



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
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



Master : **EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de master en sciences biologiques

Option : **GENETIQUE**

THEME

Approche combinée de l'analyse STR autosomique/chromosome Y pour
l'expertise des taches biologiques dans le cas d'agression sexuelle

Présenté par :

- Baziz Rania

- Zerroukhat Nora

Devant le jury :

- Mme CHAKHMA.A	MAA	USDB1	Présidente.
- Mme GUESSAIBIA.N	MCA	USDB1	Examinatrice.
- Mrs MOHAMED SAID.R	MCA	USDB1	Promoteur.
- Mme ZEKRI.A	Lieutenant	LPS(DGSN)	Co-promotrice.
- Mme KHOUAS.L	Chargée d'expertise	LPS(DGSN)	Invitée

Promotion : 2019/2020

Remerciements

Au terme de la rédaction de ce mémoire, c'est un devoir agréable d'exprimer en quelques lignes la reconnaissance qu'on doit à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette étude.

Nous remercions en premier lieu dieu tout puissant pour nous avoir accordé la puissance et la volonté de terminer ce travail.

*Le projet de fin d'études a été réalisé au niveau du Laboratoire Centrale de la police Scientifique et Technique. On tient à remercier vivement Monsieur le Directeur de la Police Scientifique et Technique le Commissaire Divisionnaire **ZEKRI.M**, et Monsieur le Chef de Service du Laboratoire Commissaire Principal de la Police le Docteur **Brahiti.H** et Monsieur Le chef de Département d'identification Génétique par intérim, le Commissaire **BENAKMOUN.T** qui nous ont permis de travailler dans les meilleures conditions*

*Nous attribuons nos chaleureux et vifs remerciements à notre promoteur Monsieur **MOHAMED SAID.R** maitre de conférence de faculté Blida 1 pour l'honneur qu'il nous a fait en dirigeant ce travail, et pour ses précieux conseils et à notre Co-promotrice Mme **ZEKRI.A** pour son encadrement ce sujet et son suivi.*

*Nous tenons à remercier toute l'équipe du Départements de la Biologie Légale et en particulier Mme **KHOUS. L**, **ZEGROUR.S**, Mr **BECHAR.M**, Mme **BENABDALLAH.N**, Mme **BELAMRI.N**, Mr **HEBBA.K** pour leurs aides et leurs conseils à la réalisation a ce projet.*

*Et enfin nos remerciements vont également à Mme **CHAKHMA.A.**, qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*

*Nos sincères considérations vont à Mme **GUESSAIBIA.N** qui a consacré son temps pour examiner et évaluer ce travail.*

Dédicace

Je dédie ce travail à mes très chers parents, tous les mots du Monde ne sauraient exprimer l'immense amour et l'estime que je vous porte, ni la Profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices pour mon bien être.

*A chère sœur **AMIRA** toujours présente pour moi et pour tout, et à mes frères **LOTFI** et **KARIM**.*

Mes amies en particulier Nada qui m'a toujours aidé et soutenu.

*A mon binôme **NORA** et toute sa Famille **ZERROUKHAT**. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit

Possible, je vous dis merci.

RANIA

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

*C'est avec une grande joie que je dédie ce travail à :
Mes parents sont toujours présents pour moi et pour
tout*

Qui m'ont aidé de près et loin

*Pour mes chères sœurs **NAZIHA, NACHOUA,**
NIHAD et **NESRINE** moteur de mon avancée*

*Pour ma nièce **HIND** et mon neveu **AKRAM***

*Pour tous mes amies en particulier **LYES***

*Enfin à mon cher binôme et mon meilleure amie
RANIA, et la famille **BAZIZ**, pour sa patience et
soutien durant tout ce travail. En souvenir à tous
ces moments mémorables de joie que nous avons
partagés, mais aussi un peu les moments difficiles.*

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

NORA

Résumé

La criminalistique est l'ensemble des techniques mises en œuvre par la justice et la police pour établir la preuve d'un délit ou d'un crime et d'en identifier son auteur, donc la criminalistique, consiste en l'étude par des voies scientifiques, des traces laissées par une activité criminelle ou litigieuse.

Les empreintes génétiques ou profils génétique sont établis par l'analyse de plusieurs loci d'ADN, principalement les STR (short tandem repeats) hautement polymorphes, cette propriété fait d'eux des marqueurs génétiques de choix pour établir un profil génétique unique de chaque individu.

En science forensique ont été développé les méthodes d'extraction, purification et profilage, ce qui révolutionne la science médico légale.

Dans ce présent travail, nous avons étudié sept cas d'agression sexuels caractérisé par leur complexité et ce, à cause du mélange des traces du suspect présumé et des victimes présumées.

Nous nous sommes particulièrement intéressées à l'intérêt de la combinaison de deux analyses : **L'analyse des STR autosomique et l'analyse de chromosome Y**, cette étude nous a permet de démontrer l'utilité et la nécessité de chaque type d'analyse dans notre approche.

Nous avons cité sept affaires des victimes ont subi l'agression sexuels, leurs profils génétiques sont détectés par prélèvement des taches biologique en particulier le sperme. Pour l'ensemble des affaires, trois affaires ont été obtenus leurs profils par **l'analyse autosomal des STR**, deux affaires par **l'analyse de l'haplotype Y** et deux autre par **la combinaison entre les deux**.

D'après nos résultats, nous avons pu démontrer que la quantité de l'ADN obtenu en PCR en temps réel détermine la technique utilisée par la suite pour obtenir un profil génétique des scellées trace et comparaisons net et interprétable afin d'incriminer le vrai auteur.

Mots clés : ADN, sperme, agression sexuelle, STR autosomique, Haplotype Y, profils génétique.

Abstract

Forensic science is the set of techniques implemented by justice and the police to establish proof of an offense or a crime and to identify its author, So forensic science consists of the study by ways of scientific evidence, traces left by criminal or contentious activity.

The genetic fingerprints or genetic profiles are established by the analysis of several DNA loci, mainly the highly polymorphic STRs (short tandem repeats), this property makes them the genetic markers of choice for establishing a unique genetic profile of each individual.

In forensic science we have developed methods of extraction, purification and profiling, which is revolutionizing forensic science.

In this present work, we studied seven cases of sexual assault characterized by their complexity, due to the mixture of traces of the presumed suspect and the alleged victims.

We were particularly interested in the interest of the combination of two analyzes: **Autosomal STR analysis** and **Y chromosome analysis**, this study allowed us to demonstrate the utility and necessity of each type of analysis in our approach.

We have cited seven cases of victims who have been sexually assaulted, their genetic profiles are detected by biologically staining in particular the sperm. For all cases, three cases were profiled by **autosomal STR analysis**, two cases by **Y haplotype** analysis and two others by **the combination of the two**.

From our results, we have been able to demonstrate that the amount of DNA obtained in real-time PCR determines the technique subsequently used to obtain a clear and interpretable genetic profile of the trace and comparison seals. In order to incriminate the real author.

Keywords : DNA, sperm, sexual assault, autosomal STR, haplotype Y, genetic profile.

ملخص

علم الطب الشرعي هو مجموعة التقنيات المستخدمة من قبل نظام العدالة والشرطة لإثبات جريمة أو لتحديد هوية صاحبها، وبالتالي يتكون علم الطب الشرعي من الدراسة عن طريق الأدلة العلمية، الآثار التي خلفها نشاط إجرامي أو مثير للجدل.

يتم إنشاء بصمات الأصابع الجينية أو الملامح الجينية من خلال تحليل العديد من مواقع الحمض النووي، وخاصةً تقارير المعاملات المشبوهة متعددة الأشكال (التكرارات المزدوجة القصيرة)، وهذه الخاصية تجعلها العلامات الجينية المختارة لإنشاء ملف جيني فريد لكل فرد.

في علم الطب الشرعي، قمنا بتطوير طرق الاستخراج والتنقية والتنميط، مما أحدث ثورة في علم الطب الشرعي.

في هذا العمل الحالي، درسنا سبع حالات اعتداء جنسي تتميز بتعقيدها، بسبب مزيج من آثار المشتبه به والضحايا المزعومين.

قد كنا مهتمين بشكل خاص باهتمام الجمع بين تحليلين: تحليل التكرارات المزدوجة الصغيرة لصبغي جسي وتحليل كروموسوم Y سمحت لنا هذه الدراسة بإثبات فائدة وضرورة كل نوع من التحليل في نهجنا.

لقد ذكرنا سبع حالات لضحايا تعرضوا لاعتداء جنسي، تم الكشف عن ملامحهم الجينية عن طريق أخذ عينات من البقع البيولوجية خاصة الحيوانات المنوية. لجميع الحالات، تم تحديد ثلاث حالات عن طريق تحليل صبغي جسي وحالتان من خلال تحليل كروموسوم Y وحالتان أخريان من خلال الجمع بينهما.

من خلال نتائجنا، تمكنا من إثبات أن كمية الحمض النووي التي تم الحصول عليها في تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الفعلي تحدد التقنية المستخدمة لاحقاً للحصول على ملف جيني واضح وقابل للتفسير لأختام التنبع والمقارنة من أجل تجريم المؤلف الحقيقي.

الكلمات المفتاحية الحمض النووي الحيوانات المنوية الاعتداء الجنسي التكرارات المزدوجة الصغيرة كروموسوم Y الملف الوراثي.

Liste des abréviations

ABI prism : Appied Biosystem

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADN mt : Acide Désoxyribonucléique mitochondrial

ATL : Tissue Lysis Buffer

ATE : Tissue Elution Buffer

CCD : Charge Coupled Device

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique

EPG : Eléctrophorégramme

FAM : 6- Carboxyfluorocein

IPC : Internal PCR Control

Kpb : Kilo paire de base

LIZ : Internal lane size standard

Min : Minute

ml : Millilitre

Pb : Paire de base

PCR : Polymerase chain reaction

PK : Protéinase K

POP-4 : Performance optimized polymer 4

PSA : Prostatic Specific Antigen

QPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RFU : Relative Fluorescence Units

Rpm : Rotation par minute

SNP : Single Nucléotide Polymorphism

SDS : Dodécylsulfate de Sodium

STR : Short Tandem Repeat

Taq : Thermus aquaticus

VNTR : Variable Number of Tandem Repeat

Zn : Zinc

°C : degré Celsius

µl : micro litre

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	L'organisation du génome humain.	04
02	La composition du spermatozoïde humain.	11
03	Processus d'extraction différentielle utilisé pour séparer les spermatozoïdes des cellules épithéliales féminines.	12
04	Principe de la sonde Taqman.	13
05	Présentation du résultat d'analyse (Profil génétique déterminé à partir d'un échantillon biologique) avec le Kit Identifier.	15
06	Réaction anticorps antigène.	21
07	Conception de bandelette de test immunochromatographique.	21
08	Principe de la PCR quantitative en temps réel avec sonde TaqMan.	25
09	Le suivi en temps réel d'une réaction PCR quantitative.	26
10	Répartition des échantillons.	35
11	Profil génétique d'une trace de sperme sur un pantalon (Ech 1,1).	49
12	Profil génétique appartenant au suspect (Ech 1,2).	50
13	Profil génétique de la fraction spermatique (Ech 5,2T1).	51
14	Profil génétique de la fraction épithéliale (Ech 5,2T2).	52

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Liste des loci analysés sur l'ADN autosomal.	07
II	Liste des loci analysés sur le chromosome Y.	08
III	Examen des scellés de trace.	17
IV	Examen des scellés de comparaison.	17
V	Cible du kit DUO.	26
VI	La dilution des 08 standards de la quantification d'ADN.	27
VII	Calcul des volumes nécessaires pour la PCR Temps réel.	28
VIII	Le système des 4 fluorochromes des STR.	29
IX	Le plan de dépôt des échantillons trace dans la plaque de PCR	30
X	Le plan de dépôt des échantillons comparaison dans la plaque de PCR	31
XI	Calcul des volumes des réactifs nécessaires à la PCR.	31
XII	Le plan de dépôt des échantillons traces dans la plaque de PCR.	32
XIII	Le plan de dépôt des échantillons comparaisons dans la plaque de PCR	33
XIV	Calcul des volumes des réactifs nécessaires à la PCR.	33
XV	Volumes nécessaires pour la post-amplification	34
XVI	Profil génétique déterminé à partir de l'échantillon trace (affaire N°01).	39
XVII	Profil génétique déterminé à partir de l'échantillon comparaison (affaire N°01).	39
XVIII	Profils génétiques déterminés à partir des échantillon traces (affaire N°02).	40
XIX	Profils génétiques déterminés à partir de l'échantillons comparaisons (affaire N°02).	40
XX	Profils génétiques déterminés à partir des échantillon traces (affaire N°05).	41
XXI	Profil génétique déterminés à partir de l'échantillon comparaison (affaire N°05).	41
XXII	Haplotype Y déterminés à partir de l'échantillons trace (affaire N°04).	43
XXIII	Haplotype Y déterminés à partir de l'échantillon comparaison (affaire N°04).	43
XXIV	Haplotypes Y déterminés à partir des échantillons traces (affaire N°06).	43
XXV	Haplotype Y déterminés à partir de l'échantillon comparaison (affaire N°06).	44
XXVI	Profils génétiques déterminés à partir des échantillons traces (affaire N°03).	45
XXVII	Profil génétique déterminé à partir de l'échantillon de comparaison (affaire N°03).	45
XXVIII	Haplotypes Y déterminé à partir des échantillons traces (affaire N°03).	46
XXIX	Haplotype Y déterminé à partir d'échantillon de comparaison (affaire N°03).	46
XXX	Profil génétique déterminés à partir d'échantillon de trace (affaire N°07).	47
XXXI	Profils génétiques déterminés à partir des échantillons de comparaisons (affaire N°07).	47
XXXII	Haplotype Y déterminés à partir d'échantillon trace (affaire N°07).	48
XXXIII	Haplotype Y déterminés à partir d'échantillon comparaison (affaire N°07).	48



SOMMAIRE

Sommaire

Introduction.....		01
Chapitre I : Etude bibliographique		
I-	La génétique au service de la justice.....	02
II-	L'ADN support de l'information génétique.....	02
III-	Le Génome humain.....	03
	III-1 ADN nucléaire.....	03
	III-2 ADN mitochondrial.....	03
IV-	Polymorphisme génétique.....	03
	IV-1 Polymorphisme de séquence.....	05
	IV-1.1 Polymorphisme d'un seul nucléotide SNP.....	05
	IV-2 Polymorphisme de longueur.....	05
	IV-2.1 Polymorphisme de restriction « RFLP »	05
	IV-2.2 Les minisatellites.....	05
	IV-2.3 Les microsatellites.....	06
	IV-2.3.1 STR autosomique	06
	IV-2.3.2 Les marqueurs haplotypiques.....	07
	IV-2.3.2.1 Les marqueurs du chromosome Y.....	08
	IV-2.3.3 Marqueurs déterminant le sexe « Amélogénine »	08
V-	L'identification génétique dans le cas d'agression sexuelle.....	08
VI-	Nature des prélèvements.....	09
	VI-1 Sur scène.....	09
	VI-2 Prélèvement de comparaison.....	09
	VI-3 Prélèvement sur victime d'agression sexuelle.....	10
	VI-4 Trace de sperme.....	10
	VI-4.1 Tests préliminaires : Identification du sperme.....	11
VII-	Études d'analyse STR/chromosome Y lors d'agression sexuelle pour l'identification d'un profil génétique.....	11
	VII-1 Extraction de l'ADN.....	11
	VI-1.1 Extraction différentielle.....	12
	VI-1.2 Le challenge de l'extraction différentielle.....	12
	VII-2 Quantification de l'ADN.....	13
	VI-2.1 La technologie de l'hydrolyse des sondes.....	13
	VII-3 Amplification de l'ADN.....	14
	VII-4 Post-Amplification.....	14
	VII-5 Electrophorèse capillaires.....	14
	VII-6 Validation des profils génétiques.....	15

Chapitre II : Matériels et méthodes

I-	Matériels.....	16
	I-1 Matériels biologiques.....	16
	I-1.1 Echontillonnage.....	16
	I-2 Matériels non biologiques.....	16
	I-2.1 Appareillage.....	16
II-	Méthodes.....	17
	II-1 Nettoyage et préparation de la surface de travail.....	18
	II-2 Recherche des taches suspectes.....	18
	II-2.1 Les tests préliminaires des échantillons traces.....	18
	II 2.1.1 Test d'orientation.....	19
	II-2.1.1.1 Examen optique au crimelight.....	19
	II-2.1.1.2 Test phosphatas acide.....	19
	II-2.1.2 Test de confirmation : Recherche de PSA.....	20
	II-2.3 L'extraction de l'ADN.....	22
	II-2.3.1 l'extraction ordinaire (sperme pur)	22
	II-2.3.2 L'extraction différentielle.....	24
	II-2.4 La quantification DUO de l'ADN.	25
	II-2.5 L'amplification par la méthode de PCR.....	29
	II-2.5.1 L'amplification par le kit AmpFISTR Identifier plus.....	29
	II-2.5.2 L'amplification de l'ADN par le kit Y filer.....	32
	II-2.6 La post amplification.....	34
	II-2.7 Electrophorèse capillaire.....	35
	II-2.8 Analyse des profils génétique.....	35

Chapitre III : Résultats et discussion

I.	Résultats et discussion.....	36
	I-1 Résultats des tests préliminaires.....	36
	I-1.1 Examen optique.....	36
	I-1.2 Examen chimique : recherche de phosphatase acide	36
	I-1.3 Examen immunologique.....	37
	I-2 La quantification DUO.....	37
	I-3 Genotypage.....	39
	I-3.1 Profils génétiques obtenus par le kit Identifier plus.....	39
	I-3.2 Haplotypes obtenus par le kit Y filer.....	43
	I-3.3 Profils génétiques obtenus par l'utilisation des deux kits.....	45

Chapitre IV : Conclusion**Chapitre V : Les références bibliographiques****Chapitre VI : Annexes****Chapitre VII : Glossaire**



INTRODUCTION

Introduction :

L'individu est identifiable parmi ses semblables grâce à tous les attributs qui lui sont propres, étant différent et unique à chaque personne, le polymorphisme de l'ADN est la caractéristique majeure définissant cette singularité, la seule exception confirmant la règle étant les vrais jumeaux possèdent un ADN identique (Coquoz et al ,2013).

Les fluides biologiques retrouvés sur les victimes et/ou dans les scènes de crimes sont exploitables en criminologie, Ils feront l'objet d'analyses dans un laboratoire de génétique forensique (Police scientifique, 2012). Ces traces biologiques uniques peuvent constitués des éléments ou des preuves clés dans une enquête criminelle (Coquoz, 2003).

Au niveau d'une scène de crime, de par sa qualité permettant non seulement d'identifier le coupable mais aussi de prouver l'acte d'agression sexuelle sur la victime, le sperme est le fluide biologique le plus important.

Le travail que nous avons réalisé dans département d'identification génétique au sein du laboratoire de la police scientifique et technique, consiste en l'établissement de profils génétique à partir des traces de sperme issue de prélèvements effectué sur les parties génitales (vaginal/ anal) ou bien sur des effets vestimentaires plus précisément des sous-vêtements de victimes d'agression sexuelle, dans sept affaires criminelles différentes. Notre but dans cette étude étant dirigé vers une étude d'approche combinée de l'analyse STR autosomique /chromosome Y pour l'expertise des taches biologiques dans le cas d'agression sexuelle.



CHAPITRE I : Etude bibliographique

I- La génétique au service de la justice :

L'empreinte génétique, une découverte brevetée par le Professeur Sir Alex Jeffreys en 1985, est devenue une procédure mise au service de la justice, ainsi que les méthodes de profilage de l'ADN, consistant en une amélioration de la technique d'empreinte génétique. Le profilage de l'ADN est basé sur des "microsatellites" à forte variation du génome humain. Ces microsatellites sont des parties choisies du brin d'ADN normalement long et complexe, où se produisent la plupart des variations entre les individus (Butler, 2005).

En 1985, Sir Alec Jeffreys a été utilisé que l'ADN contenait des séquences qui se répétaient, et surtout, ce nombre de répétitions variait d'une personne à l'autre en étant transmis par voie mendélienne aux enfants. Cette découverte fut appliquée dès 1986 sur des prélèvements effectués sur deux scènes criminelles. Les résultats obtenus furent alors comparés à un suspect, et celui-ci fut exclu (Jeffreys et al, 1985). Après une étude sur des prélèvements effectués surtout les hommes de la région, un profil identique à celui retrouvé sur la scène criminelle fut identifié (Doutremepuich, 2012).

L'analyse ADN est appelée alors DNA fingerprint ou Empreinte génétique (Jeffreys et al, 1985). Ce premier cas illustre bien l'intérêt de l'ADN en pratique judiciaire : exclusion d'un suspect, puis inclusion d'une autre personne (Doutremepuich, 2012).

Au cours de ces dernières années, les analyses ADN utilisées par la justice ont connu de nombreux développements : réduction du nombre de cellules nécessaires à l'analyse, méthodes d'extraction et de purification plus efficaces, méthodes de génotypage plus rapides. Ces analyses, effectuées uniquement dans le cadre d'une mission judiciaire, permettent alors d'identifier rapidement un corps, une tache de sang, de sperme, ou de cellules épithéliales par comparaison avec des résultats issus d'une famille (Doutremepuich, 2012).

II-L'ADN support de l'information génétique :

L'ADN ou l'acide désoxyribonucléique est le support de l'information génétique ; ce n'est qu'en 1953 après la découverte de la structure de l'ADN par Watson J. et Crick F. que les généticiens ont admis qu'il était le constituant des gènes responsables du développement et de l'évolution de toutes les espèces vivantes.

L'ADN humain est arrangé en un ensemble de 23 paires de chromosomes dont chacun est une unique molécule d'ADN double brin de 55 à 250 millions de paires de bases. L'ADN non codant, contrairement à l'ADN codant, n'est pas soumis aux pressions sélectives, les mutations qui y surviennent sont conservées et transmises à la descendance (Brown, 2004). La grande variabilité de ces régions est exploitée en criminalistique où l'analyse génétique doit répondre à certains standards (Schneider, 2006), aussi bien pour les techniques que pour l'interprétation des résultats et l'utilisation de l'ADN mitochondrial. Plusieurs types de polymorphismes ont été utilisés, chacun révélant un niveau différent de variabilité

III-Le Génome humain :

Le génome humain est l'ensemble de l'information génétique contenue sous forme d'ADN dans les cellules. Ce dernier est constitué de deux génomes distincts : l'un situé dans le noyau (génome nucléaire) et l'autre situé dans la mitochondrie (génome mitochondrial) (May-Panloup et al, 2006). (Figure 1).

