



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

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

**Domaine** : Science de la Nature et de la Vie  
**Filière** : Sciences Biologiques  
**Option** : Génétique

## THEME

# RECHERCHE SUR LA CONCORDANCE ENTRE L'ADN ET LES TRACES CARATERISTIQUES DU SANG APRES EXPOSITION THERMIQUE

Réalisé par :

- ALLACHE Amina
- IZRI Lyna

Soutenu publiquement devant le jury :

-Mme BELKHITER .S	MCB	USDB 1	Présidente
-Mr BENYAHIA .N	MAA	USDB 1	Examineur
-Mme GUESSAIBIA .N	MCA	USDB 1	Promotrice
-Mme KHEMIRI .Z	AA	SDPST	Co-Promotrice

## Remerciement

Nous souhaitons remercier toutes les personnes qui ont aidé, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet de fin d'études. Ce travail est le résultat d'un effort collectif, et nous sommes reconnaissantes envers tous ceux qui nous ont soutenus pendant ce parcours.

Nous exprimons nos sincères remerciements à **Mr MOHAMED SAID . R** , chef d'option , pour son engagement constant en faveur de la qualité de la formation , ainsi pour son accompagnement et son soutien tout au long de notre parcours académique .

Nous adressons notre profonde reconnaissance à notre promotrice , **Mme GUESSAIBIA . N** , pour son encadrement, ses conseils et sa disponibilité tout au long de ce projet. Son expertise et son soutien ont grandement contribué à la réussite de ce travail.

Nous remercions également notre co-promotrice, **Mme KHEMIRI . Z** , pour son accompagnement et son aide précieuse. Ses conseils, ses remarques et son soutien ont été essentiels à la réalisation de ce projet. Sa disponibilité nous a permis d'avancer et d'améliorer notre travail. Nous lui exprimons toute notre gratitude pour le temps et l'énergie consacrés à ce projet.

Nous adressons aussi nos remerciements à notre examinateurs et notre présidente , **Mr BENYAHIA . N** et **Mme BELKHITER . S** , pour le temps et l'attention accordés à l'évaluation de notre travail.

Nous remercions également l'ensemble de l'équipe pédagogique du département de Biologie de l'Université de Blida pour les connaissances et les compétences qui nous ont été transmises tout au long de notre parcours.

Et enfin , Nous exprimons notre sincère reconnaissance à toute l'équipe de la Police Scientifique d'Alger pour leur collaboration précieuse et pour tout ce qu'ils ont fait pour nous.



# Dédicaces

## **À mes grands-parents,**

Vous avez toujours été une source d'amour, de sagesse et de réconfort pour moi. Depuis mon enfance, vos prières, vos conseils et votre bienveillance m'ont guidé et protégé. Vous m'avez appris l'importance de la famille. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu dans chaque étape de ma vie. Votre amour inconditionnel a été un pilier pour moi, et je suis infiniment reconnaissante pour tout ce que vous avez fait.

## **À ma mère,**

Maman, tu es mon héroïne. Ton amour, tes sacrifices et ta force ont été ma lumière dans les moments les plus sombres. Tu as toujours été là pour moi, que ce soit pour me réconforter, me conseiller ou simplement m'écouter. Merci de m'avoir appris à croire en moi, à me battre pour mes rêves et à ne jamais abandonner. Tout ce que j'accomplis aujourd'hui est grâce à toi, et je t'en serai éternellement reconnaissante.

## **À mon père,**

Papa, ton soutien silencieux mais constant a été une force immense pour moi. Tu m'as appris la discipline, la rigueur et l'importance de rester fidèle à mes valeurs. Merci de m'avoir toujours poussé à donner le meilleur de moi-même et de m'avoir montré l'exemple. Ton amour et ta présence ont été un guide pour moi, et je te remercie du fond du cœur pour tout ce que tu as fait.

## **À mes tantes,**

Chahra et Nassima vous avez toujours été comme des secondes mères pour moi. Votre amour, vos conseils et vos encouragements ont été une source de réconfort et de motivation. Merci d'avoir toujours été là pour moi, prêtes à m'écouter et à me soutenir dans les moments difficiles. Votre bienveillance a illuminé mon chemin, et je vous en suis profondément reconnaissante.

## **À mes sœurs,**

Meriem, Maïssa et Lyna vous êtes mes complices, mes confidentes et mes meilleures amies. Vos rires, vos soutiens inconditionnels et même nos petites disputes ont rendu la vie plus belle et plus légère. Merci d'avoir toujours été là pour moi, peu importe les circonstances.

## **À ma binôme,**

Travailler avec toi a été une belle expérience pour moi, et je suis heureuse d'avoir partagé cette aventure avec toi.

## **À mes amies proches,**

Vous êtes ma famille de cœur. Vos rires, vos encouragements et votre présence ont été un moteur pour moi. Merci de m'avoir soutenu, écouté et motivé dans les moments de doute. Votre amitié a été une source de joie et de force, et je vous en suis infiniment reconnaissante. Vous avez rendu ce parcours plus beau et plus enrichissant.

***ALLACHE Amina***

# Dédicaces

## À mes très chers Parents

Papa et Maman, vous avez été les piliers inébranlables de cette aventure. Votre amour, votre soutien inconditionnel et votre confiance ont été ma force constante, même dans les moments de doute. Ce mémoire est le reflet de vos sacrifices et de tout ce que vous m'avez donné. Merci infiniment pour votre patience, vos conseils et cette force tranquille qui m'a portée jusqu'ici. Je vous suis reconnaissante pour tout l'amour que vous m'avez témoigné et pour m'avoir permis de réaliser ce rêve.

## À mes chers Grands-Parents

Yema et Baba, ce succès est aussi le vôtre. Votre amour inconditionnel, vos encouragements constants et la sagesse transmise ont été des piliers essentiels. Votre bénédiction et votre fierté m'ont donné la force de persévérer.

Ce mémoire est le fruit de votre éducation et des valeurs que vous m'avez inculquées : la persévérance et la foi en mes capacités. Chaque page porte votre héritage.

Merci du fond du cœur pour votre soutien indéfectible et votre confiance. Votre présence a été une source immense de réconfort et de motivation. Je vous suis infiniment reconnaissante pour tout l'amour donné et votre contribution à la réalisation de ce rêve.

Yemma et Sidou En ce jour important, mes pensées les plus émues se tournent vers vous, dont l'amour et la sagesse continuent de m'accompagner. Ce succès vous est dédié rabi yarehamkom

## À mon cher Housseem, mon futur mari

Mon merveilleux fiancé, tu as été bien plus qu'un soutien durant cette période intense. Tu as été ma force, ma patience, ma plus grande source de motivation et de réconfort. Ton soutien inconditionnel, ta compréhension et ta capacité à me redonner confiance ont été le moteur qui m'a poussée à avancer. Ce mémoire est aussi le fruit de ton amour et de tes sacrifices. Merci infiniment pour tout, mon amour. Je t'aime plus que les mots ne peuvent le dire.

## À mes chers frères et sœur

**Tarek**, **Farouk**, **Dyna** et **Mohamed**, votre présence et votre soutien ont fait toute la différence. Vos encouragements, vos visites inattendues pour une pause, vos conseils ou vos blagues pour détendre l'atmosphère ont été précieux. Votre amour et votre soutien ont été un pilier essentiel. Merci du fond du cœur d'avoir été à mes côtés dans cette aventure.

## À mes amies précieuses.

Ma chère binôme **Amina**, tu as été une partenaire de travail incroyable, une source d'inspiration constante et une amie précieuse. Ta persévérance et ton intelligence ont été une véritable force pour nous deux. Merci pour ta patience, ton écoute et notre complicité. Je suis si fière de ce que nous avons accompli ensemble.

Et ma chère copine **Iness**, ton soutien a été tout aussi précieux. Merci à vous deux pour votre amitié et votre présence bienveillante.

Encore une fois, un immense merci à tous. Votre soutien a été la clé de cette réussite.

***IZRI Lyna***

## Résumé

Dans le cadre des sciences forensiques, l'analyse des traces biologiques, notamment les traces de sang, constitue un élément fondamental dans la résolution des enquêtes criminelles. Cette étude s'intéresse à l'impact de l'exposition thermique sur l'intégrité et les propriétés de l'ADN, dans le but d'évaluer leur exploitabilité en criminalistique après une exposition à la chaleur.

Pour atteindre cet objectif, des échantillons de sang ont été placés sur différents supports puis exposés à différentes températures. La détection du sang a été réalisée à l'aide des tests d'orientation couramment utilisés ; le Kastle-Meyer et l'OBTI. L'extraction de l'ADN a été effectuée grâce aux kits PrepFiler et EZ1, suivies d'une amplification et d'une analyse par qPCR.

Les résultats ont révélé que l'exposition à des températures modérées permet de préserver une quantité suffisante d'ADN de qualité, offrant ainsi la possibilité d'obtenir des profils génétiques exploitables.

À l'inverse, les températures élevées provoquent une dégradation importante de l'ADN, entraînant soit une absence totale du profil génétique, soit des profils partiels difficiles à interpréter. De plus, l'étude a souligné que le type de support joue un rôle important dans la protection de l'ADN contre les effets thermiques, car certains matériaux semblent mieux préserver les éléments génétiques que d'autres.

Ces observations mettent en lumière que malgré l'altération potentielle causée par la chaleur, l'analyse génétique peut conserver toute sa pertinence à condition que les températures n'excèdent pas certains seuils. Cette recherche confirme ainsi que l'évaluation préalable de l'état des échantillons et la connaissance des facteurs de dégradation sont essentielles pour garantir la fiabilité des résultats en criminalistique.

**Mots clé :** Chaleur - Profil génétique - ADN - Type de support - Trace de sang .

## Abstract

In forensic science, the analysis of biological traces , particularly blood traces , represents a key element in solving criminal investigations. This study focused on the impact of thermal exposure on the integrity and properties of DNA, with the aim of evaluating its usability in forensic contexts after being subjected to heat.

To achieve this objective, blood samples were deposited on various substrates and exposed to different temperatures. Blood detection was carried out using commonly employed presumptive tests: Kastle-Meyer and OBTI. DNA extraction was performed using the PrepFiler and EZ1 kits, followed by amplification and analysis via qPCR.

The results showed that exposure to moderate temperatures preserves a sufficient quantity of high-quality DNA, allowing for the recovery of usable genetic profiles.

In contrast, high temperatures led to significant DNA degradation, resulting either in the complete absence of a genetic profile or in partial profiles that are difficult to interpret. Furthermore, the study emphasized that the type of support plays a critical role in protecting DNA from thermal damage, as certain materials seem to preserve genetic material more effectively than others.

These findings highlight that, despite the potential degradation caused by heat, genetic analysis can still be relevant—provided that the temperature remains below specific thresholds. This research thus confirms that a prior assessment of sample condition and an understanding of degradation factors are essential to ensuring the reliability of forensic results.

**Key words :** Heat – Genetic profile – DNA – Type of support – Blood trace.

## ملخص

بالنسبة لعلم الأدلة الجنائية، يُعتبر تحليل الآثار البيولوجية، وخاصة آثار الدم، عنصرًا أساسيًا في حل القضايا الجنائية. وقد ركزت هذه الدراسة على تأثير التعرض الحراري على سلامة وخصائص الحمض النووي بهدف تقييم إمكانية استغلاله في المجال الجنائي بعد التعرض للحرارة.

ولتحقيق هذا الهدف، وُضعت عينات دم على دعائم مختلفة ثم عُرضت لدرجات حرارة متباينة. تم الكشف عن وجود الدم باستخدام اختبارات الكشف الأولية الشائعة؛ وهي اختبار Kastle-Meyer واختبار OBTI. أما استخراج الحمض النووي فقد تم باستخدام مجموعتي EZ1 و PrepFiler، تلاه تضخيم وتحليل عبر تقنية qPCR.

أظهرت النتائج أن التعرض لدرجات حرارة معتدلة يسمح بالحفاظ على كمية كافية من الحمض النووي بجودة جيدة، مما يتيح إمكانية الحصول على بصمات وراثية قابلة للاستغلال.

وعلى العكس من ذلك، فإن درجات الحرارة المرتفعة تُحدث تدهورًا كبيرًا في الحمض النووي، مما يؤدي إما إلى غياب كلي للبصمة الوراثية أو إلى ظهور بصمات جزئية يصعب تفسيرها. كما أبرزت الدراسة أن نوع الدعامة يلعب دورًا مهمًا في حماية الحمض النووي من التأثيرات الحرارية، حيث يبدو أن بعض المواد توفر حماية أفضل للعناصر الوراثية من غيرها.

تُبرز هذه الملاحظات أنه وعلى الرغم من الضرر المحتمل الناتج عن الحرارة، فإن التحليل الجيني قد يظل ذا فاعلية بشرط عدم تجاوز درجات حرارة معينة. وتؤكد هذه الدراسة على أن التقييم المسبق لحالة العينات ومعرفة عوامل التدهور تُعدّ ضرورية لضمان موثوقية النتائج في علم الأدلة الجنائية.

**الكلمات المفتاحية:** الحرارة -البصمة الوراثية -الحمض النووي -نوع الدعامة -أثر الدم .

## Liste des figures

Figure 01:Exemple de variation du nombre de répétitions des Short Tandem Repeats (STR)(Tytgat,2022)....	4
Figure 02:Exemple de polymorphisme d'un seul nucléotide SNP (Zarkov and al , 2020).....	6
Figure 03:Exemple de Variations du Nombre de Copies(CNV):Délétion et Duplication (Samarakoon,2019)...	6
Figure 04:Détection des traces de sang invisibles grâce au luminol sur une scène de crime(Sharman et Elliot, 2000) .....	12
Figure 05:Détection des traces biologiques par sources lumineuses en criminalistique(Finnis et al, 2023)..	13
Figure 06:Les supports préparés pour le séchage.....	17
Figure 07:Disposition des Supports dans les Creusets.....	17
Figure 08:témoin positif et négatif du test Kastle Meyer .....	18
Figure 09:Témoins positif et négatif du test OBTI .....	19
Figure 10:les tubes eppendorfs dans le portoir magnétique.....	21
Figure 11:Principe de la quantification par PCR en temps réel.....	23
Figure 12:Courbe d'étalonnage de quantification de l'ADN des échantillons exposés à 90°C et 150°C (kitPrepFiler).....	36
Figure 13:Courbes d'amplification en temps réel des échantillons exposé à 90°C et 150°C (kit PrepFiler)....	38
Figure 14:Courbe d'étalonnage de quantification d'ADN des échantillons exposés à 90°C et 150°C (kit PrepFiler) .....	38
Figure 15:Courbes d'amplification en temps réel des échantillons exposé à 300°C (kit PrepFiler et EZ1).....	39
Figure 16:Profil génétique du coton après exposition à 90°C.....	42
Figure 17:Profil génétique du nylon après exposition à 90°C .....	43
Figure 18 : Profil génétique du papier après exposition à 90°C .....	44
Figure 19:Profil génétique de l'écouvillon après exposition à 90°C .....	45
Figure 20:Profil génétique du coton après exposition à 150°C .....	46
Figure 21:Profil génétique du nylon après exposition à 150°C .....	47
Figure 22:Profil génétique du papier après exposition à 150°C .....	48
Figure 23:Profil génétique de l'écouvillon après exposition à 150°C .....	49
Figure 24:Profil génétique du papier après exposition à 300°C, extrait avec EZ1.....	50
Figure 25:Profil génétique des restes humains exposés à une température estimée entre 150 et 200°C.....	51

## Liste des tableaux

Tableau I : principales dates de l'évolution de la science médico-légale ( Zbrog ,2025 ) .....	2
Tableau II : comparaison entre les VNTRs et les STRs (Lakna , 2018) .....	5
Tableau III : les différents loci STR du CODIS (Zhang and al , 2015) .....	8
Tableau IV : Répartition des échantillons selon les supports et les températures d'exposition .....	16
Tableau V : Protocole d'exposition thermique .....	18
Tableau VI : Étapes de Lavage des Échantillons ADN à l'aide d'un portoir magnétique .....	20
Tableau VII : Caractéristiques du Kit Investigator Quantifiler .....	24
Tableau VIII : Préparation des Réactifs pour la Réaction de qPCR .....	24
Tableau IX : Préparation de la courbe standard pour la quantification d'ADN .....	25
Tableau X : Organisation des Réactions qPCR dans les Strip-Tubes .....	25
Tableau XI : Paramètres du Rotor et Signaux de Détection en qPCR .....	26
Tableau XII : Températures et Durées des Phases du Thermocycleur en Qpcr .....	26
Tableau XIII : Réglages des Paramètres d'Analyse sur le Logiciel qPCR .....	27
Tableau XIV : les composants nécessaires à la réalisation de la PCR .....	29
Tableau XV : Conditions thermiques du programme de PCR conventionnelle.....	29
Tableau XVI : Composants du mélange pour l'analyse capillaire .....	30
Tableau XVII : Paramètres du programme thermique .....	31
Tableau XVIII : Paramètres de lecture du logiciel GeneMapper .....	32
Tableau XIX : Résultat du test Kastle-Meyer .....	33
Tableau XX : Résultats de la concentration d'ADN selon le support et la température d'exposition .....	34
Tableau XXI : du partage d'allèle pour la recherche de filiation et identification de cadavre .....	52

## Liste des abréviations

μL	Microlitre
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AP	Sites abasiques (apuriniques/apyrimidiques).
CNV	Copy Number Variation (Variation du nombre de copies)
Cq	Cycle de quantification
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DSB	Double-Strand Break ( Cassure double brin de l'ADN )
FAM™	Fluorophore de couleur vert
Kb	kilobase
KM	Kastle-Meyer
MLP	Multilocus Probe (Sonde multilocus)
NED™	Fluorophore de couleur orang
Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism ( Polymorphisme de longueur des fragments de restriction)
RFU	Relative Fluorescence Unit (Unité de Fluorescence Relative)
Rpm	Rotations par minute
SDPST	Sous direction de la police scientifique et technique
SID™	Fluorophore infra-rouge
SLP	Single Locus Probe (Sonde à locus unique)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme nucléotidique simple)
SSB	Single-Strand Break (Cassure simple brin)
STR	Short Tandem Repeat (Répétition courte en tandem)
TAZ™	Fluorophore de couleur rouge
Top 1	Topoisomerase I
Top 2	Topoisomerase II
VIC™	Fluorophore de couleur jaune-vert
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats (Nombre Variable de Répétitions en Tandem)

# Sommaire

Introduction.....	1
<b>Synthèse bibliographique.....</b>	<b>2</b>
I.Évolution des sciences médico-légales .....	2
II. Le génome humain et ses particularités .....	3
II.1. Composition et structure du génome humain .....	3
II.1.1. Le génome nucléaire .....	3
II.1 .2. Le génome mitochondrial .....	3
II.2. Les différentes variations du génome humain .....	3
II.2.1. Le polymorphisme .....	3
II.2.1.1. Polymorphisme nucléaire .....	4
II.2.1.1.1. les minisatellites ( ou variable number of tandem repeat ).....	4
II.2.1.1.2. Les microsatellites ( ou short tandem repeat ) .....	4
II.2.1.2. Polymorphisme nucléotidique unique .....	5
II.2.1.3. Variations du nombre de copies .....	6
III. STRs : Marqueurs d'identification de choix en criminalistique .....	7
III.1. Structure et classification des STRs .....	7
III.2. intérêt de l'utilisation des STRs en criminalistique .....	7
III.2.1. Historique .....	8
III.2.2. Caractéristiques des STRs en criminalistique .....	10
III.2.3. Marqueurs de lignée .....	10
IV. L'ADN sur les lieux d'un crime .....	11
IV.1. Différentes sources biologiques d'ADN .....	11
IV.1.1. Sang .....	11
IV.1.2. cheveux .....	11
IV.1.3. Salive .....	11
IV.1.4. Sperme .....	11
IV.2. Détection des traces de sang .....	12
IV.3. les profil génétique .....	13
V. Effets de la chaleur sur l'ADN et les traces biologiques .....	14
V.1. Impact de la chaleur sur l'ADN .....	14

V.1.1. Cassures d'ADN simple brin .....	14
V.1.2. Cassures d'ADN double brin .....	14
V.2. Altération des propriétés des traces de sang par la chaleur.....	15
<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>16</b>
I. Matériel .....	16
I.1. Matériel biologique .....	16
I.2. Matériel non biologique et appareillage .....	16
II. Méthodes .....	16
II.1. Exposition thermique des échantillons .....	16
II.1.1. Préparation des supports .....	16
II.1.2. L'exposition à différentes températures .....	17
II.2. Tests d'orientation et de confirmation des traces de sang .....	18
II.2.1. Principe du test Kastle-Meyer .....	18
II.2.2. Protocole de détection du test de Kastle-Meyer .....	18
II.2.3. Principe du test immunochromatographique OBTI .....	19
II.2.4. Protocole de confirmation du Test OBTI .....	19
II.3. Extraction d'ADN .....	19
II.3.1. Principe de l'extraction d'ADN .....	19
II.3.2. Protocole d'extraction manuelle .....	20
II.3.3. Protocole d'extraction d'ADN automatisée .....	21
II.4. Quantification en Temps Réel (qPCR) .....	23
II.4.1. Mise en place de la réaction qPCR .....	23
II.4.1.1. Préparation du Matériel .....	23
II.4.1.2. Dépôt des Réactifs du Kit QuantiFiler .....	24
II.4.1.3. Positionnement des composants de la hotte de l'automate .....	24
II.4.1.4. Préparation de la gamme standard .....	25
II.4.1.5. Répartition des échantillons et des témoins .....	25
II.4.2. Lancement du protocole de la qPCR .....	26
II.4.2.1. Traitement des données .....	26
II.5. Normalisation .....	28
II.6. Amplification de l'ADN (PCR) .....	28
II.6.1. Réactifs utilisés du Kit GlobalFiler .....	29

II.6.2. Protocole Expérimental .....	29
II.6.2.1. Préparation du plan de dépôt .....	29
II.6.2.2. Préparation du mélange réactionnel .....	29
II.6.2.3. Dépôt des échantillons dans la plaque PCR .....	29
II.6.2.4. Scellage et lancement de la PCR .....	29
II.7. Post-PCR .....	30
II.7.1. Réactifs Utilisés .....	30
II.7.2. Protocole Expérimental .....	30
II.7.2.1. Préparation du plan de dépôt .....	30
II.7.2.2. Préparation du Mix de Migration .....	30
II.7.2.3. Dépôt des échantillons dans la plaque post-PCR .....	30
II.7.2.4. Scellage et lancement de la dénaturation thermique.....	30
II.7.2.5. Refroidissement et choc Thermique .....	31
II.7.2.6. Vérification et Transfert dans l'Analyseur génétique à 24 capillaires .....	31
II.8. Electrophorèse capillaire .....	31
<b>Résultats et discussion</b> .....	<b>33</b>
I. Résultats des tests d'orientation et de confirmation des traces de sang .....	33
I.1. Test Kastle-Meyer .....	33
I.2. Test OBTI .....	33
II. Résultats de la quantification d'ADN .....	34
II.1. La spécificité .....	34
II.2. Efficacité réactionnelle .....	35
II.3. Le coefficient de détermination R <sup>2</sup> .....	36
II.4. Sensibilité avec l'analyse des contrôles .....	37
II.5. Interprétation des résultats de la concentration d'ADN des échantillons .....	37
III. Résultats de l'analyse des profils génétiques .....	40
III.1. Les paramètres d'analyse .....	40
III.2. Analyse des profils génétiques .....	40
IV. Application réelle – Étude de cas : profil ADN après exposition thermique .....	51
V. Discussion Générale .....	53
<b>Conclusion</b> .....	<b>55</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>57</b>

# **Introduction**

## Introduction

Le rôle des scientifiques médico-légaux est d'analyser les traces physiques et biologiques d'une scène de crime, d'une victime ou d'un suspect, à l'aide des outils et technologies disponibles, afin de permettre la reconstitution d'une situation d'intérêt. En effet, le profilage ADN est un outil très puissant pour identifier des individus sur la base de leur constitution génétique unique. L'ADN permet non seulement d'identifier la présence d'échantillons biologiques spécifiques sur une scène de crime, mais aussi d'exonérer des suspects innocents (Panneerchelvam et Norazmi, 2023).

