

MINISTÈRE D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB - BLIDA 1

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

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

Filière : Biologie

Option : Génétique et physiologie

Présenté par :

DRAA Chemseddine

Le : 16 octobre 2014

# Etablissement d'une empreinte génétique à partir d'une tache de sang sur tissus textiles

Soutenu devant le jury:

- Mr BESSAD A.	MCB	USDB	Président
- Mme GUESSAIBIA N.	MCB	USDB	Promotrice
- Mr MOHAMED SAID R.	MAA	USDB	Examinateur
- Mme BRADEA MS.	MCA	USDB	Examinatrice

Promotion: 2013 - 2014

# Remerciements

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon Directeur de mémoire Madame **Guessaibia Nadia**. Je la remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.*

*J'adresse mes sincères remerciements à tous les experts, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté à me rencontrer et répondre à mes questions durant mes recherches.*

*Je remercie monsieur le **directeur General-Major** du CRD Blida qui m'a autorisé d'effectuer mon stage pratique au niveau de laboratoire ADN de L'INCC, Ainsi le **Colonel Sofiane** pour son soutien et encouragement durant mon cursus universitaire.*

*Je remercie monsieur **Mohamed Saïd**, le chef d'option de génétique et physiologie pour sa confiance en moi et ces efforts, ainsi, mes enseignants : **Amokrane, Anane, Bassad, Ben Azzouz, Bradea, Harket** et les autres.*

*Je remercie aussi monsieur le **directeur** de l'institut national de criminalistique et criminologie et les experts de laboratoire ADN qui ont travaillé avec moi comme un ami et un frère.*

*Je remercie mes très chers parents, **AMMAR et YASSINA**, qui ont toujours été là pour moi, « Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fier ».*

*Je remercie spécialement ma très chère femme qui m'a soutenu et encourager surtout dans les moments délicats et pour sa fidélité et gentillesse, et je la souhaite une vie pleine de joie et de prospérité.*

*Un grand remercie pour ma petite fleur **ALAA ERAHMANNE** qui m'a donné plus d'espoir et de courage pour contrecarré mes difficultés et obstacles durant ma vie et je la souhaite une long vie heureuse avec une bonne santé.*

*Je remercie mon frère **Okba**, mes sœur et leur conjoints ; **Sofiane, Abdelkrim et Mhamedet** les petits oiseaux **Iyedet Asmaainssi** la famille **MESAST** ; **Bounouar, Halima, Tarek et Moustafa**, et toute la famille.*

*Je remercie spécialement **MESAST Sakina** pour sa générosité et gentillesse ainssi son soutien moral qui sera toujours dans mon cœur. Ainssi, mon grand père ; **SAID** et ma grand mère **ZGHOUDA** et toute ma famille*

*Enfin, je remercie tous mes Ami(e)s que j'aime tant, **Riad, Habib, Adel, Tarek et Rochdiet** tous mes collègue de travail pour leur sincère amitié et confiance, et à qui je dois ma reconnaissance et mon attachement.*

*À tous ces intervenants, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.*



## Résumé

Au cours de ces dernières années, les analyses ADN utilisées par la justice ont connu de nombreux développements : réduction du nombre des cellules nécessaires à l'analyse, méthodes d'extraction et de purification plus efficaces, méthodes de génotypage plus rapides. Ces analyses permettent aujourd'hui d'identifier rapidement un corps, une tache de sang, de sperme, de cellules épithéliales par comparaison avec des résultats issus d'une famille. Ces analyses sont effectuées uniquement dans le cadre d'une mission judiciaire

Dans cette étude, le sang séché sur six tissus textiles différents, à savoir, le coton, le coton d'écouvillons, le nylon, la laine, l'acrylique et polyester ont été testés pour évaluer le tissu le plus rentable et le meilleure en terme de récupération d'une quantité suffisante d'ADN afin d'avoir des profils interprétables.

Elle consiste à utiliser le kit AmpFISTR Identifier plus à partir de 2 à 3 mm carré de tache de sang sur chaque tissu, dont nous avons prélevé 18 échantillons y compris un témoin négatif et deux échantillons qui sont amplifiés avec succès pour chaque tissu.

Des profils complets ont été obtenus à partir de la tache de sang sur les six tissus ; coton, nylon, la laine, acrylique et polystère. En revanche pas de profil pour tous les tissus des témoins négatifs (ne contient pas de sang). Tous ces résultats sont réalisés grâce à la technique de quantification d'ADN qui nous a permis de mesurer la quantité d'ADN de chaque extractum, l'amplification d'ADN qui sert pour le dédoublement des fragments d'ADN d'intérêts et dernièrement ; La séparation des STR dans un séquenceur à 16 capillaire 3130 xl ABI avec le logiciel de Gène – Mapper.

**Mots clés :** Profils ADN, Identifier plus, quantification, extractum, amplification, séquences répétées en tandem.

## Abstract

In recent years, DNA profiling has been used regularly by the justice system, and has seen a number of improvements, with the need for fewer cells, more efficient DNA extraction and purification, and more rapid genotyping. These methods can now identify an individual more rapidly, from a corpse, blood stain, sperm or epithelial cells, by comparison with familial profiles. In France, DNA profiling can only be ordered by a judge.

In this study, the dried blood on six different textile fabrics, namely, cotton, cotton swabs, nylon, wool, acrylic and polyester were tested to evaluate the most cost effective and most improved tissue in terms of recovery of a sufficient amount of DNA to be interpretable profiles.

It consists in using the AmpFI STR Identifier plus kit from 2 to 3 mm square spot of blood on each tissue, we collected 18 samples including negative control, and two samples that successfully amplified for each tissue.

Complete profiles, were obtained from the blood stain on the six tissues; cotton, nylon, wool, acrylic + polystère. However, no profile for all tissues of the negative control (contains no blood). All these results are achieved through the quantification technique of DNA that allowed us to measure the amount of DNA in each extractum, DNA amplification used for the duplication of the DNA fragments of interest and recently; The separation of STR in a capillary sequencer 3130 xl with ABI software Gene - Mapper.

**Keywords:** DNA profiles, Identifier plus, quantification, extractum, amplification, short tandem repeat.

## ملخص

عرفت في السنوات الأخيرة عدة تطورات فيما يخص عملية تحليل الحمض النووي خصوصا فيما يتعلق بتقليل عدد الخلايا اللازمة لعملية التحليل، كذلك بالنسبة لطرق استخلاص وتنقية الحمض النووي الأكثر فعالية، وطرق تحديد البصمة أكثر سرعة. هاته التحاليل سمحت لنا اليوم من تحديد و بسرعة جثة بقعة دم حيوان منوي و خلايا طلائية من خلال إجراء مقارنة للنتائج مع نتائج العائلة. هاته التحاليل تجرى في إطار مهمة قانونية فقط.

في هذه الدراسة، تم اختبار الدم المجفف على ستة أقمشة مختلفة، وهي القطن، ومسحات القطن، والنايلون، والصوف، والأكريليك ، والبوليستر لتقييم فعالية القماش من حيث نسبة استرداد كمية كافية من الحمض النووي للحصول على بصمة وراثية واضحة. عملية التحليل هذه تتطلب استعمال اثنان إلى ثلاثة ملم مربع من كل قطعة قماش، أين نأخذ 18 عينة بما فيها شاهد واحد لا يحتوي على بقعة دم، وعينتان أين تم تكثيرهما بنجاح. بواسطة (Identifiler plus).

تم الحصول على بصمات وراثية انطلاقا من بقعة الدم فوق الستة أنواع من القماش المستعمل، قطن، نيلون، صوف، اكريليك وبوليستر. في المقابل ولا بصمة وراثية بالنسبة للقماش الذي ليس به دم. كل هته النتائج تم الحصول عليها بواسطة تقنية قياس الحمض النووي لكل عينة مستخلصة، بالإضافة لتقنية تكثير الحمض النووي، وأخيرا تقنية استخراج البصمة الوراثية باستعمال جهاز الفصل لقطع الحمض النووي (يعتمد على الخاصية الشعرية) ABI 3130 x I يرافقه البرنامج (Gene – Mapper).

كلمات البحث: البصمة الوراثية، الحمض النووي، تحديد كمية الحمض النووي، استخلاص الحمض النووي، تكثير الحمض النووي، استخراج البصمة الوراثية.

## La liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Principales dates de développement de l'analyse ADN en pratique judiciaire.....	04
<b>Tableau II :</b> Listes des loci analysés sur l'ADN autosomal.....	07
<b>Tableau III :</b> Echantillons biologiques et leur utilisation en vue d'isoler et d'analyser l'ADN. (Annexe).	
<b>Tableau IV :</b> La nature et la source des 06 tissus textiles.....	18
<b>Tableau V :</b> Réactifs et solution de la quantification d'ADN.....	25
<b>Tableau VI :</b> La dilution des standards de la quantification d'ADN.....	30
<b>Tableau VII :</b> Calcul du volume total à pipeter dans la plaque optique de 96 puits.....	32
<b>Tableau VIII :</b> Les composants du Kit Identifier plus et ses fluorochromes.....	34
<b>Tableau IX :</b> Préparation du Mix du pré – amplification.....	35
<b>Tableau X :</b> Préparation du Mix de post- PCR.....	38
<b>Tableau XI :</b> Résultats des quantités d'ADN des échantillons de la quantification.....	46
<b>Tableau XII :</b> Quantités d'ADN des échantillons de la quantification après les dilutions.....	47
<b>Tableau XIII :</b> Les marqueurs de profil ADN du manteau 2.....	58
<b>Tableau XIV :</b> Les marqueurs de profil ADN du chemisier 1.....	59
<b>Tableau XV :</b> Les marqueurs de profil ADN De jean 2.....	59
<b>Tableau XVI :</b> Les marqueurs de profil ADN du tapis de voiture 1.....	60
<b>Tableau XVII :</b> Les marqueurs de profil ADN du tricot de peau 2.....	60

## La liste des figures :

<b>Figure 1 :</b> Schéma d'un microsatellite.....	06
<b>Figure 2 :</b> Analyse des SNPs dans la détermination des traits physique d'une personne.....	09
<b>Figure 3 :</b> Du sang sur une scène de crime, vu grâce au luminol.....	15
<b>Figure 4 :</b> Répartition des 18 prélèvements dans des tubes eppendorf de 02 ml.....	21
<b>Figure 5 :</b> Répartition des 18 échantillons d'étude dans un portoir.....	24
<b>Figure 6 :</b> Evolution de la quantité d'amplicons en fonction du nombre de cycles de PCR présenté en échelle linéaire.....	27
<b>Figure 7 :</b> Les acteurs de la polymérisation de la sonde Taq Man.....	28
<b>Figure 8 :</b> La polymérisation.....	28
<b>Figure 9 :</b> L'élongation.....	29
<b>Figure 10 :</b> Le clivage.....	29
<b>Figure 11 :</b> L'achèvement de la polymérisation.....	29
<b>Figure 12 :</b> Configuration de la plaque optique de 96 puits.....	31
<b>Figure 13 :</b> Configuration de la plaque 96 puits du thermocycleur 9700 ABI.....	36
<b>Figure 14 :</b> Protocole de travail de thermocycleur 9700 ABI.....	37
<b>Figure15 :</b> Configuration de la plaque 96 puits du séquenceur 3130 xl .....	39
<b>Figure 16 :</b> Déroulement de l'électrophorèse capillaire.....	40
<b>Figure 17 :</b> Protocole de travail du logiciel de thermocycleur 7500 ABI.....	44
<b>Figure 18 :</b> La courbe des standards.....	45
<b>Figure 19 :</b> Profil ADN de (jean -).....	48

<b>Figure 20</b> :Profil ADN de sang sur tissu de jean 1.....	49
<b>Figure 21</b> :Profil ADN de sang sur tissu de jean 2.....	50
<b>Figure 22</b> :Profil ADN de sang sur tissu du tricot de peau 2.....	51
<b>Figure 23</b> :Profil ADN de sang sur tissu du manteau 2.....	52
<b>Figure 24</b> :Profil ADN de sang sur tissu du tapis de voiture 1.....	53
<b>Figure 25</b> :Profil ADN de sang sur tissu du chemisier 1.....	54
<b>Figure 26</b> :Profil génétique du contrôle positif, obtenu après réalisation de la co amplification des 15 loci STRs, ainsi que du locus amélogénine (inclus dans le kit AmpFI STR Identifiler plus <sup>®</sup> ).....	55
<b>Figure 27</b> :Profil génétique du témoin négatif, obtenu après réalisation de la co- amplification des 15 loci STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFI STR Identifiler plus <sup>®</sup> ).....	56
<b>Figure 28</b> :Profil génétique d'allelic ladder du kit AmpFI STR Identifiler plus <sup>®</sup> .....	57
<b>Figure 29</b> : La courbe des standards et cycles d'amplification de la quantification d'ADN.....	62
<b>Figure 30</b> : Profils d'ADN des loci vert, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539 et D2S1338 par le Kit Amp FI STR Identifiler pour (de haut en bas) acrylique, le coton, le nylon, le polyester, la rayonne et la laine.....	69

## **La liste des abréviations :**

**ADN** : Acide Désoxy Ribonucléique

**ARN** : Acide Ribo Nucléique

**ARNm** : Acide Ribo Nucléique messenger

**UV** : Ultras Violet

**STR** : Short Tandem Repeat

**SNP** : Single Nucléotide Polymorphisme

**Pb** : Paire de base

**Kpb** : Kilo paire de base

**P** : Probabilité

**ng** : nano gramme

**PK** : Protéinase K

**rpm** : rotation par minute

**IPC** :Internal PCR Control

**rt-PCR** : reel time-Polymérase Chaine Réaction

**MGB** : Minor Groove Binder

**NFQ** : Non Fluorescent Quencher

**P** Polymérisation

**R** Reporter

**ul** : Microlitre

**Ct** : threshold Cycle

**CCD** : Charge Coupled Device

**FBI** : Federal Bureau of Investigation

**RFU** : Relative Fluorescence Unit

**POP 4** : Performance Optimized Polymer 4

**ABI** : Applied Biosystems

## **Glossaire :**

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

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

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

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

**Amplicon :** Fragment d'ADN amplifié.

**L'électrophorèse capillaire :** Techniques de séparation de l'ADN qui utilisent des capillaires de silice (ou de tubes étroits) contenant une solution de polymère, à travers laquelle les molécules d'ADN chargées négativement migrent sous l'influence d'un champ électrique à haute tension.

**CODIS :** Acronyme pour Combined DNA Index System. Une collection de bases de données de profils d'ADN d'intérêt médico-légal. Les cotisations sont versées par les laboratoires agréés et les données sont conservées par le FBI.

**Seuil de cycle (Ct) :** Nombre de cycle (en PCR en temps réel) à laquelle la fluorescence générée dans une réaction dépasse largement le seuil défini. Le seuil est défini arbitrairement par le fabricant afin de refléter le point au cours de la réaction à laquelle un nombre suffisant d'amplicons ont accumulé.

**Inhibiteurs :** Une substance qui empêche ou interfère avec la réaction de polymérase en chaîne.

**Standard de taille :** Fragments d'ADN spécifiques de tailles connues qui sont définis et utilisés à des fragments inconnus de taille.

**Primer :** Un segment d'ADN ou d'ARN qui est complémentaire d'une séquence d'ADN donnée et qui est nécessaire pour initier la réplication par une ADN polymérase.

**Protéinase K :** Une protéase endolytique qui clive les liaisons peptidiques au niveau des côtés de carboxyliques aliphatiques, aromatiques, ou des acides aminés hydrophobes. La protéinase K dans le tampon d'extraction inactiver les nucléases et aide à la lyse des globules blancs pour libérer l'ADN nucléaire.

**Unité de fluorescence relative (RFU) :** Une unité de mesure utilisée dans l'électrophorèse des procédés utilisant la détection par fluorescence. La fluorescence est détectée sur la matrice CCD comme les fragments marqués, séparés dans le capillaire par électrophorèse, et excité par le laser, faire passer la fenêtre de détection. Le logiciel interprète les résultats, calcul de la taille ou de la quantité de fragments de l'intensité de fluorescence à chaque point de données.

**Single Nucleotide Polymorphism (SNP) :** Variations de séquence d'ADN qui se produisent quand un seul nucléotide (A, T, C ou G) dans la séquence du génome est modifié.

**Taq polymérase :** ADN polymérase thermostable isolée à partir de la bactérie *Thermusaquaticus*, utilisée dans la PCR.

**SNAP – SHOT :** Le système SNAPshot® Multiplex est une méthode basée sur l'extension de l'amorce, mis au point pour l'analyse de polymorphismes d'un seul nucléotidiques (SNP)

## **Sommaire :**

<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>
<b>Chapitre I : Recherche bibliographique</b>	
<b>I. L'ADN, molécule-clé des sciences médico-légales.....</b>	<b>03</b>
<b>I.1. Historique.....</b>	<b>03</b>
<b>I.2. Génome humain.....</b>	<b>04</b>
<b>I.3. Polymorphismes de l'ADN.....</b>	<b>05</b>
<b>II. Empreinte génétique (profil ADN).....</b>	<b>10</b>
<b>II.1. Définition.....</b>	<b>10</b>
<b>II.2. Applications.....</b>	<b>10</b>
<b>II.3. Evolution scientifique.....</b>	<b>11</b>
<b>III. Traces biologiques et problèmes spécifiques.....</b>	<b>12</b>
<b>IV. Les indices biologique et sources potentielles d'ADN.....</b>	<b>13</b>
<b>IV.1 Les indices biologiques.....</b>	<b>13</b>
<b>IV.2 Identification des traces biologiques sur une scène de crime ou délictuelle.....</b>	<b>13</b>
<b>V. Le sang comme source d'analyse d'ADN.....</b>	<b>14</b>
<b>V.1. Définition.....</b>	<b>14</b>
<b>V.2. Composition du sang.....</b>	<b>14</b>
<b>V.3. Mettre en évidence des taches de sang.....</b>	<b>14</b>
<b>VI. L'utilité d'une base de données génétique nationale.....</b>	<b>15</b>
<b>VII. Séparation et visualisation du profil d'ADN.....</b>	<b>16</b>
<b>VIII. Génotypage des STRs.....</b>	<b>16</b>
 <b>Chapitre II : Matériel et méthodes</b>	
<b>I- Matériel.....</b>	<b>18</b>
<b>I-a. Echantillonnage.....</b>	<b>18</b>

<b>I-1 Etape de préparation et la mise en tube des échantillons.....</b>	<b>18</b>
<b>II- Etape d'extraction d'ADN nucléaire.....</b>	<b>21</b>
II-1.Réactifs et solutions.....	22
II-2.Matériel et équipement.....	22
II-3.Protocole de travail.....	22
II- 4.Méthode.....	24
<b>III- Etape de quantification d'ADN.....</b>	<b>25</b>
III-1. Réactifs et solutions.....	25
III-2.Matériel et équipements.....	25
III-3.Méthode.....	26
III-4.Protocole de travail.....	30
<b>IV- Etape de pré-amplification d'ADN.....</b>	<b>33</b>
IV-1.Réactifs et solutions.....	33
IV-2.Matériel et équipements.....	34
IV-3.Méthode.....	34
<b>V- Etape de post – PCR.....</b>	<b>37</b>
V-1.Réactifs et solutions.....	37
V-2. Matériel et équipements.....	38
V-3.Méthode.....	38

### **Chapitre III : résultats et interprétations**

<b>I- Résultats de la quantification.....</b>	<b>44</b>
I-1. Protocole de travail.....	44
I-2.La courbe des standards.....	45
<b>II- Résultats de profilage d'ADN par les STR.....</b>	<b>48</b>
<b>III- Interprétation des résultats du profilage des STR.....</b>	<b>58</b>

### **Chapitre IV : Discussion**

<b>I. Discussion de la quantification.....</b>	<b>62</b>
<b>II. Discussion de profilage d'ADN.....</b>	<b>66</b>

<b>II.1. Partie1.....</b>	<b>66</b>
<b>II.2. Partie 2.....</b>	<b>68</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>72</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexe</b>	

# Introduction

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

En criminalistique, les traces biologiques exploitables correspondent à des substances issues des êtres vivants, échangées ou laissées sur une scène de crime, qui seront analysées au laboratoire de génétique forensique.

Cette analyse est considérée comme l'outil de base de La criminalistique qui se distingue de la criminologie par son objet plus précis que celui de l'étude des causes et des manifestations du phénomène criminel. Elle s'intéresse à la recherche et l'exploitation des traces et indices matérielles dans le but d'établir la preuve d'une infraction visée dans le code pénal et d'identifier son auteur.

Les techniques d'analyse en cours de développement facilitent le respect de normes et conviennent mieux aux analyses de routine des échantillons de scène de crime, souvent obtenus dans le cadre d'infractions très courantes. Le nombre croissant de profils d'ADN envoyés pour comparaison a nécessité la création de bases de données génétiques permettant une recherche de correspondances et une gestion des données efficaces et précises. **(Police scientifique, 2012)**.

Ces profils d'ADN peuvent jouer un rôle déterminant dans la résolution d'affaires criminelles dans la mesure où ils permettent potentiellement d'établir des liens entre une série d'infractions et/ou le profil d'un suspect établi à partir de traces relevées sur des lieux d'infractions. Tout aussi important, l'ADN peut par ailleurs aider à prouver l'innocence d'un suspect.

Pour obtenir des profils d'ADN à comparer, la première étape consiste à recueillir d'une part des échantillons provenant de traces relevées sur les lieux d'infractions, et d'autre part des échantillons de référence provenant de suspects – généralement des prélèvements de sang, de cheveux ou de fluides corporels. Les

progrès qu'ont connus les techniques dans ce domaine permettent désormais d'obtenir des résultats avec des quantités d'ADN de plus en plus faibles. Par la mise en œuvre de méthodes scientifiques, l'échantillon est analysé et un profil est établi, qui peut être comparé avec d'autres enregistrés dans une base de données.

Le travail que nous avons réalisé au sein du laboratoire d'analyse ADN, dans l'institut de criminologie et de criminalistique de la gendarmerie nationale algérienne, Consiste à l'établissement des profils génétiques à partir des taches de sang déposées sur plusieurs types de tissus textiles, nous avons choisi six types de tissus : un jean bleu (coton solide), un manteau marron (la laine), un tapis de voiture (nylon), un chemisier (polystère), un tricot de peau (coton), et dernièrement c'est un écouvillon qui contient du coton pour prélever les liquides biologiques.

Nous avons choisi ces tissus car ils sont les plus répandus sur les scènes de crime, donc notre but d'étude est dirigé vers une étude comparative entre les profils ADN obtenus à partir d'une tache de sang sur 06 tissus textiles. Cela se traduit par la qualité des pics qui représentent les profils ADN issus de 06 tissus différents à partir d'une tache de sang humain sachant que le sang prélevé vient de la même personne durant toute l'étude.

En conclusion, nous ciblons dans cette étude, le tissu le plus rentable en termes de qualité des profils et le plus résistant aux inhibiteurs conduisant à des profils interprétables, et en contre partie le tissu le moins rentable. Sachant que les six tissus sont soumis aux mêmes conditions environnementales (température, humidité, pression et pollution) dans la nature après les avoir décontaminés sous UV dans un CROSS LINKER pendant 04 minutes.

# **Chapitre I : Recherche bibliographiques**

## **I. L'ADN, molécule-clé des sciences médico-légales :**

### **I.1. Historique :**

En 1985, Sir Alec Jeffreys démontra que l'ADN contenait des séquences qui se répétaient, et surtout, ce nombre de répétitions variait d'une personne à l'autre en étant transmis par voie héréditaire aux enfants. Cette découverte fut appliquée dès 1986 sur des prélèvements effectués sur deux scènes de crime. Les résultats obtenus furent alors comparés à un suspect, et celui-ci fut exclu (**Jeffreys et al, 1985**). Après une étude sur des prélèvements effectués sur tous les hommes de la région, un profil identique à celui retrouvé sur la scène criminelle fut identifié.

L'analyse ADN est appelée alors DNA fingerprint ou Empreinte génétique. Ce premier cas illustre bien l'intérêt de l'ADN en pratique judiciaire : exclusion d'un suspect, puis inclusion d'une autre personne (**Jeffreys et al, 1985**).

Cette même année, une découverte majeure faite par K. Mullis, la PCR (Polymerase Chain Reaction), permit de développer cette analyse. La PCR permettait d'augmenter de façon considérable la quantité d'ADN analysée à partir de prélèvement contenant peu de matériel génétique grâce aux propriétés des DNA polymérase thermostables. Aussi la PCR se développa très rapidement dans les laboratoires européens et américains (tableau n° I), pour supplanter les méthodes de restriction (**Saiki et al, 1985**).

**Tableau I : Principales dates de développement de l'analyse ADN en pratique judiciaire (Doutremepuich, 2012).**

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

## **I.2. Génome humain :**

Le génome humain est composé de 3,3 milliards de paires de bases, le nombre des gènes est estimé à 30.000 gènes. La taille des gènes est très variable, le plus petit gène comprenant quelques centaines de paires de bases, alors que le plus grand peut avoir plus d'un million de paires de bases de longueurs.

Les introns sont des segments d'ADN localisés au sein du gène, transcrits en ARN, puis épissés en ARNm avant que l'ARNm ne soit traduit en protéine. Les exons sont les régions du gène qui contiennent l'information codante.

La région 5' et la région 3', situées aux deux extrémités du gène sont des régions non codantes (non traduites). Les gènes sont parfois rassemblés en groupes, les gènes qui partagent une même fonction étant proche, les uns des autres.

Les pseudogènes sont des séquences d'ADN qui ont certaines des caractéristiques de structure des gènes exprimés ont probablement été fonctionnels, mais ils ont acquis au cours de l'évolution, un nombre de mutations inactivatrices, les empêchant de produire une protéine (**Makri – Mokrane, 2006**).

