



INCC/GN



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Blida 1

Faculté de sciences biologiques

Département de biologie-physiologie cellulaire

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique-Physiologie

**Etude de la stabilité de la quantité d'ADN dans les extractions
conservées après extraction par la méthode Chelex.**

Réalisé par : BELKACEM Imane

MERROUCHE Hania

EDDAIKRA.A	MAA	USDB1	Présidente
MOHAMED SAID Ramdane	MCB	USDB1	Examineur
CHERRALLAH Amira	MCB	USDB1	Promotrice
LAZREG Samir	MSF	INCC/GN	Co-Promoteur
BRAHIM RAHMANI Mohamed	MAA	USDB1	Invité
DAHO Kaddour	MSF	INCC/GN	Invité

Promotion 2016

Remerciements

Tout d'abord nous voudrions remercier Dieu, tout puissant pour la volonté, l'opportunité et la patience qu'il nous a donné afin de mener ce travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre reconnaissance.

Nous voudrions tout d'abord adresser toute notre gratitude à notre promotrice madame CHERRALLAH Amira, nous la remercions de nous avoir encadrés, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nos remerciements s'adressent aussi aux membres du jury, madame EDDAIKRA.A, présidente et monsieur MOHAMED SAID Ramdane, pour nous avoir fait l'honneur de juger notre travail.

Notre travail a été effectué au niveau de l'institut national de criminologie et de criminalistique de Bouchaoui, nous tenons à remercier Monsieur le Directeur Général de l'INCC-GN, pour nous avoir donné la possibilité de faire la partie pratique de notre stage au niveau de l'institut.

Nous adressons des remerciements tout particuliers à monsieur LAZREG Samir expert et chef du laboratoire d'identification génétique au niveau de l'INCC-GN qui nous encadrés, nous le remercions également pour le temps qu'il nous a accordé, sa gentillesse, sa modestie et sa disponibilité, merci infiniment.

Nous voudrions exprimer nos remerciements les plus sincères à monsieur MOHAMED SAID Ramdane notre chef d'option, déjà pour nous avoir accepté dans son option et qui nous a soutenu et encouragé depuis le début de notre cursus.

Nous tenons à remercier spécialement monsieur BRAHIM RAHMANI de nous avoir aidé à avancé énormément dans notre travail, nous lui accordons toute notre gratitude car il nous a été d'une aide inestimable.

Un grand merci à toutes les personnes travaillant au laboratoire d'analyses génétiques de nous avoir bien accueillies au sein de leur équipe en particuliers à monsieur BOUSSOUFI Ahmed, chef du département de biologie, monsieur DAHO Kaddour un immense merci à vous pour tous vos conseils et pour le temps que vous nous aviez accordé, monsieur BOUCHAREB Adel pour sa gentillesse et l'intérêt qu'il a accordé à notre travail et à monsieur AGGOUNE Abdennacer pour la formation d'hygiène et de sécurité.

Nous voudrions exprimer notre reconnaissance envers les amis et collègues qui nous ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de notre démarche. Un grand merci à MAGRAOUI Aicha et ASSENINE Ouarda Iméne pour leur support et leur aide inestimables.

Dédicaces

*À nos très chers parents, qui ont toujours été là pour nous et ont tout sacrifié pour nous, n'épargnant ni santé ni efforts.
Nous vous sommes très redevables.*

Sommaire

Introduction	01
Chapitre 1 : recherche bibliographique	
I-Criminalistique	02
I.1 Historique	02
I.2 Définition	02
II-Etude génétique en criminalistique	03
II.1- Le génome et la génétique médico-légale	03
II.2- Typage d'un individu	03
II.2.1- le polymorphisme de l'ADN nucléaire	03
II.2.3- le polymorphisme de l'ADN mitochondriale	04
II.3- Polymorphisme génétique	04
II.3.1- Polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP).....	04
II.3.2- Polymorphismes de répétition	05
II.3.2.1-Les minisatellites (VNTR)	05
II.3.2.2- Les microsattellites (STR)	05
II.3.3- Polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP)	06
III-Conservation d'échantillons biologiques.	06
III.1- Les échantillons biologiques.....	06
III.2- Conservation de l'ADN.....	06
IV- Stabilité de l'ADN.	07
V- Méthodes d'analyse génétique en criminalistique	07
V.1- Les différentes méthodes d'extraction d'ADN	07
V.1.1- La méthode d'extraction organique 'phénol-chloroforme'.....	08
V.1.2- La méthode d'extraction inorganique	08
V.1.2.1- La méthode d'extraction Chelex	08
V.1.2.1- Principe de chelex	09
V.1.3- La méthode d'extraction FTA paper	09
V.1.4- Les méthodes d'extractions en phase solide (exemple : prepfier)	10
V.2- Quantification de l'ADN (PCR en temps réel).....	10
V.2.1- Les phases de la PCR en temps réel	11
V.2.2- Hydrolyse des sondes (la technologie TaqMan)	12
V.3- Amplification par PCR.....	13
V.3.1- Principe de la PCR.....	13
V.3.2- Les inhibiteurs de la PCR.....	13
V.4- Séparation et détection par électrophorèse capillaire.....	14

V.4.1- Séparation de l'ADN	14
V.4.2- Détection fluorescence des fragments d'ADN séparés	15

Chapitre 2 : matériel et méthodes

I- Prélèvement et préparation des échantillons.	17
I.1- Matériel biologique.	17
I.2- Mise en tube des prélèvements.	17
I.3- Matériel non biologique.	18
II-Méthodes	18
II.1- Extraction d'ADN.	18
II.2- Quantification de l'ADN.	19
III- Analyse statistique.	23

Chapitre III : résultats et discussion

I-Quantification de l'ADN.	24
I.1- Cycle seuil (<i>Threshold cycle</i>) ct.	24
I.2- Etablissement de courbes standards	24
I.3- Quantification.	25
I.3.1- Quantification des échantillons conservés d'une semaine à un moi	25
I.3.1.1- Comparaison entre les valeurs de quantification des échantillons et le nombre de cycle seuil ct.	26
I.3.1.2- Quantification de l'ADN dans les échantillons de salive	27
I.3.1.3- Quantification de l'ADN dans les échantillons de sang.	28
I.3.1.4- Quantification de l'ADN dans les échantillons de traces de contact. ...	29
I.3.2- Quantification des échantillons conservés pendant 1 an et 6 moi.	30
I.3.2.1- Quantification des échantillons conservés pendant 1 an.	30
I.3.2.2- Quantification des échantillons conservés pendant 6 mois.	33
Conclusion	35
Références bibliographiques	36
Annexe	

Liste des figures

- Figure 1:** schéma représentant les différents procédés d'extraction d'ADN. (P :10)
- Figure 2:** Les différentes phases de la qPCR . (P :11)
- Figure 3:** Schéma représentant la technologie TaqMan. (P :12)
- Figure 4:** Illustration interne du capillaire et les forces mises en jeu avec le déplacement des molécules d'ADN. (P :15)
- Figure 5 :** digramme représentant les quantifications des échantillons conservés pendant un mois. (P :20)
- Figure 6 :** digramme représentant la quantification des échantillons de six mois et un an. (P :22)
- Figure 7:** Evolution des concentrations d'ADN du 1^{er} au 30^{ème} jour des 5 mesures répétées 5 fois. (Salive) (P :27)
- Figure 8:** Box-blot Concentrations moyennes d'ADN du 1^{er} au 30^{ème} jour. (Salive) (P :27)
- Figure 9:** Evolution des concentrations d'ADN du 1^{er} au 30^{ème} jour des 4 mesures répétées 5 fois. (Sang) (P :28)
- Figure 10:** Concentrations moyennes d'ADN du 1^{er} au 30^{ème} jour. (Sang) (P :28)
- Figure 11:** Evolution des concentrations d'ADN du 1^{er} au 30^{ème} jour des 3 mesures répétées 5 fois. (Traces de contact) (P :29)
- Figure 12:** Box-plot des concentrations moyennes d'ADN du 1^{er} au 30^{ème} jour. (Traces de contact) (P :29)
- Figure 13:** Evolution des concentrations d'ADN des 6 mesures après 1 an. (Sang) (P :31)
- Figure 14:** Box-plots des concentrations moyennes d'ADN au 1^{er} jour et après 1 an. (Sang) (P : 31)
- Figure 15:** Evolution des concentrations d'ADN des 3 mesures après 1 an. (Ongles) (P :31)
- Figure 16:** Box-plots des concentrations moyennes d'ADN au 1^{er} jour et après 1 an. (Ongles) (p :32)
- Figure 17:** Evolution des concentrations d'ADN des 5 mesures après 1 an. (Muscle) (P :32)
- Figure 18:** Box-plots des concentrations moyennes d'ADN au 1^{er} jour et après 1 an. (Muscle) (P :32)
- Figure 19:** Evolution des concentrations d'ADN des 7 mesures après 6 mois. (Sang) (P :34)
- Figure 20:** Box-plots des concentrations moyennes d'ADN au 1^{er} jour et après 6 mois. (Sang) (P :34)
- Figure 21:** Box-plots des concentrations moyennes d'ADN au 1^{er} jour et après 6 mois. (Traces de contact) (P :34)

Liste des tableaux

Tableau I : Matériels et réactifs	P18
Tableau II : Préparation des standards	P21
Tableau III : Préparation du master mix.	P21
Tableau IV : Préparation du master mix	P23
Tableau V : Résultats des courbes établies après chaque quantification.	P24
Tableau VI : Moyennes des différentes concentrations d'ADN extraits à partir de sang, salive, traces de contact (un mois)	P25
Tableau VII : Moyennes des différentes concentrations d'ADN et les moyennes de cycles seuils	P26
Tableau VIII : Moyennes des différentes concentrations d'ADN extraits à partir de sang, ongles et muscle. (Un an)	P30
Tableau IX : Moyennes des différentes concentrations d'ADN extraits à partir de sang et traces de contact. (Six mois)	P33

Résumé

L'ADN peut être dégradé après une certaine période de conservation. Cette dégradation est peut être due à la qualité de l'échantillon ou à des conditions environnementales.

Une étude a été réalisée au sein du laboratoire de l'identification génétique de l'institut national de criminologie et de criminalistique de Bouchaoui afin de suivre l'évolution de la quantité d'ADN au fil du temps, des quantifications ont été réalisées sur une série d'échantillons par une technique simple et précise qui est la PCR en temps réel.

Pour cette étude 37 échantillons de sources différentes ont été choisis. Ces échantillons ont tous été extraits par la méthode chelex® 12 échantillons ont été conservés durant un mois à 4°C et 25 échantillons préalablement extraits dont 14 conservés durant une année et 11 conservés durant six 6 mois à -20°C ont également été exploités afin d'évaluer les quantités d'ADN récupérées en utilisant une RT-PCR.

Les résultats que nous avons obtenus ont été valorisés par une étude statistique, Les variations temporelles ont été analysées par ANOVA à mesures répétées sur les 5 périodes ou ANOVA de Friedman à mesures répétées lors d'écarts à la normalité. Lorsque les différences ont été significatives, les échantillons correspondants ont été mis en évidence par des tests de Tukey HSD

Les résultats obtenus montrent qu'après la conservation de l'ADN extrait par la méthode Chelex® à une température adéquate la quantité d'ADN pour les 12 échantillons conservés 1 mois reste comparable, où la moyenne de la quantité d'ADN pour l'échantillon de sang est passée de 0,062 ng/μl à 0,096 ng/μl et celle de l'échantillon traces de contact est passée de 0,055 ng/μl à 0,098 ng/μl sauf pour l'échantillon de salive où nous avons obtenu une augmentation de la quantité d'ADN où la moyenne de la quantité d'ADN est passée de 5,36 ng/μl à 12,43 ng/μl. De même pour les échantillons conservés 6 mois les quantités d'ADN restent comparables où la moyenne de la quantité d'ADN pour l'échantillon de sang est passée de 0,61 ng/μl à 0,79 ng/μl et celle de l'échantillon traces de contact est passée de 0,26 ng/μl à 0,31 ng/μl. Par contre pour les échantillons conservés 1 année il y'a eu une perte très significative où la moyenne de la quantité d'ADN pour les prélèvements sang est passée de 0,76 ng/μl à 0,35 ng/μl, de 41 ng/μl à 23,87 ng/μl pour les prélèvements ongles et de 220 ng/μl à 154,9 ng/μl pour les prélèvements muscle.

La méthode Chelex® semble donc intéressante pour l'extraction d'ADN puisqu'elle permet sous des conditions de conservation adéquate le maintien d'une concentration d'ADN minimum exploitable dans le cadre d'analyses médico-légales.

Mots clés : Chelex®, Conservation, Quantification, RT-PCR .

Abstract

DNA can be degraded after a period of preservation. This degradation may be due to the quality of the sample or environmental conditions.

To evaluate the amount of DNA stability over time, a series of quantification was performed in the laboratory of genetic identification of the National Institute of Criminology and Forensic "Bouchaoui" on a group of samples by a simple and precise technique which is the real-time PCR.

For this study 37 samples from different sources were chosen, all samples were extracted by Chelex® method. 12 samples have been preserved for one month at 4°C and another 25 samples previously extracted by the same method, where 14 of them have been preserved for one year, and 11 samples preserved during six months at -20°C to represent a range of relevant biological materials in order to assess the amounts of DNA recovered using RT-PCR (Quantifiler Human, Applied Biosystems).

The results we obtained were valued by a statistical study; temporal variations were analyzed by repeated measures ANOVA or repeated measures Friedman ANOVA. When differences were significant, the related samples have been demonstrated by Tukey HSD tests.

The final results indicate that after preservation of DNA extracted by Chelex® method at a suitable temperature, the amount of DNA of the 12 samples preserved one month is comparable, where the average of the amount of DNA for blood sample increased from 0,062 ng/μl to 0,096 ng/μl and the amount of DNA for contact marks increased from 0,055 ng/μl to 0,098 ng/μl, for saliva samples we noticed a significant augmentation of the amount of DNA where the average increased from 5,36 ng/μl to 12,43 ng/μl. for samples preserved six months, the amount of DNA remains comparable where the average of the amount of DNA for blood sample increased from 0,61 ng/μl to 0,79 ng/μl, and that of contact marks sample wich increased from de 0,26 ng/μl to 0,31 ng/μl. for samples preserved one year there's been a very significant loss, where the average of the amount of DNA for blood sample declined from 0,76 ng/μl to 0,35 ng/μl, for nails sample also the average declined from 41 ng/μl to 23,87, and from 220 ng/μl to 154,9 ng/μl for muscle sample.

The Chelex® method seems appropriate for DNA extraction, this method allows to preserve under suitable conditions a usable concentration of DNA in the context of forensic analysis.

Key words: Chelex®, Preservation, Quantification, RT-PCR

الجريمة , تحليل نوعية الحمض الريبي النووي منقوص الاكسجين ADN العشرين. هذه التقنية أيضا " الجينية" بتحديد طريق تركيبهم الجينية.

الريبي النووي منقوص الاكسجين, هذا الأخير يمكنه يسمى , هذا التدهور يكون نوعية العينة البيئية غير .

كمية الحمض الريبي النووي منقوص الاكسجين , عمليات تحديد كمية الحمض الريبي النووي منقوص الاكسجين, هذه أجريت العينات البيولوجية تقنية البوليميراز RT-PCR .

