'interprétation des résultats. De nombreux laboratoires de criminalistique développent actuellement des protocoles de validation très vigoureux. Par exemple, Seulement les pics qui dépassent les 150 rfu sont validés comme homozygote dans certains laboratoires car on estime que l'allélique drop out ne peut se produire au-dessus de ce niveau. (Buckleton, J. et al. 2004)

Concernant les deux kits utilisés ID et ID+, Les efficacités et la validité de typage de l'analyse des STR autosomaux ont été évaluées, des résultats similaires ont été obtenus c'est à dire des profils complets interprétables. Ceci confirme la qualité de l'ADN obtenu avec les méthodes d'extraction utilisées, sachant que le kit ID+ commercialisé récemment, est plus sensible et robuste que l'ID et est destiné pour le typage de STR à partir d'échantillons dégradés, présentant des difficultés du fait des altérations subies par les molécules d'ADN

ainsi que des concentrations faibles ce qui a tendance à favoriser l'apparition d'artéfacts d'amplification.

D'où l'efficacité des deux méthodes d'extraction Pour l'inhibition et la dégradation de l'ADN durant cette étude, ces deux facteurs n'ont pas influencé l'ADN, ceci confirme l'efficacité des deux méthodes d'extraction à savoir obtenir de l'ADN purifié, sans inhibiteur, aussi l'ADN cumulé dans les bandes de la brosse à dents reste intacte (non dégradé).

Dans les tableaux suivants l'ensemble des STR est récapitulés en tableau pour chaque individu.

Dans la partie "Matériel et Méthodes" on a dit bien que nos quatre volontaires font partie de la même famille. On a prouvé par conséquent grâce aux analyses de leurs STR un lien de paternité entre "I<sub>1</sub> – I<sub>2</sub>", "I<sub>1</sub>- II<sub>1</sub>" et idem aec "I<sub>2</sub> – II<sub>2</sub>"

Au terme de cette étude nous avons pu montrer qu'à partir d'une faible quantité initiale d'échantillon (avec une quantité de: 0.0125ug/ $\mu$ l) biologique de type salive déposé sur des supports tels que la brosse à dents, l'extraction d'ADN permettait d'obtenir une quantité suffisamment importante pour réaliser avec succès un typage des STRs dans un contexte médico-légale sachant que les brosses à dents sont disposés à la chaleur et l'humidité de la salle de bain qui peuvent aider les germes à se développer.

Nous avons pu au travers de notre mémoire nous insérer dans le cadre d'un aspect extrêmement récent d'une application de la biologie moléculaire dans notre pays: l'identification par empreinte génétique de traces biologiques dans le cadre de l'investigation assignée à la police scientifique

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à explorer des traces biologiques particulières, de la salive déposée sur des supports tels que les brosse à dents.

Sous réserve d'un faible échantillonnage, nous avons été à même de relever certaines observations et des résultats suite aux expériences réalisées, notamment:

L'extraction par kit Qiagen semble donner un meilleur rendement que celui de l'extraction organique et à un temps de réalisation plus court et non toxique.

L'extraction d'ADN par le protocole au Phénol: Chloroforme : Isoamylalcool, bien qu'elle soit toxique pour le manipulateur, semble en revanche donner de bonnes quantités en certains cas, et malgré le fait quelle soit ancienne, reste toujours une méthode très robuste qui concourt les nouvelles méthodes.

L'amplification de marqueurs moléculaires en multiplexage permet un gain de temps et une réduction de coût importants .

Le nombre de bandes utilisés à savoir au nombre de cinq, est l'optimal pour notre étude, en partant de l'idée que la brosse à dents est une pièce à conviction, utilisée en criminalistique, comme question nécessaire pour une identification humaine, par conséquent utiliser un minimum de matériel biologique pour un profil génétique interprétable.