L'ADN non transcrit est appelé ADN intérogénique ou extragénique, certaines séquences d'ADN intérogénique situées à proximités des gènes exprimés sont indispensables au contrôle de l'expression des gènes, mais une grande quantité ne paraît pas indispensable et ne possède pas de fonction connue. Dans l'ADN intérogénique et parfois dans les introns, sont situées des séquences répétées, dispersées au sein du génome, en une ou en plusieurs copies et n'ayant pas de fonctions apparente ; des séquences répétées, les plus répandues, présentes environ 500.000 fois dans le génome humain, des répétitions en tandem (CA)<sub>n</sub>, (CT)<sub>n</sub> et des éléments LINE (**Kaplan et al, 1993**).

### **I.3.Polymorphismes de l'ADN :**

#### **I.3.1.Polymorphismes de longueur "RFLP" :**

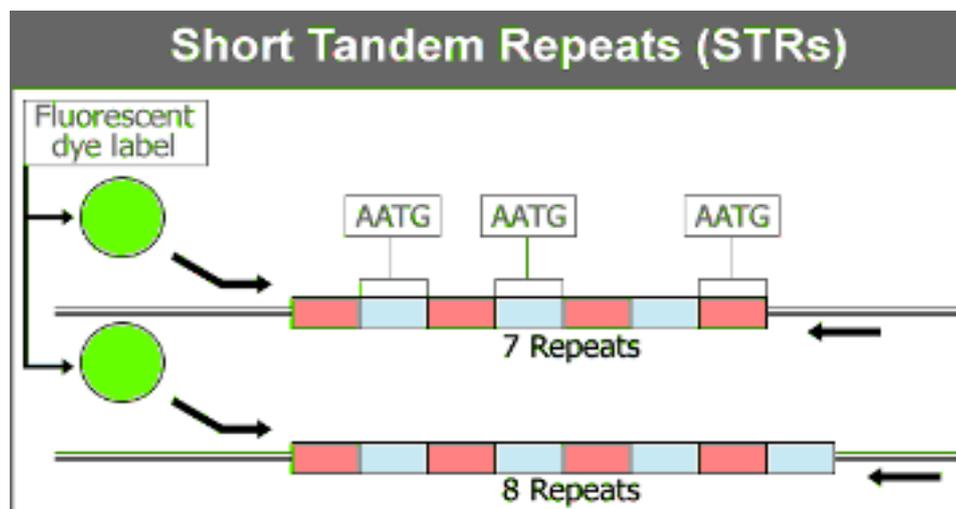
L'analyse de l'ADN par la technique de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), dépend de la fragmentation de l'ADN génomique par un enzyme de restriction. Selon l'enzyme choisi, celui-ci reconnaît et coupe l'ADN double brin à une séquence spécifique de 4 à 8 nucléotides encadrant un site contenant des répétitions (site VNTR) (**Kan et Dozy, 1978**).

#### **I.3.2.Polymorphismes de répétition :**

Les séquences non codantes (85-90 % du génome) sont très polymorphes entre espèces comme entre individus d'une même espèce. Ces séquences présentent ainsi un large choix de marqueurs génétiques qui permettent d'établir des tests d'identification redoutablement discriminants. Parmi ces marqueurs nommés selon leur taille, on trouve notamment les minisatellites (ou VNTR, *variable number of tandem repeats*, en français : nombre variable de répétitions en tandem) et les

microsatellites (ou STR, *short tandem repeats*, en français : courtes répétitions en tandem). Les VNTR et STR sont des polymorphismes de répétition composés de séquences qui se répètent en tandem. Ces séquences répétées mesurent de dix à quarante paires de bases pour les VNTR, de deux à dix paires de bases pour les STR. D'un individu à l'autre, la séquence répétée d'un VNTR ou d'un STR est identique mais le nombre de répétitions, et donc la taille du VNTR ou du STR peut être très variable (Ameziane et al, 2005).

La mise en évidence du polymorphisme d'un STR ou d'un VNTR se fait par PCR à l'aide d'amorces qui s'hybrident aux séquences non polymorphes flanquantes. Les produits d'amplification sont ensuite analysés soit sur gel d'agarose, soit à l'aide d'un analyseur de fragments d'ADN (Dubourg, 2007). La figure 1, montre la structure d'un microsatellite.



**Figure1** : Schéma d'un microsatellite.  
(NFSTC Science Serving Justice, 2007)

Il est aujourd'hui possible d'amplifier simultanément plusieurs STR ou VNTR en utilisant plusieurs couples d'amorces. La variété des produits d'amplification obtenus permet d'aboutir à des profils qui sont spécifiques des individus. Le tableau II représente les différents loci utilisés dans l'analyse d'ADN nucléaire.

**Tableau II : Liste des loci analysés sur l'ADN autosomal (Doutremepuich, 2012).**

<b>Locus</b>	<b>Chr</b>	<b>Position</b>	<b>Taille des fragments</b>	<b>Motif répété</b>	<b>Echelle allélique</b>
<b>D8S1179</b>	8	8q	de 128 à 168 pb	(TCTR)n	entre 8 et 19
<b>D21S11</b>	21	21q11-q21	de 189 à 243 pb	(TCTA)n	entre 24.2 et 38
<b>D7S820</b>	7	7q11.21-q22	de 215 à 247 pb	(AGAT)n	entre 6 et 15
<b>CSF1PO</b>	5	q33.3-34 située dans le gène du récepteur cfms proto — oncogène pour le CSF1.	de 295 à 327 pb	(AGAT)n	entre 7 et 15
<b>D3S1358</b>	3	3p	de 114 et 142 pb	(TCTA)n	entre 9 et 19
<b>THO1</b>	11	11p15.5 située dans l'intron 1 du gène de la tyrosine hydrolase	de 154 à 178pb	(TCAT)n	entre 5 et 11
<b>D13S317</b>	13	13q22-q31	de 165 à 197 pb	(AGAT)n	entre 5 et 15
<b>D16S539</b>	16	16q24-qter	de 264 à 304 pb	(AGAT)n	entre 5 et 15
<b>D2S1338</b>	2	2q35-37.1	de 289 à 341 pb	(TGCC)n	entre 15 et 28
<b>D19S433</b>	19	19q12-13.1	de 106 à 140 pb	(AAGG)n	entre 9 et 18.2
<b>vWA</b>	12	12p12 pter située dans l'intron 40 du gène humain VWA	de 135 à 167 pb	(TCTR)n	entre 11 et 22
<b>TPOX</b>	2	2p13 située dans le gène de la thyroïde-péroxidase	de 232 à 248pb	(AATG)n	entre 8 et 12
<b>D18S51</b>	18	18q21.3	de 273 à 341 pb	(AGAA)n	entre 9 et 26
<b>D5S818</b>	5	5q21-31	de 135 à 171 pb	(AGAT)n	entre 7 et 16
<b>FGA</b>	4	4q28	de 219 à 267 pb	(TTTC)n	entre 16.2 et 30

### I.3.3. Caractéristiques des STR (Short Tandem Repeat) :

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

Le nombre de répétition des STR autosomaux est très variable d'un individu à l'autre, en raison du brassage génétique qu'ils subissent, cette variabilité semble principalement liée à des dérapages de réplication). Leur pouvoir de discrimination élevé fait de ces polymorphismes des marqueurs de choix pour l'identification individuelle des individus (**Gill et al, 2001**).

Les STR sont désignés par le nombre de répétition 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. Les STR peuvent contenir des répétitions en tandem, de courts motifs, qui seront dinucléotidiques, trinucleotidiques, tetranucleotidique, pentanucleotidiques ou même hexanucleotidique (**Coquoz, 2003**).

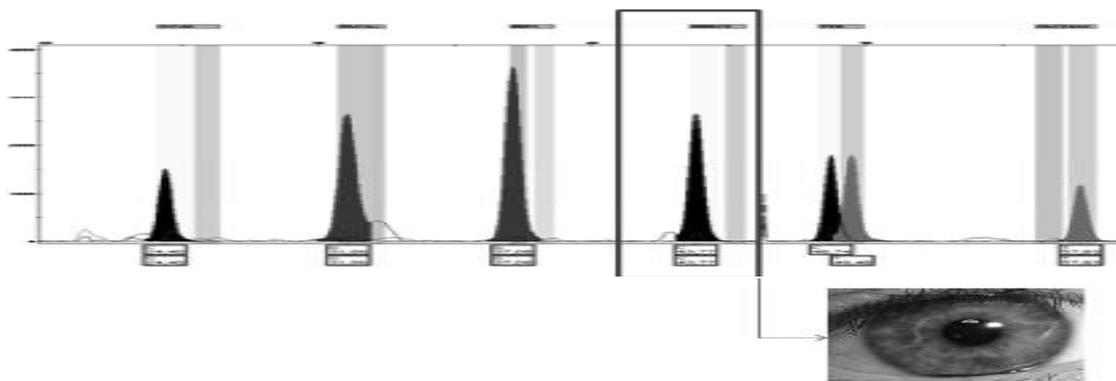
### I.3.4. Polymorphisme d'un seul nucléotide : Les SNPs

#### I.3.4.a) -Définition :

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

Les SNPs sont abondants dans le génome et leur méthode d'analyse est bien définie. Le développement de l'analyse des SNPs est dû à l'organisation du SNPs Consortium créé en 1999 entre les compagnies pharmaceutiques et des centres de séquençage du génome. Ce consortium a permis d'identifier plusieurs millions de SNPs et de développer de nouvelles technologies pour leur analyse telle que la spectrométrie de masse, les puces à ADN, le SNAP-SHOT (**Sobrinho et al, 2005**).

- Les applications de ces analyses sont :
  - L'estimation de l'origine ethnique. Ces travaux essaient de mieux préciser l'origine ethnique d'une personne. Toutefois, l'intérêt dans l'identification d'une trace fait l'objet d'études et de polémiques.
  - La détermination d'apparences morphologiques. Ces analyses représentent des aides à l'enquête car elles peuvent prédire :
    - La couleur de la peau.
    - La présence du lobe de l'oreille décollé.
    - La couleur des cheveux
    - La couleur des yeux, présenté par la figure 2 (**Frudakis et al, 2000**).



**Figure 2 :** Analyse des SNPs dans la détermination des traits physiques d'une personne (**Doutremepuich, 2012**).

## **II. Empreinte génétique (profil ADN) :**

### **II.1. Définition :**

Deux humains ont généralement une large majorité de leur séquence d'ADN commune. Certaines de ces séquences permettant 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 science forensique sont le sang et le sperme. D'autres échantillons biologiques peuvent aussi constituer une source possible d'ADN, tels que la salive, les os et tissus musculaires (**Butler et al, 2003**).

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

### **II.2. Applications :**

L'empreinte génétique est utilisée surtout en domaine de :

- **Criminologie** : pour identification des suspects ou des personnes décédées.
- **Recherche de paternité** : pour établissement ou contestation d'une filiation ou des affaires de viol et d'inceste.

#### **II.2.1 Identification de corps :**

Les analyses sont effectuées sur un fragment de muscle ou d'os. Le fémur est l'os dans lequel l'ADN est mieux protégé en situation hostile (eau, chaleur). L'ADN

analysé sera comparé aux résultats des analyses effectuées sur le père / la mère présumés du défunt ou ses présumés enfants. Des analyses complémentaires sont réalisées si le calcul de la probabilité est insuffisant ( $p < 99,999 \%$ ) :

- analyse des STR du chromosome Y,
- analyse des STR du chromosome X,
- analyse du séquençage des régions HV1 et HV2 de l'ADN mitochondrial.

Les identifications de corps peuvent être complexes lors des catastrophes aériennes, terrestres, maritimes, etc. De nombreux prélèvements affluent alors et il convient de les traiter immédiatement pour répondre à la demande des autorités et des familles (**Doutremepuich, 2012**).

#### II.2.2 La recherche de paternité :

Les analyses sont effectuées sur des prélèvements buccaux issus du père, de l'enfant et de la mère. L'analyse de l'ADN autosomal est suffisante dans la plupart des dossiers et permet d'établir une filiation avec une probabilité d'inclusion de 99,999 %, ou une exclusion de paternité avec au moins deux exclusions. L'interdiction d'effectuer un prélèvement post-mortem pour une recherche en paternité a considérablement compliqué certains cas où il est nécessaire d'effectuer des analyses sur les grands-parents paternels, demi-frères, demi-sœur (**Doutremepuich, 2012**).

#### **II.3. Evolution scientifique :**

Ces dernières années, les empreintes génétiques ont bénéficié d'évolutions dans l'amélioration des procédures d'extraction, l'augmentation de la performance des analyses, la durée des analyses. En effet, l'emploi de billes magnétiques dans les techniques d'extraction a considérablement réduit la présence d'inhibiteurs de PCR :

- en 2010, sur 15 492 analyses, 55 % présentaient des inhibiteurs de PCR.
- en 2011, sur 16 899 analyses, aucun extrait ne présentait d'inhibiteur.

L'augmentation de la performance s'est observée sur l'analyse des cellules de contact :

- en 2010, 46 % des extraits analysés donnaient un profil ADN,
- en 2011, 65 % des extraits analysés donnaient un profil ADN

Par ailleurs, sur l'ensemble des analyses, l'obtention de profils ADN est de :

- 55 % pour l'année 2010,
- 70 % pour l'année 2011.

L'ensemble de la procédure analytique a été considérablement réduite ces dernières années puisque les analyses d'extraction semi-automatisées, le dosage, l'amplification et le génotypage, se déroulent dans la même journée. Les recherches préliminaires qui permettent de mettre en évidence les traces biologiques et d'effectuer les prélèvements sont toujours aussi longues car ce sont des techniques manuelles, minutieuses et très importantes qui influent considérablement sur la qualité du résultat (**Doutremepuich, 2012**).

### **III. Traces biologiques et problèmes spécifiques :**

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

Les laboratoires impliqués dans le domaine médico-légal ont notamment pour but d'établir des profils génétiques ou profils ADN, et doivent ainsi s'adapter à des types variés de matériels biologiques. Aux échantillons traditionnels tels que les taches de sang ou de sperme, viennent alors s'ajouter de nombreux autres comme la salive, les ongles, les cheveux ou les poils, les os, les dents, ... qui peuvent eux-mêmes être déposés sur une large variété de supports tels que des écouvillons de prélèvement,

des effets vestimentaires, des objets métalliques, des supports biologiques (Butler, 2005. Andreasson *et al*, 2006).

#### **IV. Les indices biologique et sources potentielles d'ADN :**

##### **IV.1 Les indices biologiques :**

Tous les indices de nature biologique sont susceptibles de se détériorer. Ils doivent faire l'objet d'un recueil et d'un stockage méticuleux visant à les préserver de sorte que leur analyse permette d'obtenir des informations exploitables. La plupart des méthodes de typage de l'ADN sont fiables, la graisse, les colorants de certains tissus et d'autres substances encore risquent de compromettre gravement la procédure.

Des centaines d'indices matériels différents sont régulièrement transmis pour examen aux laboratoires. Seuls les éléments de preuve d'ordre biologique peuvent généralement faire l'objet d'une analyse génétique. Le tableau III (Annexes) recense les indices biologiques ayant permis d'isoler et d'analyser l'ADN (Guide d'interpol, 2009).

##### **IV.2 Identification des traces biologiques sur une scène criminelle ou délictuelle :**

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

L'obtention d'un profil ADN ou empreinte génétique sur une trace biologique nécessite une comparaison avec des prélèvements effectués sur une personne témoin, suspecte ou victime afin d'identifier l'auteur (Doutremepuich, 2012).

## **V. Le sang comme source d'analyse d'ADN :**

### **V.1. Définition :**

Le sang est l'un des indices retrouvés sur une scène de crime qui apporte le plus d'éléments utiles à l'enquête. Il porte en effet de l'ADN, pouvant appartenir au criminel ou à sa victime, mais les projections de sang confèrent aussi aux enquêteurs un moyen de reconstituer l'enchaînement des événements de violence (**Peltier, 2011**).

### **V.2. Composition du sang :**

Le sang est l'un des éléments souvent présents sur une scène de crime. Mais de quoi est-il composé ? Comme tous les fluides biologiques, il est majoritairement constitué d'eau. De nombreuses cellules sont aussi présentes (globules blancs, plaquettes...), dont les majoritaires sont les globules rouges (ou hématies). Ayant pour rôle de transporter l'oxygène, ils contiennent de l'hémoglobine, la protéine qui fixe le fer et l'oxygène, et qui donne sa couleur rouge au sang. (**Peltier, 2011**).

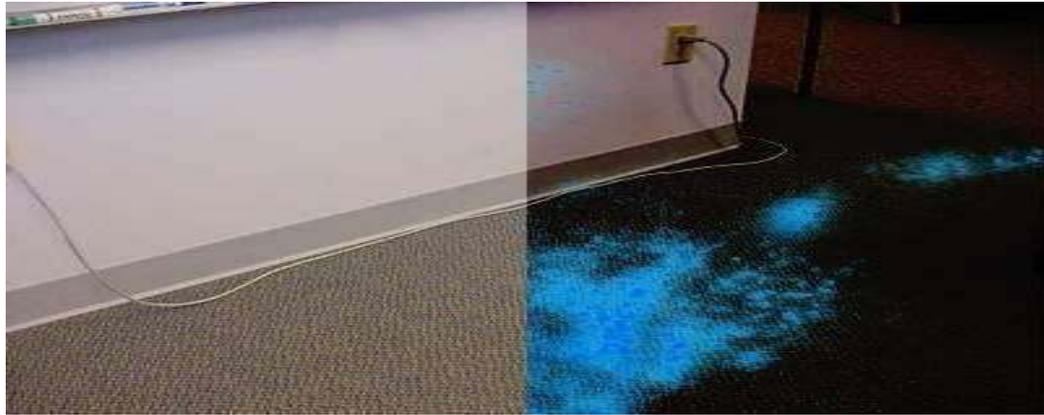
### **V.3. Mettre en évidence des taches de sang :**

Les traces de sang peuvent être nettoyées et ainsi devenir invisibles à l'œil nu. Mais l'hémoglobine, présente à raison de 15 grammes par litre de sang, a tendance à rester fixée sur les tissus. Il existe donc des méthodes de révélation des zones tachées de sang :

L'eau oxygénée seule est un moyen de mettre en évidence la présence de sang. En effet, l'hémoglobine qui possède une activité catalase transforme l'eau oxygénée en eau et dioxygène ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$ ). La production de dioxygène gazeux entraîne la formation de mousse (**Peltier, 2011**).

- Le luminol (3-aminophthalhydrazide de formule  $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$ ) est une molécule qui possède la particularité d'émettre une luminescence (des photons) en présence d'un activateur (l'eau oxygénée). La présence d'un catalyseur accélère fortement cette réaction chimique, et c'est le cas du fer (contenu dans

le sang), qui permet donc d'observer la présence de taches de sang dans l'obscurité, comme il est démontré dans la figure 3.



**Figure 3 : Du sang sur une scène de crime, vu grâce au luminol.  
(Police scientifique, 2012).**

Ces méthodes ne sont pas fiables à 100 %, puisque d'autres substances peuvent réagir de la même façon. Mais elles permettent de récolter d'éventuels indices, tout en pouvant aussi mener à la récolte d'échantillons inutiles (**Peltier, 2011**).

## **VI. L'utilité d'une base de données génétique nationale :**

Les bases de données génétiques reposent sur le principe que l'ADN obtenu à partir du matériel génétique d'un individu ou à partir d'indices biologiques laissés sur la scène de crime doit être disponible dans une telle base de données à des fins d'enquête. Le principe d'une base de données génétique utilisée en criminalistique est que l'ADN provenant d'une source donnée produira le même profil qu'il soit extrait d'un échantillon prélevé sur une scène de crime ou d'un échantillon de référence.

Une base de données génétique contient donc des informations génétiques, sous la forme de profils d'ADN, qui sont des enregistrements correspondant à des échantillons provenant de personnes et d'infractions. Elle peut avoir plusieurs finalités en termes d'identification, et donc contenir différents index : suspects, auteurs d'infractions condamnés, volontaires, population générale, victimes, policiers,

personnel de laboratoire, personnel de secours d'urgence local (médecins, infirmiers, pompiers, etc.), fournisseurs, personnes disparues et leur famille, cadavres non identifiés et tests génétiques systématiques (**Guide Interpol, 2009**).

## **VII. Séparation et visualisation du profil d'ADN :**

Les marqueurs cibles de l'ADN employés dans les analyses génétiques habituellement menées par la police scientifique sont appelés séquences répétitives courtes (ou STR). Apparus comme marqueurs possibles au début des années 1990, les STR ont rapidement montré leur potentiel comme technique de police scientifique. Grâce en particulier à leur petite taille moléculaire, les tests étaient plus sensibles et ne nécessitaient que de 0,2 à 0,5 ng d'ADN, soit une sensibilité de 100 à 250 fois supérieure à celle des premières techniques d'analyse génétique. Ces loci étaient donc également plus fiables lorsque l'ADN était très dégradé.

Les avancées en matière d'analyse des STR ont permis de combiner 16 marqueurs en un seul test. Cette technique, dite de multiplexage, augmente le pouvoir discriminant de l'analyse génétique sans remettre en cause la sensibilité globale du test ni sa pertinence à des fins de police scientifique (**Guide Interpol, 2009**).

## **VIII. Génotypage des STRs :**

L'ADN est soumis à un marquage par des molécules fluorescentes pour déterminer le profil génétique STR d'un individu : la PCR multiplex. Basée sur le même principe de la PCR classique, cette technique permet l'amplification d'ADN simultanée de plusieurs STRs. Ces colorations sont ensuite détectées lors de la séparation électrophorétique des « produits » de PCR par un Analyseur Génétique ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems, Foster City, CA). Ces informations sont ensuite transmises à un ordinateur qui va les collecter et les traiter par un logiciel spécifique GeneMapper ID v3.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Ce logiciel attribue à chaque allèle STR une taille (en paires de bases) à partir de laquelle le nombre de motifs répétés et le nom de cet allèle sont déduits. Un profil génétique est, ainsi, généré pour chaque individu analysé (**Applied Biosystems, 2001**).

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

## **I- Matériel :**

### **I-a. Echantillonnage :**

Ce travail a été effectué au niveau de laboratoire de biologie légale, dans l'institut de criminalistique et de criminologie de la gendarmerie nationale algérienne à Bouchaoui, Alger. L'objectif essentiel de ce travail est d'établir une empreinte génétique à partir de différents tissus textiles, et voir quel est celui qui présente une qualité des profils ADN optimale et minimale.

### **I-1 Etape de préparation et la mise en tube des échantillons :**

Dans cette étude nous avons utilisé 06 tissus textiles différents dans leur nature et composition afin de découvrir le tissu le mieux rentable en termes de quantité et qualité d'ADN issu d'une tache de sang humain. Ces tissus sont les plus fréquents dans les scènes de crime ce qui justifie le choix de ces derniers. Le tableau IV représente la nature et la source de chaque tissu textile et leur abréviation.

**Tableau IV : La nature et la source des 06 tissus textiles.**

<b>La nature du tissu</b>	<b>La source du tissu</b>	<b>Abréviation</b>
<b>Coton 100% synthétique</b>	<b>Pantalon de jean bleu</b>	<b>(Jen)</b>
<b>La laine 100%</b>	<b>Manteau marron</b>	<b>(Mt)</b>
<b>Nylon 100%</b>	<b>Tapis de voiture gris</b>	<b>(Tap)</b>
<b>Coton 100 %</b>	<b>Tricot de peau blanc</b>	<b>(Tep)</b>
<b>75% Polystère +25% acrylique</b>	<b>Chemisier bleu</b>	<b>(Che)</b>
<b>Coton 100%</b>	<b>Ecouvillon</b>	<b>(Ec)</b>

### I-1.1 Préparation des échantillons :

Cette étape consiste à réaliser les traitements suivants :

- Nettoyage de la surface du travail par un désinfectant ou RBS.
  
- Préparation du matériel nécessaire tel - que :
  - Pipette eppendorf.
  - Les embouts.
  - Bistouris.
  - Portoir.
  - Une pince jetable en plastique.
  - Papier blanc.
  
- Découpage des petits morceaux de chaque tissu ensuite il faut les décontaminer sous UV pendant 04minutes afin d'éviter toute contamination possible par un autre ADN.
  
- Mettre les tissus décontaminés sur un papier blanc puis les photographier globalement et individuellement.
  
- Effectuer des taches de sang avec une pipette sur chaque tissu environ 500 ul, provenant d'une même personne.
  
- Photographier chaque tissu individuellement.
  
- Laisser les échantillons à sécher pendant 04 jours dans les conditions naturelles (température, humidité, aération, pollution).

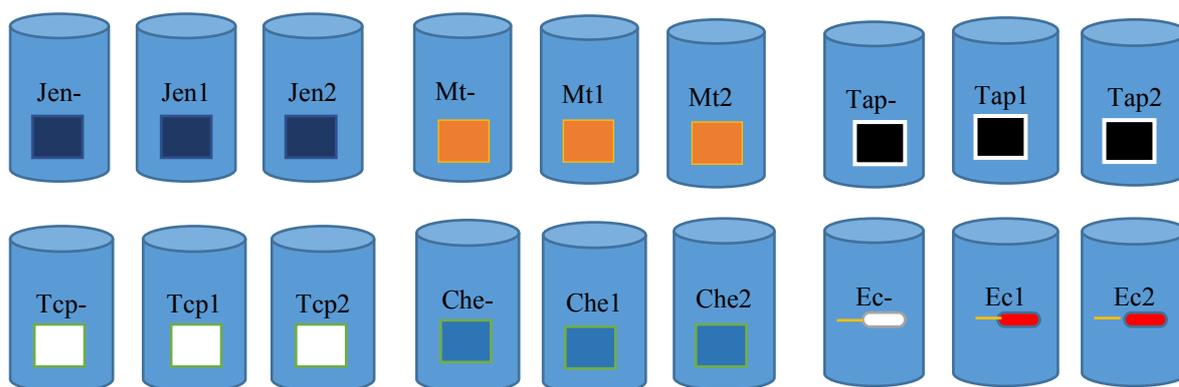
### I-1-2. La mise en tube des échantillons :

Cette étape s'effectue dans des tubes eppendorf de 0.2ml (200ul). Elle nécessite les démarches suivantes :

- préparation d'un portoir qui contient 06 tubes selon le nombre des échantillons.
- Décontamination du portoir et des 06 tubes sous UV pendant 04 minutes dans un CROSS LINKER.
- Marquer les tubes des 06 échantillons par leur abréviation.
- Découpage des 03 petits morceaux environ 3mm<sup>2</sup> de chaque échantillon y compris le témoin négatif qui est prélevé à partir de la zone qui ne contient pas de sang.
- Mettre chaque morceau dans son tube marqué à l'aide d'une pince jetable. Et donc à la fin, nous obtiendrons 03 tubes différents correspondant aux 03 prélèvements de chaque tissu.