Cependant, L'ADN est une molécule fondamentale qui abrite des informations génétiques cruciales pour les enquêtes médico-légales. (Bhoyar *et al*, 2024). Sa préservation est toutefois influencée par divers facteurs externes et internes étroitement liés. Parmi eux, Les facteurs environnementaux comptent parmi les variables ayant l'impact le plus significatif sur la préservation du matériel génétique. (Kravanja and al, 2025).

En criminalistique, la dégradation de l'ADN pose des défis, car les échantillons d'ADN dégradés peuvent être difficiles à analyser (Bhoyar *et al*, 2024).

C'est pourquoi, Lors d'une enquête, il est essentiel de prélever et de conserver les échantillons biologiques dans des conditions optimales afin de limiter leur dégradation. La qualité des résultats dépend fortement de l'état initial de l'échantillon, ce qui rend la phase de conservation cruciale. Les experts en criminalistique utilisent des techniques spécifiques pour récupérer et analyser l'ADN, même lorsqu'il est partiellement détérioré. Ainsi, la préservation des traces biologiques constitue une étape essentielle pour garantir des analyses fiables et exploitables (Shahzad *et al*, 2024).

En Algérie, peu d'études ont été menées sur l'effet de la chaleur sur les traces biologiques. Pourtant, dans le domaine de l'analyse criminelle, un incendie sur une scène de crime peut exposer les traces biologiques, notamment le sang, à des températures élevées. Cela nous amène à chercher dans quelle mesure l'exposition thermique affecte elle la conservation de l'ADN et les propriétés des traces de sang et comment ces changements physico-chimiques impactent ils les analyses en criminalistique ?

En effet lorsqu'une trace de sang est exposée à une forte température, l'ADN qu'elle contient peut-il encore être exploité pour identifier un profil génétique, ou subit-il des altérations irréversibles compromettant son analyse? Certaines matières ou surfaces pourraient-elles mieux préserver l'ADN face à la chaleur, tandis que d'autres pourraient-ils accélérer sa dégradation ?

D'où L'objectif de notre travail qui consiste à analyser des modifications génétiques et les caractéristiques des traces de sang sous températures prédéfinies, dans le but de déterminer l'impact de l'exposition thermique sur ces éléments et d'évaluer leur fiabilité dans les enquêtes criminelles. Nous étudions également l'influence du support sur lequel se trouvent les traces de sang.

# **Chapitre I : Synthèse Bibliographique**

## I. Évolution des sciences médico-légales

L'évolution de la criminalistique a connu une transformation majeure avec l'introduction de l'ADN comme outil d'identification. Avant cette avancée, l'identification reposait principalement sur les empreintes digitales, les descriptions physiques et les témoignages, souvent faillibles. ( Zbrog , 2025 )

En 1910, Edmond Locard, surnommé le « Sherlock Holmes français », posa les bases de la science médico-légale moderne en créant le premier laboratoire de criminalistique à Lyon. Il développa le principe d'échange, selon lequel tout contact entre deux objets laisse une trace, ce qui devint un fondement des enquêtes modernes. Son laboratoire permit de résoudre des affaires majeures, notamment grâce à l'analyse des preuves matérielles comme les fibres textiles, le maquillage ou les empreintes digitales.

Un tournant décisif eut lieu en 1984 lorsque Sir Alec Jeffreys, un généticien britannique, découvrit par hasard que l'ADN pouvait révéler des similitudes et des différences entre les membres d'une même famille. Cette révélation marqua le début de l'utilisation de l'ADN comme méthode d'identification unique et fiable. ( Zbrog , 2025 )

En 1986, cette technique fut appliquée pour la première fois dans une enquête criminelle, permettant d'arrêter Colin Pitchfork, tout en innocentant Richard Buckland, un suspect accusé à tort. Ce succès démontra l'efficacité de l'ADN pour établir la culpabilité ou l'innocence, révolutionnant ainsi les méthodes d'investigation. ( Zbrog , 2025 )

Depuis, l'ADN est devenu un élément central des enquêtes criminelles, permettant de résoudre des crimes anciens et d'éviter les erreurs judiciaires. Aujourd'hui, il est utilisé aux côtés des technologies numériques et de l'intelligence artificielle pour affiner les analyses et garantir des investigations plus précises, tout en soulevant des enjeux éthiques sur la vie privée et l'usage des bases de données génétiques. ( Zbrog , 2025 ) .

Le tableau suivant retrace les principales dates marquantes dans le développement de la science médico-légale :

**Tableau I : principales dates de l'évolution de la science médico-légale ( Zbrog , 2025 ) .**

Date	Événement
1910	Création du premier laboratoire de criminalistique par Edmond Locard.
1931	Création du Département de médecine légale à Harvard par Frances Glessner Lee.
1984	Découverte de l'ADN comme outil d'identification par Alec Jeffreys.
1986	Première utilisation de l'ADN dans une affaire criminelle

<b>Années 2000</b>	Développement de la criminalistique numérique et réexamen des méthodes.
--------------------	---

## **II. Le génome humain et ses particularités**

### **II.1. Composition et structure du génome humain**

Le génome humain représente l'ensemble du matériel génétique contenu dans les cellules humaines. Il est constitué d'ADN (acide désoxyribonucléique), qui stocke l'information biologique essentielle au développement, au fonctionnement et à la transmission des caractéristiques héréditaires. Ce génome comprend environ 3 milliards de paires de bases d'ADN, organisées en 23 paires de chromosomes situées dans le noyau des cellules. Il contient à la fois des régions codantes, responsables de la production des protéines, et des régions non codantes, qui jouent un rôle dans la régulation des gènes et d'autres processus biologiques (Retina, 2013).

Le génome humain est divisé en deux parties principales :

#### **II.1.1. Le génome nucléaire**

Il comprend 3,2 milliards de nucléotides d'ADN répartis sur 24 chromosomes différents (22 autosomes et 2 chromosomes sexuels X et Y).

Cet ADN nucléaire est organisé en gènes (environ 23 000), qui codent pour des protéines, et en séquences non codantes, qui ont des rôles dans la régulation génétique. Et il est principalement utilisé pour comparer des échantillons biologiques (sang, salive, sperme, etc...) prélevés sur une scène de crime avec ceux d'un suspect ou d'une base de données (Retina, 2013).

#### **II.1.2. Le génome mitochondrial**

Il est constitué d'une petite molécule d'ADN circulaire de 16 569 nucléotides, présente en plusieurs copies dans chaque mitochondrie.

Cet ADN mitochondrial est exclusivement hérité de la mère et joue un rôle clé dans la production d'énergie cellulaire.

L'ADN mitochondrial est utilisé dans des situations où l'ADN nucléaire est absent, trop dégradé ou en quantité insuffisante (Holland *et* Parsons, 1999).

## **II.2. Les différentes variations du génome humain**

### **II.2.1. Le polymorphisme**

Le polymorphisme désigne une variation génétique présente chez plus de 1 % de la population. Contrairement aux mutations, les polymorphismes ne provoquent pas de maladies de manière évidente. Ces variations peuvent apparaître dans n'importe quelle région du génome, qu'il s'agisse de zones codantes ou non codantes (Lamoril *et al*, 2008).

Le polymorphisme est à la base de l'identification des êtres humains et de leurs spécificités. On distingue alors plusieurs formes de polymorphisme :

### II.2.1.1. Polymorphisme nucléaire

L'ADN répétitif est un ensemble d'acides nucléiques présents en multiples copies dans le génome. Ils constituent une part importante de l'ADN nucléaire des eucaryotes.

Les répétitions en tandem sont l'un des principaux types d'ADN répétitif, qui copient des unités de séquences répétitives adjacentes, formant ainsi un bloc nucléotidique.

On distingue plusieurs types de polymorphismes nucléaires selon la taille et la répétition du nombre d'unités de base (Lakna, 2018).

#### II.2.1.1.1. les minisatellites (ou variable number of tandem repeat)

Le VNTR est un type de répétitions en tandem dans lequel une courte séquence de nucléotides (10 à 60 paires de bases) est répétée un nombre variable de fois dans un locus particulier. C'est pourquoi les VNTR sont également appelés minisatellites.

Généralement, le nombre d'unités répétées dans un VNTR varie d'un individu à l'autre. Par conséquent, la longueur du réseau formé par les VNTR varie également d'un individu à l'autre.

Les VNTR sont les premiers types de polymorphismes utilisés en profilage ADN pour déterminer les caractéristiques génétiques d'une personne (Lakna, 2018).

#### II.2.1.1.2. Les microsatellites (ou short tandem repeat)

Le terme STR désigne un type de répétitions en tandem dans lequel une courte séquence de nucléotides (2 à 6 paires de bases) est répétée un nombre variable de fois dans un locus particulier.

Ces répétitions peuvent être uniques (microsatellites parfaits) ou multiples (microsatellites imparfaits). Le nombre de répétitions varie entre individus et générations, créant un polymorphisme de taille. Ils montrent aussi un polymorphisme de structure, avec des changements de bases dans le motif (Balaresque, 2007).

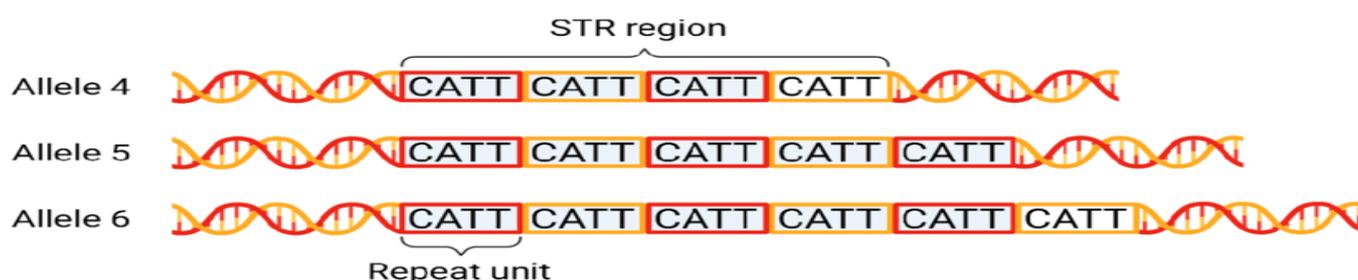


Figure 01: Exemple de variation du nombre de répétitions des Short Tandem Repeats (STR) (Tytgat, 2022).

Les différences entre les deux types de polymorphisme nucléaire peuvent être reprises dans le tableau suivant :

**Tableau II : comparaison entre les VNTRs et les STRs (Lakna , 2018) .**

/	VNTR	STR
<b>Similitudes entre VNTR et STR</b>	<p>VNTR et STR sont deux types de répétitions en tandem.</p> <p>VNTR et STR sont tous deux des régions structurales du génome eucaryote.</p> <p>VNTR et STR sont tous deux constitués d'ADN non codant.</p> <p>VNTR et STR produisent tous deux un polymorphisme génétique.</p> <p>Les séquences VNTR et STR sont tous deux répartis dans tout le génome.</p> <p>Le VNTR et le STR sont tous deux utilisés comme marqueurs génétiques en génétique médico-légale.</p>	
<b>Différence entre VNTR et STR</b>	se compose de 10 à 60 paires de bases.	se compose de 2 à 6 paires de bases.
	C'est un type d'ADN minisatellite.	C'est un type d'ADN microsatellite.
	forme une région répétitive de 0,5 à 15 Kb .	forme une région répétitive de 10 à 1 000 pb.
	contient de 10 à 1 500 copies d'une séquence répétée .	contient de 5 à 200 copies d'une séquence répétée .
produit des séquences hétérogènes .	produit des séquences homogènes .	

### II.2.1.2. Polymorphisme nucléotidique unique

Les polymorphismes nucléotidiques simples, souvent appelés SNP ( pour single nucléotide polymorphisme ) , constituent la variation génétique qui se produit lorsqu'un seul nucléotide (une base A, T, C ou G) dans une séquence d'ADN est remplacé par un autre nucléotide.

Les SNP sont présents normalement dans l'ADN d'une personne. Ils apparaissent en moyenne presque une fois tous les 1 000 nucléotides, ce qui signifie qu'il y a environ 4 à 5 millions de SNP dans le génome d'une personne (Chris Gunter , 2025) .

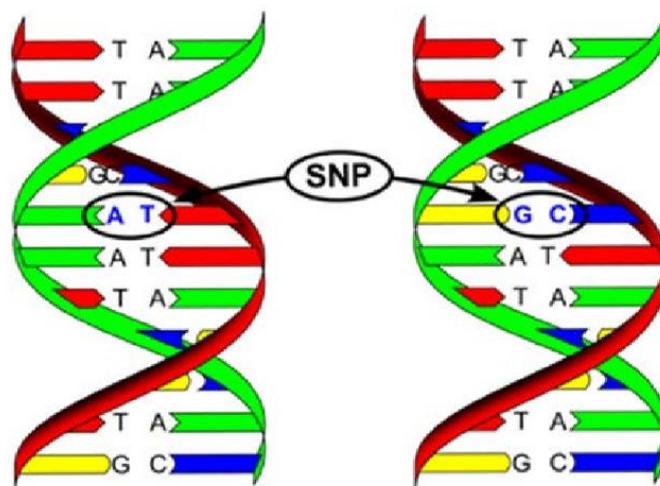


Figure 02 : Exemple de polymorphisme d'un seul nucléotide SNP (Zarkov *et al* , 2020).

### II.2.1.3. Variations du nombre de copies

Les CNV ( ou Copy number variant ) sont des altérations génétiques de taille intermédiaire impliquant des segments d'ADN de plus de 1 000 paires de bases , mais généralement inférieures à 5 mégabases (Eichler, 2008) .

Elles se manifestent sous deux formes principales :

- Les duplications , où un segment d'ADN est présent en plusieurs exemplaires.
- Les délétions , où un segment d'ADN est perdu.

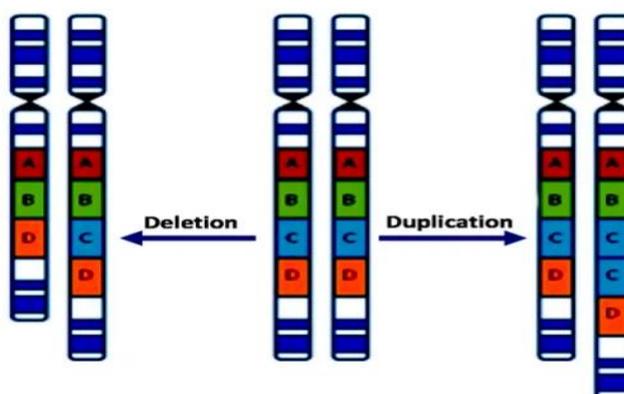


Figure 03: Exemple de Variations du Nombre de Copies (CNV) : Délétion et Duplication (Samarakoon, 2019).

Les scientifiques ont récemment compris que les CNV sont responsables d'une grande partie de la variabilité humaine .

En effet, des études ont révélé que les CNV attirent plus de paires de bases que les autres formes de mutations et qu'elles peuvent jouer un rôle important dans l'évolution .

La recherche indique également que les variations du nombre de copies peuvent affecter l'expression des gènes , altérer l'organisation de la chromatine et influencer la régulation des gènes à proximité (Eichler, 2008) .

### **III. STRs : Marqueurs d'identification de choix en criminalistique**

#### **III.1. Structure et classification des STRs**

Les répétitions courtes en tandem (STR), également appelées microsatellites ou répétitions de séquences simples, sont de courtes séquences d'ADN répétées en tandem qui impliquent une unité répétitive de 2 à 6 paires de bases (pb), formant des séries d'une longueur allant jusqu'à 100 nucléotides (Fan et Chu , 2007) .

Les STR apparaissent dispersées plus ou moins uniformément dans le génome humain, représentant environ 3 % de son ensemble et apparaissant en moyenne toutes les 2 000 paires de bases..

La plupart des STR se trouvent dans les régions non codantes, tandis que seulement environ 8 % se trouvent dans les régions codantes. De plus, leurs densités varient légèrement selon les chromosomes .

Les STR les plus courants chez l'homme sont des unités riches en A : A, AC, AAAN, AAN et AG (Fan et Chu , 2007) .

Sur la base de différentes unités de répétition, les STR peuvent être classés en différents types:

- D'une part, selon la longueur de l'unité de répétition principale, les STR sont classés en répétitions mono-, di-, tri-, tétra-, penta- et hexanucléotidiques. Le nombre total de chaque type diminue à mesure que la taille de l'unité répétée augmente. Les STR les plus courants dans le génome humain sont les répétitions dinucléotidiques.
- D'autre part, selon la structure répétée, les STR sont classés en répétitions parfaites (répétitions simples), ne contenant qu'une seule unité répétitive, et en répétitions imparfaites (répétitions composées), constituées de répétitions de composition différente ( Ludes , 2021 ) .

#### **III.2. intérêt de l'utilisation des STRs en criminalistique**

En matière criminelle, l'analyse d'une vingtaine de microsatellites d'ADN permet d'établir un profil génétique doté d'un fort pouvoir discriminant statistique. Cette technique permet d'établir ou d'exclure une correspondance entre une trace biologique détectée sur une scène de crime et un suspect dont l'ADN a été prélevé (Laurent *et al* , 2017) .

### III.2.1. Historique

Les premiers marqueurs STR utilisés en criminalistique ont été sélectionnés en 1994 par le Forensic Science Service (FSS) du Royaume-Uni pour un système d'amplification quadruplex composé de quatre STR tétranucléotidiques : TH01, vWA, FES/FPS et F13A1 (Kimpton *et al* , 1994). Ces marqueurs ont été jugés adaptés à l'amplification par PCR en raison de leurs séquences répétées simples et de leur propension à présenter des allèles régulièrement espacés différant de quatre bases ; cependant, le système quadruplex n'offrait pas un niveau élevé de discrimination.

En 1997, le Federal Bureau of Investigation (FBI) a désigné 13 loci STR autosomiques pour former le cœur du Combined DNA Index System (CODIS), une base de données composée de profils fournis par les laboratoires de criminalistique fédéraux, étatiques et locaux (Wyner *et al* , 2020).

Deux des marqueurs initialement sélectionnés par le FSS (vWA et TH01) ont été inclus dans l'ensemble de base du CODIS, tandis que les marqueurs FES/FPS et F13A01 ont finalement été écartés en raison de leur faible polymorphisme.

L'ensemble de base a été révisé en 2010 et sept STR supplémentaires ont été mis en œuvre à compter du 1er janvier 2017 (Wyner *et al* , 2020).

La majorité des kits de profilage ADN disponibles dans le commerce sont fabriqués pour inclure les loci STR principaux du CODIS (Butler, 2006).

Le tableau suivant réunit les différents loci du CODIS :

**Tableau III : les différents loci STR du CODIS (Zhang *et al* , 2015) .**

Désignation du locus	Localisation des chromosomes	Allèles compris dans l' échelle allélique	ADN Contrôle 007
D3S1358	3p21.31	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	15, 16
vWA	12p13.31	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	14, 16
D16S539	16q24.1	5, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15	9, 10
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	11, 12
TPOX	2p23- 2per	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	8, 8
Y pot	Yq11.221	1, 2	2
amélogénine	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	X, Y
D8S1179	8q24.13	5, 6, 7, 8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	12, 13

<b>D21S11</b>	21q11.2- q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	28, 31
<b>D18S51</b>	18q21.33	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	12, 15
<b>DYS391</b>	Yq11.21	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	11
<b>D2S441</b>	2p14	8, 9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 15, 16, 17	14, 15
<b>D19S433</b>	19q12	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18.2, 19.2	14, 15
<b>TH01</b>	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	7, 9,3
<b>FGA</b>	4q28	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32,2, 33,2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46,2, 47.2, 48,2, 50,2, 51,2	24, 26
<b>D22S1045</b>	22q12.3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	11, 16
<b>D5S818</b>	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	11, 11
<b>D13S317</b>	13q22-31	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	11, 11
<b>D7S820</b>	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	7, 12
<b>SE33</b>	6q14	4.2, 6.3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20.2, 21, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32,2, 33,2, 34.2, 35, 35,2, 36, 37	17, 25,2
<b>D10S1248</b>	10q26.3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	12, 15
<b>D1S1656</b>	1q42.2	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18.3, 19.3, 20.3	13, 16
<b>D12S391</b>	12p13.2	14, 15, 16, 17, 18, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	18, 19
<b>D2S1338</b>	2q35	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	20, 23

### III.2.2. Caractéristiques des STRs en criminalistique

Les séquences courtes répétées en tandem, sont comme leur nom l'indique, des séquences dont les unités répétées sont beaucoup plus courtes.

Ces fragments, choisis pour être utilisés en criminalistique, comportent généralement la répétition en tandem de seulement trois ou quatre paires de bases, qui peuvent être répétées dans la molécule d'ADN plusieurs fois ou plusieurs dizaines de fois. Évidemment, une unité de trois ou quatre paires de bases seulement est extrêmement petite, ce qui constitue à la fois un problème et un avantage pour les fins qui nous occupent (Curran , 1997) .

L'avantage est que même une très petite quantité d'ADN, même très dégradée, peut être suffisante pour être utilisée en criminalistique. Le problème, c'est que pour pouvoir procéder efficacement à une analyse, il faut augmenter considérablement la taille d'un très petit échantillon constitué de très courtes séquences d'ADN. On y parvient grâce à l'application d'une technique relativement nouvelle, la réaction en chaîne de la polymérase (Curran , 1997) .

La technique PCR/STR est moins susceptible d'être faussée par des contaminants. Elle est réellement meilleure pour ce qui est d'élucider l'origine d'une empreinte génétique spécifique à partir d'un échantillon mélangé et complexe, par exemple dans le cas de taches de sang résultant du mélange du sang de plus d'une personne, dans les restes humains mélangés et aussi dans les prélèvements à la suite d'agression sexuelle (Curran , 1997) .