L'optimisation quantitative se présente en deux niveaux : dans le nombre de faisceaux qui est de cinq et avec une quantité minimale de 0.0125ug/ $\mu$ l on a obtenu des profils génétiques complets et interprétables

L'optimisation qualitative est au niveau de la qualité de l'ADN extrait: complet, et non dégradé et leur cumul sur notre pièce à conviction qui est la brosse à dents. Tout ce ci est suffisamment important pour réaliser avec succès un typage des STRs dans un contexte d'empreinte génétique.

- 1) ABI Prism<sup>®</sup> 3130 xl Genetic Analyser User's Manual, 2007.
- 2) Audigié, Cl., Dupont, G., Zonszain, F. (1986) : Principes des méthodes d'analyse biochimiques, édition Doin, P 190.
- 3) AmpFlSTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> PCR Amplification Kit August 2012
- 4) AmpFlSTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification Kit August 2012
- 5) Andrei Semikhodskii (2007). Dealing with DNA Evidence: A Legal Guide. First published by Routledge-Cavendish; 1 edition (February 15, 2007), 200 pages.
- 6) Balding David. J (2005). Weight-of-evidence for Forensic DNA Profiles : Copyright 2005 John Wiley & Sons, 1 edition, 198 pages.
- 7) Bär, W., Brinkmann, B., Budowle, B., Carracedo, A., Gill, P., Lincoln, P., Mayr, W et Olaisen, B. (1997). DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Forensic Sci Int.* 87(3): 181-4.
- 8) Birch, L., David, E et Kolmodin, J. Wong (1996). Simplified hot start PCR. *Nature*, 381(6581): 445-446.
- 9) Brown, T.A (2004) Génomes. Ed. Flammarion.-Butler, M.J., Coble, M.D et Vallone P.M. (2007). STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Sci Med Pathol*, 3 (3): 200-205.
- 10) Butler, J. M., Budowle, B., Gill, P., Kidd, K. K., Phillips, C., Schneider, P. M., Vallone, P. M et Morling, N (2008). Report on ISFG SNP Panel Discussion: Progress in Forensics Genetics. *Genetics Suppl Series*, 1: 471-472.
- 11) Butler, J. M. (2011). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Elsevier Academic Press, San Diego, 1 edition (August 4, 2011), 704 pages.

- 12) Butler, J.M (2005). *Forensic DNA Typing: Biology Technology, and Genetics of STR Markers*. Elsevier Academic Press, New York, 2nd Edition , 688 pages.
- 13) Butler, J.M. (2009). *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. Elsevier, Academic Press; 1 edition (September 3, 2009), San Diego, 520 pages.
- 14) Butler, M.J., Coble, M.D et Vallone P.M. (2007). STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Sci Med Pathol*, 3 (3): 200-205.
- 15) Butler, J. M., Shen, Y et McCord, B. R (2003). The development of reduced size STR amplicons as a tool for the analysis of degraded DNA. *J Forensic Sciences*, 48 (5):1054–1064.
- 16) Buckleton, J., Christopher, M. T et Simon, J.W (2004). *Forensic DNA evidence interpretation*. CRC Press; 1 edition (November 29, 2004), pages 552.
- 17) Cabal Christian (2001). Rapport sur la valeur scientifique de l'utilisation de l'empreinte génétique dans le domaine judiciaire ([www.assemblée-natione.fr](http://www.assemblée-natione.fr)).
- 18) Castella, V., Dimo-Simonin, N., Brandt-Casadevall, C., and Mangin, P. (2006) Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. *Forensic Sci. Int.* 156: 70-73.
- 19) Cécile Manaouil, Annabelle Werbrouck, Émilie Traulle, Alice Cordier, Maxime Gignon, Olivier Jarde ,Service de médecine légale et sociale, CHU d'Amiens, place Victor-Pauchet, 80054 Amiens cedex 1, France *Médecine & droit* Volume 2008, numéro 88, pages 17-23 (janvier-février 2008)
- 20) Coquoz, R. (2003): *Preuve par l'ADN, la génétique au service de la justice*, collection sciences forensiques, 1<sup>ère</sup> édition, presse polytechnique et universitaire romande, Lausanne, 327 P.
- 21) Coquoz, R et Taroni, F (2006). *Preuve par l'ADN - La génétique au service de la justice*. 2ème édition. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 327 pages.
- 22) Daniel, L. H et Elizabeth, W. J (2009). *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. Copyright 2009 bay Jones and Bartlett publishers, Inc.