III-1 ADN nucléaire :

Le génome humain est constitué en majorité de séquences non codantes réparties entre les gènes, représentant l'ADN extragénique qui est formé de répétitions variées et d'origines diverses, et couvrant deux tiers de la totalité du génome. Tandis que, sur le tiers restant, près de 95% de l'ADN est présent sous forme de séquences génique apparentées : pseudogènes, introns). Au final, le génome nucléaire humain, de par sa structure et son organisation complexe, fait que seul 1 à 2% d'ADN est codant (Venter et al 2001).

L'ADN nucléaire possède trois propriétés qui vont intéresser la police scientifique : il possède des régions variables d'individu à individu ; ces régions chez un individu sont identiques quel que soit le tissu analysé ; et enfin, l'ADN est transmis par moitié de chacun des parents à ses enfants (Pascal, 1998).

La grande variabilité de ces régions est exploitée en criminalistique où l'analyse génétique doit répondre à certains standards (Schneider, 2006).

III-2 ADN mitochondrial :

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

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

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

IV-Polymorphisme génétique :

Le polymorphisme est l'existence pour de nombreux loci chez l'homme, de deux allèles ou plus s'exprimant avec une fréquence non négligeable dans la même population. Plus d'un tiers des gènes sont polymorphes. En effet, environ 99,7% d'ADN est identique chez tous les êtres humains. Par contre, environ 0,3 % d'ADN (soit équivalent d'un million de nucléotides) est hétérogène et contribue à la caractérisation et la distinction de chaque individu (Butler, 2001).

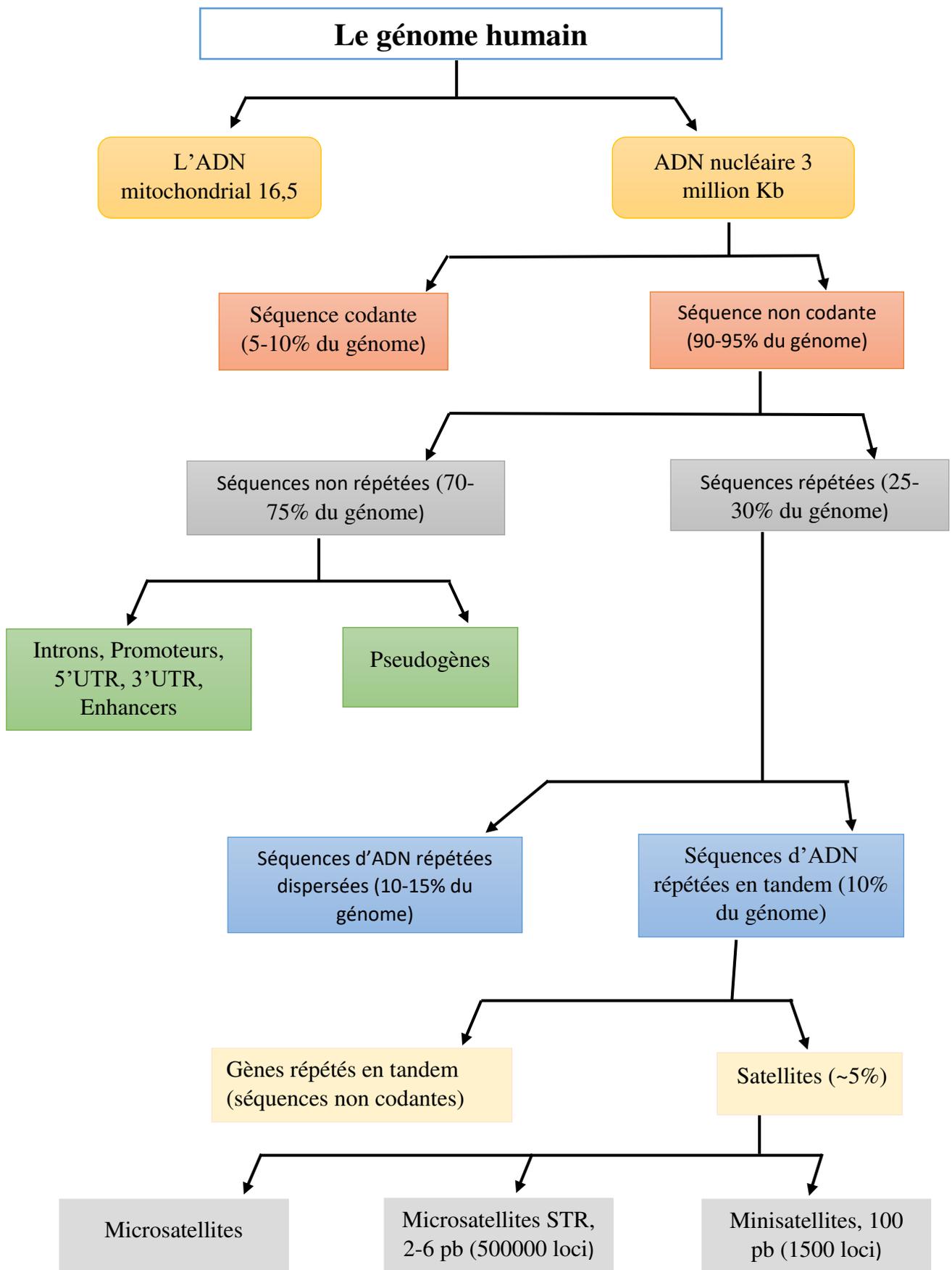


Figure 1 : L'organisation du génome humain (Kayshap et al, 2004).

IV-1 Polymorphisme de séquence :

IV-1.1 Polymorphisme d'un seul nucléotide SNP :

Les SNP pour (Single Nucleotide Polymorphisms) constituent les polymorphismes les plus répandus du génome humain. Ils s'agissent de variations de la séquence d'ADN portant sur un seul nucléotide. Ces marqueurs sont bi-alléliques et sont répartis sur l'ensemble du génome, toutes les 500 paires de bases en moyenne, aussi bien au niveau des régions codantes (gènes) que des régions non codantes. Les régions d'ADN ciblées pour l'analyse de SNP sont de petites tailles, ce qui permet l'étude de molécules d'acides nucléiques fragmentées. Ceci est particulièrement important en criminalistique pour l'identification génétique. Ces marqueurs peuvent être aussi utilisés pour la détermination éthique d'une personne (Keyser et Petkovski, 2006). Les SNP présentent un taux de mutation bien inférieur à celui des microsatellites (STR), pour cela ils sont considérés comme des marqueurs génétiques stables (Keyser et Petkovski, 2006).

IV-2 Polymorphisme de longueur :

L'analyse de l'ADN non codant a mis en évidence des régions variables, caractérisées par la répétition en tandem d'unités de base composées de deux ou plusieurs nucléotides ; la taille de ces fragments varie en fonction du nombre de répétition (Jarman et Wells, 1999).

IV-2.1 Polymorphisme de restriction « RFLP » :

Les RFLP pour (Restriction Fragment length Polymorphisms) proviennent de la digestion de l'ADN par un enzyme de restriction. C'est l'extrême spécificité de ces enzymes qui est exploitée. Ce phénomène n'étant pas rare, la digestion de l'ADN de deux individus quelconques dans une espèce donnée produit de très nombreuses différences de longueur des fragments (Botstein et al, 1980). Lorsque deux individus homozygotes sont comparés après digestion de leur ADN par une enzyme donnée et hybridation avec une sonde donnée, on observera donc des profils d'électrophorèse différents chaque fois que des sites de restriction différeront dans la région reconnue par la sonde (Botstein et al, 1980).

IV-2.2 Les minisatellites :

La découverte des minisatellites par Alec Jeffereys en 1985 a révolutionné l'utilisation de l'ADN en matière d'identification et de filiation. Le motif de base de ces marqueurs, également appelé VNTR, compte entre 9 et 100 pb. Il est réitéré entre deux et quelques centaines de fois à chaque locus (Tautz, 1993), générant ainsi des fragments de 500 pb à 20 kpb en taille.

Les minisatellites se trouvent plus fréquemment dans les régions proches des télomères mais ils peuvent être aussi présents sur d'autres sites chromosomiques (Petkovski, 2006). Ils sont instables et le nombre d'exemplaires d'une séquence donnée change souvent d'une génération à l'autre suite à des recombinaisons méiotiques « crossing-over » inégales et des conversions génétiques (Petkovski, 2006).

Leur polymorphisme élevé qui signifie de grands écarts différents par rapport à la norme a permis une utilisation de plus en plus répandue de ces minisatellites pour l'empreinte génétique, ainsi que pour les marqueurs génétiques utilisés dans l'analyse de liaison et les études de population (Jeffreys, 1991).

IV-2.3 Les microsatellites (STR) :

Représentent des régions d'ADN constitué de courts segments répétés en tandem retrouvés tout au long du génome humain qui varient en longueur à travers l'insertion, la suppression ou mutation d'une unité de séquence d'ADN répétée (Butler et Hill, 2012). Leur variabilité semble principalement liée à des dérapages de réplication (Di Rienzo et al, 1994).

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

Certaines séquences STRs ont été choisies pour être utilisés en criminalistique car elles 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 escomptées. L'avantage est qu'une très petite quantité d'ADN, même très dégradé, peut être suffisante pour être utilisée en criminalistique (Butler et al, 2007). Le problème, est que pour pouvoir procéder efficacement à une analyse, il faut grandement augmenter le nombre des très courtes séquences d'ADN. On y parvient grâce à l'utilisation d'une technique appelée PCR.

Les STRs peuvent être divisés en trois catégories :

Simple : répétitions de la même séquence et de la même taille.

Composés : Etude bibliographique deux ou plus, simples répétitions.

Complexes : ont plusieurs blocs de répétitions de différentes tailles et de séquences différentes (Goodwin et al, 2007).

D'un individu à l'autre, la séquence répétée d'un VNTR ou d'un STR est identique mais le nombre de répétitions, et donc la taille du VNTR ou du STR peut être très variable (Ameziane et al, 2005).

IV-2.3.1 STR autosomaux :

L'empreinte génétique est le résultat de l'étude de plusieurs loci. L'analyse de l'ADN autosomal repose sur l'étude de 15 loci (tableau n° II). Cette analyse permet d'établir un génotype propre à chaque individu (Doutremepuch, 2012).

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

Locus	Chr	Position	Taille des fragments	Motif répété	Echelle allélique
D8S1179	8	8q	de 128 à 168 pb	(TCTR)n	entre 8 et 19
D21S11	21	21q11-q21	de 189 à 243 pb	(TCTA)n	entre 24.2 et 38
D7S820	7	7q11.21-q22	de 215 à 247 pb	(AGAT)n	entre 6 et 15
CSFIPO	5	q33.3-34 située dans le gène du récepteur cfms proto — oncogène pour le CSF1.	de 295 à 327 pb	(AGAT)n	entre 7 et 15
D3S1358	3	3p	de 114 et 142 pb	(TCTA)n	entre 9 et 19
TH01	11	11p15.5 située dans l'intron 1 du gène de la tyrosine hydrolase	de 154 pb à 178 pb	(TCAT)n	entre 5 et 11
D13S317	13	13q22-q31	de 165 à 197 pb	(AGAT)n	entre 5 et 15
D16S539	16	16q24-qter	de 264 à 304 pb	(AGAT)n	entre 5 et 15
D2S1338	2	2q35-37.1	de 289 à 341 pb	(TGCC)n	entre 15 et 28
D19S433	19	19q12-13.1	de 106 à 140 pb	(AAGG)n	entre 9 et 18.2
vWA	12	12p12 pter située dans l'intron 40 du gène humain VWA	de 135 à 167 pb	(TCTR)n	entre 11 et 22
TPOX	2	2p13 située dans le gène de la thyroïde-péroxydase	de 232 à 248pb	(AATG)n	entre 8 et 12
D18S51	18	18q21.3	de 273 à 341 pb	(AGAA)n	entre 9 et 26
D5S818	5	5q21-31	de 135 à 171 pb	(AGAT)n	entre 7 et 16
FGA	4	4q28	de 219 à 267 pb	(TTTC)n	entre 16.2 et 30

IV-2.3.2 Les marqueurs haplotypiques :

Les marqueurs autosomaux transmise de manière biparentale, c'est-à-dire par les deux parents subissent un brassage génétique à chaque génération, la moitié de l'information génétique d'un individu lui vient de son père, l'autre moitié de sa mère. Par contre, les marqueurs uniparentaux situés sur le chromosome Y et sur l'ADN mitochondrial sont transmis d'une génération à l'autre sans changement (sauf dans le cas de mutation) et permettent donc de retracer la lignée maternelle (ADNmt) et la lignée paternelle (chromosome Y) chaque individu possède un seul allèle et l'information génétique de chaque marqueur uniparental est dite (halotypique). Ces marqueurs halotypiques peuvent également être utilisés pour l'expertise génétique mais sont toutefois moins discriminants pour l'identification (Oota 1995 ; Schultes et al, 1999).

IV-2.3.2.1 Le chromosome Y :

Le chromosome Y est le plus petit chromosome après le chromosome 22, avec environ 60 millions de bases (60mb). L'ADN du chromosome Y est un héritage exclusivement paternel et permet ainsi de retracer la lignée paternelle.

Les polymorphismes de l'ADN sur le chromosome Y humain sont des outils précieux, particulièrement utilisés dans les cas de viol et dans des cas de filiation (paternité) (Jobling et al., 1997).

Il contient des régions très polymorphes, il y a 219 STR connus, mais uniquement un ensemble de 9 à 11 loci est utilisé (Leat et al., 2004 ; Jobling et Gill, 2004). Les STR Y ont le même mécanisme mutationnel que les STR autosomaux (Gusmão et al., 2006).

Tableau II : Liste des loci analysés sur le chromosome Y (Doutremepuch, 2012).

Locus	Chr	Position	Taille des fragments	Motif répété	Échelle allélique
Amélogénine	Y	Yp11.2			
DY S393	Y		de 113 à 137 pb	(AGAT) _n	entre 11 et 17
DY S19	Y		de 182 à 201 pb	TAGA) _n	entre 12 et 17
DY S389 II	Y		de 294 à 320 pb	(TCTG et TCTA) _n	entre 27 et 33
DY S390	Y		de 179 à 199 pb	(TCTA et TCTG) _n	entre 20 et 25
DY S391	Y		de 245 à 257 pb	(TCTA) _n	entre 9 et 12
DY S385	Y		de 346 à 386 pb	(GAAA) _n	entre 8 et 19
DY S389 I	Y		de 243 à 259 pb	(TCTG et TCTA) _n	entre 11 et 15
DY S439	Y		de 238 à 254 bp	(GATA) _n	entre 10 et 14
DY S438	Y		de 131 à 158 bp	(TTTTTC) _n	entre 8 et 13
DY S392	Y		de 247 à 262 pb	(TAT) _n	entre 10 et 15
DY S437	Y		de 183 à 199 pb.	(TCTA et TCTG) _n	entre 13 et 17
DY S456	Y		de 100 à 127 pb.	(AGAT) _n	entre 13 et 18
DY S458	Y		de 133 à 165 bp.	(GAAA) _n	entre 14 et 20
DY S4635	Y		de 242 à 274 bp.	(TCTA et TGTA) _n	entre 20 et 26
Y GATA H4	Y		de 114 à 150 pb.	(TAGA) _n	entre 8 et 13
DY S448	Y		de 274 à 332 pb.	(AGAGAT) _n	entre 17 et 24

IV.2.3.3 Marqueurs déterminant le sexe « Amélogénine » :

Le gène de l'Amélogénine, localisé sur les deux chromosomes sexuels X et Y codent pour une protéine de l'émail des dents. Les séquences homologues de ce gène diffèrent par la présence de plusieurs délétions. En 1993, une délétion de 6 paires de base localisée dans le premier intron de ce gène, a été découverte sur le chromosome X. celle-ci a été utilisée pour la première fois pour la détermination génétique du sexe des individus suspects. Ce qui permet

L'exclusion immédiate de 50% de la population dans les cas d'identification du sexe. Le principe de cette méthode repose sur l'amplification par PCR d'une partie du premier intron du gène de l'Amélogénine située en dehors des régions recombinantes, en utilisant un couple d'amorce s'hybridant en amont et en aval de cette délétion. La taille des fragments amplifiés, est de 106 paires de base pour le chromosome X est 112 paires de base pour chromosome Y. ces amorces sont généralement incluses dans les kits commerciaux utilisés pour l'identification génétique des individus (Sullivan et al, 1993).

Néanmoins chez certains hommes, l'amélogénine du chromosome Y n'est pas amplifiée suite à une délétion sur le bras court du chromosome, ce qui donne un profil ADN qui peut être faussement interprété comme profil féminin (Jobbling et al, 2007).

V-Nature des prélèvements :

Des profils ont été également obtenus à partir des prélèvements par écouvillonnage sur la surface de la peau (von Wurmb-Schwark et al., 2006), ainsi qu'à partir de traces de contacts direct sur divers objets (Wickenheiser, 2002 ; Phipps et Petricevic, 2007).

Il existe deux types d'indices biologiques, l'un dit « trace » prélevé sur les lieux du crime et l'autre dit « comparaison » prélevé sur les personnes connues (suspect, victime ou parents).

V-1 Sur scène :

-Sang : est le matériel biologique le plus souvent rencontré dans les scènes de crimes, principalement en raison de la nature violente de nombreux crimes, mais également du fait qu'il soit facile à visualiser en comparaison aux autres liquides biologiques (Goodwin et al.,2007).

-Salive : contient des cellules de la paroi buccale. En criminalistique la salive est retrouvée essentiellement sur les mégots de cigarette, timbres et enveloppes, les verres et bouteilles (Tanaka,2000).

-Sperme : formé principalement de spermatozoïdes, contient également des cellules épithéliales et des globules blancs, ce qui permet d'obtenir un profil ADN même sur un individu azospermique. Il est particulièrement recherché en cas d'agression sexuelle, et peut être prélevé sur la victime ou ses vêtements (Skinker,1997).

-Autres traces : Eléments pileux, urines, excréments, os, ongle, pellicules, phanère, tissus, poils d'animaux domestiques... (Fridez,2000 ; Coquoz,2003).

V-2 Prélèvement de comparaison :

Le matériel de comparaison d'un individu, est un échantillon de ce même individu contenant son matériel génétique. Si l'individu recherché est inaccessible, on peut utiliser des effets personnels (brosse à dent, rasoir ou peigne) ou du matériel biologique de parents proches dont l'ADN permet de tirer des conclusions solides (Coquoz, 2003).

Le matériel de comparaison traditionnel est le sang. Il présente plusieurs avantages. C'est une source stérile, disponible en grande quantité.

L'autre source majeure de matériel de comparaison est la salive ou les cellules de la muqueuse buccale. Il fournit des quantités d'ADN variant substantiellement d'un prélèvement à l'autre. Son grand avantage est son accessibilité sans blesser l'intégrité corporelle de donneur (Coquoz, 2003 ; Belkhirat et Khaous, 2009).

V-3 Prélèvement sur victime d'agression sexuelle :

Dans un cadre légal et règlementaire, l'examen d'une victime de viol doit être effectué par un médecin légal. Les prélèvements sont effectués en fonction des éléments du dossier.

D'abord les prélèvements vaginaux et/ou anaux, ensuite les effets vestimentaires de la victime et enfin les prélèvements sous unguéaux, réalisé sous les ongles de la victime afin de recueillir d'éventuelles cellules de l'agresseur.

L'examen peut être réalisé sur réquisition des autorités judiciaires dans le cas de dépôt de plainte préalable par la victime adulte ou par les parents de la victime mineure. Les examens gynécologiques et prélèvements doivent se faire en urgence et le certificat doit être remis à l'autorité judiciaire requérante, ou bien sans réquisition, il s'agit en général de faits récents, la victime ne voulant pas ou n'osant pas porter plainte. Cependant, il faut réaliser l'examen et les prélèvements comme en réquisition. Un certificat descriptif sera remis à la victime dans la perspective d'un éventuel dépôt de plainte ultérieur (Hariot, 2001).

V-4 Trace de sperme :

Le sperme formé principalement de spermatozoïdes, contient également des cellules épithéliales et des globules blancs, ce qui permet d'obtenir un profil ADN même sur un individu azoospermique. Il est particulièrement recherché en cas d'agression sexuelle, et peut être prélevé sur la victime ou ses vêtements (Skinker, 1997).

V-4.1 Le fluide séminal :

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

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

Certains états pathologiques comme maladies génétiques ; l'abus d'alcool et de drogue... peuvent entraîner une réduction ou une absence totale de spermatozoïdes (Stuart et al, 2004)

V-4.2 Les cellules de sperme :

Le composant cellulaire de sperme est le spermatozoïde ou cellule spermatique ce dernier est formé par la tête de forme ovoïde contenant le noyau cellulaire et une structure flagellée (Stuart et al ;2004).

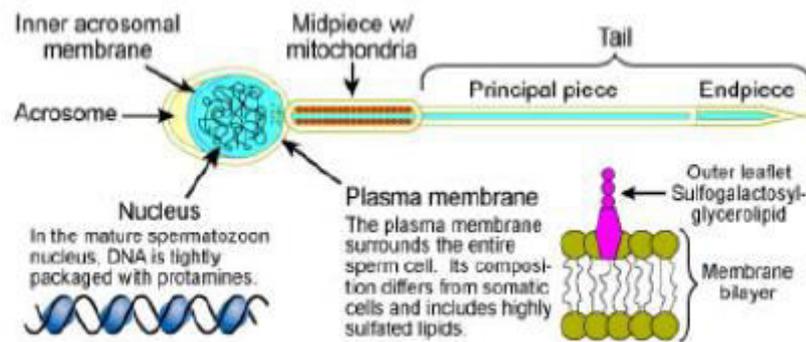


Figure 2 : La composition du spermatozoïde humain (Refaat, 2014).

V-4.3 Tests préliminaires : Identification du sperme :

Les tâches de sperme peuvent être caractérisées par la visualisation de spermatozoïdes (par un examen microscopique), par la recherche de phosphatase acide (AP enzymes spécifiques au sperme) sur des preuves d'agression sexuelle, ou par la recherche de l'antigène spécifique de la prostate (PSA ou p30) (Sensabaugh, 1979 ; Saferstein 2001).