#### - Exemple du tissu du jean :

Nous découpons 03 morceaux de 3mm<sup>2</sup> de tissu du jean (échantillon 1), dont 02 morceaux contiennent le sang et appelé ; jean1 et jean2 et le troisième morceau représente le témoin négatif, qui ne contient pas de sang.



**Figure 4 : Répartitions des 18 prélèvements dans des tubes eppendorf de 2 ml.**

## **II- Etape d'extraction d'ADN nucléaire :**

L'extraction d'ADN s'effectue par Chelex 100, c'est une résine échangeuse d'ions ajoutée sous forme de suspension aux échantillons.

Le Chelex est composé de copolymères de styrène di- vinylbenzène contenant des ions iminodiacétates appariés qui agissent comme des groupes chélateurs en liaison d'ions de métal polyvalent comme le magnésium  $Mg^{2+}$ .

Le Chelex est chargé négativement et contient des billes qui s'attachent avec un coeffecteur des DNases et RNases qui sont des endonucléases de la cellule, afin d'empêcher l'action de ces endonucléases sur notre ADN qui ont une grande affinité au coeffecteur qui est le  $Mg^{2+}$ . donc pour que l'ADN soit dégradé il faut avoir le dimère (DNase -  $Mg^{2+}$ ) ou bien (RNase -  $Mg^{2+}$ ) (Sweet et al, 1996).

L'extraction d'ADN par le Chelex 5% nécessite plusieurs actions primordiales pour l'obtention d'un ADN purifié, telles que :

- L'incubation à 56°C.
- L'incubation à 100°.
- Le lavage par eau ultra pure.

## **II-1. Réactifs et solutions :**

**La résine Chelex 100 pour préparer le Chelex 5%**

**La PK + Eau ultra pure (milli Q)**

**RBS (désinfectant)**

## **II-2. Matériel et équipement :**

**Hotte pour travailler sans risque de contamination**

**Pipettes eppendorf + L'étips + vortex + portoir**

**Turbilateur + Centrifugeuse**

**Bain à sec + Bain marie**

## **II-3. Protocole de travail :**

- L'extraction de l'ADN nucléaire par la méthode de Chelex 5% :

Chaque tube des 16 tubes préparé préalablement va subir les traitements suivants :

### II-3.1 L'étape de lavage :

Le lavage est utilisé pour éloigner les débris cellulaire et surtout l'hémoglobine (Hb) qui est considéré comme un grand inhibiteur de l'ADN. Les 03 différentes étapes du lavage sont les suivantes :

- Ajouter 1000 ul d'eau ultra pure et vortexer pendant 30 secondes.
- Mettre le tube qui contient le prélèvement en turbilateur pendant 15 minutes.
- Centrifuger pendant 03 minutes à 13000 rpm.

Après ce premier lavage, nous effectuons un deuxième lavage avec les mêmes étapes précédentes.

### II-3.2 L'étape de Pré-lyse :

C'est une étape préparatoire pour l'étape de lyse et de purification, dont nous préparons le mélange du Chelex 5% et la protéinase K comme suit :

- Vortexer le Chelex 5%
- Ajouter 400 ul du Chelex 5%
- Ajouter 04 ul de protéinase K

### II-3.3 L'étape de lyse et purification :

Dans cette étape nous suivons les démarches suivantes :

- Incuber le tube pendant 30 minutes au minimum à 56 °C au bain marie :

Cette incubation facilite le travail de la protéinase K pour éclater tous les parois cellulaires et nucléaires.

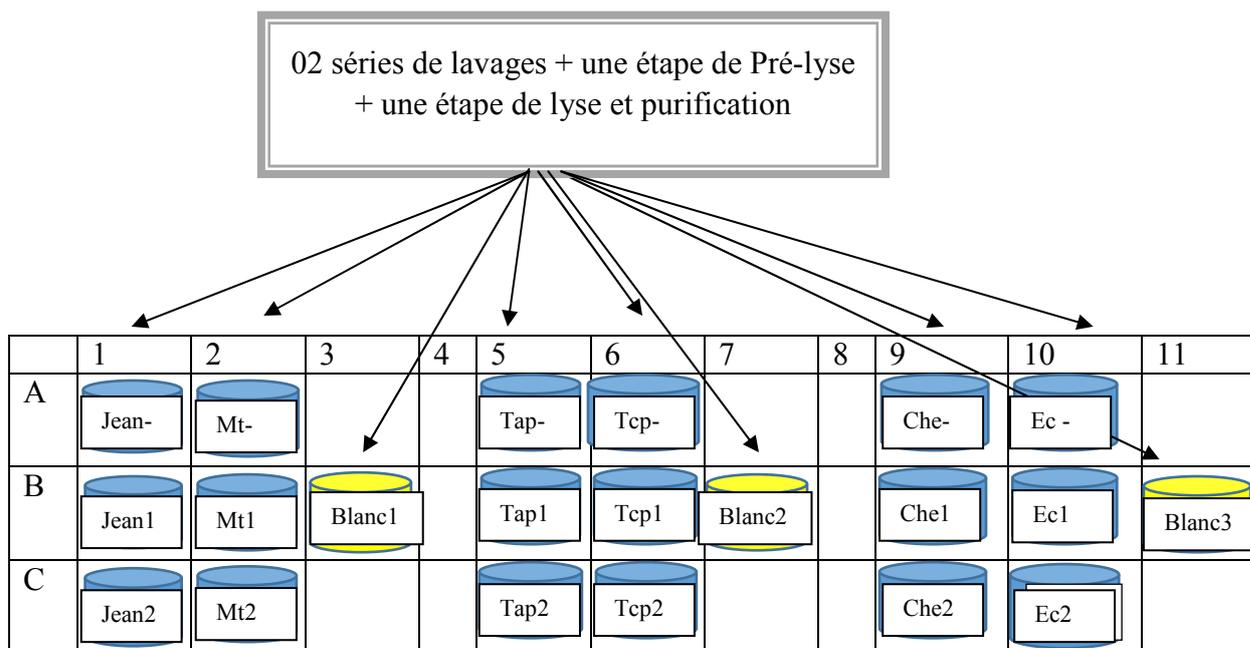
- Vortexer pendant 30 secondes.
- Incuber pendant 08 minutes à 100 °C au bloc chauffant :

Cette étape est très nécessaire, parce qu'elle assure l'éclatement des cellules presque à 100%, et surtout la dégradation des liaisons hydrogènes afin d'obtenir des monobrinns d'ADN qui montent en haut de tube avec l'eau pure pendant l'étape suivante :

- Vortexer pendant 30 secondes, ensuite, centrifugé pendant 03 minutes à une vitesse de 13000 rpm.
- Récupérer le surnagent (ADN) transparent ou jaune claire.
- Aliquote 03 ul de chaque échantillon pour réaliser la quantification d'ADN et conserver le reste de tube à + 04°C pendant 24 heures ou - 21°C pour plus de 24 heures.

## **II- 4. Méthode :**

Il faut décongeler tout d'abord la PK et la résine Chelex, et les mettre dans un portoir, puis nous débutons notre extraction d'ADN. La figure ci-dessous représente un portoir qui contient tous les 18 échantillons dont les étapes d'extraction s'effectuent en 03 série, chaque série englobe 6 échantillons avec un témoin négatif d'extraction appelé le blanc qui confirme l'absence d'une contamination lors de la manipulation d'extraction dans les résultats de la quantification où la quantité du blanc (témoin négatif) doit être nulle (quantité d'ADN = 0 nanogramme d'ADN).



**Figure 5 : Répartition des 18 échantillons d'étude dans un portoir.**

### **III- Etape de quantification d'ADN :**

La quantification de l'ADN obtenu est réalisée grâce à un kit appelé : Quantifier human contenant 03 réactifs. Le tableau V représente les différents réactifs et solution de cette étape, y compris les composants du kit de quantification d'ADN.

### **III-1.Réactifs et solutions :**

Les réactifs et solutions de l'étape de quantification d'ADN sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau V : Réactifs et solutions de la quantification d'ADN.**

<b>Kit de Quantifier human qui à 03 réactifs :</b>			
	<b><u>Primers :</u></b>	<b><u>DNA standard :</u></b>	<b><u>Reaction mix :</u></b>
<b>Composant</b>	- Amorce - Sonde taqman - Ipc	- ADN purifié à 200ng / ul	-Taq polymérase gold. -dNtps -Tampon mg <sup>2+</sup>
<b>Quantité</b>	03tubes de 1.4ml	01 tube de 120ul	01 flacon de 05ml
<b>Conditions de stockage</b>	-20°C	-20°C	+04°C
<b>Eau ultra pure (milli Q) + RBS (désinfectant)</b>			

### **III-2.Matériel et équipements :**

Hotte pour travailler sans risque de contamination
Les embouts + vortex + portoir + tube eppendorf 1.5 et 2ml
Centrifugeuse + pipette eppendorf
Plaque 96 well optique + support de plaque
Un film adhésif transparent + un plastique solide de fermeture
Thermocycler 7500 avec une lampe halogène d'Applied Biosystems
Ordinateur connecté avec le 7500

### **III-3.Méthode :**

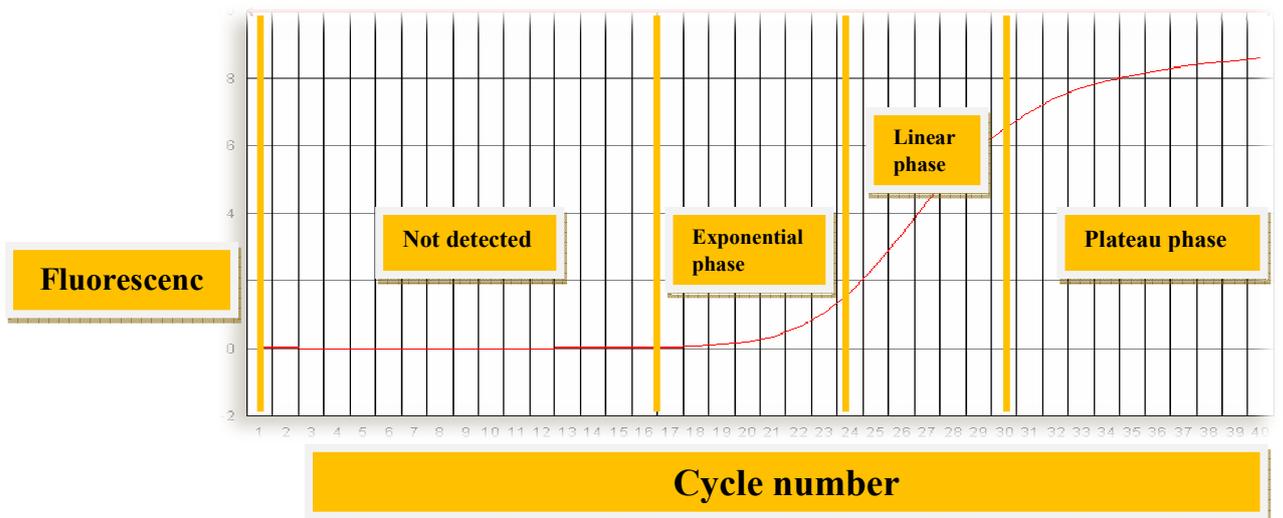
#### **III-3.1 Définition :**

La PCR en temps réel (ou qPCR pour quantitative PCR) a connu un essor considérable au cours de ces dernières années, sans doute en partie en raison de sa simplicité de mise en œuvre, de son automatisation pour des applications d'analyses à grande échelle et de la publicité importante qui a été faite sur sa précision et sa sensibilité (**Pascal, 2007**).

La PCR en temps réel combine l'amplification avec la détection et la quantification d'un signal fluorescent. La réaction d'amplification de la séquence ADN cible suit les mêmes étapes qu'en PCR classique (dénaturation, hybridation, extension).

L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle. La première augmentation significative de la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice cible (template) (**Elyse, 2002**).

La figure 06, indique les différentes phases de la PCR en temps réel Dans le thermocycleur 7500 ABI. Dont, La quantité d'amplicon obtenue à chaque cycle, n'augmente de manière exponentiellement que pendant un certain nombre de cycles, ensuite, l'amplification s'amortie (phase « linéaire » de la figure 6) en raison de la présence d'un réactif qui commence à être limitant au sein du mélange réactionnel. Cet amortissement de l'amplification se termine par un plateau au cours duquel l'amplification n'a plus lieu en raison de l'absence complète de l'un des réactifs. La réaction devient ensuite imprédictible et il est alors impossible de pouvoir comparer plusieurs échantillons entre eux sans un biais quantitatif plus ou moins significatif (**Pascal, 2007**).



**Figure 6:** Evolution de la quantité d’amplicons en fonction du nombre de cycles de PCR présentée en échelle linéaire (Pascal, 2007).

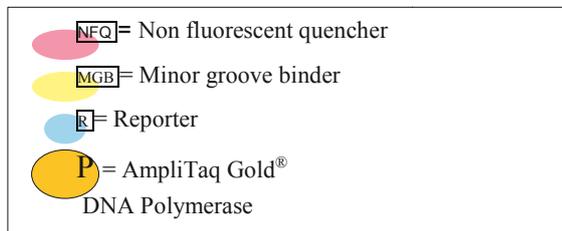
### III-3.2 Principe de la sonde Taq Man :

La méthode de détection à partir de la sonde est basée sur l’activité exonucléasique 5’-3’ de la Taq polymérase. La sonde spécifique est marquée deux fois : un fluorochrome quencher situé en 3’ et un fluorochrome reporter en 5’. La sonde Taqman est sélectionnée de manière à ce que sa température de fusion ( $T_m$ ) soit au moins de 10°C supérieure à celle des amorces de PCR. Au cours de la deuxième étape d’un cycle de PCR (hybridation des amorces), la sonde Taqman va se fixer de manière spécifique sur sa séquence complémentaire. Cette fixation sera complète et précèdera toujours la fixation des amorces en raison du  $T_m$  plus élevé de la sonde Taqman et du fait que l’étape précédente de PCR était à une température supérieure (94°C) (Pascal, 2007).

Au cours de la polymérisation, la Taq polymérase dégrade la sonde située sur son chemin et libère le reporter du quencher. Cette méthode est très précise car la fluorescence associée au fluorochrome reporter ainsi mesurée est proportionnelle à la quantité de produit généré (China et al, 2002).

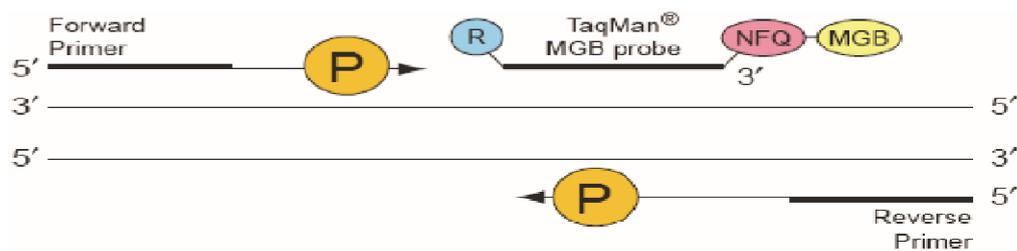
La méthode de Taq Man à l'avantage d'être spécifique de l'ADN amplifié comparé au SYBER Green qui peut se lie aussi aux produits non spécifiques de la PCR. Les sondes Taqman sont cependant plus chères et se dégradent plus vite, en particulier lorsqu'elles sont exposées à la lumière. Il en résulte une moins bonne répétabilité des PCRs dans le temps par un effet de dégradation des sondes. Les sondes Taqman sont également moins sensibles que le SYBR Green car seul un fluorophore émet un signal à chaque synthèse de deux nouveaux brins d'ADN (**Pascal, 2007**).

Nous pouvons expliquer les différentes étapes du principe du travail de cette sonde Taq Man par les étapes suivantes :

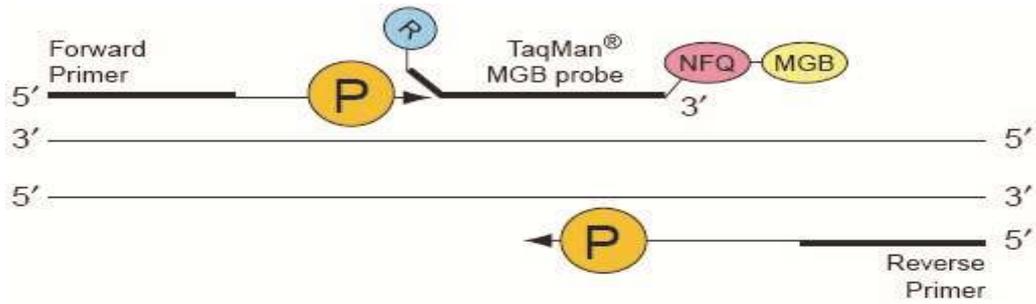


**Figure 7 : Les acteurs de la polymérisation de la sonde Taq Man.**

Durant la PCR, la sonde Taq - Man MGB s'hybride spécifiquement à une séquence complémentaire (Figure09). Quand la sonde est intact, l'énergie du reporteur est supprimée par le quencher par transfert d'énergie de type Forster. (Figure 09, figure 10).



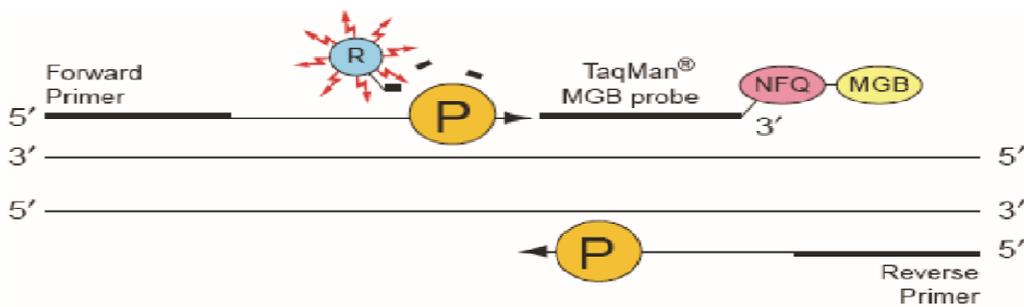
**Figure 8 : La polymérisation.**



**Figure 9 : L'élongation.**

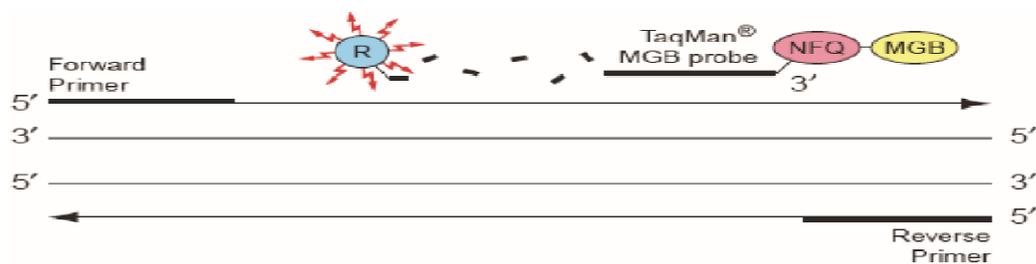
AmpliTaq Gold®DNA polymérase, clive seulement les sondes qui sont hybridées à la cible (Figure 11).

Le clivage sépare le colorant reporter du colorant quencher, Ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence du reporter. L'augmentation du signal de fluorescence n'a lieu que si la séquence cible est complémentaire de la sonde et elle est amplifiée pendant la PCR.



**Figure 10 : Le clivage.**

Puisque l'extrémité 3' de la sonde est bloquée, il n'y a pas d'extension de la sonde pendant la PCR. (Figure 12).



**Figure 11 : L'achèvement de la polymérisation.**

(User guide Quantifiler Kits. 2004).

### **III- 4. Protocole de travail :**

#### **III- 4.1- Dilution des standards :**

Avant de débiter la répartition des échantillons, dans la plaque optique de 96 puits compatible avec le thermocycleur 7500 d'Applied Biosystems, il faut préparer 16 standards (08 standards en double), qui sont des échantillons de quantité connue. Ils sont utilisés pour tracer la courbe des standards (courbe d'étalonnage) à l'aide du logiciel du thermocycleur 7500 ABI, qui est utilisée comme une référence pour le logiciel pour calculer la quantité des extraits des échantillons à analyser. (Jean, manteau, tapis, tricot de peau, chemisier et écouvillon).

C'est pour ça, nous utilisons le tube de 120 µl de DNA standard, qui contient 200 ng d'ADN, du kit Quantifier human non dilué dans l'eau pure. Pour effectuer cette dilution nous utilisons 16 tubes eppendorf, dont chaque tube correspond à un standard. Les étapes suivantes, expliquent comment diluer les 08 premiers standards en cascade, et pour les autres 08 standards, nous répétons les mêmes étapes illustrés dans le tableau suivant. (Tableau VI).

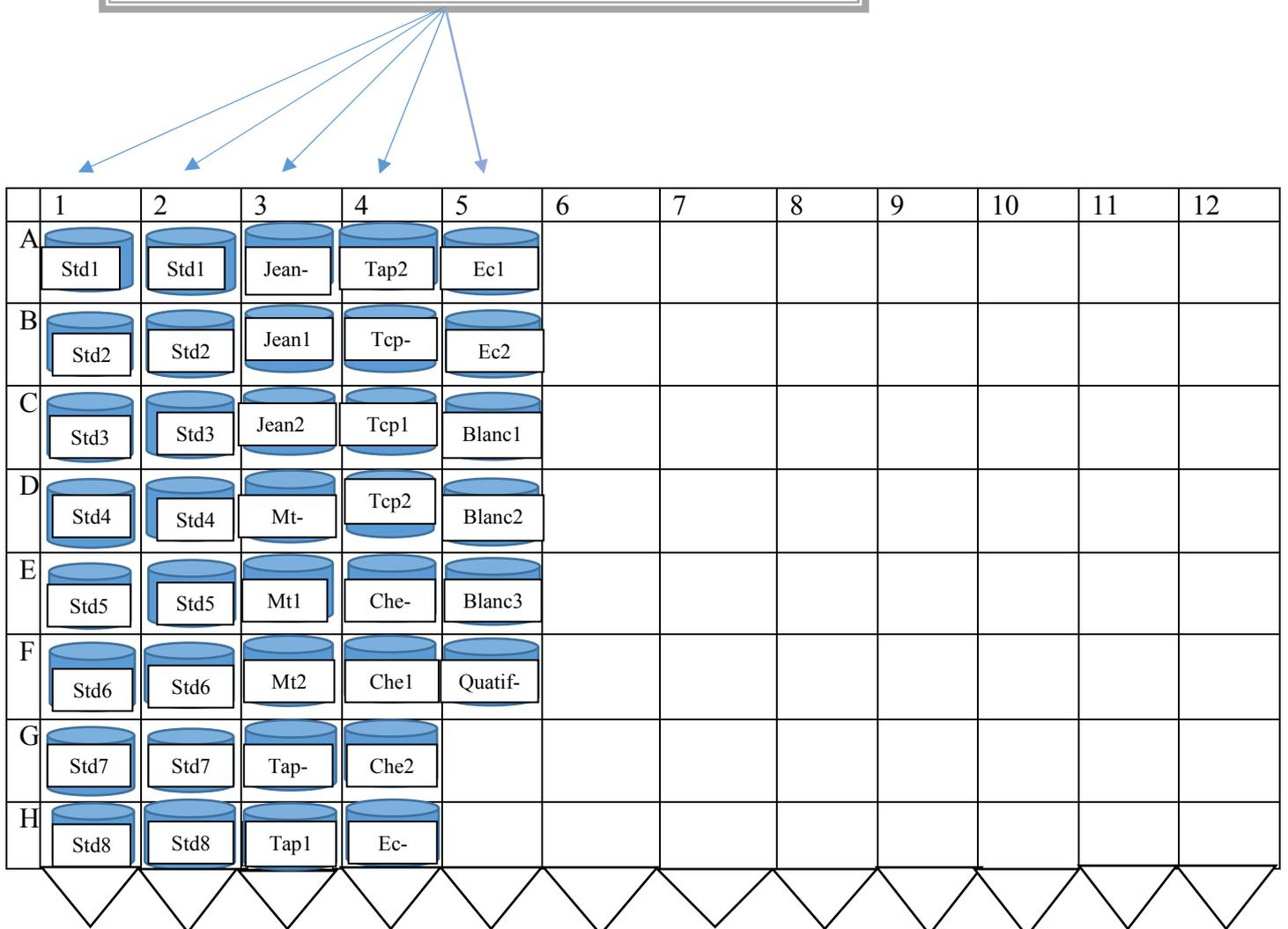
**Tableau VI : La dilution des 16 standards de la quantification d'ADN.**

<b>Indice de dilution</b>	<b>Volume du standard</b>	<b>Quantité d'ADN</b>
<b>1/4</b>	<b>Tube 1</b> : Std 1 : 30µl eau pure + 10µl du DNA standard	50,0 ng
<b>1/3</b>	<b>Tube 2</b> : Std2 : 10µl std1 + 20 µl eau pure	16,7ng
<b>1/3</b>	<b>Tube 3</b> : Std 3 : 10µl std2 + 20 µl eau pure	5,56 ng
<b>1/3</b>	<b>Tube 4</b> : Std 4 : 10µl std 3 + 20 µl eau pure	1,85 ng
<b>1/3</b>	<b>Tube 5</b> : Std 5 : 10µl std 4 + 20 µl eau pure	0,62 ng
<b>1/3</b>	<b>Tube 6</b> : Std 6 : 10µl std 5 + 20 µl eau pure	0,21 ng
<b>1/3</b>	<b>Tube 7</b> : Std 7 : 10µl std 6 + 20 µl eau pure	0,068 ng
<b>1/3</b>	<b>Tube 8</b> : Std 8 : 10µl std 7 + 20 µl eau pure	0,023 ng

Après la dilution des 16 standards, ces derniers sont répartis dans la plaque optique de 96 puits. (Figure 12).