La technique PCR/STR se prête bien à l'utilisation d'étiquettes fluorescentes pour déceler visuellement les bandes d'ADN. Plusieurs systèmes de ce genre ont d'ailleurs été mis au point.

La fluorescence se prête à la détection automatisée, ce qui facilite grandement l'analyse ultérieure des empreintes génétiques, ainsi que l'archivage et le repérage des données (Curran , 1997) .

### III.2.3. Marqueurs de lignée

Les marqueurs STR sont amplifiés par PCR multiplexe à l'aide d'amorces spécifiques, dont l'une est couplée à un fluorochrome. Les amplicons obtenus sont ensuite séparés et détectés par électrophorèse capillaire. Les résultats sont représentés par des pics de fluorescence, dont la position sur l'axe des abscisses correspond à la taille du fragment amplifié, incluant le STR et les régions flanquantes.

La validation des profils génétiques permet d'éliminer les artefacts d'analyse pour ne conserver que les pics correspondant aux allèles présents dans la trace biologique (Laurent *et al* , 2017) .

Bien que les marqueurs STR soient polymorphes, le nombre d'allèles pour chacun est relativement faible (quelques-uns au maximum) et ces allèles sont partagés par 5 à 20 % de la population en moyenne.

Le pouvoir de discrimination de cette méthode repose sur l'analyse combinée d'une vingtaine de marqueurs STR autosomaux, ce qui permet d'obtenir une probabilité d'apparition d'un profil génétique dans une population de référence de l'ordre d'une sur plusieurs milliards de milliards (Laurent *et al* , 2017) .

## **IV. L'ADN sur les lieux d'un crime**

### **IV.1. Différentes sources biologiques d'ADN**

Parmi les preuves physiques trouvées sur les lieux du crime, les preuves biologiques, à savoir le sang, le sperme, les cheveux, les sécrétions vaginales, la salive, l'urine et la sueur, sont les plus répandues et permettent d'établir un lien entre l'auteur du crime, la victime et la scène du crime (Shrivastava *et al*, 2022).

#### **IV.1.1. Sang**

Les taches de sang découvertes sur une scène de crime peuvent fournir des informations cruciales pour une enquête. L'obtention d'un profil ADN à partir de la tache peut relier une personne à la scène du crime, ce qui peut confirmer ou réfuter les déclarations des témoins. L'analyse de ces échantillons peut fournir des preuves exploratoires lors d'enquêtes criminelles. Lorsqu'un crime violent est commis, une quantité importante de sang peut rester sur la scène du crime, fournissant ainsi une quantité importante d'informations (Weber *et Lednev*, 2020).

#### **IV.1.2. cheveux**

Les cheveux peuvent conserver des traces biologiques importantes pour les enquêtes médico-légales. Les scientifiques médico-légaux sont habitués à rechercher de telles traces sur les vêtements et la peau des victimes. Cependant, lorsque la décomposition s'installe et qu'il ne reste que le squelette des victimes, les cheveux peuvent être le seul tissu représentant la surface du corps au moment du crime sur lequel des traces biologiques d'un agresseur ont pu être laissées et encore détectables (Caccia *et al*, 2021).

#### **IV.1.3. Salive**

Les échantillons de salive prélevés sur les scènes de crime contiennent souvent des fluides corporels d'autres personnes, ce qui complique l'interprétation des profils ADN obtenus, ainsi que celle des résultats des tests d'identification salivaire (Watanabe *et al*, 2022).

#### **IV.1.4. Sperme**

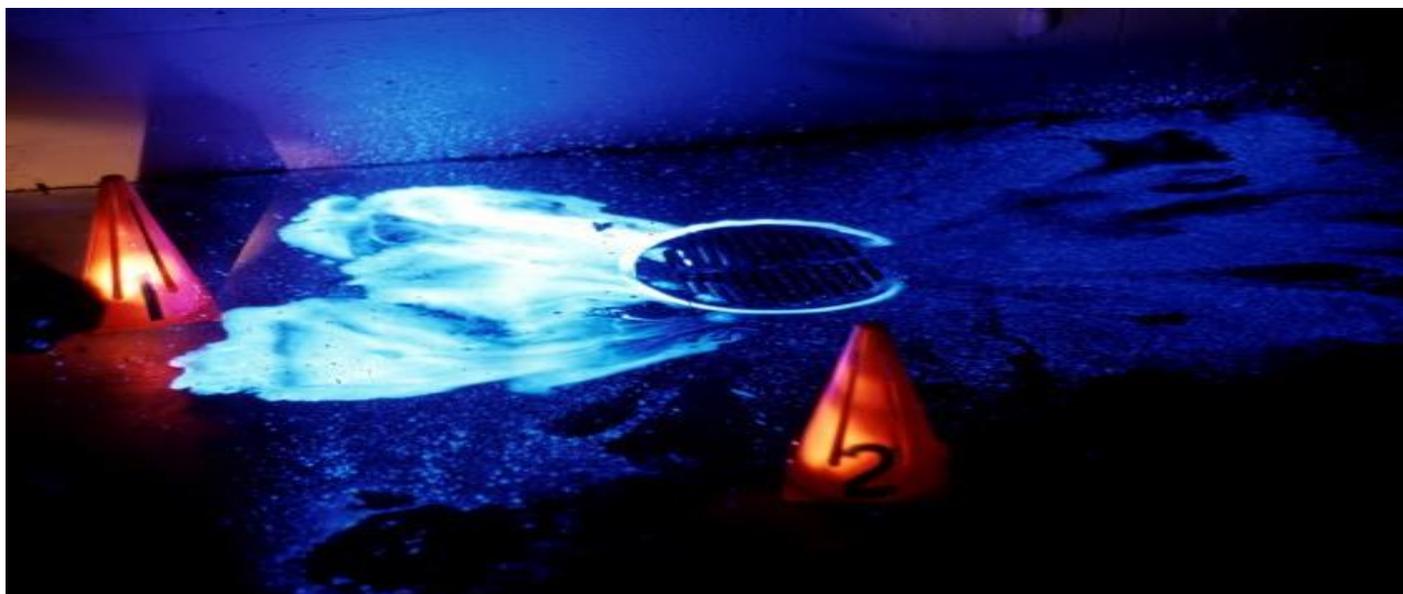
L'identification du sperme peut aider à reconstituer les événements dans les affaires d'agression sexuelle et à identifier les suspects grâce au profilage ADN. Les méthodes actuelles d'identification du sperme présentent des limites, notamment la destruction de l'échantillon et le risque de faux positifs. L'un des principaux problèmes non résolus est l'élimination des interférences du substrat sous-jacent (Borisov *et al*, 2024).

## IV.2. Détection des traces de sang

La détection de sang en criminalistique est l'étape clé de l'analyse de la scène de crime, fournissant des informations précieuses sur les circonstances dans lesquelles un acte criminel s'est produit, telles que la position de la victime et/ou de l'agresseur, leurs mouvements, les instruments utilisés, etc. et permettant la collecte de preuves biologiques et l'identification génétique (Indalecio *et al* , 2021) .

La détection de taches de sang sur des surfaces claires peut être relativement simple. Cependant, la localisation de taches de sang sur des vêtements foncés est souvent plus difficile en raison du manque de contraste, notamment pour les taches anciennes, dû au noircissement du sang au fil du temps . De plus, les taches sont parfois difficiles à reconnaître en raison de la présence d'autres substances d'apparence similaire ou du lavage du support pour tenter de les faire disparaître. Il est donc essentiel d'utiliser des techniques permettant de confirmer ou d'infirmer la présence de taches de sang (Indalecio *et al* , 2021) .

Les taches de sang occultes peuvent être détectables à l'aide du luminol (3-amino-phtalhydracine).



**Figure 04 : Détection des traces de sang invisibles grâce au luminol sur une scène de crime (Sharman et Elliot, 2000) .**

il est également possible d'utiliser des sources lumineuses alternatives permettant d'utiliser différentes longueurs d'onde adaptées à l'indication recherchée. Les composés sanguins comme l'hémoglobine et son métabolite, la bilirubine, absorbent la lumière et sont quasiment non fluorescents. L'utilisation de sources de lumière visible à bande étroite pour améliorer la visibilité est une méthode simple et non invasive qui présente un potentiel considérable pour les examens médico-légaux (Indalecio *et al* , 2021) .



**Figure 05 : Détection des traces biologiques par sources lumineuses en criminalistique (Finnis *et al* , 2023) .**

### IV.3. les profil génétique

Les profils génétiques sont essentiels en identification humaine et en médecine légale. L'ADN, présent dans les cellules nucléées du corps humain, permet de générer un profil génétique.

Une quantité et une qualité adéquates d'ADN sont nécessaires pour obtenir un profil exploitable, surtout en cas de dégradation des échantillons ( Bukyya *et al* , 2021 ).

Le profilage de l'ADN est également connu sous les noms de typage de l'ADN, d'empreinte génétique, de génotypage ou de test d'identité. Le terme « profilage de l'ADN » est plus privilégié car un large éventail de tests sont réalisés par séquençage de l'ADN grâce à une technologie améliorée (Panneerchelvam *et Norazmi*, 2023) .

La technique de profilage de l'ADN a évolué en trois phases :

- La première a été l'utilisation de la RFLP basée sur une sonde VNTR multilocus développée par Sir Alec Jeffreys.
- La deuxième phase a utilisé la RFLP basée sur une sonde à locus unique (SLP).
- Enfin, la troisième phase, qui est la technique actuelle de profilage de l'ADN, utilise la STR (Panneerchelvam *et Norazmi*, 2023) .

Toutes les méthodes de profilage de l'ADN impliquent quatre stratégies de base : l'extraction de l'ADN du bioéchantillon source, la quantification, l'électrophorèse et la détection.

Le profilage d'ADN original développé par Sir Alec Jeffreys impliquait l'utilisation d'une sonde multilocus (MLP) contre le VNTR à travers les chromosomes humains. Les bandes obtenues sont uniques à un individu : des bandes discrètes de 6 à 8 bases suffisent à distinguer les individus (Panneerchelvam *et Norazmi*, 2023) .

## V. Effets de la chaleur sur l'ADN et les traces biologiques

### V.1. Impact de la chaleur sur l'ADN

L'élévation de la température entraîne des altérations structurales de l'ADN, telles que la rupture des liaisons hydrogène entre les paires de bases, la dénaturation de la double hélice, et la formation de lésions oxydatives .

À des températures élevées, des cassures de brins simples et doubles peuvent survenir, compromettant l'intégrité de l'ADN (Nizioł *et al* , 2019) .

#### V.1.1. Cassures d'ADN simple brin

Le stress thermique peut agir comme un agent endommageant l'ADN en entraînant l'accumulation de lésions telles que 8-oxoguanine, cytosine désaminée, sites AP et cassures simple brin (SSB). Les SSB sont induites principalement pendant la phase S du cycle cellulaire. Ce phénomène est lié à l'inhibition de l'enzyme ADN topoisomérase I (top1), dont la fonction est de relâcher les superenroulements de l'ADN en introduisant des SSB temporaires. Le stress thermique (notamment à 45 °C) inhibe l'activité catalytique de top1 et provoque l'accumulation de complexes covalents top1-ADN, empêchant la fin normale du cycle catalytique. Cela conduit à l'apparition de SSB (Kantidze *et al* , 2016) .

#### V.1.2. Cassures d'ADN double brin

Le stress thermique cause des cassures double brin (DSB) principalement de manière retardée, spécifiques à la phase S du cycle cellulaire. Ces DSB apparaissent 3 à 6 heures après le stress thermique, résultant de la collision entre les fourches de réplication redémarrées et les cassures simple brin (SSB) induites par l'inhibition de l'ADN topoisomérase I (top1). La formation retardée des DSB est liée à l'inhibition de la réplication et de la transcription, qui est nécessaire pour détecter et éliminer les complexes top1-ADN, démasquant ainsi les SSB. Ces DSB retardées sont reconnues par les systèmes de réparation, mais ne sont pas réparées, ce qui déclenche la sénescence cellulaire prématurée (Kantidze *et al* , 2016) .

Le stress thermique peut aussi induire immédiatement des DSB dans les cellules en phase G1 et G2, marqués par la phosphorylation de l'histone H2AX dépendante d'ATM. Ces DSB immédiates sont réparées dans les heures suivant le stress, probablement après la restauration des systèmes de réparation inhibés. Le mécanisme exact de formation immédiate des DSB reste inconnu, mais l'inhibition de l'ADN topoisomérase II (top2) par le stress thermique est un candidat probable, car top2 modifie la topologie de l'ADN en introduisant des DSB temporaires. L'inhibition de top2 entraîne la formation de complexes covalents enzyme-ADN, conduisant à des DSB. L'expression des isoformes de top2 variant selon la phase du cycle cellulaire explique la dépendance de l'induction de DSB à cette phase (Kantidze *et al* , 2016) .

## V.2. Altération des propriétés des traces de sang par la chaleur

Le feu peut affecter l'apparence des taches de sang de plusieurs façons. La présence d'un environnement à haute température et d'un feu direct provoque le séchage, la déshydratation, la rétraction, la fissuration, le décollement de la cible et la décoloration du sang, autant de phénomènes qui peuvent altérer l'apparence de la tache. L'exposition thermique provoque l'évaporation et la concentration du sang, créant des taches plus foncées et déformées intérieurement. L'intensité du feu, sa durée et le type de surface sur laquelle le sang est présent peuvent également influencer l'apparence de la tache (Kowalske *et al*, 2024).

# **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

Notre étude a été réalisée au niveau du département d'ADN de la police scientifique de Châteauneuf-wilaya dans la wilaya d'Alger (SDPST), pendant une durée de trois mois (du 09 février au 26 avril).

L'objectif principale de ce travail était de déterminer dans quelle mesure la température altère la fiabilité des analyses de sang et d'ADN.

Pour cela, une méthode bien définie a été suivie, en plusieurs étapes importantes.

Chaque étape a été soigneusement préparée, en respectant les protocoles donnés, afin de garantir les mêmes conditions pour tous les échantillons.

## I. Matériel

### I.1. Matériel biologique

- Tube de sang hépariné, appartenant à 1 seul échantillon.

### I.2. Matériel non biologique et appareillage

- Voir Annexes

L'expérimentation a été réalisée sur quatre types de supports : coton, nylon, papier et écouvillon.

## II. Méthodes

### II.1. Exposition thermique des échantillons

#### II.1.1. Préparation des supports

On prépare 16 boîtes de Pétri stériles sur du papier pailleuse pour assurer une surface propre et stable.

Pour chaque support, on prépare quatre boîtes. On identifie chaque couvercle avec un feutre permanent pour indiquer la température d'exposition prévue : 90 °C, 150 °C ou 300 °C. Pour 300 °C, on fait deux répétitions afin de confirmer les résultats à haute température avec deux méthodes d'extraction différentes.

**Tableau IV : Répartition des échantillons selon les supports et les températures d'exposition**

Support	Coton			Nylon			Papier			Écouvillon		
	90°C	150°C	300°C	90°C	150°C	300°C	90°C	150°C	300°C	90°C	150°C	300°C
N° de d'échantillon Préparer	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2

On découpe les supports (coton, nylon, papier) en morceaux.

Ensuite, on dépose soigneusement tous les supports dans des boîtes de Pétri.

À l'aide d'une micropipette, on dépose un volume de 100 µL de sang sur chaque support.

On trace des cercles de repérage sur les différents supports afin de faciliter l'identification des traces de sang après l'exposition thermique.

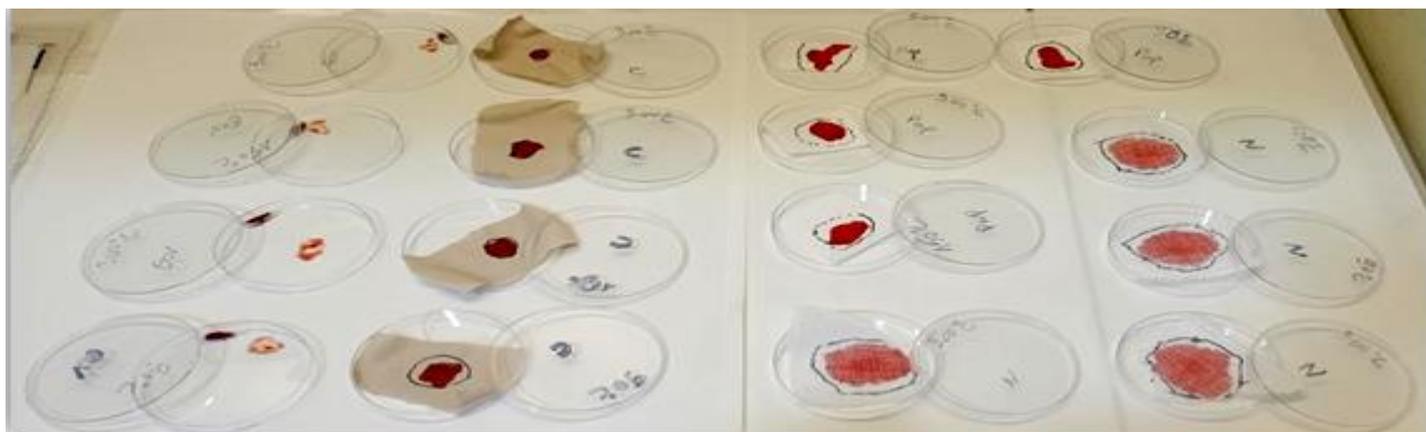


Figure 06 : Les supports préparés pour le séchage

On place les boîtes de Pétri à température ambiante dans une hotte pour un séchage complet pendant 48 à 72 heures.

### II.1.2. L'exposition à différentes températures

On soumet les creusets à un autoclavage pendant 30 minutes afin d'éliminer toute contamination. Ensuite, pour compléter la stérilisation, on les expose à des rayons UV pendant 10 à 15 minutes.

On prélève des morceaux de supports et on les place dans les creusets stériles. Les écouvillons, quant à eux, sont déposés directement sans découpe.



figure 07 : Disposition des Supports dans les Creusets

On réalise l'exposition thermique dans une étuve de séchage universelle Memmert UF55, programmée à trois températures différentes :

**Tableau V : Protocole d'exposition thermique .**

	Nombre de creusets		
	4	4	8
Échantillons traités	1 coton, 1 nylon, 1 papier, 1 écouvillon	1 coton, 1 nylon, 1 papier, 1 écouvillon	2 cotons, 2 nylons, 2 papiers, 2 écouvillons
Température (°C)	90°C	150°C	300°C
Durée d'exposition	30min	30min	20min

Tout au long de l'expérimentation, on place les creusets dans une hotte afin d'éviter toute contamination.

À la fin de l'expérimentation, on couvre soigneusement tous les échantillons et on les stocke dans un environnement fermé afin de préserver leur état pour une analyse ultérieure.

## II.2. Tests d'orientation et de confirmation des traces de sang

### II.2.1. Principe du test Kastle-Meyer

Le test de Kastle-Meyer est un test sanguin à la phénolphtaléine, basé sur une réaction d'oxydo-réduction dans laquelle la phénolphtaléine réduite est oxydée par le peroxyde d'hydrogène, sous l'effet de l'activité peroxydasique du fer contenu dans l'hémoglobine, ce qui entraîne donc sa détection.

### II.2.2. Protocole de détection du test de Kastle-Meyer

Après l'exposition thermique, on transfère les 16 échantillons dans des coupelles en plastique stériles. Avant de commencer le test, on prépare deux témoins afin de valider la fiabilité des réactifs :

- ✓ **Témoin positif** : coloration rose (réaction attendue en présence d'hémoglobine).
- ✓ **Témoin négatif** : absence de coloration (absence d'hémoglobine).



**Figure 08 : témoin positif et négatif du test Kastle Meyer**

Comme les échantillons sont secs, on humidifie des écouvillons stériles avec de l'eau distillée. On utilise ensuite ces écouvillons pour récupérer le maximum de substances de chaque échantillon.

Sur les traces récupérées, on ajoute le même nombre de gouttes du réactif KM et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Et on fait une lecture immédiate du résultat.

### II.2.3. Principe du test immunochromatographique OBTI

Le test OBTI repose sur le principe de l'immunochromatographie pour détecter la présence de sang humain. Quand le sang humain est présent, l'hémoglobine réagit avec des anticorps monoclonaux anti-hémoglobine humaine couplés à des particules colorées. Ces complexes migrent ensuite sur la membrane du test et sont capturés par un deuxième anticorps anti-hémoglobine humaine, indiquant un résultat positif.

### II.2.4. Protocole de confirmation du Test OBTI

Afin de confirmer l'origine humaine du sang détecté, on réalise un test OBTI sur les mêmes échantillons testés avec le Kastle-Meyer. On place le macérât de la trace prélevée des différents supports sur une bandelette. La formation de deux lignes rouges indique un résultat positif, tandis qu'une seule ligne (celle du contrôle) indique un résultat négatif.



Figure 09 : Témoins positif et négatif du test OBTI

Après le résultat des tests, on fait la mise en tube des échantillons dans des tubes Eppendorf de 2ml.

## II.3. Extraction d'ADN

### II.3.1. Principe de l'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN commence avec une lyse cellulaire grâce à l'utilisation d'un tampon hypotonique et l'utilisation des petites particules magnétiques incorporées dans un polymère, avec une grande surface et une capacité de liaison d'ADN élevée et efficace, ce qui entraîne la libération et la récupération maximale de l'ADN, une série de lavages est par la suite effectuée afin de purifier l'ADN extrait.

### II.3.2. Protocole d'extraction manuelle

Le kit PrepFiler® Thermofisher Scientific est utilisé pour l'extraction et la purification manuelle de l'ADN génomique à partir d'une large variété d'échantillons médico-légaux.

Afin de procéder à l'extraction d'ADN, nous avons pris douze (12) échantillons parmi les seize (16) préparés, répartis comme suit : quatre (04) échantillons (coton, nylon, papier, écouvillon) exposés à 90 °C, quatre (04) autres exposés à 150 °C, et quatre (04) exposés à 300 °C.

#### Préparation Initiale

- On chauffe les billes magnétiques à 37°C pendant 30 minutes pour mettre en suspension les billes ;
- On remonte la température du bloc chauffant à 70°C.

#### Lyse Cellulaire

- On met pour chaque échantillon : 300 µL de tampon de lyse PrepFiler et 3 µL de DTT 1M ;
- On vortex pendant 10 secondes ;
- Ensuite on incube les échantillons à 70°C avec une agitation de 900 rpm pendant 40 min.

#### Filtration

- On utilise des colonnes PrepFiler (spin baskets) pour séparer les supports du lysat ;
- On centrifuge à 12.000 - 14.000 rpm pendant 3 à 5 min pour récupérer le lysat.