هذه اختيار 12 عينة بيولوجية , بتقنية Chelex® شهر التقنية, حيث 14 عينة حفظها 4°C , أيضا اختيار 25 عينة 11 عينة أشهر لتقديم -20°C لتقدير البيولوجية لتحديد كميات النووية تقنية RT-PCR.

عليها أظهرت الحمض الريبي النووي منقوص الاكسجين بتقنية Chelex® انه يتعرض كمية منه, و هذا لم يشمل العينات المحفوظة مدة سنة حيث انخفضت كمية الحمض الريبي النووي منقوص الاكسجين.

يمكن اعتبار تقنية Chelex® الحمض الريبي النووي منقوص الاكسجين, لأنها كميات الحمض الريبي النووي منقوص الاكسجين التحليل الجريمة .

كلمات مفتاحية: Chelex®, تكميم الحمض النووي, RT-PCR, .

Liste des abréviations

µl: Microlitre

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADNmt: Acide DésoxyriboNucléique Mitochondriale

ANOVA: Analysis of Variance

°C: Degrés Celsius

CCD: Charged Coupled Device

Ct: Cycle Seuil (Threshold Cycle)

DNases: DeoxyriboNuclease

dNTP: DésoxyNucléotide Triphosphate

EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

RNases: RiboNucléase

FEO: Flux Electro-Osmotique

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

HSD: Honey Significance Difference

INCC: Institut National de Criminologie et de Chriminalistique

Mg²⁺: Magnesium

ng: nano gramme

PCR: Réaction en Chaîne par Polymérase

Ph: Potential Hydrogen

PK: Protéinase K

qPCR: Réaction en Chaîne par Polymérase Quantitative

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RT-PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase en Temps Réel

SDS: Sodium Dodécyl Sulphate

SNP: Single Nucléotide Polymorphisms

STR: Short Tandem Repeats

Taq: Thermophilus Aquaticus

UV: Ultra Violet

VNTR: Variable Numbers of Tandem Repeats



INTRODUCTION

Introduction

Au cours de ces deux dernières décennies, les techniques de la biologie moléculaire ont connue de grands progrès. Ces dernières sont devenues de nos jours indispensables surtout dans le domaine de la criminalistique et de la recherche de paternité car elles permettent l'identification des individus (**Turan *et al* ; 2015**).

Le typage de l'ADN est l'outil d'investigation de choix afin d'élucider les affaires criminelles et ce en raison de la présence de séquences répétées variables d'un individu à l'autre (**Butler, 2005**).

L'extraction de l'ADN à partir de fluides corporels tels que le sang et la salive ou encore de traces de contact est l'étape initiale et essentielle dans la recherche biologique. La bonne qualité et la quantité d'ADN affectent le succès des techniques utilisées pour les explorations génétiques à réaliser par la suite et plus particulièrement la PCR (Polymerase Chain Reaction) (**Goodwin, 2007**).

Le temps, la température et les endonucléases sont des facteurs qui dégradent l'ADN, ce qui rend difficile, voire même impossible l'obtention des fragments nécessaires pour les méthodes d'analyses basées sur la PCR si ces paramètres ne sont pas contrôlés. Afin de palier à ces inconvénients, il est nécessaire de conserver l'ADN dans des conditions qui lui soient favorables et de choisir une méthode d'extraction appropriée qui fait en sorte de préserver l'ADN et de le protéger des DNases.

L'objectif de ce travail était donc d'étudier la présence de l'ADN dans des échantillons conservé durant différentes périodes après extraction par la méthode Chelex® et d'évaluer les quantités d'ADN après plusieurs quantifications réalisées par une RT-PCR (Real Time-PCR).



Partie
BIBLIOGRAPHIQUE

I- Criminalistique

I.1-Historique

Chaque année, des milliers d'affaires criminelles dans le monde entier sont bouclées grâce à un témoin biologique silencieux sur la scène du crime (**Butler, 2012**).

En 1900, Karl Landsteiner décrit le système de groupage sanguin ABO et en 1915, Leone Lattes a publié un livre décrivant l'utilisation du typage ABO pour résoudre une affaire de paternité. C'est en 1931, que la technique « absorption-inhibition de l'ABO typage qui est devenu la norme dans les laboratoires de médecine légale avait été mise au point (**Goodwin et al ; 2007**).

Avec l'avènement des nouvelles techniques de biologie moléculaire et le développement de techniques de séquençage dans les années 70, les premiers polymorphismes génétiques ont été détectés en utilisant le Southern Blot (**Kan et Dozy., 1978**). Suite à cela, l'analyse du premier locus hautement polymorphes a été rapportée (**Wyman et White., 1980**).

En 1984, Dr. Jeffreys a constaté que certaines régions d'ADN contenant des séquences sont répétées plusieurs fois, chaque séquence à côté de l'autre, ces régions répétées d'ADN sont maintenant connus comme «VNTR » pour variable number tandem repeat La technique utilisée par le Dr Jeffreys pour examiner les VNTR a été appelée Polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP : restriction fragment length polymorphism).

Cette méthode RFLP a d'abord été utilisée pour aider dans une affaire anglaise de l'immigration et peu après pour résoudre un cas de double homicide (**Butler, 2005**).

I.2- Définition

La criminalistique est une science qui étudie les facteurs et les processus de l'action criminelle et qui détermine, à partir de la connaissance de ces facteurs et de ces processus, les moyens de lutte pour réduire ce mal social.

La criminalistique est composée d'un ensemble de disciplines et de techniques ayant pour objectif la détermination des circonstances exactes de commission d'une infraction ou un crime, de l'identification et de la personnalité de son auteur. La criminalistique met l'accent sur les techniques scientifiques, elle s'adresse surtout aux sciences purement neutres pour découvrir, enregistrer, faire des examens et identifier les preuves (**Kellens, 1998**).

II- Etude génétique en criminalistique

II.1- Le génome et la génétique médico-légale

Avec les progrès des techniques de biologie moléculaire, il est maintenant possible d'analyser une région dans tout le génome. Les loci d'ADN qui doivent être utilisés pour la génétique médico-légale devraient avoir des propriétés clés :

- Etre très polymorphes ;
- Etre facile et pas cher à caractériser;
- Peuvent Donner des profils génétiques qui sont simple à interpréter et facile à comparer entre les laboratoires ;
- Ne pas être soumise à une pression sélective;
- Avoir un faible taux de mutations (**Goodwin et al ; 2007**).

II.2- Typage d'un individu

Chaque être humain se distingue de ses *semblables* par un ensemble de caractéristiques morphologiques et biologiques qui rendent son identification possible.

Les techniques utilisées pour mettre en évidence les polymorphismes permettent aujourd'hui d'obtenir, dans de courts délais, des résultats extrêmement précis à partir d'échantillons ne contenant qu'une quantité infime de produit biologique.

II.2.1- Le polymorphisme de l'ADN nucléaire

L'ADN nucléaire se retrouve dans le centre de contrôle d'une cellule : le noyau, stocké à l'intérieur de vingt-trois paires de chromosomes.

Les marqueurs polymorphes sont des loci présentant plusieurs allèles qui vont servir de balises le long des chromosomes, ce sont rarement des gènes mais se transmettent d'une génération à l'autre comme des gènes.

En revanche, la plus grande partie de l'ADN nucléaire ne commande directement aucune synthèse protéique et l'on ignore actuellement sa fonction précise. Dans cette partie non codante, l'analyse a mis en évidence des régions variables : il s'agit de segments d'ADN caractérisés par la répétition en tandem d'unités de base, On distingue ainsi deux types de polymorphismes :

- les mini-satellites ou VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats).

- les micro-satellites ou STR (Short Tandem Repeats).

II.2.2- Le polymorphisme de l'ADN mitochondriale

A l'exception de l'ADN nucléaire, il existe un petit génome circulaire trouvé dans les mitochondries, c'est l'ADN mitochondriale (ADNmt) (**Butler, 2012**).

Contrairement à l'ADN nucléaire, qui est hérité des deux parents, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est à transmission maternelle (**Sozer, 2014**).

L'ADNmt ne contient que peu d'ADN non codant. Il ne contient notamment pas de séquences répétitives. Le polymorphisme disponible sur cet ADN est donc limité. Il est essentiellement constitué de variations de séquence (polymorphisme de séquence). Il présente néanmoins un double intérêt :

- préservé par la haute résistance de la mitochondrie et présent en de nombreux exemplaires dans une cellule.
- il peut également permettre d'expertiser des tissus biologiques dépourvus d'ADN nucléaire, mais riches en mitochondries, qui sont prélevés sur une scène de crime (**Coquoz et Taroni., 2006**).

II.3- Polymorphisme génétique

Les êtres humains sont génétiquement très proches, ceci est dû à leur appartenance à la même espèce.

Le polymorphisme est un ensemble de variations interindividuelles (mutations, recombinaisons...) affectant des caractères biologiques mineurs. Il sert de marqueur génétique permettant l'identification des individus. On ne parle de polymorphisme que si la variation est suffisante pour que l'allèle le plus fréquent ait une fréquence inférieure à 95%, c'est pour cela que les polymorphismes constituent la base et la condition de tous les moyens d'identification (**Le Morvan, 2005**).

II.3.1- Polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP)

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) résulte de variations individuelles de la localisation de sites de restriction pour une enzyme donnée. Il peut être dû soit à une création ou une suppression

d'un site de restriction en relation avec une mutation soit à une variation de distance entre deux sites suite à une insertion ou une délétion d'ADN.

La révélation de ses polymorphismes peut être réalisée par la méthode de southern blot après digestion de l'ADN en fragments de tailles différentes par des enzymes de restriction (HinfI est généralement la plus utilisée) (**Butler, 2005**).

II.3.2- Polymorphismes de répétition

Le génome humain est constitué d'une grande partie de séquences répétitives, très polymorphes. Ces séquences répétées en tandem se situent soit dans les introns des gènes, soit entre les gènes. On distingue deux types de marqueurs parmi ces séquences : Les minisatellites et les microsatellites (**Mansuet-Lupo *et al* ; 2008**).

Ses répétitions sont largement utilisées dans le domaine de la criminalistique. Les minisatellites et les microsatellites possèdent la même structure générale. Il existe une différence dans le nombre d'unités répétitives qui se traduit par des allèles de différentes longueurs causant ainsi une variation entre les différents allèles (**Goodwin *et al* ; 2007**).

II.3.2.1- Les minisatellites (VNTR)

Localisés principalement au niveau des régions subtélomériques des chromosomes, les minisatellites ou VNTR (Variable Number Tandem Repeat) sont composés de séquences de 6 à 100 nucléotides répétées en tandem. Les répétitions sont représentées dans certains allèles des milliers de fois (**Forster *et al* ; 2002**).

Les VNTRs ont été les marqueurs génétiques les plus utilisés dans le traitement des dossiers médico-légale et ont connu un très grand succès durant plusieurs années, mais leur utilisation était limitée car ils présentaient un inconvénient majeur qui est la nécessité d'avoir de grandes quantités d'ADN de bonne qualité (**Mansuet-Lupo *et al* ; 2007**).

Leur utilisation en génétique médico-légale est maintenant remplacée par les microsatellites ou STRs (Short Tandem Repeat) (**Goodwin *et al* ; 2007**).

II.3.2.2- les microsatellites (STR)

Les microsatellites ou STRs (Short Tandem Repeat) sont des régions répétées d'ADN constituées de moins de 6 nucléotides. Ils sont répartis uniformément dans l'ensemble du génome humain (**Mansuet-Lupo *et al* ; 2007**).

Le nombre de STRs dans le génome humain est estimé à environ 500 000 STRs, localisés sur un locus spécifique, généralement utilisés pour l'identification des individus. Ils sont le produit du glissement des brins complémentaires de l'ADN durant la réplication. De plus, les mutations ponctuelles et les éléments transposables ont eux aussi une influence sur l'apparition des microsatellites (**Sozer, 2014**).

.3.3- Polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP)

Les SNP (Single Nucléotide Polymorphisms) sont la forme la plus simple du polymorphisme portant sur un seul nucléotide. Ils sont formés lorsque des mutations se produisent lors de la réplication cellulaire durant la méiose (**Thorison et Stein., 2003**).

Les SNP constituent les polymorphismes les plus répons dans le génome humain. Ils sont stables, très abondants et distribués uniformément dans tout le génome. Ils sont présents sur les régions codantes et non codantes de l'ADN et ce aussi bien sur l'ADN nucléaire que sur l'ADN mitochondrial (**Goodwin, 2007**).

III- Conservation d'échantillons biologiques

III.1- Echantillons biologiques

Le corps humain est composé de millions de cellules. Toutes ces cellules contiennent un noyau à l'exception des globules rouges. Chaque cellule nucléée contient deux copies du génome d'un individu, et peut être utilisée pour générer un profil d'ADN à des conditions optimales (**Kloosterman et Kersbergen., 2003**).

Le plus souvent, le matériel biologique collecté sur les scènes de crime est le sang car il est le plus facile à détecté qu'un autre matériel biologique. Ceci dit, d'autres composants biologiques peuvent être détectés tels que la salive trouvée sur des objets ayant un contact avec la bouche comme : les mégots de cigarette, verres, marques de morsure...

III.2- Conservation de l'ADN

Afin de ralentir sa dégradation, le matériel biologique doit être conservé dans des conditions favorables à basse température et loin de l'humidité. En effet, l'ADN est une source de nourriture pour les bactéries et les champignons ce qui génère sa dégradation donc sa conservation dans un milieu frais limite leur action.

Les conditions de conservation dépendent de la nature des échantillons. Au sein d'un laboratoire, les échantillons d'ADN sont stockés dans un réfrigérateur à 4°C pour une conservation de courte durée, à -20°C et à -70°C pour une conservation de longue durée (Caenazzo, 2009).

IV- Stabilité de l'ADN

La stabilité de la molécule d'ADN est liée à la dégradation de cette dernière. L'ADN peut être endommagé ou détruit par des conditions environnementales défavorables. L'exposition environnementale dégrade les molécules d'ADN en les cassant au hasard en petits morceaux.

Les principaux facteurs influents sur la stabilité des molécules d'ADN sont l'eau, l'oxygène, l'irradiation ultraviolette, la chaleur et les nucléases (enzymes qui dégradent l'ADN) (Butler, 2012).

L'eau cause la rupture des liaisons entre les nucléotides accrochés pour former la chaîne d'ADN. De plus, l'eau rend possible l'action des nucléases.

La chaleur est un des éléments déterminant la vitesse de toute réaction chimique, et donc les diverses réactions de dégradation de l'ADN (hydrolyse, oxydation, etc.). Plus la température est élevée, plus rapide est chacune de ces réactions (Coquoz et Taroni., 2006).

V- Méthodes d'analyse génétique en criminalistique

V.1- Méthodes d'extractions de l'ADN

Il existe de nombreuses méthodes disponibles pour l'extraction de l'ADN. Le choix de la méthode à utiliser dépend d'un certain nombre de facteurs, y compris le type d'échantillon et la quantité de départ; la rapidité et dans certains cas, la possibilité d'automatiser la procédure d'extraction (Castella *et al* ; 2006) (Moss *et al* ; 2003).