Cette figure représente la configuration de la plaque optique de 96 puits compatible avec le thermocycleur 7500 ABI, et la position de chaque échantillon dans la plaque.

(23 ul du Mix + 2ul d'extractum) x (N = (16 standard) + (21 échantillons y compris 03 blanc d'extraction) + (control négatif (-) de quantification) + (02 échantillons de plus)) / N= 40



**Figure 12 : Configuration de la plaque optique de 96 puits.**

Ensuite, nous préparons le master mix (Tableau VII), qui doit être rajouté aux standards et échantillons dans leurs puits correspondant de la plaque optique de 96 puits.

### III- 4-2. Préparation du Master Mix :

Nous préparons un tube eppendorf de 2ml qui contient le volume totale des 21 échantillons + témoin(-) de la quantification et les 16 standards. Donc le nombre totales = 38 échantillons dont, nous ajoutons 12,5ul de PCR Reaction Mix + 10,5ul du primer, qui sont les deux composant du Master Mix pour chaque échantillons. Donc le volume total se calcule par 23 ul du Master Mix (x) 38 échantillons + 02.

Après la préparation du Master Mix, nous ajoutons 02ul de chaque échantillons y compris : 16 standard, 21 échantillons (parmi eux : blanc1, blanc2 et le blanc3), un témoin (-) de la quantification, et nous ajoutons 02 échantillons de plus pour les erreurs de pipetage.

Le tableau VII illustre le calcul du volume total que nous mettons dans la plaque optique de 96 puits.

**Tableau VII : Calcul du volume total à pipeter dans la plaque optique de 96 puits.**

PCR Reaction Mix	Primer	Volume total
12,5 ul	10,5 ul	$((12,5\text{ul}) \times (\mathbf{n}) + (10,5\text{ ul}) \times (\mathbf{n})) / \mathbf{n}$ : nombre totale des échantillons = 40 échantillons ((21 échantillons y compris 03 blanc d'extraction et 18 échantillons d'analyse) + (16 standards) + (01 contrôle négatif de quantification) + (02 échantillons de plus pour la marge de pipetage)). <b>V totale = (12,5 x 40) + (10,5 x 40) = 500 + 420 = 920ul du Master Mix.</b>

Après la préparation du Mix, nous ajoutons dans les 38 puits de la plaque 96 puits 23 ul du Mix, plus 02ul de chaque extractum (produit finale de l'extraction qui contient l'ADN), donc le volume finale dans chaque puits des 38 puits égale à 25 ul (23ul du Mix + 02ul échantillons).

Après le dépôt du Mix et les échantillons nous scellons toute la plaque (A1 – H12) par un film adhésif transparent, et nous centrifugeons pendant 30 seconde à 13000 rpm pour faire descendre les gouttes en haut de tube et ajuster les volumes.

Finalement, nous mettons la plaque dans le Thermocycler 7500 qui est allumé préalablement, à l'aide d'un support compatible avec cet instrument et nous lançons l'appareil.

#### **IV- Etape de pré-amplification d'ADN :**

##### **IV- a - Définition :**

C'est une étape préparatoire pour la séparation des STR dans le séquenceur 3130 xl, elle permet d'effectuer une amplification des STR par un thermocycleur 9700 ABI, à l'aide d'un Mix qui est ajouté aux échantillons d'analyse.

##### **IV-1. Réactifs et solutions :**

Le kit d'identifier plus est composé du Master + un Primer et un allelic leader, dont chaque marqueur est attaché avec un fluorofore, ainssi le gene scan Liz 500 qui est considéré comme un standard de taille. Le tableau VIII, indique les différents fluorochromes attaché aux marqueurs STR analysés par ce Kit.

**Tableau VIII : Les composants du Kit Identifier plus et ses fluorochromes.**

<b>Kit Identifier plus à 16 marqueurs :</b>	
<b>Master + Primer + Allélic leader</b>	
<b>Fluorochrome (Colorants fluorescents)</b>	<b>Marqueurs</b>
<b>6-FAM</b>	<b>D8S1179 - D21S11 - D7S820 - CSF1PO</b>
<b>VIC</b>	<b>D3S1358 - THO1 - D13S317 - D16S539 - D2S1338</b>
<b>NED</b>	<b>D19S433 - VWA - TPOX - D18S51</b>
<b>PET</b>	<b>Amélogénine – D5S818 - FGA</b>
<b>Gene Scan LIZ 500 (standard de taille)</b>	

#### **IV-2. Matériel et équipements :**

<b>Hotte pour travailler sans risque de contamination</b>
<b>Les embouts + vortex + portoir + tube eppendorf 1.5 et 2ml</b>
<b>Centrifugeuse + pipette eppendorf</b>
<b>Plaque 96 well optique + support de plaque</b>
<b>Thermocycler 9700 ABI</b>

#### **IV-3. Méthode :**

##### **IV-3-1. Préparation du Mix :**

Nous préparons le Mix dans un tube eppendorf de 02ml pour tous les échantillons d'analyse qui est 25 échantillons (21 échantillons y compris 03 blancs utilisés pendant

l'extraction et la quantification d'ADN, un témoin (+) pour confirmer nos résultats, un témoin (-) pour confirmer la contamination lors du pipetage et 02 échantillons en plus pour les erreurs de pipetage).

Le calcul du volume total du Mix nécessaire pour 25 échantillons, est expliqué dans le tableau suivant :

**Tableau IX : Préparation du Mix du Pré – Amplification.**

Mix (15ul) x N	Volume totale du Mix
<p align="center"><b>Master + Primer</b></p>	<p><b>(10,5 ul du Master + 5,5 ul Primer) x</b> (Nombre des échantillons = 25 (21 échantillons y compris 03 blancs + témoin positif + témoin négatif de l'amplification) + 2 échantillons pour l'erreur de pipetage.</p> <p><b>V total = (10,5 + 5,5) x 25 = 400ul</b></p>

Après la préparation du mix, nous passons à la préparation de la plaque de 96 puits compatible avec le thermocycleur 9700 ABI gold.

Nous mettons dans chaque puits de la plaque 15ul du Mix + 10ul de chaque échantillon, donc chaque puits contient 25 ul comme volume finale. Sachant que, nous utilisons 25 puits de la plaque, selon le nombre total des échantillons.

IV-3-2. Préparation de la plaque de 96 puits compatible avec Thermocycler 9700 :

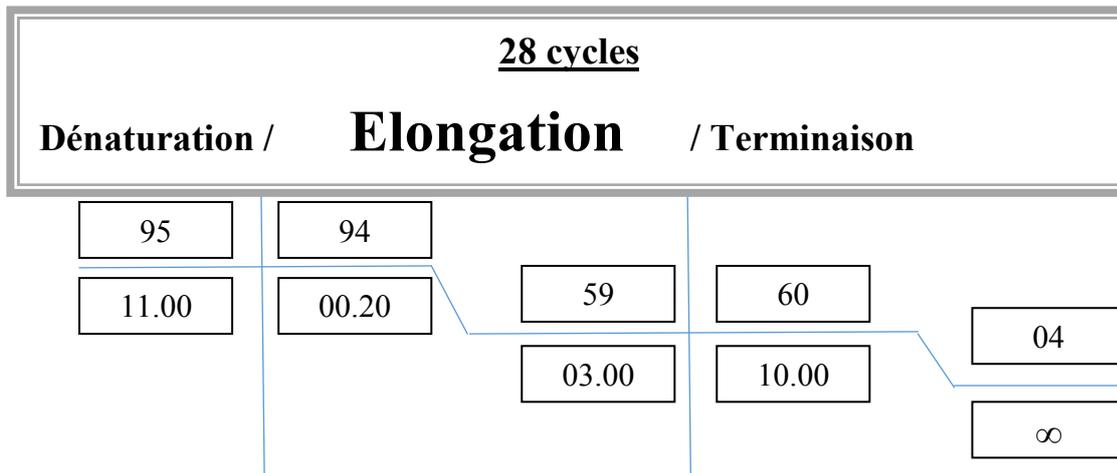
La figure 13, représente la configuration de la plaque de 96 puits compatible avec le thermocycleur 9700 ABI, dont nous ajoutons le Mix et les échantillons, et le blanc 1,2 et 3 représentent les témoins négatifs des 03 séries d'extraction.

Ajouter 15ul du Mix + 10ul d'échantillon dans tous les puits (25 puits = 21 échantillons y compris 03 blancs + (Témoin+) + (Témoin -) + 02 échantillons en plus)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Jean-	Tap2	Ec1									
B	Jean1	Tcp-	Ec2									
C	Jean2	Tcp1	Blanc1									
D	Mt-	Tcp2	Blanc2									
E	Mt1	Che-	Blanc3									
F	Mt2	Che1	T+									
G	Tap-	Che2	T-									
H	Tap1	Ec-										

**Figure 13** : Configuration de la plaque de 96 puits du thermocycleur 9700 ABI.

Ensuite, Mettre la plaque dans le thermocycleur 9700 gold, choisir le programme adequat et lancer l'instrument dont le programme se deroule comme suit :



**Figure 14 : Protocole de travail du thermocycleur 9700 ABI.**

L'amplification des STR, se déroule en trois étapes à l'aide du thermocycleur 9700

Etape1 : La dénaturation des deux brins d'ADN dans une température de 95°C pendant 11 minutes.

Etape2 : L'élongation qui nécessite deux phases :

- Phase 1 s'effectue à une température de 94°C pendant 20 seconde.
- Phase 2 s'effectue à 59°C pendant 03 minutes.

Etape 3 : La terminaison, qui s'effectue à 60°C pendant 10 minutes suivi d'un refroidissement à 04°C.

**V- Etape de post – PCR :**

**V-1. Réactifs et solutions :**

<b>Formamide + Gene Scan Liz 500</b>
<b>Pop 4 + Buffer + Allelic leader</b>
<b>Eau ultra pure</b>

## V-2. Matériel et équipements :

<b>Hotte de protection</b>
<b>Plaque 96 puits + pipettes eppendorfs + etips + tube de 2ml</b>
<b>Cross linker + vortex + support de la plaque de 96 puits</b>
<b>Septa + portoir + Papier de protection de surface + cryobloc</b>
<b>Sequencieur 3130 xl avec 16 capillaires d'applied biosystems</b>
<b>Ordinateur connecté avec le sequencieur 3130 xl avec un logiciel Genne Mapper d'applied biosystems, version 3.2 + Onduleur</b>

## V-3. Méthode :

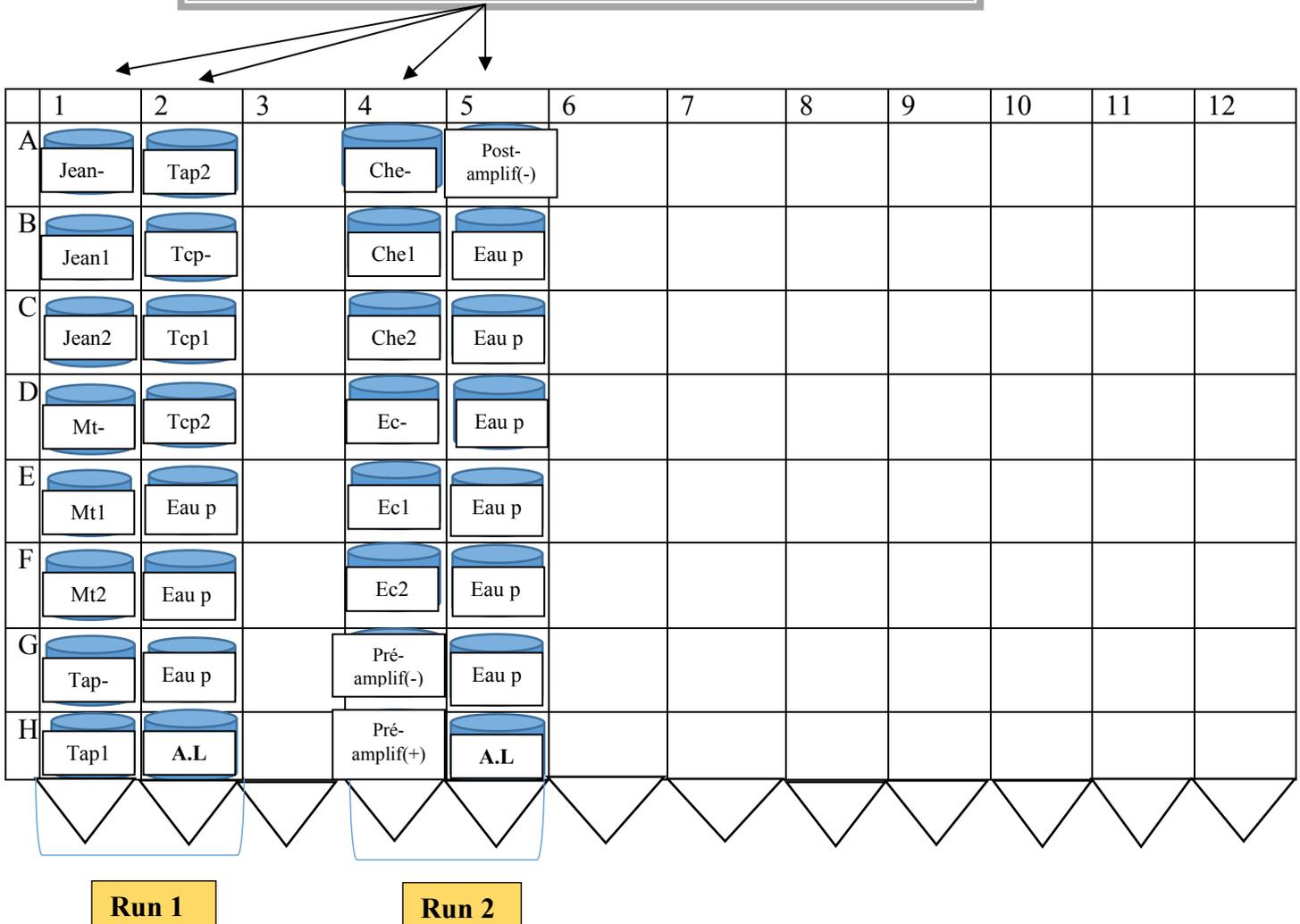
V-3-1. Préparation du Mix : Cette préparation est expliquée dans le tableau X.

**Tableau X : Préparation du Mix de post PCR.**

<b>Mix</b>	<b>Volume totale</b>
$\{(8,7\text{ul formamide}) \times (N)\} + \{(0,3\text{ul de Liz 500}) \times (N)\} / N : \text{ nombres des échantillons} = 26 \text{ (18 échantillons, T1-, T2-, T+ et 03 Allelic leader) } + 2 \text{ (pour l'erreur de pipetage).} / N = 26$	$V \text{ totale} = (8,7\text{ul} \times 26) + (0,3\text{ul} \times 26) = 234 \text{ ul}$

Après la preparation du Mix, nous préparons la plaque de 96 puits compatible avec l'autosampler du sequencieur 3130 xl à 16 capillaires, par l'ajout de 09 ul du Mix et 01 ul d'échantillon dans chaque puits selon le nombre des échantillons et nous laissons la colonne 03 vide entre les colonnes 1 et 2 et la colonne 4 et 5 pour éviter les contaminations durant la manipulation. La répartition des échantillons est représentée dans la figure 15.

Mettre **09ul** du Mix (formamide + Liz 500) + **01ul** d'échantillons dans chaque puits correspondant, indiqués ci-dessous dans la configuration de la plaque de 96 puits. (Colonne 1, 2, 4, 5).



**Figure 15 : Configuration de la plaque 96 puits du séquenceur 3130 xl.**

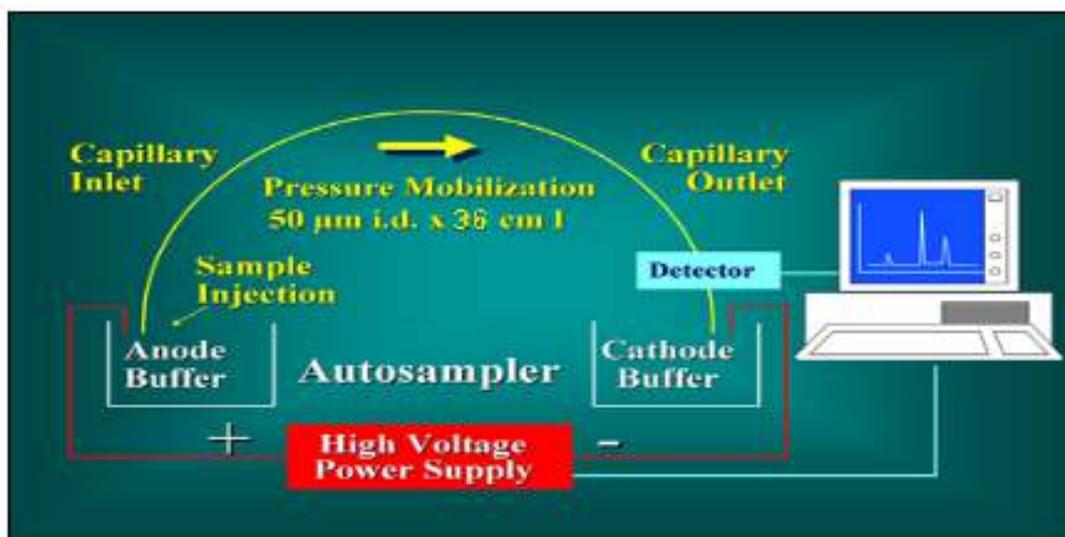
Après la préparation de la plaque, la mettre dans le séquenceur et lancer l'analyse. Les puits vides doivent être remplis par l'eau pure, pour éviter les problèmes de décalage de lecture des résultats par le logiciel de Gene - Mapper. ID V3.2. L'analyse dure environ 45 minutes pour le run qui englobe les 16 premiers échantillons (A1 – H2) à la fois y compris l'eau pure, puis une 45 minutes pour le deuxième run qui englobe les autres 16 échantillons (A4 – H5) y compris l'eau pure aussi.

### V-3.2. Séparation des fragments ADN par l'électrophorèse :

Après amplification, les fragments d'ADN amplifiés sont séparés par électrophorèse dans des capillaires placés dans un séquenceur 3130 xl (Applied Biosystems) à 16 capillaires. Les produits PCR migrent selon leurs tailles dans ces capillaires sous l'influence d'un champ électrique.

Le capillaire est un tube en verre très fin de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre et de 36 cm de long, recouvert d'un polyamide opaque sauf dans la région de la détection, rempli de solution visqueuse d'un polymère POP 4 (Performance Optimized Polymere 4), qui agit comme un gel en créant un environnement de tamisage pour des molécules d'ADN (la vitesse de migration étant inversement proportionnelle à la taille des molécules).

Après injection, une haute tension (15000 volts) est appliquée à travers le capillaire afin de séparer les fragments d'ADN en quelques minutes. Les fragments liés aux marqueurs fluorescents sont, lors de leur passage, excités par un laser et la lumière est captée par un détecteur (Figure 16).



**Figure16 : Déroulement de l'électrophorèse capillaire.**

**(Applied Biosystems, 2001)**

Le séquenceur est relié à un ordinateur auquel sont transférés les données brutes de l'analyse électrophorétique, puis grâce à un logiciel performant appelé "Gene Mapper" les données de l'électrophorèse capillaire sont analysées et validées, pour obtenir à la fin un profil génétique.

Les données du produit amplifié sont superposées au Ladder, un produit déjà amplifié par la firme et qui renferme le maximum d'informations sur les allèles trouvés pour chaque marqueur dans la population humaine. Chaque individu possède ainsi soit un allèle (homozygote) soit deux allèles (hétérozygote) pour chaque marqueur, issu de ses parents.

### V-3.3. Validation des profils génétiques :

La détection des différents marqueurs a lieu par excitation au laser des molécules marquées par un fluorochrome et passant dans les capillaires. Les molécules marquées réémettent une fluorescence qui est détectée par une caméra spécifique 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 "Gene Mapper" ID V3.2.

La validation des résultats se fait selon les étapes suivantes :

1/- Assemblage des données. 2/- Identification des pics. 3/- Détermination de la taille des molécules. 4/- Séparation par couleurs (fluorochromes). 5/- Comparaison au Ladder allélic. 6/- Assignment de la nomenclature de chaque allèle. 7/- Validation des profils obtenus par un analyste.

Les résultats sont obtenus sous forme de profils, dont chacun comporte plusieurs pics correspondants aux allèles détectés, selon le spectre de longueur d'ondes. Chacun des fluorochromes est représenté par une couleur : FAM (bleu), VIC (vert), PET (rouge), LIZ (orange) et NED (jaune), le but étant d'éviter le chevauchement des fragments d'ADN qui possèdent le même poids moléculaire au moment de l'électrophorèse capillaire.

Les 16 loci STRs marqués par les fluorophores sont :

- Bleu pour D8S1179, D21S11, D7S820 et CSF1PO
- Vert pour D3S1358, THO1, D13S317, D16S539 et D2S1338
- Jaune pour D19S433, VWA, TPOX et D18S51
- Rouge pour AML, D5S818 et FGA.

## **Chapitre III : Résultats et interprétations**

## I- Résultats de la quantification :

### I-1. Protocole de travail :

Le protocole de travail du logiciel du thermocycleur 7500 ABI est programmé avant l'analyse, par la fixation du volume d'échantillons à 25 ul, puisque nous avons mis dans la plaque de quantification 23 ul du Mix et 02 ul d'échantillon dans chaque puits. La durée de l'analyse est environ 01 heures et 45 minutes.

La figure ci-dessous, montre les cycles thermiques du protocole d'analyse qui passe par 02 étapes :

Etape 1 : Un seul cycle qui dure 10 minutes pour augmenter la température à 95°C.

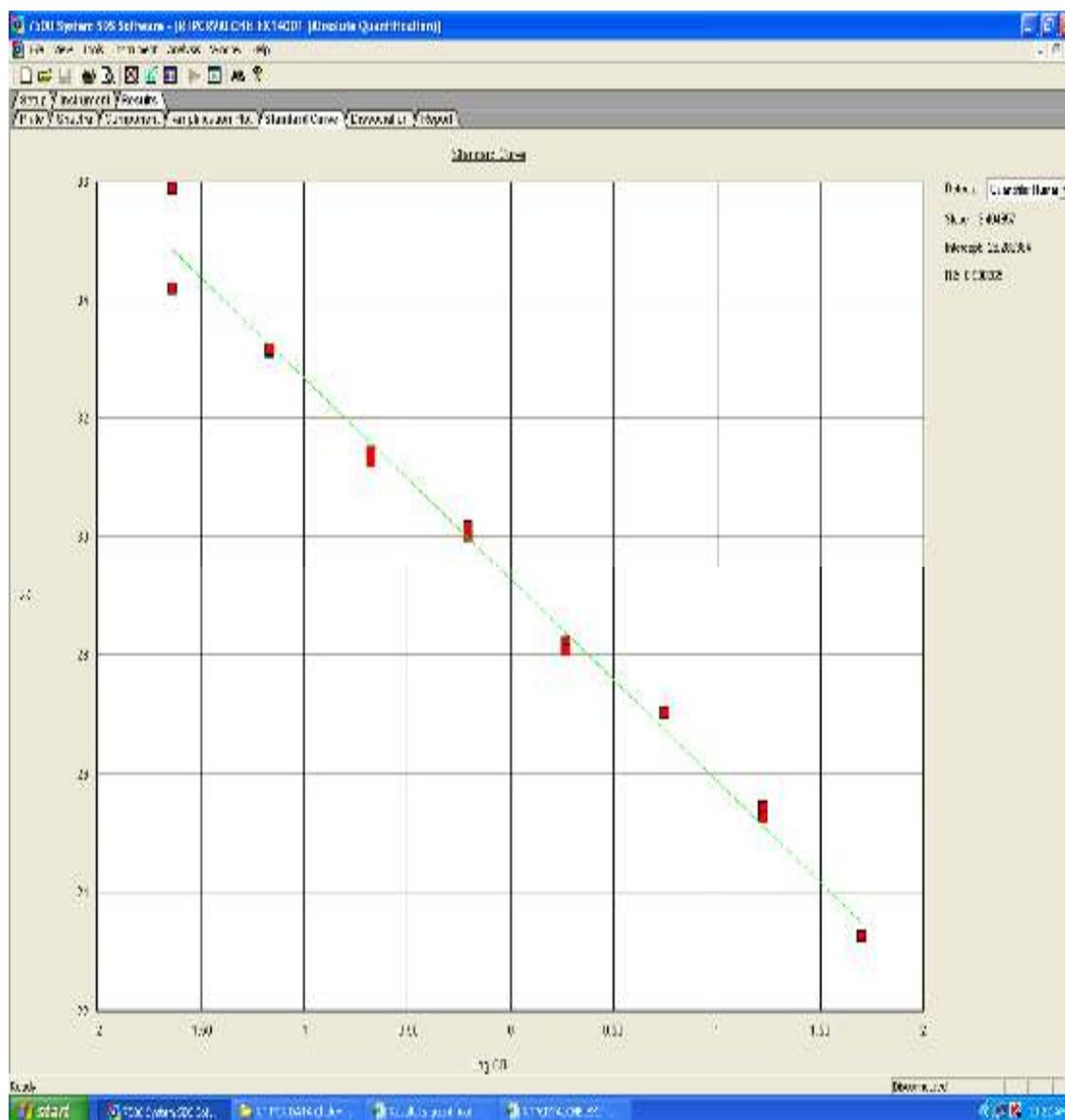
Etape 2 : 40 cycles, dont chaque cycle à 02 partie ; La première, dure 15 seconde à 95°C, et la deuxième, dure 01 minutes à 60°C (**User guide Quantifiler Kits. 2004**).



**Figure 17 : Protocole de travail du logiciel du thermocycleur 7500 ABI.**

## **I-2.La courbe des standards :**

La droite standard va représenter les valeurs de Ct obtenues expérimentalement en fonction du log des concentrations en molécules cibles fixées, issues de séries de dilutions d'un échantillon standard. La valeur de Ct est inversement proportionnelle au log base 10 de la concentration initiale en molécules cibles (**James et al, 2006**).