#### Liaison de l'ADN aux billes magnétiques

- On met sur le lysat : 180 µL d'isopropanol puis 15 µL de billes magnétiques ;
- On vortex doucement pendant 10 secondes ;
- On met nos échantillons dans un agitateur à 1500 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.

#### Lavage et purification d'ADN

Le tableau suivant indique Les lavages essentiels pour éliminer les organites et les débris cellulaires ainsi que tous les inhibiteurs et les contaminants présents sur le support :

**Tableau VI : Étapes de Lavage des Échantillons ADN à l'aide d'un portoir magnétique .**

Étape	Action
<b>1er lavage (Wash Buffer A)</b>	On place les tubes dans le portoir magnétique pendant 10 minutes, on retire le surnageant, puis on ajoute 600 µL de Wash Buffer A. On vortex entre chaque ajout pendant 10 secondes, puis on les remet dans le portoir magnétique et on élimine le tampon de lavage.
<b>2ème lavage (Wash Buffer A)</b>	On répète les étapes du premier lavage en utilisant seulement 300 µL de Wash Buffer A.
<b>3ème lavage (Wash Buffer B)</b>	On répète les étapes du premier et deuxième lavage en utilisant 300 µL mais du Wash Buffer B.

### Élution et récupération de l'ADN

- On met entre 50 et 100  $\mu\text{L}$  de tampon d'élution PrepFiler (TE Buffer) ;
- On incube à  $70^{\circ}\text{C}$  avec une agitation 900 rpm pendant 5 minutes ;
- On place les tubes eppendorfs dans le portoir magnétique pendant 10 minutes et on récupère le surnageant contenant de l'ADN pur ;



**Figure 10 : les tubes eppendorfs dans le portoir magnétique**

On dépose notre extractum dans des tubes eppendorfs identifiés de 1.5 mL.

L'extractum obtenue doit être clair sans dépôts ni particules qui peuvent entraver son amplification. Si l'extractum est trouble, on le centrifuge à 14,000 rpm et on récupère le surnageant clair ou on effectue une autre série de lavage.

### Stockage de l'ADN

À la fin du protocole, on stocke les échantillons au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  en attendant leur passage à la quantification (qPCR).

### II.3.3. Protocole d'extraction d'ADN automatisée

L'automate EZ1 Advanced XL ainsi que le Kit DNA Investigator EZ1&2<sup>®</sup> Qiagen ont été utilisés pour l'extraction et la purification des acides nucléiques à l'aide de cartes spécialisées et des réactifs sous forme de cartouches préremplies, ce qui réduit les étapes manuelles et minimise le risque de contamination.

Les quatre (04) échantillons restants, également constitués de coton, nylon, papier et écouvillon, préalablement exposés à  $300^{\circ}\text{C}$ , ont été traités en suivant le protocole ci-dessous :

#### Préparation Initiale

- On allume le bloc chauffant à  $56^{\circ}\text{C}$ .

#### Lyse cellulaire

- On met pour chaque échantillon : 190  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse G2 de EZ1 et 10  $\mu\text{L}$  de protéinase K.
- Après chaque ajout, on vortex pendant 10 secondes ;
- Ensuite on incube les échantillons à  $56^{\circ}\text{C}$  avec une agitation de 900 rpm pendant 1 heure.

## Filtration

- On utilise des colonnes PrepFiler (spin baskets) pour séparer les supports du lysat ;
- On centrifuge à 12.000-14.000 rpm pendant 3 à 5 min pour récupérer le lysat.

## Purification de l'ADN avec l'automate EZ1 Advanced XL

### ✧ Préparation de l'automate

-On allume l'appareil et on lance le programme UV de 20 minutes lumière pour la désinfection.

### ✧ Installation des consommables

- On agite vigoureusement les cartouches de réactifs EZ1 puis on les place dans le support prévu à cet usage et on les presse légèrement pour s'assurer qu'elles sont bien insérées ;
- On débouche des tubes 2 ml contenant les lysats et on les place dans la rangée N°04 du support EZ1 ;
- On place les embouts filtrants et le porte-embouts dans la rangée N°02 ;
- On étiquette les tubes d'élution de 1,5 mL avec le numéro d'échantillon et on les place dans la rangée N°01.

Au final, on vérifie la configuration des réactifs et des échantillons avant de lancer le protocole.

### ✧ Démarrage et exécution du protocole EZ1

- On sélectionne le protocole approprié sur l'écran de l'appareil ;
- On paramètre le volume d'élution à 50 µL et on confirme la position des constituants de l'automate ;
- On ferme la porte et on démarre l'extraction automatique.

### ✧ Étapes automatisées de l'extraction

L'automate a ensuite exécuté les étapes suivantes :

- Perforation des cartouches ;
- Collecte du bon volume du tampon d'élution et le mettre en dernière position ;
- Mélange de l'isopropanol avec les billes magnétiques ;
- Fixation de l'ADN sur les billes magnétiques ;
- Séparation magnétique et lavages successifs ;
- Rinçage et contrôle de la température ;
- Éluion finale de l'ADN

### ◆ Récupération et stockage de l'ADN

À la fin du protocole, on récupère les tubes d'élution et on les referme ;

En cas de volume inférieur à 50 µL, on effectue un ajustement avec du tampon TE.

On stocke les échantillons au congélateur à -20°C en attendant leur passage à la quantification (qPCR).

## II.4. Quantification en Temps Réel (qPCR)

La PCR en temps réel (RT-PCR) appelée PCR quantitative ou qPCR est basée sur une réaction enzymologique d'amplification et sur une mesure continue des amplicons (produits de cette amplification) grâce à un marqueur fluorescent.

Elle repose sur l'activité 5-nucléase de l'ADN polymérase Taq, qui clive la sonde Taqman spécifique à la cible à amplifier. Les données de fluorescence sont ensuite exprimées en logarithme afin d'identifier facilement la phase exponentielle qui permet une estimation quantitative à l'aide de la droite des standards de dilution.

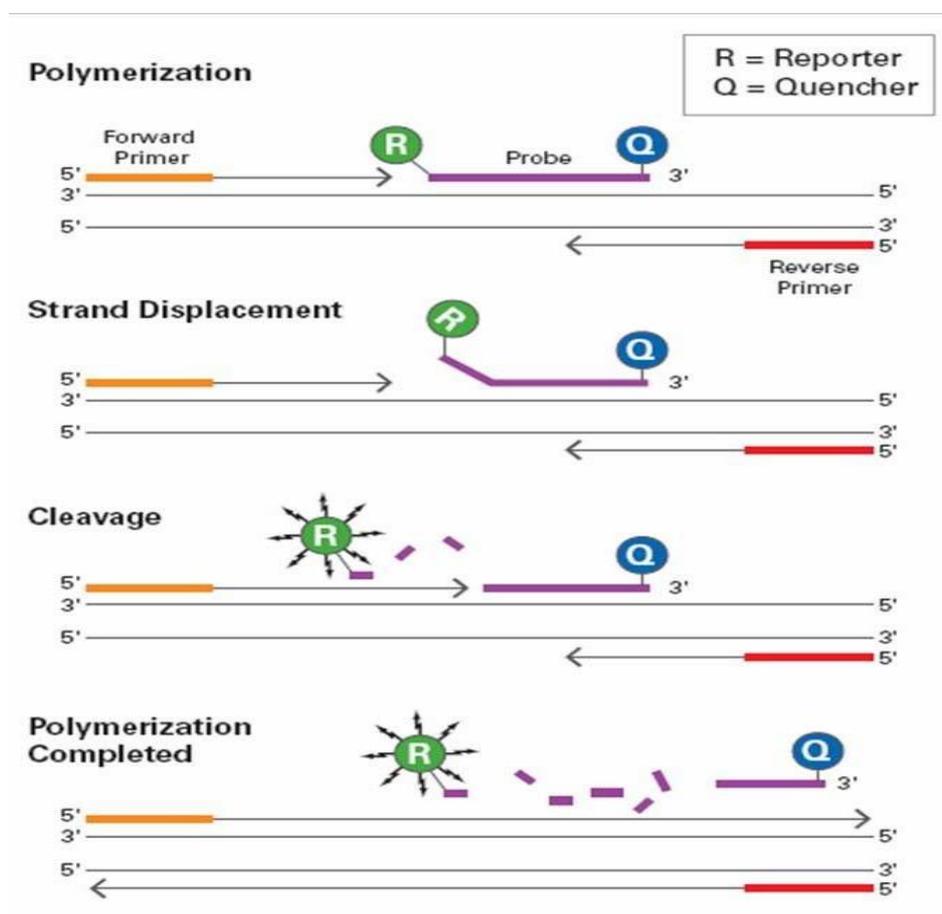


Figure 11: Principe de la quantification par PCR en temps réel (Piquereau , 2011).

Cette méthode est essentielle pour garantir la fiabilité des analyses médico-légales. Elle permet d'évaluer avec précision la quantité d'ADN et la présence d'éventuels inhibiteurs dans un échantillon afin d'éviter toute perte du matériel génétique.

### II.4.1. Mise en place de la réaction qPCR

#### II.4.1.1. Préparation du Matériel

On commence par ouvrir le logiciel et charger le protocole préenregistré et on lance 15 minutes de stérilisation UV des constituants de la hotte de l'automate QiAgility afin d'éliminer toute contamination possible. Entre temps on remplit le fichier Excel Data Handling Tools avec les numéros d'ADN correspondants à nos échantillons, ce qui nous permet d'assurer un suivi précis de chaque tube.

### II.4.1.2. Dépôt des Réactifs du Kit QuantiFiler

**Tableau VII : Caractéristiques du Kit Investigator Quantifiler**

Kit	Gène cible	Localisation	Longueur d'amplicon	Région amplifiée
Human Quantifiler	Human telomerase reverse transcriptase	5p15.33	62 bases	Intron

Une préparation des réactifs pour la qPCR est nécessaire à réaliser manuellement dans une hotte avant de les déposer dans l'automate :

**Tableau VIII : Préparation des Réactifs pour la Réaction de qPCR**

Réactif	Volume total (µl)	Volume utilisé (µl)
Mix : Milieu réactionnel (200 µM dNTP, 3,75 U Taq polymérase, 5 mM Mg <sup>2+</sup> , 200 nM sonde Taqman, stabilisants) + des amorces à 300 nM.	1100	908,5
Témoin négatif : Diluant	360	181
Témoin positif : ADN standard	13	1

### II.4.1.3. Positionnement des composants de la hotte de l'automate

On vérifie soigneusement la position des différents éléments dans la hotte :

- ✓ Les tips de 50 µL et 200 µL dans les deux adaptateurs 96-tip.
- ✓ Les Eppendorf 2 mL des réactifs dans le Mix Block 1X5 mL 4X2 mL et le Reagent Block 16X0,2 mL 8X2mL/1,5mL.
- ✓ Les minitubes de 0,2 mL dans le Reagent Block 16X0,2 mL 8X2mL/1,5mL.
- ✓ Les échantillons à analyser dans les 3 portoirs flip-cap 32X1,5mL.
- ✓ La plaque qPCR 72X0,1 mL prête à recevoir les échantillons.

#### II.4.1.4. Préparation de la gamme standard

On effectue une dilution en cascade pour obtenir une courbe standard.

**Tableau IX : Préparation de la courbe standard pour la quantification d'ADN**

Standard	Concentration (ng/ $\mu$ l)	ADN control	Diluant
1	20	20	30
2	5	10 du premier standard	30
3	1.25	10 du deuxième standard	30
4	0.3125	10 du troisième standard	30
5	0.078125	10 du quatrième standard	30
6	0.01953125	10 du cinquième standard	30
7	0.0048828125	10 du sixième standard	30

#### II.4.1.5. Répartition des échantillons et des témoins

Avant de lancer la qPCR, les différents réactifs ont été placés dans des tubes selon une organisation précise, présentée dans le tableau suivant :

**Tableau X : Organisation des Réactions qPCR dans les Strip-Tubes**

Type de réaction	Contenu	Position
Témoin négatif	1 $\mu$ l de diluant	Strip-tube N°8
Témoin positif	1 $\mu$ l d'ADN standard	Strip-tube N°9
Echantillons	1 $\mu$ l des extractum	à partir du strip-tube N°10 jusqu'au N°72

### II.4.2. Lancement du protocole de la qPCR

Mise en marche du logiciel avec les paramètres du thermocycleur RotorGene sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau XI : Paramètres du Rotor et Signaux de Détection en qPCR**

<b>Type du Rotor</b>	72-Well Rotor	
<b>Signal</b>	470 nm Excitation 510 nm Emission	Green (FAM) donne une information sur l'ADN humain.
	530 nm Excitation 555 nm Emission	Yellow (VIC) donne une information sur les inhibiteurs.

Le tableau suivant présente les températures et la durée de chaque phase du programme utilisé par le thermocycleur lors de la qPCR :

**Tableau XII : Températures et Durées des Phases du Thermocycleur en qPCR**

Phase	Température (°C)	Durée
<b>Dénaturation initiale</b>	95°C	3 min
<b>Dénaturation</b>	95°C	5 sec
<b>Hybridation</b>	60°C ou Tm (-5)	10 sec
<b>Elongation et fluorescence</b>	72°C	20 sec
<b>Maintien (facultatif)</b>	4°C	-
<b>Nombre de cycle total</b>	40	

#### II.4.2.1. Traitement des données

Un ensemble de procédures de normalisation des données est nécessaire pour évaluer l'efficacité de la qPCR :

##### Correction de la ligne de base :

Pour être détectable, le signal de fluorescence doit dépasser la ligne de base. Il est donc impératif de définir la ligne de base et le seuil avec précision pour une bonne quantification.

Les réglages appliqués pour l'analyse des données qPCR sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau XIII : Réglages des Paramètres d'Analyse sur le Logiciel qPCR**

Paramètres d'analyse			
Cycling A (canal Green et Yellow)	Correction de pente	Vérifier la tangente	la position de la pente à <b>-3,33</b>
	Réglage du décollage	Cycle 5 à 15	Artéfacts de stabilisation de la réaction.
		Cycle 15 à 20	Ligne de base pour une amplification précise.
	Échelle linéaire  Détection automatique du seuil (ou Cq)	Pour afficher une échelle linéaire.  Réglage du seuil qui se situe : <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Significativement au-dessus de la ligne de base de fond.</li> <li>➤ Dans la phase logarithmique d'amplification et évite la phase de plateau.</li> <li>➤ Dans une plage où les tracés d'amplification des échantillons sont parallèles.</li> </ul>	

#### Vérification de la courbe standard :

Lorsqu'on examine la courbe standard, les trois principaux paramètres à prendre en compte sont les suivants :

L'efficacité de la qPCR c'est l'efficacité avec laquelle la cible a été amplifiée et doit se situer entre 0,9 et 1.1 ( Postollec *et al* , 2011) ;

La valeur  $R^2$  c'est la mesure statistique de la proximité des données avec la ligne de régression et doit être supérieur à 0,98 pour une bonne corrélation entre deux valeurs ( Larionov *et al* , 2005);

L'écart-type entre les répétitions indique la précision du pipetage, il doit être inférieur à 0,2, cette notion est prise en compte en mise en plaque manuelle de la qPCR.

### Détermination de la concentration des échantillons :

Pour déterminer la quantité d'ADN cible présent dans un échantillon donné à l'aide de la courbe étalon.

Le programme suit l'équation suivante :  $Y = mx + b$

---

y : valeur du Ct                      m : pente (-3,33)                      x : log (quantité)                      b : ordonnée à l'origine (26,54)

---

$$\text{Concentration (quantité)} = 10^{((Ct-b)/-3,33)}$$

Par la suite les échantillons ayant présenté un résultat de quantification supérieur à 0,01 ng/μl sont susceptible de donner un profil génétique et suivent donc le reste des étapes.

### II.5. Normalisation

Avant de passer à la PCR et l'électrophorèse capillaire, une étape essentielle est effectuée et qui consiste à corriger des mesures techniques par rapport à une référence stable afin d'examiner la véritable variation biologique des échantillons donnant ainsi un point de repère stable auquel les mesures peuvent se rapporter.

Le facteur de normalisation qu'on utilise ici est une concentration d'ADN ne dépassant pas 0,1 ng/μl pour tous les échantillons afin d'uniformiser la quantité de l'ADN initiale de notre plaque et cela en suivant l'équation de dilution :  $C_1V_1 = C_2V_2$  où C1 et V1 sont la concentration et le volume initiaux et C2 et V2 sont la concentration et le volume après dilution.

Une technique utile pour simplifier les calculs de dilution consiste à utiliser des ratios plutôt que des valeurs réelles. En établissant un rapport entre la concentration initiale et finale, on peut facilement déterminer le rapport entre le volume initial et final.

Exemple pour une concentration initiale de 0,3 ng/μl on aura 0,1/0,3 soit un ratio de 1/3 ou 1:2 pour 1 μl d'échantillon on ajoute 2 μl d'eau pour un total de 3 μl du volume final.

### II.6. Amplification de l'ADN (PCR)

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique d'amplification des acides nucléiques en laboratoire utilisée pour obtenir à partir d'un échantillon peu abondant une importante quantité d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie à l'aide de l'enzyme d'ADN la Taq polymérase.

### II.6.1. Réactifs utilisés du Kit GlobalFiler

Le tableau suivant présente les différents composants utilisés pour préparer la réaction de qPCR :

**Tableau XIV : les composants nécessaires à la réalisation de la PCR**

Composant	Volume par réaction ( $\mu\text{L}$ )	Remarques
PCR Reaction Mix	7.5 $\mu\text{L}$	Contient ADN polymérase et dNTP
Primer Set	2.5 $\mu\text{L}$	Amorces spécifiques STR
Eau ultra pure (buffer)	5 $\mu\text{L}$	Complément du volume total
Total	15 $\mu\text{L}$	Sans l'ajout de l'ADN des échantillons

### II.6.2. Protocole Expérimental

#### II.6.2.1. Préparation du plan de dépôt

On remplit le plan de dépôt de la PCR.

#### II.6.2.2. Préparation du mélange réactionnel

On calcule le volume total nécessaire selon le nombre d'échantillons ( $n+2$ ).

On vortex doucement les réactifs pendant 10 secondes.

On prépare notre mix (PCR Reaction Mix + Primer Set + eau pure) dans un tube Eppendorf.

#### II.6.2.3. Dépôt des échantillons dans la plaque PCR

On distribue 15  $\mu\text{L}$  du mix dans chaque puits de la plaque.

On ajoute 5  $\mu\text{L}$  d'ADN dans chaque puits selon l'ordre établi dans le plan de dépôt, sans oublier le témoin positif et le témoin négatif.

#### II.6.2.4. Scellage et lancement de la PCR

On recouvre la plaque avec une feuille d'aluminium avant de la placer dans le thermocycleur.

On vortex, puis on lance le programme suivant :

**Tableau XV : Conditions thermiques du programme de PCR conventionnelle**

Étape	Température	Durée
Incubation initiale	95°C	1 min
Dénaturation	94°C	10 sec
Hybridation / Élongation	59°C	1 min 30
Extension finale	60°C	10 min

## II.7. Post-PCR

La phase de post-PCR est une étape essentielle pour la préparation des produits d'amplification en vue de leur analyse par l'électrophorèse capillaire sous forme monocaténaire. Elle assure une migration optimale des fragments d'ADN et leur détection grâce à l'utilisation du Ladder, LIZ600 et du formamide.

### II.7.1. Réactifs Utilisés

Le tableau suivant regroupe les composants utilisés pour préparer le mélange destiné à l'analyse capillaire :

**Tableau XVI : Composants du mélange pour l'analyse capillaire**

Réactifs	Concentration/Quantité	Conditions de Conservation
Hi-Di Formamide	8,5 µl/échantillon	-20°C
DNA Size Standard GeneScan Liz 600	0,5 µl/échantillon	-20°C
Échantillons PCR	3 µl	-20°C après amplification
Ladder (étalon de taille)	1,5 µl	-20°C

### II.7.2. Protocole Expérimental

#### II.7.2.1. Préparation du plan de dépôt

- On remplit le plan de dépôt de la post-PCR.

#### II.7.2.2. Préparation du Mix de Migration

- On calcule le volume total nécessaire selon le nombre d'échantillons (n+2).
- On vortex doucement les réactifs pendant 10 secondes.
- On prépare notre Mix (Hi-Di Formamide + DNA Size Standard GeneScan Liz 600) dans un tube.

#### II.7.2.3. Dépôt des échantillons dans la plaque post-PCR

- On distribue 9 µL du mix dans chaque puits de la plaque.
- On ajoute 3 µL de l'échantillon PCR dans chaque puits selon l'ordre établi dans le plan de dépôt, sans oublier le témoin positif et le témoin négatif.
- On ajoute 1,5 µl du Ladder dans 2 puits de chaque Run de 16.

#### II.7.2.4. Scellage et lancement de la dénaturation thermique

On recouvre la plaque avec des septa-strips.

On centrifuge brièvement pour éliminer les bulles d'air.

On place la plaque dans le “thermocycleur 9700 Silver” en lançant le programme suivant :

**Tableau XVII : Paramètres du programme thermique**

Température	Durée	Objectif
95°C	3 minutes	Séparation des brins d'ADN

#### II.7.2.5. Refroidissement et choc Thermique

La plaque post PCR est placée directement après dénaturation sur le cryo-bloc pendant 3 min.

#### II.7.2.6. Vérification et Transfert dans l'Analyseur génétique à 24 capillaires

On vérifie l'absence de bulles d'air et on centrifuge à nouveau si nécessaire.

On place les retainer clips sur la plaque.

On transfère la plaque dans l'analyseur génétique (3500XL Genetic Analyzer Hitachi) et on lance l'analyse des produits de post PCR.

### II.8. Electrophorèse capillaire

Les produits de post amplification sont soumis à une électrophorèse capillaire par un analyseur génétique 3500XL.

Les fragments d'ADN chargés négativement sont attirés par l'électrode cathodique en platine fixée à l'extrémité du capillaire (24 capillaires en tout), qui est ouverte et remplie de polymère à performances optimisées (le POP qui fait migrer l'ADN). Lorsqu'un courant est appliqué, les fragments d'ADN sont attirés vers le capillaire et voyagent à travers le polymère jusqu'à la fenêtre de détection et le boîtier de la matrice.

Lorsque les fragments traversent une zone dégagée dans le capillaire, les fluorophores sont excités par un laser et l'émission est détectée et enregistrée par une caméra CCD sous forme de pixels (il peut détecter jusqu'à cinq fluorophores « FAM<sup>TM</sup> », « VIC<sup>TM</sup> », « NED<sup>TM</sup> », « TAZ<sup>TM</sup> » et « SID<sup>TM</sup> » (Coquoz et al, 2003). La capacité de détecter plusieurs fluorophores permet de détecter un plus grand nombre de fragments d'ADN de taille similaire.

