

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE

RECHERCHE



UNIVERSITE DE SAAD DAHLAB BLIDA

Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

Département De Biologie Et Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de master

Filière : biologie

Option : Génétique

THEME

Validation de trois tests préliminaires Kastle Meyer, OBTI et antigène spécifique de prostate pour l'obtention d'un profil génétique

Présenté par :

M^{elle} DOURARI Hayet

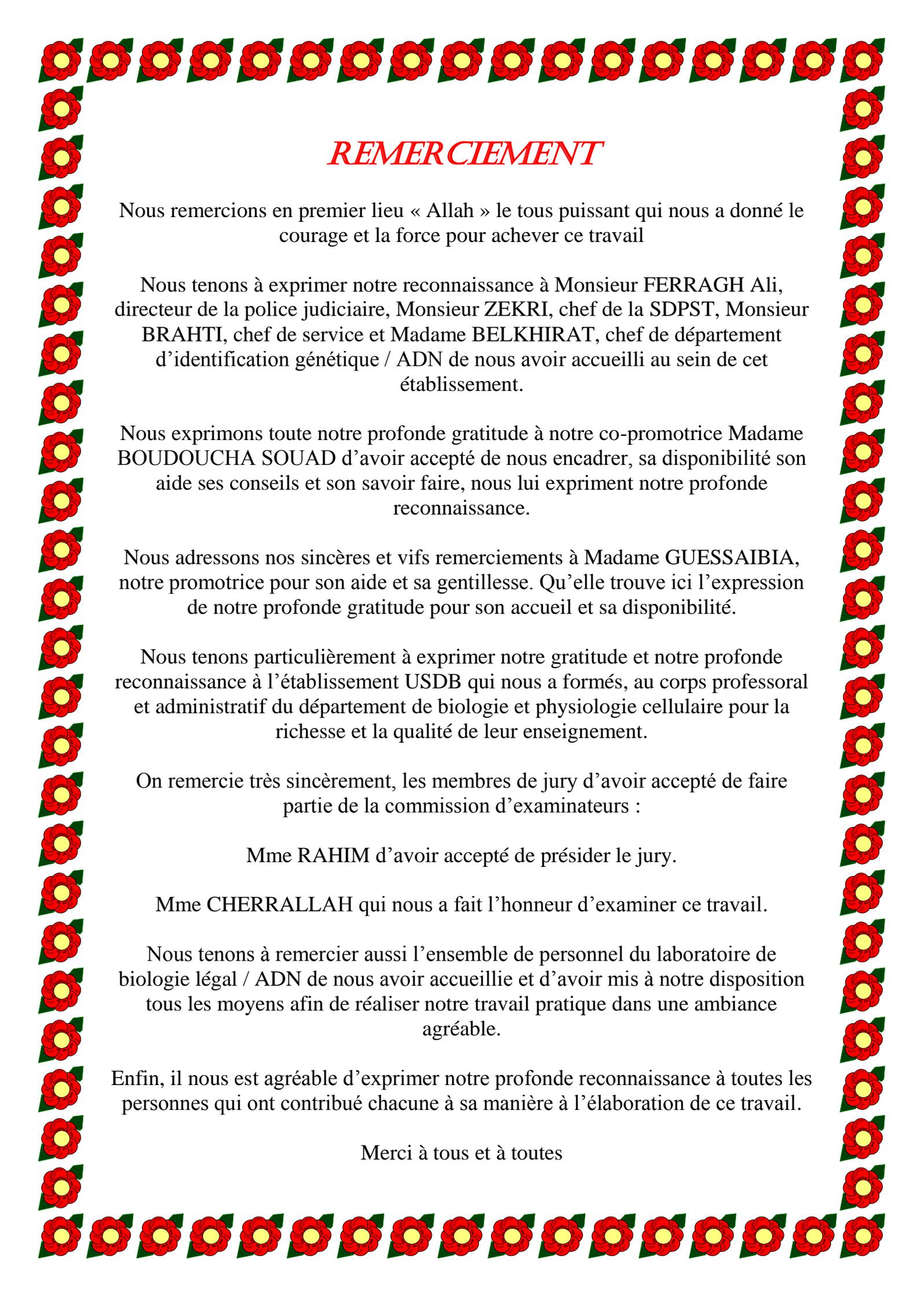
M^{elle} OUSSADOU Nouara

Soutenu le 26 juin 2018

Membres du jury :

Mme RAHIM I.	MCB	USDB	Présidente
Mme CHERRALLAH A.	MCB	USDB	Examinatrice
Mme GUESSAIBIA N.	MCB	USDB	Promotrice
Mme BOUDOCHA S.	Ingénieur en chef en biotechnologie	LPS	Co-promotrice

2017/2018



REMERCIEMENT

Nous remercions en premier lieu « Allah » le tous puissant qui nous a donné le courage et la force pour achever ce travail

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à Monsieur FERRAGH Ali, directeur de la police judiciaire, Monsieur ZEKRI, chef de la SDPST, Monsieur BRAHTI, chef de service et Madame BELKHIRAT, chef de département d'identification génétique / ADN de nous avoir accueilli au sein de cet établissement.

Nous exprimons toute notre profonde gratitude à notre co-promotrice Madame BOUDOUCHEA SOUAD d'avoir accepté de nous encadrer, sa disponibilité son aide ses conseils et son savoir faire, nous lui exprimons notre profonde reconnaissance.

Nous adressons nos sincères et vifs remerciements à Madame GUESSAIBIA, notre promotrice pour son aide et sa gentillesse. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude pour son accueil et sa disponibilité.

Nous tenons particulièrement à exprimer notre gratitude et notre profonde reconnaissance à l'établissement USDB qui nous a formés, au corps professoral et administratif du département de biologie et physiologie cellulaire pour la richesse et la qualité de leur enseignement.

On remercie très sincèrement, les membres de jury d'avoir accepté de faire partie de la commission d'examineurs :

Mme RAHIM d'avoir accepté de présider le jury.

Mme CHERRALLAH qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail.

Nous tenons à remercier aussi l'ensemble de personnel du laboratoire de biologie légal / ADN de nous avoir accueillie et d'avoir mis à notre disposition tous les moyens afin de réaliser notre travail pratique dans une ambiance agréable.

Enfin, il nous est agréable d'exprimer notre profonde reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué chacune à sa manière à l'élaboration de ce travail.

Merci à tous et à toutes



Dédicaces

*Au nom du dieu le clément et le miséricordieux louange à **ALLAH** le tout puissant.*

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère mère en terme de reconnaissance pour tous les sacrifices qu'elle a fait pour que je réussisse dans mes études ; et pour tout ses encouragements et son amour.

A mon très cher papa qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

*A mes chers frères **Sofiane** et **Messaoud**.*

*A ma chère sœur **Keltouma**.*

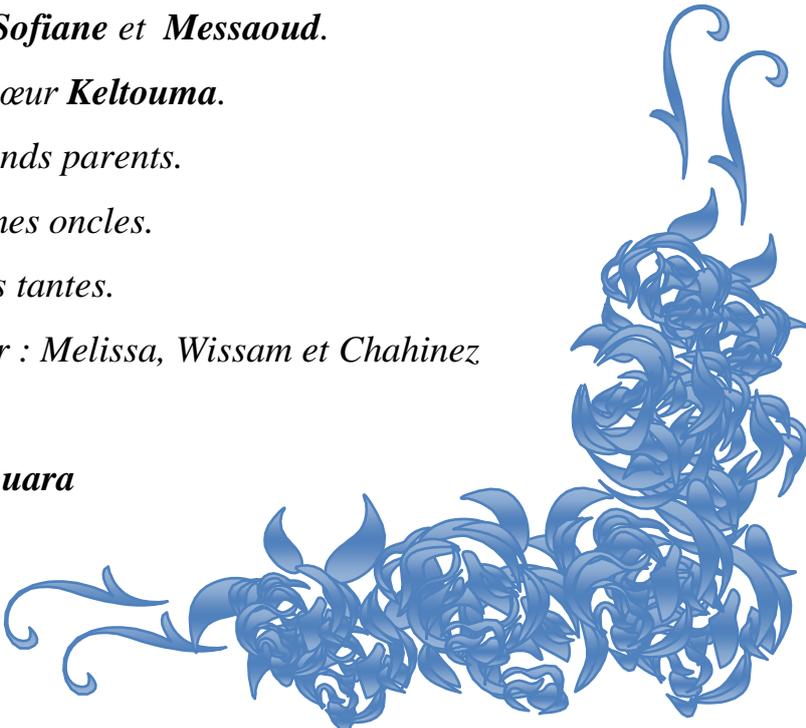
A mes grands parents.

A tous mes oncles.

A mes tantes.

*A tous mes amis en particulier : **Melissa**, **Wissam** et **Chahinez***

Nouara





Dédicaces

*Au nom du dieu le clément et le miséricordieux louange à **ALLAH** le tout puissant.*

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement :

*A mes chers parents,
Qui m'ont aidé de
Près et de loin.*

*A mes chères sœurs
Kenza, Amina,
Yasmina*

A mon frère Amine

*A toute ma famille, qui porte le nom **DOURARI** et surtout **Mohamed** et **Fatma Zohra**.*

A tout ceux qui ont participé à l'élaboration de ce modeste travail et tous ceux qui nous sont chers.

HAYET



RESUME

Depuis l'avènement de la biologie moléculaire en matière d'empreintes génétique, le domaine des sciences médico-légales a été révolutionné. Les profils génétiques sont des outils moléculaires d'identification quasi-absolus des individus. Toujours est-il qu'il faut confirmer la nature humaine des prélèvements biologiques trouvés sur les scènes de crime.

Pour cela, différents tests ont été mis au point, dont les trois tests (Kastle Meyer, OBTI et L'Antigène Spécifique de Prostate) dont nous avons entrepris de faire la validation dans le présent travail. Le test Kastle Meyer est un test chimique du sang qui cible son contenu en hémoglobine, très efficace, facile à réaliser et fournit rapidement des résultats sûrs, c'est un réactif incolore qui donne une intense coloration rose en présence du sang.

Toutefois, le test Kastle Meyer détecte du sang de n'importe quelle origine, qu'elle soit animale ou humaine. Par contre, le test OBTI qui est un test immuno-chromatographique détecte spécifiquement du sang humain. En ce qui concerne le troisième test PSA, il a été adapté pour le sperme humain.

Les échantillons biologiques passent par différentes étapes du processus analytique de l'ADN jusqu'à l'obtention d'un profil génétique. Ces trois tests préliminaires ont été validés à partir de différentes sources biologiques, en nous appuyant sur certaines caractéristiques de validations telles que la sensibilité, la spécificité et la répétabilité. Les profils génétiques obtenus ont confirmé la puissance de la validité de ces trois tests.

Mots-clés : Kastle Meyer, OBTI, Antigène Spécifique de Prostate, Profils génétiques, Sang, Sperme

ABSTRACT

Since the advent of molecular biology in genetic fingerprinting. The field of forensic science has been revolutionized. Genetic profiles are almost absolute molecular identification tools of individuals. Still, it is necessary to confirm the human nature of biological samples found at crime scenes.

For this various tests have been developed, including the three tests (Kastle Meyer, OBTI, prostate specific antigen) which we undertook to validate in the present work. The Kastle Meyer test is a blood chemistry test that targets its hemoglobin content, is highly effective, easy to perform and provides fast, safe results; it is a colorless reagent that gives an intense pink color in the presence of blood. However, the Kastle Meyer test detects blood of any origin, whether animal or human. In contrast, the OBTI test which is an immunochromatographic test, specifically detects human blood. Regarding the third test PSA, it was adapted for human sperm.

Biological samples go through other stages of the analytical process of DNA until a genetic profile is obtained. The genetic profiles obtained confirmed the strength of the validity of these three tests.

Keywords: Kastle Meyer, OBTI, prostate specific antigen, the genetic profiles, blood, sperm.

ملخص

منذ ظهور البيولوجيا الجزيئية في البصمة الوراثية، أحدثت ثورة في مجال الطب الشرعي، تعتبر الخصائص الوراثية أدوات تعريف جزيئية مطلقة للأفراد. ومع ذلك، لا بد دائم من تأكيد الطبيعة البشرية للعينات البيولوجية الموجودة في مسرح الجريمة.

لهذا، تم وضع العديد من الاختبارات، بما في ذلك الاختبارات الثلاثة (كاستل ماير OBTI، مستضد البروستات محددة)، التي تعهدنا بالتحقق منها في العمل التالي. اختبار كاستل ماير هو اختبار كيمياء الدم الذي يستهدف محتواه الهيموجلوبين، وهو فعال للغاية، ويسهل تنفيذه ويوفر نتائج سريعة ومضمونة؛ وهو كاشف عديم اللون يعطي لوناً وردياً شديداً في وجود ، هو OBTI الدم. لكن اختبار كاستل ماير يكشف عن الدم مهما كان أصله، سواء كان حيوان أو إنسان. في المقابل، اختبار اختبار كروماتوجرافي مناعي، يكشف بشكل خاص عن دم الإنسان. فيما يتعلق بالاختبار مستضد البروستات محددة، تم تكييفه للحيوانات المنوية البشرية.

تمر العينات البيولوجية بمراحل أخرى من العملية التحليلية للحمض النووي حتى يتم الحصول على صورة جينية. تم التحقق من صحة هذه الاختبارات الأولية الثلاثة من مصادر بيولوجية مختلفة، بالاعتماد على بعض خصائص التحقق مثل الحساسية والنوعية والتكرار. وأكدت الخصائص الجينية التي تم الحصول عليها تأكيد قوة صلاحية هذه الاختبارات الثلاثة.

الكلمات المفتاحية : كاستل ماير OBTI، مستضد البروستات محددة، الخصائص الوراثية، الدم، للحيوانات المنوية.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma d'un microsatellite (Iglesias, 2009)	6
Figure 2 : Polymorphisme monocléotidique SNP (Goodwin, et al 2007).....	7
Figure 3 : Présentation de l'ADN mitochondrial, de la région de contrôle et des régions hypervariables. (Coquos, et al 2013).....	8
Figure 4 : schémas expliquant les différentes étapes de la PCR (Iglesias, 2009).....	14
Figure 5 : Les différentes étapes du test immuno-chromatographique de l'hémoglobine humaine.....	23
Figure 6 : Le ladder du kit Identifier Plus.....	40
Figure 7 : Les résultats de test Kastle Meyer.....	41
Figure 8 : Résultats du test OBTI Hexagon avec le sang humain aux différents moments avec des concentrations de 2 ml et 0.2 ml du tampon.	46
Figure 9 : Résultats du test OBTI Hexagon avec le sang animal aux différents moments avec des concentrations de 2 ml et 0.2 ml du tampon	47
Figure 10 : Résultats du test OBTI Hexagon avec le liquide corporel à une concentration de 0.2 ml du tampon.	48
Figure 11 : Résultats du test PSA de la gamme des dilutions du sperme humain (Après 10, 15 et 30 minutes).....	53
Figure 12 : Résultats du test PSA des ratios (sperme/sang), (sperme/salive) après 10 et 15 minutes.....	55
Figure 13 : Résultats du test PSA sur d'autres liquides corporels après 10 minutes.	58
Figure 14 : Profil génétique partiel (Sang dilué)	61
Figure 15: Profil génétique masculin complet (sang pur).....	62
Figure 16 : Profil génétique masculin (sperme pur, Prélèvement vaginal avec 5µl du sperme).....	63
Figure 17 : Mélange de profils génétique (Prélèvement urinaire féminin avec 5 µl du sperme).....	64

Liste des tableaux

Tableau I : Principales dates de développement de l'analyse ADN en pratique judiciaire (Doutremepuich, 2012)	11
Tableau II : Liste des locis analysés sur l'ADN autosomal. (Doutremepuich, 2012).....	15
Tableau III : Appareillages et équipements, kits et réactifs utilisés	17
Tableau IV : Echantillons utilisés pour le test Kastle Meyer.	22
Tableau V : Echantillons de sang	25
Tableau VI : Les échantillons de liquide corporel	25
Tableau VII : Les échantillons de sperme humain	28
Tableau VIII : Les ratios de prélèvements salive et sang avec le sperme	29
Tableau IX : Les échantillons préparés	29
Tableau X : Les échantillons de sperme animal (lapin)	30
Tableau XI : Echantillons utilisés pour une extraction organique différentielle.....	31
Tableau XII : Echantillons utilisés pour une extraction organique	31
Tableau XIII : Composition du master mix (kit Quantifiler Humain DNA)	35
Tableau XIV : Le système des 4 colorants des STR	35
Tableau XV : Composition du master mix (kit IDENTIFILER PLUS)	36
Tableau XVI : Composition du mix Post-PCR	37
Tableau XVII : Résultats obtenus par test Kastle Meyer	42
Tableau XVIII : Témoin positif et témoin négatif du test OBTI Hexagon.	44
Tableau XIX : Résultats de la sensibilité du test OBTI Hexagon sur le sang humaine.	45
Tableau XX : Résultat de la spécificité du test OBTI Hexagon sur le sang animale.	47
Tableau XXI : Résultats du test Hexagon OBTI pour d'autres liquides corporels.	48
Tableau XXII : Témoin positif et témoin négatif du test PSA.....	51
Tableau XXIII : Résultats du test PSA de la gamme des dilutions du sperme humain.	52
Tableau XXIV : Résultats du test PSA des ratios	54
Tableau XXV : Résultats du test PSA de la gamme des diluions du sperme de lapin.....	56
Tableau XXVI : Résultats du test PSA sur d'autres liquides corporels	57

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ADN mt : ADN mitochondriale

dNTP : Désoxy nucléotide triphosphate

DTT: Dithiothreitol

CCD: Charge Coupled Device

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

HB : Hémoglobine

KM: Kastle-Meyer

Min: minute

Mg²⁺: Magnesium

ml : Millilitre

ng : Nanogrammes

pb : paire de base

PCI : Phénol-Chloroforme-Isoamyl

PCR : Polymerase Chain Reaction

PK: Protéinase Kinase

POP4: Performance Optimized Polymere 4

PSA : Antigène spécifique de prostate

RFLP : Restriction fragment length polymorphism

S.A : Sang animal

SDS : Dodécylsulfate de Sodium

S.H: Sang human

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

STR: Short Tandem repeat

VNTR: Variable Nucleotide Tandem Repeat

°C : Degré Celsius

µl : micro litre

sommaire

Introduction	1
I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	2
I.1 ADN, élément de preuve en police scientifique.....	2
I.1.1 Historique	2
I.1.2 Génome humain	3
I.2 Les polymorphismes du génome humain	3
I.2.1 Le polymorphisme de taille des fragments de restriction.....	4
I.2.2 Les séquences répétées en tandem des fragments de restriction	4
I.2.3 Les séquences courtes répétées en tandem.....	5
I.2.4 Le polymorphisme mononucléotidique.....	6
I.3 Les marqueurs haplotypiques :.....	7
I.3.1 Polymorphisme de l'ADN mitochondrial	8
I.3.2 Chromosome Y.....	9
I.4 Profil d'identification génétique (Empreinte génétique) en criminalistique	9
I.4.1 Les indices biologiques et identification génétique	9
I.4.2 Sources d'analyse d'ADN	10
I.5 Quelques méthodes d'analyse de base en biologie légale.....	11
I.5.1 Tests préliminaires	11
I.5.2 Le processus d'analyse de l'ADN.....	12
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	17
II.1 Matériel :	17
II.1.1 Matériel biologique	17
II.1.2 Matériel non biologique	17
II.2 Méthodes	18
II.2.1 Sang	18
II.2.2 Sperme.....	25
II.2.3 Extraction de l'ADN	31
II.2.4 Quantification par PCR en temps réel	34
II.2.5 Amplification par PCR multiplexe.....	35
II.2.6 La post-PCR	36
II.2.7 Electrophorèse capillaire	38