Les molécules d'ADN doivent être séparées des autres matières cellulaires (protéines, la membrane cytoplasmique, le cytoplasme ect...) avant qu'elles puissent être examinées. Les protéines cellulaires qui protègent l'ADN dans l'environnement de la cellule peuvent inhiber la capacité d'analyser l'ADN (Butler, 2005). Les étapes d'extraction d'ADN sont caractérisées par une rupture des membranes cellulaires, ce qui entraîne la lyse des cellules, une dénaturation des protéines et la séparation de l'ADN des protéines dénaturées et des autres composants cellulaires (Goodwin *et al* ; 2007).

V.1.1- Méthode d'extraction organique 'phénol-chloroforme'

L'extraction organique, parfois appelée extraction au phénol chloroforme, a été pendant de nombreuses années la méthode la plus largement utilisée pour l'extraction de l'ADN (**Butler, 2012**).

Dans ce procédé, les globules rouges qui ne contiennent pas d'ADN sont lysés par rupture physique de leurs membranes cellulaires. L'extraction organique implique l'addition en série de plusieurs produits chimiques. Les globules blancs sont ensuite lavés et traités avec de la protéinase K et du dodécylsulfate de sodium (SDS) pour rompre les membranes cellulaires et décomposer les protéines qui protègent les molécules d'ADN quand elles sont dans les chromosomes (**kobilinsky et al ; 2005**).

Par la suite, un mélange phénol / chloroforme est ajouté pour séparer les protéines de l'ADN.

L'extrait est ensuite centrifugé et les protéines précipitées forment une pellicule à l'interface entre la phase de phénol-chloroforme organique et la phase aqueuse contenant l'ADN. Ce procédé est répété deux à trois fois ou jusqu'à ce qu'il n'y ai plus de pellicule visible. (**Comey et al ; 1994**)

L'ADN est ensuite purifié à partir de la phase aqueuse par précipitation à l'éthanol ou filtrer par centrifugation.

V.1.2-Méthodes d'extractions inorganiques

Les méthodes d'extractions inorganiques sont basées sur l'utilisation des produits chimiques inorganiques ; chlorure de sodium ; chlorure de lithium ; EDTA ; acide acétique, et ce, afin de relarguer les protéines à partir d'un mélange d'ADN et de protéines. Dans le cadre de notre travail, c'est la méthode d'extraction Chelex® qui sera détaillée.

V.1.2.1- Méthode d'extraction « Chelex® »

La méthode Chelex® a été largement utilisée dans les laboratoires médico-légaux en raison de sa simplicité et son efficacité (**Phillips et al ; 2012**).

Chelex®, est une méthode basée sur l'échange d'ions, rapide, efficace et moins sujette à la contamination échantillon-échantillon que d'autres techniques d'extraction d'ADN (**Rogers *et al* ; 2007**).

Chelex® est une résine échangeuse d'ions qui est ajoutée sous forme d'une suspension à l'échantillon (**Walsh *et al* ; 1991**). Elle est composée de copolymère styrène-divinylbenzène contenant des ions iminodiacétate appariés qui agissent comme des groupes chélateurs liants des ions métalliques polyvalents tels que le magnésium (Mg^{2+}) (**Bille *et al* ; 2004**).

V.1.2.2- Principe de Chelex®

Le principe de Chelex® dépend d'un rapport de charge. Le Chelex® contient des résines échangeuses d'ions chargées négativement qui se lient à un cofacteur qui est le Mg^{2+} responsable de l'activation des endonucléases (DNases et RNases). Après dégradation des protéines membranaires par la protéinase K (PK), le matériel cellulaire sera libéré dans la solution et le Chelex® séquestre le Mg^{2+} . L'activation des endonucléases ne sera donc pas faite, et l'ADN reste intact.

V.1.3- Méthode d'extraction FTA paper (Fast Technology for Analysis paper):

FTA paper, est un papier absorbant à base de cellulose qui contient quatre substances chimique qui protègent l'ADN de la dégradation des nucléases et conservent le papier contre la croissance bactérienne (**Burgoyne, 1996**).

L'utilisation de FTA paper implique simplement le dépôt d'une tache de sang sur le papier. Après avoir sécher la tache, le matériel cellulaire est lysé au contacte direct avec le papier FTA et l'ADN reste lié au papier. L'ADN lié peut ensuite être purifié par lavage avec des réactifs de purification FTA pour éliminer l'hème et d'autres inhibiteurs de la réaction PCR (**Lorente *et al* ; 1998**), (**Kline *et al* ; 2002**).

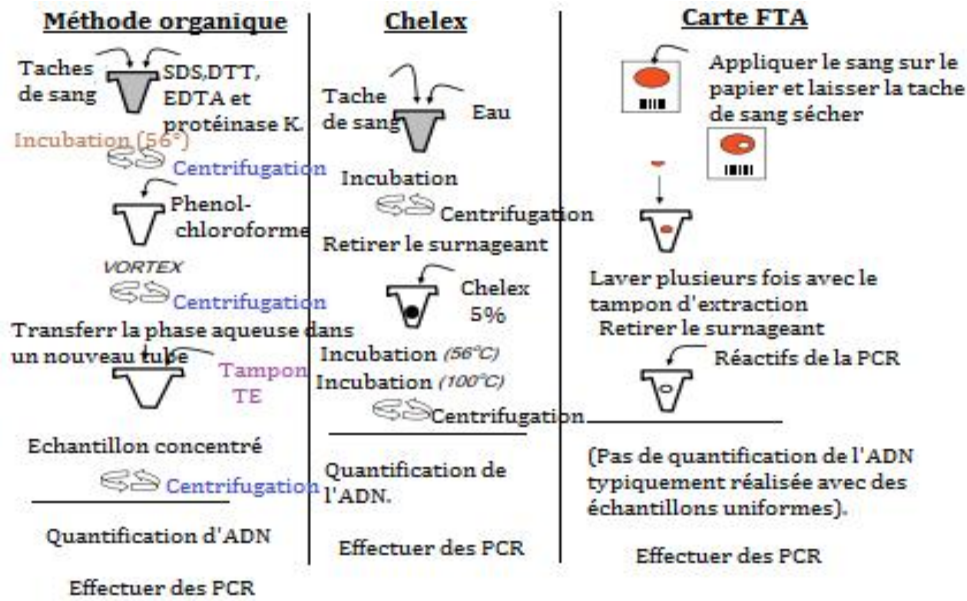


Figure 1 : schéma représentant différents procédés d'extraction d'ADN (organique, Chelex®, FTA paper) (Butler, 2011).

V.1.4 Extraction en phase solide

L'extraction en phase solide est une technique conçue pour une préparation sélective et rapide des échantillons ainsi qu'une purification avant une analyse chromatographique.

L'ADN est sélectivement lié à un substrat tel que des particules de silice. Les molécules d'ADN sont alors retenues alors que les protéines et d'autres composants cellulaires sont élués par lavage. Ensuite, l'ADN est libéré sous une forme purifiée.

PrepFiler est une technique d'extraction en phase solide qui a été validée et permet l'isolement de l'ADN de haute qualité avec des rendements élevés principalement en raison du fait qu'une petite taille des billes est utilisée pour fournir une plus grande surface pour capturer des molécules d'ADN au cours du processus d'extraction (Barbaro *et al* ; 2009), (Brevnov *et al* ; 2009).

V.2- Quantification de l'ADN par PCR en temps réel

Après extraction et purification, l'ADN est ensuite quantifié afin de vérifier si la quantité d'ADN présente est amplifiable (Budowle *et al* ; 2000).

L'addition d'une quantité correcte d'ADN à la PCR produit de bons résultats alors qu'un surplus ou une quantité insuffisante d'ADN affectent les résultats et rend les profils impossibles à interpréter. (Nicklas et Buel., 2003).

La quantification de l'ADN est réalisée par la PCR en temps réel appelée également la PCR quantitative (qPCR). C'est une technique qui peut refléter à la fois la qualité et la quantité d'ADN dans un échantillon extrait (**Barbisin et Shewale., 2010**).

Tous les systèmes de PCR en temps réel sont basés sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent (reporter) durant le processus d'amplification. Le signal augmente donc d'une façon exponentielle au cours des cycles de PCR. L'augmentation du signal d'émission fluorescent est donc proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. (**Poitras et Houde., 2002**).

V.2.1- les phases de la PCR en temps réel

La PCR en temps réel comprend trois phases :

1-La phase exponentielle : C'est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR, il y'a un doublement de produit à chaque cycle à un taux exponentiel. Il existe une relation proportionnelle entre l'augmentation de la fluorescence et l'augmentation du produit PCR.

2-La phase linéaire : Diminution de la quantité des composants et l'amplification devient de moins en moins efficace.

3-La phase plateau : le taux d'amplification décroît générant très peu d'amplicons et reste constant (**Goodwin, 2007**).

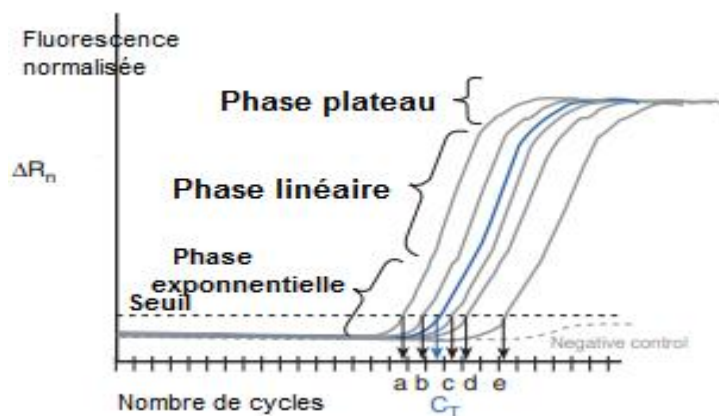


Figure 2 : Les différentes phases de la qPCR (**Butler, 2005**).

V.2.2- Hydrolyse de sondes (la technologie TaqMan)

Basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase, la sonde TaqMan a pour principe d'hydrolyser une sonde hybridée à la séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation.

La sonde Taqman est pourvue d'un fluorochrome émetteur (reporter) du coté de son extrémité 5', et d'un fluorochrome suppresseur (quencher) situé à l'extrémité 3'. L'émission du reporter est inhibée par le quencher. Une fois stimulé, il y'a un transfert d'énergie du fluorochrome émetteur vers le fluorochrome suppresseur par le principe de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), cette énergie est transformée en chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence (**Mackay *et al* ; 2002**).

L'élongation du nouveau brin d'ADN est entamée à partir de l'amorce par la Taq polymérase. Lors de l'élongation, la Taq polymérase rencontre la sonde hybridée sur son passage et l'hydrolyse par la suite grâce à son activité 5'-exonucléasique, ceci permet la libération du reporter de l'environnement du quencher, permettant ainsi l'émission de la fluorescence (**Bustin, 2000**).

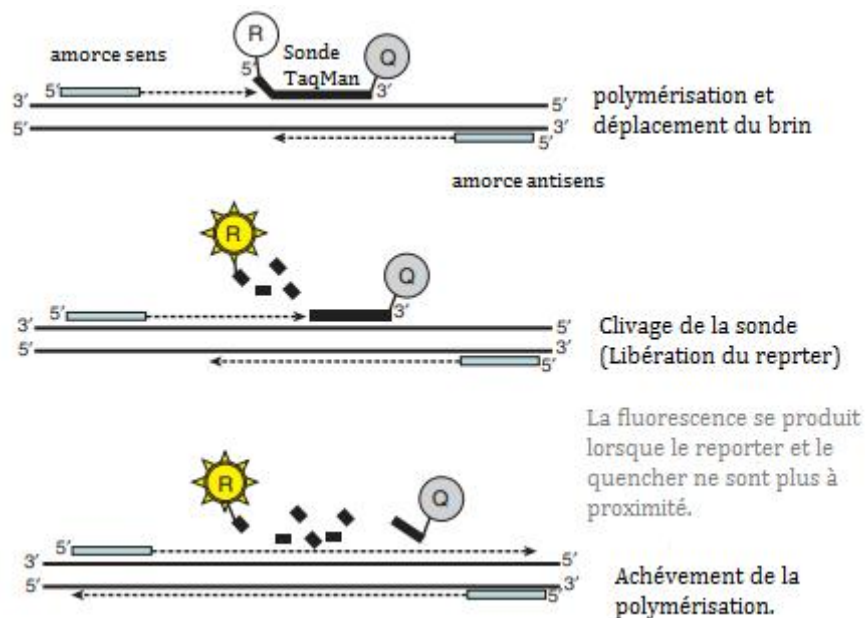


Figure 3 : Représentation schématique de la technologie TaqMan (Butler, 2005).

V.3- Amplification par PCR

V.3.1- Principe de la PCR

La PCR est un processus enzymatique. Il s'agit d'une réplification *in vitro* de séquences spécifiques d'ADN permettant de produire des dizaines de milliards d'exemplaires d'une même séquence. C'est un processus similaire à ce que réalise une cellule en division. Environ une trentaine de cycles sont effectués dans une expérience de PCR classique. Ainsi, après 30 cycles on aura amplifié 2 fois notre ADN cible (Coquoaz *et al* ; 2013).

Chaque cycle de PCR comprend trois étapes :

1-La dénaturation : La première étape est la dénaturation, elle s'effectue à une température de 94°C. A cette température, l'ADN matriciel est dénaturé suite aux cassures des liaisons hydrogènes car ces liaisons ne peuvent pas se maintenir à une température supérieure à 80°C et l'ADN double brin se dénature en ADN simple brin.

2-L'hybridation : La seconde étape est l'hybridation, elle s'effectue à une température, appelée température d'hybridation des amorces qui varie entre 50 et 65°C. La diminution de la température permet aux amorces de s'apparier par complémentarité à leurs séquences cibles sur l'ADN.

3-L'élongation : La dernière étape est l'élongation, elle s'effectue à une température de 72°C. La Taq polymérase se lie aux ADN monocaténaux amorcés et synthétise les brins d'ADN complémentaires en ajoutant des dNTPs à la suite des amorces.

Au cycle suivant, les fragments synthétisés durant le cycle précédent servent à leur tour de matrice.

V.3.2- Inhibiteurs de la PCR

Dans les analyses des échantillons forensiques par PCR, le problème d'inhibition de la PCR peut surgir (Wilson, 1997).

La Taq polymérase peut être inhibée par certains produits chimiques, une forte concentration d'ions, en particulier le calcium et le magnésium (Coquoaz *et al* ; 2013).

En sciences forensiques, il existe deux inhibiteurs majeurs de la PCR qui sont l'hème, le colorant qui confère la couleur rouge à l'hémoglobine et le colorant bleu dans les vêtements comme celle trouvée dans les jeans (Goodwin, 2007).

V.4- Séparation et détection par électrophorèse capillaire

Après amplification, les fragments d'ADN doivent être séparés. Cette séparation se fait selon le poids moléculaire. Les analyses des STRs se faisaient traditionnellement par électrophorèse sur support de polyacrylamide, indispensable pour atteindre la puissance de séparation nécessaire. Actuellement, cette technique a été remplacée par l'électrophorèse capillaire qui est plus efficace et plus rapide.

L'électrophorèse capillaire est une technique de séparation intermédiaire entre l'électrophorèse classique et la chromatographie liquide. Elle se déroule dans un tube très fin appelé « capillaire ». C'est la méthode principale de la séparation et détection des STRs.