Toutes ces données et ces signaux de fluorescence (en pixels) vont être collectés, analysés traduits et validés par le logiciel GeneMapper, qui permet dans un premier temps d'assigner une taille aux fragments identifiés en les comparant avec le standard de taille et en second temps, chaque allèle est identifié d'une manière très spécifique en le comparant avec une échelle allélique (le ladder) ce qui permet d'attribuer le nombre allélique approprié aux fragments d'ADN d'après leurs tailles (pb) et le fluorochrome associé et donc l'obtention d'un profil génétique.

Tableau XVIII : Paramètres de lecture du logiciel GeneMapper

Paramètres d'analyse		
<b>Seuil d'amplitude des pics</b>	Seuil Analytique 50 RFU	
<b>Quantité d'ADN initiale</b>	> 100 pg pour éviter les fluctuations stochastiques (drop-in et drop-out d'allèles en dessous du Seuil Stochastique de 50 et 150 RFU)	
<b>Verification des OL (Off Ladder) Hors Bin</b>	s'ils sont bien situés en dehors des segments géniques du panel à cause d'une saturation d'ADN.	
<b>Limite de détection</b>	<b>Artéfacts</b>	Stutters : erreurs d'amplification à cause d'une saturation d'ADN
		Pull-Up : mauvaise séparation spectrale à cause d'une saturation d'ADN.

# **Chapitre III : Résultats et Discussion**

## I. Résultats des tests d'orientation et de confirmation des traces de sang

### I.1. Test Kastle-Meyer

Les résultats du test Kastle-Meyer révèlent une corrélation claire entre la température d'exposition et la présence d'hémoglobine fonctionnelle :

Tableau XIX : Résultat du test Kastle-Meyer

/	Température d'exposition											
	90°C				150°C				300°C			
Support	Coton	Nylon	Papier	Écouvillon	Coton	Nylon	Papier	Écouvillon	Coton 1 et Coton 2	Nylon 1 et Nylon 2	Papier 1 et Papier 2	Écouvillon 1 et Écouvillon 2
Résultat	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Interprétation	Coloration rose = Présence d'hémoglobine (Test positif)				Coloration rose = Présence d'hémoglobine (Test positif)				Aucune coloration = Absence d'hémoglobine (Test négatif)			

➤ **À 90°C et 150°C :**

L'apparition d'une coloration rose sur tous les supports testés confirme la présence d'hémoglobine.

Cela suggère que l'hémoglobine reste stable à ces plages de températures modérées. L'activité peroxydase de l'hémoglobine (responsable de la coloration) est toujours fonctionnelle.

➤ **À 300°C :**

Aucune coloration n'a été observée sur l'ensemble des supports.

Cela suggère qu'une température élevée à 300°C pendant 20 minutes semble avoir provoqué une dégradation irréversible de l'hémoglobine, rendant impossible sa réaction avec la phénolphtaléine.

### I.2. Test OBTI

Les résultats obtenus avec ce test immunochromatographique :

➤ **À 90°C et 150°C :** La présence de deux bandes rouges sur toutes les bandelettes indique une reconnaissance réussie des antigènes spécifiques à l'hémoglobine humaine.

Cela montre que la structure des protéines antigéniques n'est pas altérée à ce niveau de température et reste détectable par ce test.

➤ **À 300°C :** Seule la bande témoin (C) est visible.

Ceci confirme une altération profonde des protéines due à la température élevée, empêchant toute reconnaissance par les anticorps du test. L'antigène est probablement détruit ou modifié, ce qui rend le test négatif malgré la présence initiale du sang humain.

## II. Résultats de la quantification d'ADN

L'utilisation des automates QIAgility et Rotor-Gene, nous a permis d'avoir une analyse rapide et fiable des échantillons, offrant des données sur la concentration en ADN et la qualité de l'extraction.

Les résultats obtenus ont été essentiels pour évaluer l'impact de la chaleur sur la récupération et la dégradation de l'ADN, et ont été utilisés pour comparer l'efficacité des différents protocoles d'extraction.

### Paramètres d'évaluation de la réaction qPCR :

#### II.1. La spécificité

L'objectif du critère de spécificité est de démontrer que la méthode qPCR réalisée en duplex répond adéquatement au besoin du test qui est de :

- Quantifier l'ADN Humain présent dans un échantillon grâce à l'utilisation d'amorces FAM représentés par le Target Green ;
- Détecter les inhibiteurs présents dans un échantillon grâce à l'utilisation d'amorces VIC représentée par le Target Yellow.

**Tableau XX : Résultats de la concentration d'ADN selon le support et la température d'exposition**

Sample name	Green			Yellow		
	Target	Cq	Concentration		Target	Cq
Std. A1	Human	21,903	24,617812	NgMul	IC	--
Std. A2	Human	24,235	4,9256388	NgMul	IC	--
Std. A3	Human	26,478	1,0477321	NgMul	IC	--
Std. A4	Human	28,351	0,2876632	NgMul	IC	27,667
Std. A5	Human	30,38	0,0709089	NgMul	IC	27,841
Std. A6	Human	32,285	0,0190416	NgMul	IC	28,077
Std. A7	Human	33,987	0,0058832	NgMul	IC	28,067
Diluent	Human	0	0	NgMul	IC	28,675
Témoin +	Human	20,911	48,816184	NgMul	IC	22,319
C90 Prep	Human	<b>31,024</b>	0,0454791	NgMul	IC	<b>28,27</b>
N90 Prep	Human	<b>21,923</b>	24,276465	NgMul	IC	<b>32,704</b>
P90 Prep	Human	<b>26,473</b>	1,05118	NgMul	IC	<b>27,391</b>
E90 Prep	Human	<b>23,31</b>	9,3244464	NgMul	IC	<b>30,895</b>
C150 Prep	Human	<b>25,371</b>	2,2489861	NgMul	IC	<b>30,386</b>
N150 Prep	Human	<b>25,689</b>	1,8053771	NgMul	IC	<b>28,298</b>
P150 Prep	Human	<b>27</b>	0,7308609	NgMul	IC	<b>27,91</b>
E150 Prep	Human	<b>24,296</b>	4,7235722	NgMul	IC	<b>30,383</b>

C300 Prep	Human	--	--	NgMul	IC	28,275
N300 Prep	Human	--	--	NgMul	IC	28,94
P300 Prep	Human	--	--	NgMul	IC	28,277
E300 Prep	Human	--	--	NgMul	IC	28,176
C300 EZ1	Human	--	--	NgMul	IC	28,408
N300 EZ1	Human	--	--	NgMul	IC	29,091
P300 EZ1	Human	<b>38,353</b>	0,0002891	NgMul	IC	<b>28,353</b>
E300 EZ1	Human	--	--	NgMul	IC	<b>28,214</b>
T- Prep	Human	--	--	NgMul	IC	<b>28,785</b>
C référence Prep	Human	<b>27,5</b>	0,5173098	NgMul	IC	<b>30,067</b>
N référence Prep	Human	<b>28,505</b>	0,2585841	NgMul	IC	<b>28,367</b>
P référence Prep	Human	<b>25,162</b>	2,597698	NgMul	IC	<b>27,134</b>
E référence Prep	Human	<b>26,032</b>	1,4250714	NgMul	IC	--
T- EZ1	Human	--	--	NgMul	IC	28,847

## II.2. Efficacité réactionnelle

$$[ADN] = [ADN]_0 \times (1 + E)^C \text{ soit } [ADN] = [ADN]_0 \times 2^C$$

[ADN] <sub>0</sub> : Concentration d'ADN initial	[ADN] : Concentration d'ADN amplifié	E : Efficience (se rapproche de 1 pour une efficacité à 100%)	C : nombre de cycle
--	--------------------------------------	---	---------------------

$$\text{Efficience} = 10^{(-1/M)} - 1 \longrightarrow 1 = 10^{(-1/M)} - 1 \longrightarrow 2 = 10^{(-1/M)} \longrightarrow \text{Log}(2) = \text{Log} 10^{(-1/M)} \longrightarrow 0,30 = -1/M$$

$$M = -1 / 0,3 \longrightarrow M = -3,33 \text{ pour une efficacité à 100\%}.$$

Si la pente est inférieure à -3,33 : soit le produit qPCR est supérieur à 150 Pb soit il y a une concentration faible de primer soit une faible efficacité des amorces.

Si la pente est supérieure à -3,33 : soit il y a un problème d'amplification des standards, soit une erreur de pipetage et de dilution insuffisante.

### II.3. Le coefficient de détermination R2

Selon l'équation suivante :  $Y = mx + b$

y : valeur du Cq	m : pente (-3,33)	x : log (quantité)	b : ordonnée à l'origine (26,54)
------------------	-------------------	--------------------	----------------------------------

Exemple à partir de notre Témoin positif :

$$Cq = (-3,337 \times \text{Log [ADN]}) + B \implies B = Cq - (-3,337 \times \text{Log [ADN]}) = 20,911 - (-3,337 \times \text{Log } 48,816) = 26,545$$

B reste constant peu importe l'échantillon.

Il existe donc une corrélation linéaire entre la valeur de X (Log [ADN]) soit la quantité d'ADN cible à l'origine présente dans un échantillon et la valeur de Y le Cq obtenu pour cet échantillon : cette relation linéaire est la base de la qPCR.

R<sup>2</sup> : Coefficient de détermination doit être supérieur à 0,98

Une valeur R2 faible peut indiquer une dilution e inadéquate ou l'utilisation de micropipettes non calibrées.

L'efficacité de la qPCR ainsi que le coefficient de détermination ont été confirmés avec la courbe des standards ci-dessous :

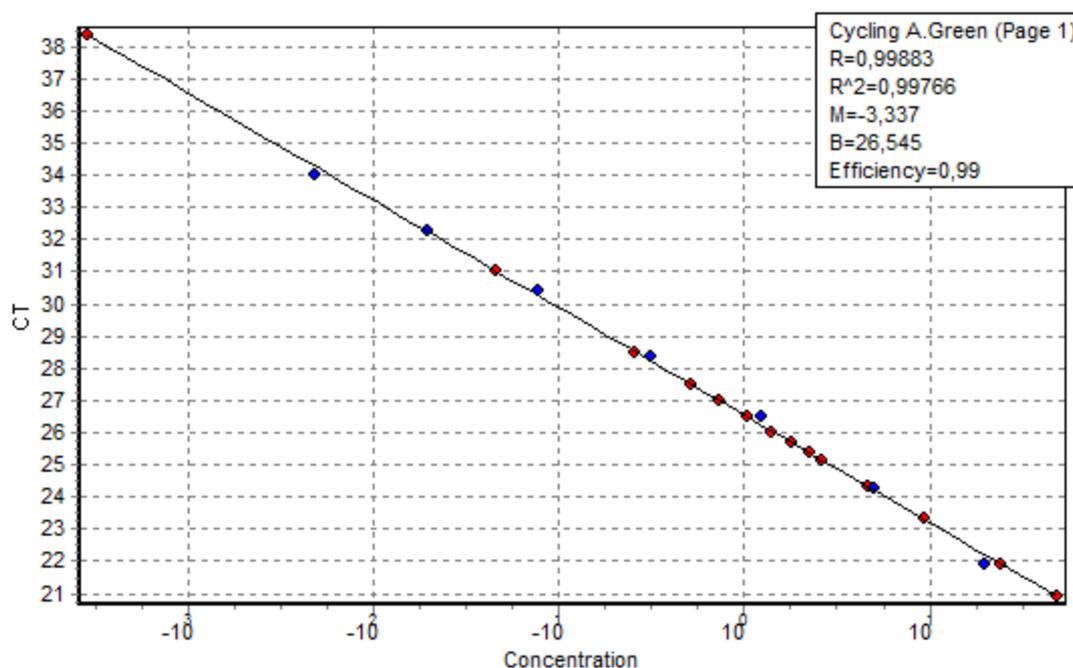


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de quantification de l'ADN des échantillons exposés à 90°C et 150°C (kit PrepFiler)

#### II.4. Sensibilité avec l'analyse des contrôles

Le contrôle positif permet de vérifier le bon fonctionnement des différents composants du kit et d'assurer qu'il n'y a pas d'amplification non spécifique. On considère qu'il y'a présence d'amplification non spécifique lorsque le Cq de ce contrôle est retardé de plus d'un cycle (Postollec *et al* , 2011). Ce qu'on n'observe pas dans le tableau ci-dessus (tableau XX ) , ou le Cq du témoin positif démarre bien avec la ligne de base.

Le contrôle négatif permet d'évaluer les contaminants produits lors de l'étape d'amplification, et d'après les résultats de notre plaque, le témoin négatif ne présente aucun signal détecté ce qui confirme l'absence de contaminants ou de dimères d'amorces.

Le contrôle négatif environnemental de l'extraction avec le kit prepfiler ainsi que celui avec le kit EZ1 ont permis d'évaluer le bruit de fond ou les contaminations dues à la préparation d'ADN (extraction d'ADN).

#### II.5. Interprétation des résultats de la concentration d'ADN des échantillons

L'analyse des concentrations d'ADN montre que la température et le type de support ont un effet direct sur la quantité d'ADN récupérée.

À 90°C avec le kit PrepFiler, le support nylon donne la concentration la plus élevée, suivi de l'écouvillon, puis papier, et enfin le coton qui présente une concentration très faible. Cette différence s'explique par la nature du support. Le nylon, qui est une fibre synthétique hydrophobe, n'absorbe pas totalement le sang, ce qui permet une récupération plus rapide de l'ADN, en particulier après une exposition modérée à la chaleur. L'écouvillon est conçu pour prélever et conserver l'ADN, ce qui justifie aussi sa bonne performance. En revanche, le coton retient fortement les cellules dans ses fibres ce qui entrave l'extraction d'ADN. Par ailleurs le Cq des inhibiteurs du coton a commencé avant le Cq de l'ADN d'intérêt ce qui a entravé son amplification. Suivi par le Cq du papier. Contrairement aux Cq du Nylon et de l'écouvillon d'où leurs concentrations élevées.

À 150°C, les concentrations diminuent pour tous les supports, car la chaleur commence à casser les brins d'ADN. Malgré cela, le coton montre une amélioration par rapport au résultat précédent ce qui confirme une libération plus facile de l'ADN avec l'augmentation de la chaleur et une amplification plus spécifique traduite avec un Cq tardif des inhibiteurs. À l'inverse, le nylon voit sa concentration chuter à cause du durcissement du plastique entravant la libération de l'ADN.

Enfin, à 300°C, pratiquement aucun signal de fluorescence n'a été détecté sur les supports extraits avec PrepFiler, ce qui montre que l'ADN est totalement dégradé à cette température. Le seul échantillon avec une très faible concentration est celui du papier extrait avec EZ1. Cela montre d'une part que le kit EZ1 est plus sensible que le kit Prepfiler, et d'autre part qu'il est possible que le papier est un bon support de conservation du sang et qu'il interfère moins à l'extraction d'ADN que les autres supports.

Les échantillons de références quand à eux ont montré que la chaleur n'est pas le seul facteur contraignant, la nature des supports interfère également avec l'extraction et la purification de l'ADN et ainsi avec sa concentration.

L'analyse de la quantification d'ADN réalisée à l'aide de l'automate Rotor-Gene Q a permis de visualiser les résultats sous forme de courbes de fluorescence :

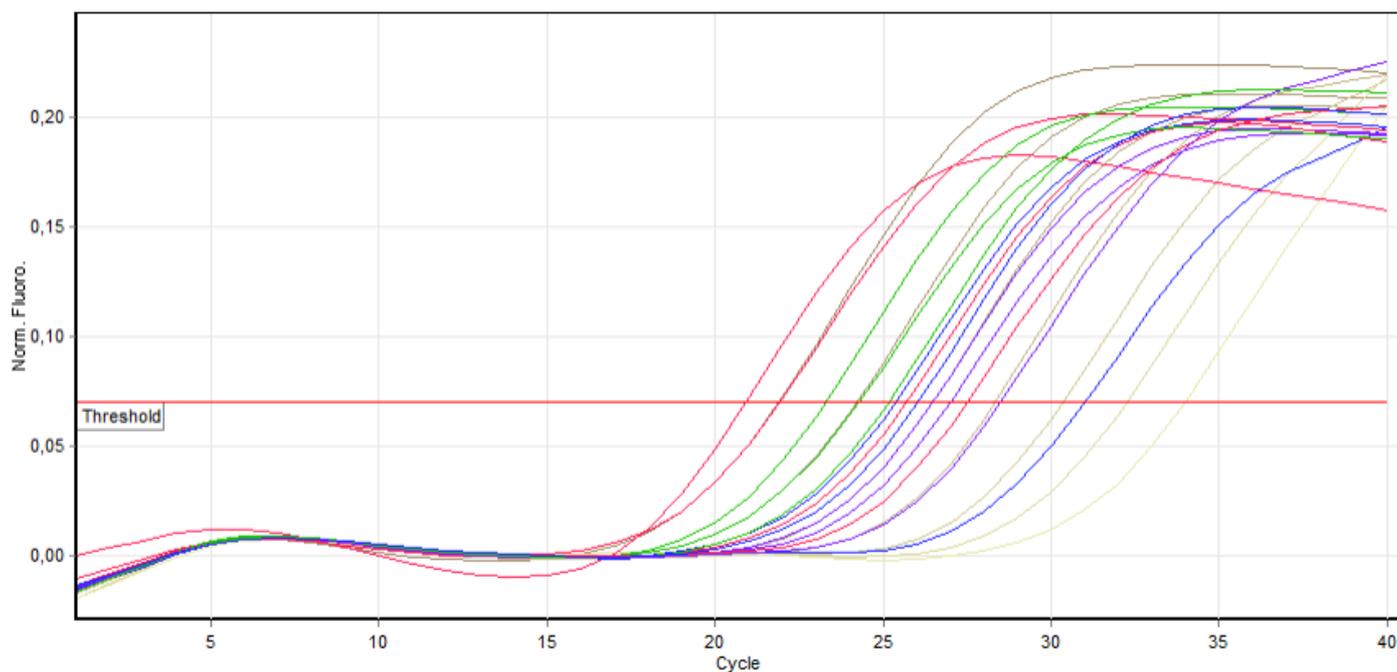


Figure 13 : Courbes d'amplification en temps réel des échantillons exposés à 90°C et 150°C (kit PrepFiler)

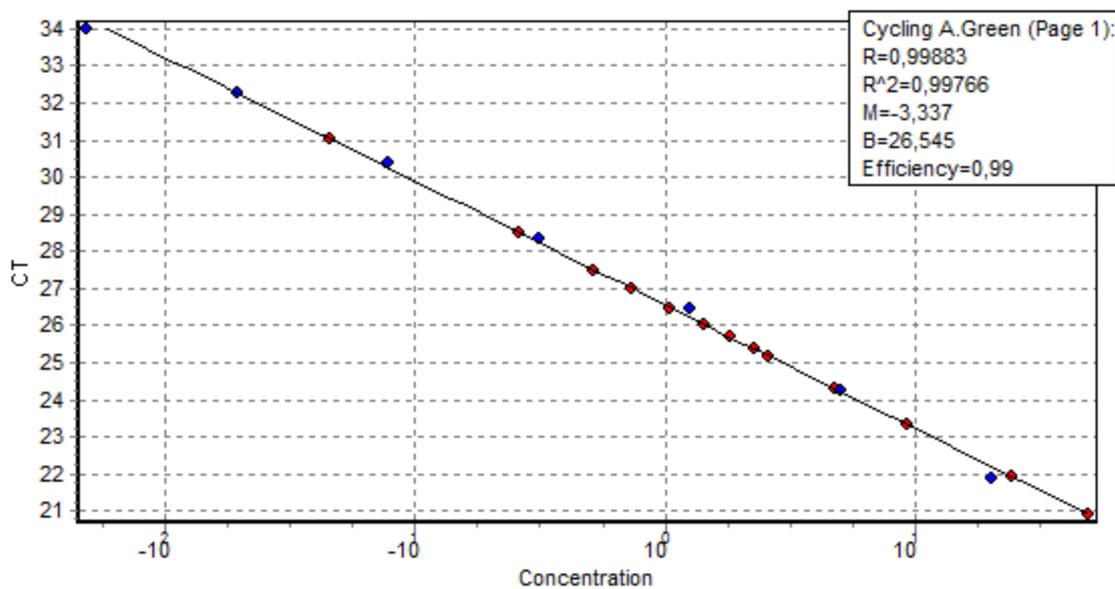
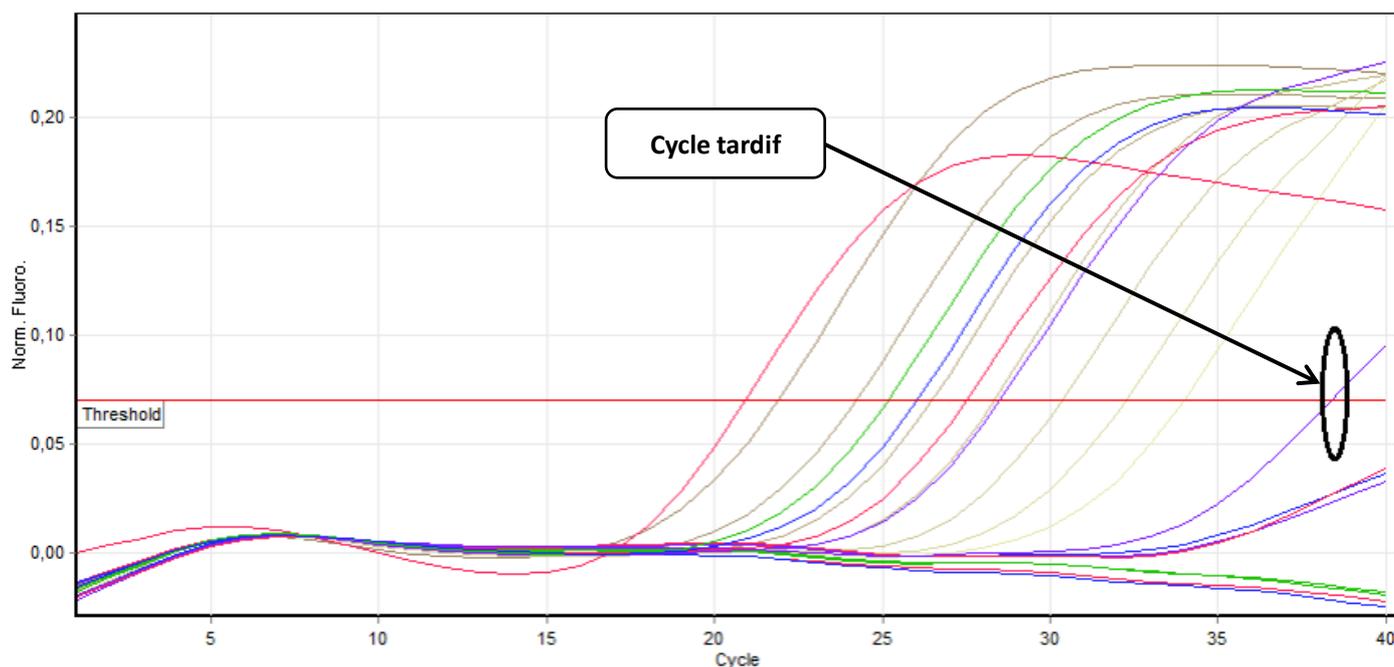


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de quantification d'ADN des échantillons exposés à 90°C et 150°C (kit PrepFiler)



**Figure 15 : Courbes d'amplification en temps réel des échantillons exposé à 300°C (kit PrepFiler et EZ1)**

On note selon les courbes de fluorescence plus il y'a de quantité d'ADN et plus le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour atteindre un nombre déterminé d'ADN amplifié sera réduit.