III.	RESULTATS ET DISCUSSION	41
III.1	La validation du test Kastle Meyer.....	41
III.1.1	Résultats de la validation du test Kastle Meyer	41
III.1.2	Interprétation et discussion	43
III.2	La validation du test OBTI Hexagon.....	44
III.2.1	Témoin positif et témoin négatif du test OBTI Hexagon.....	44
III.2.2	Résultats de la validation du test OBTI Hexagon	45
III.2.3	Interprétation et discussion	49
III.3	La validation du test PSA	51
III.3.1	Témoin positif et témoin négatif du test PSA	51
III.3.2	Résultats de la validation et interprétation du test PSA.....	52
III.4	Obtention des profils génétiques et interprétation.....	60
	Conclusion.....	65
	Références bibliographiques	

Introduction

L'empreinte génétique est considérée comme l'une des découvertes médico-légale les plus importantes de notre siècle. Basée sur le fait que l'ADN (Acide Désoxyribo Nucléique) de chaque être humain est unique, le typage par empreinte génétique est aujourd'hui, la technique la plus efficace pour l'identification d'individus. Cela est devenu possible depuis l'avènement des techniques de biologie moléculaire essentiellement, la PCR (Polymérase Chaîne Réaction) et le séquençage, qui offrent à la justice une méthode fiable d'investigation. (Blandin, 2004)

En effet, l'ADN possède des régions variables d'un individu à l'autre, ces régions sont identiques dans toutes les cellules d'un individu et l'ADN est hérité pour moitié de chacun des deux parents. Il existe plusieurs types de polymorphismes ; aujourd'hui l'établissement d'un profil génétique est basé sur l'analyse d'un de ces types nommé microsatellites (Short Tandem Repeat ou STR). Ce sont des séquences variables entre les individus qui permettent de poser une identité génétique à toute trace biologique. Le profil final obtenu est unique pour chaque individu, d'où leur grand intérêt et notamment en criminalistique. (Blandin, 2004)

On peut établir une empreinte génétique à partir de tout échantillon qui renferme de l'ADN comme les taches de sang, du sperme, de la salive ou tout autre tissu ou liquide organique comportant des cellules nucléées. Dans le contexte forensique, déterminer la nature de l'échantillon biologique portant l'information génétique est nécessaire pour établir le profil génétique d'un individu. (Coquos, et al 2013)

Chaque échantillon biologique appelle des techniques ingénieuses d'analyse au laboratoire et des tests indicatifs particuliers pour la facilité de détection avec une sensibilité et une spécificité élevées, ces tests peuvent prendre pour cibles des composés chimiques ou des protéines particulièrement concentrées dans certaines matières biologiques telles que l'hémoglobine pour le sang, la PSA pour le sperme. (Coquos, et al 2013)

Dans le cadre de notre projet de fin d'études au laboratoire de Police Scientifique et Technique, il nous a été proposé de nous intéresser à la validation de trois tests préliminaires. Le test Kastle Meyer détecte du sang, l'OBTI est un test spécifique au sang humain et l'Antigène Spécifique de Prostate ou la PSA qui est un test adapté pour le sperme humain. Les échantillons biologiques passent par différentes étapes du processus analytique de l'ADN jusqu'à l'obtention d'un profil génétique.

L'objectif de ce travail est de valider ces trois tests préliminaires à partir de différentes sources biologiques, Nous nous appuyons sur certaines caractéristiques de validations telles que la sensibilité, la spécificité et la répétabilité.

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 ADN, élément de preuve en police scientifique

I.1.1 Historique

La découverte des premiers marqueurs génétiques est récente puisqu'elle date des années 1900 pour le groupe sanguin ABO par Landsteiner, et de 1958 pour le système d'histocompatibilité tissulaire HLA par Dausset. (Mansuet-Lupo, et *al* 2007)

En 1985, il a été démontré que l'ADN contenait des séquences qui se répétaient, et surtout, que ce nombre de répétitions variait d'un individu à l'autre. Cette découverte fut appliquée dès 1986 sur des prélèvements effectués sur deux scènes criminelles au Royaume-Uni concernant un cambriolage et un viol. Les résultats obtenus furent alors comparés à un suspect, et celui-ci fut exclu après une étude sur des prélèvements effectués sur tous les hommes de la région. En effet, un profil identique retrouvé sur la scène de criminelle fut identifié chez quelqu'un d'autre, depuis, l'analyse ADN est appelée << empreinte génétique >> (Jeffrey, et *al*, 1985)

Les groupes sanguins furent les premiers marqueurs génétiques utilisés dans la définition de l'unicité des individus. Ils furent ensuite remplacés, en appréhendant directement l'ADN, par l'étude des régions répétitives du génome, beaucoup plus polymorphes et donc beaucoup plus discriminatives. (Mansuet-Lupo, et *al* 2007)

Au début des années 90, la technologie a fait un spectaculaire pas en avant avec la technique de la PCR (Polymérase Chain Réaction). Puisque les scientifiques ont pu amplifier du matériel génétique à partir d'ADN extrait. La méthode était rapide, fiable et très sensible et donnait la possibilité de détecter des séquences répétées qui pourraient potentiellement être plus utiles. (Doutremepuich, 2001)

I.1.2 Génome humain

Le génome humain est constitué de 3,2 milliards de paires de nucléotides répartis en deux fois 23 chromosomes. (Robert. J 2010)

Depuis 1866, date à laquelle Gregor Mendel mit en évidence la transmission des facteurs héréditaires sur des petits pois, la génétique a connu des progrès constants dans le but d'appréhender les mécanismes complexes de formation et de fonctionnement des organismes.

L'histoire de la génétique est marquée par un tournant majeur : la découverte faite en 1953 par James Watson et Francis Crick, en dévoilant la structure et la composition de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ensuite le projet du génome humain a débuté en 1990. (Sfar et Chouchane, 2008).

L'ADN nucléaire est formé de seulement 5 % de séquences codant pour des protéines, appelées gènes et dont l'homologie entre les individus d'une même espèce est grande. Le reste est constitué en grande partie de séquences répétitives, très polymorphes, et dont la fonction précise n'est pas encore élucidée. Ces séquences répétées en tandem se situent soit dans les introns des gènes, soit entre les gènes. (Mansuet-Lupo, et *al*, 2007)

I.2 Les polymorphismes du génome humain

Le polymorphisme est à la base de l'identification par les empreintes génétiques, car grâce à lui, chaque individu possède un génome unique. (Loistron, 2009)

L'analyse de la partie non codante du génome a permis de mettre en évidence des régions variables. On distingue plusieurs types de polymorphisme dans le génome :

I.2.1 Le polymorphisme de taille des fragments de restriction

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) résulte de variations individuelles de la localisation de sites de restriction pour une enzyme donnée. Il peut être dû soit à une création ou une suppression d'un site de restriction en relation avec une mutation, soit à une variation de distance entre deux sites suite à une insertion ou une délétion d'ADN. Ces polymorphismes sont révélés par la méthode du Southern blot (Southern, 1975) après digestion enzymatique (généralement par *HinfI* en Europe et par *HaeIII* aux Etats Unis) de l'ADN extrait afin d'observer, grâce à leur reconnaissance par une sonde marquée, des fragments différant par leur longueur (Botstein et al, 1980 ; Wyman et White, 1980). (Petkovski, 2006), ont été utilisés comme outils d'analyse génétique en 1974. (Botstein, et al 1980)

Un RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) est défini aussi par un couple sonde/enzyme de restriction et correspond à un locus génétique précis permettant, de ce fait, la caractérisation d'allèles. (Laperche, et al 1991)

I.2.2 Les séquences répétées en tandem des fragments de restriction

Ils ont été découverts en 1985 par Alec Jeffreys (Loistron, 2009), c'est une classe particulière de répétitions en tandem qui est présente en nombre variable dans différentes positions chromosomiques. On appelle ce type de répétitions, répétition en tandem en nombre variable (en anglais, *variable number tandem repeat* ou VNTR), ou parfois ADN mini-satellite.

Chez l'homme, les loci des VNTR sont des séquences de 1 à 5 Kb contenant un nombre variable de répétition de 15 à 100 nucléotides. Si l'on dispose d'une sonde de VNTR et si l'ADN génomique total est coupé par une enzyme de restriction qui ne possède aucun site cible dans les répétitions de VNTR, alors un transfert Southern révèle un grand nombre de fragments de tailles différentes liés à la sonde. En raison de la variabilité du nombre de répétitions en tandem d'un individu à l'autre, l'ensemble des fragments qui apparaissent sur l'autoradiographie du transfert Southern est hautement spécifique de chaque individu. On appelle en fait ces profils de bandes des empreintes d'ADN (*DNA fingerprints* en anglais). On les utilise très fréquemment en médecine légale. (Griffiths, et al. 2002)

I.2.3 Les séquences courtes répétées en tandem

Des marqueurs cibles de l'ADN employés dans les analyses génétiques habituellement menées par la police scientifique sont appelés séquences répétitives courtes (ou STR short tandem repeat). Apparus comme marqueurs possibles au début des années 1990, les STR ont rapidement montré leur potentiel comme technique de police scientifique. (Alleyne, et *al* 2009)

Le nombre de ces répétitions est variable d'un individu à l'autre, constituant une série d'allèles. (Mansuet-Lupo, et *al* 2007)

Les microsatellites sont également des séquences d'ADN répétées en tandem et sont également connues sous le nom de répétitions de séquences simples ou de courtes répétitions en tandem (STR). Ils se composent d'unités de répétition de 1-5 bp répétées typiquement 5-30 fois. La plupart des loci microsatellites peuvent être efficacement amplifiés par PCR standard car les régions répétées sont plus courtes que 100 pb (figure 1). Les microsatellites peuvent montrer un polymorphisme important (mais sont infiniment plus variables que les minisatellites variables), et sont abondants dans tout le génome humain.

Les microsatellites sont particulièrement adaptés à l'analyse d'échantillons médico-légaux contenant une quantité d'ADN dégradée et / ou limitée. La première application médico-légale était le typage des microsatellites à partir des restes squelettiques d'une victime de meurtre. (Keiji et Jeffreys, 2005)

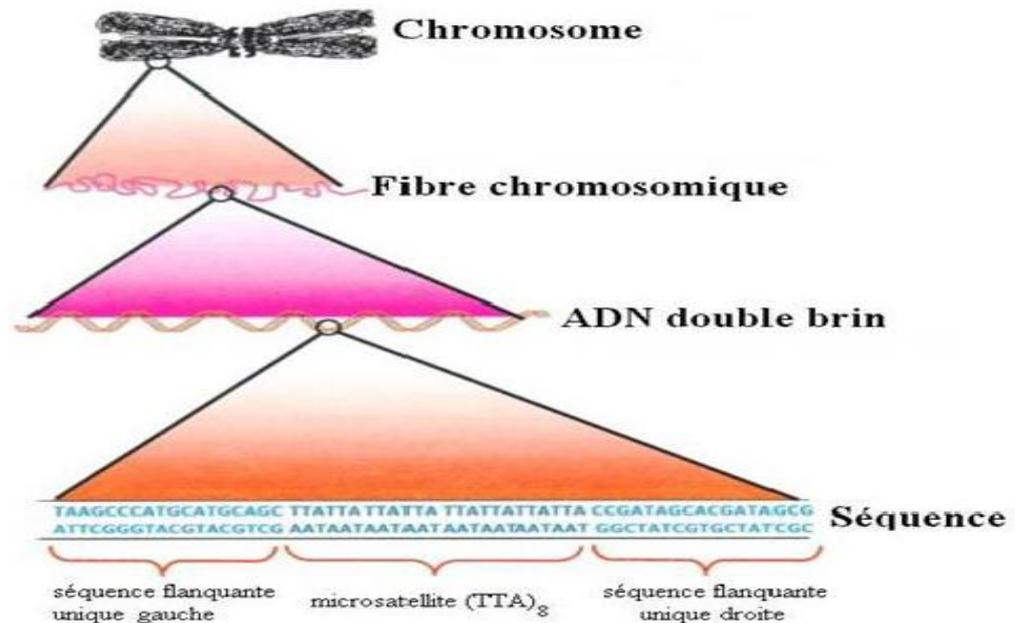


Figure 1 : Schéma d'un microsatellite (Iglesias, 2009)

I.2.4 Le polymorphisme mononucléotidique

Les polymorphismes de nucléotide unique SNP (single nucleotide polymorphism) sont les plus répandus du génome humain, représentant environ 90% des polymorphismes de l'ADN humain.

Au cours des dernières années, les SNP ont remplacé les microsatellites comme marqueurs de choix pour la plupart des études d'organismes modèles et en particulier pour les humains. (Varela et Amos, 2009)

Cette forme courante de polymorphisme se rencontre environ toutes les 1 000 bases dans le génome humain et 1,8 million de SNP sont actuellement répertoriés. (Le morvon, Formenno, et al 2007)

La majorité des SNP sont localisés dans les régions non codantes du génome et de ce fait n'a pas d'impact détectable sur le phénotype d'un individu (Keyser et Petkovski, 2006)

Un polymorphisme mononucléotidique (SNP). Deux allèles sont montrés qui diffèrent à une position, indiquée par l'étoile : la quatrième position dans l'allèle G est une guanine tandis que dans l'allèle A c'est une adénine. Dans la plupart des cas, l'événement de mutation au

locus spécifique qui crée un SNP est un événement unique et seulement deux allèles différents (bialléliques) sont normalement trouvés (figure 2) (Goodwin, et *al* 2007)

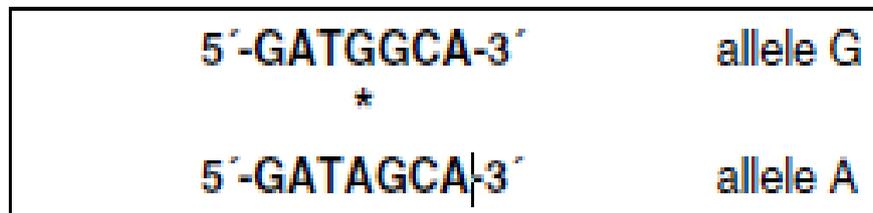


Figure 2 : Polymorphisme monocléotidique SNP (Goodwin, et *al* 2007)

I.3 Les marqueurs haplotypiques :

Les marqueurs autosomaux subissent un brassage génétique à chaque génération puisqu'ils sont transmis de manière biparentale. Ainsi, la moitié de l'information génétique d'un individu lui vient de son père et l'autre moitié de sa mère. Les marqueurs uniparentaux, c'est-à-dire ceux situés sur le chromosome Y et sur l'ADN mitochondrial, sont transmis d'une génération à l'autre sans changement sauf dans le cas de mutations. Les marqueurs de l'ADN mitochondrial, transmis de mère à enfant, permettent de retracer les lignées maternelles et ceux du chromosome Y, transmis de père en fils, les lignées paternelles.

Cette caractéristique rend les marqueurs moins informatifs pour l'identification individuelle. L'information génétique de chaque marqueur uni parental est appelée haplotype au lieu de génotype puisqu'un seul allèle est détecté par individu. (Petkovski, 2006)

I.3.1 Polymorphisme de l'ADN mitochondrial

Les mitochondries sont de petites organelles situées à l'intérieur de nos cellules, qui effectuent les réactions biochimiques productrices de l'énergie dont elles ont besoin. On rencontre environ 100 à 1000 mitochondries par cellules et chaque mitochondrie contient une dizaine de copies d'un petit ADN.

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est un ADN circulaire. Il ne contient que peu d'ADN non codant. Il ne contient notamment pas de séquences répétitives. Le polymorphisme disponible sur cet ADN est donc limité. Il est essentiellement constitué de variations de séquences (polymorphisme de séquence) concentrées dans une portion d'ADN non codant d'environ 1100 nucléotides de long, appelée la *région de contrôle* (parfois aussi «D-loop»).

L'analyse d'ADN mitochondrial porte en général sur les deux portions les plus variables de la région de contrôle, portions appelées HV1 (région hypervariable 1) et HV2 (région hypervariable 2). Ces deux portions s'étendent approximativement des nucléotides 16024 à 16365 respectivement des nucléotides 73 à 340 (Figure 3) (Coquos, et al 2013)

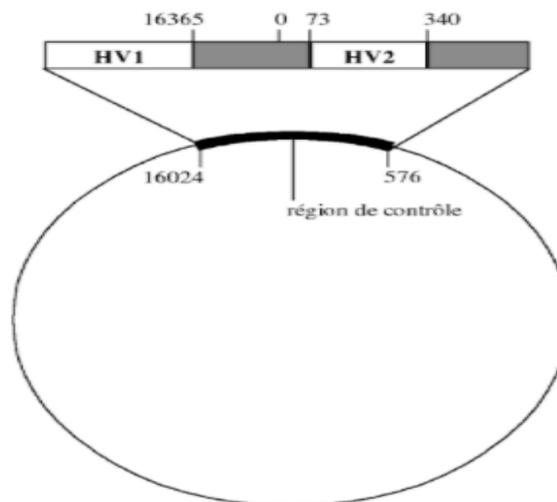


Figure 3 : Présentation de l'ADN mitochondrial, de la région de contrôle et des régions hypervariables. (Coquos, et al 2013)

I.3.2 Chromosome Y

Le chromosome Y est l'un des plus petits chromosomes humains, avec une taille moyenne estimée à 60 millions de paires de bases (Mb). (Gusmao, et al 1999)

L'ADN du chromosome Y est exclusivement d'origine paternelle, un individu masculin possède donc les mêmes allèles que son père, son oncle paternel, son grand-père paternel, ses frères, etc. (Mansuet-Lupo, et al 2007)

Les polymorphismes spécifiques de Y se sont révélés particulièrement utiles dans le travail de routine en médecine légale. Les STR semblent être les marqueurs du chromosome Y les plus appropriés en raison de leurs niveaux de diversité comparativement aux polymorphismes bialléliques.

Le modèle de l'héritage le long de la lignée masculine rend les polymorphismes Y (STR) appropriés pour le test de paternité quand une progéniture mâle est en question, et sont aussi utiles dans la discrimination des taches dans les enquêtes médico-légales lorsqu'un suspect est impliqué. C'est le cas de la plupart des crimes violents, y compris les infractions sexuelles. (Gusmao, et al 1999)

Le premier microsatellite polymorphique du chromosome Y, aujourd'hui nommé DYS19, a été décrit en 1992 (Roewer et Epplen, 1992 ; Petkovski, 2006)

I.4 Profil d'identification génétique (Empreinte génétique) en criminalistique

I.4.1 Les indices biologiques et identification génétique

L'expertise génétique est issue d'un principe dégagé par M. Edmond Locard, professeur de médecine légale du XXème siècle, en 1910 : « *tout individu, à l'occasion de ses actions criminelles en un lieu donné, dépose et emporte à son insu des traces et des indices : sueur, sang, poussière (...)*. (Bruno, 2017).