- 23) De Leo, D., Tagliaro, F., Mashio, S., and Mario, M. (1985) A sensitive and simple assay of saliva on stamps. *Z Rechtsmed.* 95:27-33.
- 24) Denise, T., Chung, B. S., Jiri, D., Kerry, L., Butler, J. M et Bruce, R. M (2004). A Study on the Effects of Degradation and Template Concentration on the Amplification Efficiency of the STR Miniplex Primer Sets. *J Forensic Sci*, 49 (4): 733-740.
- 25) Edwards, A., Civtello, A., Hammond, H.A., and Caskey, C.T. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeat. *Am.J.Hum. Genet.* 49 : 746-756.
- 26) Etienne, J. (1999) : *Biochimie- génétique, biologie moléculaire*, 5<sup>ème</sup> édition : Masson, Paris- Milan- Barcelone, pp 374-375.
- 27) Fridez, F., and Coquoz, R. (1996) PCR DNA typing of stamps: evaluation of the DNA extraction. *Forensic Sci.* 78: 103-110.
- 28) Georges B. Johnson, Jonathan B. Losos, Peter H. Raven, Susan S. Singer, Jonathan B. Losos – 2011.
- 29) Gill, P., Brinkmann, B., d'Aloja, E et Andersen, J (1997). Considerations from the European DNA profiling group (EDNAP) concerning STR nomenclature. *Forensic Sci Int*, 87 (3): 185–192.
- 30) Gill, P et Wilson, I (2001). Application of low copy number DNA profiling. *Croatian Medical Journal*, 42 (29): 229–232.
- 31) Hervé Guénard (2001): *Physiologie humaine*, Édition 3: Wolters Kluwer France, p409
- 32) Goodwin, W., Linacre, A. et Hadi, S (2011). *An Introduction to Forensic Genetics*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 28 juin 2011 - 216 pages.

- 33) Gusmão, L., Alves, C et Costa, S (2002). Point mutations in the flanking regions of the Y-chromosome specific STR's DYS391, DYS437, and DYS438. *Int J Leg Med*, 116 (6) : 322–326.
- 34) Hochmeister, M.N. (1996) A discussion of "PCR DNA typing of stamps: Evaluation of the DNA extraction". *Forensic Sci .Int.*83: 75-77.
- 35) Klug W, Cumming M, Spencer C (2006) in *genetique*, 8<sup>em</sup> edition p587-588.
- 36) Li, H. H., Gyllensten, U. B., Cui, X. F., Saiki, R. K., Erlich, H. A et Arnheim, N (1988). Amplification and analysis of DNA-sequences in single human-sperm and diploid-cells. *Nature*, 335: 414–417.
- 37) Lucie LE BEILLAN et Simon CLEVERS 2007 Université de Rouen.
- 38) Martin, P. D, Schmitter, H et Schneider, P. M (2001, février 15). brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe. *Forensic Sci Int*, 119 (2): 225-31.
- 39) Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G et Erlich, H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp. Quant Biol*, 51(1): 263-73.
- 40) Opel, K. L., Chung, D. T, Drábek, J., Butler. J. M et McCord, B. R (2007). Developmental Validation of Reduced-Size STR Miniplex Primer Sets. *Forensic Sci*, 52 (6):1263-71.
- 41) Pellat B. *Salives et milieu buccal*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Médecine buccale, 28-150- H-10, 2010
- 42) Petkovski, E (2006). Polymorphismes ponctuels de séquence et identification génétique. Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur à Université Louis Pasteur Strasbourg I, 2006:1-114.
- 43) QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook.