Plusieurs éléments influent sur la séparation d'ADN au sein de l'électrophorèse capillaire : Le polymère utilisé afin de permettre la séparation, le capillaire, le tampon d'électrophorèse et le voltage appliqué ou l'intensité du champ électrique (Sozer, 2014).

V.4.1- Séparation de l'ADN

Les produits de PCR amplifiés sont injectés dans un capillaire contenant une solution visqueuse appelée « polymère ». Un champ électrique très élevé est ensuite appliqué à travers le polymère provoquant ainsi la séparation des molécules d'ADN. Les petites molécules d'ADN migrent plus rapidement et sont détectées en premier.

L'ADN se déplace avec le flux électrophorétique de l'électrode négatif (cathode) vers l'électrode positif (l'anode). Les fils du polymère emmêlés forment des pores transitoires qui servent d'obstacles afin d'inhiber la migration des molécules d'ADN en fonction de leur taille. Les petites molécules d'ADN passent facilement à travers les obstacles.

Une autre force est en jeu dans le capillaire, il s'agit du flux électro-osmotique (FEO). En présence d'un tampon aqueux de pH > 1,5, les groupes silanol de la paroi interne du capillaire sont chargés négativement. Ils sont à l'origine de la formation d'une double couche d'ions : interne négative (groupements silanol) et diffuse positive (cations du tampon). La mise en mouvement des ions chargés positivement sous l'influence du champ électrique crée le FEO de l'anode vers la cathode sous la forme d'un front plat. De ce fait, la dispersion de l'échantillon est faible et l'efficacité de la séparation élevée (Trivin, 2003).

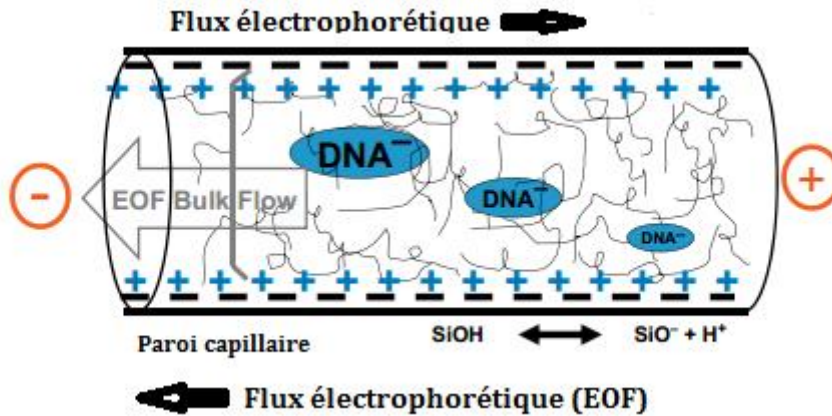


Figure 4 : Illustration interne du capillaire et les forces mises en jeu avec le déplacement des molécules d'ADN (Butler, 2011).

V.4.2- Détection fluorescence des fragments d'ADN séparés

A l'issue de la PCR, les amplicons des différents STRs se retrouvent marqués par un fluorophore attaché à une amorce qui est incorporée dans la région cible de l'ADN amplifié.

Une fenêtre de détection est disposée le long du capillaire. Quand les fragments d'ADN parviennent à son niveau, plus ou moins séparés les uns des autres après avoir migré sur une distance suffisante, le fluorophore qu'ils portent est excité par un laser qui absorbe l'énergie du laser puis émet de la lumière à une faible énergie. Les signaux fluorescents subissent une décomposition spectrale (prisme) et chaque faisceau est dirigé vers une caméra CCD qui transforme le signal lumineux en un signal électrique converti en information numérique utilisable par les logiciels. Ces signaux sont mesurés en unité de fluorescence et les allèles des STRs sont représentés dans un électrophorégramme sous forme de pics ou sont visualisés sous forme de bandes (Butler, 2005).



**MATERIELS
ET
METHODES**

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'identification génétique, au sein de l'institut national de criminologie et de criminalistique de la gendarmerie scientifique à Bouchaoui, Alger pendant une période limitée allant du 09-03-2016 au 20-04-2016.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'évolution de l'ADN conservé après extraction par la méthode Chelex® et d'étudier la fiabilité de cette méthode d'extraction.

Notre étude a porté sur des échantillons conservés d'une semaine à un mois et des échantillons conservés pendant 6 mois et 1 an.

I- Prélèvements et préparation des échantillons

I.1-Matériel biologique

Avant chaque manipulation, il est nécessaire de porter un masque, une charlotte et des gants stériles afin d'éviter tout type de contamination.

Les échantillons biologiques ont été prélevés volontairement à partir de 5 participants connus, comme suit :

- Prélèvements de la salive

A l'aide d'un écouvillon stérile, chaque participant a écouvillonné à l'intérieur de sa bouche pendant 5 minutes. Un numéro identifiant a été attribué à chaque écouvillon.

- Prélèvements du sang

Avec une électrode d'un appareil de glycémie, 4 participants ont été piqués au doigt, ensuite avec un écouvillon, chaque participant a récupéré une goutte de sang. Chaque écouvillon porte un numéro identifiant.

- Prélèvements des traces de contacts

3 participants ont frotté leurs mains à l'aide d'un écouvillon, sur ce dernier des traces de contact ont été récupérées. Chaque écouvillon porte un numéro identifiant.

I.2- Mise en tube des prélèvements

- Les tubes eppendorfs sont désinfectés aux UV pendant 4 minutes.

- Chaque échantillon a été mis dans un tube eppendorf de 2 ml, chaque tube possède un numéro correspondant à l'écouvillon d'où provient l'échantillon. Cette étape permet de procéder à l'étape d'extraction.

I.3- Matériel non biologique

Tableau I : matériels et réactifs

Matériels	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"> - Micropipette. - Tubes eppendorfs 0.6ml; 2ml - Cross-linker. - Centrifugeuse - Bain marie - Bain à sec. - Vortex. - Les embouts. - Plaque de 96 puits optique. - Real Time PCR, Applied Biosystem, USA). - SDS system version 1.2.3 	<ul style="list-style-type: none"> - Chelex®, résine échangeuse 5%. - Protéinase K. - Le kit de quantification : <ul style="list-style-type: none"> • Master mix • Primer mix - La solution standard : <ul style="list-style-type: none"> • Solution mère • Eau ultra pure

II- Méthodes

II.1- Extraction d'ADN

- Principe d'extraction par Chelex®

La méthode Chelex® constitue un moyen très rapide pour isoler l'ADN des DNases. Son principe est basé sur l'inhibition de l'action des endonucléases sur l'ADN en séquestrant le Mg^{2+} qui est un coeffecteur stimulant l'action des DNases.

- Mode opératoire

Avant de procéder à l'extraction une étape de lavage est consacrée uniquement pour les échantillons contenant le sang. Car l'hémoglobine est un inhibiteur de la réaction PCR.

La procédure est très simple :

- Mettre 1ml d'eau ultra pure dans chaque tube contenant l'échantillon sanguin.
- Mélanger les tubes au vortex pendant 30 secondes.
- Turbuler les tubes pendant 10 minutes (40 tours/min).
- Centrifuger les tubes pendant 3 minutes à 13000 rpm.

Cette étape est répétée plusieurs fois (3 fois minimum) jusqu'à obtention d'un surnageant clair.

- Avant chaque utilisation, il faut faire passer le Chelex® 5% au vortex pendant 5 secondes.
- Ajouter 400 µl du Chelex® 5% à chaque échantillon à l'aide d'une micropipette.
- Ajouter 20 µl de protéinase K (PK) à l'aide d'une micropipette (pour les échantillons contenant le sang, on ajoute seulement 4 µl de PK).
- Faire passer les tubes au vortex pendant 30 secondes afin que les mélanges deviennent homogènes.
- Incuber pendant 30 minutes minimum à 56°C au bain marie pour assurer l'activité de la PK qui est la digestion des protéines.
- Mélanger les tubes au vortex pendant 30 secondes.
- Incuber les échantillons au bain sec pendant 8 minutes à 100°C afin d'assurer la lyse cellulaire complète.
- Mélanger les échantillons au vortex pendant 10 secondes.
- Centrifuger les échantillons au vortex pendant 3 minutes à une vitesse de 13000 rpm.
- Récupérer le surnageant (200µl) à l'aide d'une micropipette et le mettre dans un tube eppendorf stérile.
- 3 µl de chaque échantillon d'ADN extrait à été prise et déposée dans chaque'un des tubes pour la quantification.
- Les tubes des échantillons initiaux ont été conservés dans le réfrigérateur à 4°C.

Un microtube vide de 2 ml est additionné aux tubes contenant les échantillons, ce tube est réservé au control négatif (le blanc). C'est un test indicatif qui a pour objectif de révéler toute sorte de contaminations. Il a été soumis à la même procédure que les échantillons biologiques, mais il ne contient que les réactifs nécessaires à l'extraction.

II.2- Quantification de l'ADN

- Préparation des réactifs

Le kit de quantification (Quantifiler Human DNA) contenant différents réactifs nécessaires à la préparation de Master Mix de la RT-PCR, qui sont :

- Réaction Mix : Taq polymérase, Mg²⁺⁺ (co-effecteurs), dNTPs. Ce mélange est conservé à (+4°C)
- Primer Mix : amorces. Ce primer est conservé à (-20°C).

Pour la préparation de la solution standard :

- Solution mère : contenant 200ng/ μ l d'ADN synthétique de concentration connue.
- Eau ultra pure

- Mode opératoire

- **Quantification des échantillons conservés d'une semaine à un mois**

les différentes quantifications des échantillons conservés pendant un mois

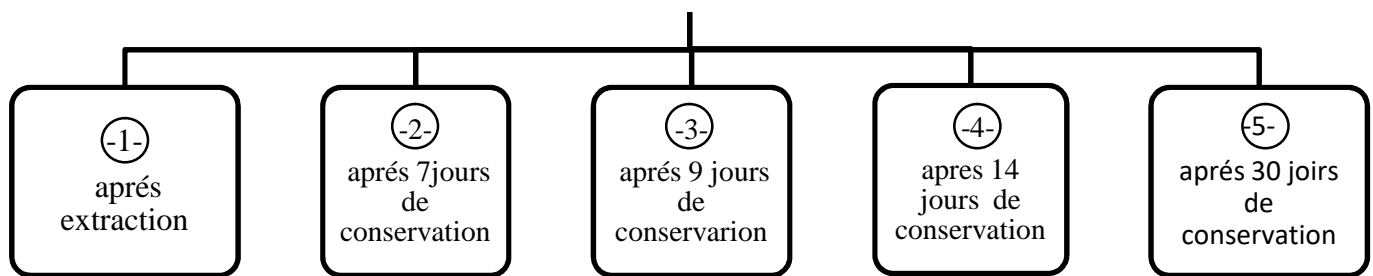


Figure 5 : digramme représentant les quantifications des échantillons conservés pendant un mois

Après l'achèvement de la phase d'extraction, des aliquotes ont été préparés à partir des échantillons préalablement extraits.

- Préparation du plan de travail et désinfection de l'hôte aux U.V.
- Des microtubes de 0.6ml ont été préparés et désinfectés au cross-linker.

Avant d'entamer la quantification, une préparation de la gamme des standards qui représente une série de 08 dilutions préparées à partir d'une solution mère d'ADN standard 200 ng/ μ l est réalisée, afin d'établir une courbe d'étalonnage pour que le logiciel (7500 system SDS software) puisse calculer la concentration d'ADN dans chaque échantillon.

La courbe d'étalonnage représente une relation proportionnelle entre l'intensité de la fluorescence et le nombre de la quantité d'ADN synthétisée.

Le plan de préparation des standards est représenté dans le tableau **-II-**:

Tableau I : Préparation des standards.

Les standards	Préparation des solutions	Concentration Finale [ng/µl]
Standard-1-	30 µl d'eau ultra pure + 10 µl de solution mère	50
Standard-2-	20 µl d'eau ultra pure + 10 µl de standard-1-	16,7
Standard-3-	20 µl d'eau ultra pure + 10 µl de standard-2-	5,56
Standard-4-	20 µl d'eau ultra pure + 10 µl de standard-3-	1,85
Standard-5-	20 µl d'eau ultra pure + 10 µl de standard-4-	0,62
Standard-6-	20 µl d'eau ultra pure + 10 µl de standard-5-	0,21
Standard-7-	20 µl d'eau ultra pure + 10 µl de standard-6-	0,068
Standard-8-	20 µl d'eau ultra pure + 10 µl de standard-7-	0,023

NB: Après chaque préparation d'un standard, on vortex pour que la solution soit homogène.

La préparation du master mix nécessite la préparation d'un mélange entre la solution réaction mix et la solution primer mix, les volumes sont présentés dans le tableau-**III-** :

Tableau III : Préparation du master mix.

Quantifiler Humain (H)		
Réactifs	Volume par réaction (µl)	Volume total Master Mix (µl)
Réaction Mix	6,5	234
Primer Mix	5,5	198

Le volume total= volume par réaction × nombre de réaction + 2

- Le volume total du master mix est de 432 µl.
- Dans la plaque de 96 puits optiques, nous avons utilisé les quatre premières rangées, les deux premières rangées ont été réservées pour le dépôt des solutions standards, les deux restantes pour le dépôt des échantillons.
- Dans les puits réservés aux standards on a déposé à l'aide d'une micropipette un volume de 12µl de la solution master mix dans le puits correspondants (voir annexe 01), et un volume de 1 µl de chaque solution standard.
- La même chose pour les échantillons : 12 µl de la solution master mix et 1 µl de chaque échantillon.

- Le dernier puits des quatre rangées a été réservé pour le témoin négatif de la quantification TQ, le TQ contient 1 µl d'eau ultra pure et 12 µl de master mix, ce témoin a pour but de détecter s'il y'a une contamination ou non.
- La plaque de quantification est recouverte par un film transparent pour garder l'échantillon plus ou moins stable.
- Cette dernière est placée dans la centrifugeuse pour que les puits soient dépourvus des bulles d'air.
- La plaque à été placée dans le système 7500 RT-PCR pour entamer la quantification d'ADN.

NB: le même protocole de quantification à été réalisé pour les autres quantifications ; d'une semaine de conservation, de deux semaine de conservation, et d'un mois de conservation.

- **Quantification des échantillons de six mois et d'un an :**

Une quantification à été réalisée sur des échantillons extraits il y'a six mois et une année conservés au niveau de laboratoire.

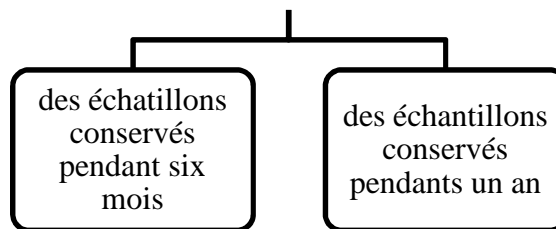


Figure 6 : digramme représentant la quantification des échantillons de six mois et un an

Afin d'étudier la présence d'ADN après une durée de conservation à une température de -20°C. Nous avons choisi de réaliser une quantification d'anciens échantillons conservés pendant six mois et d'autres conservés pendant un an. Ces prélèvements ont été extraits par la méthode Chelex®.