Donc 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)

I.4.2 Sources d'analyse d'ADN

I.4.2.1 Sang

La tache de sang représente le matériel élémentaire le plus courant mais aussi un des plus difficiles à exploiter en médecine légale judiciaire. C'est un matériel courant car il existe pratiquement toujours des traces sanglantes là où il y a agression contre un individu quel que soit le type d'agression. (Nicolas et Albrespy, 1969)

- Définition

Le sang contient des cellules anucléées (globules rouges) et des cellules nucléées (globules blancs), donc la quantité d'ADN qui peut être obtenue par analyse de ce liquide physiologique provient essentiellement des leucocytes, que l'on trouve à raison d'environ 5000 à 10000 cellules par μl . Il est la substance biologique, par excellence, retrouvée sur les scènes de crime. Les globules rouges ont pour rôle de transporter l'oxygène, ils contiennent de l'hémoglobine qui fixe le fer et l'oxygène et qui donne sa couleur rouge au sang.

I.4.2.2 Sperme

Le sperme contient normalement d'importantes quantités d'ADN dans les spermatozoïdes, qui le rend très utile pour l'établissement d'empreintes génétiques, surtout dans les cas d'agression sexuelle. (Curran, 1997)

- Définition

Le sperme est un liquide biologique blanchâtre d'aspect visqueux contenant des cellules reproductrices mâles appelées spermatozoïdes. Ce liquide physiologique est composé chez l'homme, du liquide prostatique ou séminal contenant non seulement des spermatozoïdes, des cellules épithéliales mais également des protéines telles que la glycoprotéine P30 également appelée PSA secrété par la glande prostatique.

I.5 Quelques méthodes d'analyse de base en biologie légale

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, 1985) (Tableau 1) (Doutremepuich, 2012)

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'analyse 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.5.1 Tests préliminaires

- kastle Meyer

Idéalement, les tests médico-légaux, pour identifier la présence du sang devraient être sensibles, spécifiques et consommer aussi peu d'échantillon que possible.

Le test Kastle-Meyer (KM) est un test chimique rapide et facile, ce test identifie le composant clé de l'hémoglobine, qui en présence de peroxyde d'hydrogène catalyse l'oxydation de l'indicateur phénolphtaléine, le rendant rose. (Sloots, et *al* 2017)

- OBTI Hexagone

Il s'agit d'un test immuno-chromatographique rapide de détection du sang humain. Ce nouveau produit spécifique à l'hémoglobine de primates s'est avéré très performant et valable pour l'identification judiciaire du sang humain dans plusieurs études. (Beaudoin, et *al* 2005). Il a été validé par Hochmeister et al. (Hermon, et *al* 2003), le test en soi est très simple d'utilisation et peut être effectué directement sur la scène de crime sans autre artifice. (Beaudoin, et *al* 2005)

- Antigène spécifique de prostate (PSA)

L'antigène spécifique de la prostate (PSA, également connu comme p30), une glycoprotéine produite par la glande de la prostate et sécrétée dans le plasma séminal, est maintenant reconnu comme un marqueur pour la détection de sperme dans les affaires criminelles impliquant des mâles ayant subi une vasectomie ou azoospermiques. (Hochmeister, et *al* 1997)

I.5.2 Le processus d'analyse de L'ADN

Les substances biologiques à partir desquelles le test va être réalisé (sang, sperme, salive, etc.) doivent être apportées au laboratoire sous une forme répondant aux conditions requises. On peut ainsi effectuer un prélèvement avec un écouvillon s'il s'agit d'un objet de taille importante et analyser ensuite le prélèvement, découper un vêtement pour récupérer une trace d'ADN ou utiliser du ruban adhésif pour détacher des cellules de peau d'un objet qui aura été touché par une personne. Les traces révélant des réactions positives avec les tests préliminaires vont subir un processus d'analyse.

I.5.2.1 Extraction

L'extraction organique, parfois appelée extraction au phénol-chloroforme-isoamyl (PCI), a été la méthode la plus utilisée pour l'extraction de l'ADN.

Elle implique l'addition en série de plusieurs produits chimiques. On ajoute d'abord du dodécylsulfate de sodium (SDS) et de la protéinase K pour briser les membranes cellulaires et décomposer les protéines qui protègent les molécules d'ADN lorsqu'elles se trouvent dans les chromosomes.

Ensuite, un mélange de phénol / chloroforme / isoamyl est ajouté pour séparer les protéines de l'ADN. Ce dernier est plus soluble dans la partie aqueuse du mélange organique-aqueux. Lorsqu'elles sont centrifugées, les protéines indésirables et les débris cellulaires sont séparés de la solution aqueuse. Les molécules d'ADN en phase et en double brin peuvent être transférées proprement pour l'analyse. (Butler, 2012)

I.5.2.2 Quantification

La quantification de l'ADN est une étape importante de l'analyse. Il s'agit ici de déterminer la quantité d'ADN extrait des cellules. La concentration en ADN extrait dépend fortement de la nature et de la taille du tissu analysé et elle est généralement comprise entre zéro et quelques centaines de nanogrammes (ng). La sensibilité des systèmes de génotypage en aval est d'à peu près 20 cellules (environ 130 pg d'ADN) en conditions normales de laboratoire. (Alleyne, et al 2009)

I.5.2.3 Amplification par Polymérase Chain Réaction (PCR)

Cette étape consiste à augmenter ou à amplifier la très petite quantité d'ADN contenue dans les échantillons prélevés dans le cadre du travail de police scientifique afin d'obtenir une quantité suffisante pour détecter un profil. Pour cela, on a recours à la PCR, qui divise en deux parties chaque molécule d'ADN (composée de deux brins) et utilise les deux brins séparés comme modèles pour créer de nouvelles molécules d'ADN.

La moitié manquante de l'hélice d'ADN est reconstituée sur chacun des deux éléments d'origine. On obtient alors deux molécules d'ADN complètes, toutes deux identiques à la première. L'ensemble de ce processus de duplication est répété à de très nombreuses reprises, de vingt-cinq à trente-cinq fois d'affilée, l'idéal étant de doubler le nombre total de molécules d'ADN à chaque étape. À la fin, le nombre de molécules d'ADN est plusieurs millions de fois supérieur au nombre de départ.

Pour les besoins de l'identification humaine, les STR, ou microsatellites, sont devenus les marqueurs les plus utilisés car ils mettent en évidence une grande variabilité des allèles au sein d'une population donnée. En Algérie, au laboratoire de Police Scientifique et Technique, 16 loci sont utilisés pour l'obtention d'un profil génétique autosomal (tableau II).

Les années 1990 ont connu une nouvelle évolution, celle de l'amplification génétique par la *Polymerase Chain Reaction* (PCR). (Rouger, et al 1996)

Cette technologie a permis de dupliquer plusieurs fois de petits fragments d'ADN dans des délais très brefs. En général, il est possible d'obtenir plus de 100 millions de copies en, à peu près, 2 heures. (Doutermepeuch, 2001)

La PCR est une réaction de polymérisation en chaîne réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN (ADN matriciel), la Taq polymérase, les amorces et les quatre désoxyriboNucléosides Triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon. Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température réitérés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur. Cet appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. Chaque cycle comprend les trois étapes suivantes allant de quelques dizaines de secondes à quelques minutes. (Figure 4) (Iglesias, 2009)

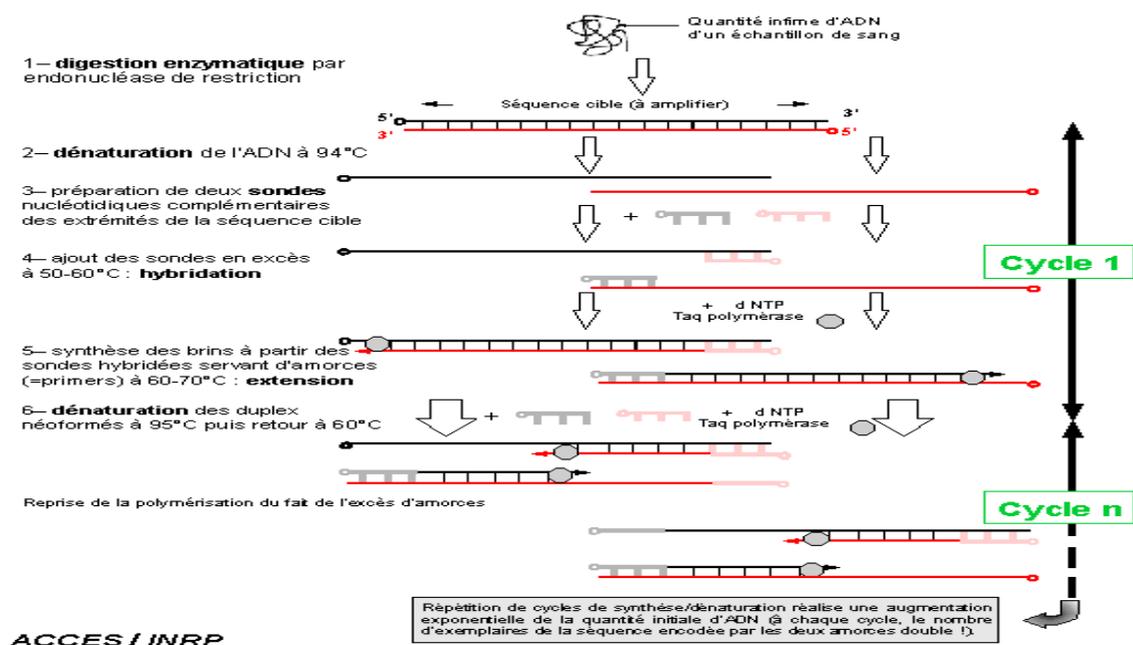


Figure 4 : schémas expliquant les différentes étapes de la PCR (Iglesias, 2009)

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

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

I.5.2.4 Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse est une méthode qui a pour objectif de séparer des fragments d'ADN de tailles différentes. Un profil STR amplifié par PCR multiplexe contient plusieurs fragments STR de différentes longueurs selon l'allèle considéré. L'électrophorèse permet de les trier par taille et de les présenter sous la forme d'un électrophorégramme.

Lors de l'électrophorèse, les différents fragments d'ADN contenu dans l'ADN amplifié obtenu grâce à la PCR sont séparés en fonction de leur taille. Il est ainsi possible de mesurer la taille des fragments et, à partir de cette information, d'obtenir un profil génétique STR. (Alleyne, et *al* 2009)

L'électrophorèse capillaire est une électrophorèse qui a seulement la particularité de se dérouler dans un tube presque aussi fin qu'un cheveu (un tube capillaire).

(Coquoz, et *al* 2013)

II. MATERIEL ET METHODES

Ce travail a été réalisé à la Sous-direction de la Police Scientifique et Technique, au département d'identification génétique /ADN se trouvant à Château neuf, à Alger, pendant une période de 4 mois.

II.1 Matériel :

II.1.1 Matériel biologique

Le matériel biologique choisi pour cette étude se compose des liquides biologiques humains suivants :

- Du sang
- Du sperme
- De la salive
- Et de l'urine

II.1.2 Matériel non biologique

Tableau III : Appareillages et équipements, kits et réactifs utilisés

Salles	Appareillages et équipements	Kits utilisés et réactifs
Préparation des réactifs	Autoclave - Balance- Spatule - coupelles - Epprouvette - Erlen Meyer	Phénolphtaléine -Potasse KOH - Poudre de zinc - eau déminéralisé - Dodécylsulfate de sodium
Examen de scellés	Ecouvillons stériles - Micro pipettes 10/100/200/1000 µl - Eppendorfs - Coupelles - Tips - Portoirs - Pinces - Gazes stériles	Kit OBTI Hexagone - Kit PSA Seratec - réactif Kastle Meyer
Extraction	Centrifugeuses - Bloc chauffant - Vortex - Hotte verticale	Phénol chlorophorme isoamyl - PK - DTT - Tampon d'extraction - Ethanol à 70°C - Ethanol absolue
Quantification	Thermocycler 7500fast - Centrifugeuse pour plaques - Plaque real time PCR	Kit humain Quantifiler
PCR	Thermocycler - Plaque PCR - Papier aluminium - Support plaque PCR	Kit PCR Identifier - dNTP, Mg ²⁺ - Primers - Taq Polymérase
Post PCR	Thermobloc - Cryobloc	Formamide - Standard de taille - LADDER
Electrophorèse capillaire	Séquenceur 3100 (ABI PRISM) - Ordinateur	

- Au cours de ce travail les tubes et tous les échantillons sont soigneusement identifiés.
- Tout le matériel est stérilisé.
- Tous les tests comportent des témoins positif et négatif.

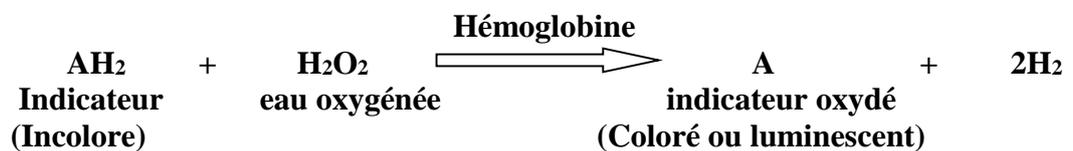
II.2 Méthodes

II.2.1 Sang

- Propriétés chimiques du sang

La caractéristique chimique la plus spécifique du sang est son contenu en hémoglobine. C'est cette propriété qui est exploitée par la totalité des tests chimiques destinés à identifier la présence de sang. L'hémoglobine est un puissant catalyseur de l'oxydation de toute sorte de substances oxydables par l'eau oxygénée.

Schéma général des réactions chimiques catalysées par l'hémoglobine est le suivant :



Dans les tests indicatifs, ces substances oxydables sont choisies pour que le produit A, obtenu au terme de la réaction, soit un produit coloré ou un produit luminescent. Il existe une large palette de substances qui possèdent cette qualité. Il y a donc une large gamme de tests indicatifs envisageables pour le sang. Ils se différencient par la couleur et la visibilité du produit de la réaction, par leur sensibilité et par leur spécificité.

- Contrôles

Les tests indicatifs sont des tests fournissant une réponse en oui ou non, pour lesquels il est essentiel de s'assurer de leur bon fonctionnement. Le contrôle négatif est constitué d'un support ne portant pas la moindre trace de sang, qui doit donc donner un résultat négatif. Le contrôle positif est constitué d'un support portant une petite tache de sang dilué jusqu'à la limite de détection du test, qui doit donner un résultat positif.

- Sensibilité

Une façon très commode d'exprimer la sensibilité des tests indicatifs est d'indiquer le plus haut degré de dilution du sang qui permet encore d'obtenir un résultat positif. La sensibilité des tests indicatifs du sang devrait dépasser 1 sur 100 000. C'est-à-dire que l'on devrait être en mesure de détecter une tache constituée de sang dilué 100 000 fois (1 millilitre de sang versé dans 100 litres d'eau). Une tache de sang dilué 100 fois n'est plus visible sur du tissu coloré. Il est donc évident que ces tests permettent de détecter des traces de sang qui seraient sinon invisibles.

- Spécificité

Un résultat positif de ces tests donne une forte présomption qu'il s'agit de sang mais ne le prouve pas de façon absolue. La présence d'agents oxydants ou de matières végétales contenant des peroxydases (enzymes catalysant la même réaction que l'hémoglobine) peut conduire à des faux positifs. Tous les fruits et légumes ayant tendance à se colorer sur les surfaces fraîchement coupées contiennent des peroxydases. Le cas échéant, ces enzymes peuvent être facilement décomposées en chauffant le buvard de prélèvement pendant 20 minutes à 100 °C.

D'une façon générale, néanmoins, les risques de faux positifs sont modestes. Le risque de se tromper est même extrêmement faible pour les traces bien visibles il est tout à fait exceptionnel qu'une substance ayant l'apparence visuelle du sang, donne une réaction avec le test indicatif, mais ne soit pas du sang. Le risque est plus élevé avec des traces très faibles ou diluées, où l'information visuelle de l'apparence de la trace n'est pas disponible. Il semble que le réactif de Kastle –Meyer soit le moins susceptible de donner des faux positifs.

Les risques de faux négatifs sont très limités. L'hémoglobine est une molécule très stable. Il y a donc peu de risques qu'une vraie tache de sang ne donne aucune réaction au test indicatif par exemple parce qu'elle est trop vieille. Les faux négatifs peuvent provenir d'un réactif défectueux, mais ce genre d'incident peut aisément être évité avec un contrôle positif. Ils peuvent provenir d'une sensibilité du test insuffisante. Toute trace dont la teneur en sang n'atteint pas ce seuil ne pourra logiquement pas être détecté. (Coquoz, et al 2013)

II.2.1.1 La nature de la tache

- Test Kastle Meyer

1-Préparation de réactif pour le test de kastle Meyer

Dans un erlen de 250 ml mettre :

- 2g de phénolphtaléine
 - 20g de potasse KOH
 - 20g poudre de zinc
 - 100 ml d'eau déminéralisée
- On chauffe le mélange pendant 45 min à 100°C-150°C avec un agitateur (La couleur rose foncé indique un état oxydé).
- Après 45 min (La couleur transparente indique un état réduit).
- Répartir dans un flacon et conserver à 4°C à l'abri de la lumière (Recouvrir d'aluminium, et de para film)

2-Protocole

Dans un eppendorf on met :

- Témoin positif (sang).
- 2 à 4 gouttes du réactif de Kastle Meyer.
- 2 à 4 gouttes de H₂O₂ (0.1v).
- Agitation

Résultat :

Couleur rose en présence d'oxygène moléculaire (détection de l'hémoglobine)

3- Préparation des échantillons pour la validation du test Kastle Meyer

Tableau IV : Echantillons utilisés pour le test Kastle Meyer.

Echantillons		
Sang humain pur (10µl)	La rouille	Sang animal (mouton) (10µl)
Sang humain 1/100 (10µl)	Ketchup	Javel pur
Sang humain 1/1000 (10µl)	Tomate	Javel + sang humain (pure)
Sang humain ancien pur		Javel + sang humain (1/100)
Sang humain tissu taché ancien		

(Chaque échantillon répété trois fois).

II.2.1.2 L'origine de la tache

Test OBTI Hexagon

1- Principe

Le principe du fonctionnement du test immuno-chromatographique de l'hémoglobine humaine (HB) est illustré dans la (Figure 5), avec le fonctionnement schématique sur la gauche et une photo sur la droite.

En A, l'hémoglobine de l'échantillon se fixe à des anticorps anti-hémoglobine marqué avec un colorant disponible dans l'orifice de dépôt du test.

En B, la migration dans le buvard permet au complexe HB-anticorps d'atteindre une première zone où il est capturé par un deuxième anticorps anti-hémoglobine immobilisé en laissant apparaître une bande colorée.

En C, le surplus d'anticorps est emporté jusqu'à une deuxième zone où il est capturé par un anticorps anti-anticorps en laissant également apparaître une bande colorée.