**Figure 18 : La courbe des standards.**

Après l'établissement de cette courbe, nous assemblons les quantités d'ADN des échantillons à partir des résultats brutes du logiciel de l'instrument 7500 ABI dans le tableau XI, qui représente les Ct et les concentrations des 18 échantillons issus de l'extraction par la méthode Chelex.

**Tableau XI : Résultats des quantités d'ADN des échantillons de la quantification.**

paramètres		Ct	Concentration d'ADN (ng / ul)
Echantillons			
Jean-		39,06	1,34E-03
Jean1		27,28	3,86
Jean2		27,09	4,38
Mt-		38,64	1,79E-03
Mt1		28,51	1,68
Mt2		28,53	1,66
Tap-		27,05	<b>Pas de résultat</b>
Tap1		27,2	4,08
Tap2		27,14	4,24
Tcp-		27,07	<b>Pas de résultat</b>
Tcp1		28,68	1,5
Tcp2		27,86	2,62
Che-		37,43	4,04E-03
Che1		29,01	1,2
Che2		28,73	1,45
Ec-		27,04	<b>Pas de résultat</b>
Ec1		27,38	3,61
Ec2		26,92	4,93

Nos résultats obtenus après la dilution des échantillons issus de la quantification d'ADN sont indiqués dans le tableau suivant :

**Tableau XII : Quantités d'ADN des échantillons de la quantification après les dilutions.**

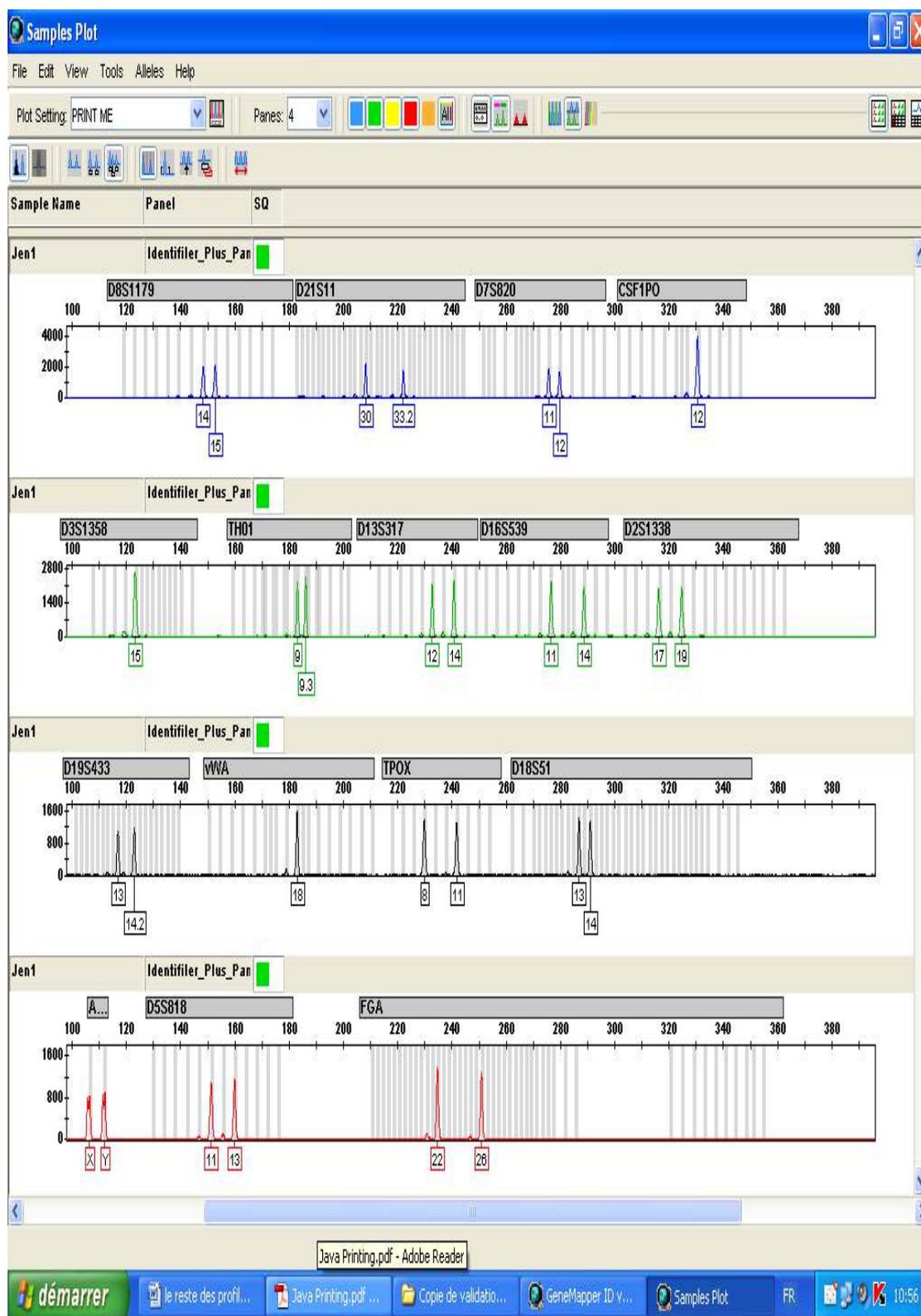
Paramètres		Ct	Dilutions des échantillons
Echantillons			
Jean1		27,28	39 (1ng ADN + 38 ul eau pure)
Jean2		27,09	44 (1ng ADN + 43 ul eau pure)
Mt1		28,51	17 (1ng ADN + 16 ul eau pure)
Mt2		28,53	17 (1ng ADN + 16 ul eau pure)
Tap1		27,2	41 (1ng ADN + 40 ul eau pure)
Tap2		27,14	43 (1ng ADN + 42 ul eau pure)
Tcp1		28,68	15 (1ng ADN + 14 ul eau pure)
Tcp2		27,2	26 (1ng ADN + 25 ul eau pure)
Che1		27,86	12 (1ng ADN + 11 ul eau pure)
Che2		28,73	15 (1ng ADN + 14 ul eau pure)
Ec1		27,38	36 (1ng ADN + 35 ul eau pure)
Ec2		26,92	49 (1ng ADN + 48 ul eau pure)

## II- Résultats de profilage d'ADN par les STR :

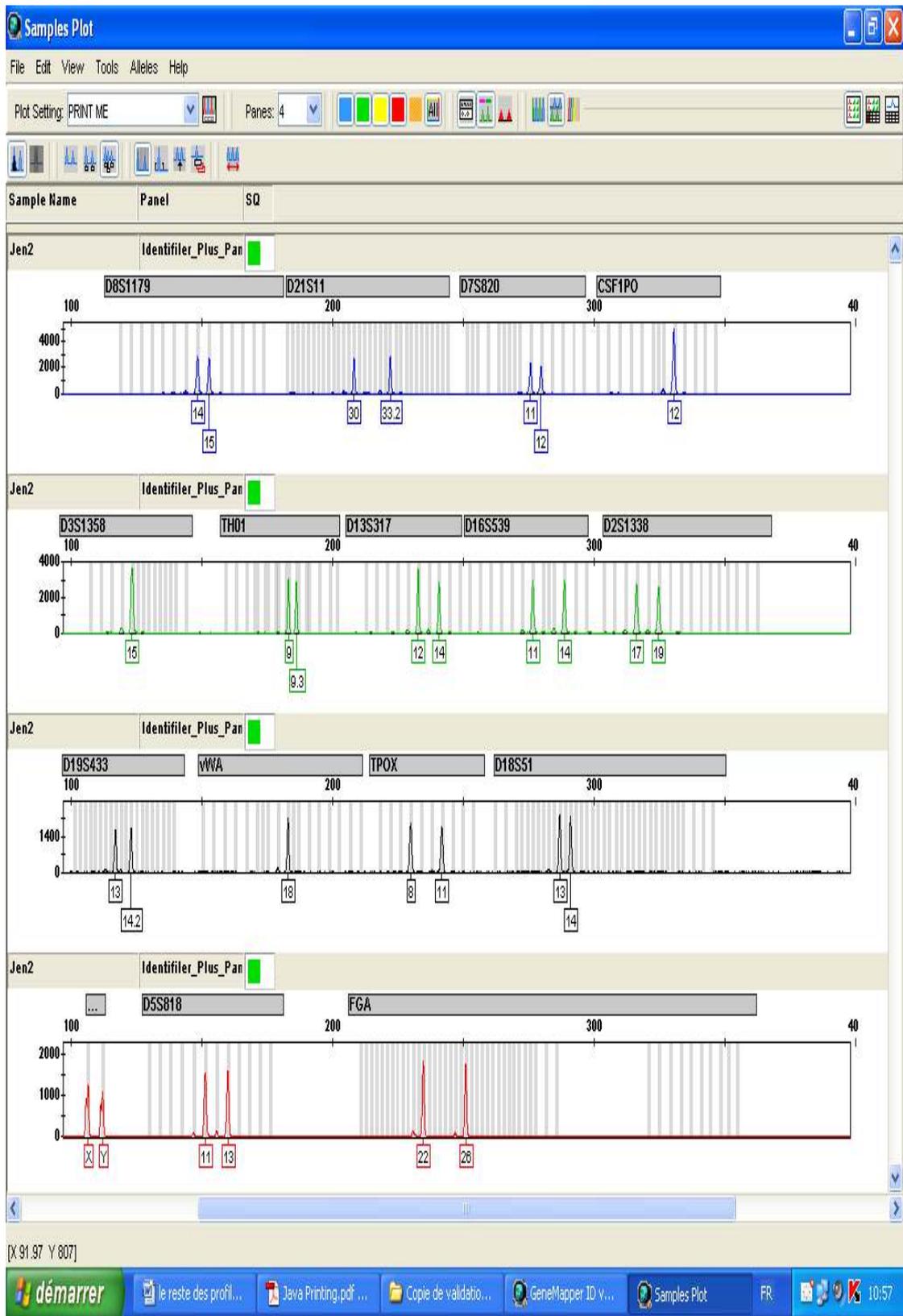
Dans cette étapes nous exposons les différents profils ADN des différents tissus d'étude qui sont obtenues à l'aide du séquenceur 3130 xl à 16 capillaires et son logiciel Gene – Mapper IDV3.2, sachant que nous avons utilisés l'identifier plus comme Kit d'amplification des STR



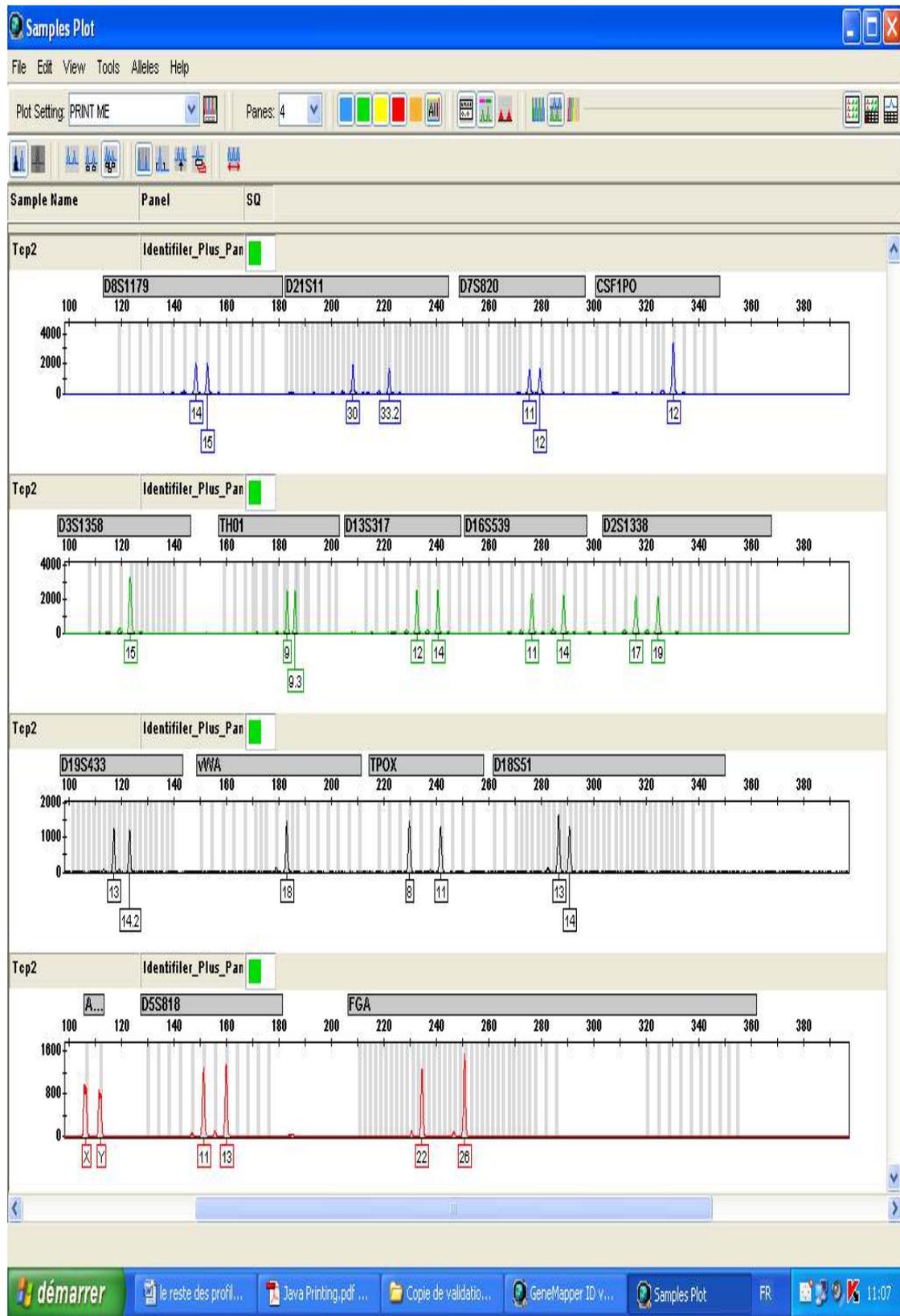
**Figure 19** : profil ADN de jean (-).



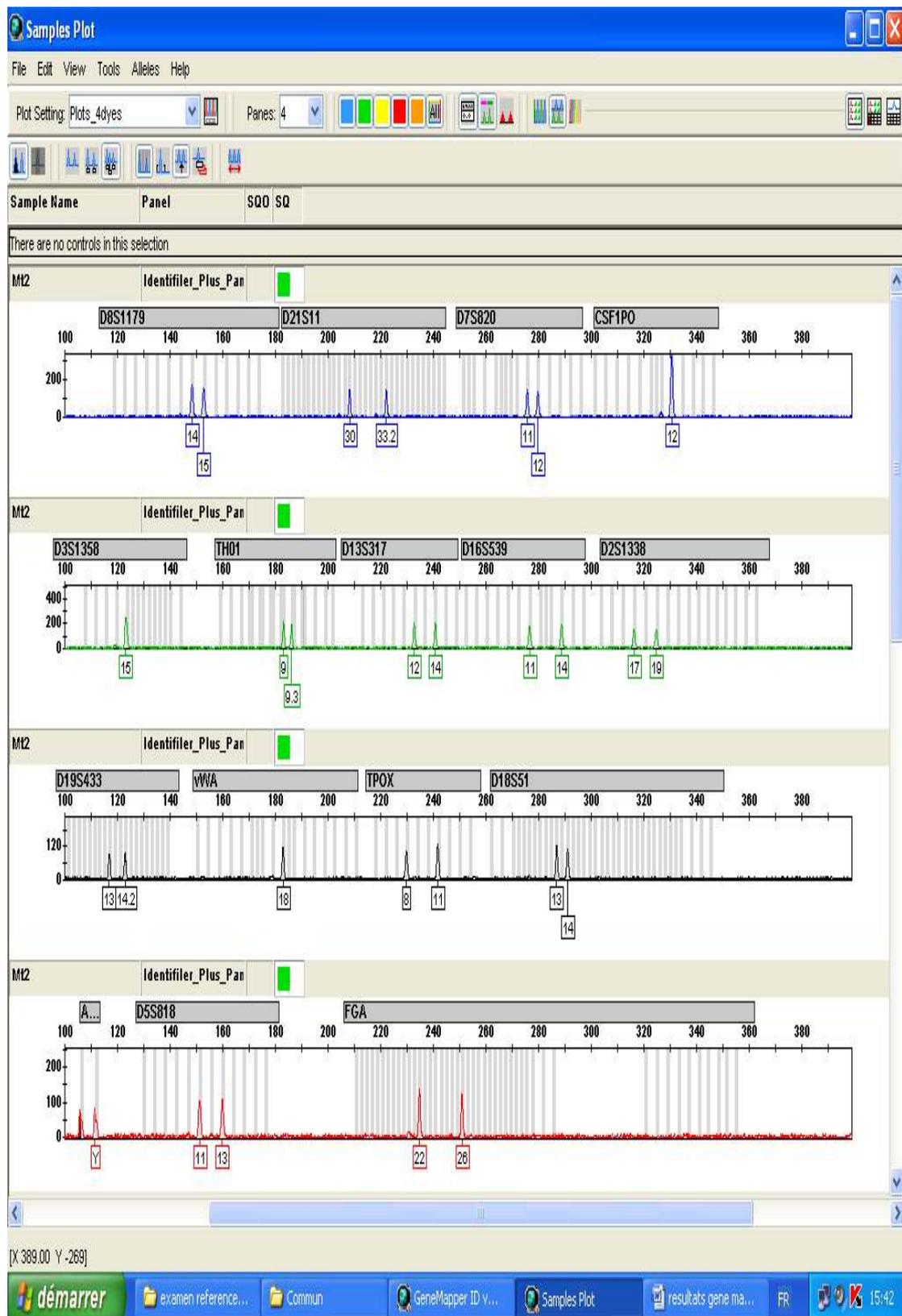
**Figure 20 : profil ADN de jean 1.**



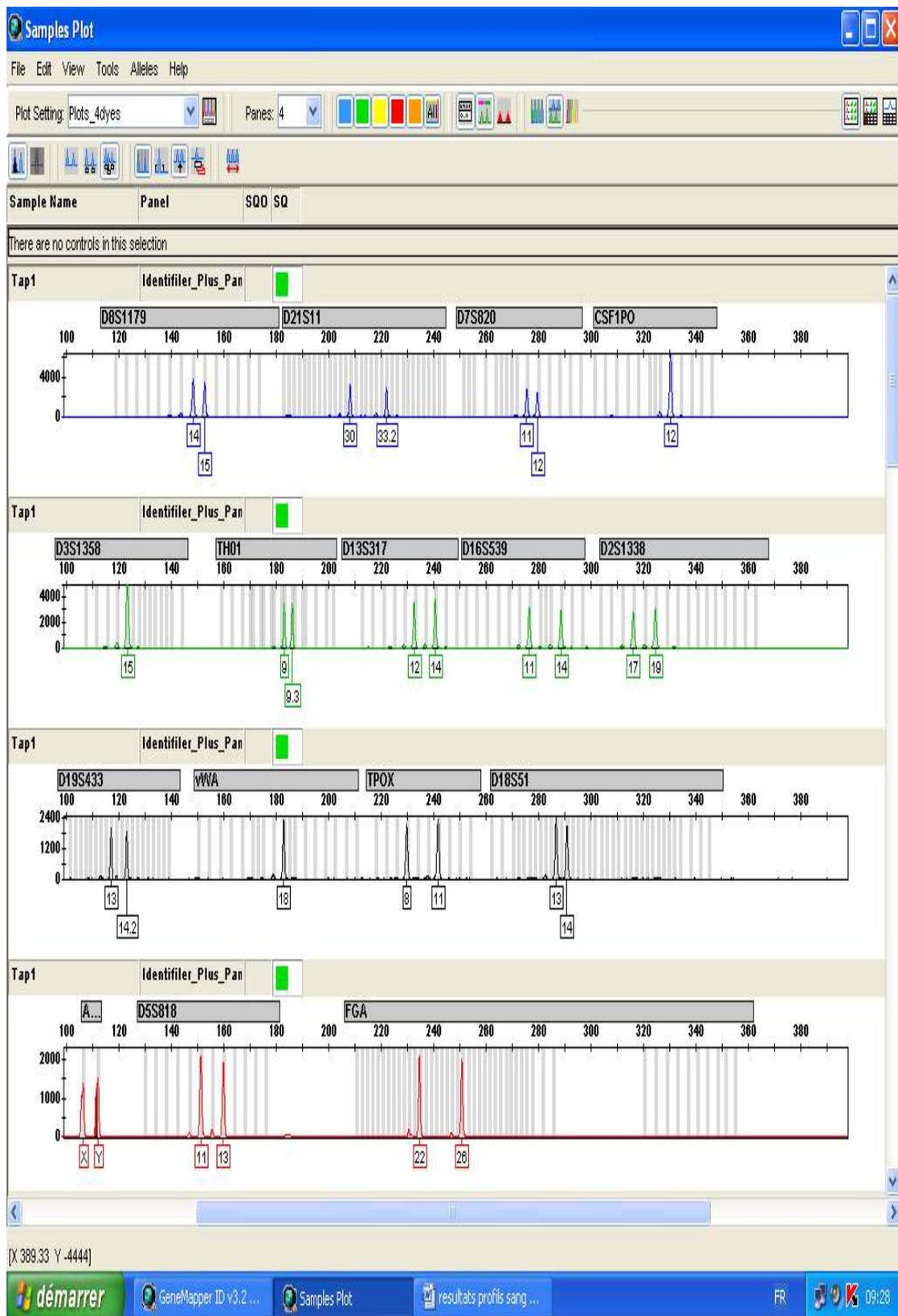
**Figure 21 : profil ADN de sang sur tissu de jean 2.**



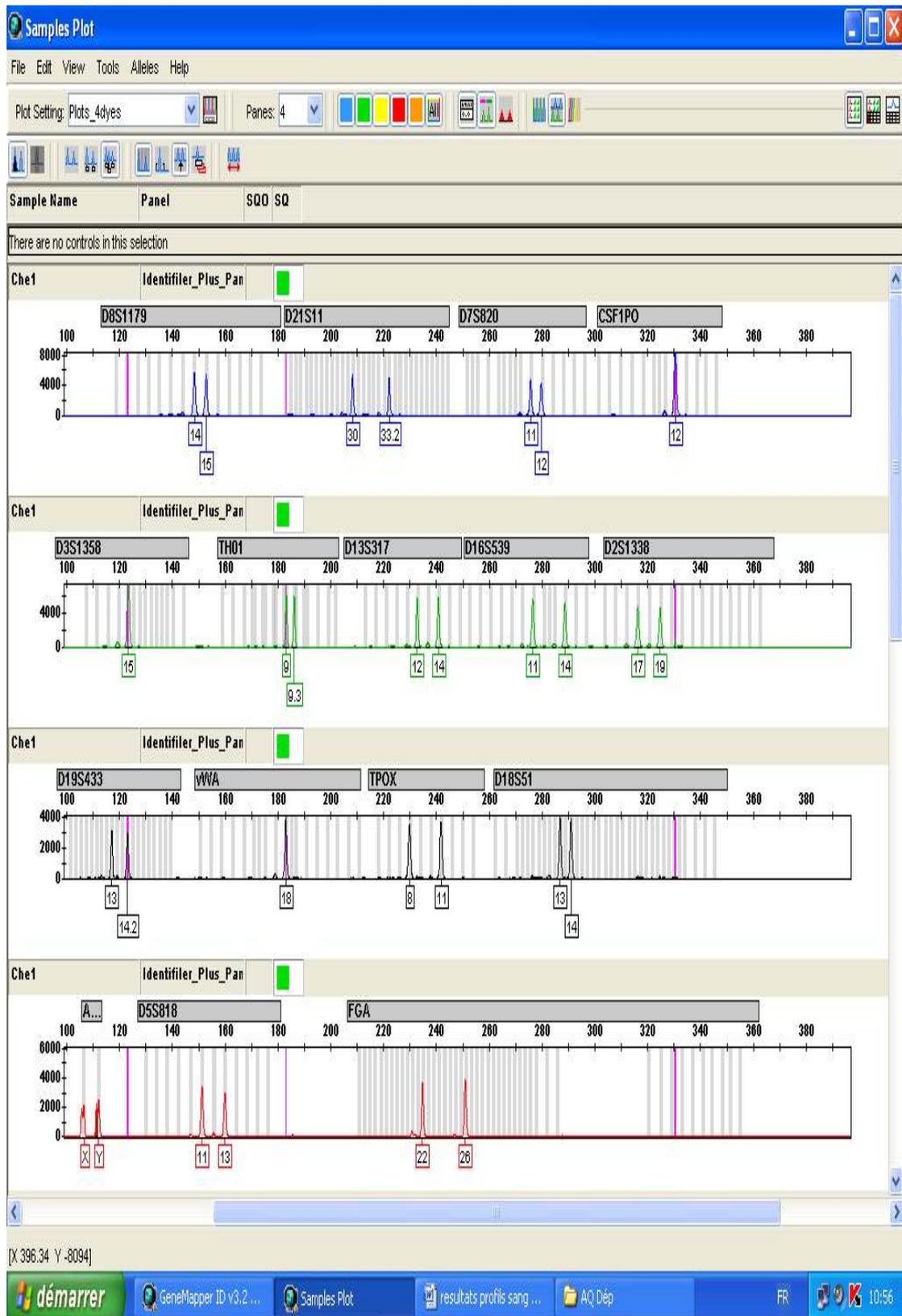
**Figure 22 : profil ADN de sang sur tissu de tricot de peau 2.**