La PCR quantitative comporte plusieurs cycles de réactions enzymatiques et elle est donc plus sensible aux impuretés (protéines, phénol/chloroforme, sels, solvants chimiques,...). Ces perturbateurs peuvent également entraver la détection de la fluorescence.

Par ailleurs, on sait que l'usage qui sera fait de l'ADN et la nature du prélèvement conditionnent souvent le protocole de préparation utilisé. Néanmoins, le pré-requis à toute amplification, est que l'ADN utilisé comme matrice soit débarrassé d'inhibiteurs potentiels de la PCR.

Mais il n'y a pas que la qualité de l'ADN qui peut influencer le résultat d'amplification, la quantité d'ADN utilisée peut également influencer se résultat.

En effet une quantité insuffisante d'ADN ne permettant pas d'obtenir d'amplification, alors qu'une quantité trop importante d'ADN matriciel peut conduire à l'inhibition enzymatique par la présence de contaminants provenant de l'échantillon, des supports ou des réactifs utilisés donnant lieu à une amplification aspécifique.

L'intégrité et la pureté de la matrice d'ADN sont donc déterminantes en qPCR.

### III. Résultats de l'analyse des profils génétiques

Après la séparation des amplicons par le séquenceur ABI 3500xl, et l'analyse des données avec le logiciel GeneMapper, nous avons obtenu des profils génétiques (représentés dans les figures 16 -> 25 ).

Les profils génétiques se présentent sous forme d'un électrophorégramme comprenant une série de pics, chacun d'eux correspond à un allèle issu d'un marqueur bien déterminé mentionné au-dessus de chaque série de pics. Selon que l'individu soit homozygote ou hétérozygote pour un STR analysé, nous aurons un ou deux pics par locus.

L'échelle horizontale « l'échelle allélique » indique la taille des fragments d'ADN dans une plage appelée bin. Chaque pic est caractérisé en abscisse par sa position (qui dépend de la vitesse de migration donc de la taille) et en ordonnée par l'intensité relative de la fluorescence initiale exprimée en Unité de Fluorescence Relative RFU détectée par des fluorochromes. Parmi ces fluorochromes, le FAM™ donne des pics bleus, le VIC™ donne des pics verts, le NED™ qui donne des pics noirs, le TAZ™ donne des pics rouges et le SID™ donne des pics violets.

#### III.1. Les paramètres d'analyse

Cette procédure a pour but de fournir des lignes directrices pour l'interprétation des résultats d'ADN autosomiques amplifiés par le kit Globalfiler ; avec des paramètres empiriques bien définis par le laboratoire de la Police Scientifique et Technique, et qui consiste à vérifier un certain nombre de critères sur la migration électrophorétique, notamment :

- Vérification de l'allure générale du profil obtenu (hauteur des pics, seuil d'acceptabilité,...) ;
- Vérification du standard de taille pour chaque échantillon ;
- Vérification de la présence de tous les allèles du Ladder ainsi que l'allure des pics ;
- Vérification du control négatif, pour une éventuelle contamination ;
- Vérification du control positif contenu dans les kits de PCR utilisés ;
- Vérification des artefacts : filtrer les stutters, détecter les "**drop-in**", les "**pull-up**", etc. Car ces artefacts peuvent fausser l'interprétation du profil génétique.

Ce n'est qu'à l'issue de la validation de ces critères que le résultat peut être exploité et interprété.

#### III.2. Analyse des profils génétiques

On commence par vérifier le profil génétique du témoin négatif qui permet de vérifier la présence ou l'absence d'ADN exogène ce qui exclue toute contamination lors du processus de l'amplification.

On poursuit avec le témoin positif qui démontre si le profil est complet et conforme au kit et si les réactifs utilisés sont de bonnes qualités ce qui confirme le bon déroulement du processus d'amplification.

Enfin on passe aux Ladder pour vérifier s'il y a eu une bonne migration, sans décalage de lecture car l'identification des allèles se fait par comparaison avec cet étalon qui contient tous les allèles fréquents d'une population.

Les profils génétiques obtenus à partir du sang exposé à différentes températures ont été comparés aux profils de référence. L'analyse des 24 loci, d'une personne de sexe féminin montre une perte d'hétérozygotie ce qui facilite la vérification de l'allure générale du profil avec l'équilibre inter-locus et le ratio PHR (Peak Height Ratio) et ainsi le suivi d'une éventuelle altération due à la chaleur.

Par contre, on constate que pour certains marqueurs comme le TH01, le nombre de répétition sur l'un de ses deux chromosomes 11 est étiqueté 9.3 cela veut dire que l'allèle correspondant est composé de 9 répétitions du STR plus 3 nucléotides. Même chose pour le D19S433 et le SE33. Ce type de polymorphisme est appelé micro-variant, car les allèles diffèrent l'un de l'autre par des tailles ne correspondant pas à une unité répétitive complète.

L'analyse des microvariants dans les profils génétiques quant à elle constitue un défi particulier lorsqu'on travaille avec de l'ADN dégradé. Ces derniers, bien qu'ils soient très utiles pour la discrimination génétique, peuvent être partiellement ou totalement perdus dans un échantillon altéré.

Les profils de référence pour les quatre types de supports présentent des saturations avec la présence de plusieurs pull-up. L'origine de ces artefacts est due à des pics très hauts ce qui a entraîné une interférence optique à cause d'une grande quantité d'ADN injecté ou pas assez dilué.

Grâce à la correction du logiciel GeneMapper l'utilisation de ces profils a été possible comme base de référence aux échantillons exposés à la chaleur.

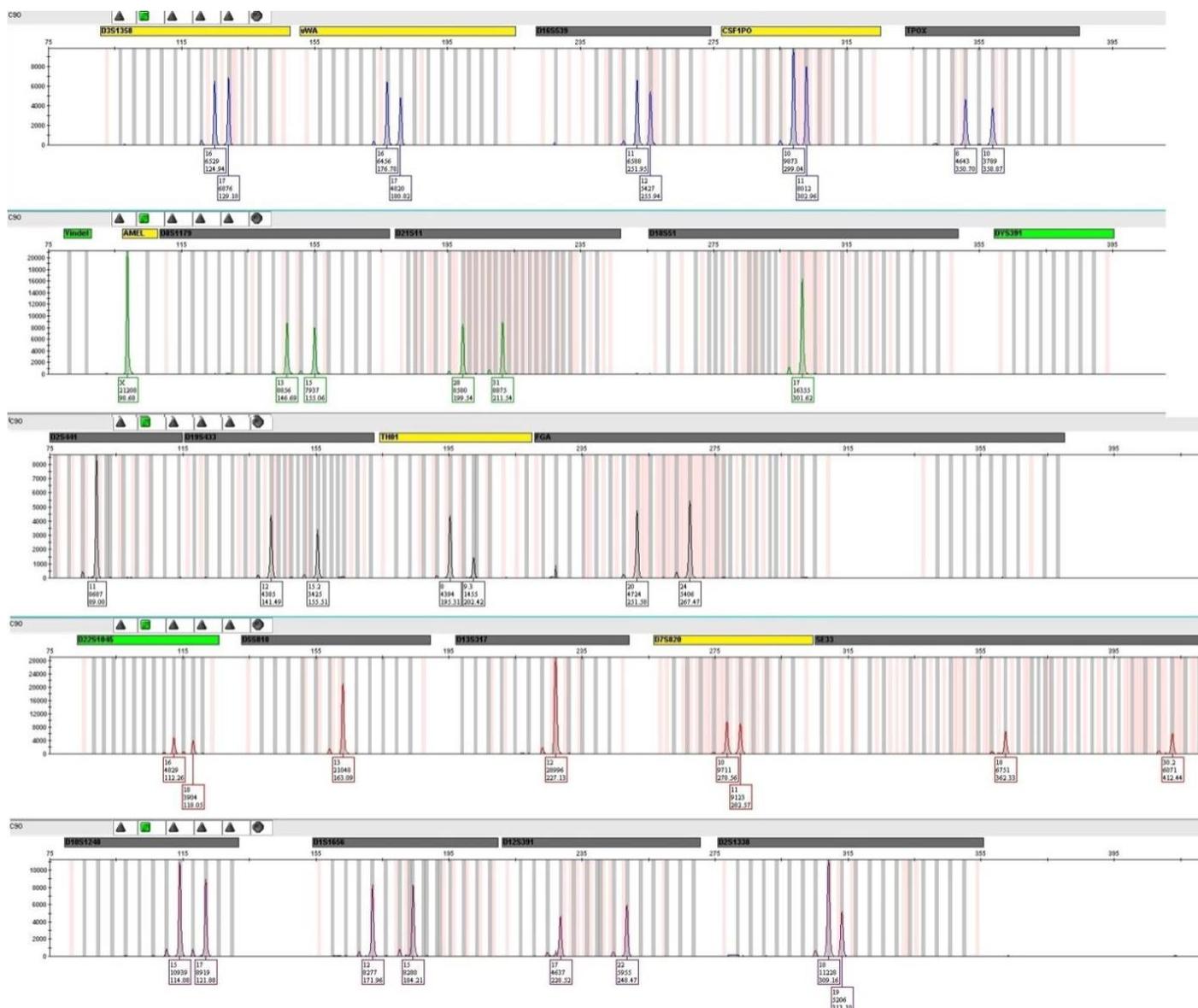


Figure 16 : Profil génétique du coton après exposition à 90°C

L'analyse du profil génétique obtenu à partir de l'échantillon sanguin sur le coton exposé à une température de 90°C pendant 30 minutes a révélé un profil complet et aucune perte d'allèle n'a été observée, ce qui confirme les tests préliminaires que lors d'une température plus ou moins modérée il n'y a pas de dégradation significative de l'ADN. Cela indique que l'ADN a pu être correctement extrait et amplifié malgré l'exposition thermique.

La présence d'hétérozygotes dans le profil confirme l'intégrité du matériel génétique, montrant que les deux allèles de plusieurs loci ont été conservés et amplifiés. Toutefois, une imbalance entre les pics de deux marqueurs (TH01 et D2S1338) a été observée ainsi qu'une perte modérée des loci longs, ce qui pourrait suggérer une altération partielle et modérée de la qualité de l'ADN qui peut être attribuée à la présence d'inhibiteurs du support. Cela peut également s'expliquer par des dommages légers de la molécule d'ADN induits par la chaleur, affectant de manière sélective certains fragments d'ADN.

L'analyse du profil génétique obtenu à partir de l'échantillon sanguin sur le nylon exposé à une température de 90 °C pendant 30 minutes a révélé également un profil complet et aucune perte d'allèle n'a été observée, ce qui confirme également les tests préliminaires.

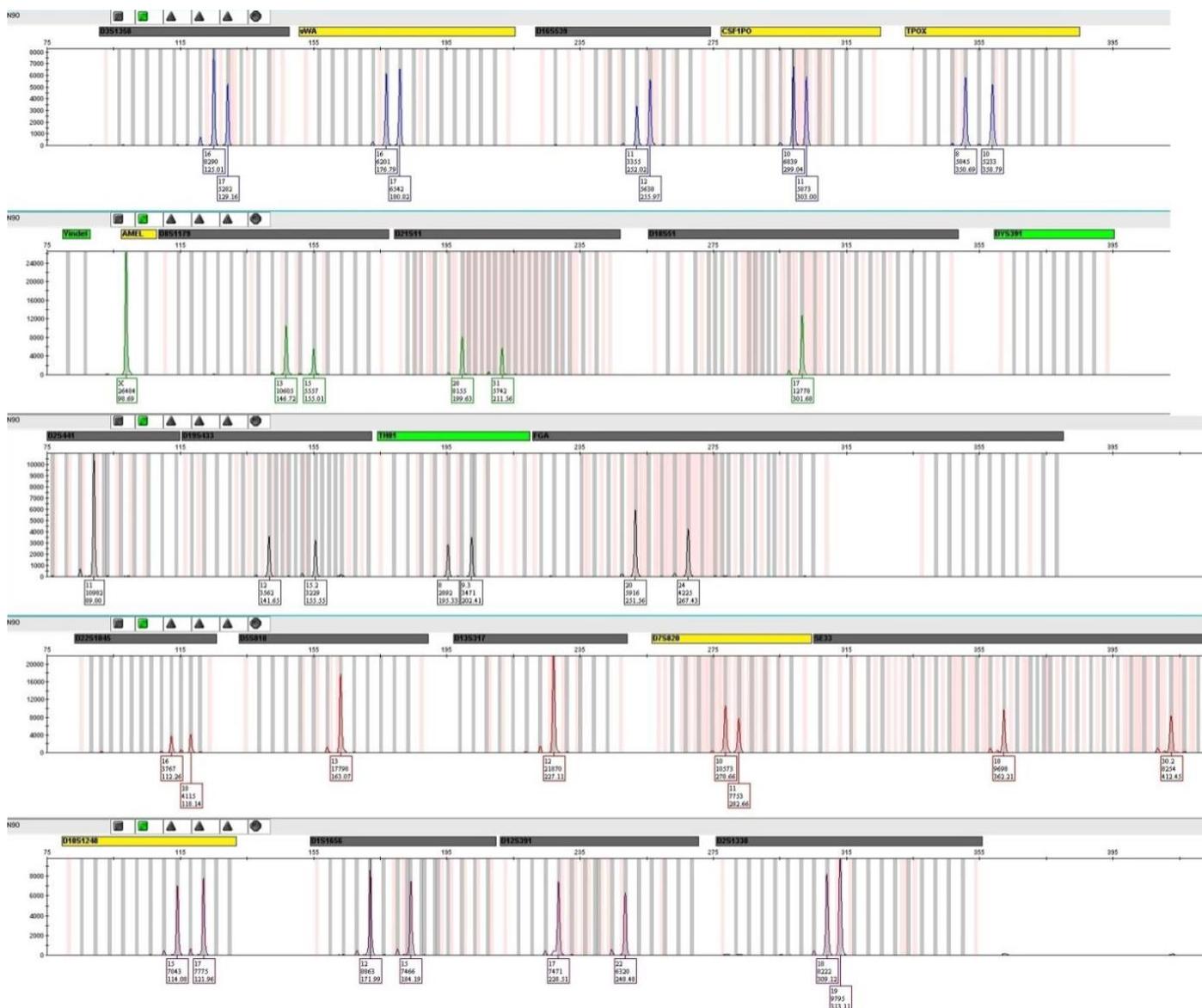


Figure 17 : Profil génétique du nylon après exposition à 90°C

La présence d'hétérozygotes dans le profil confirme l'intégrité du matériel génétique, montrant également que les deux allèles de plusieurs loci ont été conservés et amplifiés. Toutefois, une imbalance entre les pics de deux marqueurs (D16S539 et D8S1179) a été observée ainsi qu'une perte modérée des loci longs, ce qui pourrait suggérer une altération partielle et modérée de la qualité de l'ADN qui peut être attribuée à la présence d'inhibiteurs du support. Cela peut également s'expliquer par des dommages légers de la molécule d'ADN induits par la chaleur, affectant de manière sélective certains fragments d'ADN.





L'analyse du profil génétique obtenu à partir de l'échantillon sanguin sur le coton exposé à une température de 150°C pendant 30 minutes a révélé un profil complet et aucune perte d'allèle n'a été observée, ce qui confirme les tests préliminaires que même à une température plus ou moins élevée il n'y a pas de dégradation totale de l'ADN. Cela indique que l'ADN a pu être correctement extrait et amplifié malgré l'exposition thermique.

La présence d'hétérozygotes dans le profil confirme l'intégrité du matériel génétique, montrant que les deux allèles de plusieurs loci ont été conservés et amplifiés. Toutefois, une imbalance entre les pics d'un marqueur (SE33) a été observée ainsi qu'une perte prononcée des loci longs, ce qui pourrait suggérer une altération partielle de la qualité de l'ADN ou une amplification inégale et préférentielle de certains allèles qui peut être attribuée à la présence d'inhibiteurs du support ou qui peut être expliquée par des dommages induits par la chaleur, affectant de manière sélective les fragments longs d'ADN.

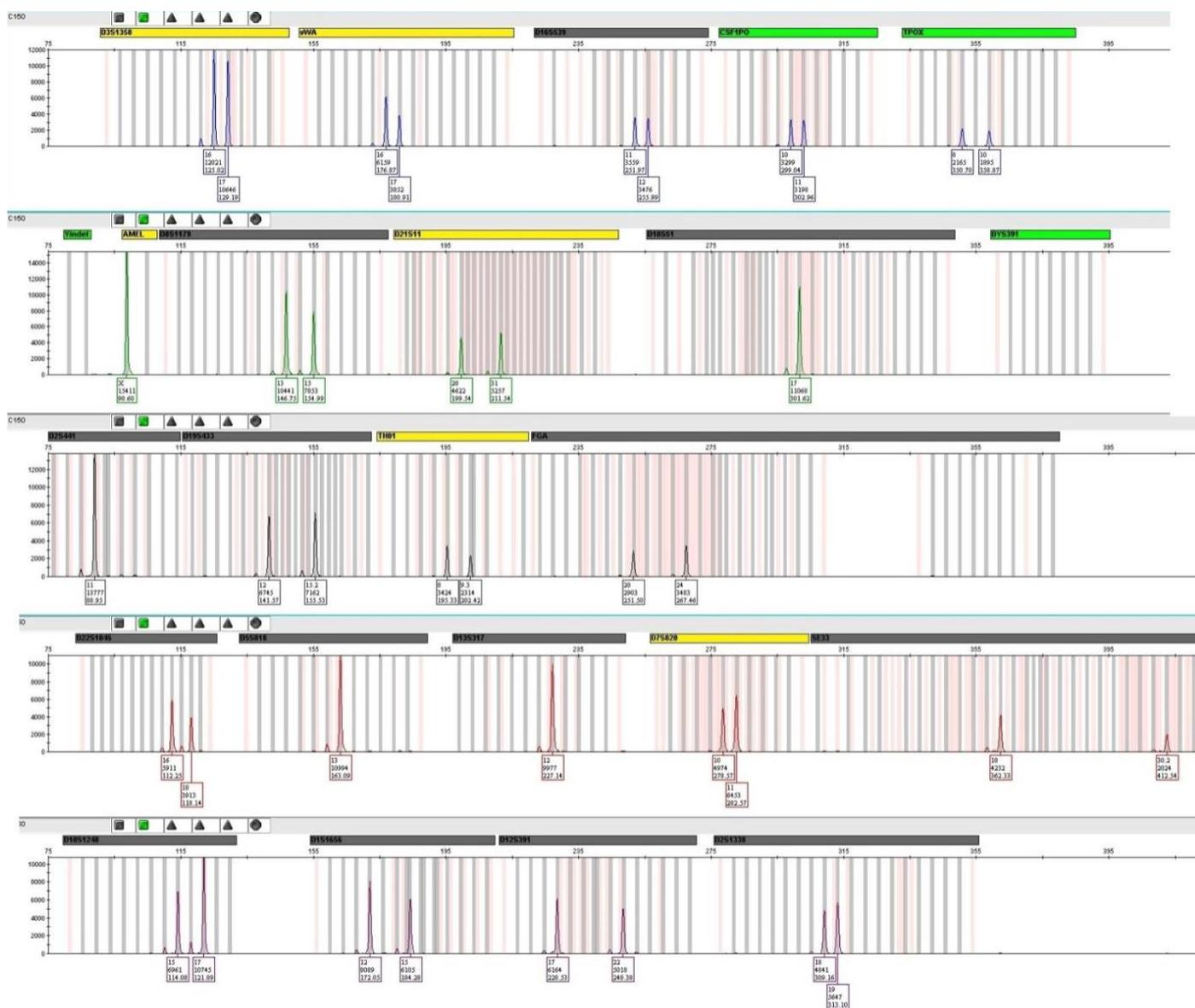


Figure 20 : Profil génétique du coton après exposition à 150°C

L'analyse du profil génétique obtenu à partir de l'échantillon sanguin sur le nylon exposé à une température de 150°C pendant 30 minutes a révélé un profil complet et aucune perte d'allèle n'a été observée, ce qui confirme les tests préliminaires que même à une température plus ou moins élevée il n'y a pas de dégradation totale de l'ADN. Cela indique que l'ADN a pu être correctement extrait et amplifié malgré l'exposition thermique.

La présence d'hétérozygotes dans le profil confirme l'intégrité du matériel génétique, montrant que les deux allèles de plusieurs loci ont été conservés et amplifiés. Par contre aucune imbalance entre les pics n'a été détectée mais on note une perte prononcée des loci longs, ce qui pourrait suggérer une altération partielle de la qualité de l'ADN ou une amplification inégale et préférentielle de certains allèles qui peut être attribuée à des dommages induits par la chaleur, affectant de manière sélective les fragments longs d'ADN.