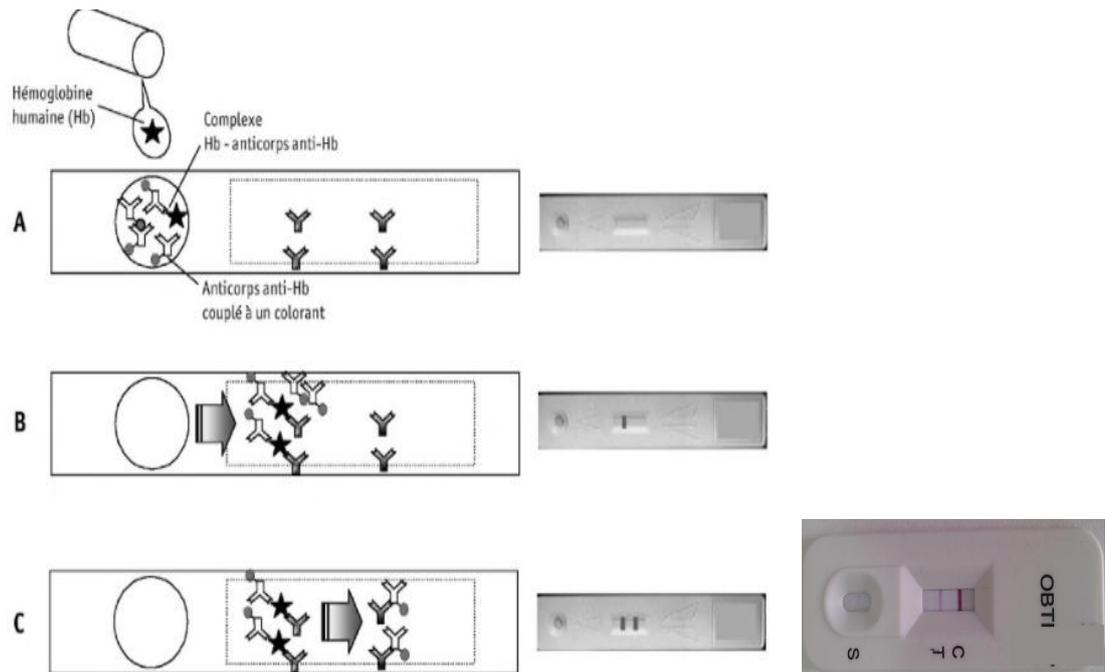


Figure 5 : Les différentes étapes du test immuno-chromatographique de l'hémoglobine humaine

Interprétation du test :

***ligne de contrôle (C)**

- présence d'une bande → test valide.
- absence de bande → test invalide, à répéter

***ligne de résultat (T)**

- présence d'une bande(même de coloration faible) → HB humaine détectée.
- absence de bande → HB humaine non détectée.

2-Protocole

Le test a été effectué essentiellement selon les instructions du fabricant.

Les taches sèches ont été grattées à l'aide de l'applicateur, qui fait partie intégrante du bouchon du tube de collecte fourni avec le kit.

Dans certaines expériences, un fil provenant de la compresse de gaze stérile ou l'écouvillon a été immergé directement dans 2 ml de tampon dans le tube de collecte. Le tube collecteur contenant l'échantillon a été agité manuellement et incubé à température ambiante pendant 30 minutes. Deux gouttes ont été transférées à l'appareil.

Dans certaines expériences, le temps a été prolongé jusqu'à une heure et, dans d'autres expériences, le volume du tampon d'échantillon a été réduit à 0,2 ml afin d'augmenter la sensibilité du test.

3- Préparation des échantillons pour la validation du test OBTI Hexagon

Des échantillons de sang pur ou du sang dilué fournis à partir de donneurs humains et animaux (mouton, le lapin et la poule) ont été déposés sur des compresses de gaze stériles et séchés à l'air à température ambiante.

Les liquides corporels utilisés comme le sperme et la salive ont été obtenus du laboratoire d'analyse fournies par des donneurs et déposés sur des compresses de gaze stériles et sur des écouvillons. Toutes les taches ont été séchées à l'air à température ambiante.

Tableau V : Echantillons de sang

Sang humain pur	Sang mouton pur	Sang lapin pur	Sang poule pur
Sang humain + H ₂ O 1/250	Sang mouton + H ₂ O 1/250	Sang lapin + H ₂ O 1/250	Sang poule + H ₂ O 1/250
Sang humain + H ₂ O 1/1000	Sang mouton + H ₂ O 1/1000	Sang lapin + H ₂ O 1/1000	Sang poule + H ₂ O 1/1000
Sang humain + H ₂ O 1/2000	Sang mouton + H ₂ O 1/2000	Sang lapin + H ₂ O 1/2000	Sang poule + H ₂ O 1/2000

Prélèvement de 10 µL de chaque échantillon permet la réalisation des dépôts sur des compresses de gaze stériles, Chaque échantillon répété trois fois.

Tableau VI : Les échantillons de liquide corporel

Sperme pur
Salive

Faire des prélèvements de 10 µl sur écouvillons stériles à partir de ces liquides corporels, chaque échantillon répété trois fois.

II.2.2 Sperme

- Test de confirmation SERATEC PSA-SEMIQUANT

Le test immuno-chromatographique SERATEC PSA-SEMIQUANT permet de détecter la glycoprotéine P30 produite exclusivement par les cellules épithéliales du tissu prostatique. Cette protéine présente dans le liquide séminal à la concentration de 0,5 à 3,0 mg/ml a pour fonction de fluidifier le liquide séminal. Sa sécrétion est indépendante de la production de spermatozoïdes.

1-Principe du test PSA

Le test utilise deux anticorps monoclonaux anti-PSA murins reconnaissant deux épitopes différents de la PSA. L'un de ces anticorps est immobilisé dans la région test (T) de la membrane. Plus loin, la région du contrôle © et la région du standard interne contiennent des anticorps polyclonaux caprins anti-anticorps de souris. Le puits de dépôts contient le second anticorps monoclonal anti-PSA murin fixé à des particules d'or (Gold-anti-PSA).

La PSA de l'échantillon forme un complexe PSA-anticorps-gold et migre par capillarité jusqu'à la région T où il forme un complexe avec l'anticorps murin anti-PSA immobilisé et cesse de migrer les anticorps libres, plus légers migrent jusqu'aux régions C et I développant deux lignes qui sont indépendantes de la présence de PSA dans l'échantillon mais permettent de vérifier que le test est correctement exécuté.

- Caractéristiques qualitatives

Sensibilité : Avec l'aide des produits, il y a la possibilité de détecter un minimum de 1ng/ml de PSA.

Le **High Dose Hook Effect** (effet pronoze) n'entraîne pas de faux résultats négatifs : le liquide séminal dilué en 1/1 jusqu'à 10^{-6} est positivement testé avec le tampon de dilution.

Spécificité : Le produit ne montre pas de réaction croisée avec d'autres protéines du liquide séminal. Lors d'immunoblot du liquide séminal, on observe avec les anticorps, seulement une bande réactive de la taille des PSA. Une réaction croisée entre le liquide séminal et d'autres mammifères (chien, chat, cheval, cochon, bœuf, bélier, âne), à l'exception des primates, n'a pas été observée.

Une réaction croisée avec d'autres liquides corporels peut être pratiquement exclue par l'extraction ou la dilution de l'échantillon.

Interprétation du test :

***Ligne de contrôle (C)**

- Contrôle en cas d'erreur d'application et de l'intégrité des composants du test

***Ligne interne standard**

- L'intensité de la couleur de la ligne relève une concentration en PSA de » 4 ng PSA/ml.

***Ligne de résultat (T)**

- Seulement visible lors de PSA positifs, elle reflète la concentration en PSA de l'échantillon. (> 4 ng/ml)

2-Protocole

- Mettre les échantillons dans des tubes eppendorf.
- Ajouter 500µl de la solution du tampon spécialement élaborée pour les PSA semiquant.
- Laisser macérer pendant 2h à 4 C°.
- Récupérer le macérât dans de nouveaux tubes passoirs.
- Centrifuger les tubes à 13.000 rpm pendant 3 minutes.
- Le surnageant sera utiliser pour le test d'orientation et confirmation Seratec PSA Semiquant.
- Avant le début du test, ramener tous les composants à température ambiante.
- Séparer la cassette test du sachet de protection, et inscrire l'identification sur la cassette.
- A l'aide de la pipette en plastique, verser 3 gouttes de l'échantillon (120 µl) dans la chambre d'échantillonnage, et commencer à chronométrer.
- Conserver le restant de l'échantillonnage pour, éventuellement par la suite, effectuer d'autres tests.
- Après 10 minutes de temps de réaction à température ambiante, le résultat peut être lu. A ce moment-là, le liquide dans la chambre d'échantillonnage doit être entièrement absorbé.

3- Préparation des échantillons pour la validation du test PSA

1/ Réalisation d'une gamme de dilution à partir d'un échantillon de sperme pur. Cette gamme s'étend de l'échantillon dilué au 1/250 à celui dilué au 1/4000 dans de l'eau stérile. Un prélèvement de 10 µl de chaque dilution permet la réalisation des dépôts sur de la gaze stérile, qui sont ensuite séchés à l'air à température ambiante.

Tableau VII : Les échantillons de sperme humain

Sperme pur
Sperme + H ₂ O 1/250
Sperme + H ₂ O 1/500
Sperme + H ₂ O 1/1000
Sperme + H ₂ O 1/2000
Sperme + H ₂ O 1/4000

Le prélèvement de 10 µl de chaque échantillon permet la réalisation des dépôts sur des compresses de gaze stériles, Chaque échantillon répété trois fois.

2/ Préparation des ratios de prélèvements salive et sang avec le sperme sur des écouvillons stériles.

Tableau VIII : Les ratios de prélèvements salive et sang avec le sperme

Sperme et sang	Sperme et salive
5µl sperme + 5µl sang	5µl sperme + 5µl salive
5µl sperme + 10µl sang	5µl sperme + 10µl salive
5µl sperme + 20µl sang	5µl sperme + 20µl salive
5µl sperme + 40µl sang	5µl sperme + 40µl salive

Le prélèvement de 10 µl de chaque échantillon permet la réalisation des dépôts sur des écouvillons, Chaque échantillon répété trois fois

3/ Préparation des mélanges de sperme/urine (femme), sperme/ prélèvement vaginal, et d'autres liquides corporels sur des écouvillons stériles.

Tableau IX : Les échantillons préparés

Echantillons	Prélèvement corporelles	Echantillons	Prélèvement corporelles
1	Urine (femme) +sperme	6	Salive (Femme)
2	Prélèvement vaginale + sperme	7	Urine (Femme)
3	Urine (homme)	8	Sang (Femme)
4	Prélèvement fécal	9	Salive (Homme)
5	Prélèvement vaginal	10	Sang (Homme)

4/Préparation des échantillons du sperme animal (lapin) sur des écouvillons stériles.

Tableau X : Les échantillons de sperme animal (lapin)

Sperme pur
Sperme + H ₂ O 1/250
Sperme + H ₂ O 1/500
Sperme + H ₂ O 1/1000
Sperme + H ₂ O 1/2000
Sperme + H ₂ O 1/4000

II.2.3 Extraction de l'ADN

II.2.3.1 Préparation des échantillons d'extraction

Nous avons procédé à la technique d'extraction organique avec le phénol-chloroforme-isoamyl sur des échantillons préparés précédemment

Tableau XI : Echantillons utilisés pour une extraction organique différentielle

Echantillons	Prélèvement corporelles / Sperme
01	Prélèvement vaginal / 5 µl
02	Urine (Femme) / 5 µl

Tableau XII : Echantillons utilisés pour une extraction organique

Echantillons	Quantité
Sperme	Pur
	1/250
	1/1000
Sang	1/100
Sang	Pur

II.2.3.2 Extraction différentielle au phénol-chloroforme-isoamyl

Le but d'une lyse différentielle ou d'une extraction différentielle est de séparer les cellules masculines (spermatozoïdes) des cellules épithéliales, à partir des prélèvements vaginales, anales ou autres afin d'obtenir séparément un profil génétique masculin et féminin. Cette phase est importante lorsqu'on est en présence de matériel féminin. Ce dernier étant souvent plus abondant il peut masquer celui de l'agresseur lors de l'établissement du profil ADN de l'agresseur.

-Protocole

1^{er} étape lyse cellulaire

1/ Première lyse :

- Déposer 500 µl de tampon d'extraction dans le tube contenant l'échantillon (50 µl).
- Ajouter 15 µl de PK (10mg/ml).
- Vortexer légèrement.
- Incuber pendant 2h à 56°C (lyse douce des cellules épithéliales)
- Vortexer légèrement et passer les échantillons en tube passoire afin de récupérer le lysat.
- Centrifuger pendant 3min à 13000 rpm.
- Récupérer le surnageant (fraction épithéliale) dans un nouveau tube eppendorf identifié et conserver à 4°C en attendant l'extraction phénol/chloroforme).

2/ Laver le culot (fraction Spermatique) :

- * Ajouter au culot 500 µl de la solution de lavage, vortexer vigoureusement jusqu'à remise en suspension totale du culot.
- * Centrifuger pendant 5min à 13000 rpm pour éliminer le reste des cellules épithéliales.
- * Éliminer le surnageant et refaire l'opération une seconde fois.

3/ Deuxième lyse :

- Ajouter 500 µl de la solution d'extraction S au culot.
- Ajouter 15 µl de PK et 25 µl de DTT.
- Vortexer et centrifuger brièvement.
- Incuber pendant 2h à 56°C ou overnight à 37°C

2^{ème} étape Phénolisation

- Après incubation, vortexer et centrifuger brièvement.
- Déposer 500µl du mélange PCI aux tubes contenant fraction Spermatique (1 volume d'échantillon pour 1 volume de PCI).
- Vortexer vigoureusement, pour obtenir un mélange homogène de couleur blanche.
- Centrifuger les échantillons pendant 3min à 13000 rpm.
- Prélever la phase supérieure contenant l'ADN (micropipette P-200). Ne pas toucher l'interface en pipetant.
- Transférer la phase supérieure dans un nouveau tube eppendorf identifié.
- Refaire les étapes 1 à 4 deux à trois fois si la galette protéique est importante. (Maintenir un rapport de 1 volume de phase aqueuse pour 1 volume de PCI).
- Prélever la phase aqueuse contenant l'ADN dans un nouveau tube identifié (Ne pas toucher l'interface protéique).

3^{ème} étape Elution (Précipitation à l'éthanol)

- Après phénolisation, déposer 1000 µl d'éthanol absolu (conservé à -20° C) dans le tube contenant la phase aqueuse.
- Mélanger doucement par inversion.

- Centrifuger à 10000 rmp pendant 10 min.
- Jeter l'éthanol (vider le tube). Cette étape doit être réalisée rapidement.
- Ajouter 500 µl d'éthanol à 70 % (conservé à +4° C).
- Mélanger doucement par inversion.
- Centrifuger à 10000 rmp pendant 5 min.
- Vider le tube.
- Laisser les tubes s'évaporer dans un bloc chauffant (40 à 56° C) pendant quelques minutes.
- Remettre l'ADN en suspension en ajoutant 50 µl d'eau ultra pure autoclavée.
- Vortexer vigoureusement, puis faire un short spin, on obtient enfin les extractums.

II.2.4 Quantification par PCR en temps réel

La concentration optimale d'ADN doit être comprise entre 0.05 et 0.125ng/µl pour le bon fonctionnement de la PCR multiplex, c'est la raison pour laquelle tous les extractums obtenus doivent être quantifiés par PCR en temps réel.

Protocole

La quantification est effectuée grâce au kit Quantifiler Humain DNA contenant : l'ADN standard 200 ng / µl, le Primer et le PCR reaction mix (conservé à -21 ° C).

- Préparer la courbe d'étalon à partir de l'ADN standard de 200ng/µl et procéder aux dilutions la première de ¼ et sept dilutions qui suivent de 1/3.
- Préparer ensuite le Master mix dans un eppendorf selon les calculs suivants (Tableau XIII) :

Tableau XIII : Composition du master mix (kit Quantifiler Humain DNA)

Réactifs	Volume
Reaction mix	V (µl)= 12,5 * (le nombre d'échantillons (N) + 2)
Primer	V (µl)= 10,5 * (le nombre d'échantillons (N) + 2)

- Répartir 23µl de ce master mix dans chaque puit de la plaque PCR, ajouté 2 µl de chaque échantillon et l'ADN standard sur un des puits. Recouvrir la plaque avec un film adhésive transparent, centrifuger 1 min à 1600rpm, placer la plaque dans un thermocycleur (7500 Fast) et lancer le programme.

II.2.5 Amplification par PCR multiplexe

La PCR multiplex permet d'amplifier plusieurs fragments d'ADN simultanément en utilisant différentes paires d'amorces.

L'amplification est assurée par le kit IDENTIFILER PLUS contenant les primers, master mix, témoin positif, et permet d'amplifier 15 STRs simultanément ainsi que l'amélogénine, marqueur permettant de déterminer le sexe d'un individu.

Ce kit utilise un système de 4 colorants (**Tableau N°XIV**) fluorescents sur les amorces de manière à identifier des STR de loci différents mais de même taille afin d'éviter le chevauchement des fragments d'ADN au moment de l'électrophorèse capillaire :

Tableau XIV : Le système des 4 colorants des STR

Couleur	STR
VIC (vert)	D3 S1358 - TH01 - D13 S317 - D16S539
FAM (bleu)	D8S1179 - D21S11 - D7S820 - CSF1PO
NED (jaune)	D2S1338 - D19S433 - vWA - TPOX
PET (rouge)	D18S51 - Amel - D5S818 - FGA

Protocole

- Préparer les dilutions selon les résultats de la quantification.
- Préparer ensuite le master mix dans un eppendorf selon les calculs suivants (Tableau XV) :

Tableau XV : Composition du master mix (kit IDENTIFILER PLUS)

Réactifs	Volume
Reaction mix	$V (\mu\text{l}) = 10 * (\text{le nombre d'échantillons } (N) + 2)$
Primer	$V (\mu\text{l}) = 5 * (\text{le nombre d'échantillons } (N) + 2)$

- Répartir 15 μl de ce master mix dans chaque puit de la plaque PCR de 96 puits, et ajouter 10 μl de chaque échantillon sans oublier le contrôle positif (ADN fourni dans le kit) et négatif (eau distillée pure) en suivant l'ordre de dépôt. Recouvrir la plaque avec une feuille d'aluminium, placer la plaque dans le thermocycleur (7500 Fast) genamp pcr system 9700 et lancer la PCR.

II.2.6 La post-PCR

C'est une étape de dénaturation qui suit la PCR pour obtenir les amplicons sous forme monobrin nécessaire pour la migration en électrophorèse capillaire.

Cette étape est effectuée grâce aux réactifs suivant :

- Formamide : agent intercalant qui maintient l'ADN sous forme monobrin
- Deux marqueurs de tailles :
 - * LIZ qui fournit une échelle appelée « Standard de taille » et renseigne sur la taille des allèles correspondant au nombre de répétitions du motif en paire de base.
 - * LADDER ' Allelic Ladder Identifiler Plus ' un mélange d'ADN pré amplifié contenant tous les allèles possibles pour les 16 marqueurs permet l'identification des allèles.

Protocole

- Retirer la plaque du thermocycleur et préparer une autre plaque à puits.
- Préparer ensuite le mix post-PCR dans un eppendorf selon les calculs suivants (Tableau XVI) :

Tableau XVI : Composition du mix Post-PCR

Réactifs	Volume
Formamide	$V (\mu\text{l}) = 8.7 * (\text{le nombre d'échantillons } (N) + 3)$
Standard de taille	$V (\mu\text{l}) = 0.3 * (\text{le nombre d'échantillons } (N) + 3)$

- Répartir 9 μl du mix Post-PCR dans chaque puit de la plaque et ajouter 4 μl de chaque produit amplifié sans oublier un témoin positif correspondant à un profil connu, un témoin négatif qui ne contient pas de trace biologique et le Ladder en suivant l'ordre de dépôt.
 - Recouvrir la plaque avec un film aluminium, placer la plaque dans le thermocycleur pour la dénaturation pendant 3 min à 95°C.
 - Déposer la plaque sur un cryobloque à -20°C pendant 3 min puis centrifuger 1min à 1600rpm.
- La plaque est ainsi prête pour être lancée dans le séquenceur 3130XL Genetic analyser.