Cette quantification se fait sur des échantillons conservés au niveau du laboratoire au sein de l'INCC. Les concentrations initiales de ces échantillons sont répertoriées dans la partie annexe (annexe 2 et 3).

Le même protocole de quantification précédemment détaillé a été réalisé sauf que les volumes nécessaires pour la préparation du master mix étaient différents.

Tableau IV: Préparation du master mix.

Quantifiler Humain (H)		
Réactifs	Volume par réaction (µl)	Volume total Master Mix (µl)
Réaction Mix	12,5	575
Primer Mix	10,5	483

Nous avons choisis 25 échantillons dont 11 conservés pendant 6 mois et 14 conservés pendant un an. Ces échantillons ont été prélevés à partir de traces de sang, prélèvements de muscles, des ongles, et des traces de contact. Les concentrations initiales en ADN étaient connues. Le plan de la plaque de quantification est répertorié dans la partie annexe (annexe 4).

III- Analyse statistique

Les concentrations d'ADN ont été mesurées à partir d'échantillons de salive (5), de sang (4) et de traces de contact (3). Les mesures ont été effectuées après 1 jour puis répétées après 7, 9, 14 et 30 jours. Les variations temporelles ont été analysées par ANOVA à mesures répétées sur les 5 périodes ou ANOVA de Friedman à mesures répétées lors d'écarts à la normalité. Lorsque les différences ont été significatives, les échantillons correspondants ont été mis en évidence par des tests de Tukey HSD (Honey Significance Difference).

Une 2^{ème} série a porté sur des concentrations d'ADN mesurées à partir d'échantillons de sang (6), d'ongles (3) et de muscle (5). Les mesures ont été effectuées dès le prélèvement puis après 1 an.

Une 3^{ème} série a porté sur des concentrations d'ADN mesurées à partir d'échantillons de sang (7) et de traces de contact (2). Les mesures ont été effectuées dès le prélèvement puis après 6 mois. Les variations temporelles pour ces 2 dernières séries ont été analysées par des test t pour échantillons appariés sur les 2 périodes.

L'analyse a été effectuée sur Statistica 10, Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA. Les résultats sont donnés sous la forme $\bar{x} \pm SE$; SE est l'erreur standard sur la moyenne égale à $\frac{s}{\sqrt{n}}$ où n est l'effectif de l'échantillon et s l'écart-type estimé.



RESULTATS
ET
DISCUSSION

Le but de ce travail était d'étudier l'évolution de l'ADN conservé après extraction par la méthode Chelex®. Pour cela une série de quantification a été réalisée afin de mesurer les quantités d'ADN dans les échantillons préalablement extraits, après une durée d'un mois au réfrigérateur (4°C) et des échantillons conservés pendant 6 mois et une année au congélateur (-20°C), en utilisant une PCR en temps réel.

I-Quantification de l'ADN

I.1- Cycle seuil (*Threshold cycle*) et

Au cours de chaque cycle les valeurs de fluorescence représentent la quantité d'amplicons produits dans la réaction. Le cycle seuil représente le nombre de cycles requis ou le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond et il apparaît au cours de la phase exponentielle de l'amplification (Tse et capeau., 2003).

I.2- Etablissement de courbes standards

Le clivage de la sonde TaqMan se traduit par une augmentation du signal fluorescent qui est directement proportionnelle à l'augmentation de la proportion d'amplicons. Cette augmentation de la fluorescence peut être corrélée à la quantité de la matrice d'ADN initial comparée avec des échantillons dont la concentration d'ADN est connue (Elyse, 2002). De ce fait il est possible d'établir une droite appelée courbe standard permettant le calcul de la quantité d'ADN. La courbe standard est générée par le logiciel donnant Ct (cycle seuil) en fonction du logarithme décimal de la concentration en ADN (Stratagene, 2007).

Tableau V: Résultats des courbes établies après chaque quantification.

Quantification des échantillons conservés pendant un mois		
La courbe standard	Équation de type $y=ax+b$	R^2
J ₁	$y= -3,373744x + 29.10$	0,9963
J ₇	$y= -3,214804x + 28.76$	0,9969
J ₉	$y= -3,381639x+29,19$	0,9942
J ₁₄	$y=-3.299085x + 29.01$	0.9972
J ₃₀	$y=-3,088518x+29,47$	0,9951
Quantification des échantillons conservés pendant six mois et une année		
J _{6mois} J _{1an}	$y=-3,409173x + 28.17$	0,9939

R² : Coefficient de détermination. **a** : Pente. **b** : Ordonnée à l'origine.

Le tableau ci-dessus résume les résultats obtenus à partir de l'établissement des courbes standards.

Les courbes standards générées à partir de ces quantifications ont été produites avec succès car le coefficient de détermination R² de chaque courbe est très proche de 1, ce qui signifie que les gammes de dilutions standards ont été bien préparées et que la RT-PCR fonctionne correctement.

I.3- Quantification

Après l'extraction d'ADN, il était souhaitable de mesurer la quantité d'ADN. L'intérêt premier de la quantification est de déterminer si la quantité d'ADN est suffisante afin de procéder à d'autres explorations génétiques en l'occurrence l'établissement de profils génétiques (*Goodwin, 2007*).

I.3.1- Quantification des échantillons conservés d'une semaine à un moi

Les concentrations d'ADN extrait à partir de salive (n=5), de sang (n=4) et de traces de contact (n=3) mesurées après 1 jour puis répétées après 7, 9, 14 et 30 jours sont répertoriées dans la partie annexe (annexe 11).

Après plusieurs quantifications des mêmes échantillons pendant un mois, les concentrations d'ADN ont été mesurées pour les 3 séries d'études. Les résultats répertoriés dans le tableau ci-dessous montrent des augmentations dans les concentrations d'ADN de j1 à j30, la présence d'ADN dans nos échantillons quelque soit la série permettra d'effectuer les analyses génétiques quant cela sera nécessaire.

Tableau VI : Concentrations d'ADN moyennes estimées à partir de sang, salive et traces de contact prélevées.

$\bar{x} \pm SE (ng \cdot \mu L^{-1})$	Salive (n=5)	Sang (n=4)	Traces de contact (n=3)
J ₁	5.36±1.43	0.062±0.039	0.055±0.029
J ₇	7.19±1.42	0.061±0.030	0.057±0.033
J ₉	8.78±1.58	0.107±0.069	0.079±0.038
J ₁₄	8.75±1.73	0.087±0.051	0.101±0.081
J ₃₀	12.43±2.50	0.096±0.059	0.098±0.054

I.3.1.1- Comparaison entre les valeurs de quantification des échantillons et le nombre de cycle seuil ct

Après plusieurs quantifications des mêmes échantillons pendant un mois, les concentrations d’ADN ont été mesurées.

Pendant le déroulement de la quantification, la détection du nombre de cycles par le 7500 system SDS software se fait en même temps.

Les résultats répertoriés dans le tableau VII montrent des augmentations dans les concentrations d’ADN et des diminutions dans le nombre du cycle seuil.

Ces augmentations dans les concentrations et les diminutions dans le nombre du cycle seuil seraient possible dues à une inhibition exercée par des inhibiteurs présents dans la solution des échantillons. Il pourrait en effet s’agir de débris d’hémoglobine restants après lavage dans les échantillons de sang, ou à la solution Chelex® elle-même qui pourrait jouer ce rôle d’inhibiteur.

La conservation de l’extractome à +4°C favoriserait donc la diminution des inhibiteurs, et avec la diminution de ces derniers, la quantité d’ADN pourrait apparaitre de plus en plus importante avec le prolongement de la conservation. L’augmentation du nombre de cycles se fait par la diminution de la quantité d’ADN, dans notre cas le cycle seuil diminue car la quantité d’ADN augmente.

Tableau VII : Concentrations d’ADN Moyennes et cycles seuil moyens

\bar{x}	Salive (n=5)		Sang (n=4)		Traces de contact (n=3)	
	Concentration d’ADN $(ng \cdot \mu l)^{-1}$	ct	Concentration d’ADN $(ng \cdot \mu l)^{-1}$	ct	Concentration d’ADN $(ng \cdot \mu l)^{-1}$	ct
J ₁	5.36	27.02	0.062	28.16	0.055	29.02
J ₇	7.19	26.93	0.061	28.02	0.057	28.87
J ₉	8.78	26.51	0.107	27.62	0.079	28.50
J ₁₄	8.75	25.41	0.087	26.69	0.101	27.75
J ₃₀	12.43	28.17	0.096	29.02	0.098	29.52

I.3.1.2- Quantification de l'ADN dans les échantillons de salive

Les moyennes des échantillons de salive entre le 1^{er} jour et le 30^{ème} jour varient respectivement entre 5,36 ng/µl et 12,43 ng/µl.

La comparaison par ANOVA à mesures répétées sur les 5 périodes est répertoriée dans la partie annexe (annexe 12), la mesure au premier jour puis après 7, 9, 14 et 30 jours, a mis en évidence une variabilité des concentrations d'ADN très significative ($F=11.38$; $p=0.00014 \ll 0.05$) (figure 7).

Le test de Tukey HSD (honey significance difference) montre que les concentrations mesurées augmentent de façon significative après le 9^{ème} jour, la dernière valeur (30^{ème} jour) étant significativement la plus élevée (figure 8).

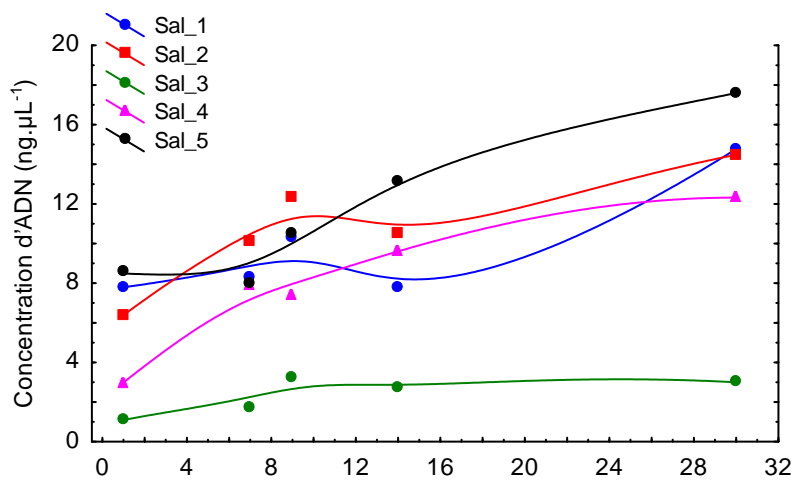


Figure 7: Evolution des concentrations d'ADN du 1^{er} au 30^{ème} jour des 5 mesures répétées 5 fois. (Salive)

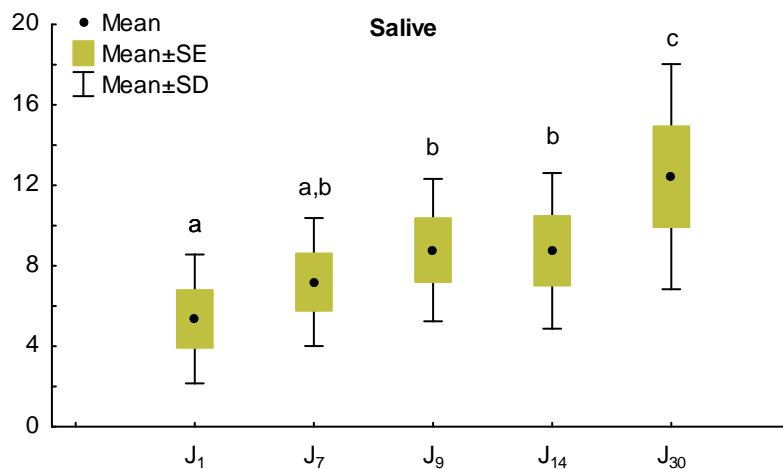


Figure 8: Box-blot Concentrations moyennes d'ADN du 1^{er} au 30^{ème} jour. (Salive)

I.3.1.3- Quantification de l'ADN dans les échantillons de sang

Les moyennes des échantillons de sang entre le 1^{er} jour et le 30^{ème} jour varient respectivement entre 0,062 ng/µl et 0,096 ng/µl.

La comparaison par ANOVA à mesures répétées sur les 5 périodes est répertoriée dans la partie annexe (annexe 13) est non significative, les concentrations d'ADN restent comparables du 1^{er} au 30^{ème} jour ($F=1.63$; $p=0.23 \gg 0.05$), (figures 9,10).

Il semblerait donc la quantité d'ADN dans l'échantillon de sang soit restée stable après 1 mois de conservation.

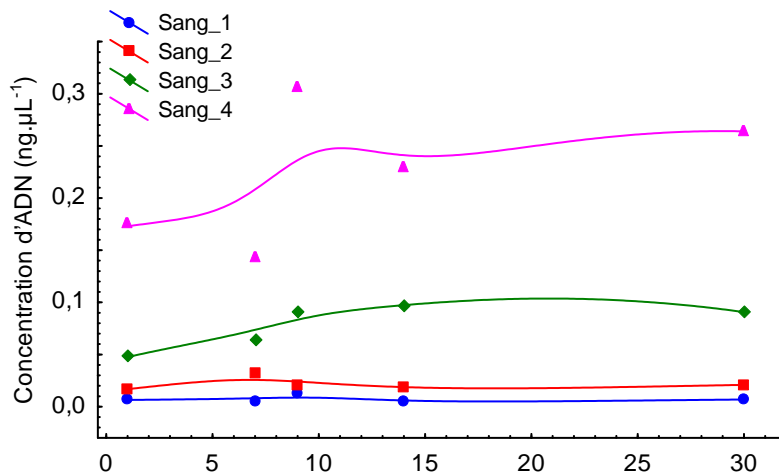


Figure 9 : Evolution des concentrations d'ADN du 1^{er} au 30^{ème} jour des 4 mesures répétées 5 fois. (Sang)

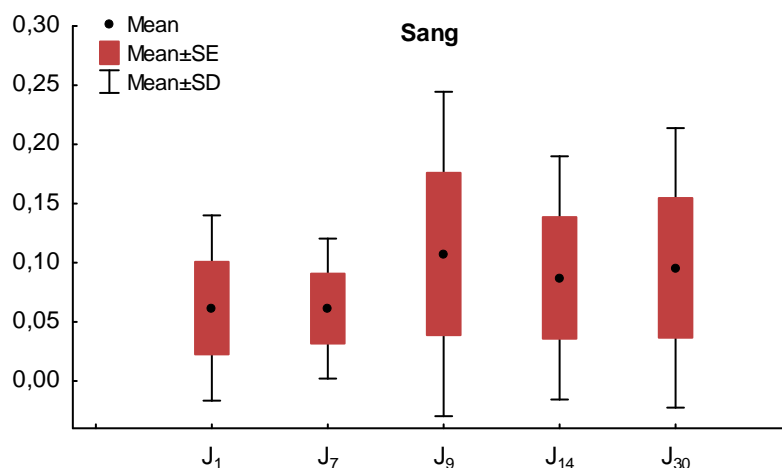


Figure 10 : Concentrations moyennes d'ADN du 1^{er} au 30^{ème} jour. (Sang)

I.3.1.4- Quantification de l'ADN dans les échantillons de traces de contact

Les moyennes des échantillons des traces de contact entre le 1^{er} jour et le 30^{ème} jour varient respectivement entre 0,055 ng/µl et 0,098 ng/µl.