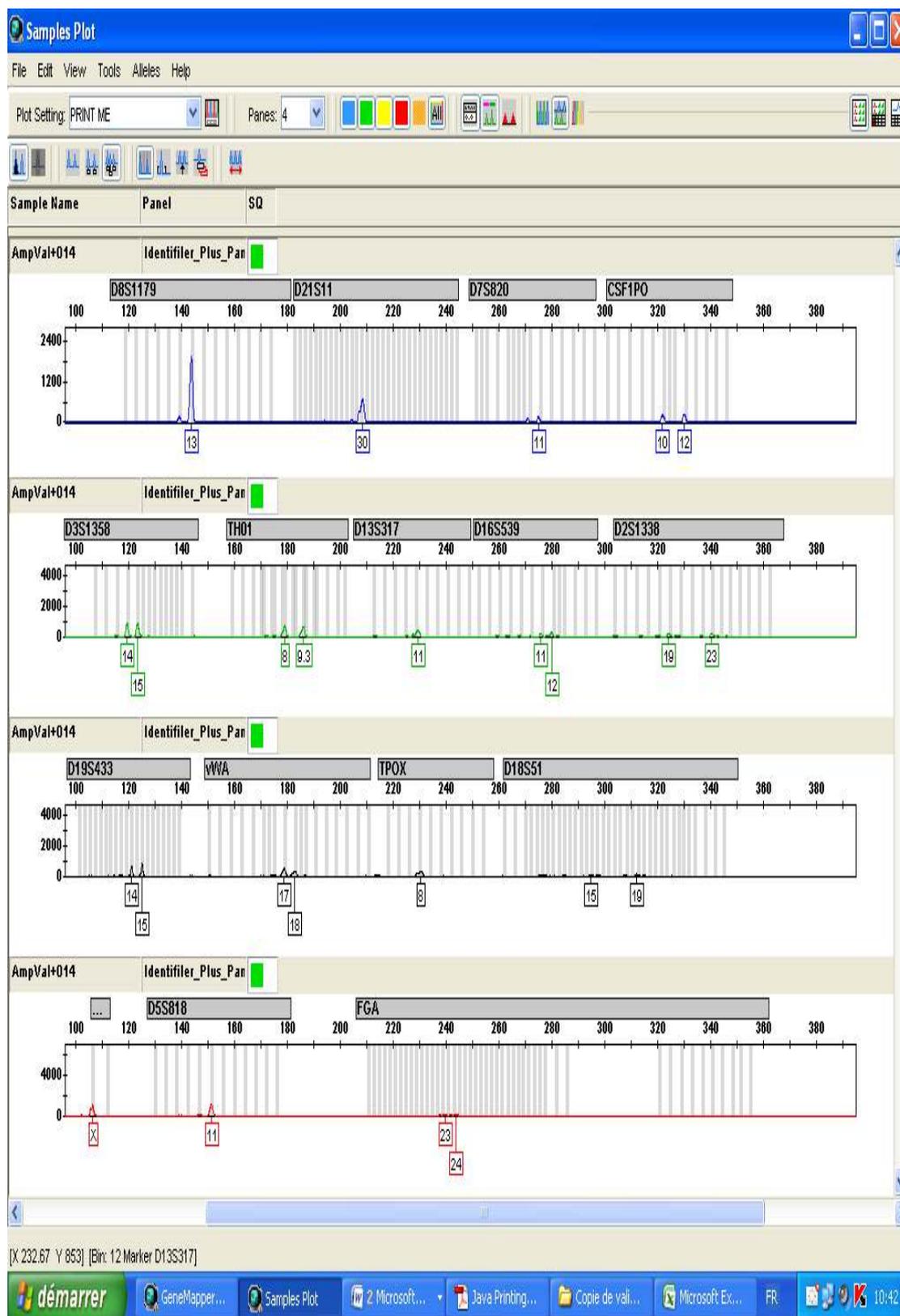
**Figure 23 : profil ADN de sang sur tissu du manteau 2.**



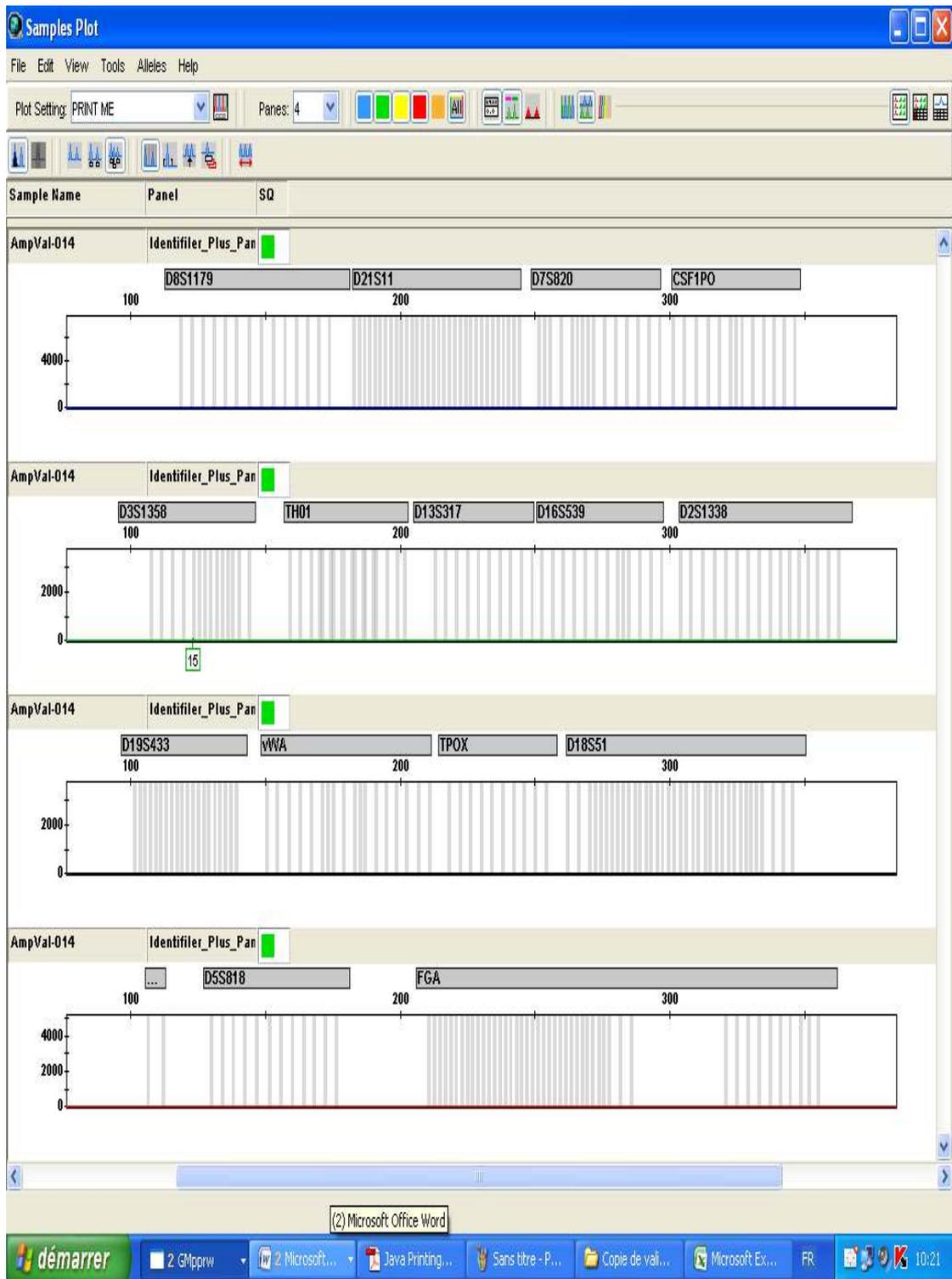
**Figure 24** : profil ADN de sang sur tissu du tapis de voiture 1.



**Figure 25: profil ADN de sang sur tissu du chemisier 1**



**Figure 26 :** Profil génétique du contrôle positif, obtenu après réalisation de la co-amplification des 15 loci STRs, ainsi que du locus amélogénine (inclus dans le kit AmpFISTR Identifiler plus®).



**Figure 27** : Profil génétique du témoin négatif, obtenu après réalisation de la co-amplification des 15 loci STRs, ainsi que du locus amélogénine (inclus dans le kit AmpFISTR Identifiler plus®).



### III- Interprétation des résultats du profilage des STR :

Les tableaux suivants, représentent les différents 16 marqueurs qui constituent le graphe d'un profil ADN, les allèles de chaque marqueur et dernièrement, l'hauteur des pics correspondants aux allèles, dont chaque marqueur est défini par un seul chiffre. Par exemple (allèle 15 du marqueur D3S1358) s'il est homozygote donc un seul pic, ou bien hétérozygotes (allèle 12 et 14 du marqueur D13S317). donc les deux allèles sont représentés par deux pics.

Les hauteurs qui représentent les extrémités de la fourche des hauteurs pour chaque tissu sont colorées en jaune dans les tableaux correspondants.

Les marqueurs (D8S1179 – FGA), sont représentés par 04 couleurs différentes pour les distinguer dans le graphe de profil et faciliter la lecture et la comparaison des résultats.

**Tableau XIII : Les marqueurs de profil ADN du manteau 2.**

Tissu	Marqueur	Allèle 1	Allèle 2	Hauteur d'allèle 1 (RFU)	Hauteur d'allèle 2 (RFU)
Mt2	<b>D8S1179</b>	14	15	168	155
Mt2	<b>D21S11</b>	30	33.2	145	141
Mt2	<b>D7S820</b>	11	12	144	134
Mt2	<b>CSF1PO</b>	12		<b>333</b>	
Mt2	<b>D3S1358</b>	15		254	
Mt2	<b>TH01</b>	9	9.3	215	193
Mt2	<b>D13S317</b>	12	14	205	200
Mt2	<b>D16S539</b>	11	14	175	193
Mt2	<b>D2S1338</b>	17	19	149	151
Mt2	<b>D19S433</b>	13	14.2	88	94
Mt2	<b>vWA</b>	18		116	
Mt2	<b>TPOX</b>	8	11	104	127
Mt2	<b>D18S51</b>	13	14	121	111
Mt2	<b>AMEL</b>	X	Y	<b>82</b>	86
Mt2	<b>D5S818</b>	11	13	105	109
Mt2	<b>FGA</b>	22	26	139	122

**Tableau XIV : Les marqueurs de profil ADN du chemisier 1.**

Tissu	Marqueur	Allèle 1	Allèle 2	Hauteur d'allèle 1 (RFU)	Hauteur d'allèle 2 (RFU)
Che1	D8S1179	14	15	5743	5374
Che1	D7S820	11	12	5363	4998
Che1	D21S11	30	33.2	4806	4336
Che1	CSF1PO	12		<b>8384</b>	
Che1	D3S1358	15		7398	
Che1	TH01	9	9.3	6368	5904
Che1	D13S317	12	14	5820	5783
Che1	D16S539	11	14	5656	5128
Che1	D2S1338	17	19	4777	4617
Che1	D19S433	13	14.2	3088	3001
Che1	vWA	18		4065	
Che1	TPOX	8	11	3501	3592
Che1	D18S51	13	14	4013	3791
Che1	AMEL	X	Y	<b>2197</b>	2472
Che1	D5S818	11	13	3401	3004
Che1	FGA	22	26	3703	3923

**Tableau XV : Les marqueurs de profil ADN du jean 2.**

Tissu	Marqueur	Allèle 1	Allèle 2	Hauteur d'allèle 1 (RFU)	Hauteur d'allèle 2 (RFU)
Jen2	D8S1179	14	15	2881	2700
Jen2	D21S11	30	33.2	2701	2783
Jen2	D7S820	11	12	2275	2059
Jen2	CSF1PO	12		<b>4937</b>	
Jen2	D3S1358	15		3684	
Jen2	TH01	9	9.3	3076	2888
Jen2	D13S317	12	14	3620	2844
Jen2	D16S539	11	14	2993	2981
Jen2	D2S1338	17	19	2762	2575
Jen2	D19S433	13	14.2	1629	1705
Jen2	vWA	18		2096	
Jen2	TPOX	8	11	1867	1769
Jen2	D18S51	13	14	2241	2161
Jen2	AMEL	X	Y	1250	<b>1082</b>
Jen2	D5S818	11	13	1555	1595
Jen2	FGA	22	26	1861	1760

**Tableau XVI :Les marqueurs de profil ADN de tapis de voiture 1.**

Tissu	Marqueur	Allèle 1	Allèle 2	Hauteur d'allèle 1 (RFU)	Hauteur d'allèle 2 (RFU)
Tap1	<b>D8S1179</b>	14	15	3754	3400
Tap1	<b>D21S11</b>	30	33.2	3187	2974
Tap1	<b>D7S820</b>	11	12	2736	2426
Tap1	<b>CSF1PO</b>	12		<b>6184</b>	
Tap1	<b>D3S1358</b>	15		4955	
Tap1	<b>TH01</b>	9	9.3	3456	3469
Tap1	<b>D13S317</b>	12	14	3558	3819
Tap1	<b>D16S539</b>	11	14	3239	2991
Tap1	<b>D2S1338</b>	17	19	2770	3025
Tap1	<b>D19S433</b>	13	14.2	2001	1847
Tap1	<b>vWA</b>	18		2299	
Tap1	<b>TPOX</b>	8	11	2098	2298
Tap1	<b>D18S51</b>	13	14	2416	2037
Tap1	<b>AMEL</b>	X	Y	<b>1377</b>	1539
Tap1	<b>D5S818</b>	11	13	2107	1929
Tap1	<b>FGA</b>	22	26	2103	2020

**Tableau XVII :Les marqueurs de profil ADN de tricot de peau 2.**

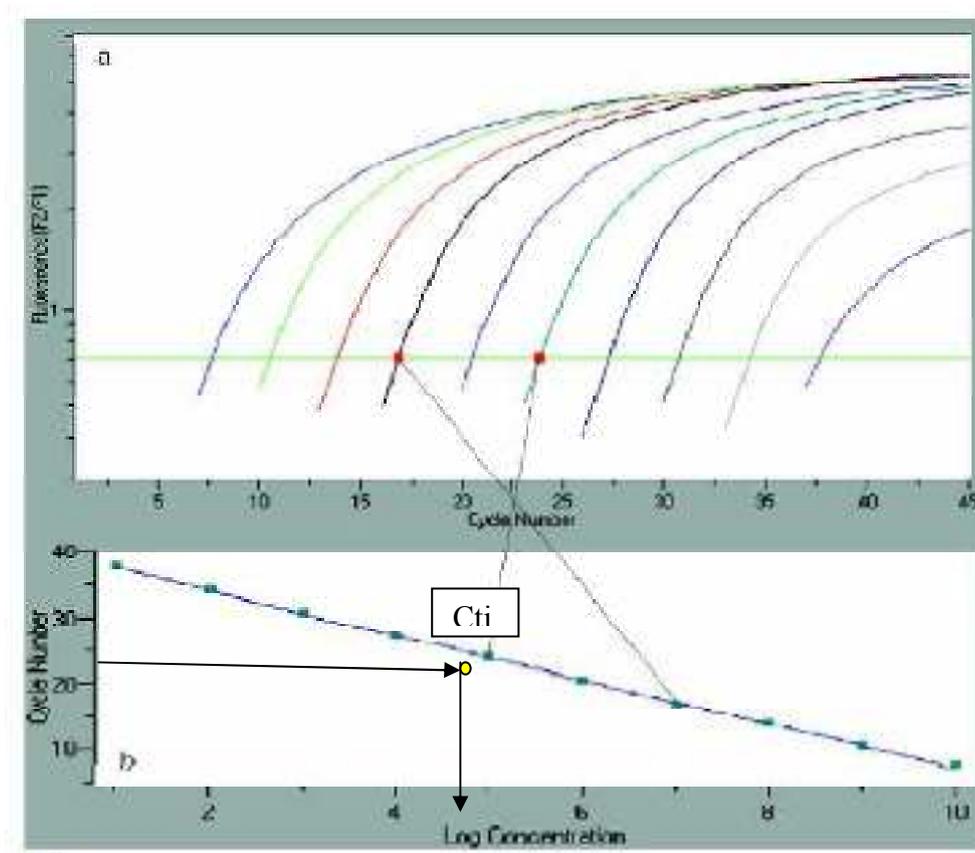
Tissu	Marqueur	Allèle 1	Allèle 2	Hauteur d'allèle 1 (RFU)	Hauteur d'allèle 2 (RFU)
Tcp2	<b>D8S1179</b>	14	15	2022	1961
Tcp2	<b>D21S11</b>	30	33.2	1915	1986
Tcp2	<b>D7S820</b>	11	12	1614	1622
Tcp2	<b>CSF1PO</b>	12		<b>3400</b>	
Tcp2	<b>D3S1358</b>	15		3306	
Tcp2	<b>TH01</b>	9	9.3	2466	2500
Tcp2	<b>D13S317</b>	12	14	2535	2531
Tcp2	<b>D16S539</b>	11	14	2335	2221
Tcp2	<b>D2S1338</b>	17	19	2170	2122
Tcp2	<b>D19S433</b>	13	14.2	1256	1227
Tcp2	<b>vWA</b>	18		1450	
Tcp2	<b>TPOX</b>	8	11	1442	1286
Tcp2	<b>D18S51</b>	13	14	1674	1313
Tcp2	<b>AMEL</b>	X	Y	923	<b>814</b>
Tcp2	<b>D5S818</b>	11	13	1270	1350
Tcp2	<b>FGA</b>	22	26	1262	1529

## **Chapitre IV : Discussion**

## I. Discussion de la quantification :

Durant notre travail, nous avons pu recueillir les résultats indiqués préalablement dans la courbe des standards et le tableau XI, qui représente les différentes quantités des échantillons, issus de l'extraction par la méthode Chelex. Ces résultats sont obtenus grâce à la PCR en temps réel, réalisée par le thermocycleur 7500 ABI.

Tout d'abord, la courbe d'étalonnage (courbe des standards), est utilisée comme une référence pour calculer la quantité en ADN de nos échantillons d'étude. Le Ct obtenu à partir d'un échantillon de concentration inconnue va ainsi être traduit en concentration en molécules cibles grâce à la droite standard.



**Figure 29** : La courbe des standards et les cycles d'amplification de la quantification d'ADN (Huggett et al, 2013).

Un échantillon standard a été dilué en série. Les Ct obtenus (points rouges) sont reportés en fonction des logs des concentrations relatives du standard : on établit ainsi une droite standard (points verts de la fig. b). Une fois la courbe standard établie, les Ct des échantillons inconnus sont convertis en concentrations.

Le Ct obtenu à partir d'un échantillon inconnu (C<sub>t</sub> en jaune) permettra, lorsqu'il sera reporté sur la droite, d'obtenir le log de la concentration en molécules cibles de cet échantillon (**James et al, 2006**).

Nous avons obtenus des quantités différentes d'ADN en nanogramme pour les 06 tissus textiles, dont la plus grande quantité est celle d'écouvillon de 4,93 ng, suivie de tissu de jean avec 4,38 ng. En revanche, la petite quantité est celle du chemisier avec 1,2 ng et le tricot de peau avec 1,5 ng.

Pour les tissus qui sont utilisés comme des témoins négatifs, nous avons obtenus des quantités minimales d'où normalement, nous ne trouvons aucune quantité d'ADN puisque les tissus ne contiennent pas de sang.

Donc ces résultats nous confirment que nous avons effectué des contaminations lors du pipetage et la préparation de la plaque optique de 96 puits du thermocycleur 7500 ABI

Les deux échantillons utilisés comme témoin négatif sont le jean avec 1,34E-03 ng et le manteau avec 1,79E-03 ng.

Dans les résultats de quantification le dévoilement de la concentration de chaque échantillon nécessite une coordination entre les résultats de la courbe des standards et la courbe d'amplification, dont le Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique.

Le Ct représente chaque cycle de la PCR et représente la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond.

Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct ou Threshold cycle) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en le comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues (**Bustin, 2000**).

Cette description confirme nos résultats. Par exemple :

- L'échantillon de jean 1 de quantité égale à 3,86 ng et jean 2 égale à 4,38 ng. Le Ct correspondant égale à 26,74 et 26,81 respectivement. Par contre, une petite quantité d'ADN, comme l'échantillon du manteau qui est égale à 1,68 ng correspond à un Ct égal à 27,38.

Les résultats de la quantification représentés dans le tableau XI, sont soumis à des dilutions des quantités d'ADN des différents échantillons puisque les conditions du travail avec le kit d'amplification Identifier plus, nous exige d'utiliser 1 ng / ul d'ADN pour chaque échantillon pour avoir des profils d'ADN interprétable. Donc les dilutions sont effectuées comme suit :

**1- Pour les concentrations qui sont supérieures à 0,1 ng / ul d'ADN :**

Exemple de tissu du jean 1 ; quantité d'ADN = 3,86 ng, donc :

$$\begin{array}{l}
 X \quad 3,86 \text{ ng} \quad \begin{array}{l} \longrightarrow \\ \longrightarrow \end{array} \quad \left. \begin{array}{l} 1 \text{ ul} \\ 10 \text{ ul} \end{array} \right\} \longrightarrow X = \frac{10 \text{ ul} \times 3,86 \text{ ng}}{1 \text{ ng}}
 \end{array}$$

X = 38,6 ng / 10 ul, X égale environ 39 ng / 10 ul. Donc, dans 10 ul, nous prenons 1 ng d'ADN + 38 ul d'eau pure dans le puits correspondant dans la plaque de 96 puits compatible avec le thermocycleur 9700 ABI.

Dans notre étude, nous n'effectuons que des dilutions puisque tous les résultats de quantification des échantillons d'analyse sont supérieurs à 1 ng d'ADN et par conséquent une concentration de 1 ng / ul.

**2- Pour les concentrations des échantillons qui sont inférieures à 0,1ng / ul d'ADN :**

Nous devons effectuer des concentrations d'ADN. Par exemple :

Si nous constatons une quantité de 0,02 ng, Donc :

$$\begin{array}{ccc}
 0,02 \text{ ng} & \longrightarrow & 1 \text{ ul} \\
 X & \longrightarrow & 10 \text{ ul}
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{ccc} 0,02 \text{ ng} & \longrightarrow & 1 \text{ ul} \\ X & \longrightarrow & 10 \text{ ul} \end{array}} \right\} X = 10 \times 0,02 = 0,2 \text{ ng}$$

X= 0,2 ng / 10 ul. Cette quantité n'est pas suffisante parce que la quantité est inférieure à 1 ng. Donc nous prenons le volume total dans 10 ul d'où la quantité d'ADN est 0,2 ng.

Dans notre étude, nous n'avons aucune quantité d'ADN inférieure à 1 ng, puisque nous avons étalé 500 ul du sang sur tous les tissus textiles d'analyse, ce volume nous permet de récolter des quantités supérieures à 1 ng dans ce cas, nos échantillons n'ont pas besoin de concentration, sauf pour les tissus des témoins négatifs comme le jean - et le manteau-, où la quantité est très inférieure à 1 ng.

La présence d'une très faible quantité d'ADN dans ces 02 tissus négatifs, nous confirme l'existence d'une contamination lors du pipetage durant l'étape de quantification d'où normalement nous ne constatons aucun résultat pour ces tissus, puisque ils ne contiennent pas de tache de sang, et le prélèvement est effectué à l'extrémité du tissu d'origine.

## **II. Discussion de profilage d'ADN :**

### **II.1. Partiel :**

Nous retrouvons exactement les mêmes allèles des différents marqueurs au niveau des profils de chaque tissu. Nous citons comme des exemples, le tissu du manteau 2 qui a donné un profil moins bon par rapport aux profils des tissus : jean 2, chemisier 1, tapis de voiture 1 et le tricot de peau 2.

En revanche, le tissu du chemisier est le plus rentable, en ce qui concerne la qualité des profils et la résistance aux inhibiteurs.

La comparaison des hauteurs des pics de tissu du manteau 2 et les autres tissus ; chemisier 1, jean 2, tapis de voiture 1 et le tricot de peau 2, nous confirme que le manteau est le tissu le plus contaminé par les inhibiteurs, et nous donne des profils moins bons par rapport aux autres tissus, puisque la fourche des hauteurs des pics est entre 82 et 333 RFU.

Par contre, nous trouvons le chemisier1 avec une fourche entre 2197 et 8384 RFU, cette hauteur de 8384 RFU est due à la saturation de l'allèle 12 homozygote du marqueurCSF1PO. Le Jean 2 (1082 et 4937).Le tapis de voiture 1 (1377 et 6184 RFU) et le Tricot de peau 2 (814 et 3400 RFU).

D'après les résultats indiquées dans les tableaux (XIII, XIV, XV, XVI et XVII), et comme nous avons dilués les concentrations des échantillons issus de la quantification (tableau XII), La concentration de l'hémoglobine augmente dans le sang dilué.

Nous pouvons dire que le Kit d'Identifier plus sur le tissu du chemisier composé de polystère et d'acrylique, résiste aux inhibiteurs d'amplification durant la PCR, spécialement contre l'hémoglobine. (Iglesias, 2009).

Le sexe étant également déterminé au cours du processus d'analyse (locus amélogénine), celui-ci est utilisé pour pouvoir confirmer le sexe : homme XY, femme XX. Ces profils génétiques ne sont pas validés sauf si le Ladder et les différents témoins utilisés pour le kit ont donné des résultats conformes, soit :

- Le Ladder doit donner tous les allèles possibles connus chez l'homme. (Figure 28).
- Le témoin positif (fourni dans le kit AmpFISTR Identifier plus®, AmpFISTR Control DNA 9947A de génotypes connus pour ces STRs) doit montrer des tailles des allèles concordant avec celles attendues, il assure le bon déroulement de la PCR. (Figure 26).

Le profil du control positif est partiel, cela est dû à la manipulation, puisque nous n'avons pas bien décongelés la bouteille du control positif inclus dans le Kit d'Identifier plus avant l'utilisation, ce qu'élimine des fragments d'ADN inclus dans le profil.

- Le témoin négatif d'amplification doit effectivement être négatif, soulignant qu'il n'y a pas eu de contaminations lors de l'analyse(Figure 27).

- Tous les marqueurs doivent être amplifiés et détectés, et donc apparaître sur le graphique sous forme de pics.

A travers nos expériences, nous avons ainsi pu montrer que:

- Tous les pics des allèles analysés étaient présents, alors que de surcroît l'amplitude des pics des STRs se trouvait dans une fourchette acceptable, soit entre 800RFU en limite inférieure et 8500 RFU en limite supérieure.