VI -Étude d'analyse STR autosomique/chromosome Y lors d'agression sexuelle pour l'identification d'un profil génétique :

VI-1 Extraction de l'ADN :

Un échantillon biologique obtenu à partir d'une scène de crime, sous la forme d'une trace de sang, d'un écouvillon buccal, de sperme ou de tissu provenant d'un individu connu, contient un certain nombre de substances en plus de l'ADN. Les protéines cellulaires qui protègent et empaquent l'ADN dans l'environnement de la cellule peuvent alors inhiber la capacité d'analyse de l'ADN. Par conséquent, les méthodes d'extraction ont été développées pour séparer les protéines et autres matériaux cellulaires des molécules d'ADN. Idéalement, le processus d'extraction d'ADN devrait éliminer les inhibiteurs qui réduisent ou empêchent l'amplification de la réaction de polymérisation (PCR) (Butler et Hill, 2012).

Les objectifs du processus d'extraction d'ADN sont :

- □ La lyse des cellules pour libérer les molécules d'ADN.
- □ La séparation des molécules d'ADN des autres matériaux cellulaires.
- □ l'isolement de l'ADN de haute qualité qui ne se dégradera pas au fil du temps dans une solution stable.

Il existe plusieurs méthodes d'extraction, principalement utilisées dans les laboratoires de médecine légale, mais le procédé exact varie selon la nature de l'échantillon analysé (Butler, 2003).

VI -1.1 Extraction différentielle :

L'extraction différentielle est une technique qui sépare les cellules épithéliales des spermatozoïdes dans le cas des agressions sexuelles, ce qui permet de différencier le profil masculin du profil féminin. Cette méthode implique la lyse préférentielle des cellules épithéliales par une incubation dans un mélange SDS/protéinase K, puis les cellules spermatiques sont lysées par traitement avec le mélange SDS/Protéinase K/dithiothréitol (DTT). Le DTT permet de rompre les ponts disulfures présents dans la membrane nucléaire des spermatozoïdes (Butler, 2003).

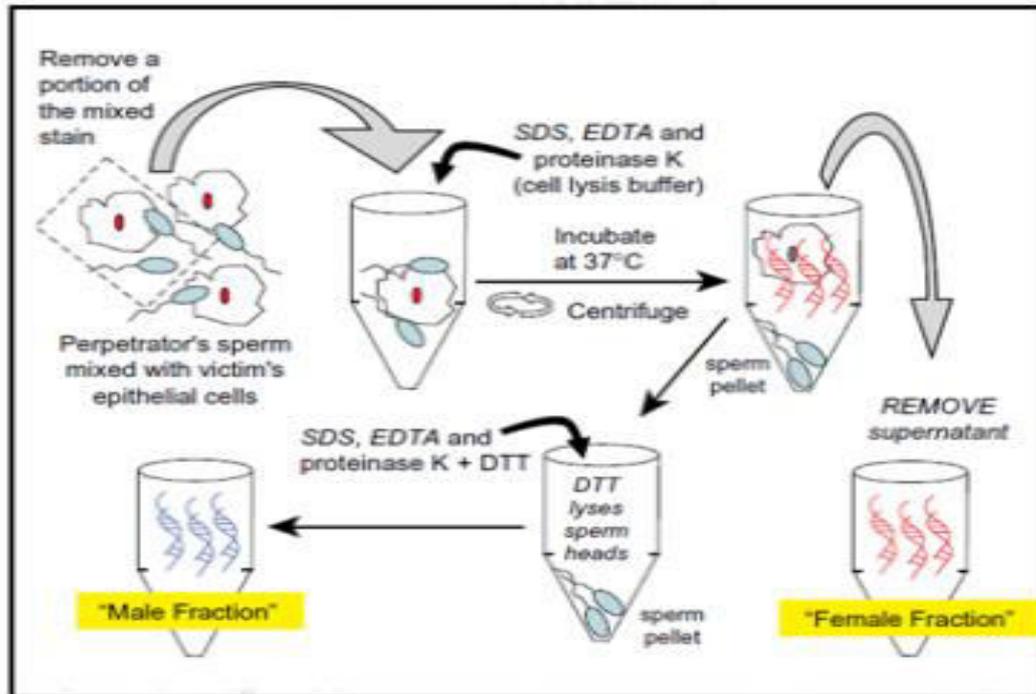


Figure 3 : Processus d'extraction différentielle utilisé pour séparer les spermatozoïdes des cellules épithéliales féminines (Butler, 2011).

VI -1.2 Le challenge de l'extraction différentielle :

- 1) Les échantillons biologiques en mélange sont en quantité souvent 5000 fois inférieure à ceux ordinairement adresser aux laboratoires hospitaliers.
- 2) Il faut prendre en considération le temps écoulé entre le rapport en cause et le prélèvement de l'échantillon.
- 3) Faire une extraction d'un même type cellulaire n'est pas aussi difficile qu'une extraction d'un mélange de cellules de la victime et l'auteur de viol ce qui rend la séparation des cellules spermatique et épithéliale une étape cruciale en cas de prélèvement vaginaux si le nombre de spermatozoïdes est minoritaire leurs caractéristiques génétiques peuvent ne pas apparaitre après analyse (de Mazancourt et al. 2006).

VI-2 Quantification de L'ADN :

Le problème typique d'une analyse ADN est la détermination de la quantité d'ADN optimale pour la réaction PCR (Tringali et al., 2004 ; Kline et al., 2005), une déviation de cette quantité produit des profils présentant un déséquilibre des pics, un allèle ou locus drop-out ou absence totale de profil (Alonso et al., 2004). Le grand impact de la concentration de l'ADN sur le succès de l'amplification par PCR fait qu'une quantification fiable, sensible et spécifique de l'ADN humain est essentielle (Schulz et al., 2006). La quantification de l'ADN fait donc appel à la technique de PCR en temps réel (Swango et al., 2007), qui est réalisée en présence d'un contrôle interne de la PCR (IPC) qui permet la détection des inhibiteurs de PCR (Swango et al., 2006 ; Costello et Schumm, 2006), et renseigne sur l'état de dégradation de l'ADN dans l'échantillon (Swango et al., 2006, Ricci et al., 2006).

VI-2.1 La technologie de l'hydrolyse des sondes :

Une des méthodes appliquées pour la quantification de l'ADN présent dans les extractums (ADN extrait) est basée sur la technologie de l'hydrolyse des sondes. La chimie utilisée dans l'expérimentation est la Taqman. Cette technologie repose sur l'activité 5' nucléase de l'ADN polymérase impliquée dans la réaction de PCR. En effet, en progressant, celle-ci va déplacer et cliver la sonde allèle spécifique hybridée à l'ADN cible. Cette sonde est dessinée de manière à permettre la capture de la fluorescence du fluorophore donneur (en 5' de la sonde) par le fluorophore receveur (en 3' de la sonde). Ainsi, lors du clivage de la sonde par l'ADN polymérase, le fluorophore donneur et receveur sont éloignés permettant la détection de la fluorescence (Linacre et Tobe, 2013).

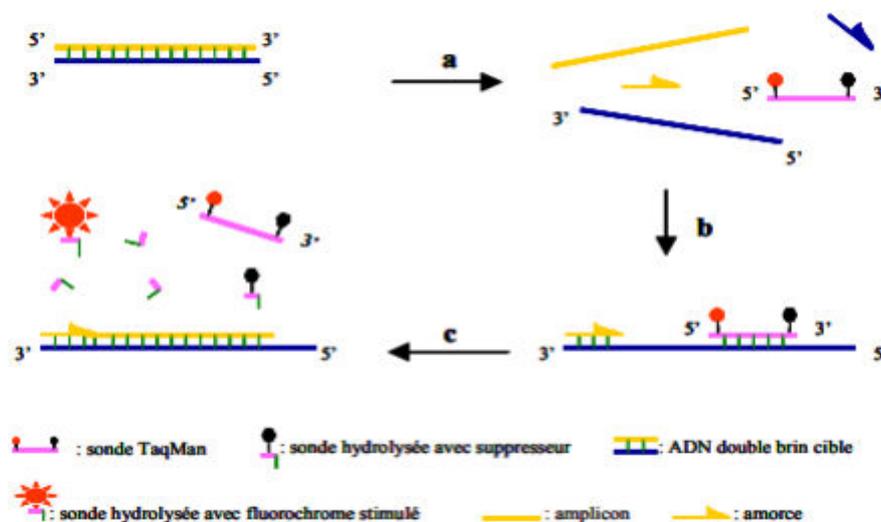


Figure 4 : principe de la sonde Taqman (Poitras et Houde, 2002).

- (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution.
- (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et l'approximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute.
- (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du supprimeur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

VI-3 Amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) :

La PCR (Polymerase Chain Reaction) fut inventée par Mullis en 1983 et brevetée en 1985. Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase. Il s'agit d'une répllication in vitro des séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de générer des dizaines de milliards d'exemplaires d'un fragment d'ADN particulier (séquence d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel).

En effet, si la séquence d'intérêt est présente dans l'extrait d'ADN, il est possible de l'amplifier sélectivement en très grande quantité. La puissance de la PCR repose sur le fait que la quantité d'ADN matriciel n'est pas, en théorie, un facteur limitant. On peut donc amplifier des séquences nucléotidiques à partir de quantités infinitésimales d'extrait d'ADN.

La disponibilité de quatre fluorochromes distincts facilite le développement du système de réaction de polymérisation en chaine des séquences (Doutremepuich, 2001). Il s'agit alors d'une analyse de STRs au moyen d'un kit multiplexe.

VI-8 Post amplification :

Avant de faire passer les amplicons des échantillons sur le séquenceur, l'ADN doit se présenter sous forme monocaténaire, à cet effet, la dénaturation de l'ADN est réalisée en utilisant le formamide (agent intercalant) et la chaleur, suivie par un choc thermique pour assurer et prolonger la dénaturation de l'ADN. Durant cette étape, un standard de taille est également ajouté fournissant 16 simples fragments classés selon leurs tailles, chacun des fragments étant marqué avec un fluorophore de couleur orange (Poitras et Houde, 2002).

VI-5 Electrophorèse capillaires :

La dernière étape dite de génotypage consiste en une migration différentielle des amplicons dans des capillaires contenant une solution de polymère (électrophorèse capillaire) Leur détection est réalisée par fluorimétrie grâce aux marqueurs fluorescents qui leur sont couplés lors de la PCR. Electrophorèse capillaires est une technique physico-chimique qui sépare des constituants ionisés en fonction de leur taille dans un champ électrique (Butler et al, 2001).

Depuis une vingtaine d'années, le développement de nouveaux supports (gels de polyacrylamide, d'agarose et enfin capillaires de silice) comme champ migratoire a donné à l'électrophorèse un nouvel essor (Butler et al, 2001).

Le support de migration est alors un gel liquide POP4-ABI contenant le polymère de séparation, les sels nécessaires à la migration et l'urée (condition dénaturantes) (Butler et al, 2005), (McCord et al, 2007).

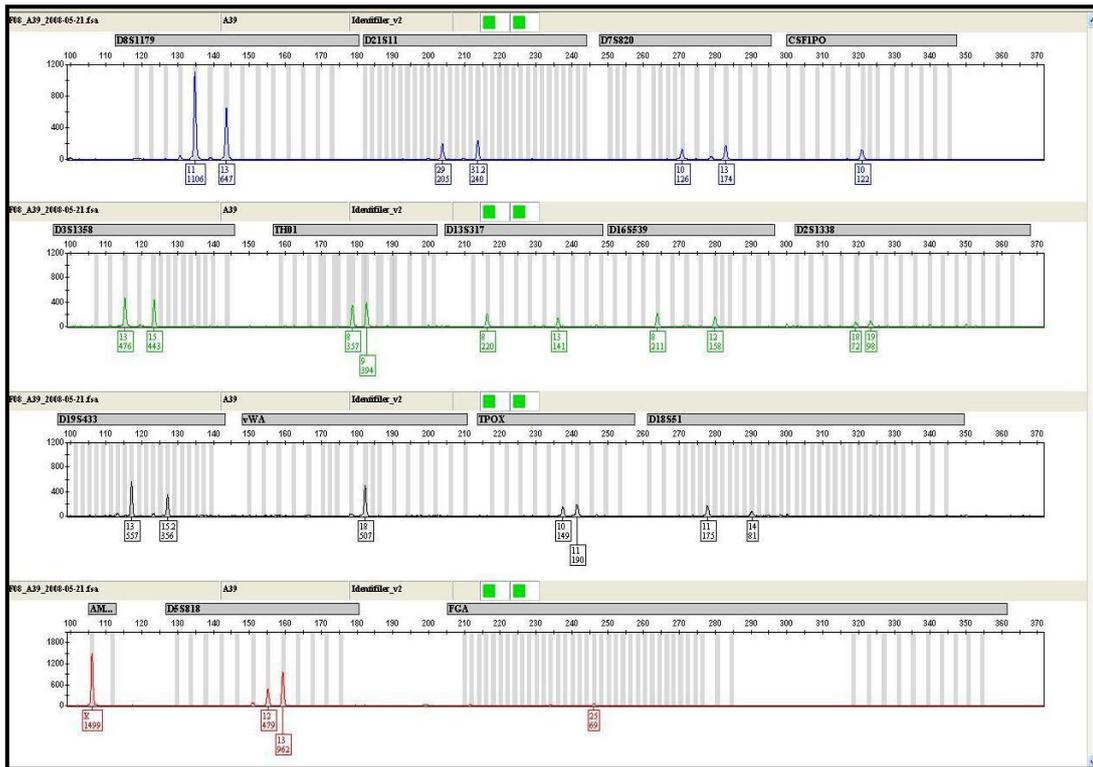
Les avantages du l'Electrophorèse capillaires :

- **La séparation des fragments**
- **Préserver les échantillons**
- **Les résultats sont générés dans un format de données brutes**
- **Détection automatisée évite la contamination (Butler, 2005).**

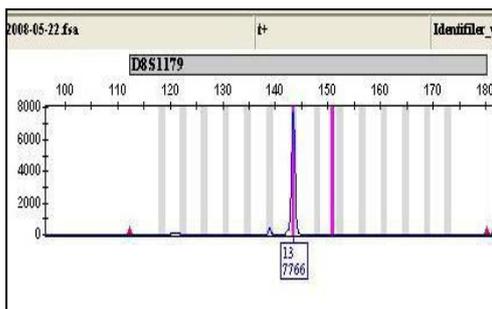
VI-6 Validation des profils génétiques :

Une fois les résultats d'ADN obtenus après séparation et détection des produits PCR, un profil génétique est généré grâce à des logiciels d'analyses génétiques, les données de l'électrophorégramme étant traduites en un profil exploitable.

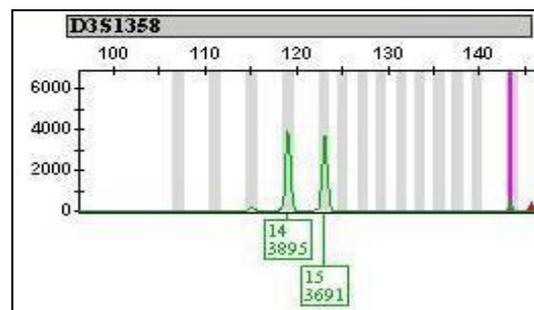
L'objectif des laboratoires d'analyse de l'ADN est en effet de produire un profil d'ADN pour tous les types d'échantillons inconnus ou de référence en vue de comparaisons à des fins d'identification (Sozer, 2014).



(a) Exemple de profil génétique déterminé à partir d'un prélèvement buccal.



(b) Personne homozygote pour le marqueur D8S1179



(c) personne Hétérozygote pour le marqueur D3S1358

Figure 5 : Présentation du résultat d'analyse (Profil génétique déterminé à partir d'un échantillon biologique) avec le Kit Identifiler (Laboratoire Central de Police Scientifique et Technique de la Sûreté Nationale, 2009).



CHAPITRE II: Matériels et méthodes

Chapitre II :

Toutes les étapes de l'expertise qui vont suivre ont été effectuées au niveau du département d'identification génétique du Laboratoire de la Police Scientifique et Technique (LPS), pour une période de cinq mois, de Février à juin 2020 suivant les exigences de la norme ISO 17025, une séparation physique est mis en place des examens effectués sur les traces biologiques a analysé a des échantillons de références qui sont des prélèvements des suspects (présumés agresseurs), afin d'éviter toute contamination entre les deux types d'échantillons.

Dans ce contexte, notre étude traitera des affaires requis selon les normes de l'assurance qualité, considérés comme des lignes directrices pour l'analyse de nos échantillons et l'interprétation des résultats obtenus. En appliquant la procédure d'évaluation des résultats d'ADN autosomique, amplifiés par le kit Identifiler[®] Plus et l'ADN chromosome Y par le kit Y filer, avec des paramètres bien définis par le laboratoire de Police Scientifique et Technique (LPS) ; et cela dans le but de fournir une Procédure Opérationnelle Standard (SOP).

I-Matériels :

I-1 Matériel biologique :

Pour la réalisation de ce travail, nous avons effectués une expertise génétique sur sept cas d'affaires d'agressions sexuelles. Ce choix a été fixé à cause des problèmes d'interprétations des mélanges de profils génétiques partiels, obtenus après analyse d'ADN autosomique, amplifié par le kit Identifiler[®] Plus et les haplotypes Y par le kit Y filer.

Les traces de sperme analysés ont été prélevées sur la partie génitale (écouvillon vaginal/écouvillon anal) ou bien sur des effets vestimentaires plus précisément des sous-vêtements (Tableau 3 et 4).

I-1.1 Echantillonnage :

Les prélèvements biologiques de référence ont été réalisé sur des tubes EDTA pour le sang par le médecin avec fiche de prélèvement ou bien des prélèvements buccaux sur écouvillons stériles effectués par des agents qualifiés avec une fiche de prélèvement.

I-2 Matériel non biologique :

Les différents salles, équipements et réactifs utiles lors du protocole d'analyse ont été répertoriés.

Lors des différentes manipulations, nous avons fait appel au matériel suivant :

I-2.1 Appareillage : annexe 2.

Tableau III : Examen des scellés de trace.

N° d'affaire	N° de scellé	Description du scellé
01	01	Un sous vêtement de couleur blanche pour femme présentant des traces suspectes.
02	01	Un prélèvement vaginal sur un écouvillon effectué sur la victime.
	02	Un prélèvement anal sur écouvillon effectué sur la victime.
03	01	Un prélèvement vaginal sur écouvillon effectué sur la victime.
	02	Un sous vêtement de couleur rouge pour femme présentant des traces suspectes.
04	01	Un sous vêtement féminin (culotte noir) présentant des traces suspectes.
05	01	Un scellé judiciaire contenant une pile de lingette portant des traces suspecte.
	02	Un prélèvement vaginal sur écouvillon effectué sur la victime.
06	01	Un prélèvement vaginal sur un écouvillon effectué sur la victime.
	02	Un prélèvement vaginal sur un écouvillon effectué sur la victime.
	03	Un prélèvement anal sur un écouvillon effectué sur la victime.
07	01	Un pantalon noir appartenant à la victime.

Tableau IV : Examen des scellés de comparaison.

N° d'affaire	N° de scellé	Description du scellé
01	02	Un prélèvement sanguin sur un écouvillon appartenant au suspect.
02	03	Un prélèvement buccal sur un écouvillon appartenant a la victime.
	04	Un prélèvement buccal sur un écouvillon appartenant au suspect.
03	03	Un prélèvement sanguin sur un écouvillon appartenant au suspect.
04	02	Un prélèvement sanguin sur un écouvillon appartenant au suspect.
	03	Un prélèvement sanguin sur un écouvillon appartenant a la victime.
05	03	Un tube de sang appartenant au suspect,
06	04	Un prélèvement sanguin sur un écouvillon appartenant a la victime.
	05	Un prélèvement sanguin sur un écouvillon appartenant au suspect.
07	02	Un prélèvement buccal sur un écouvillon appartenant a la victime.
	03	Un prélèvement buccal sur un écouvillon appartenant au suspect.

II-Méthodes :

Dans ce travail nous avons traité des affaires réelles et réalisé une expérience afin de déterminer des profils génétiques à partir de traces de sperme laissés sur des sous-vêtements ou des prélèvements anaux ou vaginaux sur des écouvillons.

II-1 Nettoyage et préparation de la surface de travail :

Il s'agit d'une étape préparatoire obligatoire avant chaque examen de scellés, et elle consiste en :

- Nettoyage de la paillasse avec l'eau de javel 10% ou SDS 0,1%.
- Division de la surface de travail en 3 parties distinctes.
- Nettoyage du matériel et équipements à utiliser.
- Mettre du papier paillasse pour déposer les pièces.

-Ouverture du dossier : une fois que l'affaire est distribuée selon un ordre des analystes dans un registre de roulement des affaires, le chargé d'affaire la prend et il procède à :

- ✓ Lire attentivement la réquisition.
- ✓ Vérifier les pièces selon la réquisition.
- ✓ Séparer les scellés trace et comparaison.
- ✓ Conserver les scellés comparaison dans leur emplacement.
- ✓ Procéder à l'ouverture des scellés traces suivant un protocole d'assurance qualité.

II-2 Recherche des taches suspectes :

-Identifier chaque numéro d'ADN qui sera unique avec un code barre : chaque numéro d'ADN correspond à un scellé ou sous scellé ou bien des taches prélevées sur un scellé.

-Fixation avec photographie.

-Procédé à la recherche des tâches suspectes et les validé avec des tests préliminaires.

II-2.1 Les tests préliminaires des échantillons traces :

Les étapes préliminaires consistent en la recherche de traces biologiques de sperme par des tests indicatifs (chimiques, immunologique) indispensable à la détection, non seulement de la nature des traces visibles mais également aident à la recherche de traces invisibles sur différents supports.

II -2.1.1 Test d'orientation :

Examen optique sur tissu et recherche de phosphatase acide sur les prélèvements et les pièces reçus.

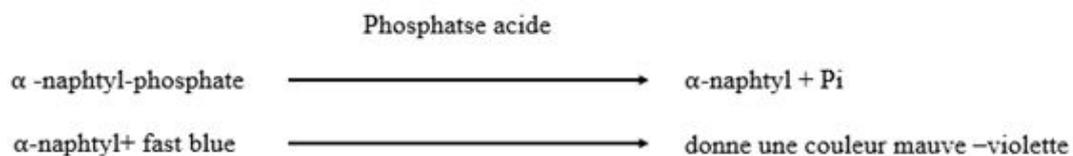
II -2.1.1.1 Examen optique au crimelight :

Pour la détection de l'emplacement des taches de sperme sur le tissu, on utilise un crime light, un appareil capable de produire une lumière bleue à 470 nm pour vérifier la présence des taches de sperme qui émet une fluorescence à cause des flavines, l'observation se fait avec des lunettes de protection à filtre jaune ou orange.