La comparaison par ANOVA de Friedman à mesures répétées sur les 5 périodes est répertoriée dans la partie annexe (annexe 14) est non significative, les concentrations d'ADN restent comparables du 1^{er} au 30^{ème} jour ($p=0.34 \gg 0.05$), (figures 11,12).

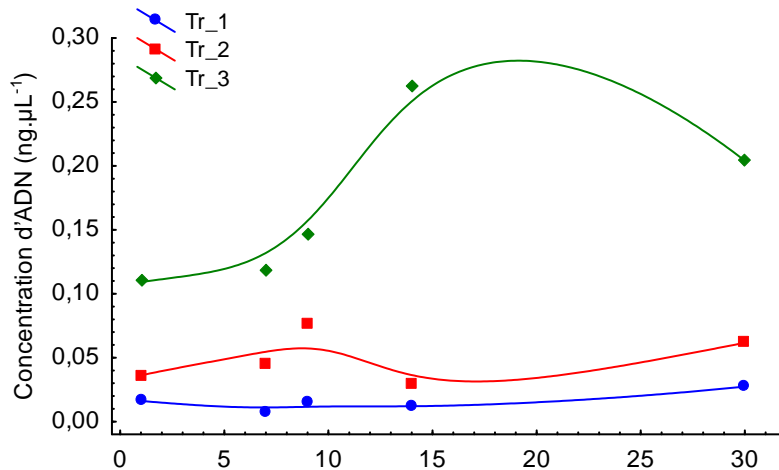


Figure 11 : Evolution des concentrations d'ADN du 1^{er} au 30^{ème} jour des 3 mesures répétées 5 fois. (Traces de contact)

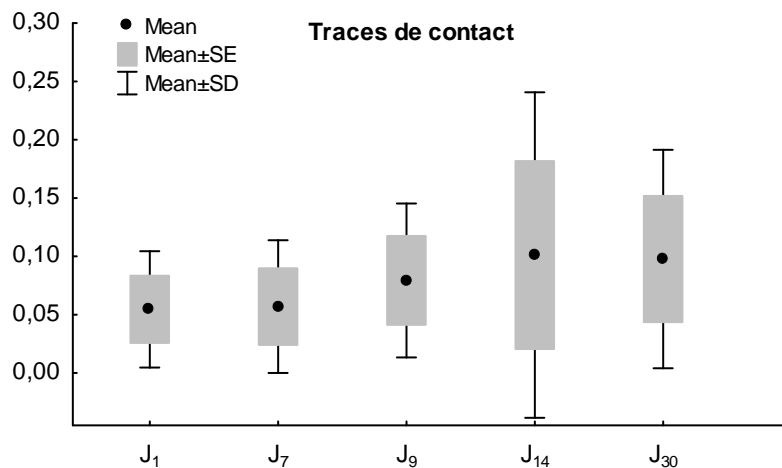


Figure 12 : Box-plot des concentrations moyennes d'ADN du 1^{er} au 30^{ème} jour. (Traces de contact)

I.3.2- Quantification des échantillons conservés pendant 1 an et 6 mois

I.3.2.1- Quantification des échantillons conservés pendant 1 an.

Les concentrations d’ADN extrait à partir de sang (n=6), d’ongles (n=3) et de muscle (n=5) mesurées dès le prélèvement puis répétées après 1 an sont répertoriées dans la partie annexe (annexe 15).

Les moyennes de ces concentrations sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau VIII: Concentrations moyennes d’ADN extraits à partir de sang, d’ongles et de muscles.

$\overline{x} \pm SE (ng \cdot \mu L^{-1})$	Sang (n=6)	Ongles (n=3)	Muscle (n=5)
J ₀	0.76±0.16	41.0±5.5	220±153
J _{1 an}	0.35±0.07	23.87 ±3.41	154.9±106.4

Les tests t pour échantillons appariés sont répertoriés dans la partie annexe (annexe 16) ont montré (après 1 an) des concentrations d’ADN :

1. ayant une différence très significative pour le prélèvement « **sang** » (p=0.006). Cette concentration chute de 53.3% (un peu plus de la moitié) après 1 an (par rapport au 1^{er} jour du prélèvement) (Figures 13,14).
2. ayant une différence significative pour le prélèvement « **ongles** » (p=0.015). Cette concentration chute de 41.8% après 1 an (par rapport au 1^{er} jour du prélèvement) (figures 15,16).
3. comparables pour le prélèvement ayant « **muscle** » une diminution non significative (p=0.23) (figures 17,18).

La différence est significative pour les échantillons de « sang » et « ongles » signifie que l’ADN a subit une dégradation considérable qui est peut être due à l’activation de DNases ou à des conditions environnementales mais cela n’empêche que nous avons toujours une quantité amplifiable susceptible de générer des profils génétiques.

La concentration d’ADN pour les échantillons de « muscle » est comparable entre le 1^{er} jour et après 1 an, ce qui signifie que la quantité d’ADN est restée stable.

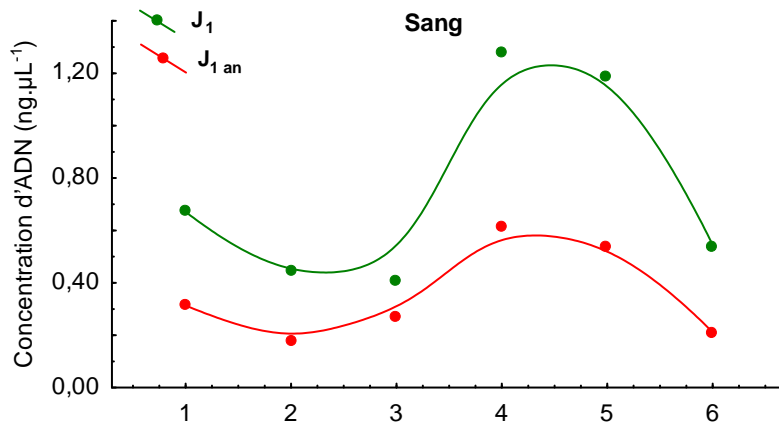


Figure 13 : Evolution des concentrations d'ADN des 6 mesures après 1 an. (Sang)

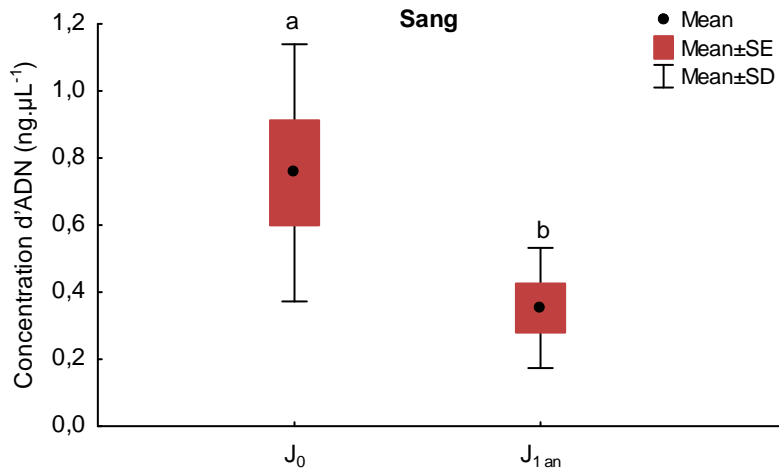


Figure 14 : Box-plots des concentrations moyennes d'ADN au 1^{er} jour et après 1 an. (Sang)

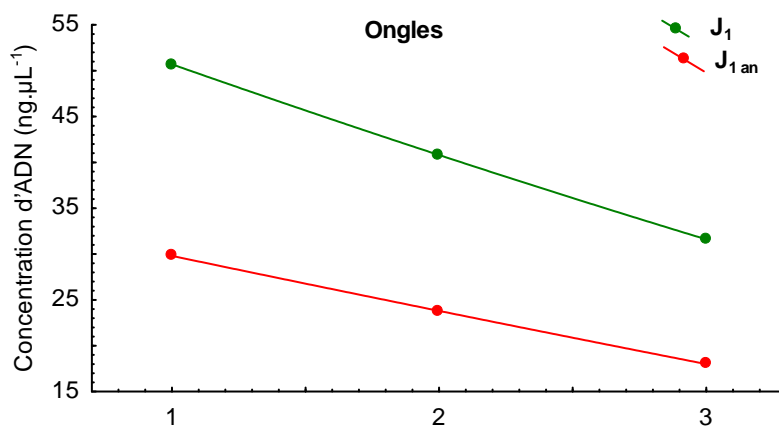


Figure 15 : Evolution des concentrations d'ADN des 3 mesures après 1 an. (Ongles)

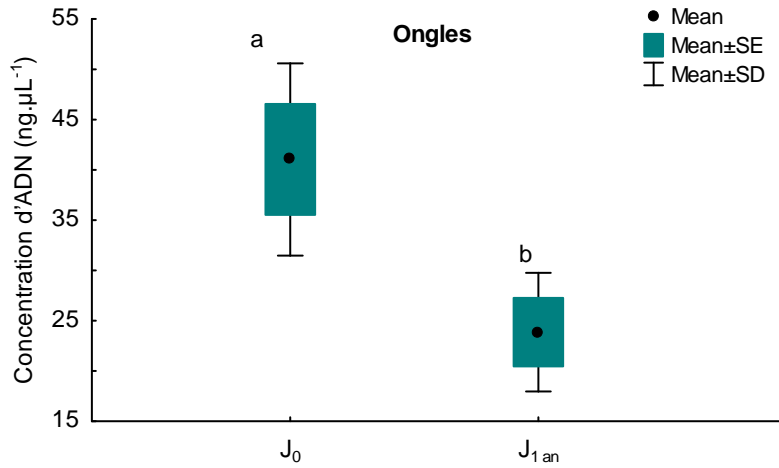


Figure 16 : Box-plots des concentrations moyennes d'ADN au 1^{er} jour et après 1 an. (Ongles)

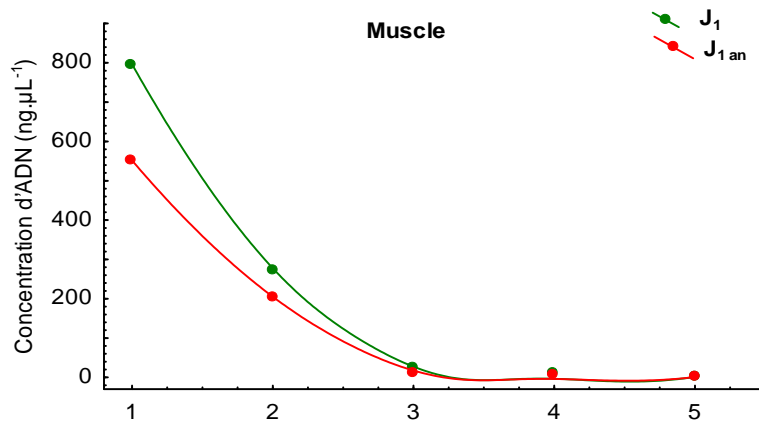


Figure 17 : Evolution des concentrations d'ADN des 5 mesures après 1 an. (Muscle)

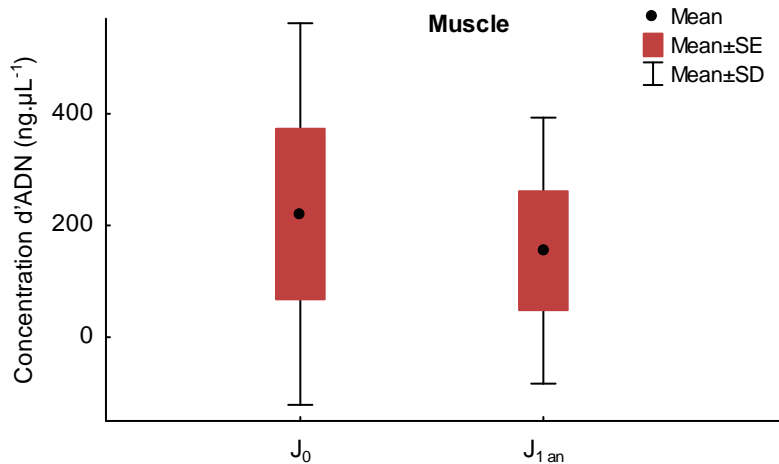


Figure 18 : Box-plots des concentrations moyennes d'ADN au 1^{er} jour et après 1 an. (Muscle)

I.3.2.2- Quantification des échantillons conservés pendant 6 mois

Les concentrations d'ADN à partir de sang (n=7) et de traces de contact (n=2) mesurées dès le prélèvement puis répétées après 6 mois sont répertoriées dans la partie annexe (annexe 17).

Les moyennes de ces concentrations sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau IX : Concentrations moyennes d'ADNs extraits à partir de sang et de traces de contact.

$\bar{x} \pm SE (ng \cdot \mu l^{-1})$	Sang (n=7)	Traces de contact (n=2)
J ₀	0.61±0.17	0.26±0.12
J _{6 mois}	0.79±0.17	0.31±0.11

Les tests t pour les échantillons appariés sont répertoriés dans la partie annexe (annexe 18) ont montré (après 6 mois) des concentrations d'ADN :

1. Comparables pour le prélèvement « **sang** » (p=0.39). (figure 19,20)
2. Comparables pour le prélèvement « **traces de contact** » (p=0.05, limite).(figure 21)

La concentration d'ADN est comparable entre le 1^{er} jour et après 6 mois. Ce résultat signifie que la quantité d'ADN est restée stable et qu'il n'y a pas eu de dégradation d'ADN.

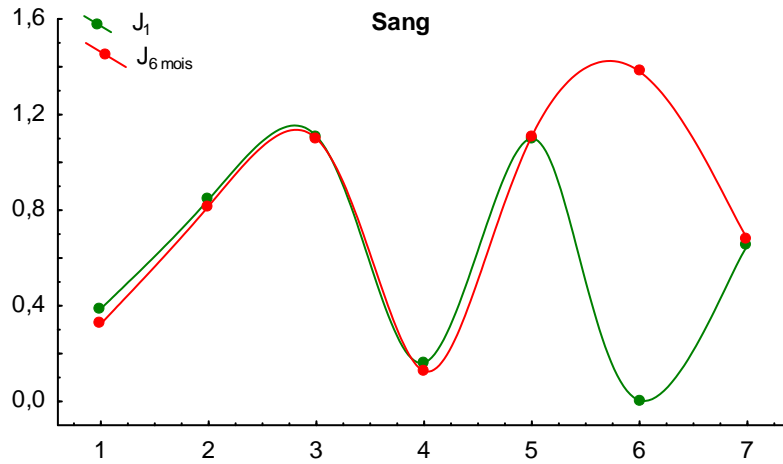


Figure 19 : Evolution des concentrations d'ADN des 7 mesures après 6 mois. (Sang)

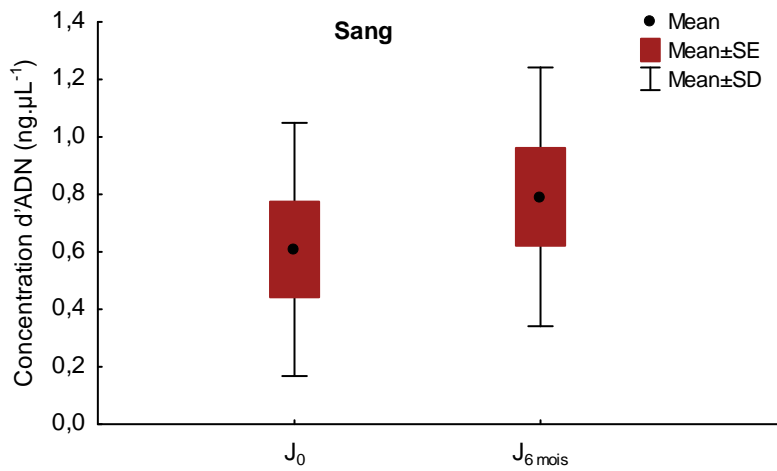


Figure 20 : Box-plots des concentrations moyennes d'ADN au 1^{er} jour et après 6 mois.