II.2.7 Electrophorèse capillaire

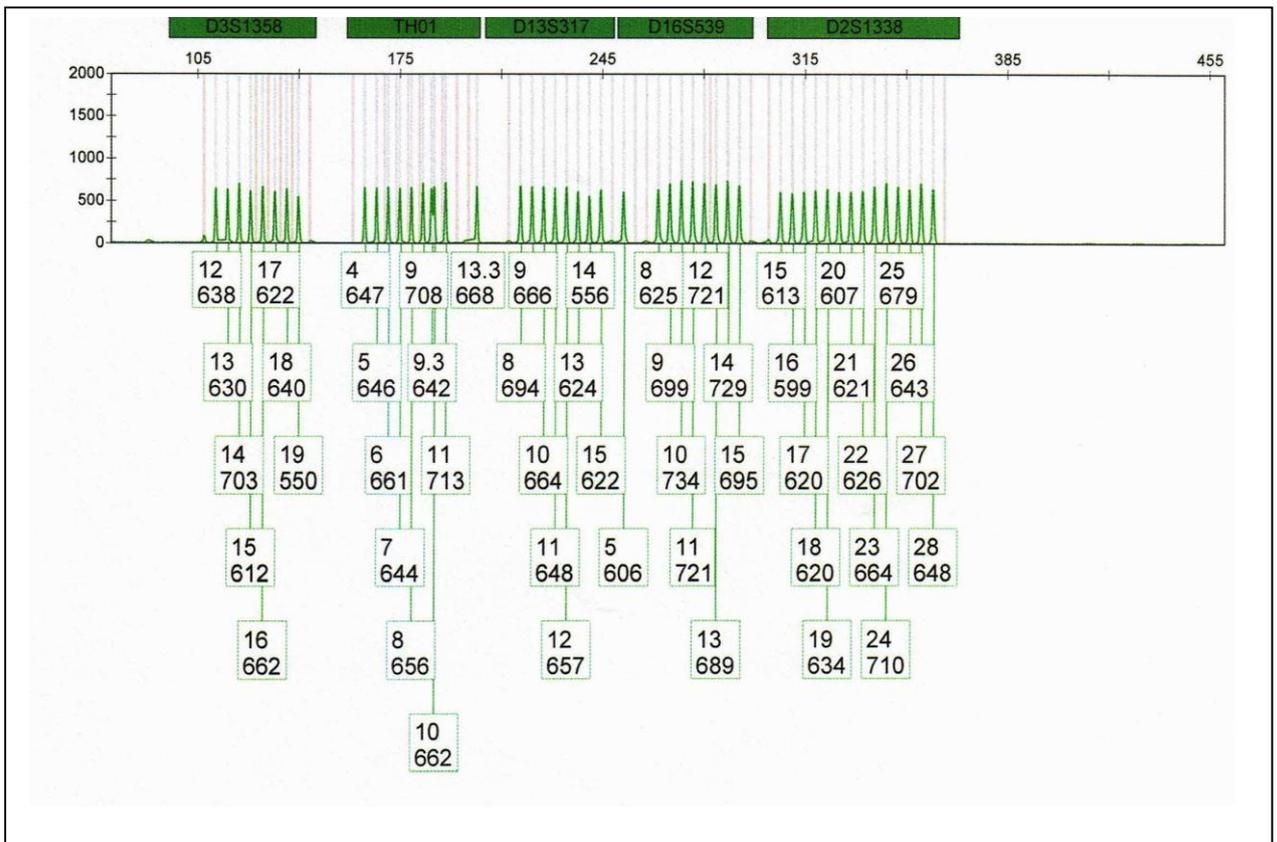
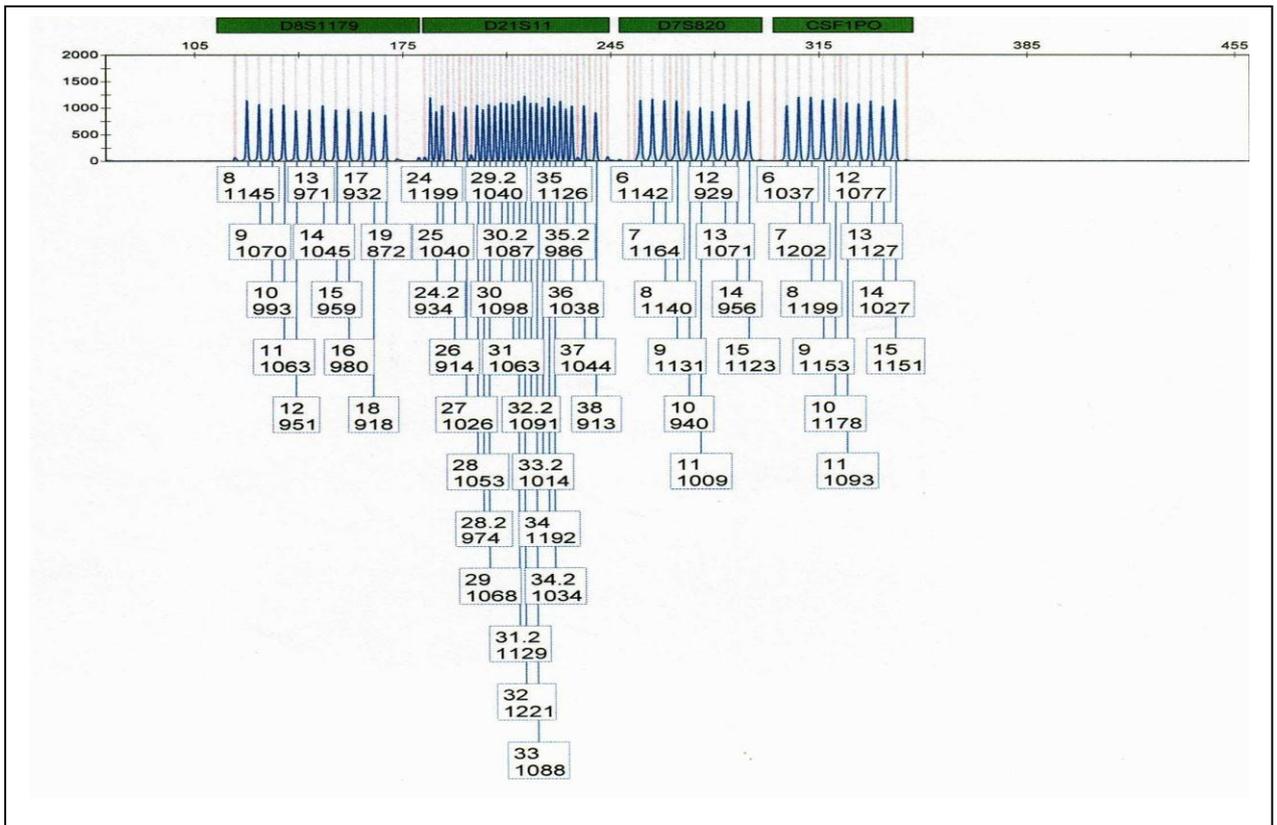
Les produits de post-amplification dénaturés sont soumis à une électrophorèse capillaire dans un séquenceur de type ABI PRISM 3130 XL comprenant 16 capillaires remplis d'un polymère POP4 (Performance Optimized Polymere 4). L'ADN étant chargé négativement, les petites molécules migrent plus vite sous l'effet du champ électrique tandis que les plus grosses molécules sont retardées.

Après injection une haute tension (3000 volts) est appliquée à travers le capillaire afin de séparer les fragments d'ADN en quelques minutes.

Dès qu'une molécule arrive au niveau de la fenêtre de détection, elle est bombardée par le faisceau laser du séquenceur et émet une fluorescence qui est captée par un détecteur.

Le séquenceur est relié à un ordinateur dans lequel sont transférés les données brutes de l'analyse électrophorétique puis grâce à un logiciel performant 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 standard de taille interne LIZ et externe LADDER (Figure 6) ce dernier est un produit amplifié et renferme le maximum d'allèles relatifs aux marqueurs dans la population humaine.



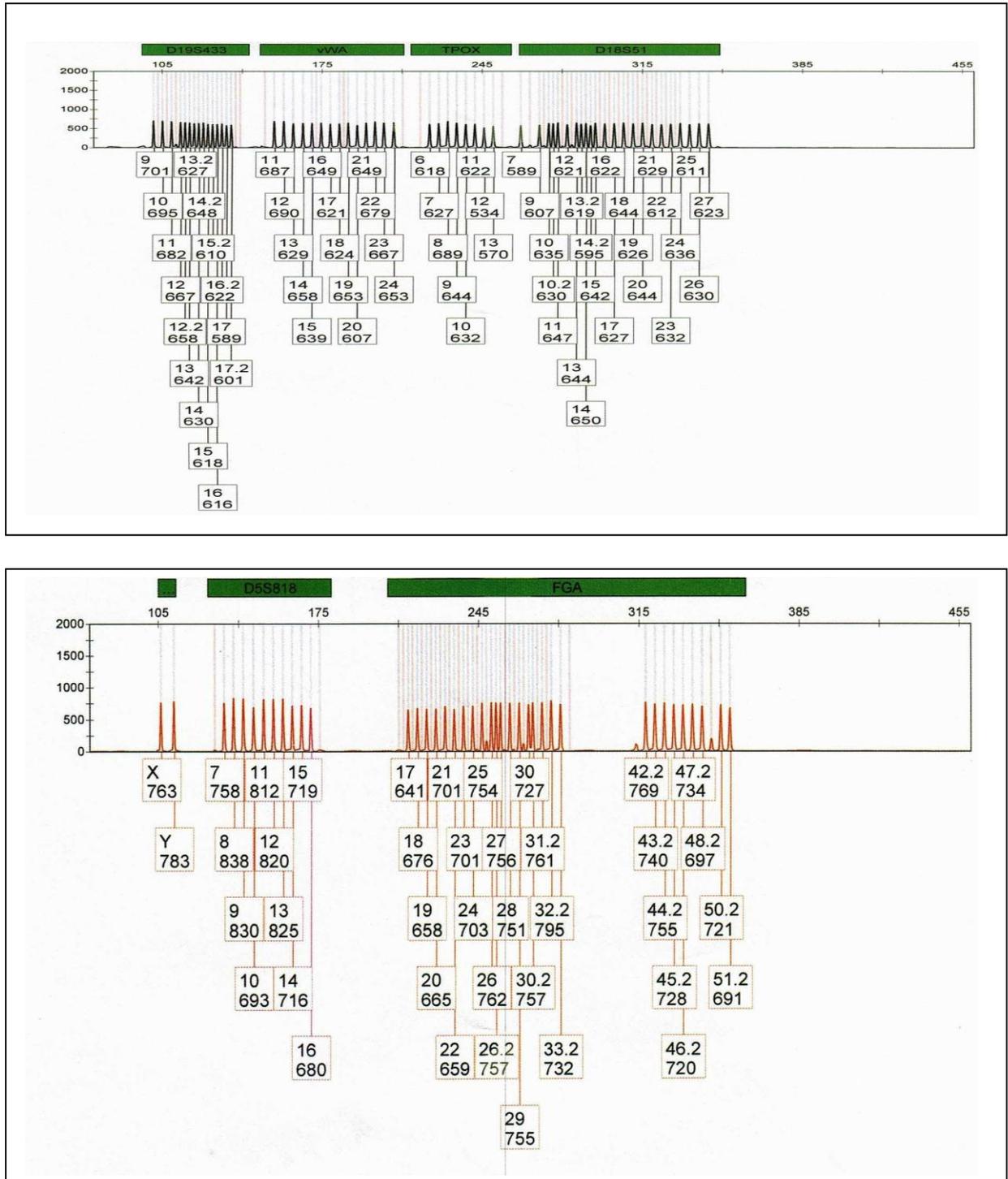


Figure 6 : Le ladder du kit Identifiler Plus

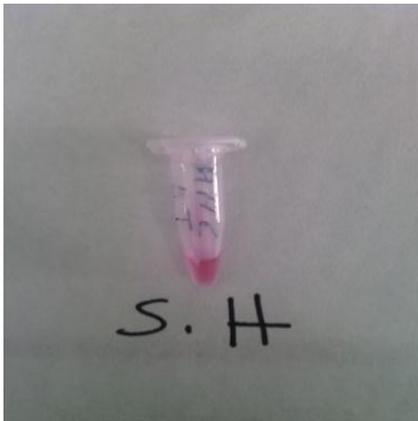
III. RESULTATS ET DISCUSSION

A travers cette étude dont l'objectif principal est la validation de trois tests préliminaires Kastle Meyer, OBTI et PSA à partir de différentes sources biologiques que nous avons eu à identifier, nous avons essayé de nous baser sur différentes caractéristiques de validation telles que la sensibilité, spécificité et répétabilité.

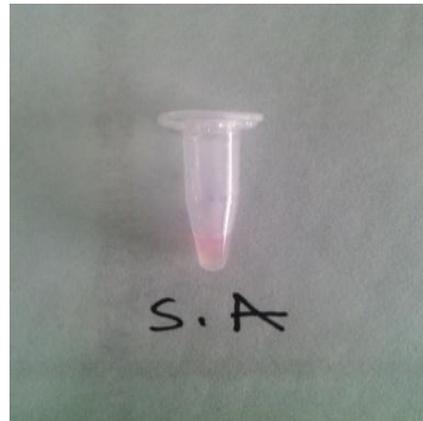
III.1 La validation du test Kastle Meyer

III.1.1 Résultats de la validation du test Kastle Meyer

Sachant que la validation du test Kastel Meyer repose sur l'apparition d'une coloration rose pour la détection du sang, les résultats suivant ont été observés (Figure 7)



Résultat positif (+)



Résultat positif (+)



Résultat négatif (-)

Figure 7 : Les résultats de test Kastle Meyer

- En ce qui concerne les différents échantillons testés, les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XVII : Résultats obtenus par test Kastle Meyer

Echantillons	Instantané	10 min	15 min
Sang humain pur	+++	+++	+++
Sang humain 1/100	++	++	++
Sang humain 1/1000	+	+	+
La rouille	-	-	-
Ketchup	-	-	-
Tomate	-	-	-
Sang humain ancien pur	+++	+++	+++
Sang animal (mouton)	+++	+++	+++
Javel pur	-	-	-
Javel + sang humain	+++	++	++
Javel + sang humain (1/100)	+	+	-
Sang humain tissu taché ancien	+++	+++	+++

+ : Résultat positif

- : Résultat négatif

III.1.2 Interprétation et discussion

Le test Kastle Meyer nous a permis de révéler tous les échantillons du sang (humain et animal) qui ont donc donné un résultat positif. Cependant les échantillons du sang à différentes dilutions jusqu'à 1/1000 ont encore permis d'obtenir le même résultat ce qui révèle la **sensibilité** du test.

Le sang ancien qu'il soit liquide ou sur un tissu datant au moins de 10 ans donne des résultats positifs avec le test Kastle Meyer cela augmente sa sensibilité vis à vis de la présence de la molécule d'hémoglobine qui résiste aux différentes conditions externes.

Le réactif de Kastle Meyer semble être le moins susceptible de donner des résultats faux positifs. Les échantillons tels que la rouille et l'eau de javel sont connus pour donner de légers faux positifs dans d'autres tests chimiques du sang permettant par la même occasion de trouver des traces du sang, contrairement au test Kastle Meyer qui donne un résultat négatif ce qui révèle la **spécificité** du test. (Cox, 1991)

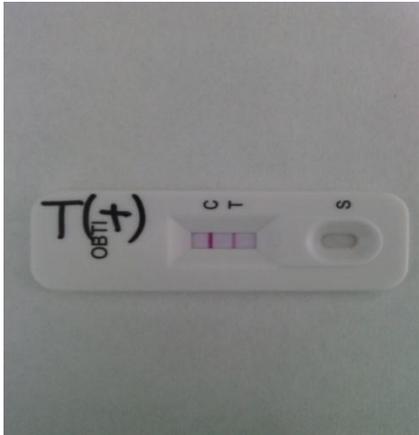
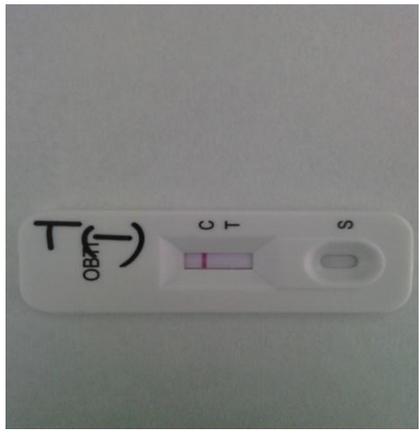
On peut donc conclure que le test Kastle Meyer est très efficace, facile à réaliser et fournit rapidement des résultats sûrs et fiables.

III.2 La validation du test OBTI Hexagon

III.2.1 Témoin positif et témoin négatif du test OBTI Hexagon

Le test OBTI Hexagon permet de confirmer la présence de sang humain dans un échantillon, les témoins permettent de montrer le résultat obtenu en cas de test positif ou négatif (Tableau XVIII)

Tableau XVIII : Témoin positif et témoin négatif du test OBTI Hexagon.

Témoin	Echantillon	Résultat
Positif +	Sang humain pur + Tampon	
Négatif -	Eau + Tampon	

* Avec le résultat positif (Présence du sang humain) apparition de 2 lignes

* Avec le résultat négatif seulement une ligne qui est visible

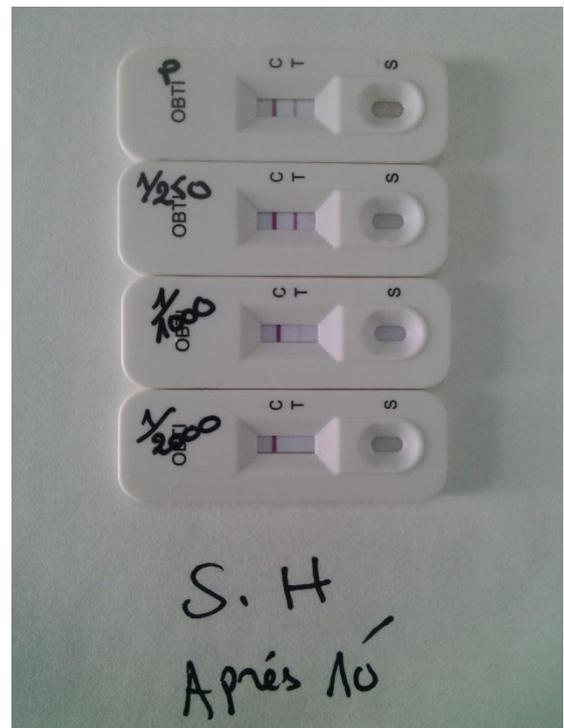
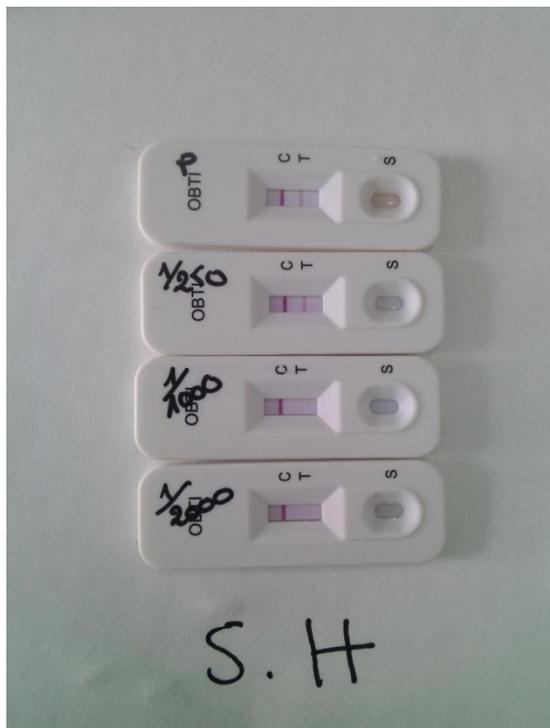
III.2.2 Résultats de la validation du test OBTI Hexagon

Tableau XIX : Résultats de la sensibilité du test OBTI Hexagon sur le sang humaine.