Les taches de sperme présumées, sont alors délimitées à l'aide d'un feutre et découpées pour extraire le sperme du tissu par macération. Cependant la présence de la fluorescence n'indique pas toujours la présence de sperme. En effet, certaines bactéries, l'urée et la salive sont capables d'émettre la même fluorescence.

II-2.1.1.2 Examen chimique : recherche de phosphatase acide (PA) :

La phosphatase acide AP est une enzyme en concentration particulièrement élevée dans le sperme et est une enzyme qui catalyse les réactions de décomposition des groupements phosphates, Sa détection est possible par utilisation de composé phosphaté conduisant à la formation d'un produit coloré lors de la réaction catalysée par l'enzyme. La méthode est basée sur l'hydrolyse de α -naphtyl phosphate au Ph 5,0 par l'AP produisant le α -naphtol et le phosphate inorganique selon la réaction suivante :



Le test de phosphatase acide peut se faire selon deux techniques en fonction de la nature et la taille de l'échantillon :

- ✓ La technique se fait sous presse «in situ » pour les vêtements de grande taille.
- ✓ La technique se fait en tube après macération pour les prélèvements vaginaux et anaux et pour les bouts de tissus découpées à partir des sous-vêtements

Protocole de macérations :

- On place 1 cm² du tissu analysé ou l'écouvillon dans un tube eppendorf.
- On ajoute 750 μ l de l'eau physiologique puis on laisse macérer à température ambiante pendant 2h ou durant toute la nuit au réfrigérateur.
- Le macérât est ensuite passé dans un tube passoir et centrifugé à 13000 tpm pendant 3minutes.

Le surnageant est récupéré pour réaliser les tests préliminaires PA et l'Antigène Prostatique Spécifique (PSA).

Le test PA en tube se fait sur le surnageant récupéré après macération du tissu ou l'écouvillon selon le protocole suivant :

Protocole PA en tube :

- Ajouter 100µl de solution alpha-naphtyl-phosphate à 100µl du surnageant de macérât obtenu après centrifugation, on agite et laisse reposer 15 min.
- On ajoute 100µl de fast bleu et l'observation se fait à l'œil nu.

Un résultat positif apparaît en violet tandis qu'en absence de sperme l'échantillon reste incolore.

Protocole de technique sous presse :

- Le vêtement ou le tissu est posé à plat et recouvert d'une feuille papier.
- On pulvérise dessus la solution d'alpha-naphtyl-phosphate et on compresse pendant 20 min.
- On pulvérise dessus la solution chromogène fast bleue
- La présence du sperme se traduit par la coloration violette.

Cependant la spécificité du test de la PA est insuffisante pour éviter toute ambiguïté car il peut donner des faux positifs et faux négatifs donc il faut utiliser un test de confirmation.

II -2.1.2 Test de confirmation : recherche de PSA

La recherche de l'antigène prostatique spécifique (Prostate Specific Antigen, PSA) ou protéine p30 est devenue la méthode de choix pour la détection du sperme, en particulier en absence du spermatozoïde lors des agressions sexuelles dans le domaine forensique (Healy et al, 2007).

Le test immuno-chromatographique SERATEC PSA-SEMIQUANT permet de détecter la glycoprotéine P30 produite par les cellules épithéliales du tissu prostatique.

Cette protéine présente dans le liquide séminal à la concentration de 0,5 à 3,0 mg/ml a pour fonction de fluidifier le liquide séminal. Sa sécrétion est indépendante de la production de spermatozoïdes.

Principe :

Le test utilise deux anticorps anti-PSA murins reconnaissant deux épitopes différents de la PSA conjugués à un colorant et pouvant se fixer à la PSA humaine.

Les complexes antigène-anticorps obtenus migrent à travers la membrane vers la zone de réaction où se trouvent des anticorps polyclonaux anti-PSA immobilisés. Le complexe antigène-anticorps avec les particules colorées entraînent la formation d'une lignée indiquant la présence de la PSA humaine.

Les anticorps monoclonaux mobiles non liés à la PSA humaine migrent sur la membrane vers une zone de contrôle dans laquelle résident les anticorps anti-Ig immobilisés. Un complexe se forme et s'accompagne également de la formation d'une ligne. Le test est considéré comme valide quand une ligne dans la zone de contrôle est observée. Ainsi, la région du contrôle C et la région standard interne i sont indépendantes de la présence de PSA dans les échantillons biologiques.

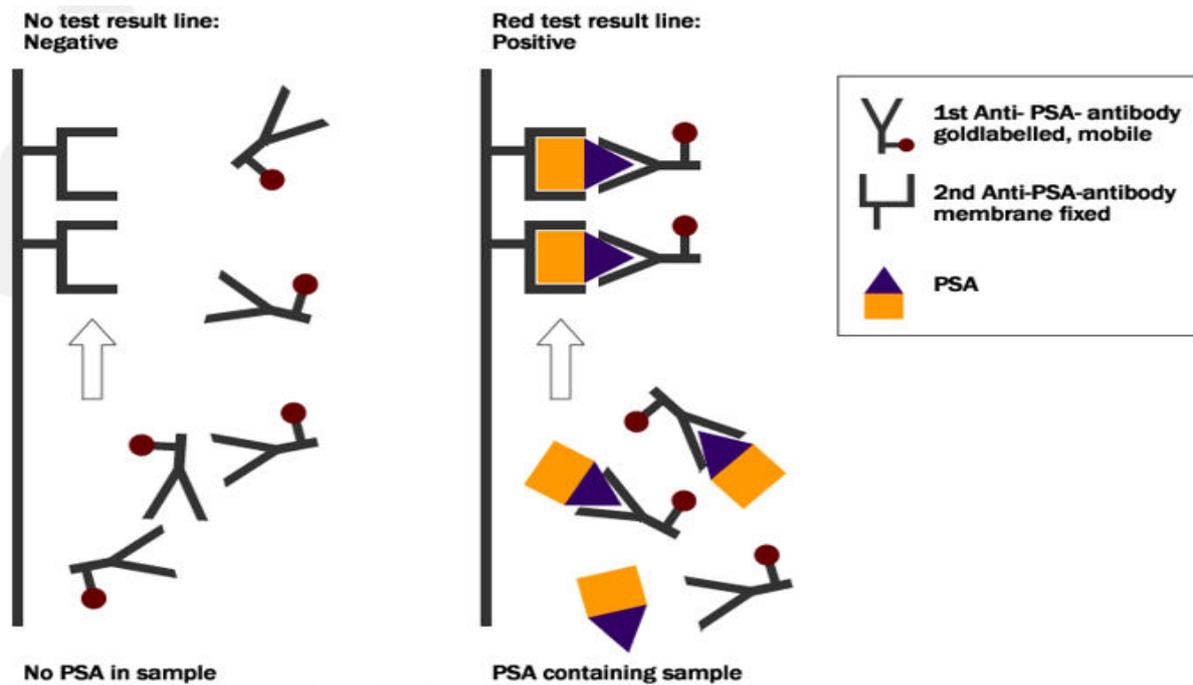


Figure 06 : Réaction anticorps -antigène.

Interprétation du test :

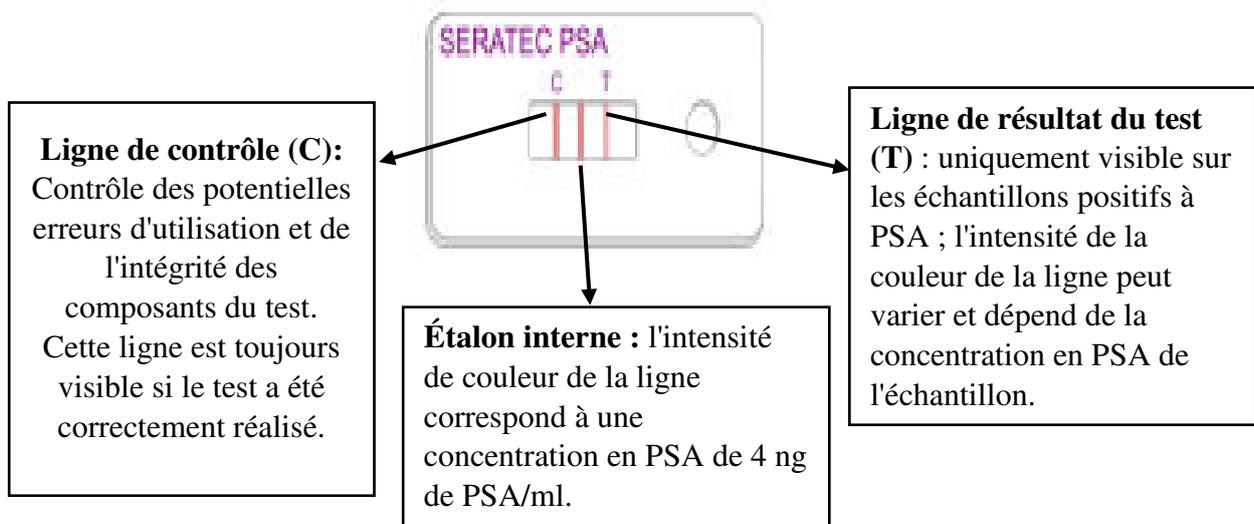


Figure 07 : Conception de bandelette de test immunochromatographique (Original).

Protocole :

- Mettre les échantillons dans des tubes eppendorfs.
- Ajouter 500µl de la solution du tampon spécialement élaborée pour les PSA semiquant.
- Laisser macérer pendant 2h à 4 C°.
- Récupérer le macérât dans de nouveaux tubes passoires.
- Centrifuger les tubes à 13.000 rpm pendant 3 minutes.
- Le surnageant sera utiliser pour le test d'orientation et confirmation Seratec PSA Semiquant.
- Mettre tous les composants du test à température ambiante avant la réalisation. Les basses températures peuvent entraîner une diminution de la sensibilité.
- Retirer la cassette de test du sachet de protection et l'étiqueter pour permettre son identification.
- Ajouter 3 gouttes de l'échantillon (env. 120 µl) dans la chambre d'échantillonnage à l'aide de la pipette en plastique fournie et lancer le chronomètre.
- Lire le résultat du test après 10 minutes à température ambiante. Le liquide dans la chambre d'échantillonnage doit être totalement absorbé.
- Conserver le reste de l'échantillon pour éventuellement effectuer d'autres tests.

II-2.3 L'extraction de l'ADN :

II-2.3.1 l'extraction ordinaire (sperme pur) :

Lors d'agression sexuelle, l'extraction ordinaire s'effectue sur les échantillons des sous-vêtements contient des taches de sperme.

Principe de la méthode :

L'extraction de L'ADN par le kit QIAGEN est basée sur l'utilisation de colonne revêtue d'une matricide silice qui est capable de fixer sélectivement l'ADN (silice chargé positivement et l'ADN chargé négativement) en condition en force ioniques élevées.

Processus opératoire :

-Avant de commencer la lyse si l'ATL contient des cristaux le faire chauffer à 70°C en appliquant une agitation douce.

A- Lyse :

- 1- Dans un tube de 2ml, immerger un échantillon de 0.5 cm² dans 300µl de tampon ATL et 20µl de PK du kit et lorsque vous manipulez de sperme ajouter 20 µl de DTT 1M.
- 2- Vortexer pendant 10 secondes et incubé pendant 1h à 56° avec une agitation de 900rpm, en absence de bloc chauffant avec agitateur, faire agiter les échantillons pendant 10 secondes chaque 10 minutes.
- 3- Centrifuger quelques secondes pour faire tomber les gouttelettes accumulées dans le couvercle d'ependorf.
- 4- Passer l'échantillon en tube passoire pour récupérer le lysat.
- 5- Ajouter 300µl de tampon AL et vortexer pour bien mixer pendant 10 secondes.
- 6- incubé pendant 10min à 70°C sur le bloc chauffant avec agitateur de 900rpm, en absence de bloc chauffant avec agitateur, faire agiter les échantillons pendant 10 secondes chaque 3min.

B- La purification :

- 1- Centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttelettes et ajouter 150µl d'éthanol absolu.
- 2- Vortexer pendant 15 seconde, centrifuger brièvement et déposer le tout doucement au centre d'une colonne QIAamp MinElute column, préalablement identifiée sans toucher la membrane avec le cône de la pipette.
- 3- Centrifuger 1min à 8000 rpm.
- 4- Éliminer le tube contenant l'éluant, transférer dans un nouveau tube de 02ml et ajouter 500µl de tampon AW1.
- 5- Centrifuger 1min à 8000 rpm : 45min un nouveau tube de 02ml et ajouter 700 µl de tampon AW2.
- 6- Centrifuger 1 min à 8000 rpm.
- 7- Éliminer le tube contenant l'éluat transférer la colonne QIAamp MinElute column dans un nouveau tube de 02ml et ajouter 700µl d'éthanol absolu.
- 8- Centrifuger 1min à 8000 rpm.
- 9- Éliminer le tube contenant l'éluat ; transférer la colonne QIAamp MinElute column dans nouveau tube de 02 ml.
- 10- Centrifuger 3min à 14000rpm.
- 11- Placer la colonne QIAamp MinElute column dans un nouveau tube de 1 ;5 ml stérile préalablement identifié ouvrir la couvercle de la colonne et laisser sécher à température ambiante pendant 10 minute ou à 56° pendant 03 minute

12- Ajouter 20 à 50 µl du tampon ATE ou bien de l'eau distillée, fermer le capuchon de la colonne.

13- Incuber pendant 1min à température ambiante, centrifuger pendant 1min à 14000rpm pour récupérer l'extractum Jeter la colonne.

14- Conserver les tubes d'ADN à -20° C.

II-2.3.2 L'extraction différentielle :

Lorsqu'un échantillon est prélevé sur un écouvillon vaginal/anal contient le sperme d'agresseur mélangé aux cellules épithéliales de la victime. Il est nécessaire d'effectuer une extraction différentielle qui consiste à séparer les cellules épithéliales de la victime dans une fraction (dite fraction féminine) et les spermatozoïdes (dite fraction masculine) ensuite l'extraction de l'ADN est effectuée sur chacune des fractions obtenues après une lyse différentielle afin d'isoler les spermatozoïdes de toutes les autres cellules.

Protocole :

1-Lyse cellulaire douce des cellules épithéliales :

Dans un premier temps une lyse dans des conditions douces permet de lyser les cellules autres que les spermatozoïdes.

- Le culot obtenu après macération et centrifugation de l'échantillon est resuspendu dans 500µl de tampon de lyse.
- On ajoute 12µl de protéinase K, on vortexe légèrement.
- Après incubation 2h 56° le tube est soumis à une centrifugation pendant 5 min à une 13000 tpm.
- Le surnageant est récupéré dans un tube eppendorf et conservé à 4°C en attendant l'extraction l'ADN.

Le culot est soumis à 3 lavages à l'eau physiologique pour éliminer l'interphase et l'ADN féminine interférant le culot contenant les têtes de spermatozoïdes.

2- Lyses des spermatozoïdes :

- Le culot remis en suspension dans 500µl de tampon de lyse est traité par addition de 12µl de protéinase K (PK)
- 20µl de dithiothréitol (DTT) et incubation pendant 2h à 56°C ou toute la nuit.

3- Extraction et purification :

La purification et l'élution sont faites de la même manière que l'extraction ordinaire.

II-2.4 La quantification DUO de l'ADN :

Le kit de quantification d'ADN Quantifiler Duo permet aux laboratoires forensique d'obtenir simultanément une évaluation quantitative et qualitative de l'ADN humain (ADN total) et ADN masculin dans une seule réaction de PCR en temps réel très sensible. Cela guide l'expert à choisir le kit adéquat (STR autosomique, Y-STR ou miniSTR) et rationalise le flux de travail tout en augmentant les taux de réussite des analyses en aval.

Principe :

La PCR en temps réel (rt-PCR, q-PCR) peut être réalisé en utilisant une sonde marquée spécifique de la cible dite sonde TaqMan ou un autre fluorochrome qui se lie à l'ADN.

La sonde TaqMan porte à son extrémité 5' un fluorochrome Reporter et à son extrémité 3' un Quencher. Le Reporter est une molécule qui émet un signal de fluorescence à une longueur d'onde spécifique est mesuré à la fin de chaque cycle de PCR. En absence d'amplification, la sonde reste intacte, le Quencher (suppresseur) absorbe en grande partie la fluorescence du reporter donc le reporter est réprimé. S'il y a amplification, la sonde taqMan est hydrolysée lors de l'étape d'élongation de l'ADN par l'activité exonucléasiques 5'-3' de l'ADN polymérase. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant l'émission de la fluorescence (figure 7).

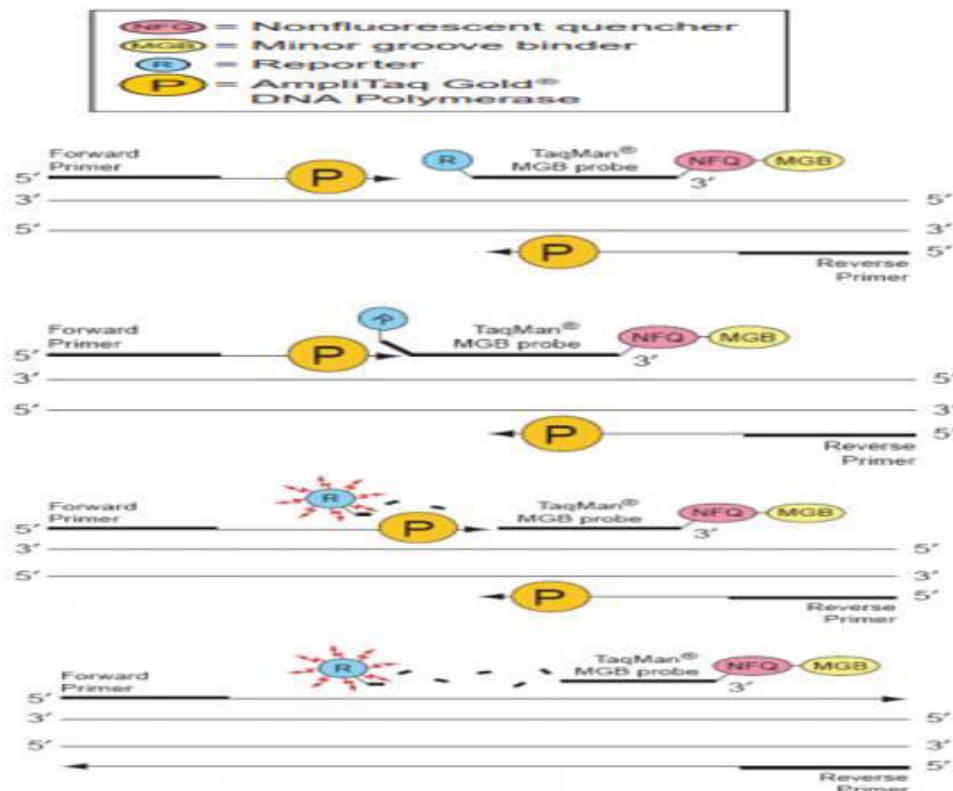


Figure 08 : Principe schématisé de l'essai à la sonde TaqMan. (Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit User Guide)

La cinétique de la réaction PCR met en jeu 3 phases : une phase d'initiation (amplification non détectable), une phase exponentielle et une phase plateau. La cinétique décrit une courbe sigmoïde (figure 8). En mesurant l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle, il est possible de suivre la formation des produits de PCR pendant la phase exponentielle (phase au cours de laquelle la quantité de produits amplifiés est en corrélation directe avec la quantité initiale de matrice) (Tse and Capeau, 2003 ; Vassias, 2012).

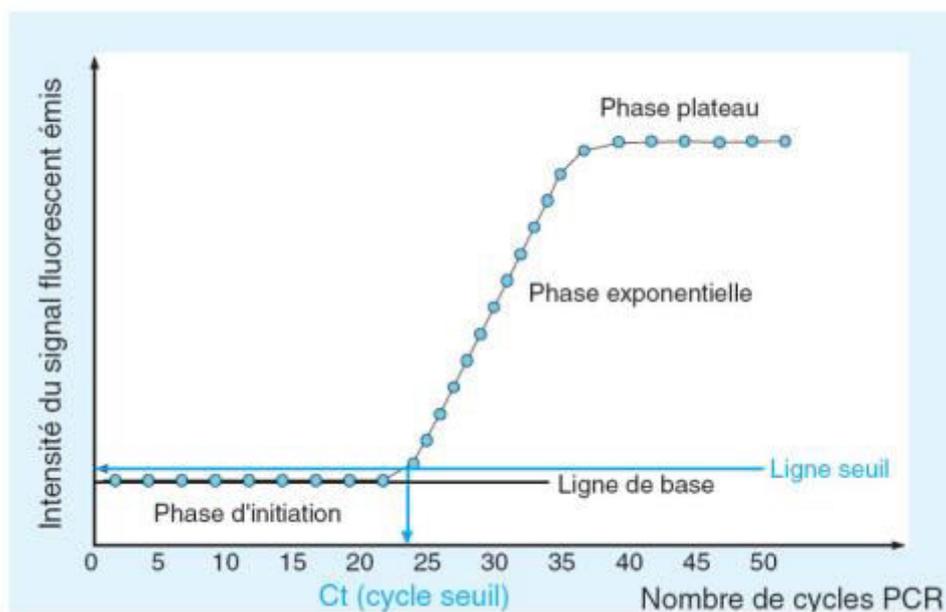


Figure 09 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR quantitative (Tse and Capeau, 2003).

Tableau V : Cible du kit DUO.

Cible	Gène (Ou se fixe l'amorce)	taille	Dye
ADN Humain	RPPH1 14q11.2 (Ribonucléase PRNA H1)	140 pb	VIC
ADN Humain male	SRY Y11p.3 (Sex determining region Y)	130 pb	FAM
IPC	ADN synthétique	130 pb	NED

Le but du kit DUO :

- Quantifier l'ADN humain total et l'ADN humain male.
- Déterminer le ratio ADN male ; ADN femelle.
- Détecter les inhibiteurs.