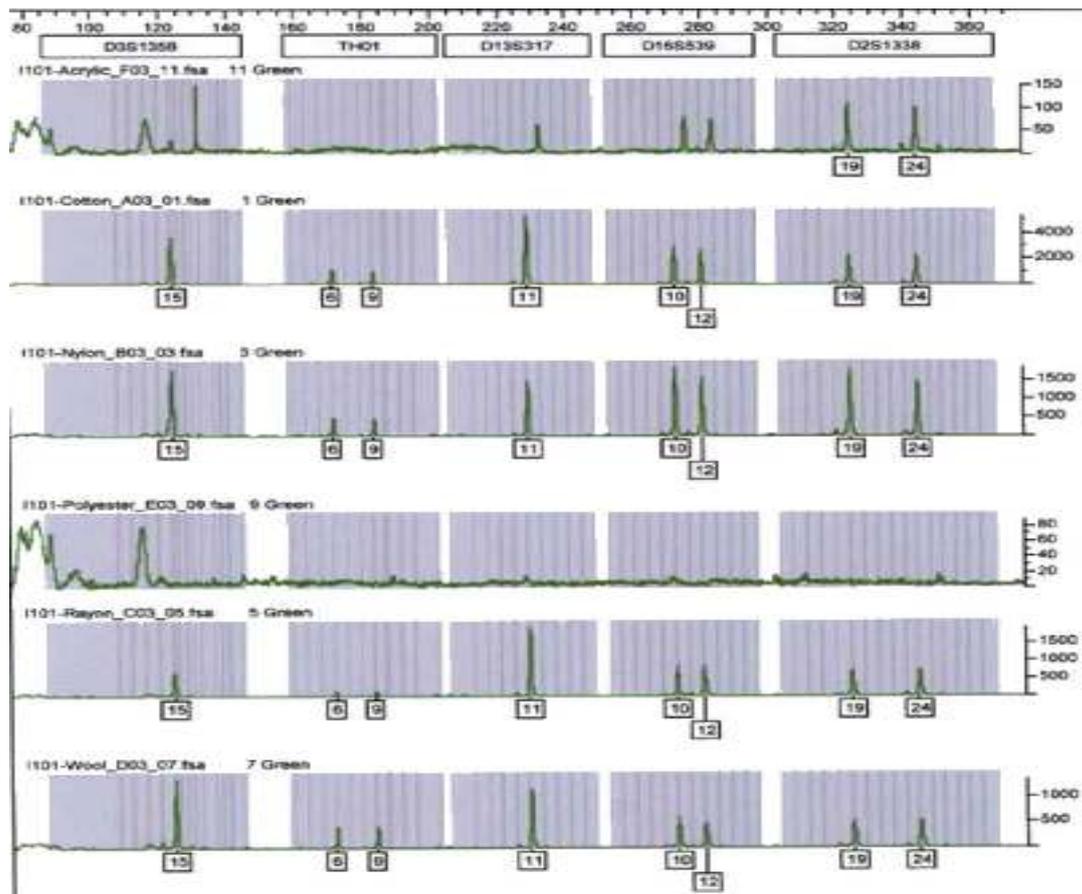
## **II.2. Partie 2 :**

Lay Hong Seah et ces collaborateurs, ont montrés dans leur étude d'établissement des profils ADN sur des tissus textiles, comme le nylon, acrylique et polystère, la laine et le coton. Sachant que Les cinq marqueurs verts, sont identifiés dans tous ces échantillons, les résultats suivants :

L'Amplification de ces marqueurs (D3S1358, TH01, D13S317, D16S539 et D2S1338) ; (figure 29), sur les anciennes taches de sang de 14 jours a généré des profils d'ADN presque complets pour le coton et nylon et des profils relativement moins intenses par rapport aux taches de sang frais (chiffre non indiqué).

Ainsi, un profil partiel a été obtenu à partir d'acrylique et pas de profil d'ADN a été dérivé à partir de polyester (**L.H. Seah et al, 2004**).

La figure ci-dessous, montre les différentes empreintes génétiques des tissus utilisés dans l'étude seah et ces collaborateurs.



**Figure 30 : Profils d'ADN des loci vert, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539 et D2S1338 par le Kit Amp FISTR Identifier pour (de haut en bas) acrylique, le coton, le nylon, le polyester, la rayonne et la laine(L.H. Seah et al, 2004).**

Notre étude a confirmée aussi, l'obtention des profils ADN complet à partir des tissus du coton (jean, écouvillon et tricot de peau), nylon (tapis de voiture), par contre, nous avons obtenus aussi des profils complets pour le polystère et l'acrylique.

- L.H. Seah et ces collaborateurs, ont justifiés leurs résultats par ce qui suit :

La présence de groupes fonctionnels sur les fibres permet aux chaînes moléculaires (intrinsèques ou extrinsèques) à être maintenus ensembles par l'opération de la forte liaison intermoléculaire : fortes liaisons hydrogène, attractions dipôle-dipôle et van der Waals.

Les groupes O-H de coton et les groupes N-H de nylon et la laine sont capables de former des liaisons hydrogène fortes avec des chaînes d'acides nucléiques résultant de puissants attractions intermoléculaires, ce qui facilite par conséquent une amplification in situ sur la matrice solide avec une détérioration possible des forces d'attraction avec le temps.

Le polystère et l'acrylique contiennent le carbonyle polaire (OCM) et les groupes cyano (CQN) qui permettent relativement une plus faible attraction dipôle-dipôle avec des chaînes d'acides nucléiques. L'amplification nulle à partir de polyesters peut être due à l'inefficacité des forces intermoléculaires entre les polyesters et les acides nucléiques(L.H. Seah et al, 2004).

Les résultats de seah, sont obtenus à partir des taches de sang séchées de 14 jours, ce qui ouvre une probabilité d'inefficacité du Kit d'amplification Identifier avec des sources d'ADN dégradées par rapport à l'Identifier plus. Ainsi, il est possible que la durée de 14 jours influence sur les liaisons intermoléculaire entre le tissu de polystère et d'acrylique par exemple, avec l'ADN.

## **Conclusion**

Avec leur puissance d'identification et leur fiabilité, les analyses d'ADN participent à une évolution du travail des enquêteurs qui est en phase avec l'emprise croissante des technologies de l'information. Nous vivons l'ère de la gestion rationnelle et efficace des informations. Ces informations doivent être de bonne qualité. Elles doivent être conservées d'une façon organisée et rassemblées en réseaux au minimum à l'échelle nationale.

Nous avons pu montrer dans notre travail, qu'à partir des différents types de tissus textiles tels-que ; Cotton, nylon, polystère, laine. Nous pouvons avoir différents profils d'ADN à partir d'une goutte de sang humain dont la quantité étalée sur chaque tissu est préalablement stable (environ 500ul).

Nous nous sommes intéressés à extraire cette trace biologique (sang) par la résine Chelex 5% échangeuse d'ions qui nous a permis de récupérer et purifier une quantité d'ADN suffisante afin d'établir un profil ADN.

Dans notre cas, la méthode d'extraction d'ADN à partir de la résine Chelex 5% échangeuse d'ions avait pour but d'obtenir, à partir de sang humain, des acides nucléiques purifiés de qualité et en quantité nécessaires pour conduire un protocole d'obtention de profils génétiques via la technique PCR, sachant que le degré de pureté de ce matériel génétique compte parmi les facteurs critiques d'amplification, tout particulièrement dans le but de générer des empreintes génétiques interprétables et complètes.

L'utilisation des deux kits Quantifiler human et l'Identifier plus de la firme Applied Biosystems, nous a permis de quantifier et amplifier respectivement l'ADN avec succès, même avec des tissus textiles contaminés surtout le tissu de la laine, qui contient une quantité remarquable d'inhibiteurs, ce qui se traduit par de faibles pics des profils d'ADN interprétés par le logiciel Gene Mapper d'Applied Biosystems.

Durant notre travail au laboratoire, les résultats des profils d'ADN nous ont permis d'établir une comparaison en ce qui concerne la fiabilité et la rentabilité des six tissus utilisés en terme de quantité et de qualité d'ADN et par conséquent la qualité d'empreinte génétique (profil ADN).

Il est évident que le tissu qui donne le plus bon profil est : le coton de jean, car, la qualité des fibres du coton qui permet de collecter le maximum de quantité d'ADN et les groupes O-H de coton sont capables de former des liaisons hydrogènes fortes avec des chaînes d'acides nucléiques résultant de puissantes attractions intermoléculaires. En revanche, le tissu de la laine, nous donne des moins bons profils par rapport au coton de jean, cela est due probablement à l'irrésistance aux inhibiteurs et l'attribution des faibles liaisons intermoléculaire avec l'ADN.

Il reste donc à améliorer les techniques pour pouvoir avoir un résultat similaire avec les autres textiles. Ainsi, un perfectionnement des différents Kit soit : d'extraction, quantification ou d'amplification pour faciliter l'obtention d'un profil ADN complet à une courte durée, à partir de l'ADN dégradé ou une source biologique contaminée par les inhibiteurs.

## **Parties bibliographiques**

- 1) Applied Biosystems. (2001) AmpFl STR® Identifiler™ PCR Amplification Kit User's Manual, Foster City, CA, P/N 4323291.
- 2) Ameziane, N., Bogard, M., Lamoril, J. (2005) Principe de biologie moléculaire en biologie clinique, [Livre], Paris: Elsevier Masson.
- 3) Andreasson, H., Nilsson, M., Budowle, B., Lundberg, H., et Allen, M. (2006) Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Sci. Int.* **164**: 56-64.
- 4) Bustin, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* # 25: 169-193.
- 5) Butler, J. M., Shen, Y et Mccord, B. R. (2003) The development of reduced size STR amplicons as a tool for the analysis of degraded DNA. *J forensic Science*, 48 (5): 1054 – 1064.
- 6) Butler, J.M. (2006) Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J. Forensic Sci.* **51**: 253-265.
- 7) China, B., Ghafir, Y., Daube, G. (2002) Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vét.* **147**, 99-109
- 8) Coquoz, R. (2003) Preuve par l'ADN; la génétique au service de la justice.

- 9) Claire Peltier. (2011) Dossier > Police scientifique : les vraies méthodes d'investigation, Futura-Sciences.
- 10) Chakravarti, A. (2011) Single nucleotide polymorphism to a future genetic medicine. *Nature*.409, 822-823
- 11) Dubourg, C. (2007) « Polymerase Chain Reaction (PCR) » [Page Web]  
Accès :[http://www.med.univrennes1.fr/wkf/stock/RENNES20071031101610vdauidPCR\\_2007.pdf](http://www.med.univrennes1.fr/wkf/stock/RENNES20071031101610vdauidPCR_2007.pdf)
- 12) Doutremepuich, C. (2012) Les empreintes génétique en pratique judiciaire, *Bull. Acad. Natle Méd.*, 2012, 196, no 6, 1117-1130.
- 13) Elyse, P. (2002) La PCR en temps réel: principes et applications. *Biology and Biotechnology*.
- 14) Frudakis, T.N. (2000) *Molecular photo fitting redacting ancestry and phenotype from DNA* Academic Press Publisher Amsterdam.
- 15) Frumkin, D., Wasserstrom, A., Davidson, A., etGrafit, A. (2010)Authentication of forensic DNA samples. *Forensic Sci. Int.* **4**: 95-103.
- 16) Gill, P., Whitaker, J., Flaxman, C., Brown, N., et Buckleton, J. (2001) An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci. Int.* **112**: 17-40.

17) Goodwin, W., Linacre, A., et Hadi, S. (2007) An introduction to forensic genetics. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons Ltd, USA.

18) Lorraine A., Ahmed M., Ingo B., Bundeskriminalamt W., Thomas F., Song C., Derek F., Neeraja G., Susan H., Pierre J., Reidar N., Richard S., Werner S., Arthur T., Simon W. Guide Interpol. (2009) L'échange de données génétique et les pratiques en matière d'analyse d'ADN. Deuxième édition.

19) Huggett JF., Foy CA., Benes V., Emslie K., Garson JA., Haynes R., Hellemans J., Kubista M., Mueller RD., Nolan T., Pfaffl MW., Shipley GL., Vandesompele J., Wittwer CT., Bustin SA. (2013) The Digital MIQE Guidelines: *Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments*, ClinChem 59(6): 892-902

20) Iglesias, M. (2009) Ajout d'un Contrôle d'inhibition dans des Kits STR MULTIPLEX, Laboratoire AURIGEN, Lausanne.

21) Jeffreys, A.J., Wilson, V., et Thein, S.L. (1985) Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* **314**: 67-73.

22) James, J., Lawrence E., Irene, I., Olivia, W., Suzanne, K., Martin, H., Bamini J., Jing, J., Joanne, M., Ming-sound, T., Sandy, D. (2006) Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Research*.

23) Kaplan. J.C., et Delpech, M. (1993) *Biologie Moléculaire et Médecine*, 2ed édition, Paris : Médecin Science.

24) Kan, Y. W., and Dozy, A. M. (1978) Polymorphism of DNA sequence adjacent to human aglobin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75, 5631- 563.

25) Lay Hong, S\*., Mohd Izuan O., Primulapathi Jaya, N., Hithaya Jeevan. (2004) DNA profiling on fabrics: an in-situ method. *International Congress Series* 1261 565–567.

26) Makri – Mokrane, S. «Thèse». (2006) *Introduction à la génétique moléculaire*.

27) Pascal, M. (2007) *La PCR en temps réel. Choix d’amorces et analyse des résultats*. Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, INRA, Toulouse.

28) Saiki, R.R., Sharft, S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$  globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis. *Science* 230, 1351-1354.

29) Sobrino, B., Brison, M., Carradedo, A. (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International*, 154, 181-194.

30) Sweet, D., Lorente, M., Valenzuela, A., Lorente, J.A., et Alvarez J.C. (1996) Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. *Forensic Sci. Int.* **83**: 167-177.

31) User guide. (2004) Quantifiler® Human and Y Human Male DNA Quantification Kits.

32) Weber, J.L., May, P.E. (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.***44**: 388-396.

### **Sites visités:**

1)(<http://www.gene-quantification.info/>).

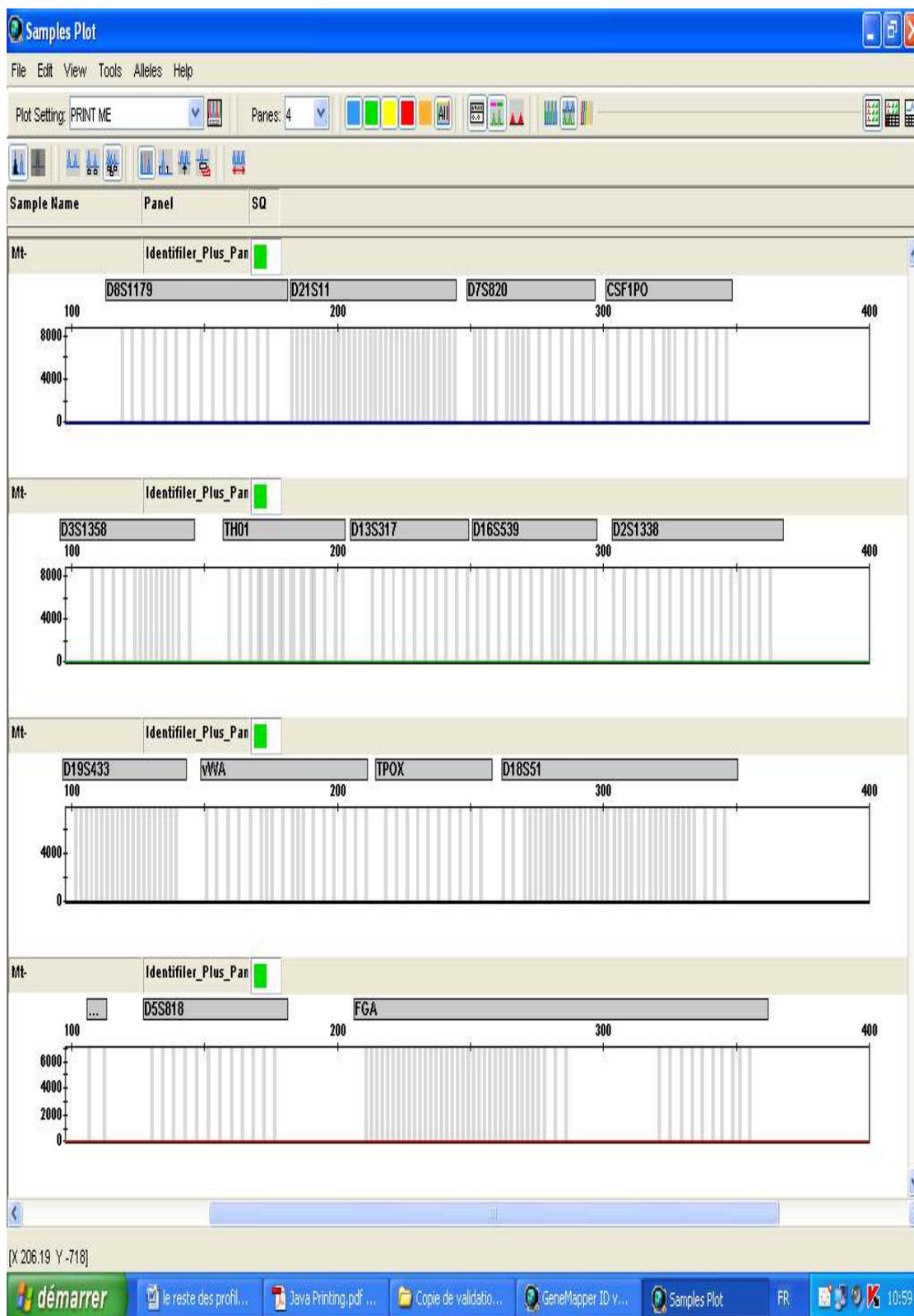
2) ([http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot\\_05001/polymorphisme/microsatellites.html](http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/polymorphisme/microsatellites.html)).

3) ([http://www.futura-science.com/magazine/sante/infos/dossiers/biologie\\_police\\_scientifique-vrais\\_methodes-investigation-2012](http://www.futura-science.com/magazine/sante/infos/dossiers/biologie_police_scientifique-vrais_methodes-investigation-2012)).

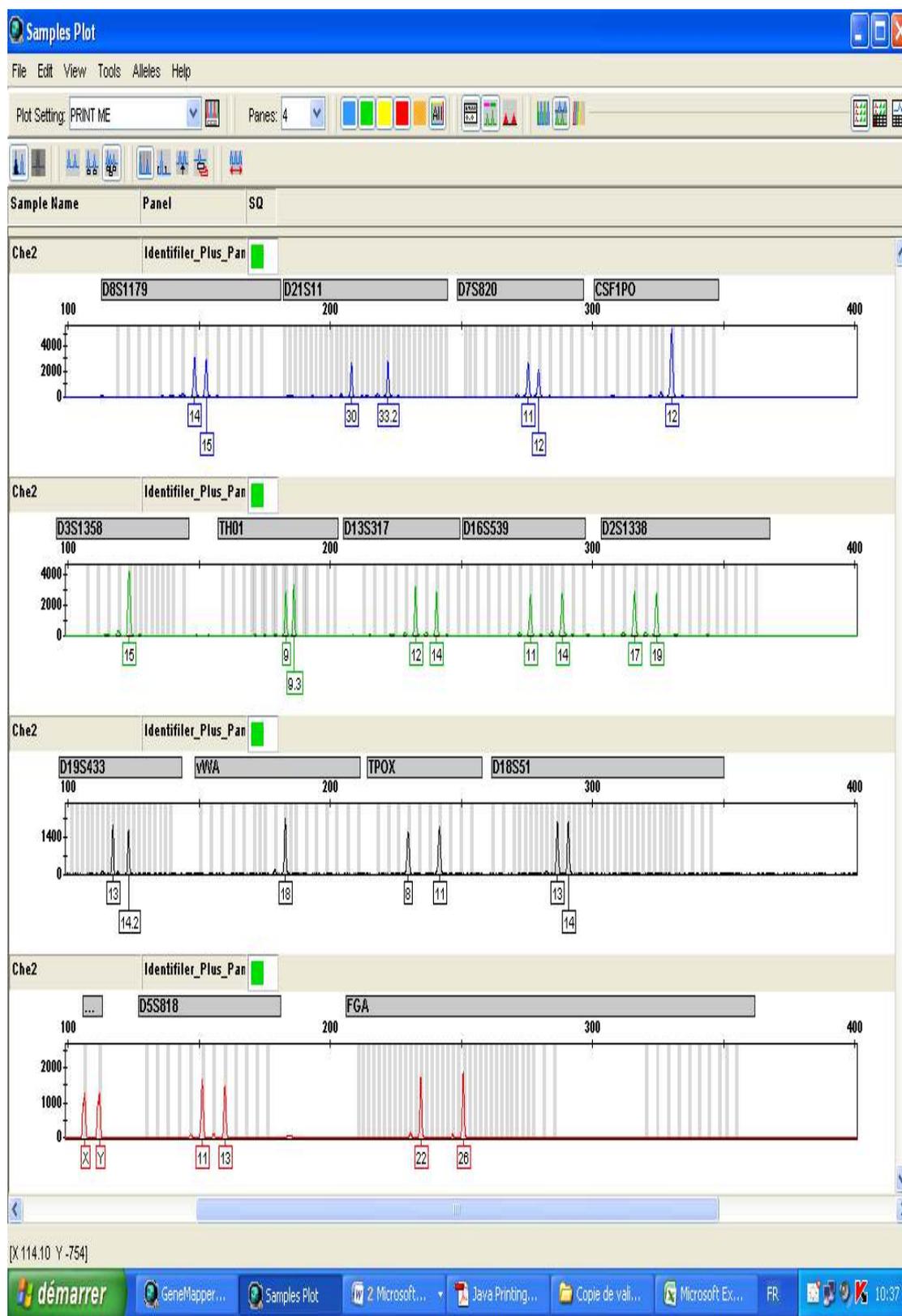
4) [http://www.nfstc.org/pdi/Subject04/pdi\\_s04\\_m02\\_00.htm](http://www.nfstc.org/pdi/Subject04/pdi_s04_m02_00.htm).

5) <http://www.bio-rad.com/fr-fr/applications-technologies/qpcr-real-time-pcr>.