Temps \ Dilution	Instantané		10min		15min		20min		1h	
	2ml	0.2ml	2ml 0.2ml		2ml 0.2ml		2ml 0.2ml		2ml	0.2ml
Pur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1000	-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
1/2000	-	-	-	+/-	-	+	-	+	-	+

+ : Résultat positif

- : Résultat négatif



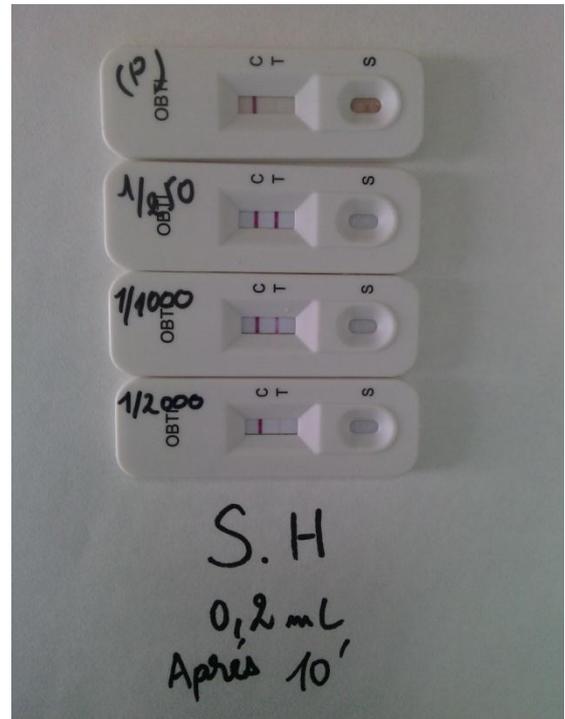
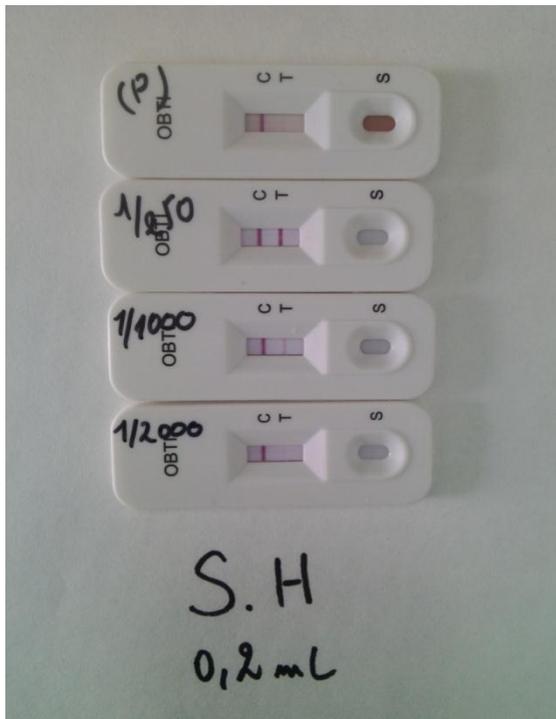
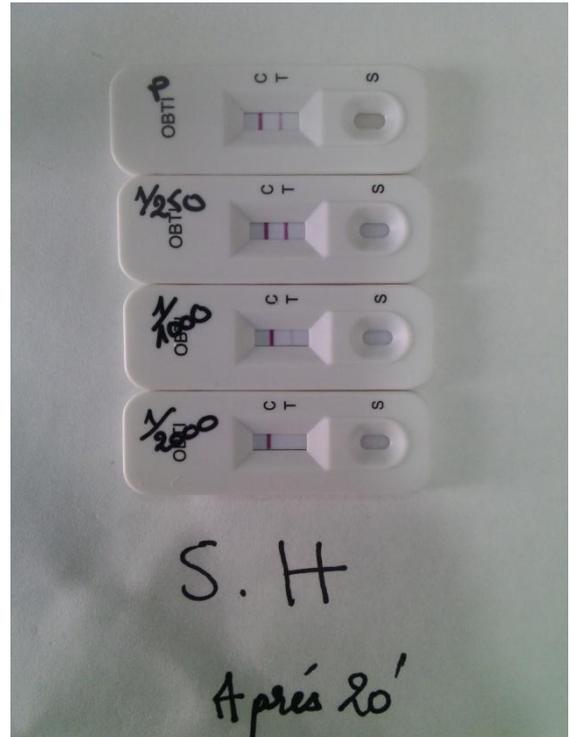
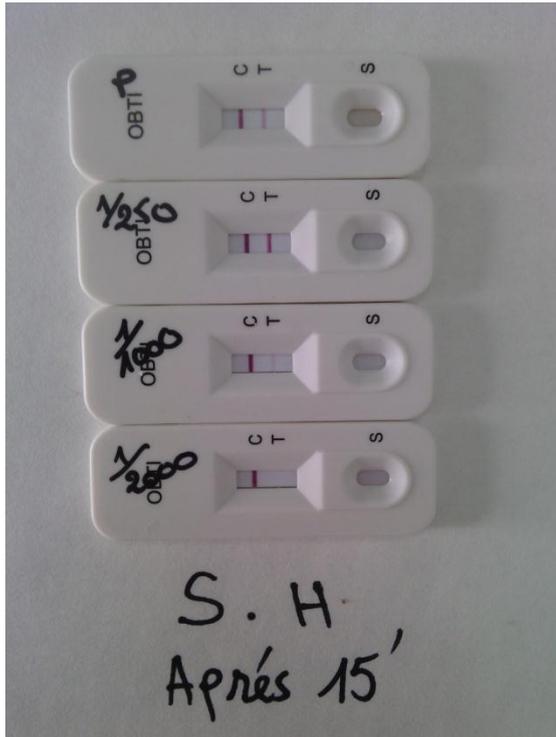


Figure 8 : Résultats du test OBTT Hexagon avec le sang humain aux différents moments avec des concentrations de 2 ml et 0.2 ml du tampon.

Tableau XX : Résultat de la spécificité du test OBTI Hexagon sur le sang animale.

Temps / Délution	Instantané		10min		15min		20min		1h	
	2ml Mouton	0.2ml poule								
Pur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : Résultat positif
 - : Résultat négatif

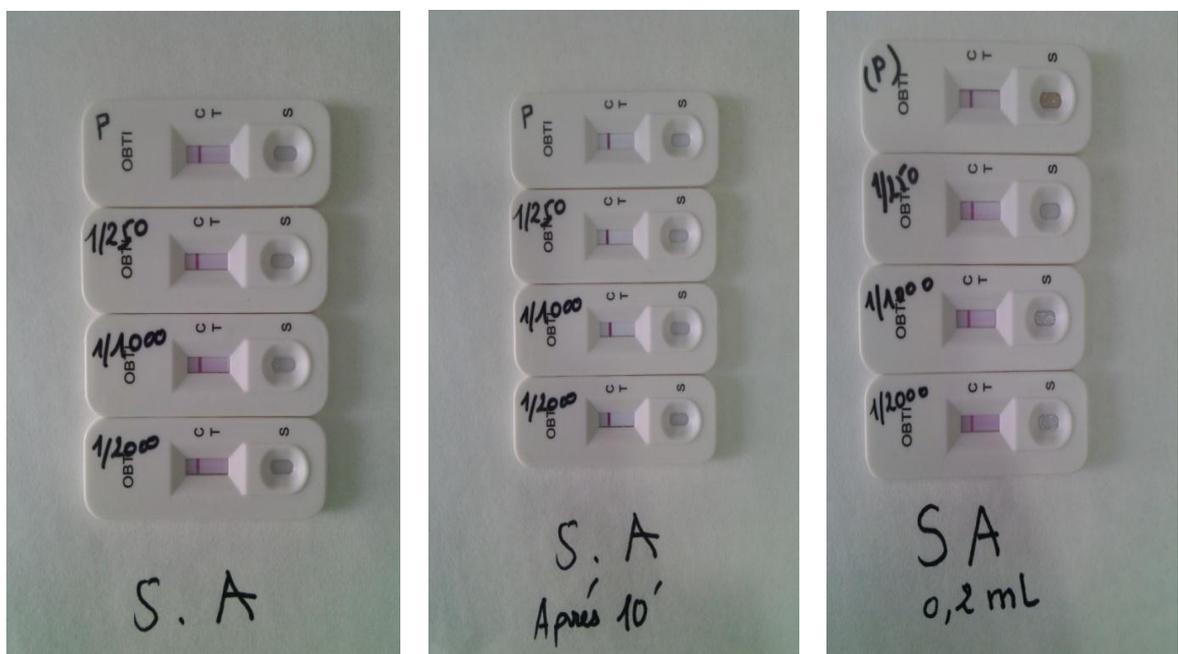


Figure 9 : Résultats du test OBTI Hexagon avec le sang animal aux différents moments avec des concentrations de 2 ml et 0.2 ml du tampon

Tableau XXI : Résultats du test Hexagon OBTI pour d'autres liquides corporels.

Échantillons \ Temps	Instantané		10min		15min		30min		1h	
	2ml	0.2ml	2ml	0.2ml	2ml	0.2ml	2ml	0.2ml	2ml	0.2ml
Sperme	-	+/-	-	+	-	+	-	+	-	+
Salive	-	+/-	-	+	-	+	-	+	-	+

+ : Résultat positif
- : Résultat négatif

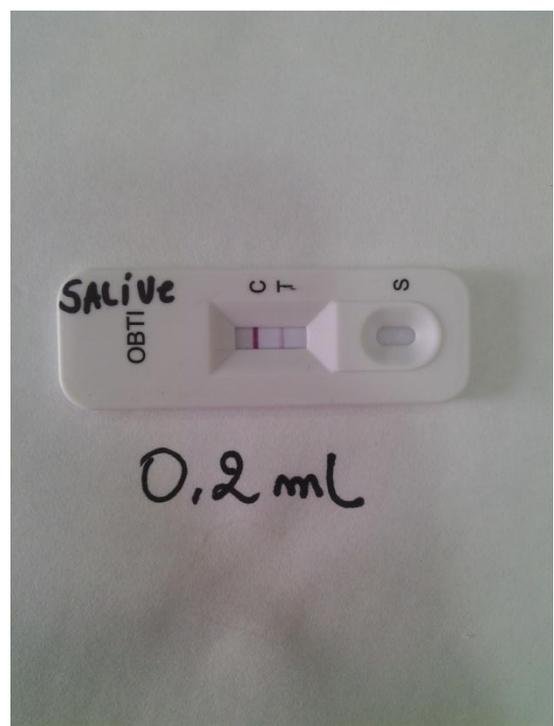
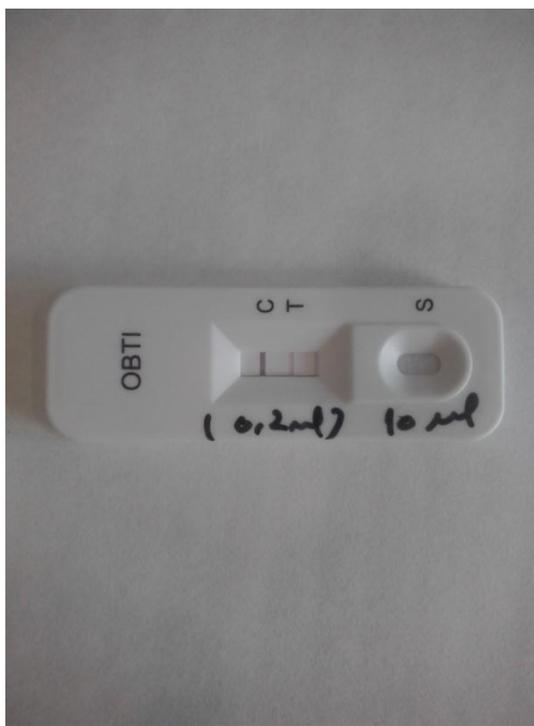


Figure 10 : Résultats du test OBTI Hexagon avec le liquide corporel à une concentration de 0.2 ml du tampon.

III.2.3 Interprétation et discussion

La méthode d'échantillonnage utilisée est sensible et adéquate pour le champ d'application sur scène de crime et au laboratoire de police scientifique (grattage des taches séchée avec l'applicateur et l'immerger directement dans le tube collecteur)

1/ Comme attendu, tous les échantillons du sang humain et animaux ont donné une réaction positive avec le test kastle Meyer.

2/ Le sang obtenu à partir des animaux cités ci-dessus ont donné une réaction négative avec le test OBTI.

3/ Le sperme et salive ont donné un résultat positif avec le test Hexagone OBTI après 10minutes.

Cependant, les échantillons tacher par les liquides corporels du corps humain (sperme, salive, sécrétion vaginale, urine) donnent une réaction positive avec le test OBTI et réaction négative avec le test kastle Meyer, cela explique la présence d'une quantité d'hémoglobine variante.

4/ Pour prouver la haute sensibilité de ce test, la quantité du tampon est réduit à 0.2 ml au lieu de 2ml

5/ Le sang animal est testé avec 0.2 ml de tampon et a donné encore un résultat négatif après 1h avec le test OBTI.

6/ Le sang humain dilué à 1/1000 donne une réaction positive quand l'échantillon est immergé dans 0.2 ml du tampon mais il donne une réaction négative dans 2 ml du tampon c'est après 15 minutes qu'il donne une réaction positive avec le tampon 2 ml.

Donc la limite inferieur de la dilution du sang humain est supérieure à la dilution de 1/1000

En résumé la sensibilité du test OBTI est augmentée en réduisant le volume du tampon des échantillons à 0.2 ml (4 gouttes).

Les résultats et leurs interprétations successivement obtenus dans notre travail sont en accord et similaires avec les rapports de Hochmeister et al (1999), qui a trouvé que le test OBTI Hexagon est un puissant et robuste outil comme test de confirmation du sang humain. Il a une sensibilité très élevée permettant d'obtenir un résultat positif même avec le sang dilué jusqu'à 1/100000, il est spécifique pour le sang humain et donne un résultat positif même avec du sang dégradé.

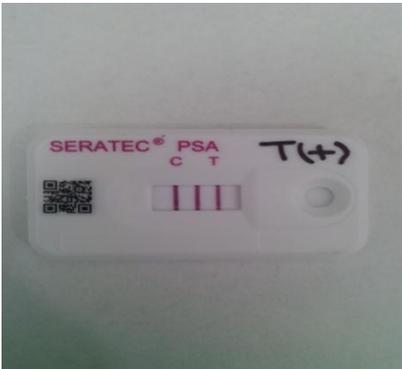
Les différents échantillons utilisés dans notre expérimentation sont seulement une fraction de celles échantillonnées par la méthode de Hochmeister et al mais les dilutions du sang humain adopté sont similaires sans oublier aussi le même résultat positif obtenu avec les échantillons des liquides corporels tels que la salive et le sperme. En effet Hochmeister et al, Spear et Binkley, ont détecté l'hémoglobine dans les fluides corporels.

III.3 La validation du test PSA

III.3.1 Témoin positif et témoin négatif du test PSA

Le test PSA est adapté pour l'identification du sperme humain, les témoins permettent de montrer le résultat obtenu en cas de test positif ou négatif (Tableau XXII)

Tableau XXII : Témoin positif et témoin négatif du test PSA

Témoin	Echantillon	Résultat
Positif +	Sperme 20µl + Tampon (PSA)	
Négatif -	Eau 20µl + Tampon(PSA)	

* Avec le résultat positif (>4ng/ml) apparition de 3 lignes

* Avec le résultat négatif seulement deux lignes qui sont visible

III.3.2 Résultats de la validation et interprétation du test PSA

La glycoprotéine P30 (connue par PSA) est produite par la glande prostatique et sécrétée dans le liquide séminal. C'est un marqueur utilisé pour détecter la présence du liquide séminale, la technologie à développer des tests commerciaux adéquat pour la détection de la PSA, qui sont simples, utiles et produisent des résultats faciles à interpréter.

Tableau XXIII : Résultats du test PSA de la gamme des dilutions du sperme humain.

Temps Dilutions	10min	15min	30min	1h
Pur	+++	+++	+++	+++
1/250	+++	+++	+++	+++
1/500	-	+	+	+
1/1000	-	-	-	-
1/2000	-	-	-	-
1/4000	-	-	-	-

+ : Résultat positif

- : Résultat négatif





Figure 11 : Résultats du test PSA de la gamme des dilutions du sperme humain (Après 10, 15 et 30 minutes)

Interprétation

Les tests sur la série des dilutions du sperme humain ont permis la détection de la PSA dans le liquide séminal et donner des résultats positifs dans tous les échantillons dilués à une échelle minimum 1/500 (après 15 minutes), offrant ainsi une **sensibilité** de détection pour la dilution de l'échantillon.