Composition du kit Quantifiler DUO :

- Primer : les sondes RPPH1-SRY-IPC respectivement étiquetées avec VIC-FAM-NED.
- Reaction Mix : ADN polymerase Taq Gold, des sels, un tampon, des dntpc, Mg⁺⁺, ROX.
- ADN standard : ADN male.
- Buffer dilution (diluant) : Tris HCL+EDTA 5 PH08.

Mode opératoire :

Commencer par remplir le plan de dépôt quantification Real PCR

- 1.Préparer la gamme standard à partir de l'ADN de 200ng / μ l ; procéder aux dilutions suivantes :

Tableau VI : La dilution des 08 standards de la quantification d'ADN.

Volume du standard	Concentration	Dilution
Std 1 : 30 μ l eau pure + 10 μ l DNA standard	50ng / μ l	1 /4
Std 2 : 10 μ l std1 + 20 μ l eau pure	16,7 ng / μ l	1 /3
Std 3 : 10 μ l std2 + 20 μ l eau pure	5 ,56 ng / μ l	1 /3
Std 4 : 10 μ l std3 + 20 μ l eau pure	1,85 ng / μ l	1 /3
Std 5 : 10 μ l std4 + 20 μ l eau pure	0,62 ng / μ l	1 /3
Std 6 : 10 μ l std5 + 20 μ l eau pure	0,21 ng / μ l	1 /3
Std 7 : 10 μ l std6 + 20 μ l eau pure	0,068 ng / μ l	1 /3
Std 8 : 10 μ l std7 + 20 μ l eau pure	0,023 ng / μ l	1 /3

- 2.Vortexer les tubes d'ADN q quantifier, le témoin négatif et les standards.
- 3.Mélanger doucement par retournement le Reaction Mix.
- 4.Vortexer les primers (ne pas centrifuger).
- 5.Après la dilution des 8 standards, ces derniers sont déposés dans la première colonne de la plaque, suivi par les extractums de nos échantillons (tableau 06).

6. Calculer les volumes des différents réactifs nécessaires au mix (se référer au formulaire suivi quantification real time PCR).

Tableau VII : Calcul des volumes nécessaires pour la PCR Temps réel.

Echantillons de trace		Echantillons de comparaison	
Nombre d'échantillon 17+08 Std+02 (un témoins positif et témoin négatif)=27		Nombre d'échantillon 11+08 Std+02 (un témoins positif et témoin négatif)=21	
Réactif	Volume	Réactif	Volume
Reaction Mix	27 x 12,5 µl = 337,5 µl	Reaction Mix	21 x 12,5 µl = 262,5 µl
Primer	27 x 10,5 µl = 283,5 µl	Primer	21 x 10,5 µl = 220,5 µl

7. Repartir 23 µl de ce mix dans chaque puits.

8. Ajouter dans les puits 02µl de chaque échantillon (extractum) et standard (se référer au plan de dépôt) donc le volume total dans chaque puits est égal à 25µl.

9. Recouvrir la plaque avec du papier adhésif.

10. Placer la plaque dans le thermo-cycleur 7500 Fast et lancer le programme 9600Emulation.

Une fois l'ordinateur allumé, mettre en marche le thermocycleur (ABI 7500 sequence détection system de Applied Biosystems) et choisir l'icône 7500 fast syst V1.4.0. Les puits à analyser sont choisis après introduction de la plaque dans le thermocycleur, auxquels on applique les détecteurs des fluorochromes VIC (vert) pour l'ADN humain, FAM (bleu) pour l'ADN male et NED (rouge) pour l'IPC. Le tableau est rempli selon le plan de dépôt.

Les résultats obtenus à partir des échantillons traces en utilisant le kit DUO, peuvent nous orienter l'analyse adéquate :

- ✓ Soit vers l'analyse autosomal STR en utilisant Identifier plus.
- ✓ Soit vers l'analyse Y STR en utilisant Y filer.

11. Procéder au calcul du ratio :

Calcul du ratio ADN male ; femelle :

Le ratio male : femelle :

$$\frac{\text{ADN MALE}}{\text{ADN MALE}} = \frac{\text{ADN FEMELLE}}{\text{ADN MALE}}$$

$$1 = \frac{\text{ADN TOTAL HUMAIN} - \text{ADN MALE}}{\text{ADN MALE}}$$

- Le ratio calculé est [**1 < 10**], l'analyse est réalisée par STR Autosomal.
- Le ratio calculé est [**1 > 10**], l'analyse est réalisée par haplotype Y.

II-2.5 Amplification d'ADN par la méthode de PCR :

La PCR (Réaction de polymérisation en chaîne) permet d'amplifier de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement en utilisant plusieurs amorces spécifiques de différentes régions d'intérêt.

Chacune des amorces étant marquée par un fluorochrome différent permettant d'attribuer un allèle à un système de STR donné (MANSUET-LUPO E al ,2007).

Selon le ratio de quantification DUO la PCR s'oriente vers deux kits différents.

II-2.5.1 L'amplification par le kit AmpFISTR Identifier plus :

On utilise ce kit quand le ratio calculé est [**1 < 10**], qui permet l'amplification de 15 répétitions tétranucléotidique et le marqueur de sexe en une seule réaction.

Tableau VIII : le système des 4 fluorochromes des STR.

Couleur	STR
VIC (vert)	D3 S158- TH01- D13 S317-D16S539
FAM (bleu)	D8S1179-D21S11-D7S820-CSF1PO
NED (jaune)	D2S1338-D19S433-vWA-TPOX
PET (rouge)	D18S51-Amel-D5S818-FGA

Ce kit utilise un système de 4 fluorochromes (tableau 08) marqueurs sur les amorces d'une manière à identifier des différents STR de différents mais de même taille afin d'éviter le chevauchement des fragments d'ADN au moment de l'électrophorèse capillaire

Mode opératoire :

-Le kit d'amplification cité précédemment, fourni par Applied biosystems, contient une quantité de réactif suffisante pour réaliser 200 amplifications.

-L'amplification de l'ADN en utilisant ce kit nécessite 10 µl d'échantillon.

-Pour le bon déroulement de cette PCR, la concentration optimale d'ADN doit être comprise entre 0,05 et 0,1 ng /µl. Pour des concentrations élevées, les échantillons doivent être dilués.

- Commencer par remplir le plan de dépôt de l'amplification puis identifier une plaque PCR (numéro amplification) et vérifier la compatibilité des numéros d'ADN porté sur les tubes à amplifier et le plan de dépôt (Tableau 09 et 10).

Tableau IX : Le plan de dépôt des échantillons traces dans la plaque de PCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ech 1,1	7,1										
B	Ech 2,1	T+										
C	Ech 2,2	T-										
D	Ech 3,1											
E	Ech 3,2T1											
F	Ech 3,2T2											
G	Ech 5,2T1											
H	Ech 5,2T2											

Tableau X : Le plan de dépôt des échantillons comparaisons dans la plaque de PCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ech 1,2	T-										
B	Ech 2,3											
C	Ech 2,4											
D	Ech 3,3											
E	Ech 5,3											
F	Ech 7,2											
G	Ech 7,3											
H	T+											

Le protocole suivi est dicté par le fournisseur et renferme les étapes suivantes :

- 1-Vortexer doucement pendant 5 à 10 sec les différents réactifs de la PCR (master mix, primer set) ne pas centrifuger les primers (amorces) pour éviter leur concentration au fond du tube.
- 2-Vortexer les tubes d'ADN à amplifier ainsi que les témoins (positif et négatif).
- 3-Calculer les volumes des différents réactifs nécessaires au mix (remplir le formulaire de suivi amplification identifier) (Tableau 11).

Tableau XI : Calcul des volumes des réactifs nécessaires à la PCR.

Echantillons de trace		Echantillons de comparaison	
Nombre d'échantillon 9+02 (un témoin positif et témoin négatif)=11		Nombre d'échantillon 7+02 (un témoin positif et témoin négatif)=9	
Réactif	Volume	Réactif	Volume
Reaction mix	11 x 10 µl = 110 µl	Reaction mix	9 x 10 µl = 90 µl
Amorces	11 x 5 µl = 55 µl	Amorces	9 x 5µl = 45 µl

- 4-Préparer le mix dans un tube eppendorf.
- 5-Vortexer et centrifuger le tube.
- 6-Répartir 15µl de ce mix dans chaque puits (se référer au plan de dépôt).

7-Ajouter 10 µl de chaque échantillon dans son puits en suivant l'ordre de dépôt sans oublier les témoins (positif et négatif), donc le volume final est de 25 µl.

8-Recouvrir la plaque avec une feuille d'aluminium.

9-Placer la plaque dans le thermocycleur et lancer le programme identifier.

Le thermocycleur est programmé pour exécuter 28 cycles d'amplification selon 4 étapes :

- 1- Activation de la Taq polymérase à 95°C, durant 11 minutes
- 2- Dénaturation de deux brins d'ADN à 94°C durant 20 secondes.
- 3- Hybridation à 59°C pendant 3 minutes.
- 4- Elongation à 60°C pendant 10 minutes.

II-2.5.2 L'amplification de l'ADN par le kit Y filer :

Principe :

Le kit d'amplification Y filer est conçu pour les laboratoires forensiques et est optimisé pour aider à améliorer la résolution des traces de preuves et des mélanges d'agression sexuelle qui contiennent de petites quantités d'ADN masculin dans un grand fond d'ADN féminin.

Ce kit est un test multiplex à 4 colorants pour les courtes répétitions en tandem (STR).

Protocole :

Commencer par remplir le plan de dépôt de l'amplification (Abi310-3100ou3130XL) puis identifier une plaque PCR (numéro amplification) (Tableau 12 et 13).

Tableau XII : Le plan de dépôt des échantillons traces dans la plaque de PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ech 3,1	T+										
B	Ech 3,2T2	T-										
C	Ech 4,1											
D	Ech 6,1											
E	Ech 6,2											
F	Ech 6,3											
G	Ech 7,1											
H	T+											

Tableau XIII : Le plan de dépôt des échantillons comparaison dans la plaque de PCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ech 3,3											
B	Ech 4,2											
C	Ech 6,4											
D	Ech 7,3											
E	T+											
F	T+											
G	T-											
H												

1-vérifier la compatibilité des numéros d'ADN portée sur tubes à amplifier et le plan de dépôt.

2-Vortex doucement pendant 5a 10 sec les différents réactifs de la PCR (mix, primers, taq) ne pas centrifuger les primers (amorces) pour éviter leur concentration au fond du tube .

3-Vortexer les tubes d'ADN a amplifié ainsi que les témoins positifs et négatifs.

4-Calculer les volumes des différents réactifs nécessaires au mix (remplir le formulaire de suivi amplification Y-filer).

Tableau XIV : Calcul des volumes des réactifs nécessaires à la PCR.

Echantillons de trace		Echantillons de comparaison	
Nombre d'échantillon 7+02+01 (deux témoins positif et témoin négatif)=10		Nombre d'échantillon 4+02+01 (deux témoins positif et témoin négatif)=7	
Réactif	Volume	Réactif	Volume
Reaction mix	10 x 9,2 µl = 92 µl	Reaction mix	7 x 9,2 µl = 64,4 µl
Taq Gold	10 x 0,8 µl = 8 µl	Taq Gold	7 x 0,8 µl = 5,6 µl
Amorces	10 x 5µl = 50 µl	Amorces	7 x 5µl = 35 µl

5-Préparer le mix dans un tube eppendorfs.

6-Vortexer et centrifuger le tube.

7-Répartir 15µl de ce mix dans chaque puits (se référer au plan de dépôt).

8-Ajouter 10 μ l de chaque échantillon (ne pas en prendre davantage) dans son puits en suivant l'ordre de dépôt sans oublier les témoins positifs et négatifs (0.1ng / μ l).

9-Recouvrir la plaque avec une feuille d'aluminium.

10-Placer la plaque dans le thermocycleur et lancer un programme Y-filer.

Le thermocycleur est programmé pour exécuter 30 cycles d'amplification selon 5 étapes :

- 1- Activation de la Taq polymérase à 95°C, durant 11 minutes
- 2- Dénaturation de deux brins d'ADN à 94°C durant 1 minute.
- 3- Hybridation à 61°C pendant 1 minute.
- 4- Polyadénylation à 72°C pendant 1 minute.
- 5- Elongation à 62°C durant 80 minutes.

II-2.6 Post-amplification :

Le volume des réactifs nécessaires (formamide et standard de taille (Liz)) est calculé selon le tableau suivant :

Tableau XV : Volumes nécessaires pour la post-amplification

Echantillons de trace		Echantillons de comparaison	
Nombre d'échantillon 15+02 (un témoin positif et témoin négatif)= 17		Nombre d'échantillon 11+02 (un témoin positif et témoin négatif)= 13	
Réactif	Volume	Réactif	Volume
Formamide	17 x 8,7 μ l = 144,5 μ l	Formamide	13 x 8,7 μ l = 113,1 μ l
Standard de taille LIZ	17 x 0,3 μ l = 5,1 μ l	Standard de taille LIZ	13 x 0,3 μ l = 3,9 μ l

Le volume de formamide et du standard de taille sont mélangés dans un tube, puis est ensuite vortexé et centrifugé. Un volume de 9 μ l de ce mélange est déposé dans chaque tube selon un plan de dépôt. Un volume de 3 μ l de chaque échantillon amplifié est prélevé de la plaque amplifiée, puis déposé dans le puit correspondant de la plaque post-amplification (Figure).

1,5 μ l de Ladder et les deux témoins (positif et négatif) sont déposés après le dernier échantillon, puis les septas sont placés avant de d'introduire la plaque dans le thermocycleur pendant 3 min à 95°C puis dans le cryobloc pendant 3 à 5 min. La plaque est ainsi prête à être analysée.

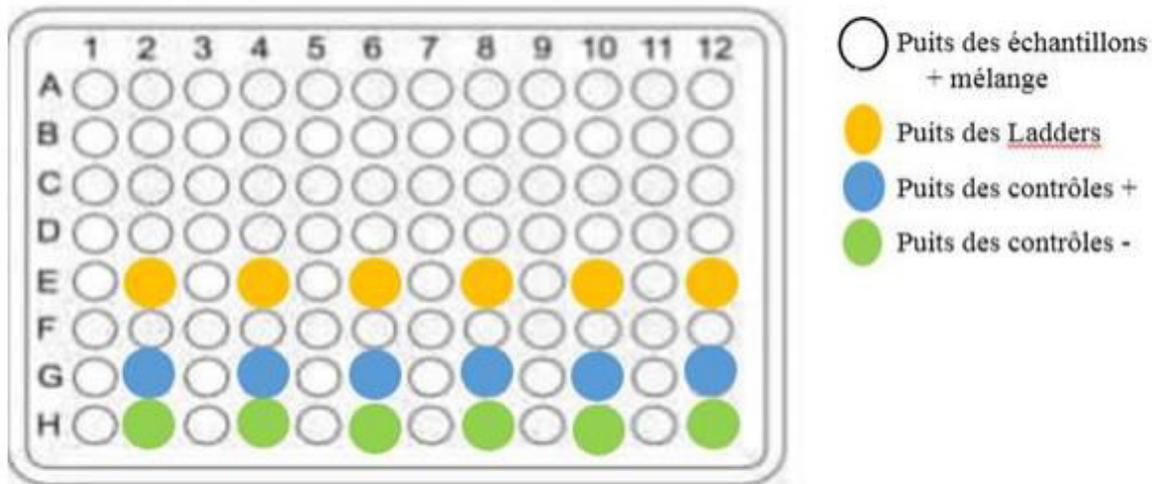


Figure 10 : Répartition des échantillons.

II-2.7 Electrophorèse capillaire :

Après post amplification, les fragments d'ADN sont analysés par électrophorèse capillaire qui est une méthode analytique basée sur la séparation des fragments sous l'influence d'un champ électrique des particules chargées injectées dans un tube capillaire rempli du gel POP4.

Principe :

Les capillaires contenant d'un polymère POP4 (Performance optimized polymer 4) exercent un effet de tamisage moléculaire, la solution tampon est un milieu conducteur qui permet le transport de l'ADN (chargés négativement) de la cathode vers l'anode, cette migration se base sur le rapport poids /charge.

Le séquenceur utilisé dans ce travail est le 3130XL Genetic analyser, comprenant 16 capillaires (36cm/50um) dès qu'une molécule arrive au niveau de la fenêtre de détection, elle est bombardée par le faisceau laser du séquenceur et émet une fluorescence qui est captée par une caméra CCD5 (charge coupled device).

Les données sont transmises au logiciel DATA COLLECTION, (l'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la taille des fragments d'ADN séparés, les cinq fluorochromes utilisés dans le kit d'amplification sont : le 6-FAM™, VIC™, NED™ et PET™ le cinquième est le LIZ™ pour le standard de taille (Rao-Coticone et al., 2003).

II-2.8 Analyse des profils génétiques :

Les données brutes collectées sont traitées par un logiciel spécifique Gene Mapper ID-X software Applied Biosystems, permettant une interprétation des données sous forme de profils génétiques. Ainsi, pour chaque échantillon analysé, un profil génétique est généré.



CHAPITRE III: Résultats et discussion

Chapitre III :

I- Résultats et discussion :

I-1 Résultats des tests préliminaires :

I-1.1 Examen optique :

L'observation des sous-vêtements des victimes au crime light : scellés N°01 des affaires N°04, N°07, scellés N°02 de l'affaire N°03 permet de visualiser des traces de sperme grâce à un éclairage d'excitation de longueur d'onde de 490 nm qui donne une fluorescence aux substances biologiques.

Toutefois l'absence de cette luminescence ne permet pas de conclure l'absence des traces spermes. Il est donc nécessaire d'effectuer d'autres tests complémentaires.

I-1.2 Examen chimique : recherche de phosphatase acide :

Une coloration violette est obtenue avec l'ensemble des échantillons testés, ce qui atteste de la présence de phosphatase acide aussi bien sur tube que sous presse.

Sous presse, la coloration sous forme de gouttes, taches ou zones violettes sur le papier absorbant permet de détecter les taches suspectes sur le vêtement lui-même.

Le test de la PA est une technique qui a largement fait ses preuves, le transfert sur papier filtre a permis :

- De Localiser des taches de sperme sur des grandes étoffes comme les pantalons.
- De travailler de manière exhaustive sur l'ensemble des pièces à conviction sans les altérer.
- De détecter de taches de sperme sur des tissus couleur sombre et foncé.

L'interprétation de résultat reste délicate car la réaction peut s'avérer faussement positive ou faussement négative par perte d'activité de la PA rapidement dégradé dans des milieux extrêmes physiques ou chimiques. La vitesse d'apparition de la coloration est importante à surveiller :

-Un délai inférieur à 30 secondes est en faveur de la présence de sperme, une vitesse plus lente conduit à une réserve sur résultat jusqu'au contrôle ultérieurs.

-En présence d'autres types de sécrétion biologiques (vaginales), les taches apparaissent plus en roses que violettes.

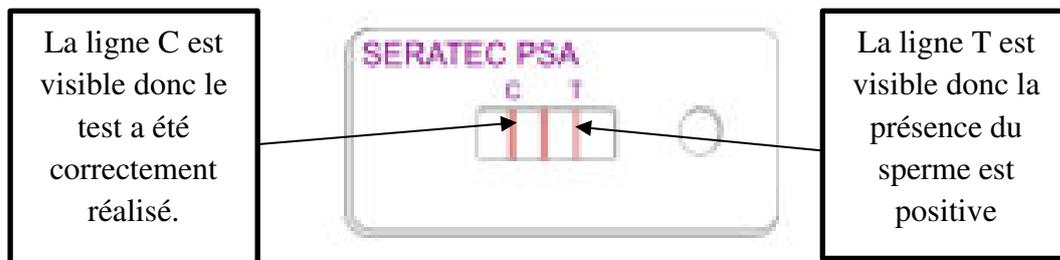
C'est la raison pour laquelle un examen de certitude est systématiquement mis en œuvre à partir des zones révélées positives soit via crime light ou bien la phosphatase acide afin de confirmer ou infirmer la présence de sperme.

I-1.3 Examen immunologique (Recherche de la Prostat Serum Antigen) :

Tous les échantillons analysés par les deux méthodes d'orientation doivent être passés par le test PSA car il est un marqueur plus spécifique que les autres méthodes pour la confirmation de la présence de liquide séminal.

La recherche de PSA sur macérât des échantillons prélevés sur les victimes de cette étude s'est avérée positive dans tous les cas d'affaires ce qui confirme les résultats des tests d'orientation précédente (examen optique+ phosphatase acide).

Résultat positif (PSA détectable) :



Trois lignes visibles dans la fenêtre la ligne de résultats test T, la ligne étalon interne et la ligne de contrôle C. toute ligne T visible fortement ou faiblement colorée doit être considérée comme un résultat positif.

I-2 Résultats de la quantification DUO :

Après la quantification DUO des échantillons des sept cas d'affaires, nous avons calculer le Ratio ADN [male : femelle] pour s'acheminer vers le kit d'amplification qui correspond le résultat.

-Nous avons cité le calcul des affaires : affaire N°02, N°05 et N°06, pour expliquer le choix de kit d'amplification utilisé.

Affaire N°2 :

Échantillon	ADNt humain	ADN male	Ratio	IPC
2,1	4,03	0,71	1 : 46	-
2,2	0,15	0,01	1 : 14	-

ADN male/ADN male : (ADN total-ADN male) /ADN male

$$1 = (4,03-0,71) /0,71.$$

$$1 = 4,61.$$

-Le ratio est inférieur à [1 : 10], On dirige l'analyse vers autosomal STR (identifier plus).

Affaire N°6 :

Échantillon	ADN t humain	ADN male	Ratio	IPC
6,1	2,57	0.06	1 :41	-
6,2	0.004	/	Ind	-
6.3	4.89	/	1 :53	-

ADN male/ADN male :(ADN total-ADN male) /ADN male.

$$1 : (2.57-0.06) /0.06.$$

$$1 : 41.83.$$

-Le ratio est supérieur à [1 :10], l'ADN femelle est majoritaire donc il serait judicieux d'orienter l'analyse directement vers Y STR (Y filer).

Affaire N°5 :

Scellé N°	Quantité d'ADN Humain en ng/µl	Observation
Ech 5.1	0.004	Aucun profil génétique ne peut être déterminé
Ech 5.2	4.3	Un profil génétique peut être déterminé

-L'échantillon **5,1** ne peut pas passer pour une analyse STR autosomale ou HaploTYPE Y puisque la quantité requise pour la PCR est comprise entre 0.05-0.1 ng/µl donc nous ne pouvons pas obtenir un profil.