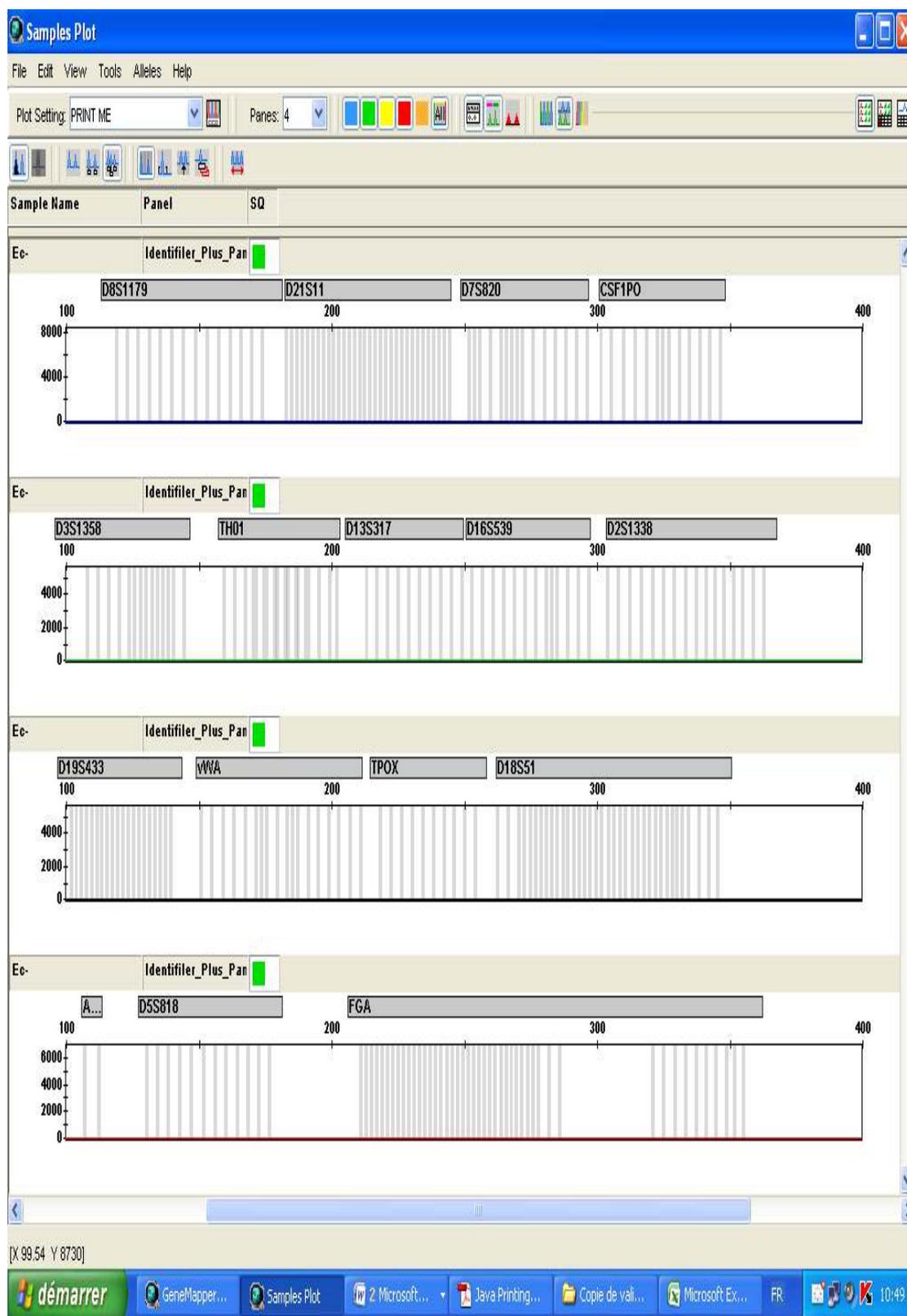
# Annexes



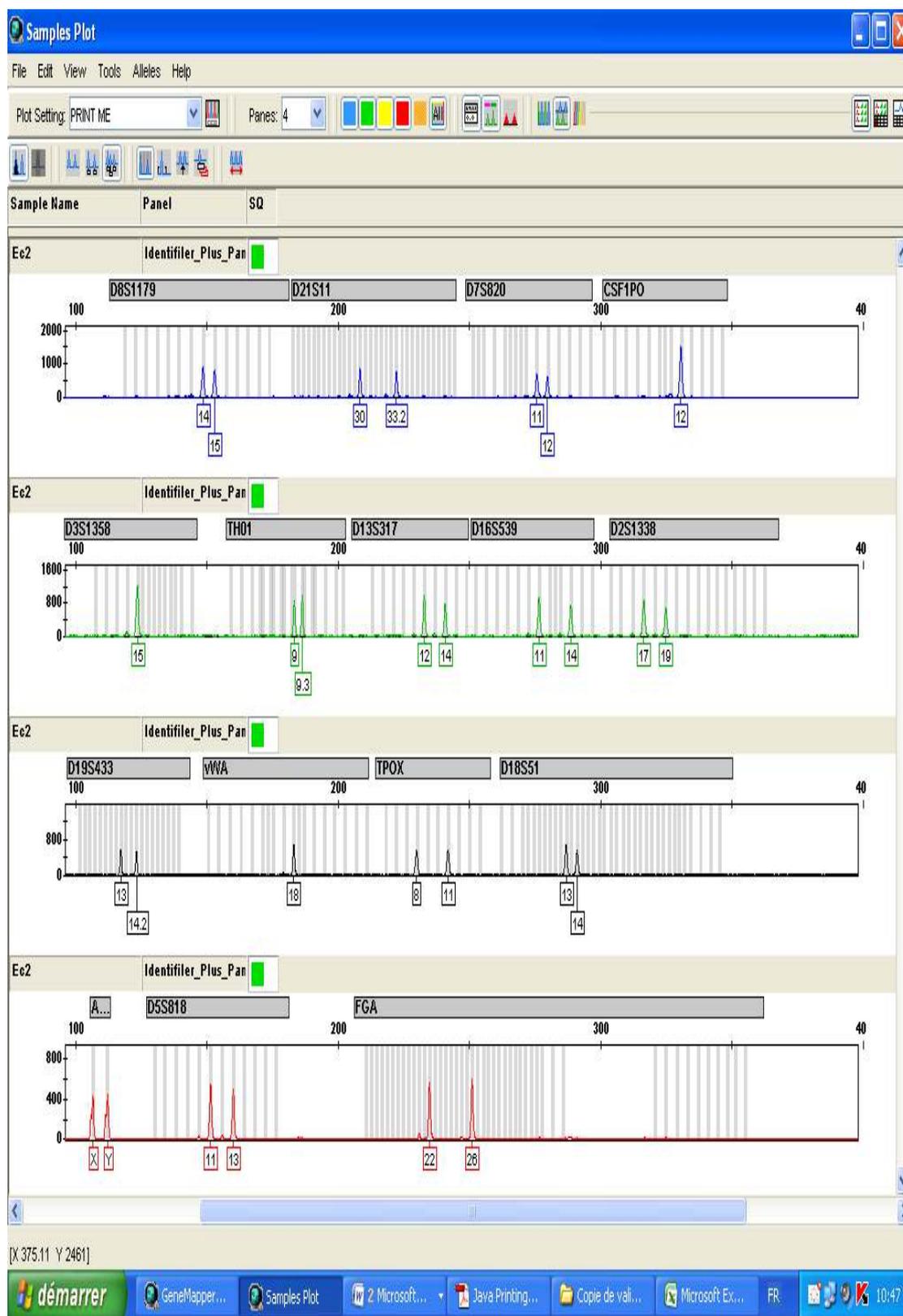
**Profil ADN du témoin négatif du manteau (-)**



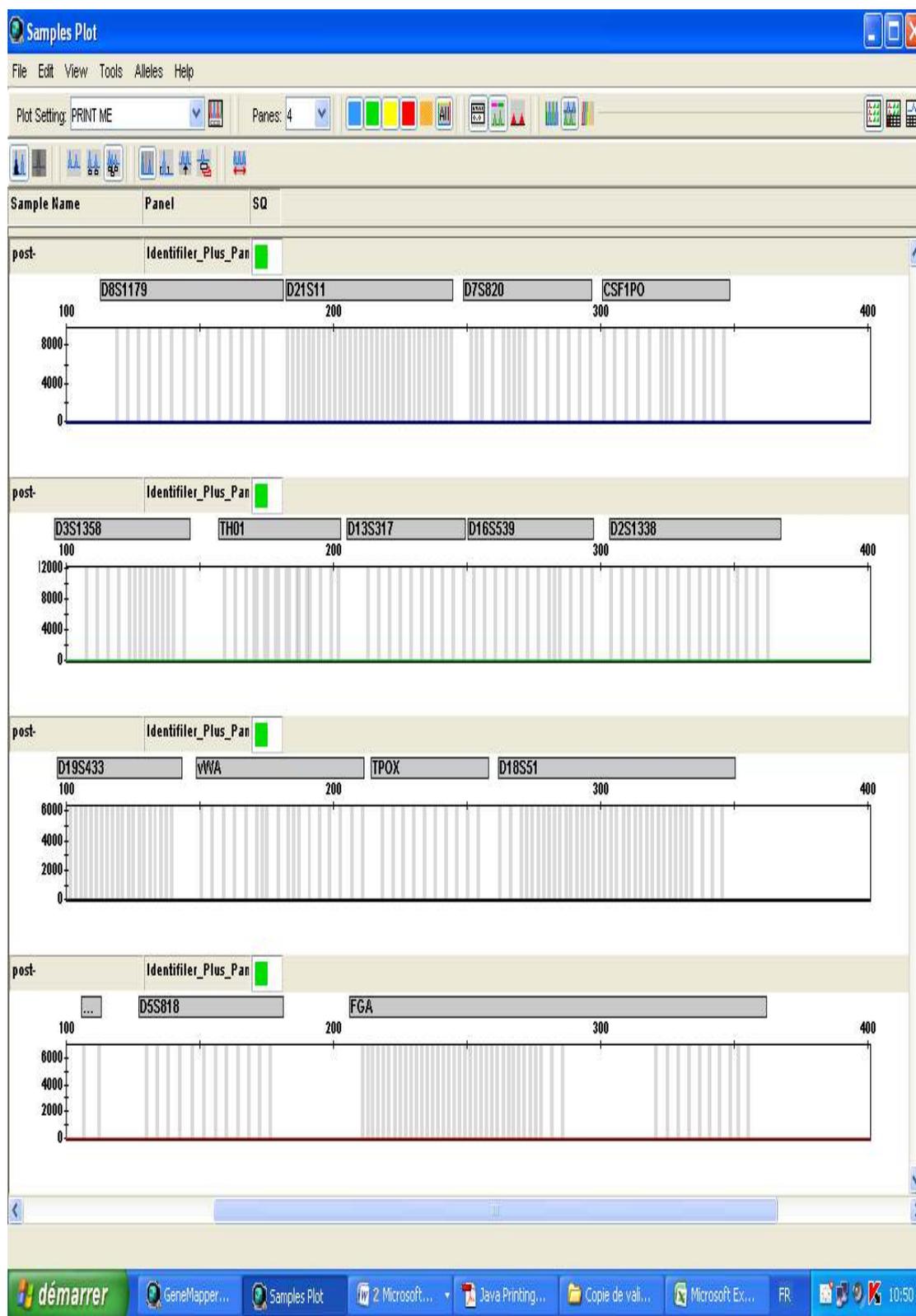
**Profil ADN de sang sur tissu du chemisier 2**



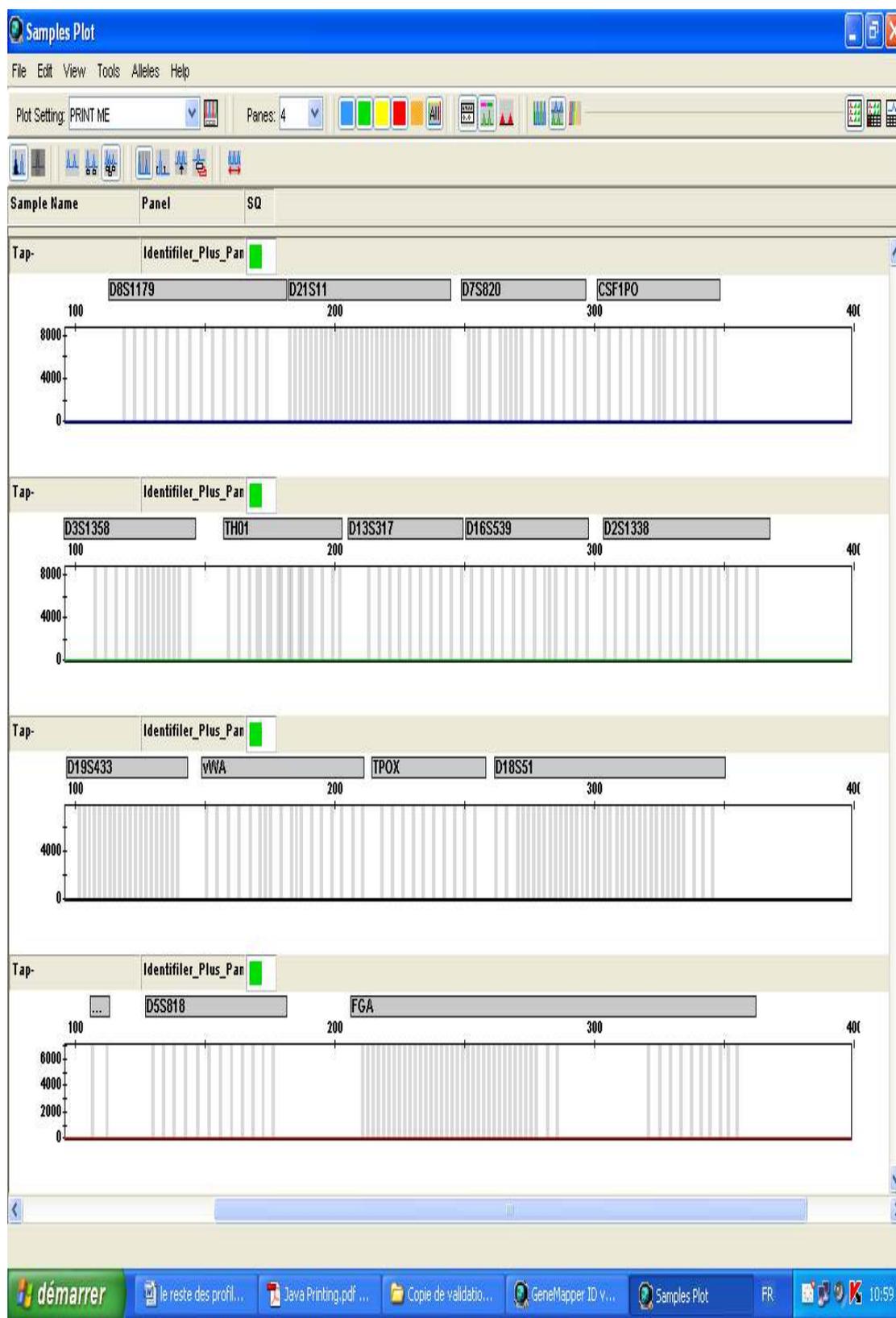
**Profil ADN du témoin négatif d'écouvillon (-)**



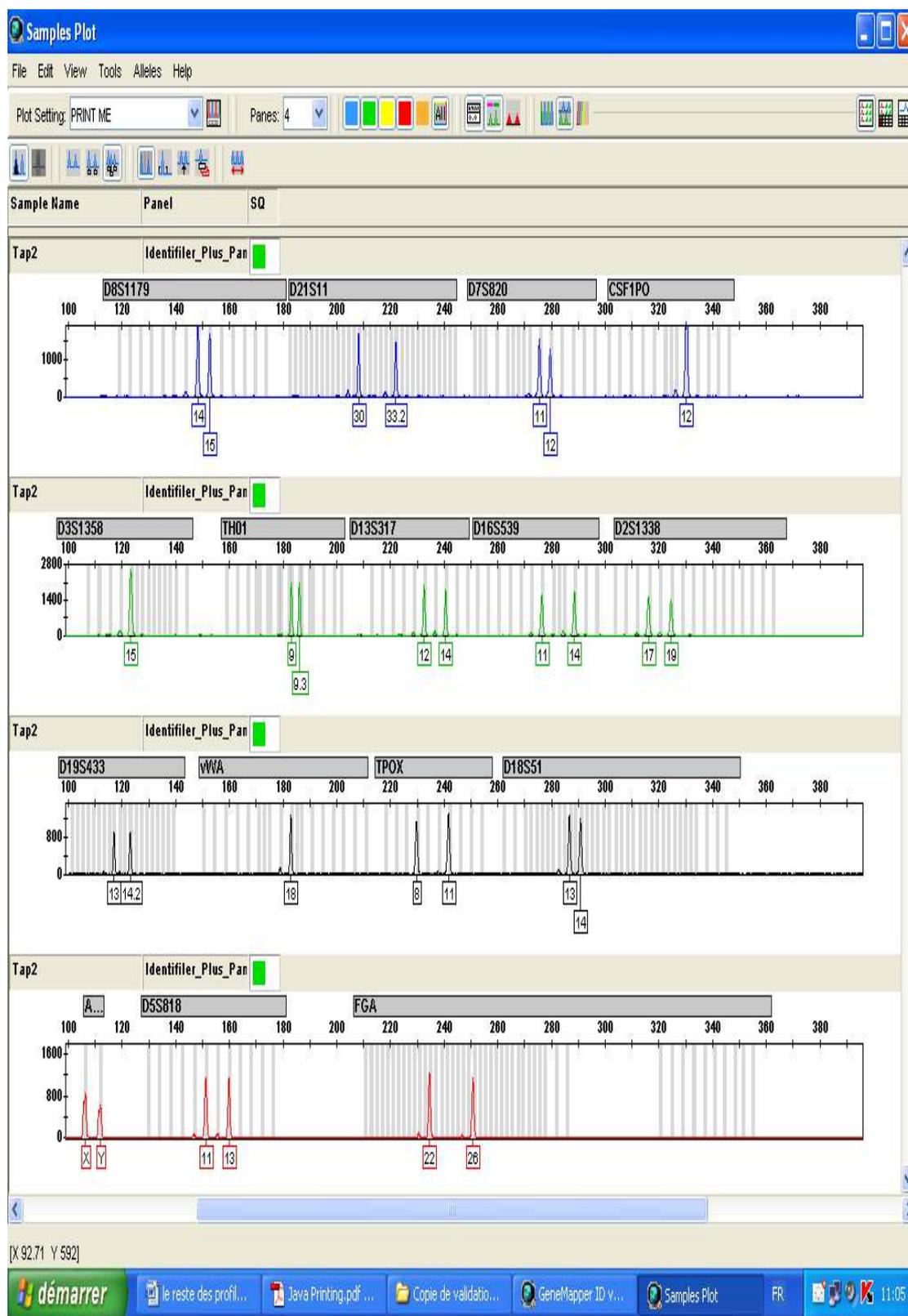
**Profil ADN de sang sur l'écouvillon 2**



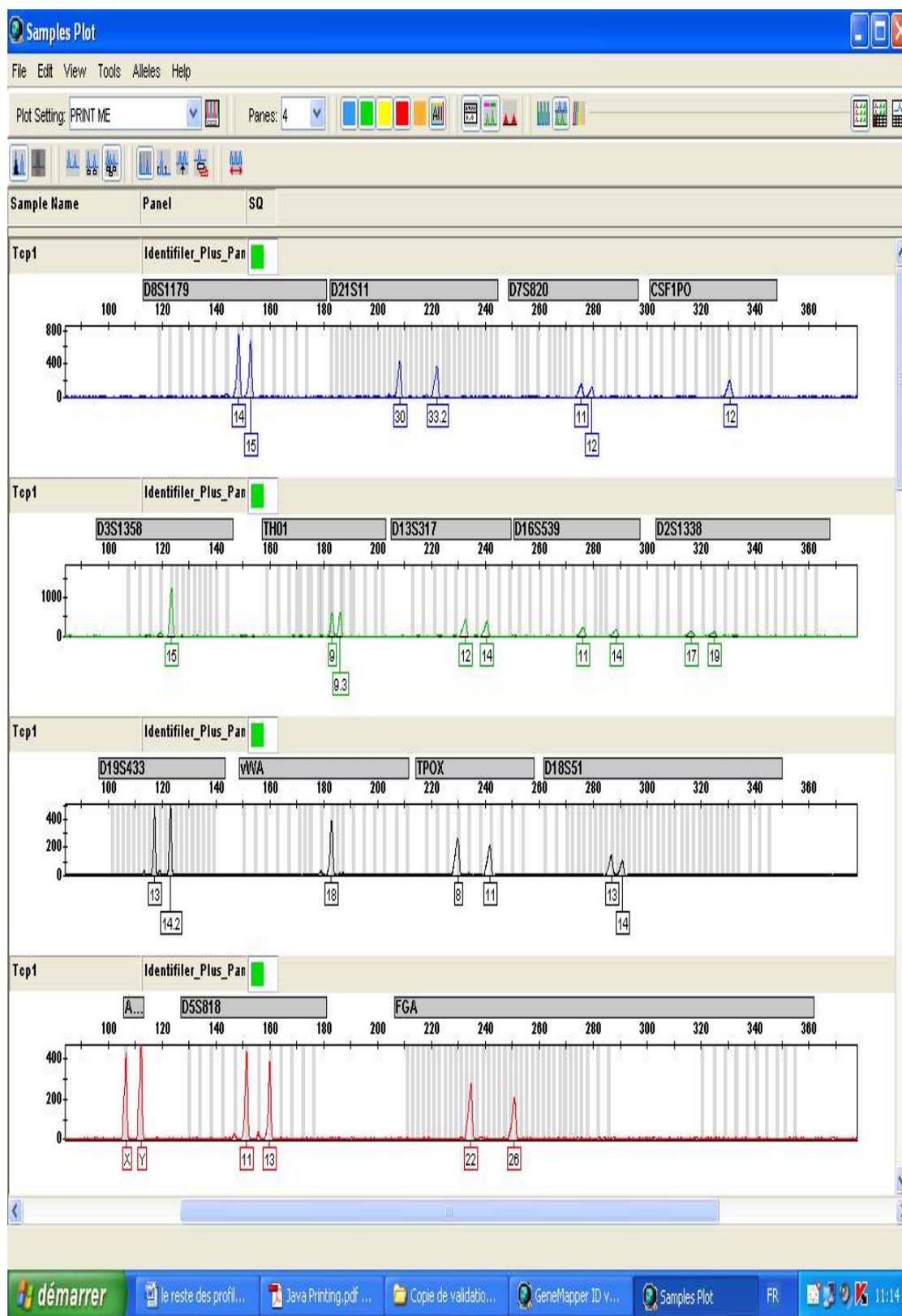
**Profil ADN du témoin négatif du post – amplif (-)**



**Profil ADN du témoin négatif du tapis de voiture (-)**



**Profil ADN de sang sur tissu de tapis de voiture 2**



**Profil ADN de sang sur tissu de tricot de peau 1**

**Tableau III: Échantillons biologiques et leur utilisation en vue d'isoler et d'analyser l'ADN (guide d'interpol 2009).**

ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES	COMMENT EN ISOLER ET EN ANALYSER L'ADN
<b>Sang</b>	Le sang peut se présenter sous forme de flaques, de gouttelettes, d'éclaboussures et de traces. Il peut être coagulé, séché ou frais.
<b>Os</b>	Lorsque le corps est dans un état de décomposition avancée, des échantillons d'os peuvent être utilisés pour l'analyse génétique.
<b>Pellicules squames</b>	/ Certaines affections dermatologiques entraînent une desquamation du cuir chevelu ou de la peau qui peut permettre de procéder à une analyse génétique.
<b>Cheveux</b>	L'ADN se trouve dans la racine du cheveu et dans les cellules du cuir chevelu se trouvant à proximité de la racine lorsque le cheveu a été arraché. Un simple cheveu arraché peut avoir entraîné suffisamment de matière cellulaire pour permettre une analyse génétique. En revanche, un cheveu tombé naturellement, comme on en voit souvent sur les vêtements, ne présente normalement pas suffisamment de matériel génétique pour une analyse. Il est difficile d'évaluer la qualité de la racine d'un cheveu sans l'examiner au microscope. Il faut donc recueillir tous les cheveux présents.
<b>Tige du cheveu</b>	L'ADN contenu dans la tige d'un cheveu est insuffisant pour une analyse de STR standard, mais une analyse de l'ADN mitochondrial peut être réalisée sur des cheveux sans racine.
<b>Fèces</b>	Les méthodes habituelles d'analyse génétique ne sont pas applicables aux fèces, à moins que celles-ci ne contiennent du sang. L'analyse de l'ADN mitochondrial est toutefois possible.
<b>Ongles</b>	Si la victime a griffé son agresseur, il est possible d'obtenir un profil génétique à partir des cellules de peau ou des cellules sanguines trouvées sous un ongle.  L'ongle proprement dit contient également suffisamment d'ADN pour une analyse.
<b>Empreintes digitales</b>	Il peut être possible d'obtenir un profil en recueillant à l'aide d'un écouvillon, les résidus présents une fois l'empreinte digitale prélevée et en les examinant à l'aide de la technique d'analyse LCN.

<b>Chair</b>	Lorsqu'une personne a été blessée, il est possible de trouver des morceaux de chair. Ces échantillons contiennent de l'ADN en grande quantité et peuvent être analysés.
<b>Sécrétions nasales ou auriculaires</b>	Les mouchoirs et les cotons-tiges usagés sur lesquels des sécrétions nasales ou auriculaires sont visibles peuvent être une source intéressante d'ADN.
<b>Fragments de corps</b>	On trouve parfois des fragments de corps, souvent en mauvais état, sur les scènes de crime. Ils sont toutefois toujours susceptibles de faire l'objet d'une analyse génétique.
<b>Salive</b>	Les traces de salive ne sont pas forcément visibles. Ce n'est pas la salive proprement dite qui contient de l'ADN, mais les cellules buccales qu'elle renferme.
<b>Sperme</b>	Le sperme peut se présenter sous forme liquide (dans un préservatif par exemple) ou sous forme d'une trace visible. Il peut également ne pas être visible et il faut alors décider de son emplacement possible au moment de sélectionner les objets à transmettre au laboratoire. Le sperme liquide, y compris les toutes petites traces, renferment généralement de nombreux spermatozoïdes contenant chacun de l'ADN. Même lorsque le sperme ne contient pas de spermatozoïdes, il peut renfermer suffisamment de matière cellulaire pour permettre une analyse génétique.
<b>Cellules de la peau</b>	L'ADN d'une personne peut être transféré sur un objet qu'elle touche ou manipule ou sur un vêtement qu'elle porte. On parle alors parfois d'« ADN de contact ». La probabilité de trouver ce type d'ADN dépend beaucoup des circonstances, mais on peut envisager cette analyse pour des objets probants dans des affaires graves.
<b>Sueur</b>	Cette sécrétion liquide ne contient pas de matériel génétique. Il est arrivé que des laboratoires réussissent à obtenir de l'ADN à partir de traces de sueurs sur des vêtements, mais cela a été attribué à la présence fortuite de cellules.
<b>Urine</b>	L'urine peut contenir des cellules provenant de la paroi de l'urètre, mais il est peu probable qu'elles soient en quantité suffisante pour permettre une analyse génétique.
<b>Liquide vaginal</b>	Le liquide vaginal contient des cellules provenant de la paroi du vagin et permet une analyse génétique.



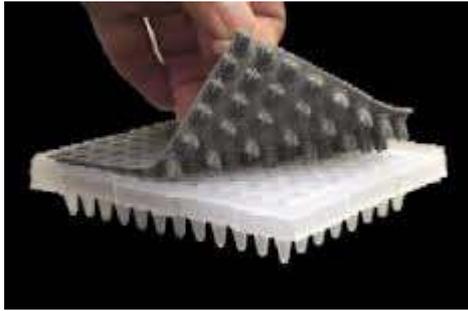
Tache de sang sur jean Tache de sang sur manteau



Tache de sang sur tapis Tache de sang sur tricot de peau



Tache de sang sur chemisier Tache de sang sur écouvillon



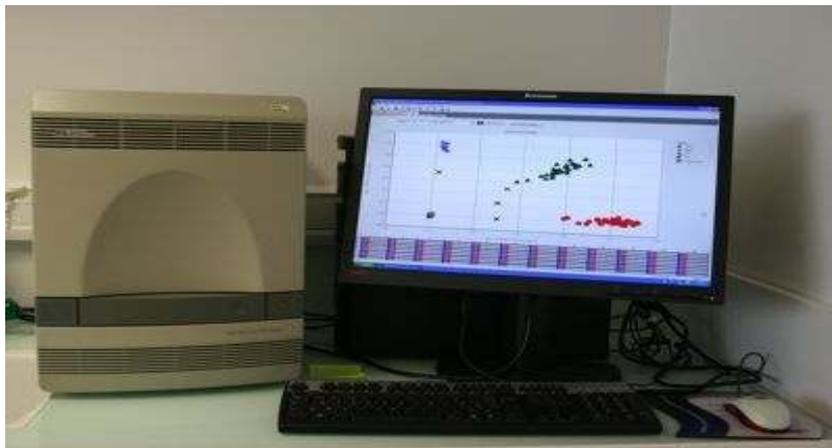
Plaque 96 puits avec le septas



Séquenceur 3130xl + ordinateur



Thermocycleur 9700 gold (AppliedBiosystems)



Thermocycleur 7500 du reel time - PCR (Applied Biosystems)



Tubes eppendorf



Portoir des tubes eppendorf



Portoir des tubes de 25 ml



Différents support de la plaque 96 puits



Agitateur



Plaque de 96 puits



Boites eppendorf des embouts



Centrifugeuse



Hotte



Support pipettes eppendorf



Bloc chauffant agitateur



Bain marie