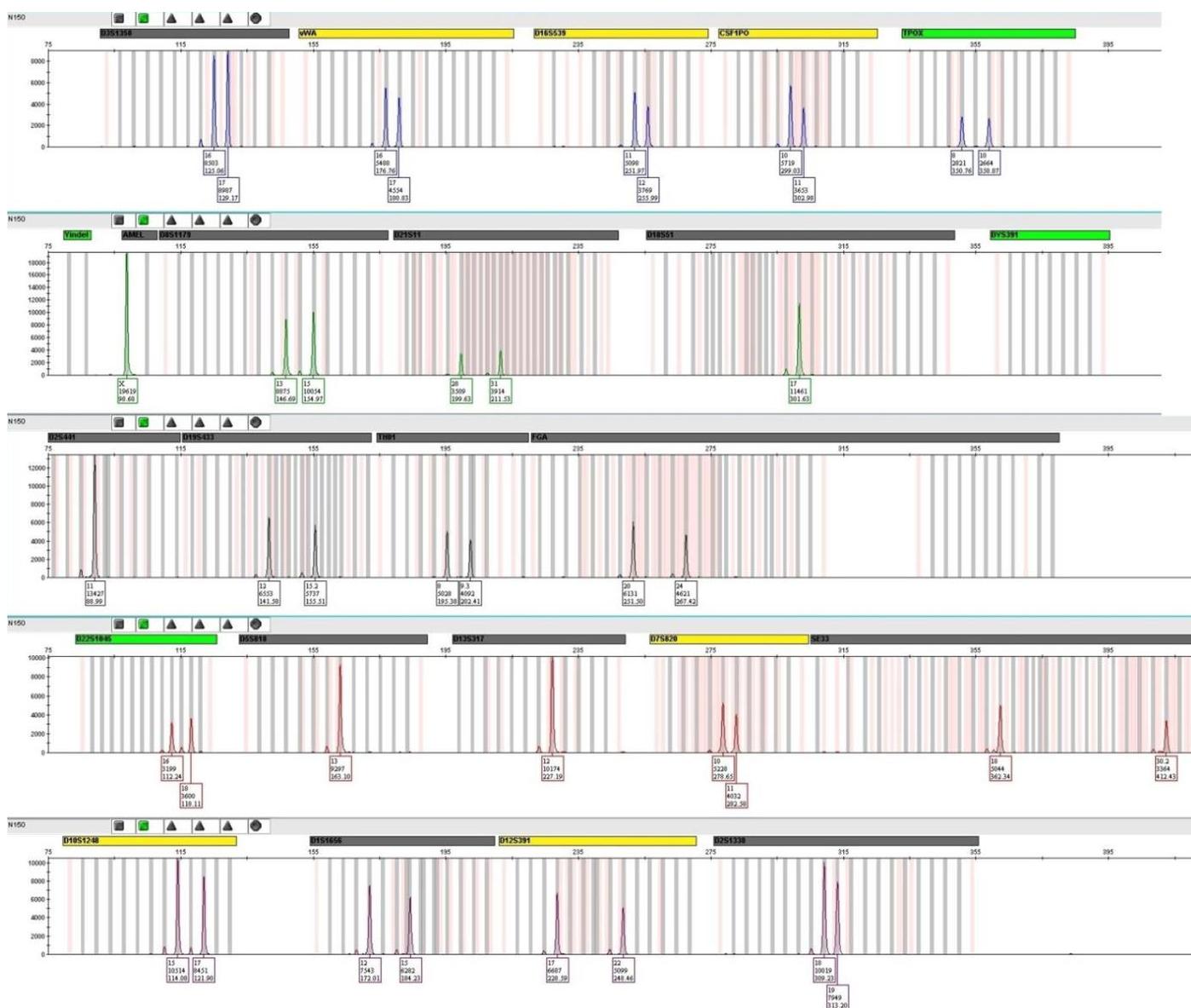


Figure 21 : Profil génétique du nylon après exposition à 150°C

L'analyse du profil génétique obtenu à partir de l'échantillon sanguin sur le papier exposé à une température de 150°C pendant 30 minutes a révélé un profil complet et aucune perte d'allèle n'a été observée, ce qui confirme les tests préliminaires que même à une température plus ou moins élevée il n'y a pas de dégradation totale de l'ADN. Cela indique que l'ADN a pu être correctement extrait et amplifié malgré l'exposition thermique.

La présence d'hétérozygotes dans le profil confirme l'intégrité du matériel génétique, montrant que les deux allèles de plusieurs loci ont été conservés et amplifiés. Toutefois, une imbalance entre les pics d'un marqueur (CSF1PO) a été observée ainsi qu'une perte très prononcée des loci longs, ce qui pourrait suggérer une altération partielle de la qualité de l'ADN ou une amplification inégale et préférentielle de certains allèles qui peut être attribuée à la présence d'inhibiteurs du support ou qui peut être expliquée par plusieurs dommages induits par la chaleur, affectant de manière sélective plusieurs fragments longs d'ADN.

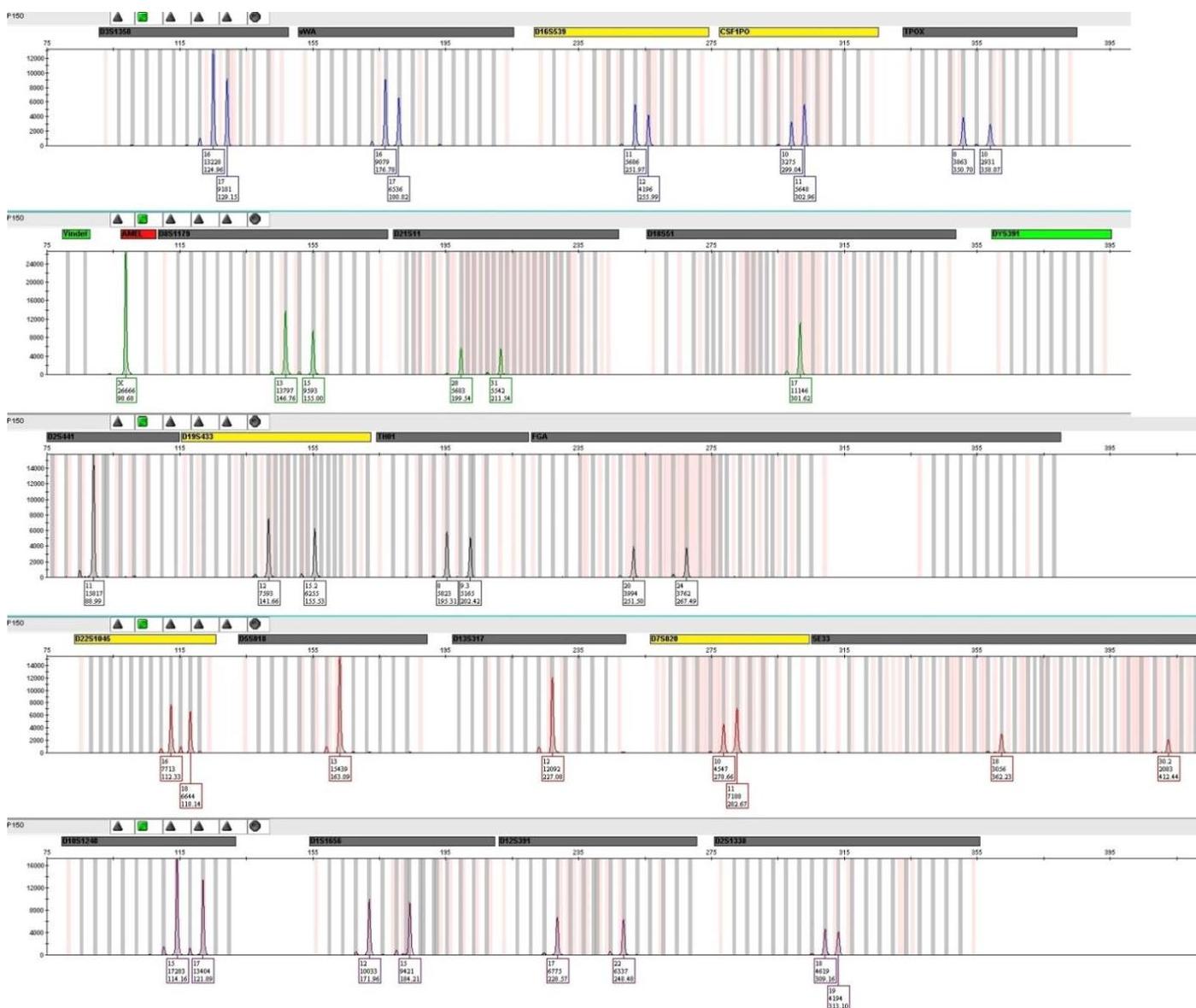


Figure 22 : Profil génétique du papier après exposition à 150°C

L'analyse du profil génétique obtenu à partir de l'échantillon sanguin sur l'écouvillon exposé à une température de 150°C pendant 30 minutes a révélé un profil complet et saturant avec la présence de plusieurs artéfacts (pull-up un bruitage stochastique et drop-in microvariant due à une mauvaise résolution) mais aucune perte d'allèle n'a été observée, ce qui confirme les tests préliminaires que même à une température plus ou moins élevée il n'y a pas de dégradation totale de l'ADN. Cela indique que l'ADN a pu être correctement extrait et amplifié malgré l'exposition thermique.

La présence d'hétérozygotes dans le profil confirme l'intégrité du matériel génétique, montrant que les deux allèles de plusieurs loci ont été conservés et amplifiés. Toutefois, une imbalance entre les pics d'un marqueur (D2S1338) a été observée ainsi qu'une perte très prononcée des loci longs, ce qui pourrait suggérer une altération partielle de la qualité de l'ADN ou une amplification inégale et préférentielle de certains allèles qui peut être attribuée à la présence d'inhibiteurs du support ou qui peut être expliquée par plusieurs dommages induits par la chaleur, affectant de manière sélective plusieurs fragments longs d'ADN.

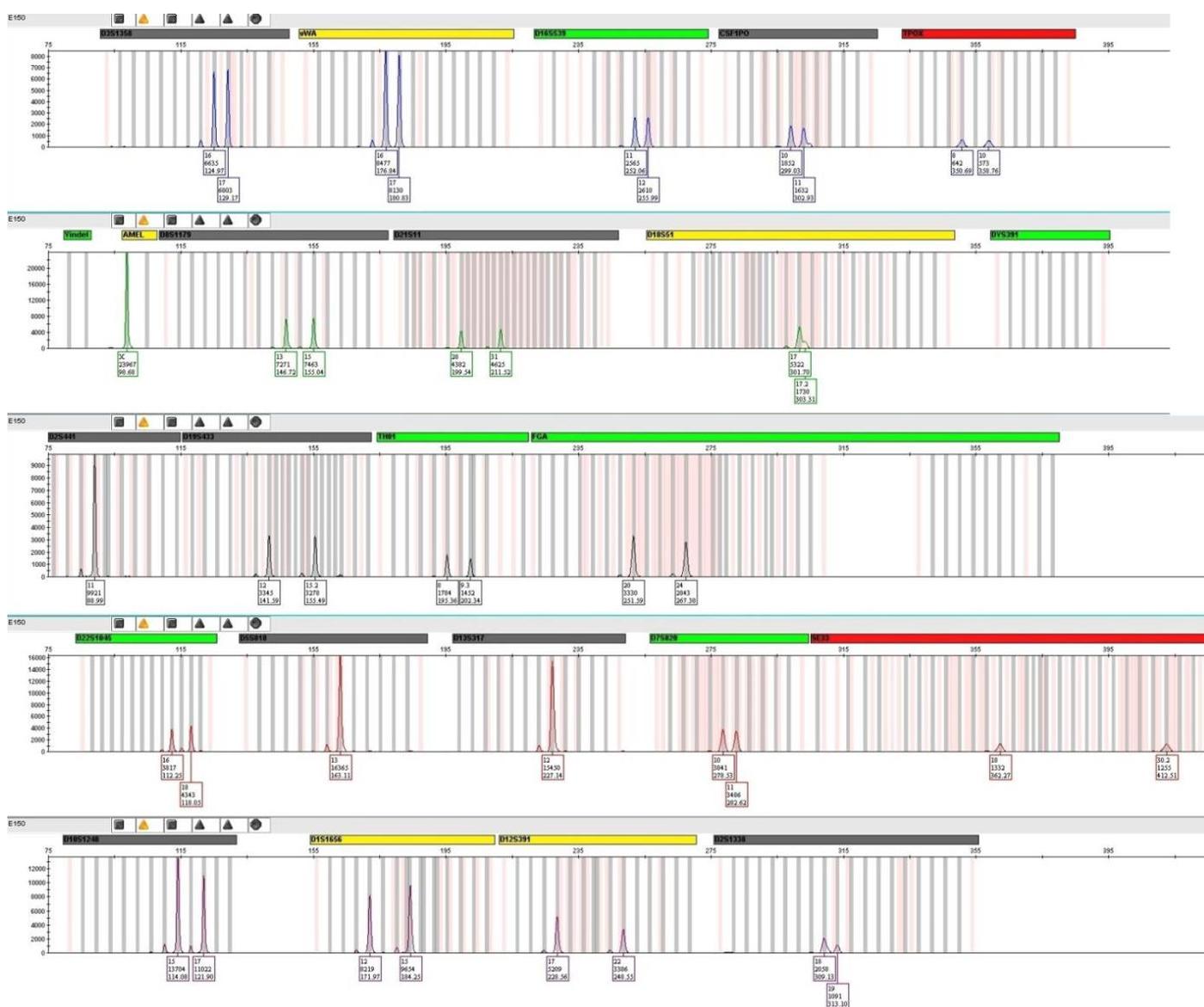


Figure 23 : Profil génétique de l'écouvillon après exposition à 150°C

L'analyse du profil génétique obtenu à partir de l'échantillon sanguin sur le papier exposé à une température de 300°C pendant 20 minutes a révélé un profil partiel inexploitable avec la présence de plusieurs artéfacts due à un bruitage stochastique avec une perte d'allèle (non amplifiés ou en-dessous du seuil de détection), ce qui confirme les tests préliminaires qu'à une température trop élevée il y'a dégradation presque totale de l'ADN.

Certains loci sont manquants ou incomplets présentant plusieurs stutters, des drop-in notamment au niveau des loci D5S818, D7S820, D1S1656 et D2S1338, et des drop-out dans la majorité des loci. Cela témoigne d'une mauvaise intégrité du matériel génétique. Ces observations suggèrent que l'exposition à cette température a induit une dégradation majeure qui a affecté la molécule d'ADN. Créant des distorsions dans l'interprétation du profil.

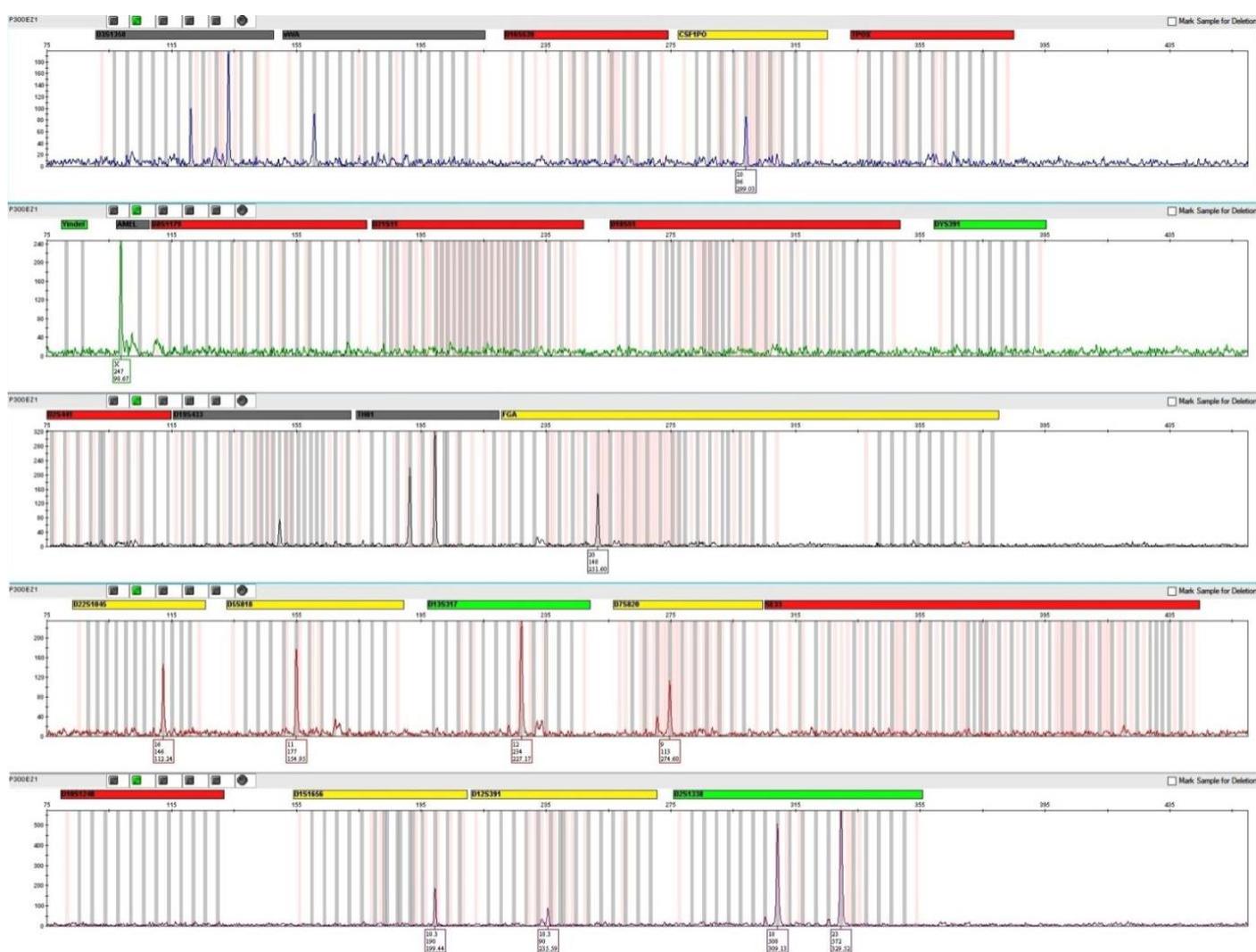


Figure 24 : Profil génétique du papier après exposition à 300°C, extrait avec EZ1

#### IV. Application réelle – Étude de cas : profil ADN après exposition thermique

Dans le cadre d'une affaire judiciaire, des restes humains ont été retrouvés dans les décombres d'un incendie, dans une scène de crime au niveau du domicile du suspect, l'échantillon prélevé a été analysé après exposition thermique estimée au moment de l'événement atteignant environ 150°C et 200 °C selon les données de l'enquête.

Note : Les éléments contextuels (lieu, type de scène, nature du sinistre) ont été modifiés dans le but de préserver la confidentialité de l'affaire et l'anonymat des personnes impliquées afin d'éviter toute violation du secret professionnel et judiciaire. Les données scientifiques, en revanche, sont représentatives de la situation réelle et conservent donc l'intégrité scientifique nécessaire à l'analyse.

Les analyses réalisées sur ces restes humains exposés à la chaleur sont énumérés ci-dessous :

- Extraction ADN par méthode magnétique automatisée (EZ1).
- Quantification par qPCR avec l'obtention d'une faible concentration (0,16 ng/μl).
- Amplification STR avec le kit GlobalFiler™ (ThermoFisher).

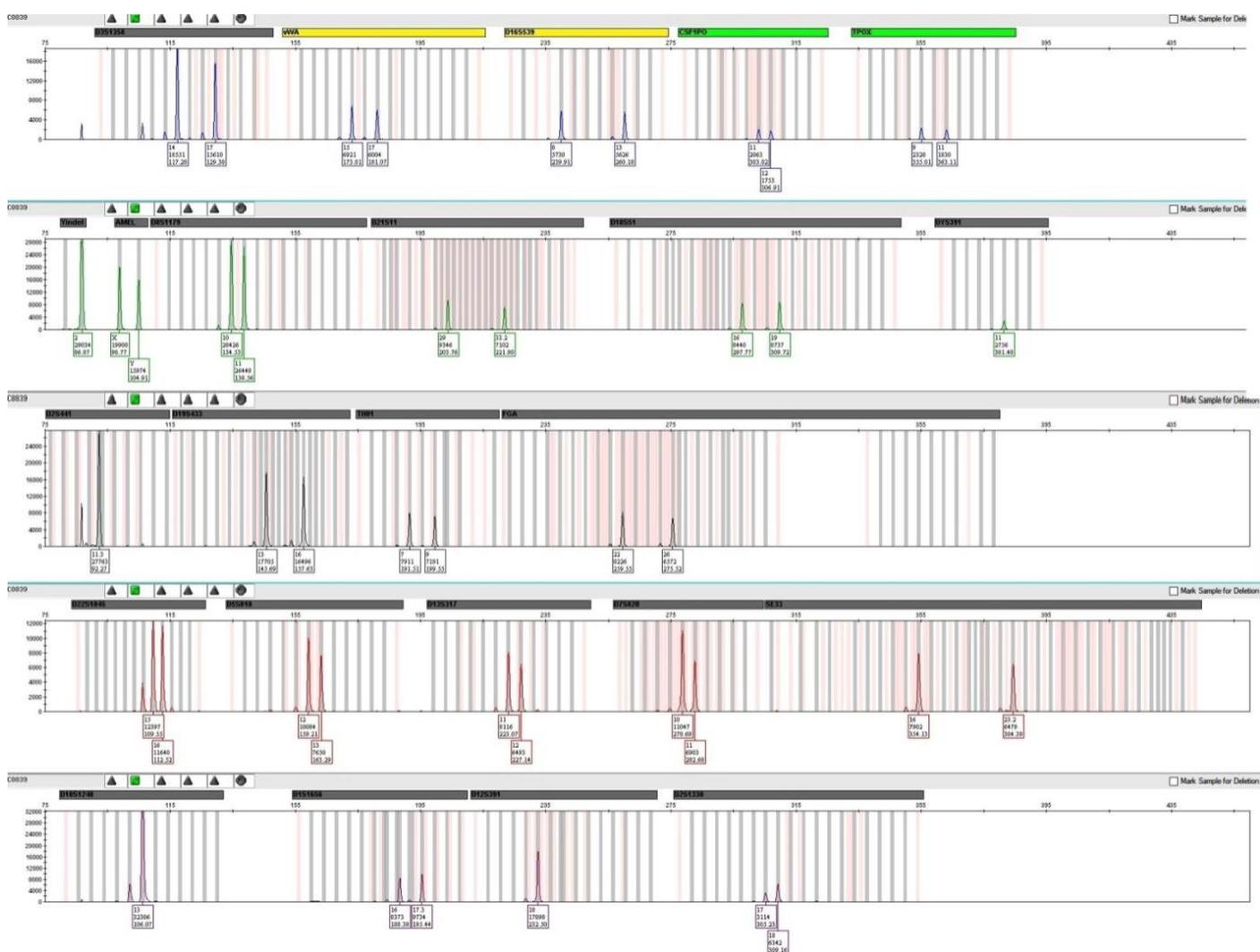


Figure 25 : Profil génétique des restes humains exposés à une température estimée entre 150 et 200°C

Les résultats montrent un profil complet sans perte d'allèle. La présence d'hétérozygotes dans le profil confirme l'intégrité du matériel génétique, montrant que les deux allèles de plusieurs loci ont été conservés et amplifiés. Toutefois, une imbalance entre les pics d'un marqueur (D2S1338) a été observée ainsi qu'une perte très prononcée des loci longs.

Ces résultats sont cohérents avec nos observations expérimentales à 150 °C pendant 30 min. Avec dégradation des fragments longs et présence d'imbalance des hétérozygoties.

Cette affaire, bien que modifiée pour des raisons éthiques, illustre bien l'impact de la chaleur sur l'amplification des loci longs.

Pour la suite de l'affaire, d'autres échantillons de morceaux osseux qui ont été retrouvés dans une autre scène de crime, ont été analysés et un profil génétique d'un morceau de fémur a montré une concordance au niveau du CODIS avec le profil génétique obtenu des restes humains incendiés.

L'identification de la victime a été faite grâce à la recherche de filiation avec comparaison du profil génétique des parents de personnes disparues. Le résultat de cette analyse est représenté dans le tableau ci-dessous.