-L'échantillon **5,2** a été extrait selon le protocole (l'extraction différentielle) après la lyse douce en deux échantillons :

-Echantillon **5,2 F1** correspond à la fraction spermatique.

-Echantillon **5,2 F2** correspond à la fraction épithéliale.

Donc la quantification DUO est une technique qui nous aide à prendre le moyen simple de faire l'analyse en économisant du temps, des efforts et des réactifs de kit.

I-3 Génotypage :

I-3.1 Profils génétiques obtenus par le kit AmpFISTR Identifier plus :

Affaire N°01 :

Tableau XVI : Profils génétiques déterminés à partir de l'échantillon trace.

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier plus															
D8 S1179	D2 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D1 S851	Amel	D5 S818	FGA
Ech 1,1 : Trace de Sperme sur un sous vêtement féminin (couleur blanche).															
10- 13- 14	30- 31.2	8- 10-	11- 12	17	6- 7- 8	8- 12	10- 11- 12	17- 20	13- 14- 15- 16	14- 15- 17- 18	8-9	16- 17- 20	X-Y	11- 12	21- 24- 25

Tableau XVII : Profils génétiques déterminés à partir de l'échantillon comparaison.

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier plus															
D8 S1179	D2 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D1 S851	Amel	D5 S818	FGA
Ech 1,2 : prélèvement sanguin appartenant au suspect.															
14	30- 31.2	8- 10-	11- 12	17	7- 8	8	11- 12	17	14- 16	14- 15-	8- 9	16 -	X-Y	11- 12	21

Exemple d'interprétation :

Le profil génétique obtenu à partir du prélèvement sanguin appartenant suspect, **objet du scellé N°02 (Ech 1,2) ne peut être exclu** comme ayant participé au mélange de profils génétiques obtenu à partir de la trace de sperme sur un sous vêtement féminin, **objet du scellé N°01(Ech 1,2).**

Affaire N°02 :

Tableau XVIII : Profils génétiques déterminés à partir des échantillons traces.

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier plus															
D8 S1179	D2 1S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D1 8S51	Amel	D5 S818	FGA
Ech 2,1 : traces de sperme retrouvées sur le prélèvement vaginal effectué sur la victime.															
12-13-14	29-30	8-9	12-13-14	15-13-14	8-9	10-11	9-13	20-22	13-14.2	15-18	8	15-20	X-Y	12-13	20-21-24-25
Ech 2,2: traces de sperme retrouvées sur le prélèvement anal effectué sur la victime.															
12-13-14-15	29-30	8-9-11	10-11-12-13-14	15-16-17-18	8-9	8-10-11	9-10-13-14	17-10-20-22	12-13-13.2-14.2-15.2	15-16-18-19	6-8-11	12-14-15-18-20	X-Y	11-12-13	20-21-24-25

Tableau XIX : Profils génétiques déterminés à partir des échantillons comparaisons.

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier plus															
D8 S1179	D2 1S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D1 8S51	Amel	D5 S818	FGA
Ech 2,3 : Prélèvement buccal sur un écouvillon de la victime.															
12-15	29	9-10	12	16	9	11	9-10	20-23	14.2-15.2	16-18	8	12-15	X-X	12-13	20-21
Ech 2,4 : Prélèvement sanguin sur un écouvillon du suspect															
13-14	29-30	8-9	13-14	15-17	8-9	10-11	9-13	20-22	13-14.2	15-18	8	15-20	X-Y	12-13	21-25

Affaire N°05 :

Tableau XX : Profils génétiques déterminés à partir des échantillons traces.

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier plus															
D8 S1179	D2 S111	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D1 8S51	Amel	D5 S818	FGA
Ech 5,2T1: Prélèvement vaginal sur un écouvillon de la victime (fraction spermatique)															
13- 14- 15	30- 31- 32- 32.2	9- 10- 12	8- 10- 11	15- 16- 17	6-7- 8-9	11- 12- 13	9- 11- 12	17-19	11- 13- 14- 16.2	15- 16- 17- 18	8-11	14- 17	X-Y	11- 12- 13	20- 21- 23- 25
Ech 5,2T2: Prélèvement vaginal sur un écouvillon de la victime (fraction épithéliale)															
13- 15- 16	30- 32.2	10	8- 10- 11	15- 16-17	6-7- 9	11- 12-	9- 11- 12	17- 19	11- 13- 14	15- 16	8-9	14- 17	X-Y	11- 12- 13	21- 23

Tableau XXI : Profil génétique déterminés à partir de l'échantillon comparaison.

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier plus															
D8 S1179	D2 S111	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D1 8S51	Amel	D5 S818	FGA
Ech 5,3 : prélèvement sanguin appartenant au suspect.															
13- 15	31- 32	10- 12	8- 10	16-17	7-9	12- 13	12	19	13- 16.2	17- 18	8	14- 17	X-Y	12- 13	20- 25

Discussion :

-Les mélanges dont l'un des contributeurs (victime/suspect) est qualifié de « majoritaire » ; ils se caractérisent par des allèles qui se distinguent par leur intensité de fluorescence lors de l'analyse, plus élevée (RFU élevé) que les autres allèles du mélange (RFU faible). L'intensité des différents allèles étant corrélée à la proportion respective de chaque contributeur dans le mélange, les allèles les plus intenses seront associés au contributeur majoritaire, les allèles les moins intenses, aux contributeurs minoritaires. Selon la qualité du profil, il pourra être difficile de distinguer un allèle faible d'un artefact analytique (stutter, pull-up, épaulement, ou bruit de fond important), très couramment rencontré dans les mélanges.

-La concordance des profils génétiques obtenus est réalisée après la comparaison des 16 marqueurs de kit identifier plus entre les échantillons traces et les échantillons comparaisons. Si 3 sur 16 des marqueurs de profil génétique obtenu à partir des traces de sperme ne concorde pas avec 3 marqueurs du profil génétique de suspect cela fait l'exclusion de ce dernier.

-L'ensemble de nos analyses concernant nos affaires d'attentat à la pudeur sur des victimes, nous permet d'émettre les conclusions ci-après :

- ✓ Présence de traces de sperme sur les prélèvements vaginaux, anaux et des sous-vêtements reçus.
- ✓ Un même profil génétique d'une personne de sexe masculin a été obtenu à partir des traces de sperme prélevé des écouvillons vaginaux et anaux ou sous-vêtements dans l'ensemble des affaires N°01, N°02 et N°05. Ce profil génétique obtenu à chaque fois dans ces affaires concorde avec le profil génétique des suspects.
- ✓ Concernant les prélèvements intimes (vaginaux/anaux) un mélange de profil génétique au moins de deux personnes a été obtenu ceci dit il est difficile de séparer les profils des agresseurs de celui de la victime.

-La lyse différentielle est une méthode d'isolement permet la séparation des spermatozoïdes des autres cellules épithéliales (essentiellement celles de la victime) en deux échantillons qui pourront être analysées séparément.

- Dans la fraction masculine (fraction spermatique) nous avons des mélanges dont les marqueurs d'ADN mâle (profil de l'agresseur) sont majoritaires et les marqueurs d'ADN femelle sont minoritaires ceci explique probablement que la digestion des cellules épithéliales n'a pas été totale et/ou le lavage du culot n'a pas été bien fait (qui peut contenir quelques fragments d'ADN femelle).

Pour y remédier l'obtention de ces mélanges il faut :

- Faire des lavages jusqu'à trois.
- Pousser, augmenter le temps d'incubation (lyse douce).
- Faire des observations microscopiques pendant la lyse douce pour s'assurer de l'éclatement total des cellules épithéliales.
- Dans la fraction féminine (fraction épithéliale) nous avons obtenu aussi des mélanges dont les marqueurs d'ADN femelle sont majoritaires et les marqueurs d'ADN mâle sont minoritaires ceci explique la présence des cellules épithéliales dans le liquide séminal.

I-3.2 Haplotypes obtenus par le kit Y filer :

Affaire N°04 :

Tableau XXII : Haplotype Y déterminés à partir de l'échantillon trace.

Les 17 loci du kit Y filer System															
DYS 456	DYS 389I	DYS 390	DYS 389 II	DYS 458	DYS 19	G_DYS 385 a/b	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	Y_GATA	DYS 437	DYS 438	DYS 448
Ech 4,1: trace de sperme sur un sous-vêtement de la victime.															
14	13	24	30	18,2	14	13-18	12	12	12	21	11	12	14	10	20

Tableau XXIII : Haplotype Y déterminés à partir de l'échantillon comparaison.

Les 17 loci du kit Y filer System															
DYS 456	DYS 389I	DYS 390	DYS 389 II	DYS 458	DYS 19	G_DYS 385 a/b	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	Y_GATA	DYS 437	DYS 438	DYS 448
Ech 4,2 : un prélèvement sanguin du suspect.															
14	13	24	30	18,2	14	13-18	12	12	12	21	11	12	14	10	20

Exemple d'interprétation :

L'haplotype Y du suspect obtenu à partir du prélèvement sanguin, objet du scellé N°02 (**Ech 4,2**) **concorde** avec les haplotypes Y obtenus à partir de sous vêtement de la victime objet du scellé N°01(**Ech 4,1**).

Affaire N°06 :

Tableau XXIV : Haplotypes Y déterminés à partir des échantillons traces.

Les 17 loci du kit Y filer System															
DYS 456	DYS 389I	DYS 390	DYS 389 II	DYS 458	DYS 19	G_DYS 385 a/b	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	Y_GATA	DYS 437	DYS 438	DYS 448
Ech 6,1: Un prélèvement vaginal de la victime.															
15	12	24	29	14	14	17	13	10	10	-	11	11	-	10	20
Ech 6,2 : Un prélèvement vaginal de la victime.															
15	-	-	-	14	-	-	13	-	-	-	11	11	14	10	-
Ech 6,3 : Un prélèvement anal de la victime.															
15	12	24	29	14	14	17-18	13	10	10	21	11	11	14	10	20

Tableau XXV : Haplotype Y déterminés à partir de l'échantillon comparaison.

Les 17 loci du kit Yfiler System															
DYS 456	DYS 389I	DYS 390	DYS 389 II	DYS 458	DYS 19	G_DYS 385 a/b	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	Y_GATA	DYS 437	DYS 438	DYS 448
Ech 6,5 : Un prélèvement sanguin du suspect.															
14	13	23	30	-	14	13-18	12	11	11	21	11	11	14	10	20

Exemple d'interprétation :

-La comparaison d'haplotype Y dans ce cas ne peut se faire que sur un haplotype complet, **scellé N°03 (Ech 6,3)**.

- Un haplotype Y partiel ne peut être jamais pris en considération car qu'une seule exclusion de marqueur peut exclure un suspect.

Donc l'haplotype Y du suspect obtenu à partir du prélèvement sanguin, objet du scellé N°05 (**Ech 6,5**) **ne concorde pas** avec les haplotypes Y obtenus à partir de prélèvement effectué sur la partie génitale de la victime objet du scellé N°03 (**Ech 6,3**).

Discussion :

L'analyse de marqueurs STR du chromosome Y (donc présents uniquement dans le profil masculin), pourront alors identifier un haplotype et donc de remonter une lignée paternelle.

Dans le cas où l'ADN masculin est minoritaire, il faut orienter l'analyse vers le Yfiler (analyse des 17 loci du chromosome Y), procédure la plus performante dans ce genre de situation. Cette analyse peut exclure des personnes.

Dans notre expertise nous avons cité deux affaires :

-L'une des affaires l'haplotype Y obtenu à partir trace de sperme concorde avec l'haplotypes Y obtenu à partir de prélèvement sanguin du suspect.

-L'autre affaire l'haplotype Y obtenu à partir trace de sperme ne concorde pas avec l'haplotype Y obtenu à partir de prélèvement sanguin du suspect.

Donc l'analyse par l'haplotype Y permet de retracer la ligner paternelle ce qui fait qu'on peut exclure un suspect ainsi que sa lignée paternelle.

I-3.3 Profils génétiques obtenus par l'utilisation des deux kits :

Affaire N°03 :

Tableau XXVI : Profils génétiques déterminés à partir des échantillons traces.

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier plus															
D8 S1179	D2 1S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D1 8S51	Amel	D5 S818	FGA
Ech 3,1: Trace de sperme sur un écouvillon vaginal effectué sur la victime.															
12- 13- 14- 15	29- 30- 32- 32.2 - 33.2	10- 11- 12	10 - 11 - 12 - 13	14- 15- 16- 17- 18	7- 8- 9	10- 11- 12	9- 10- 12- 13- 14	17- 19- 24	13- 14	15- 17- 18- 19	8-9- 11	11- 14- 18	X-Y	8- 10- 12- 13	19- 22- 23
Ech 3,2T1 : Trace de sperme T01 sur un sous-vêtement de couleur bleue appartenant à la victime.															
12- 13- 14- 15	29- 30- 31.2- 32- 33.2	10- 12	10 - 11 - 12 - 13	14- 16- 17- 18	7-8- 9	10- 11- 12	9- 10- 12- 14	17- 19- 24	13- 14	15- 17- 18- 19	8-9- 11	11- 14- 18	X-Y	8- 10- 12- 13	19- 22- 23- 24
Ech 3,2T2 : Trace de sperme T02 sur un sous-vêtement de couleur bleue la victime.															
12- 13- 14- 15	29- 30- 32- 33.2	10- 12	10 - 11 - 13	14- 16- 17- 18	7-8- 9	10- 11- 12	9- 10- 12- 13- 14	17- 19- 24	13- 14	14- 17- 18- 19	8-9- 11	11- 14- 18	X-Y	8- 9- 10- 12- 13	19- 22- 23

Tableau XXVII : Profil génétique déterminés à partir d'échantillon de comparaison.

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier plus															
D8 S1179	D2 1S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D1 8S51	Amel	D5 S818	FGA
Ech 3,3 : Prélèvement sanguin du suspect.															
12- 15	32.2 - 33.2	8-12	10	15- 17	8	12- 13	11- 12	17	13	14- 17	8	12- 14	X-Y	10- 12	24-25

Exemple d'interprétation :

Deux mélanges de profils génétique d'au moins deux personnes dont l'un des profils est d'une personne de sexe masculin a été obtenu à partir de la trace de sperme sur écouvillon vaginal effectué sur la victime. Objet du scellé N°01 (**Ech 3,1**) ainsi qu'à partir des traces de sperme **T01** et **T02** prélevées sur un sous vêtement de couleur bleue appartenant à la victime, objet du scellé N°02 (**Ech 3,2**). Donc pour clarifier cette affaire, il est nécessaire de faire passer ces échantillons par l'analyse de l'haplotype Y.

Tableau XXVIII : Haplotypes Y déterminés à partir des échantillons traces.

Les 17 loci du kit Yfiler System															
DYS 456	DYS 389I	DYS 390	DYS 389 II	DYS 458	DYS 19	G_DYS 385 a/b	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	Y_GATA	DYS 437	DYS 438	DYS 448
Ech 3,1: trace de sperme sur écouvillon vaginal effectué sur la victime.															
15	13	24	29	17	13	13-15	13	9	10	21	11	11	14	10	20
Ech 3,2T2 : Trace de sperme T02 sur un sous-vêtement de couleur bleue appartenant à la victime.															
15	13	24	29	17	13	13-15	13	9	10	21	11	11	14	10	20

Tableau XXIX : Haplotype Y déterminés à partir d'échantillon de comparaison.

Les 17 loci du kit Yfiler System															
DYS 456	DYS 389I	DYS 390	DYS 389 II	DYS 458	DYS 19	G_DYS 385 a/b	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	Y_GATA	DYS 437	DYS 438	DYS 448
Ech 3,3 : Prélèvement sanguin du suspect.															
14	13	23	-	18.2	-	-	12-	11	-	20	-	-	14	-	-

Interprétation :

Un même haplotype Y a été obtenu à partir de la trace de sperme sur écouvillon vaginal effectué sur la victime, objet du scellé N°01 (**Ech 3,1**) et de la trace de sperme **T02** prélevée sur un sous vêtement de couleur bleue appartenant à la victime, objet du scellé N°02 (**Ech 3,2T2**). Cet haplotype Y **ne concorde pas** avec l'haplotype Y partiel obtenu à partir du prélèvement sanguin du suspect, objet du scellé N°03.

Affaire N°7 :

Tableau XXX : Profil génétique déterminés à partir d'échantillon de trace.

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier plus															
D8 S1179	D2 1S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D1 8S51	Amel	D5 S818	FGA
Ech 7,1 : trace de sperme sur un pantalon appartenant à la victime.															
11- 12- 13- 14- 15	29- 30- 32.2	9- 10- 12- 13	8- 10- 12- 13	15- 17- 18	6- 8	11- 12	11- 12	17- 19- 21	12- 13- 14	15- 16	8- 11	12- 13- 18	X-Y	11- 12	20- 22- 25

Tableau XXXI : Profils génétiques déterminés à partir des échantillons comparaisons.

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier plus															
D8 S1179	D2 1S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D1 8S51	Amel	D5 S818	FGA
Ech 7,2 : un prélèvement buccal de la victime.															
13- 15	29- 32.2	10- 13	10- 13	17- 18	6-8	11- 12	11- 12	19	13- 14	15- 16	8-11	12- 18	X-X	11- 12	22- 25
Ech 7,3 : un prélèvement buccal du suspect.															
11- 12	29	9- 12	8- 12	15- 17	6-8	10- 12	11	17- 21	12- 14	16	8	13	X-Y	12	20- 21

Interprétation :

Selon les résultats obtenus dans les tableaux, On est en présence de mélange de profil d'au moins trois personnes, Objet du scellé N°01(**Ech 7,1**). Ce mélange peut contenir :

-Deux femmes et un agresseur masculin (hypothèse 1) comme il peut contenir deux agresseurs avec une femme (victime) (hypothèse 2). Donc il est nécessaire de faire la détermination par les haplotypes Y.

Discussion :

Pour trancher et élucider cette affaire nous proposons de faire l'analyse Y filer de l'haplotype afin de confirmer la présence d'un ou plusieurs agresseurs de sexe masculin.

Tableau XXXII : Haplotype Y déterminés à partir d'échantillon de trace.

Les 17 loci du kit Y filer System															
DYS 456	DYS 389I	DYS 390	DYS 389 II	DYS 458	DYS 19	G_DYS 385 a/b	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	Y_GATA	DYS 437	DYS 438	DYS 448
Ech 7,1 : trace de sperme sur un pantalon appartenant à la victime.															
14	13	23	30	18.2	14	13-18	12	10	11	21	11	11	14	10	19

Tableau XXXIII : Haplotype Y déterminés à partir d'échantillon de comparaison.

Les 17 loci du kit Y filer System															
DYS 456	DYS 389I	DYS 390	DYS 389 II	DYS 458	DYS 19	G_DYS 385 a/b	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	Y_GATA	DYS 437	DYS 438	DYS 448
Ech 7,2 : un prélèvement buccal du suspect.															
14	13	23	30	18.2	14	13-18	12	10	11	21	11	11	14	10	19

Interprétation :

Selon les résultats de l'analyse Y filer, l'haplotype Y du suspect objet du scellé N°02 (**Ech 7,2**) **concorde** avec l'haplotype Y retrouvé sur le pantalon de la victime, objet du scellé N°01 (**Ech 7,1**) ce qui confirme que nous sommes en présence d'un mélange de profil génétique d'un agresseur avec deux profils génétiques féminins (hypothèse 1).

Discussion :

Vu l'impossibilité d'interpréter le mélange d'au moins de trois personnes, il était impossible d'inclure le suspect avec le kit [identifier plus] ainsi avec le kit [Y filer].

Néanmoins, la combinaison des deux kits identifier plus et Y filer nous a permis de renforcer nos résultats en concluant que le troisième contributeur masculin du mélange peut être ce suspect ou un membre de sa lignée paternelle.

Quelques exemples des profils génétiques :

Affaire N°01 :

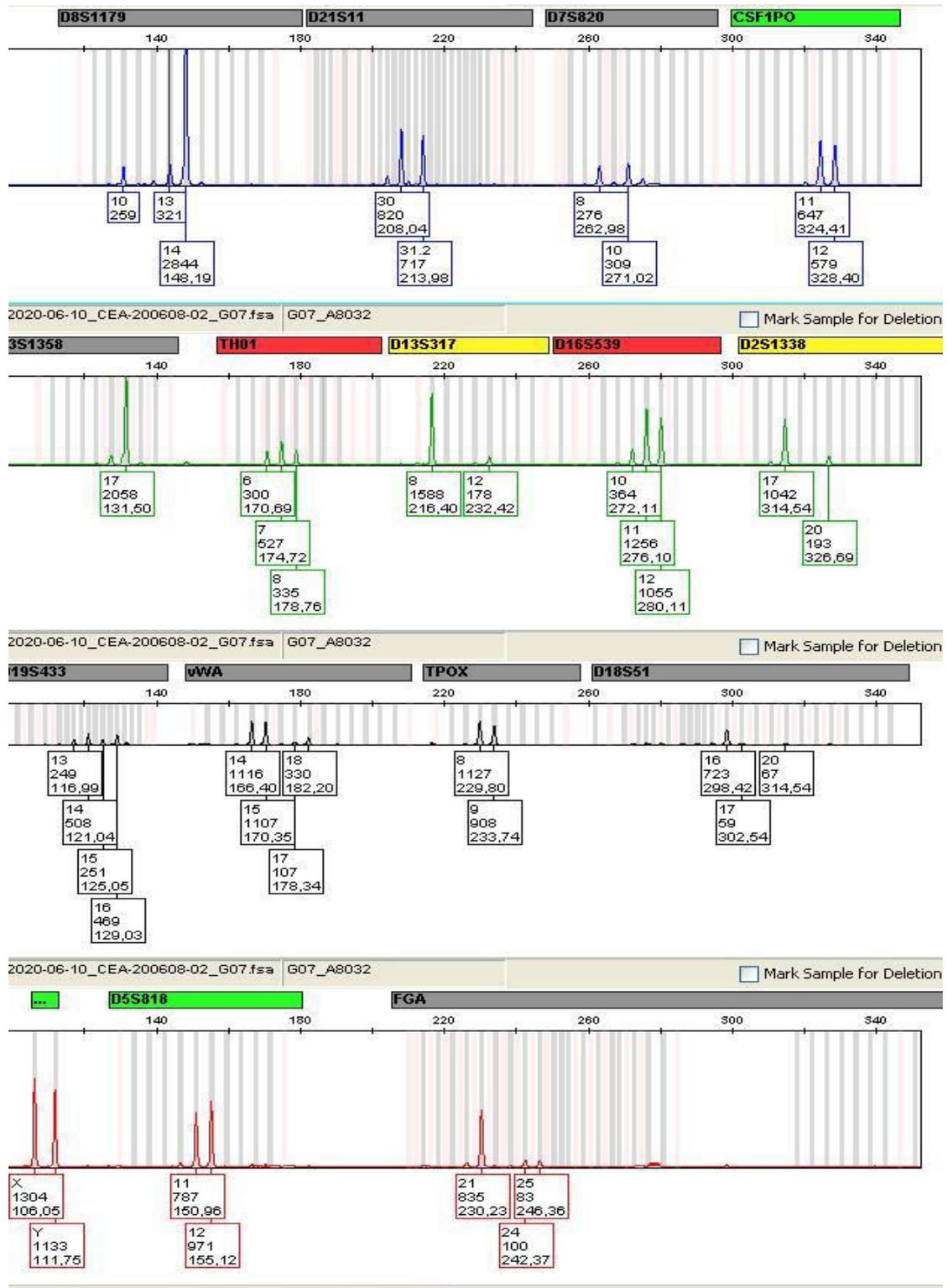


Figure 11 : Profil génétique d'une trace de sperme sur un pantalon (Ech 1,1).