B/ Tableau XXIV : Résultats du test PSA des ratios

Temps Ratio	10min	15min	Temps Ratio	10min	15min
Sperme/Sang 5/5	+++	+++	Sperme/Salive 5/5	+++	+++
Sperme/Sang 5/10	+++	+++	Sperme/Salive 5/10	+++	+++
Sperme/Sang 5/20	+++	+++	Sperme/Salive 5/20	+++	+++
Sperme/Sang 5/40	+++	+++	Sperme/Salive 5/40	+++	+++

+ Indique le résultat positif

- Indique le résultat négatif

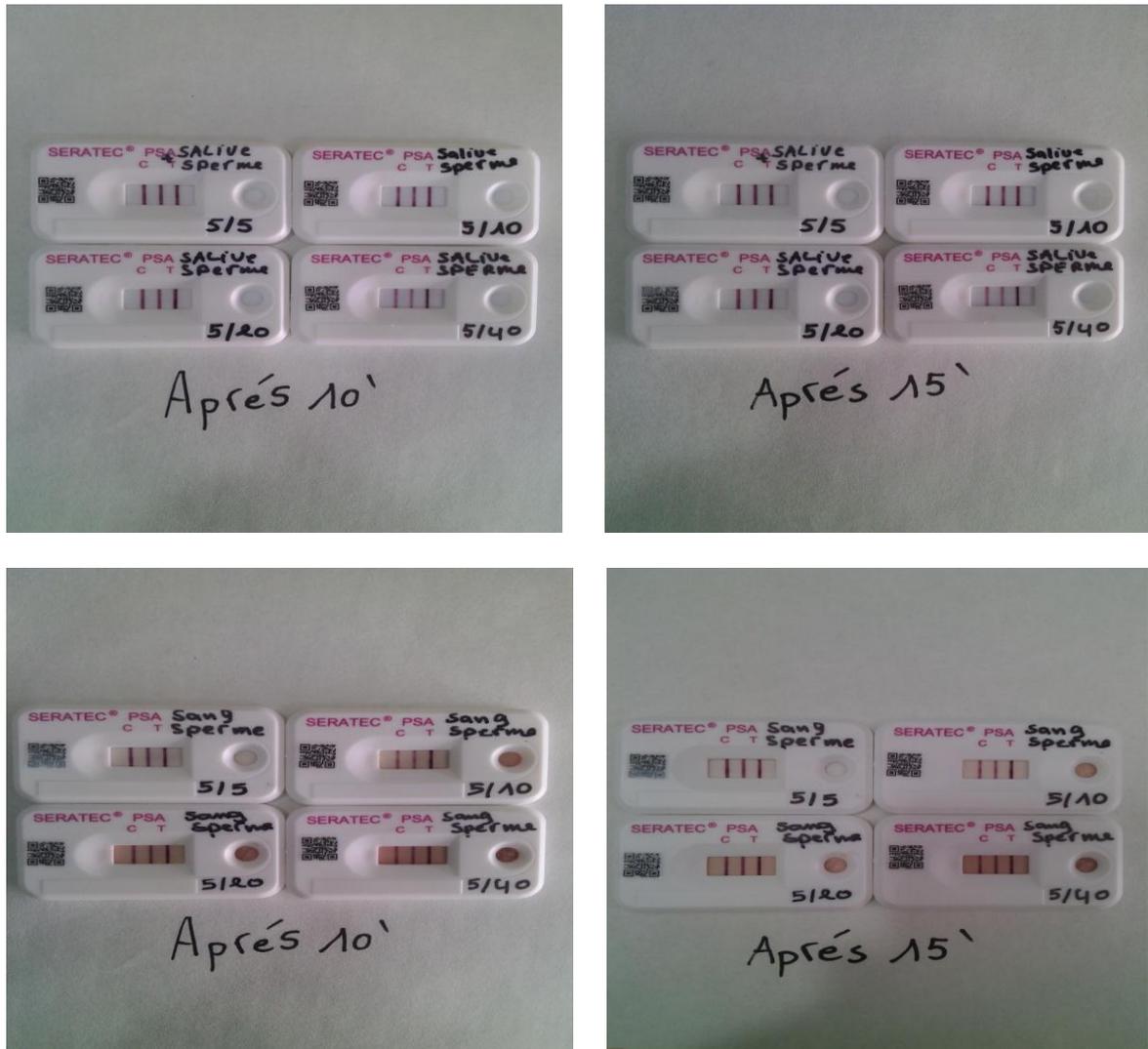


Figure 12 : Résultats du test PSA des ratios (sperme/sang), (sperme/salive) après 10 et 15 minutes.

Interprétation

Les tests effectués sur les ratios avec d'autres liquides corporels (sang, salive mélangé avec du sperme) ont permis de détecter la PSA et donner des résultats positifs ce qui révèle ainsi la **sensibilité** et la **spécificité** du test dépendant du liquide séminal.

C/ Tableau XXV : Résultats du test PSA de la gamme des diluions du sperme de lapin

Temps \ Dilutions	10min	15min
Pur	-	-
1/250	-	-
1/500	-	-
1/1000	-	-
1/2000	-	-
1/4000	-	-

+ Indique le résultat positif

- Indique le résultat négatif

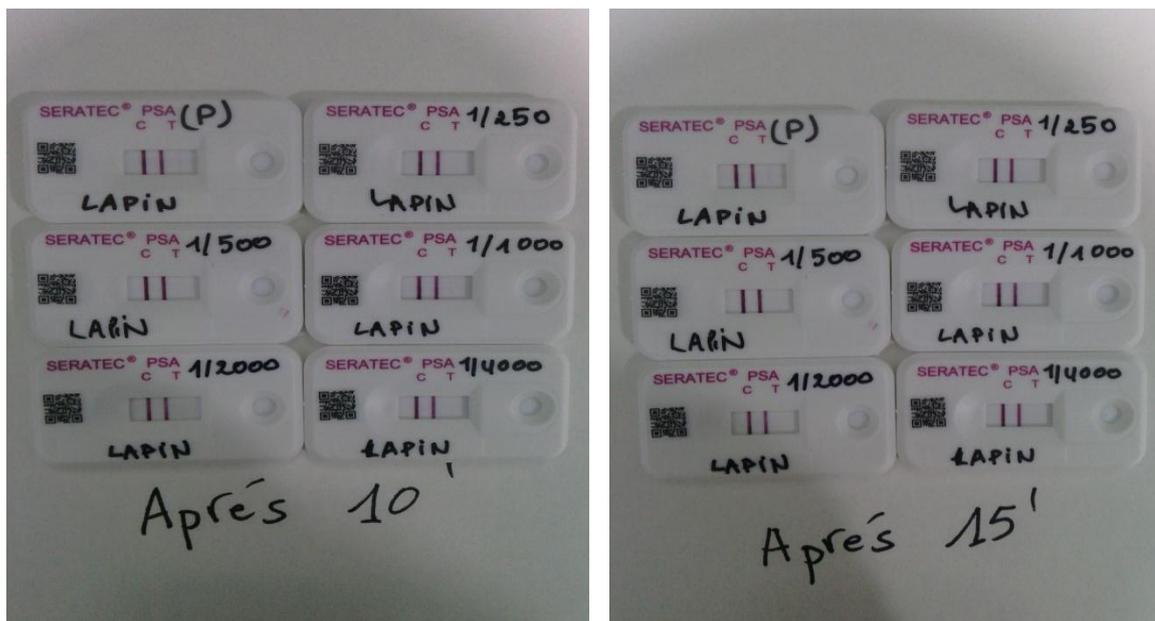


Figure 12 : Résultats du test PSA de la gamme des diluions du sperme de lapin.

Interprétation

Des résultats négatifs de la PSA sur le sperme du lapin avec une série de dilutions ont été observé ce qui montre la **spécificité** du test pour le sperme humain

D/ Tableau XXVI : Résultats du test PSA sur d'autres liquides corporels

Temps Echantillons	10min	15min	Temps Echantillons	10min	15min
Urine (Femme) + Sperme	+++	+++	Salive (Femme)	-	-
Prélèvement vaginal + Sperme	+++	+++	Urine (Femme)	-	-
Urine (Homme)	+++	+++	Sang (Femme)	-	-
Prélèvement fécale	-	-	Salive (Homme)	-	-
Prélèvement vaginal	-	-	Sang (Homme)	-	-

+ Indique le résultat positif

- Indique le résultat négatif

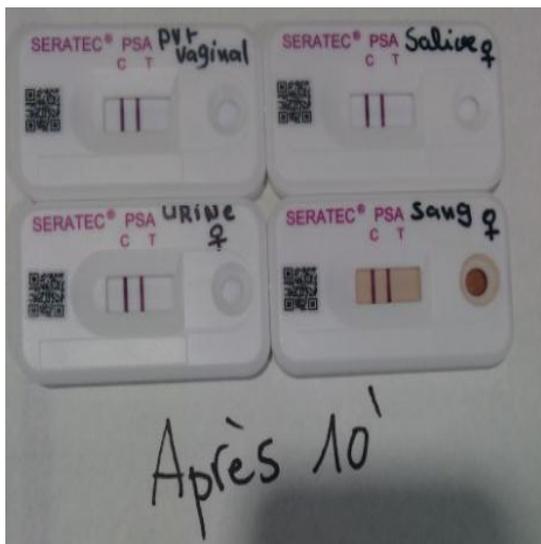
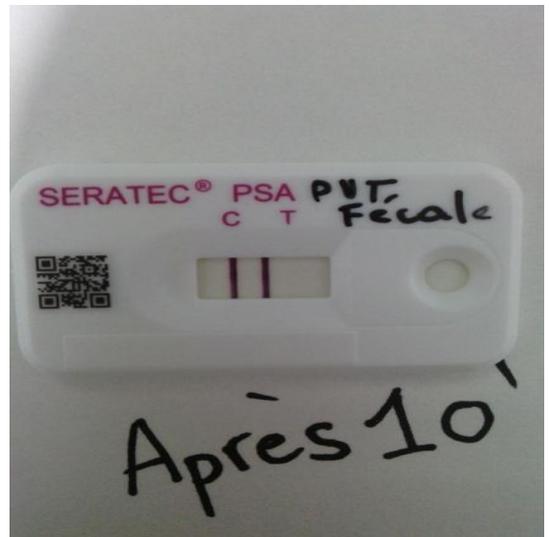
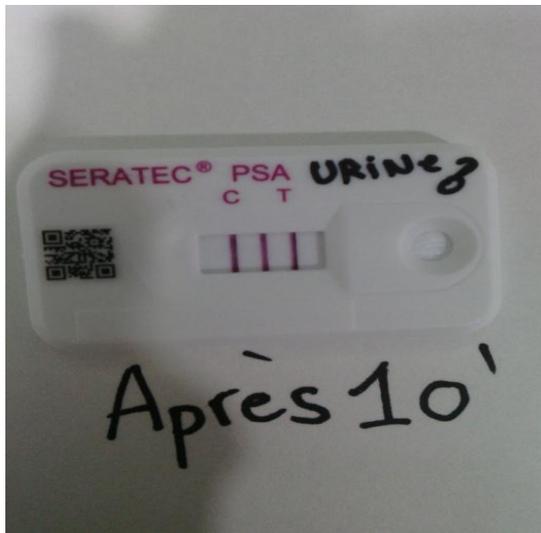
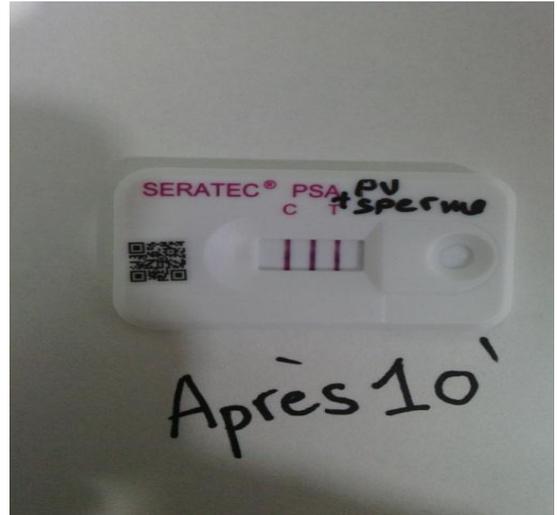
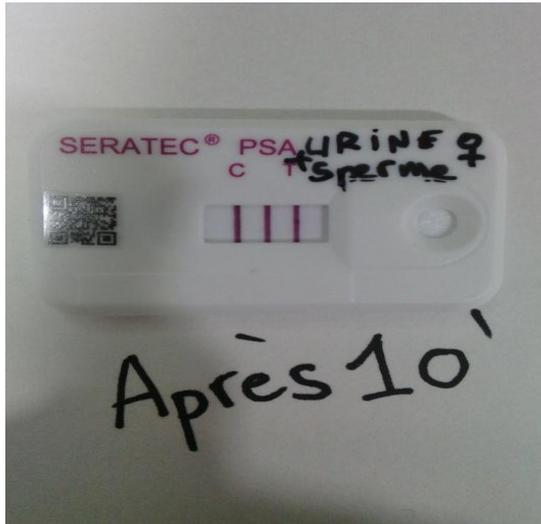


Figure 13 : Résultats du test PSA sur d'autres liquides corporels après 10 minutes.

Interprétation

- Des résultats positifs ont été obtenus dans les échantillons prélevés chez la femme (urine et prélèvement vaginal) mélangés avec du sperme.
- Un résultat positif a été obtenu avec l'échantillon d'urine provenant de donneur de sexe masculin cela explique la présence d'une faible quantité de PSA.
- Aucune protéine PSA n'a été identifiée dans le prélèvement fécal, le résultat été négatif.
- Un résultat négatif a été obtenue avec les autres échantillons (Salive et Sang) cela révèle la **spécificité** du test PSA.

En résumé le test PSA permet tout à la fois, une grande rapidité ainsi qu'une simplicité d'utilisation, et offre une grande sensibilité et spécificité de détection du sperme humain.

Les résultats obtenus avec le test PSA destinés à détecter le sperme, sont en accord et similaires avec les rapports de Hochmeister (1999) qui décrits que sa sensibilité est telles que du sperme dilué 200 000 à 1 000 000 fois donne encore un résultat positif et sa spécificité pour le sperme humain est raisonnablement bien établie et aussi l'urine masculine provenant d'hommes adultes donne des mêmes résultats positifs.

III.4 Obtention des profils génétiques et interprétation

Sachant que :

- Le test Kastle Meyer détecte du sang (de n'importe quelle origine c à d animale ou humain).
- OBTI détecte spécifiquement du sang humain.
- La PSA détecte spécifiquement du sperme humain.

Donc, à partir du test Kastle Meyer, on ne peut pas passer directement au profilage, il faut d'abord passer par l'OBTI pour confirmer qu'il s'agit du sang humain. A ce moment-là, on peut procéder à des profils génétiques.

Les profils génétiques que nous avons obtenus à partir des échantillons préparés précédemment sont de deux types :

- Un profil génétique partiel : C'est un profil incomplet seuls quelques marqueurs génétiques sont établis. Ce profil résulte de la qualité de l'échantillon biologique utilisé du sang dilué 1/100. (Figure 14)
- Un profil génétique masculin complet à partir de sang pur, présente tous les marqueurs génétiques, y compris le marqueur sexuel (Figure 15)

Concernant le test PSA, les profils génétiques obtenus sont également de deux types :

- Un profil génétique masculin complet à partir du sperme pur, présente tous les marqueurs génétiques, y compris le marqueur sexuel.
 - Un profil génétique du sexe masculin a été obtenu à partir du mélange d'échantillons préparé à partir d'un prélèvement vaginal mélangé avec un prélèvement du sperme, ce profil génétique concorde avec le profil génétique obtenu à partir de l'échantillon du sperme pur cité ci-dessus. (Figure 16)
- Et un double profil génétique provenant d'un mélange de deux prélèvements (Prélèvement urinaire féminin avec 5 µl du sperme). On remarque la présence de plus de deux allèles sur plusieurs marqueurs, ceci explique la présence de profils génétiques d'au moins de deux personnes au sein de l'échantillon composé d'ADN féminin et masculin. (Figure 17)

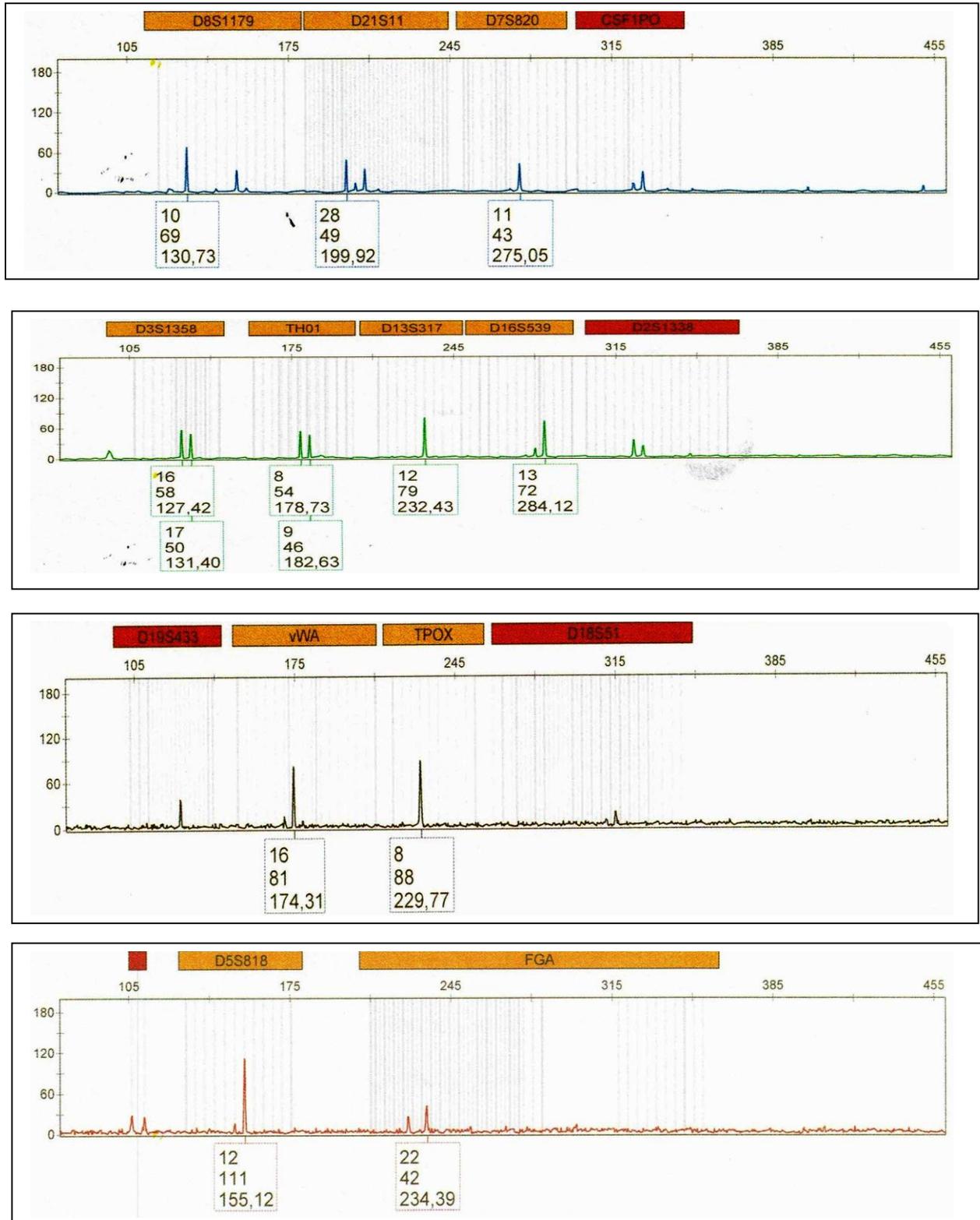


Figure 14 : Profil génétique partiel (Sang dilué à 1/100)