**Tableau XXI : du partage d'allèle pour la recherche de filiation et identification de cadavre**

24 Locus Globalfiler	Allèles de la victime (fémur et restes humains)		Allèles du Père présumé		Allèles de la Mère présumée	
<b>D3S1358</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	16	<b>17</b>	<b>14</b>	16
<b>Vwa</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	18	<b>15</b>	17
<b>D16S539</b>	<b>8</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	11	12	<b>13</b>
<b>CSF1PO</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	10	<b>11</b>	<b>12</b>	14
<b>TPOX</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	8	<b>9</b>	<b>11</b>	
<b>Yindel</b>	2		2		-	
<b>AMEL</b>	<b>X</b>	<b>Y</b>	<b>X</b>	<b>Y</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>D8S1179</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	15	<b>10</b>	15
<b>D21S11</b>	<b>29</b>	<b>33.2</b>	29.2	<b>33.2</b>	28	<b>29</b>
<b>D18S51</b>	<b>16</b>	<b>19</b>	12	<b>19</b>	13	<b>16</b>
<b>DYS391</b>	<b>11</b>		<b>11</b>		-	
<b>D2S441</b>	<b>11.3</b>		11	<b>11.3</b>	<b>11.3</b>	14
<b>D19S433</b>	<b>13</b>	<b>16</b>	<b>13</b>		15.2	<b>16</b>
<b>TH01</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	9	<b>9</b>	
<b>FGA</b>	<b>22</b>	<b>26</b>	<b>22</b>		25	<b>26</b>
<b>D22S1045</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>16</b>		<b>15</b>	
<b>D5S818</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>12</b>		<b>13</b>	
<b>D13S317</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	13	10	<b>12</b>
<b>D7S820</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>10</b>		10	<b>11</b>
<b>SE33</b>	<b>16</b>	<b>23.2</b>	<b>23.2</b>	30.2	<b>16</b>	19
<b>D10S1248</b>	<b>13</b>		<b>13</b>		<b>13</b>	14
<b>D1S1656</b>	<b>16</b>	<b>17.3</b>	11	<b>17.3</b>	15	<b>16</b>
<b>D12S391</b>	<b>18</b>		<b>18</b>	20	<b>18</b>	23
<b>D2S1338</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>18</b>		16	<b>17</b>

## V. Discussion Générale

Le présent travail vise à évaluer l'impact de l'exposition thermique sur la stabilité de l'ADN, en expérimentant trois niveaux de températures (90°C, 150°C et 300°C), représentatifs de différents contextes médico-légaux (chaleur prolongée, incendie domestique, combustion complète).

Une altération physico-chimique due à une température comprise entre 90°C et 150°C sur un échantillon sanguin pendant 30 minutes, conserve l'activité peroxydasique de l'hémoglobine et les épitopes antigéniques observés avec les tests d'orientation et de confirmation du sang. Pourtant, cette altération provoque la cassure des liaisons phosphodiester de la molécule d'ADN, ce qui rend cette dernière plus fragmentée, cette fragmentation est observée avec l'analyse des profils génétiques.

Les résultats expérimentaux obtenus confirment une dégradation progressive et sélective de l'ADN, selon l'intensité thermique influençant directement la qualité des profils génétiques obtenus :

A 90°C l'ADN reste intact avec l'obtention d'un profil complet dans les différents supports (coton, nylon, papier et écouvillon), une légère baisse de RFU avec une imbalance des hétérozygoties dans certains supports (coton et nylon), mais sans aucune perte de loci ;

En revanche à 150°C, il y a un début visible de dégradation avec l'obtention de profils complets mais plus déséquilibrés en balance d'hétérozygotie dans les différents supports (coton, nylon, papier et écouvillon), avec une perte prononcée en loci longs, présence d'artéfacts type pull-up et stutters plus marqués voir drop-in microvariant qui ont été observés.

Ce qui a été démontré dans l'affaire d'identification de restes humains incendiés, un profil complet a pu être exploité, malgré la dégradation du scellé, ce qui soutient l'hypothèse selon laquelle la chaleur entraîne une perte préférentielle des loci longs.

A 300°C avec le support papier, l'ADN est très dégradé avec l'obtention d'un profil partiel inexploitable, avec une perte des fragments longs. Cet ADN dégradé est également plus sensible aux contaminations.

L'usage de profils de référence non exposés à la chaleur ont permis de confirmer la perte sélective de loci des profils génétiques des échantillons expérimentaux sur les quatre supports.

Tout l'enjeu d'une bonne analyse génétique en criminalistique est de déterminer la quantité d'ADN présente dans un extractum pour effectuer la réaction PCR et avoir un profil exploitable (Alonso *et al* , 2004). Une déviation de cette quantité peut altérer la qualité des profils génétiques générés menant ainsi à une amplification déséquilibrée, en raison de fluctuations stochastiques, surtout lors de la présence d'une quantité minimale d'ADN (Swango *et al* , 2006) .

Nous avons obtenu un tracé similaire avec le cas du profil partiel obtenu par l'analyse de l'échantillon sanguin sur le papier exposé à 300°C pendant 20 minutes, qui est le résultat d'une très faible quantité de produits de PCR obtenue, donnant lors de son passage par la camera CCD des signaux à une intensité très faible, situés pour la plupart des marqueurs dans la zone stochastique et sous le seuil d'amplitude des pics.

Quant à la sous-estimation d'une quantité d'ADN, donnant la notion de saturation de profil génétique, ou saturation du détecteur, qui se produit lorsque la quantité de fluorescence générée par un échantillon dépasse la capacité de détection linéaire du système d'analyse capillaire ABI 3500.

Cette saturation a été observée notamment avec les profils références des quatre supports, et détectée avec une hauteur des pics très élevée entraînant une interférence optique, et l'abondance des artéfacts tels que les stutters, les pull-up et même les doubles pics ou pics tronqués. Néanmoins ces profils restent tout à fait exploitables grâce à l'utilisation du Logiciel GeneMapper.

Nos résultats sont conformes aux observations des chercheurs comme S. Lund et al et A. Barbaro et al (Lund et Dissing , 2003 ) (Barbaro et Cormaci , 2008) , qui indiquent que la dégradation commence entre 120 et 150°C. Les travaux de D. Lazano-Peral et al confirment que des expositions à 150°C pendant 30 minutes entraînent une perte significative de loci longs et la sélectivité des loci retrouvés confirme la fragilité des fragments longs (Lazano-Peral *et al* , 2021) .

D'autres études ont montré qu'au-delà de 250-300°C, seul l'ADN mitochondrial peut être analysé (Butler *et al* , 2003) .

Néanmoins, l'étude ne démontre pas l'effet de la durée d'exposition prolongée à différents intervalles, ni même à combien de degrés on observe une perte d'un locus, une analyse dans des durées variables et des températures progressives étalées entre 150°C et 300°C aurait pu nous fournir plus de réponses et précisions.

# **Chapitre IV : Conclusion**

Au terme de ce mémoire dédié à l'impact de la chaleur sur l'intégrité de l'ADN, il est désormais possible de dresser un bilan clair des observations et de leurs implications.

Cette étude souligne l'importance cruciale d'une compréhension approfondie de l'impact de l'exposition thermique, qui affecte la conservation de l'ADN sans affecter les propriétés des traces de sang à une température comprise entre 90°C et 150°C, ce qui n'interfère pas avec son analyse en criminalistique.

Cependant, l'ADN exposé à 150°C subit quand même une dégradation suffisante pour altérer l'amplification de plusieurs loci STR, en particulier les plus longs.

Par ailleurs, l'ADN exposé à 300°C subit des altérations irréversibles affectant la conservation de l'ADN et les propriétés physico-chimiques des traces de sang, compromettant ainsi son analyse en donnant un profil génétique inexploitable.

Ces résultats confirment la vulnérabilité progressive de l'ADN en fonction de la température, en particulier pour les loci de longs fragments. Ils soulignent l'intérêt d'adapter les protocoles d'analyse selon les conditions d'exposition thermique des échantillons, en favorisant des marqueurs courts ou résistants en cas de dégradation avancée.

L'inclusion d'une affaire réelle a permis de confirmer et d'illustrer ces analyses empiriques dans un contexte judiciaire. Cela a apporté de la crédibilité, et a montré l'application pratique de nos résultats, en ancrant notre étude dans la réalité médico-légale et en démontrant que les expériences obtenues en laboratoire peuvent prédire le comportement de l'ADN en condition réelle.

Notre travail apporte donc une valeur ajoutée en contexte médico-légal, notamment dans le cas d'identification post-incendie ou sinistres thermiques. En effet, comprendre la limite de détection de l'ADN selon la température permet d'éviter de fausses interprétations (exemple faux homozygotes dues à des drop-outs) et d'orienter l'analyse vers des protocoles plus efficaces.

Notre étude a également permis de renforcer l'importance d'adapter les méthodes d'analyse, notamment en utilisant le Kit PCR minifiler ou Yfiler qui ciblent de courtes régions plus faciles à amplifier ou le Kit qPCR qui donnent une information sur l'Indice de dégradation de l'ADN.

Ainsi que l'utilisation de logiciels d'aide d'interprétation avec un cadre probabiliste de la modélisation des drop-outs et des profils partiels.

Bien que notre résultante soit cohérente et reproductible, certaines limites doivent être prises en compte. D'abord, les conditions thermiques sont standardisées (étuve à température contrôlée) ne reflète pas parfaitement les conditions chaotiques observées en contexte réel (incendie, explosion, etc.), où les températures peuvent fluctuer brutalement et interagir avec des facteurs environnants (fumée, humidité, combustion incomplète...).

En perspective , il serait donc pertinent d'étudier l'effet de l'exposition thermique sur des durées variables, l'influence du milieu (humide, sec), l'interférence des contaminants environnementaux, l'inclusion d'autres matrices (dents, os, ongles...) et l'intégration des nouvelles techniques pour les profils partiellement exploitables .

# **Références bibliographique**

1. Alonso, A., Martin, P., Albarrán, C., Garcia, P., Garcia, O., De Simón, L. F., Garcia-Hirschfeld, J., Sancho, M., de La Rúa, C., & Fernández-Piqueras, J. (2004). Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Science International*, 139(2–3), 141–149.
2. Balaesque, P. (2007). Les microsatellites des génomes eucaryotes : De leur cycle de vie et de leur neutralité. *Med Sci (Paris)*, 23(8-9), 729-734 .
3. Barbaro, A., & Cormaci, P. (2008). Study about the effect of high temperatures on STRs typing. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 277–278.
4. Barbaro, A., Cormaci, P., & La Marca, A. (2019). DNA extraction from soil by EZ1 Advanced XL (Qiagen). *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 299, 161-167.
5. Bhojar, L., Mehar, P., & Chavali, K. (2024). An overview of DNA degradation and its implications in forensic caseworks. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 14(1).
6. Borisov, A. V., Snegerev, M. S., Colón-Rodríguez, S., Fikiet, M. A., Lednev, I. K., & Kistenev, Y. V. (2024). Identification of semen traces at a crime scene through Raman spectroscopy and machine learning. *Scientific Reports*, 14, Article 23070.
7. Bukyya, J. L., Tejasvi, M. L. A., Avinash, A., Chanchala, H. P., Talwade, P., Afroz, M. M., Pokala, A., Neela, P. K., Shyamilee, T. K., & Srisha, V. (2021). DNA profiling in forensic science: A review. *Journal of Forensic Sciences*, 8(4), 135–143.
8. Butler, J. M. (2006). Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 51(2), 253-265.
9. Butler, J. M., McCord, B. R., & Shen, Y. (2003). The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *Journal of Forensic Sciences*, 48(5), 1054–1064.
10. Caccia, G., Cappella, A., Castoldi, E., Marino, A., Colloca, D., Amadasi, A., Caccianiga, M., Lago, G., & Cattaneo, C. (2021). Blood and sperm traces on human hair: A study on preservation and detection after 3-month outdoor exposure. *Science & Justice*, 61(6), 657–666.
11. Chris Gunter, Ph.D.(2025). What are single nucleotide polymorphisms (SNPs)?. National Human Genome Research Institute ( NIH ).
12. Curran, T. (1997). L'analyse génétique en criminalistique : Technologie et application. Division des sciences et de la technologie.
13. Eichler, E. (2008). Copy number variation and human disease. *Nature Education*, 1(3), 1.
14. Fan, H., & Chu, J.-Y. (2007). A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 5(1), 7–14.
15. Finnis, J., Davidson, G., Fraser, I., Murphy, C., Hargreaves, C., Stevenson, N., Doole, S., & Rogers, C. (2023). Illuminating the benefits and limitations of forensic light sources. *Science & Justice*, 63(1), 127–134.
16. Foley, M. (2023). Applied Biosystems™ PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit (Manual and Semi-automated via AutoMate Express™).
17. Gascho, D., Morf, N. V., Thali, M. J., & Schaerli, S. (2017). The use of immunochromatographic rapid test for soft tissue remains identification in order to distinguish between human and non-human origin. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 57(3), 165-168.
18. Gill, P., Ivanov, P. L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., Evett, I., Hagelberg, E., & Sullivan, K. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics*, 6(2), 130–135.
19. Holland, M. M., & Parsons, T. J. (1999). Mitochondrial DNA sequence analysis: Validation and use for forensic casework. *Forensic Science Review*, 11(1), 21–50.

20. Indalecio, C. R., Hernández-Romero, D., Legaz, I., Sánchez Rodríguez, M. F., & Osuna, E. (2021). Détection de taches de sang occultes lors de l'analyse des scènes de crime. *Chimie médico-légale*, 26, 100368.
21. Jean Claude. (2018, 15 octobre). Crimes et délits : recherche des traces biologiques. Science en livre.
22. Jia, Yibing. (2012). Real-time PCR.. "Methods in Cell Biology".(Pages 55-68)
23. Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2023). Polymerase chain reaction (PCR). StatPearls Publishing.
24. Kowalske, Z., Oleiwi, A., & Williams, G. (2024). From ashes to evidence: A study on the alterations in bloodstain patterns in high heat environments and post-fire scenes. *Journal of Forensic Sciences*, 70(2), 742–750. 21.
25. Lakna. (2018, 12 février). Différence entre VNTR et STR . Pédia.
26. Lamoril J, Ameziane N, Deybach J.-C, Bouizegarène P, Bogard M. Notions de génétique moléculaire pour comprendre l'hérédité. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 2008;23(6):331–352.
27. Larionov, A., Krause, A., & Miller, W. (2005). A standard curve based method for relative real-time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*, 6, 62.
28. Laurent, F.-X., Vibrac, G., Rubio, A., Thévenot, M.-T., & Pène, L. (2017). Les nouvelles technologies d'analyses ADN au service des enquêtes judiciaires. *Medecine/Sciences (Paris)*, 33(11), 971-978.
29. Laurent, F.-X., Vibrac, G., Rubio, A., Thévenot, M.-T., & Pène, L. (2017). The new DNA analysis technologies for judicial investigations: The future of forensic DNA analysis for criminal justice. *Medicine/Sciences (Paris)*, 33(11), 971-978.
30. Lozano-Peral, D., Rubio, L., Santos, I., Gaitán, M. J., Viguera, E., & Martín-de-las-Heras, S. (2021). DNA degradation in human teeth exposed to thermal stress. *Scientific Reports*, 11, 12118.
31. Ludes, B. (2021). L'amplification génique : une révolution en médecine légale et en criminalistique [Polymerase chain reaction: A revolution in legal medicine and forensic sciences]. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 205(4), 396-401.
32. Lund, S., & Dissing, J. (2003). Surprising stability of DNA in stains at extreme humidity and temperature. In *Progress in Forensic Genetics (Vol. 10)*. Elsevier.
33. Martins, C., Lima, G., Carvalho, M. R., Cainé, L., & Porto, M. J. (2015). DNA quantification by real-time PCR in different forensic samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e545–e546.
34. Nizioł, J., Ekiert, R., Kuczkowska, J., Fryń, P., & Marzec, M. (2019). Thermal degradation of biological DNA studied by dielectric spectroscopy. *Polymer Testing*, 80, 106158.
35. Panneerchelvam, S., & Norazmi, M. N. (2003). Forensic DNA profiling and database. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 10(2), 20–26.
36. Panneerchelvam, S., & Norazmi, M. N. (2023). DNA profiling in human identification: From past to present. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 30(6), 5–21.
37. Piquereau, J. (2011). Figure 6 –Principe de détection des produits de PCR par la méthode TaqMan . Dans *Rôle de l'architecture cellulaire dans la signalisation énergétique du cœur de la souris*. ResearchGate.
38. Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., & Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28(5), 848–861.
39. Retina . (2013). The human genome is the combined DNA sequence of the haploid set of all chromosomes. In *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. Elsevier.
40. Ricci, U., Marchi, C., Previderè, C., & Fattorini, P. (2006, April). Quantification of human DNA by real-time PCR in forensic casework. *International Congress Series*, 750-752.

41. Samarakoon, Pubudu. (2019, January 24). CNVs (Copy Number Variants)— Context, detection methods and exploratory data analysis with Python.
42. Shahzad, M., De Maeyer, H., Salih, G. A., Nilsson, M., Haratourian, A., Shafique, M., Shahid, A. A., & Allen, M. (2024). Evaluation of storage conditions and the effect on DNA from forensic evidence objects retrieved from lake water. *Genes*, 15(3), 279.
43. Sharman, L. E., & Elliot, D. A. (2000). Crime-scene investigation and examination: Scene analysis and reconstruction. In J. A. Siegel, P. J. Saukko, & G. C. Knupfer (Eds.), *Encyclopedia of Forensic Sciences* (pp. 457–462). Academic Press.
44. Shen, C.-H. (2023). *Diagnostic molecular biology* (2nd ed.). Academic Press.
45. Shrivastava, P., Kumawat, R. K., Kushwaha, P., & Rana, M. (2022). Biological Sources of DNA: The Target Materials for Forensic DNA Typing. In *Handbook of DNA Profiling*, pp. 51–67.
46. Sloots, J., Lalonde, W., Reid, B., & Millman, J. (2017). Kastle-Meyer blood test reagents are deleterious to DNA. *Forensic Science International*, 281, 141-146.
47. Swango, K. L., Timken, M. D., Chong, M. D., Buoncristiani, M. R., Hennessy, L. K., & Krenke, B. E. (2006). A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic Science International*, 158(1), 14–26.
48. Tytgat O. *Bringing Science to the Scene: Novel Strategies for Portable DNA Profiling* [thesis]. January 2022.
49. Watanabe, K., Taniguchi, K., Toyomane, K., & Akutsu, T. (2022). A new approach for forensic analysis of saliva-containing body fluid mixtures based on SNPs and methylation patterns of nearby CpGs. *Forensic Science International: Genetics*, 56, 102624.
50. Weber, A. R., & Lednev, I. K. (2020). Crime clock – Analytical studies for approximating time since deposition of bloodstains. *Forensic Chemistry*, 19, 100248.
51. Wyner, N., Barash, M., & McNevin, D. (2020). Forensic autosomal short tandem repeats and their potential association with phenotype. *Frontiers in Genetics*, 11, 884. 42.
52. Zarkov, Z., Dimitrova, V., Martinova, M., & Kyurkchiev, S. (2020). Mental health and social inequalities in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Public Health*, 11(3), 25–35.
53. Zbrog, M. (2025, February 19). A quick history of forensic science: Fingerprints, DNA & beyond.
54. Zhang, S., Bian, Y., Tian, H., & Li, C. (2015). Development and validation of a new STR 25-plex typing system. *Forensic Science International: Genetics*, 17, 26–34.

# **Annexes**



**Tube de sang hépariné**



**Ciseaux**



**Des gants stériles**



**Boîtes de Pétri stériles**



**Couppelles en plastique**



**Porte-embouts**



**Embouts stériles**



**Micropipettes**



**Des creusets**



**Tubes Eppendorf  
(1,5 ml et 2 ml)**



**Minitubes (0,2 ml)**



**Striptubes (tubes  
de qPCR)**



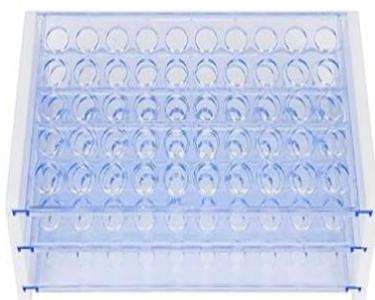
**Colonnes spin  
baskets PrepFiler**



**Ecouvillons**



**support magnetique**



**Support pour tubes**



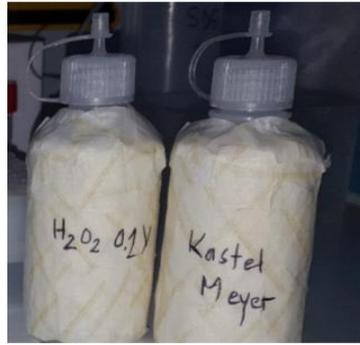
**Plaques qPCR / PCR**



**Plaque de dépôt Post-PCR**



Feuille d'aluminium



Réactifs du test



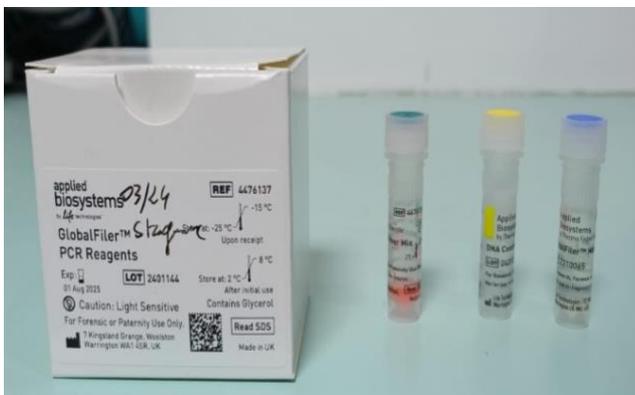
Test OBTI



Kit PrepFiler



Kit Investigator EZ1



Kit GlobalFiler



Kit Allelic Ladder



**Étuve de séchage universelle Memmert UF55**



**Automate EZ1 Advanced XL**



**Automate QIAgility**



**Thermocycleur RotorGene**



**Analyseur génétique SeqStudio**



**analyseur génétique 3500XL**



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

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

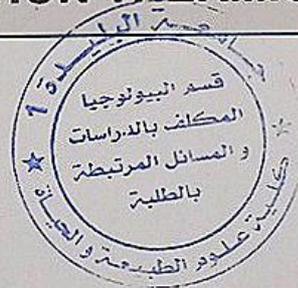
Domaine : Science de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : Génétique

## THEME

# RECHERCHE SUR LA CONCORDANCE ENTRE L'ADN ET LES TRACES CARATERISTIQUES DU SANG APRES EXPOSITION THERMIQUE

Réalisé par :

- ALLACHE Amina
- IZRI Lyna



Soutenu publiquement devant le jury :

-Mme BELKHITER .S	MCB	USDB 1	Présidente
-Mr BENYAHIA .N	MAA	USDB 1	Examineur
-Mme GUESSAIBIA .N	MCA	USDB 1	Promotrice
-Mme KHEMIRI .Z	AA	SDPST	Co-Promotrice

Promotion 2024 / 2025

M. BENYAHIA N.