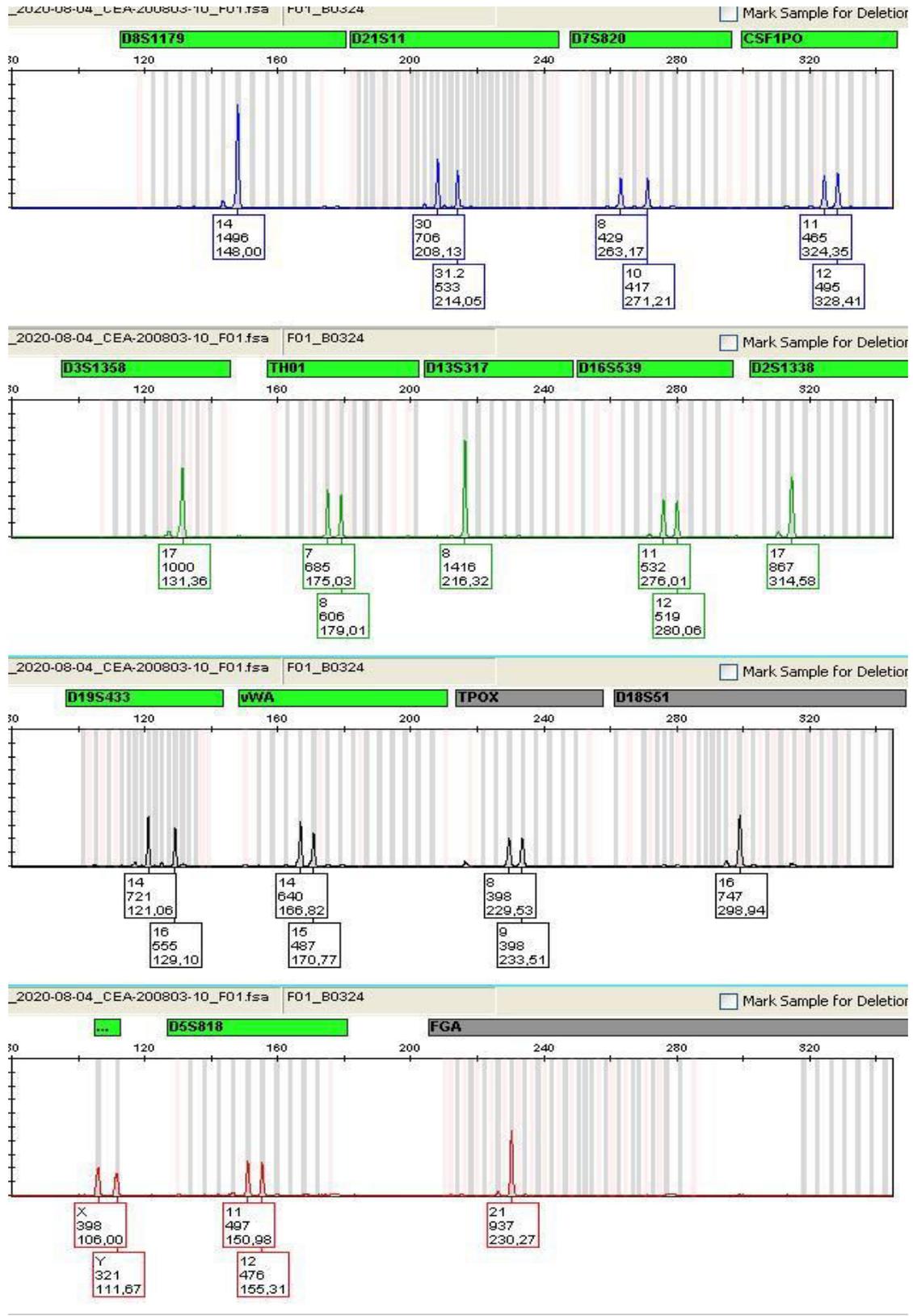


Figure 12 : Profil génétique appartenant au suspect (Ech 1,2).

Affaire N°05 :

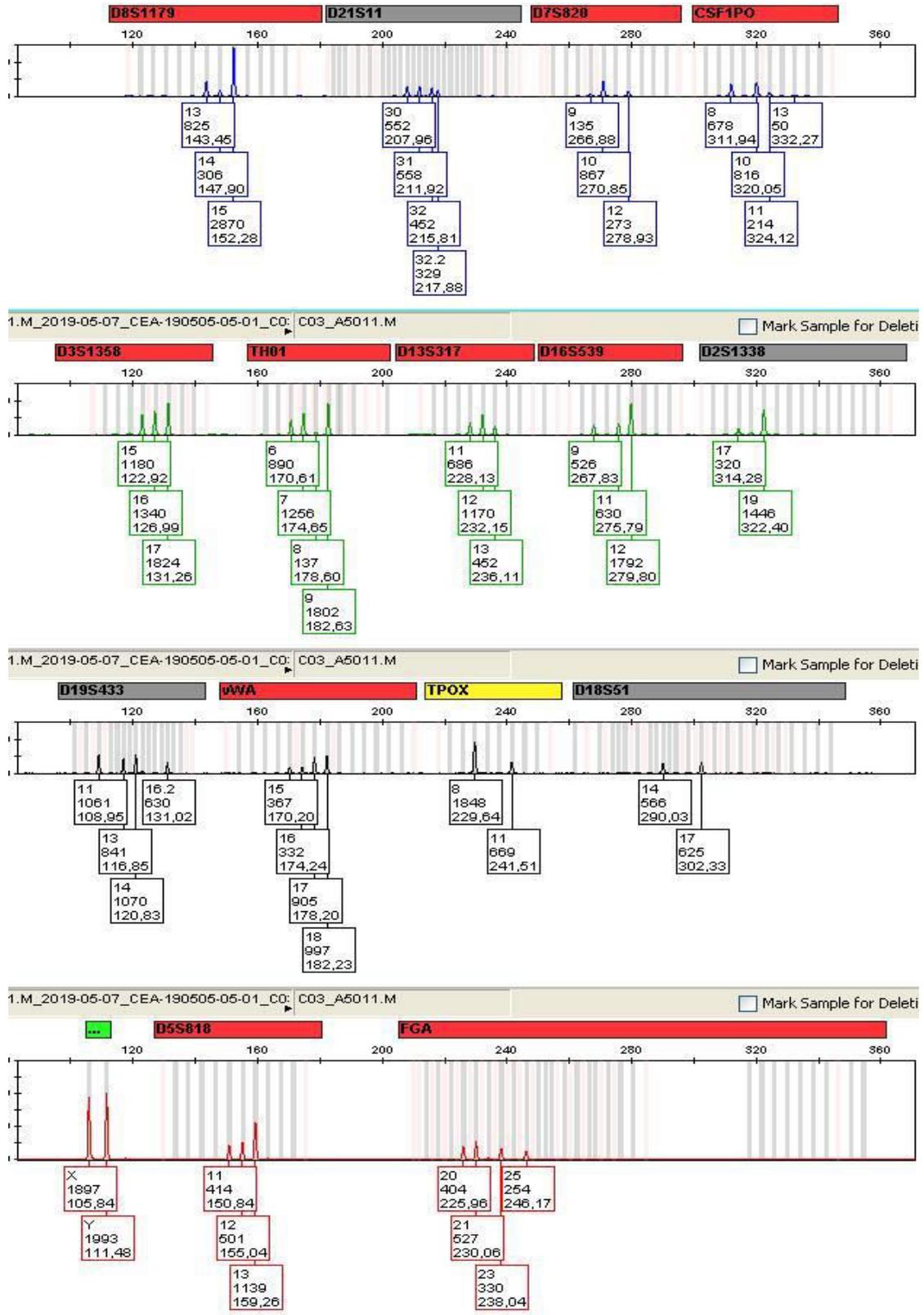


Figure 13 : Profil génétique de la fraction spermatique (Ech 5,2T1).

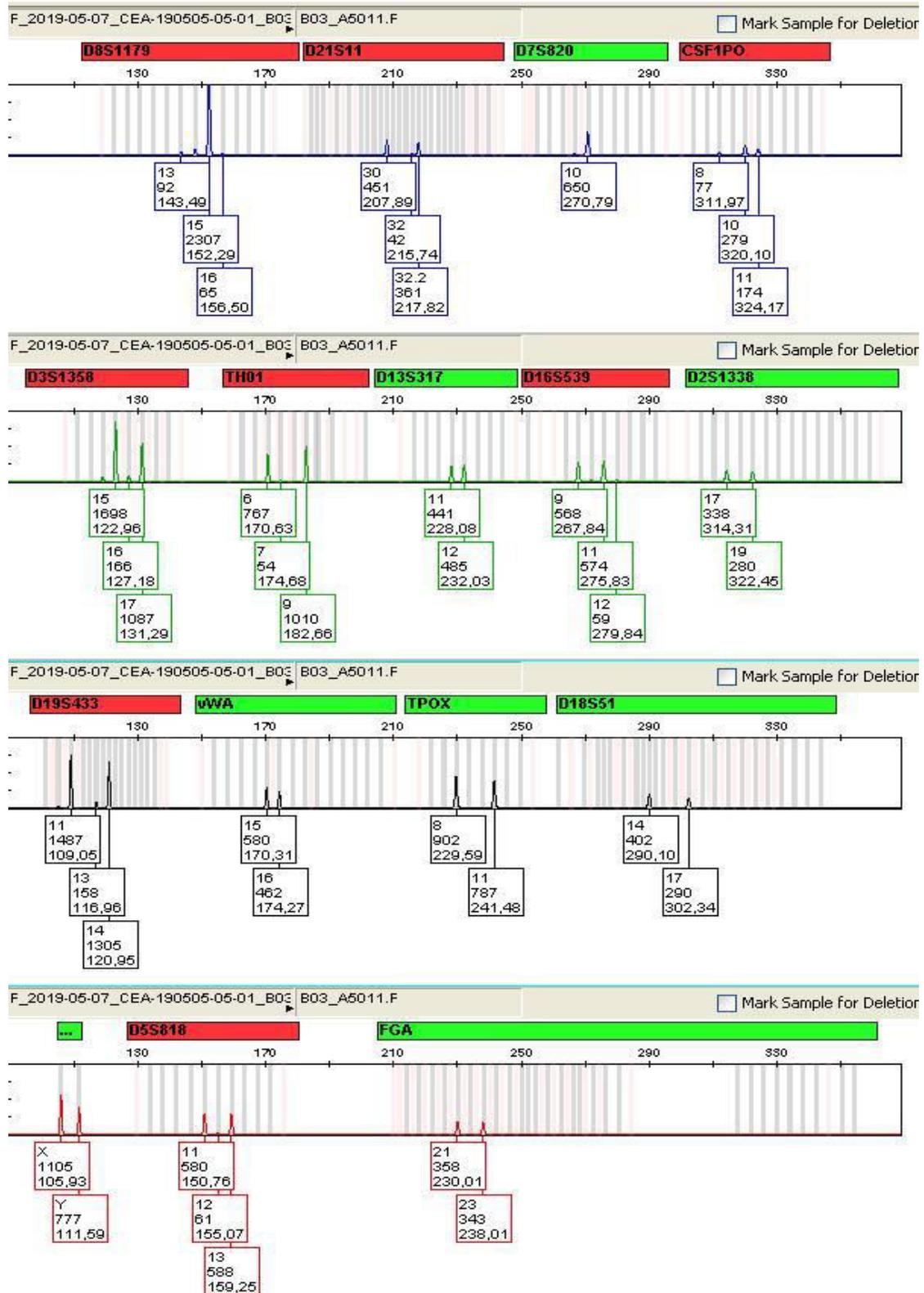


Figure 14 : Profil génétique de la fraction épithéliale (Ech 5,2T2).



CHAPITRE IV : CONCLUSION

Conclusion :

L'utilisation des polymorphismes de l'ADN à des fins d'identification des personnes est l'élément de preuve le plus performant offert par la science médico-légale. La précision et la fiabilité de l'expertise ont fait l'un des meilleurs outils pour découvrir la vérité.

En terme de notre stage effectué au laboratoire de la police technique et scientifique dans le cadre de notre projet de fin d'étude, nous avons pu nous familiariser avec la méthodologie d'un laboratoire forensique et la rigueur nécessaire pour l'identification judiciaire.

Dans nos expertises nous avons identifié les profils génétiques selon les résultats de la quantification de l'ADN, le ratio calculé nous a orienté vers l'analyse STR autosomique ou bien l'analyse de l'haplotype Y, ce qui permet d'éviter le gaspillage des kits et gagner du temps.

Nous avons étudié 7 cas d'affaires d'agression sexuelle pour lesquelles 4 cas sur 7 que nous avons élucidé par l'utilisation de l'haplotype Y (kit Y filer), 2 cas nous avons exclu le suspect ainsi sa lignée paternelle et dans deux autres cas nous avons inclus le suspect ou un membre de sa lignée paternelle d'où l'intérêt de cette technique d'orienter l'enquêteur soit pour chercher un autre suspect présumé en dehors de sa lignée paternelle, soit pour chercher un suspect au sein de sa lignée paternelle.

L'application de cette approche a pour ambition de faciliter le travail de l'expert afin qu'il puisse rendre des conclusions à la justice, qui soient les plus éclairées possibles.



Chapitre V : Les références bibliographiques

A

Ameziane, N., Bogard, M., Lamoril, J. (2005). *Principe de biologie moléculaire en biologie clinique*, Paris : Elsevier Masson.705p.

Butler J. M. (2011). *Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology*. 1st edition. Elsevier Academic Press, San Diego.704p.

Arman A.P. and Wells R.A. (1999). Hyper variable minisatellite recombinators. Trends genetics, p 200.

B

Butler, J.M., Hill, C.R. (2012). *Biology and Genetics of ew Autosomal STR Loci Useful for Forensic DNA Analysis*. Forensic Sci Rev 24 :15.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26231356>.

Butler, J.M. (2005). Forensic DNA typing : Biology, techenology, and genetics of STmarkers. 2nd ed New York : Elsevier.688p.

Browwn T.A. (2004). Génomes. Edition Flammarion, p130.

Belkhirat S et Khouas L. (2009) Contributio, à la mise en place d'un cadre juridique pour l'application de l'analyse génétique dans la pratique judiciaire. Mémoire de post graduation spécialisé.

Botstein, D., White,R.L., Skolnick,M., Davis,R.W. (1980). *Construction of a Genetique Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms*, Am JHum Genet 32:314-331.Disponible sur:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6247908>.

Butler, J.M., Hill, C.R. (2012). *Biology and Genetics of ew Autosomal STR Loci Useful for Forensic DNA Analysis*. Forensic Sci Rev 24 :15

Butler, JM (2007). *Technologies de typage à répétition en tandem courtes utilisées dans les tests d'identité humaine*. BioTechniques, 43 (4), Sii – Sv. doi: 10.2144 / 000112582
Disponible sur : <https://www.future-science.com/doi/full/10.2144/000112582>.

C

Coquoz R.(2003).Preuve par l'ADN : la génétique au service de la justice .Ed.Presse polytechniques et universitaire romandes :353p.

Castella V, Mangin P. DNA profiling success and relevance of1739 contact stains from casework. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser. 2008).

D

Doutremepuich C. (2001). *10 ans D'empreintes Génétiques*, collection dirigée par JEANS6CLAUCE Karensenty. Edition La Documentation Française.228p

Doutremepuich C. (2012) *Les empreintes génétique en pratique judiciaire Bulletin de l'Académie National de Médecine.*, 196, no 6, 1117-1130.

Disponible sur : <https://doi.org/10.1520/JFS13941J>.

De Mazancourt Philippe , geoffroy lorrin de la Grandmaison, Marc bailly ,Michel Durigon , Héléne Pfitzinger (2006) ,viols ,sperme ,spermatozoides , identification et paternité médico-légale ,pp.242-244 .

Di RienzoA., Peterson C., Garza, J. C., Valdes A. M., Slatkin M., FreimerN. B. (1994).*Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations.*

Proc.Natl.Acad.Sci.USA ;91: 3166-3170

Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8159720>

G

Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S. (2007) *An introduction to forensic genetics.* 2nd edition. John Wiley and Sons Ltd, USA.162p

Gusmão L., Butler J. M., Carracedo A., Gill P., Kayser M., Mayr W. R., Morling N., Prinz M., Roewer L., Tyler-Smith C. and Schneider P. M. (2006). DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 120: 191–200.

H

Hariot C.(2011) .Prise en charge d'une victime de viol .*Legal Med* 45 :201-215.

I

Ikawa T., Kakegawa A., Nagano T., Ando H., YamakoshiY., Tanabe T., Simmer J.P., Hu C.C., Fukae M. and Oida S. (2005). *Porcine Amelogenin is Expressed from the X and Y Chromosomes.* *Journal of Dentist Research*, 84(2):144-148. doi: 10.1177 / 154405910508400207 Disponible sur :

<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/154405910508400207?journalCode=jdrb> .

J

Jobling M.A., Lo I.C.C., Turner D. J., Bowden G.R., Lee A.C., Xue Y., Carvalho Silva D., Hurles M.E., and al. (2007). *Structural variation on the short arm of the human Y chromosome: recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y.*

Human Molecular Genetics, 16 (3): 307–316. Doi : 10.1093 / hmg / ddl465

Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2590852>.

Jeffreys A.J., MacLeod A., Tamaki., Neil D.L.N., et Monckton D.G. (1991). *Minisatellites Repeat coding as a digital approach to DNA typing*. Nature 354: 204-209. Doi: 10.1038 / 354204a0 disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1961248>.

Jarman A.P., Wells R.A. (1999). *Hyper variable minisatellite recombinators*. Trends genetics, 5 (11): 367-71. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2692244>.

Jobling M.A. and Gill P. (2004). Encoded evidence: DNA in forensic analysis. Genetics, 5: 739-751.

Jobling M.A, Panda A.Tyler-Smith C.(1997) .The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing ,Int .J. Legal Med .110.118 -124.

L

Linacre A et Tobs S.S. (2013). *Wildlife DNA analysis. Application in forensic science*. 1st edition. John Willey et Sons Ltd, England.350p.

O

Oota H.SaitouN,Matsushita T.Ueda S.(1995).Agenetic study of 2,000-year –old humain remains from japon using mitochondrial DNA sequences,Am.J.Phys . Anthropol 98 (2) :133 -45.

P

Pascal,O. (1998). *Empreintes génétiques : pourquoi et pour qui ?* Médecine et Droit, 32 : 1-6.

Petkovski, E.(2006). *Polymorphisme ponctuels de sequence et identification génétique* : étude par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Thèse de doctorat Université Louis Pasteur Strasbourg, France.

R

Ruitberg C. M, Reeder D. J, Butler J. M. (2001).*STRBase: A short tandem repeat DNA database for the human identity testing community*. Nucleic Acids Res ;29: 320-322.doi: 10.1093 / nar / 29.1.320
Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11125125>.

S

Schneider P. M. (2006). *Scientific standards for studies in forensic genetics*. Forensic

Science International, 165: 238–243.doi: 10.1016 / j.forsciint.2006.06.067
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16875790>

Shadrach B., Commane M., Hren C. and Warshawsky I. (2004). *Consultations in Molecular Diagnostics: A Rare Mutation in the Primer Binding Region of the Amelogenin Gene Can Interfere with Gender Identification.* Journal of Molecular Diagnostics, 6 (4): 401- 405. Doi: 10.1016 / s1525-1578 (10) 60538-7.
Disponible sur
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525157810605387> .

Skinker D.M, Warnecke S.C , Morrow J.K ,Hunsaker J.C (1997).Amplification of Y-chromosomal STRs from ancient skeletal material.Hum .Genet . 104 (2) :164-6.

Sozer,A.C.(2014) *DNA analysis for missing person identification in mass fatalities.* CRC Press,Taylor &Francis Group,London,312p..

Stuart H.James,Jon j,Nordby,Suzanne Bell (2004) ,forensic Science :An introduction to Scientific and investigative techniques,taylor E forancis, 220-233 .

Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP,et Gill P . (1993) *A rapid and quantitative DNA sex test : fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin.* Biotechnique 15 :636-8,640-1 Disponible sur :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8251166>.

T

Tautz, D., (1993). *Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences*, 67: 21- 28. Doi: 10.1007 / 978-3-0348-8583-6_2. Disponible sur :
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-8583-6_2 .

TanakaM.Takashi Y .,Hideki N ., Hiroyuki O., Yoshiki K., Keizo S., Toshimiichi Y .,Keiji T.,Yoshinao K (2000) .Usefulness of a tooth-bruch as a source of Evidential DNA for typing, .Journal forensic Sci. ,45 (3) : 658 -659.

V

Venter J.C, Adams M. D., Myers E. W, Li P. W., Mural R. J, Sutton G. G. (2001) *The sequence of the human genome.* Science ;291:1304-1351 .

Van Oorschot RAH, Ballantyne KN, Mitchell RJ. Forensic trace DNA a review. Investig Genet. 2010) .

W

Weber, J.L., May, P.E. (1989) .*Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction.* Am. J. Hun. Genet.44 : 388-396.
Disponile sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1715443/>.