- 44) Ricci, U., Sani, I., Klintschar, M., Cerri, N., De Ferrari, F., and Uzielli, M.L.G. (2003) Identification of Forensic Samples by Using an Infrared-based Automatic DNA Sequencer. *Croat. Med. J.* 44:299-305
- 45) Rapley Ralph et Whitehouse David (2007). *Molecular Forensics*. John Wiley & Sons Ltd. 1 edition (May 29, 2007), 258 page.
- 46) Ruitberg, C. M., Reeder, D. J et Butler, J. M (2001). STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Research*, 29 (1): 320–322.
- 47) Saiki, R. K., Gelfand, D. H et Stoffel, S (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science*, 239: 487-491
- 48) Schneider, P.M. (1997) Basic issues in forensic DNA typing. *Forensic Sci. Int.* 88: 17-22.
- 49) Sweet, D., Lorente, M., Valenzuela, A., Lorente, J.A., and Alvarez, J.C. (1996) Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified chelex method. *Forensic Sci Int* 83:167-177.
- 50) Tautz, D (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*, 17(16): 6463-71.
- 51) Weber, J. L et Wong, C (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Hum molec Genet*, 2 (8): 1123-1128.
- 52) Wu, J. S., Lee, C., Wu, C. C et Shiue, Y. L (2004). Primer design using genetic algorithm. *Bioinformatic*, 20 (11): 1710–1717.

### **Site visité:**

-([www.exobio.cnrs.fr](http://www.exobio.cnrs.fr))

-([www.univ-rouen.fr](http://www.univ-rouen.fr)) Site finalisé au 01/02/2007 par Lucie LE BEILLAN et Simon CLEVERS

**Tableau XII : Appareillage et Equipement :**

Le laboratoire de la police scientifique et technique dispose des équipements qui nous permettent de réaliser des empreintes génétiques



**Hôte Telstar AV-100 SEX 53**



**Centrifugeuse de tube Falcon**



**Centrifugeuse Eppendorf mini spin**



**Incubateur agitateur**



**Le 7500 fast real-time PCR system**



**Bloc chauffant Neo LAB**



**Thermocycleur Gene Amp PCR system 9700**



**Séquenceur 3130X Genetic analyzer d'APPLIED BIOSYSTEMS**



**Centrifugeuse de plaques Sigma 3-16 K**



**Vortex Heidol PH reax top**



**Congélateur national LAB**



**Micropipette Brand :**

**100-1000  $\mu$ l**

**20-200  $\mu$ l**

**10-100  $\mu$ l**

**5-50  $\mu$ l**

**2-20  $\mu$ l**



**Phadebas ® Amylase test, 50 comprimés**



**Le kit de la quantification**



**Le kit Identifiler d'amplification des STR**



**Le kit Identifiler plus d'amplification des STR**

**Tableau VII: comparaison dans la composition entre les deux kits amplifications utilisés AmpFISTER Identifier, et AmpFISTER Identifier plus.**