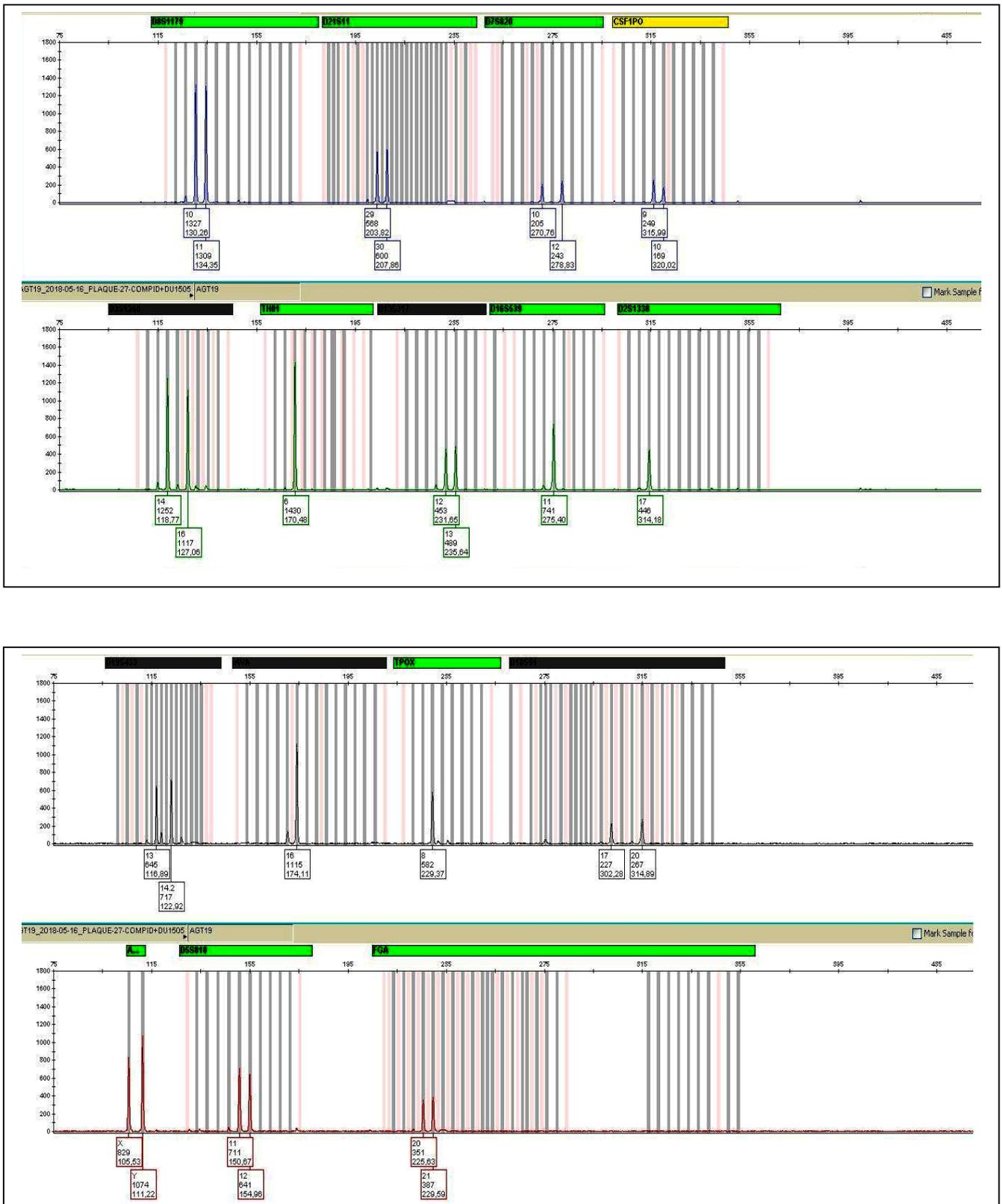


Figure 15: Profil génétique masculin complet (sang pur)

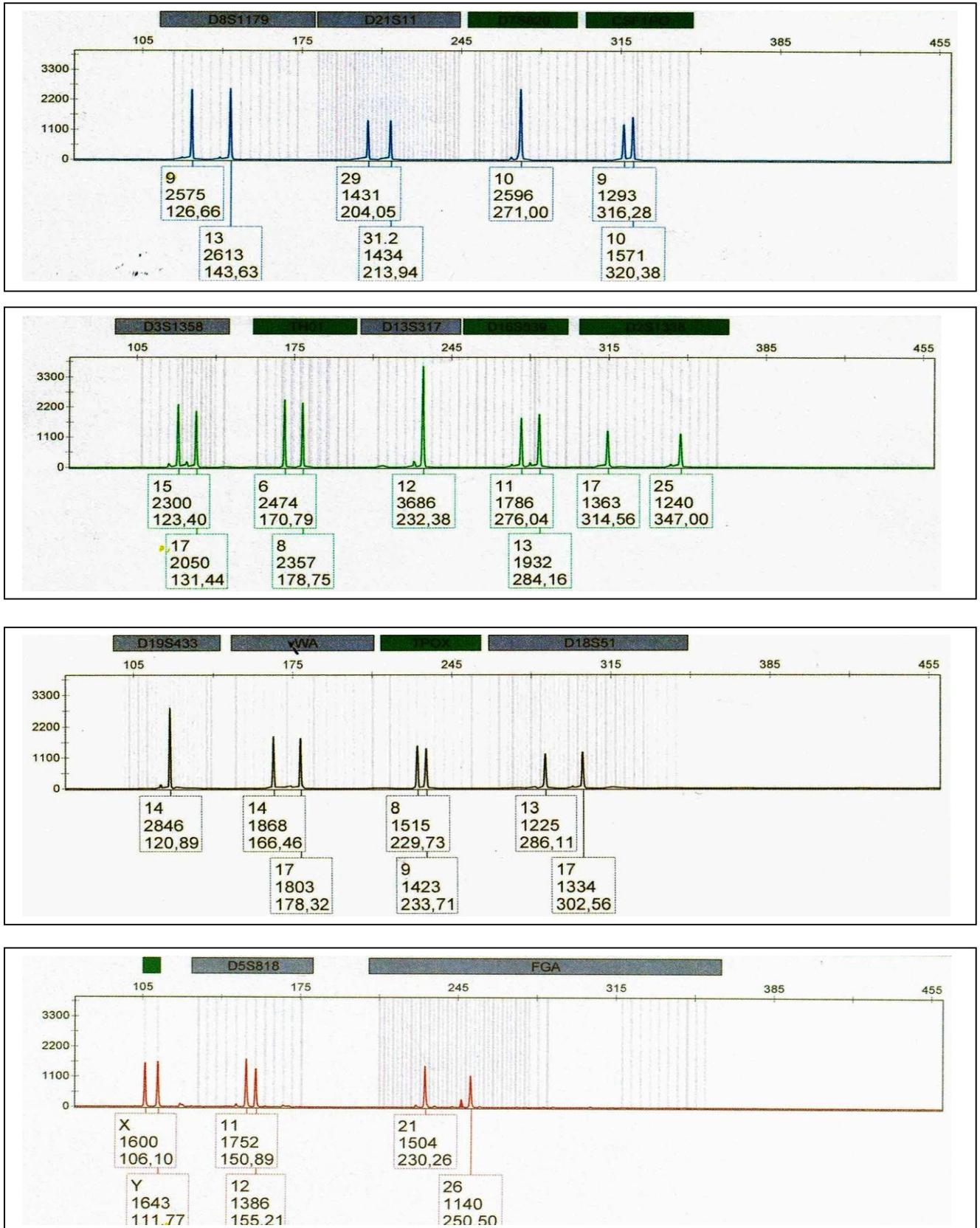


Figure 16 : Profil génétique masculin (sperme pur, Prélèvement vaginal avec 5µl du sperme)

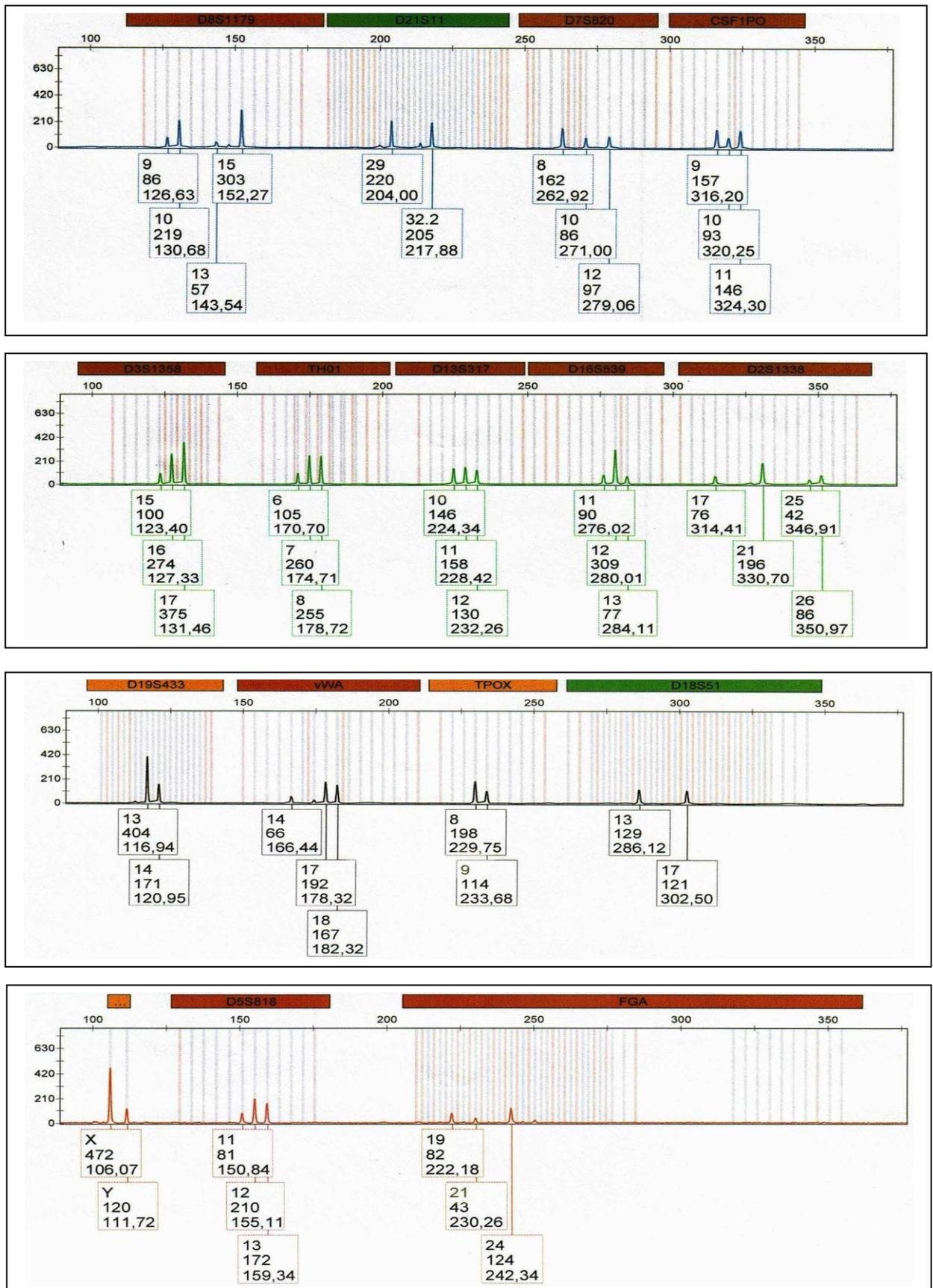


Figure 17 : Mélange de profils génétiques (Prélèvement urinaire féminin avec 5 µl du sperme).

Conclusion

Le profil génétique est le résultat d'une analyse d'ADN rendant possible l'identification quasi-absolue des individus permettant de résoudre de nombreux cas difficiles, tant dans le domaine de la recherche de filiation, que dans le domaine de la criminalistique.

Tous les échantillons biologiques sont des sources potentielles d'ADN, les méthodes d'identification de leurs natures et leurs origines fait appel à divers tests avec une sensibilité et une spécificité très élevées.

Les tests préliminaires que nous avons étudiés permettent d'attester des substances biologiques telles que le sang et le sperme. Ces tests ciblent essentiellement des protéines concentrées dans ces matières, l'hémoglobine pour le sang et la PSA dite encore la glycoprotéine P30 pour le sperme. Il nous a été proposé de nous intéresser à la validation de trois tests préliminaires Kastle Meyer, OBTI et PSA.

Le test Kastle Meyer est un test chimique du sang qui cible son contenu en hémoglobine, très efficace, facile à réaliser et fournit rapidement des résultats sûrs, c'est un réactif incolore qui donne une intense coloration rose en présence de sang.

Le test OBTI HEXAGON est un test immuno-chromatographique pour la confirmation de présence de traces de sang humain. Nous avons pu voir les caractéristiques de performance de ce test qui a une sensibilité très élevée et spécifique pour le sang humain, Il est toutefois évident qu'il peut parfois donner un résultat positif avec de la salive et le sperme. En effet, d'infimes traces d'hémoglobine peuvent parfois être naturellement présentes dans ces matières.

Le test SERATEC PSA Semiquant est un test dont le principe est identique à celui du test immuno-chromatographique de l'hémoglobine, Il sert à la détection de la PSA qui est une glycoprotéine produite par la prostate et sécrétée dans le liquide séminal. On a observé sa performance de détection du sperme humain et offre tout à la fois une grande sensibilité, spécificité, rapidité ainsi qu'une simplicité d'utilisation.

Ces tests devraient être utilisés seulement sur la scène de crime à la criminalistique, ce qui permettrait le transfert rapide des échantillons au laboratoire pour les analyser dans le but de l'obtention des profils génétiques, ce qui permettrait un gain de temps et d'argent en même temps.

Références bibliographiques

Alleyne Lorraine, Ahmed al Marzooqi, Ingo Bastisch, Thomas F. Callaghan, Song Chen, Derek Forest, Neeraja Gotru, Pierre Joubert, Reidar Nilsen, Richard Scheithauer, Werner Schuller, Arthur Tompkins, Simon Walsh, Clemens Wechner, (2009). Guide Interpol sur l'échange de données génétique et sur les pratiques en matière d'analyse, 2^{ème} édition.

Beaudoin Alexandre, Agt Claude Harrisson, Christian Brown, (2005). Validation of the Hexagon OBTI TEST for use as a confirmation test for luminol at crimes scenes attended by the sureté du Québec. Service de l'identité judiciaire, sureté de Québec, Québec.

Blandin Prisca, (2004). Recherche d'ADN et profils génétiques. Institut de Médecine Légale Strasbourg. Rev. Fr. Histotechnol., 2004, 17, n° 1, p. 75 à 78.

Bruno PY, (2017). L'utilisation des caractéristiques génétiques dans les procédures judiciaires. Rapport scientifique avec le soutien du GIP Mission de recherche Droit et Justice, Université Lorraine.

Butler John M (2012). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology, Pages 29–47 Elsevier Inc

Coquos Raphaël, Jennifer Comte, Diana Hall, Tacha Hicks, Franco Taroni, (2013). Preuve par l'ADN : la génétique au service de la justice. Ed, *Presse polytechniques et universitaire romandes* : 457p.

Curran Thomas, (1997). L'analyse génétique en criminalistique : technologie et application. Direction de la recherche parlementaire division des sciences et de la technologie, Canada.

David Botstein, Raymond L. White, Mark Skolnick, et Ronald W. Davis (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms, *Am JHum Genet* 32:314-331.

Doutremepuich C. (2001). 10 ans d'empreintes génétiques. Ed, *La Sécurité d'aujourd'hui* : 218p.

Doutremepuich. C, (2012). Les empreintes génétiques en pratique judiciaire. Ed, *Bull. Acad. Natle Méd*, 2012, 196, no 6, 1117-1130.

Goodwin William, Adrian Linacre, Sibte Hadi, (2007). An Introduction to Forensic Genetics. Ed, *John Wiley & Sons Ltd*, 147p.

Griffiths Anthony J.F, Jeffrey H. Miller, David T. Suzuki, Richard C. Lewontin, William M. Gelbart, (2002). L'introduction à l'analyse génétique.

Gusmao Leonor, Brion Maria, Anabel GonzaLez-Neira, Maviky Lareu, Carracedo Angel, (1999). Y chromosome Specific Polymorphisms In Forensic Analysis. *Legal Medicine (Legal Med)*, 55-60.

Hermon Dalia, Moshe Shpitzen, Carla Oz, Baruch Glattstein, Myriam Azoury, Ron Gafny, (2003). The use of the hexagon OBTI test for detection of human blood at crime scenes and on items of evidence part I: validation studies and implementation.

Hochmeister Semen, Rudin. O, UVBorer, Kratzer. A, Gehrig. CH, and Dirnhofer. R, (1997). Evaluation of Prostate-Specific Antigen (PSA) membrane tests for the forensic identification of semen. *J. For. Sciences*.

Jeffreys A.J., Wilson V, Thein S.L, (1985a). Individual specific fringer prints of human ADN. *Nature*. (314):76-79.

Keiji Tamakia, Alec J. Jeffreys, (2005). Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. Ed : Elsevier Ireland Ltd. *Legal Medicine* 7, 244–250.

Keyser et Petkovski, (2006). Utilisation des SNP pour l'identification des SNP pour l'identification humaine. *Spectra Analyse*, 249 24-29.

Laperche. S, Van Huffel. V, Rouger. P, Salmon.C, (1991). Etude par les fragments de restriction (RFLP) du polymorphisme de l'ADN en criminologie : analyse quantitative et qualitative à partir de sang et de sperme séchés sur différents supports. *Rev. Fr. Hémobiol*, 139-150.

Le Morvon. V, Formennto. J, Milano. G, Bonnet. J, Robert. J, (2007). Techniques de recherche des polymorphismes génétiques. Ed, *Springer, BioTribune* 21:76-85.

Loistron Soléna, (2009). Les empreintes génétiques en médecine légale : réalisation, législation. *Thèse de doctorat Unité de formation et de recherche d'odontologie, Université de Nantes, France*.

Mansuet-Lupo. A, Rouger. P, Van Huffel. V, (2007). Les empreintes génétiques : des affaires d'interprétation difficile. Ed, *Elsevier Masson SAS, Transfusion Clinique et Biologique* 14, 343–347

Mansuet-Lupo. A, Rouger. P, Van Huffel. V, (2007). Les empreintes génétiques : état de l'art en 2007, techniques, applications et législation. Ed, Elsevier Masson SAS. *Transfusion Clinique et Biologique* 14, 334–342.

Mansuet-Lupo. A, Rouger. P, Van Huffel. V, (2007). Les empreintes génétiques : nouvel outil en médecine légale. Ed, *Elsevier Masson SAS, Immuno-analyse et biologie spécialisée* 22 (2007) 209–214

Miguel A. Varela, William Amos, (2010). Heterogeneous distribution of SNPs in the human genome: Microsatellites as predictors of nucleotide diversity and divergence. Ed, Elsevier Inc, *Genomics* 95 151–159.

Iglesias Miriam sous la supervision du Dr Raphaël Coquoz, (2009). Ajout d'un contrôle d'inhibition dans des kits STR multiplex. Laboratoire AURIGEN, Lausanne.

Nicolas. G, Albrespy. C, (1969). Intérêt des groupes sanguins dans l'étude médico-légale des taches de sang. Rapport Congrès National de Transfusion Sanguine, centre hospitalier et universitaire de Nantes volume 12, 169-182.

Petkovski Elizabet, (2006). Polymorphismes ponctuels de séquence et identification génétique : étude par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Thèse de doctorat Université Louis Pasteur Strasbourg, France.

Rober. J, (2010). Polymorphismes génétiques. Ed : *John Libbey Eurotext, Bull Cancer*, Volume 97, 11.

Rouger. P, Van Huffel. V, (1996). Polymorphisme de l'ADN et exclusions de paternité : analyse de 543 cas de recherche de filiation TCB. Ed : *Elsevier Masson SAS, Transfusion Clinique et Biologie* 5, 273-278.

Sfar. S, Chouchan. L, (2008). Le projet génome humain : programme fédérateur de la médecine génomique. Ed, *Elsevier Masson SAS. Pathologie Biologie* 56, 170–175.

Slouts James, Lalonde Wendy, Reid Barbara, Millman Jonathan, (2017). Kastle-Meyer blood test reagents are deleterious to DNA. *Forensic Science International*.