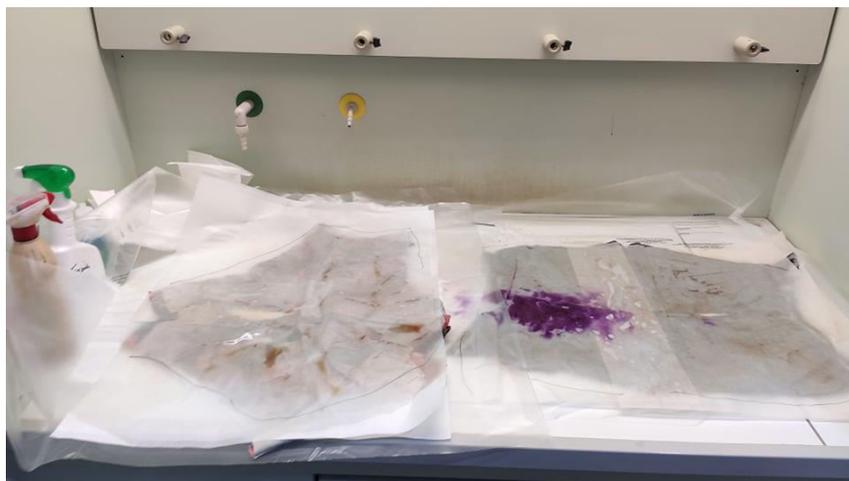
CHAPITRE VI : ANNEXES

Annexe 1 : Tests préliminaires

Test d'orientation : (Original)

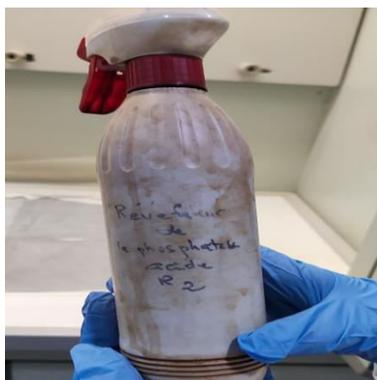


Crime scope

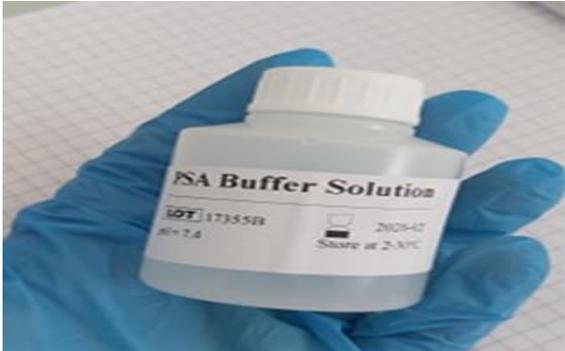


La sous presse

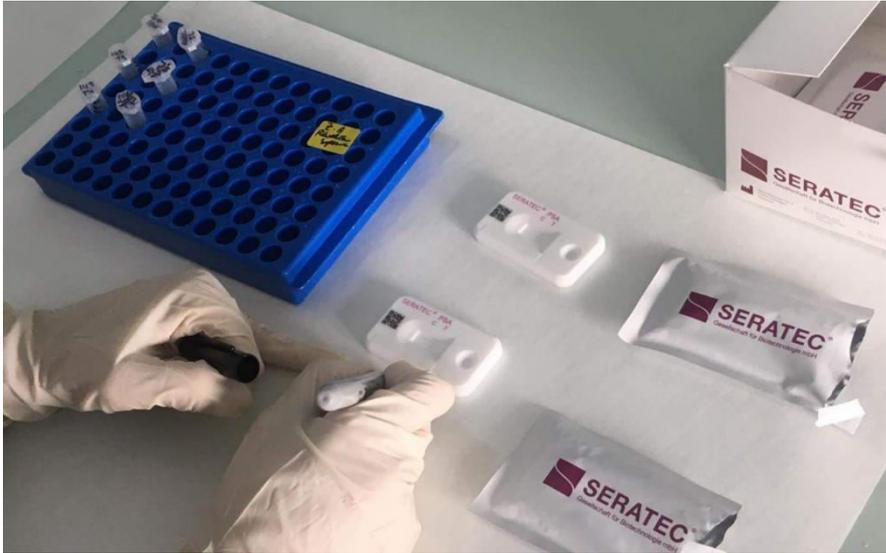
Révélateur



Réactif de SERATEC PSA



(Original)



Annexe 2 : Extraction de l'ADN (Original)



Colone de silice QIAmp

Tube de (2ml) Quiagen MinElute Column



Réactif de Kit Quiagen



Centrifugeuse



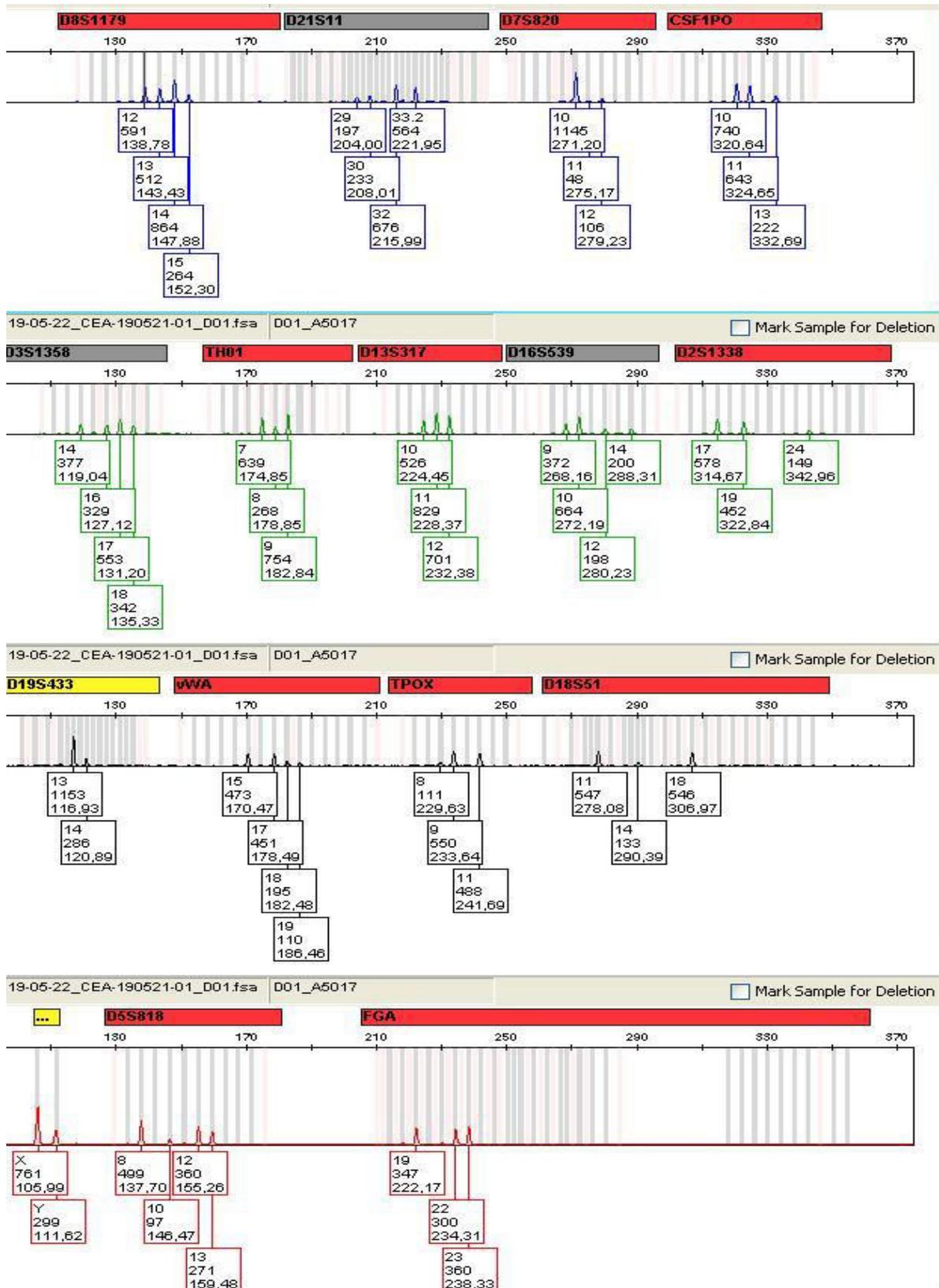
Agitateur avec plaque centrifugeuse chauffante



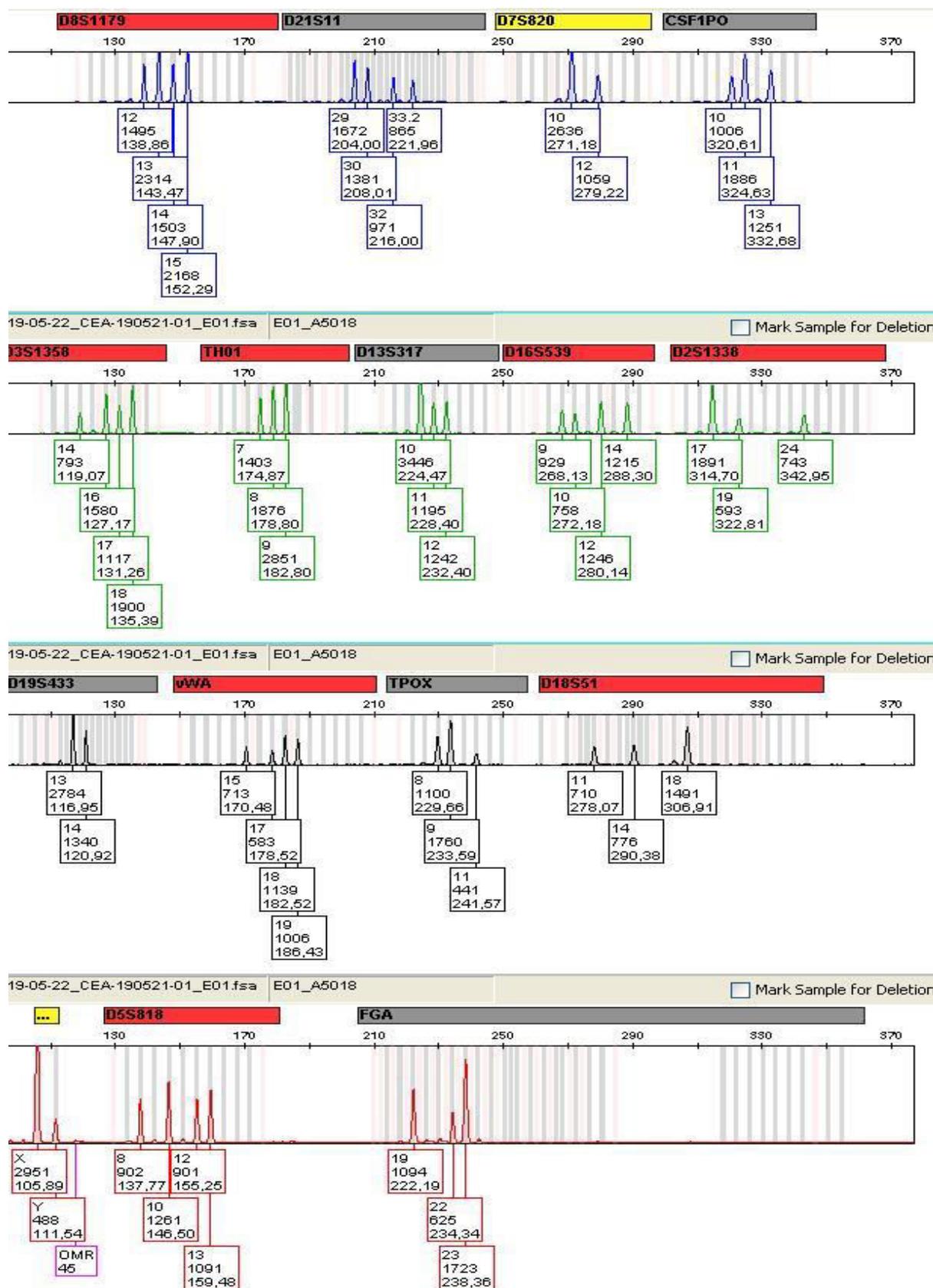
Vortex

Annexe 3 : les profils génétiques

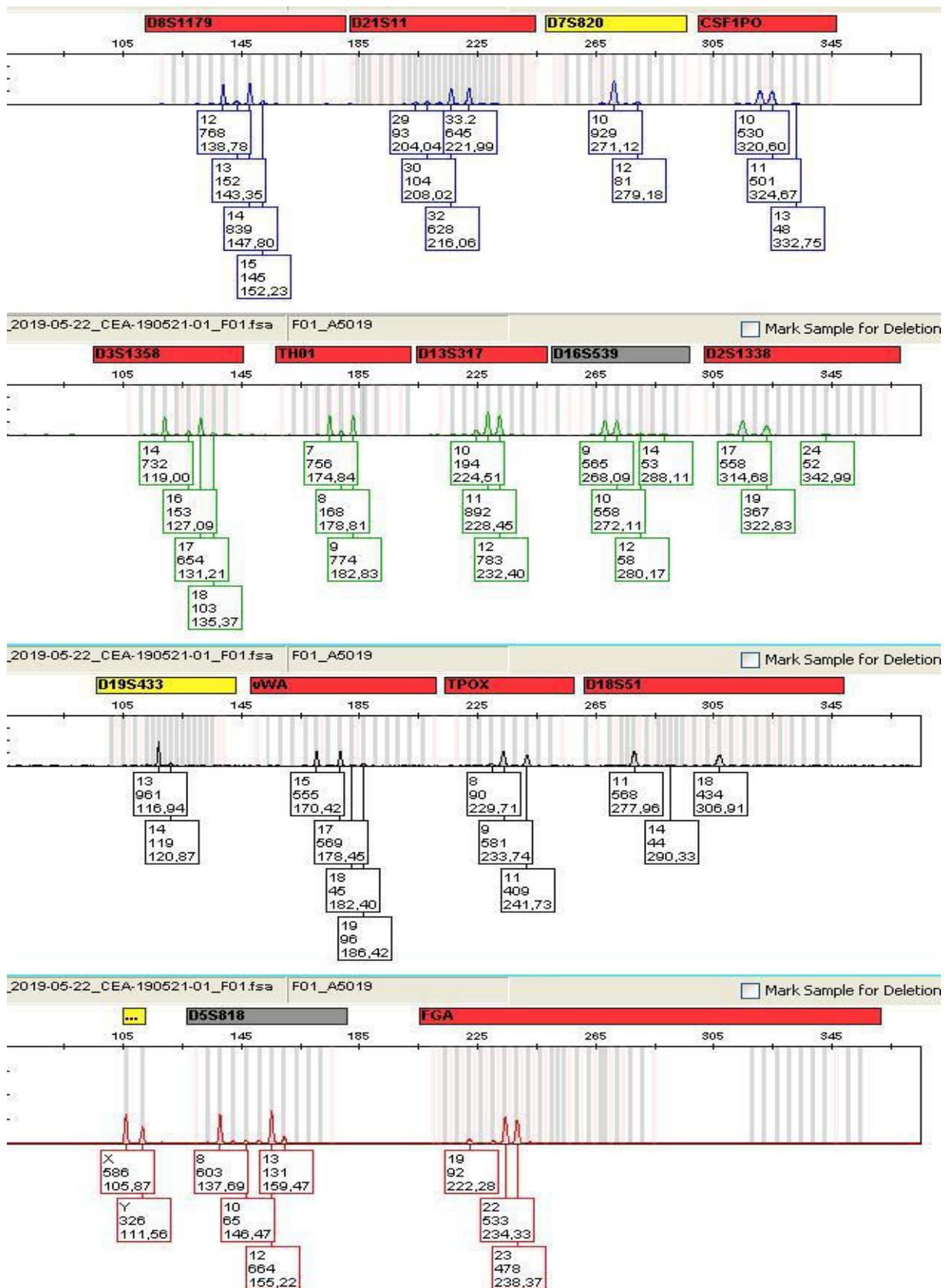
Affaire N°03 :



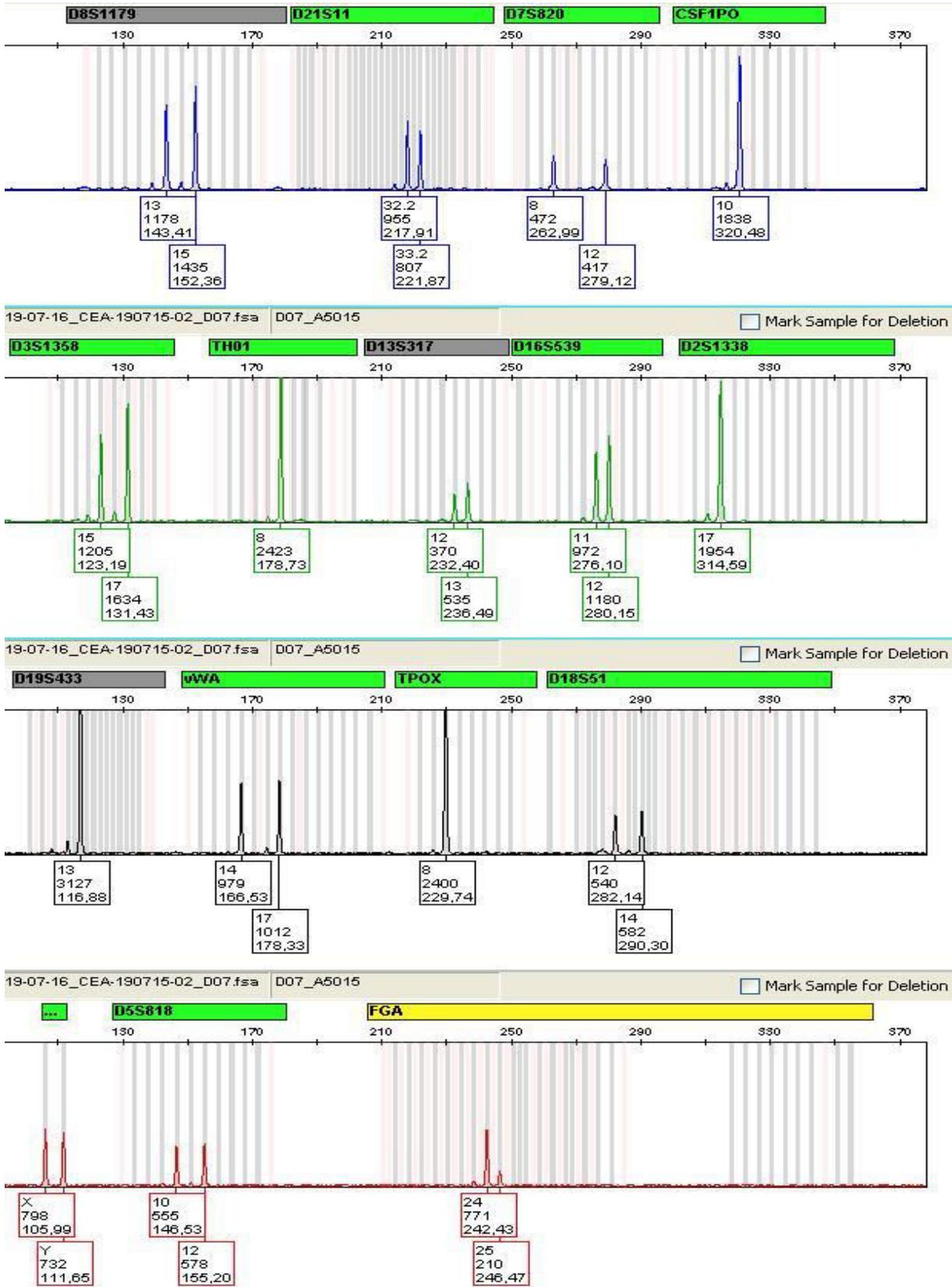
Profil génétique : Trace de sperme sur un écouvillon vaginal (Ech 3,1).



Profil génétique : Trace de sperme T01 sur un sous-vêtement de couleur bleue (Ech 3,2T01).



Profil génétique : Trace de sperme T02 sur un sous-vêtement de couleur bleue (Ech 3,2T02).



Profil génétique : Prélèvement sanguin appartenant au suspect (Ech 3,3).



CHAPITRE VII : GLOSSAIRE

Glossaire

ADN (DNA) : acide désoxyribonucléique, support matériel de l'hérédité il est formé de deux brins complémentaires enroulés en hélice (double hélice), ce qui lui permet de se dupliquer en deux molécules identiques entre elles et identiques à la molécule mère lors du phénomène de réplication lors de la mitose.

Allèle : l'une de deux ou plusieurs variantes d'un gène polymorphe

Amorce (Primer) : court fragment d'ADN (oligonucléotide) qui, hybridé avec une molécule simple brin d'acide nucléique.

Amplicon : fragment d'ADN amplifié par PCR.

Amplification : augmentation du nombre de copies d'ADN ou d'ARN in vitro ou in vivo.

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

Electrophorèse capillaire : processus de séparations.

Gène : segment d'ADN situé à un endroit précis (locus) sur un chromosome et porteur d'une information génétique.

Génome : ensemble de l'information génétique d'un individu ou d'une espèce.

Haplotype : constitution génétique d'un individu pour un caractère génétique présent en un seul exemplaire.

Hétérozygote : sujet abritant deux allèles différents d'un même gène.

Homozygote : sujet abritant deux allèles identiques d'un même gène.

Locus (pluriel, loci) : position précise et invariable d'une région génique, d'un gène ou d'un marqueur sur le chromosome.

Marqueur génétique : zone de l'ADN présentant un polymorphisme et qui est utilisée pour l'identification individuelle.

Microsatellites : sont des marqueurs génétiques de type Short Tandem Repeat (STR)

PCR multiplex : c'est une technique de biologie moléculaire qui sert à amplifier simultanément plus d'un amplicon, en utilisant paire d'amorce.

Polymorphisme : caractère ou gène pour lequel il existe plusieurs variantes au sein d'une population.

Protéinase K : dans un tampon d'extraction, la PK inactive les nucléases et aide à la lyse des globules blancs pour libérer l'ADN nucléaire.

Recombinaison : au cours de la méiose, recombinaison de fragments d'ADN homologues entre deux chromatides non sœurs d'un même chromosome (d'origine paternelle et maternelle) aboutissant à l'échange réciproque d'allèle.

Science forensique : est définie comme l'ensemble des principes scientifiques et des techniques appliqués à l'investigation criminelle.