AmpFISTER Identifier	AmpFISTER Identifier plus
<p><b>Reaction Mix:</b> contient MgCl<sub>2</sub>, dATP, dGTP, dCTP, et dTTP, albumine de sérum bovin et 0,05% d'acide de sodium dans un tampon et de sel.</p>	<p><b>Master Mix:</b> contient du MgCl<sub>2</sub>, dATP, dGTP, dCTP, et dTTP, albumine de sérum bovin, de l'enzyme, et 0,05% d'acide de sodium dans un tampon et de sel.</p>
<p><b>Control DNA 9947A:</b> contient 0,1 ng / ADN ul de lignée cellulaire humaine dans 0,05% d'acide de sodium et un tampon. le profil de cet ADN femelle est CSF1PO 10, 12; D2S1338 19, 23; D3S1358 14, 15; D5S818 11, 11; D7S820 10, 11; D8S1179 13, 13; D13S317 11, 11; D16S539 11, 12; D18S51 15, 19; D19S433 14, 15; D21S11 30, 30, FGA 23, 24; TH01 8, 9.3; TPOX 8, 8; VWA 17,18.</p>	<p><b>Control DNA 9947A:</b> contient 0,1 ng / ADN de la lignée cellulaire humaine dans 0,05% d'acide de sodium et un tampon. le profil de cet ADN femelle est CSF1PO 10, 12; D2S1338 19, 23; D3S1358 14, 15; D5S818 11, 11; D7S820 10, 11; D8S1179 13, 13; D13S317 11, 11; D16S539 11, 12; D18S51 15, 19; D19S433 14, 15; D21S11 30, 30, FGA 23, 24; TH01 8, 9.3; TPOX 8, 8; SVA 17, 18.</p>
<p><b>Primer:</b> contient locus spécifique 6-FAM , VIC , NED et PET colorant étiquetés et amorces non marquées dans le tampon. Les amorces amplifient le STR loci CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, VWA, et le Amelogenin marqueur de sexe.</p>	<p><b>Primer:</b> contient locus spécifique 6FAM, VIC, NED et PET marqué par un colorant et amorces non marquées dans le tampon. Les amorces amplifient le STR loci CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, VWA, et le Amelogenin marqueur de sexe.</p>
<p><b>Allelic Ladder:</b> Contient les allèles amplifiés suivants:</p> <p>6-FAM (bleu): D8S1179 8–19; D21S11 24, 24.2, 25–28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36–38; D7S820 6–15; CSF1PO 6–15.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• VIC (vert): D3S1358 12–19; TH01 4–9, 9.3, 10, 11, 13.3; D13S317 8–15; D16S539 5, 8–15; D2S1338 15–28.</li> <li>• NED (jaune): D19S433 9–12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2; vWA 11–24;</li> </ul>	<p><b>Allelic Ladder:</b> Contient les allèles amplifiés suivants:</p> <p>6-FAM (bleu): D8S1179 8–19; D21S11 24, 24.2, 25–28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36–38; D7S820 6–15; CSF1PO 6–15.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• VIC (vert): D3S1358 12–19; TH01 4–9, 9.3, 10, 11, 13.3; D13S317 8–15; D16S539 5, 8–15; D2S1338 15–28.</li> <li>• NED (jaune): D19S433 9–12, 12.2, 13, 13.2, 14,</li> </ul>

TPOX 6–13; D18S51 7, 9, 10, 10.2, 11–13, 13.2, 14, 14.2, 15–27.  • PET (rouge): Amelogenin X, Y; D5S818 7–16; FGA 17–26, 26.2, 27–30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2.	14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2; vWA 11–24; TPOX 6–13; D18S51 7, 9, 10, 10.2, 11–13, 13.2, 14, 14.2, 15–27.  • PET (rouge): Amelogenin X, Y; D5S818 7–16; FGA 17–26, 26.2, 27–30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2.
<b>ADN Polymerase.</b>	-

**Tableau VIII: Loci amplifiés et fluorochromes utilisés par le kit AmpFISTR Identifier et AmpFISTR Identifier plus (AmpFISTR® Identifier™ Kit User's guide)**

Locus	Localisation chromosomique	Allèles inclus dans l'Identifier Allelic Ladder.	Fluorochrome	DNA control 9947A
D8S1179	8	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM	13
D21S11	21q11.2-q21	24,24.2,25,26,27,28.2,29,29.2, 30,30.2,31,31.2,32,32.2,33,33.2,34,34.2,35,35.2,36,37,38		30
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,15		10,11
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,15		10,12
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,19	VIC	14,15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9,9.3, 10, 11,13.3		8,9.3
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,15		11
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,15		11,12
D2S1338	2q35-37.1	15,16,17,18,19,20,21,22,23,24, 25,26,27,28		19,23
D19S433	19q12-13.1	9,10,11,12,12.2,13,13.2,14,14.2,15,15.2,16,16.2,17,17.2		NED
VWA	12p12-Pter	11,12,13,14,15,16,17,18,19,20, 21,22,23,24		14,15