(Sang)

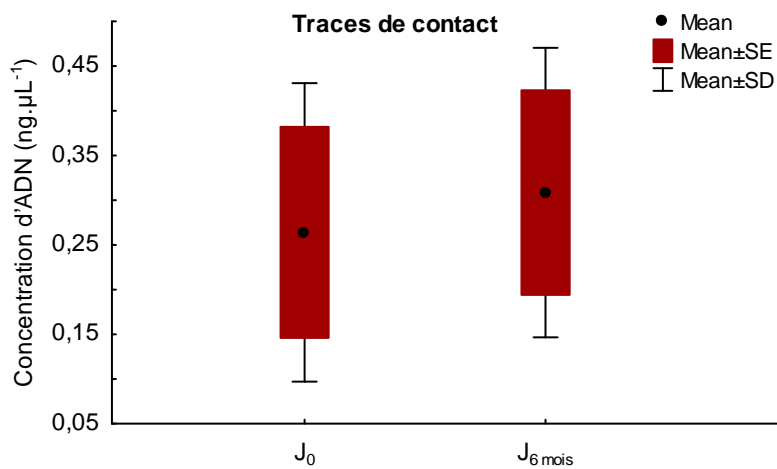


Figure 21 : Box-plots des concentrations moyennes d'ADN au 1^{er} jour et après 6 mois.

(Traces de contact)



CONCLUSION

Conclusion

Dans le cadre de cette étude, nous avons réalisé un travail qui avait pour objectif d'étudier la persistance de l'ADN conservé après extraction par la méthode Chelex® ainsi que la fiabilité de cette méthode d'extraction.

Notre travail nous a donc permis d'étudier l'évolution de l'ADN extrait par la méthode Chelex® et de mieux comprendre l'étape de quantification d'ADN par la RT-PCR, passant par plusieurs séries de quantification, effectuées durant un mois, donnant ainsi différentes quantités d'ADN durant cette période de conservation.

Une autre série de quantification a été lancée contenant des échantillons conservés pendant six mois et un an extraits par la méthode Chelex® pour mieux étudier la persistance de l'ADN conservé.

D'après les résultats obtenus, les concentrations des échantillons conservés 1 mois et 6 mois n'ont pas montré de variations significatives qui pourraient altérer la génération de profils génétiques sauf pour l'échantillon de salive conservé 1 mois où nous avons obtenu une augmentation de la quantité d'ADN. Cependant, pour les échantillons conservés 1 année, nous avons observés une différence significative entre la concentration initiale et celle obtenue après une conservation d'une année.

La méthode d'extraction d'ADN Chelex® est fiable et l'ADN extrait par cette méthode peut être conservé pendant au moins une année.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A. Mansuet-Lupo, P. Rouger, V. Van Huffel, (2007), les empreintes génétiques : des affaires d'interprétation difficile, transfusion clinique et biologique, 14, 343-347.

Amanda C. Sozer, PhD. (2014) DNA Analysis for Missing Person Identification in Mass Fatalities , Taylor & Francis Group, 5-8-12.

Audrey Mansuet-Lupo, Véronique Van Huffel, Philippe Rouger, (2008) Les empreintes génétiques : nouvel outil en médecine légale, medecine & droit, 88, 24-28.

Babisin, M., et Shewale, J.G. (2010) Assesment of DNA extracted from forensic samples prior to genotyping. Forensic science review,22, 199-214.

Bille, T. et al. (2004) Novel method of DNA extraction from bones assisted DNA identification of World Trade Center victims. Progress in Forensic Genetics 10, 553–555.

Burgoyne, L. A. (1996). Solid medium and method for DNA storage. U.S. Patent 5,496,562.

Castella, V. *et al.* (2006) Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. *Forensic Science International* 156, 70–73.

Ceren Turan, Irene Maja Nanni, Agostino Brunelli, Marina Collina. (2015) New rapid DNA extraction method with Chelex® from *Venturia inaequalis* spores, journal of microbiological methods,115, 139-142.

Comey, C.T., Koons, B.W., Presley, K.W., Smerick, J.B., Sobieralski, C.A., Stanley, D.M. and Baechtel, F.S. (1994) *Journal of Forensic Sciences*, 39, 1254–1269

ELYSE P. (2002).La PCR en temps réel: principes et applications. *Biology and Biotechnolog*2-11.

Foster,L., et al. (2002) Natural radioactivity and human mitochondrial DNA mutations. Proceeding of the national academy of science of the united states of America 99,13950-139540.

Goodwin.W, Idris.B. (2015) Comparison of Chelex®1-100 with two solid phase DNA extraction techniques, Forensic Science International: Genetics Supplement Series: 274-275

John M. Butler. (2005) Forensic DNA typing, Elsevier (USA), 241.

John M. Butler. (2012) Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. National Institute of Standards and Technology Gaithersburg, Maryland, USA, 29-49-293.

K. Phillips, N. McCallum, L. Welch (2012) A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex®-1001 and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated), Forensic Sci. Int.-Genet. 6 (2) 282–285.

Kan, Y.W. and Dozy, A.M. (1978) Polymorphism of DNA sequence adjacent to human B-globin structural gene: relationship to sickle mutation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 75, 5631–5635.

Kellens G.(1998) Eléments de criminologie. Actes du colloque de l'Association Internationale des Criminologues de Langue Française (AICLF), Bruxelles: Erasme,.10

Kline, M. C., et al. (2002). Polymerase chain reaction amplification of DNA from aged blood stains: quantitative evaluation of the “suitability for purpose” of four filter papers as archival media. Analytical Chemistry, 74, 1863–1869.

Kloosterman, A.D. and Kersbergen,P. (2003) Efficacy and limits of genotyping low copy number DNA samples by multiplex PCR of STR loci. Progress in forensic genetics 9,795-798.

Lorente, J. A., et al. (1998). Newborn genetic identification: Expanding the fields of forensic haemogenetics. Progress in Forensic Genetics, 7, 114–116.

Moss, D. et al. (2003) An easily automated, closed-tube forensic DNA extraction procedure using a thermostable proteinase. *International Journal of Legal Medicine* 117, 340–349.

Nicklas, J.A., and Buel,E.(2003) quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and bioanalytical chemistry* 376, 1160-1167.

Padma Pandeshwar, MDS Reader, Reshma Das, MDS Senior Lecturer. (2014) Role of oral fluids in DNA investigations, *Journal of Forensic and Legal Medicine*: 45-50

Rogers NL, Cole SA, Lan HC, Crossa A, Demerath EW.(2007) New saliva DNA collectio method compared to buccal cell collection techniques for epidemiological studies. *Am J Hum Biol* ,19:319e26.

Sanger, F. et al. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463–5467.

Thorison, G.A., and stein,L.D.(2003) The SNP consortium website : past, present and future. *Nucleic Acids Research* 31,124-127.

Tse, C., et Capeau, J. (2003) Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 61: 279-293.

Walsh, P. S., et al. (1991). Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10, 506–513.

William Goodwin, Adrian Linacre, Sibte Hadi. (2007) *An Introduction to Forensic Genetics*, John Wiley & Sons Ltd, 1-2-27-44.

Wilson, I.G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology* 63, 3741-3751.

Wyman, A.R. and White, R. (1980) A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 6754–6758.



ANNEXES

Annexe 1: Plan de la plaque de quantification.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std.01	Std.01	Ech.001	Ech.005								
B	Std.02	Std.02	Ech.002	Ech.008								
C	Std.03	Std.03	Ech.003	Ech.009								
D	Std.04	Std.04	Ech.006	Ech.010								
E	Std.05	Std.05	Ech.007	Ech.011								
F	Std.06	Std.06	Ech.012	Tex 02								
G	Std.07	Std.07	Tex 01	TQ								
H	Std.08	Std.08	Ech.004									

Annexe 2 : Quantités initiales d'ADN des échantillons conservés pendant 1 an.

Echantillons	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Types d'échantillons	muscle	sang	Sang	sang	muscle	muscle	muscle	ongle	muscle	ongle	sang	sang	sang	ongle
Quantités d'ADN	797	0,676	0,443	0,409	272	23,2	9,61	50,7	0,427	40,8	1,28	1,19	0,537	31,6

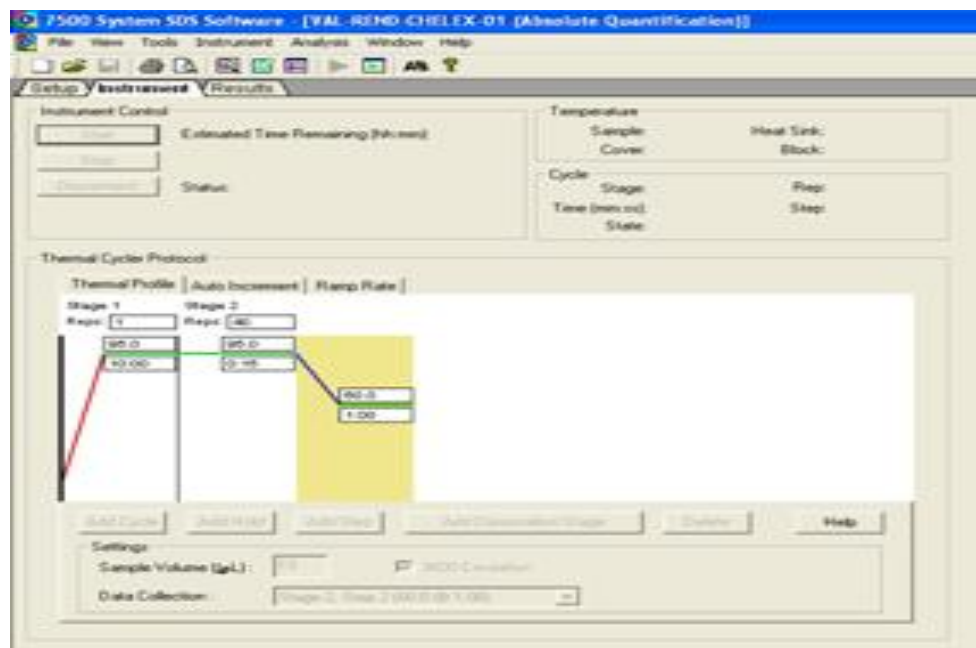
Annexe 3 : Quantités initiales d'ADN des échantillons conservés pendant 6 mois.

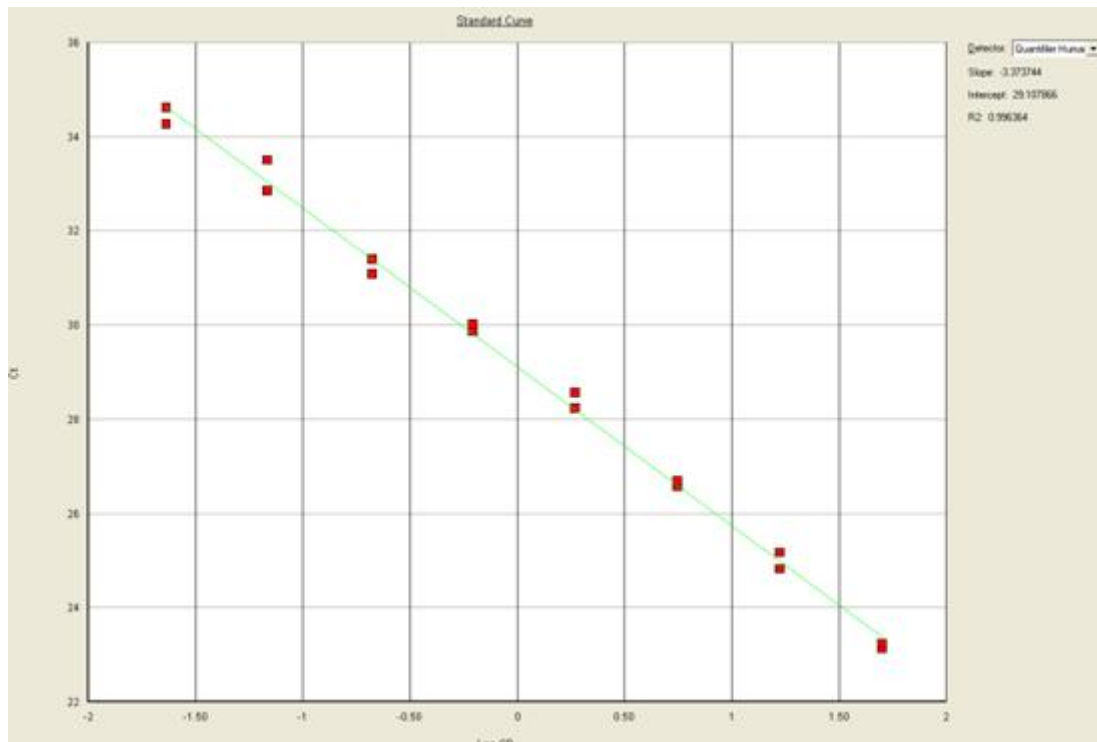
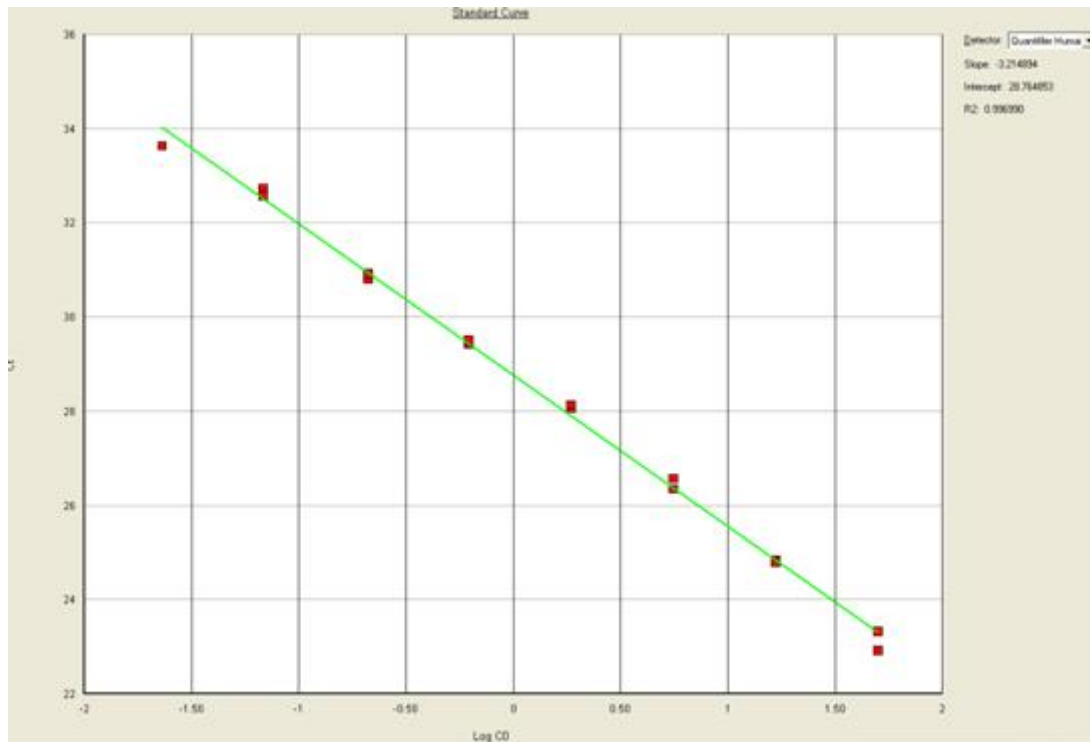
Echantillons	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y
Types d'échantillons	Sang	Sang	Sang	Traces de contact	Traces de contact	Sang	Sang	Sang	Muscle	Ongle	Sang
Quantités d'ADN	0,387	0,845	1,11	0,146	0,382	0,162	1,10	0,00419	0,999	0,534	0,651