TPOX	2p23-2pter	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,13		17,18
D18S51	18q21.3	7,9,10,10.2,11,12,13,13.2,14,14.2,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27		15,19
Amelogénine	X : p22.1-22.3 Y : p11.2	X, Y	PET	X
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,16		11
FGA	4q28	17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,26.2,27,28,29,30,30.2,31.2,32.2,33.2,42.2,43.2,44.2,45.2,46.2,47.2,48.2,50.2,51.2		23,24

**Tableau IX: Les paramètres de migration sur ABI PRISM® 3130 xl.**

Paramètre	Module de contrôle
Injection voltage	10 KV
Injection time	3 s
oven_temperature	60°
Run_voltage	15 KV
Run time	1200 S
Pre-run voltage	15 KV
Pre-run time	60 S
Data delay	200 S

**Tableau X: Conditions de cycle pour cycleur thermique 7500 Fast.**

Étape	Temps-Durée	Commentaire
Activation Initiale de la PCR	95°- 10'	la PCR exige une incubation initiale afin d'activer l'ADN Polymerase
<b>Cycle à deux étapes</b>		

Dénaturation cycles fluorescence Hybridation/élongation	40	95°-15''  60°-1	recueillir les données de
---	----	-----------------------	---------------------------

**Tableau XI: Recommandations générale pour la conception des amorces PCR (Butler, 2009).**

Paramètres	Valeurs optimales
Taille des amorces	18-30 bases
Température de fusion des amorces (T <sub>m</sub> )	55-72°C
Pourcentage de GC	40-60%
Structures en boucle des amorces	≤3 bases contiguës
Structures secondaires des amorces	≤ 3 bases contiguës
Distance entre deux amorces sur la séquence cible	<2000 bases
Différence de T <sub>m</sub> entre les amorces forward et reverse	≤ 5°C
Séquence oligonucléotidique unique	Blast

ABI Prism<sup>®</sup> 3130 xl Genetic Analyser User's Manua, 2007; GeneMapper<sup>®</sup> ID-X Software Version 1.0 Getting Started Guide, 2007)

**Tampon d'extraction:**

- 5ml de Tris HCl 1M pH= 8.
- 10ml d'EDTA 0.5 M pH= 8.
- 10ml de NaCl 5M.
- 100 ml de SDS à 10%.
- 375 ml d'eau pure autoclavée.

# INTRODUCTION

CHAPITRE I :

# BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE II :

# MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE III :

# RESULTATS ET DISCUSSION

**CONCLUSION**

# ANNEXES

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Pour l'I1 (Père):

D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	THO1	D13S317	D16S539	D2S1338
15	29 - 30	11 - 13	10	11 - 15	7 - 9	10 - 12	10 - 13	18 - 20
D19S433	VWA	TPOX	D18S51	Amel	D5S818	FGA		
13	16 - 18	8	17 - 18	XY	12	20 - 22		

-Pour l'I2 (Maman):

D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	THO1	D13S317	D16S539	D2S1338
12 - 15	29 - 32.2	9 - 10	11	15 - 16	7 - 9	8 - 12	11 - 12	17 - 26
D19S433	VWA	TPOX	D18S51	Amel	D5S818	FGA		
12-14	17	11	13-15	XX	8-12	21- 22		

-Pour l'I1 (Fille):

D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	THO1	D13S317	D16S539	D2S1338
15	29 - 30	9 - 11	10 - 11	11 - 16	9	12	10 - 12	20 - 26
D19S433	VWA	TPOX	D18S51	Amel	D5S818	FGA		
12 - 13	16 - 17	8 - 11	15 -17	XX	8 - 12	22		

-Pour l'I2 (Fils):

D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	THO1	D13S317	D16S539	D2S1338
15	29- 23.2	9 - 11	10 - 11	11- 16	7- 9 7- 9	10 - 12	12 - 13	17 - 18
D19S433	VWA	TPOX	D18S51	Amel	D5S818	FGA		
13 - 14	17 - 18	8 - 11	13 - 18	XY	12	21 - 22		