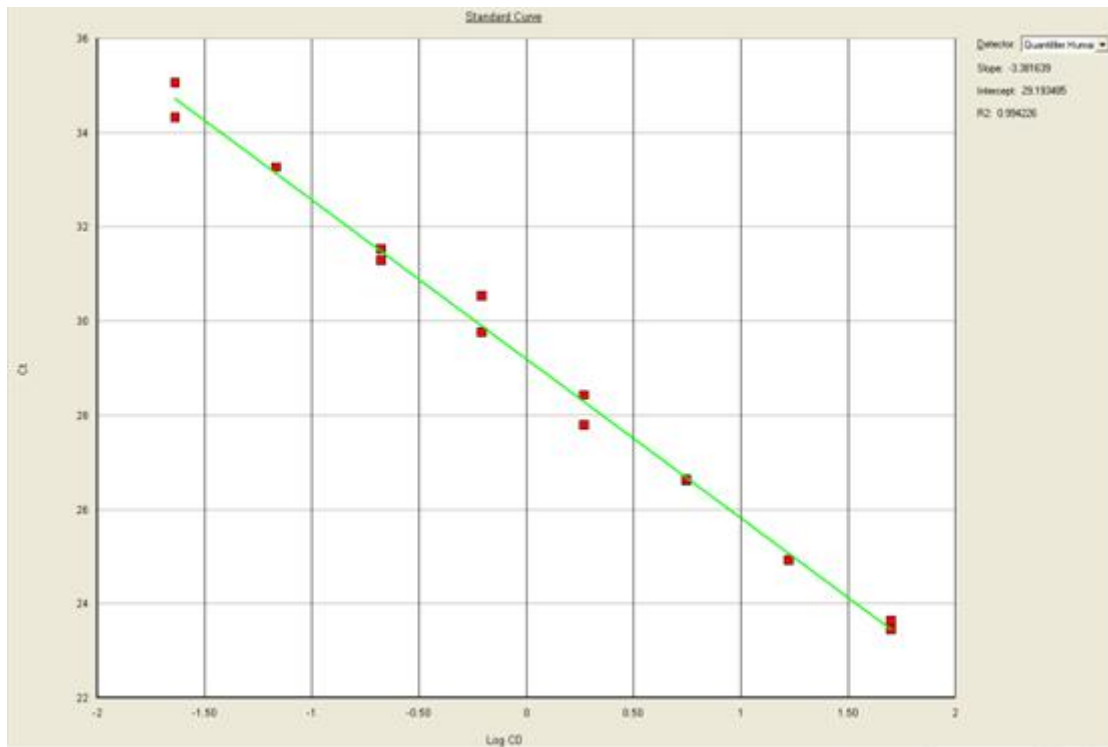
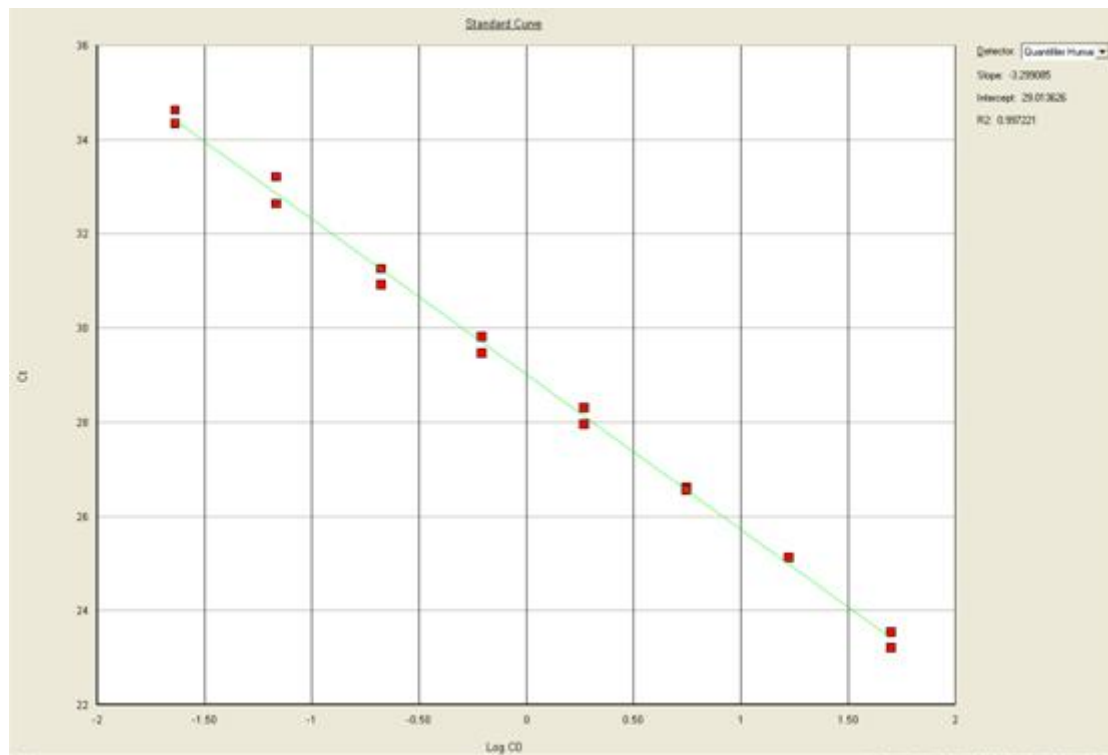
**Annexe 4 : Plan de la plaque de quantification des échantillons conservés
pendant 6 mois et 1 an.**

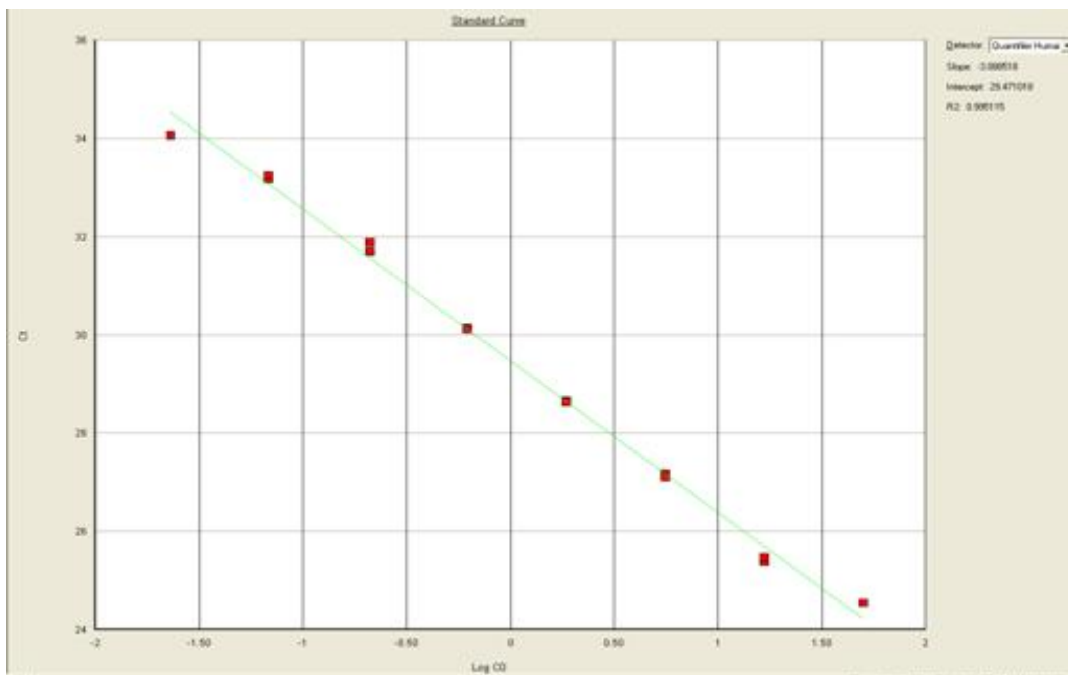
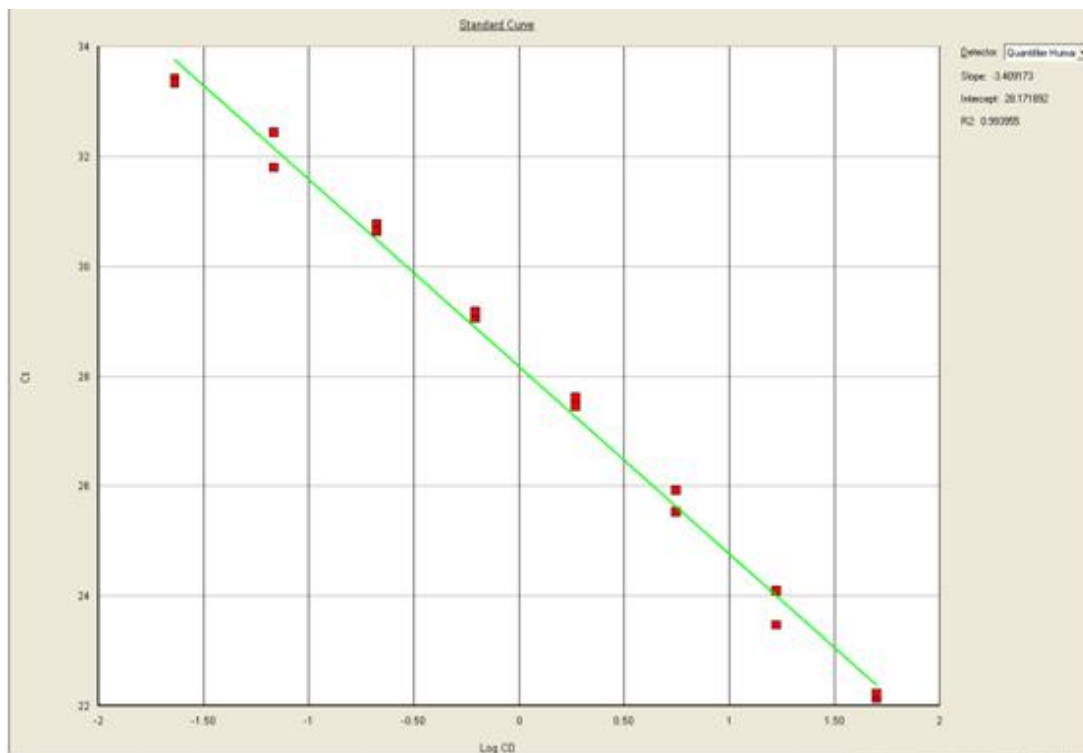
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std.01	Std.01	Ech A	Ech I	Ech Q	Ech Y						
B	Std.02	Std.02	Ech B	Ech J	Ech R	TQ						
C	Std.03	Std.03	Ech C	Ech K	Ech S							
D	Std.04	Std.04	Ech D	Ech L	Ech T							
E	Std.05	Std.05	Ech E	Ech M	Ech U							
F	Std.06	Std.06	Ech F	Ech N	Ech V							
G	Std.07	Std.07	Ech G	Ech O	Ech W							
H	Std.08	Std.08	Ech H	Ech P	Ech X							

Annexe 5 : Programme de la RT-PCR.



Annexe 6 : Courbe standard de la première quantification.**Annexe 7 : Courbe standard de la deuxième quantification.**

Annexe 8 : Courbe standard de la troisième quantification.**Annexe 9 : Courbe standard de la quatrième quantification.**

Annexe 10 : Courbe standard de la cinquième quantification.**Annexe 11 : Courbe standard de la sixième quantification.**

Annexe 12 : Les concentrations d'ADN extrait à partir de salive (n=5), de sang (n=4) et de traces de contact (n=3)

Variable	Type=Salive Descriptive Statistics				
	Valid N	Mean	Standard Error	Minimum	Maximum
J ₁	5	5,36	1,43	1,12	8,57
J ₇	5	7,19	1,42	1,72	10,07
J ₉	5	8,78	1,58	3,29	12,37
J ₁₄	5	8,75	1,73	2,74	13,12
J ₃₀	5	12,43	2,50	3,00	17,59

Variable	Type=Sang Descriptive Statistics				
	Valid N	Mean	Standard Error	Minimum	Maximum
J ₁	4	0,062	0,039	0,006	0,176
J ₇	4	0,061	0,030	0,006	0,142
J ₉	4	0,107	0,069	0,012	0,306
J ₁₄	4	0,087	0,051	0,005	0,229
J ₃₀	4	0,096	0,059	0,007	0,264

Variable	Type=Tr_Cont Descriptive Statistics				
	Valid N	Mean	Standard Error	Minimum	Maximum
J ₁	3	0,055	0,029	0,016	0,111
J ₇	3	0,057	0,033	0,007	0,119
J ₉	3	0,079	0,038	0,015	0,147
J ₁₄	3	0,101	0,081	0,012	0,262
J ₃₀	3	0,098	0,054	0,027	0,204

Annexe 13 : La comparaison par ANOVA à mesures répétées sur les 5 périodes.

Type=Salive Repeated Measures Analysis of Variance Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1807,1	1	1807,10	26,86	0,00659
Error	269,1	4	67,27		
PERIODE	135,9	4	33,98	11,38	0,00014
Error	47,8	16	2,99		

Type=Salive Tukey HSD test; variable DV_1 Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Within MS = 2,9855, df = 16,000					
Cell No.	PERIODE	DV_1 Mean	1	2	3
1	J ₁	5,36		****	
2	J ₇	7,19	****	****	
4	J ₁₄	8,75	****		
3	J ₉	8,78	****		
5	J ₃₀	12,43			****

Annexe 14 : La comparaison par ANOVA à mesures répétées sur les 5 périodes.

Type=Sang Repeated Measures Analysis of Variance Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,136	1	0,136	2,80	0,193
Error	0,146	3	0,049		
PERIODE	0,007	4	0,002	1,63	0,231
Error	0,013	12	0,001		

Type=Sang Tukey HSD test; variable DV_1 Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Within MS = ,00104, df = 12,000			
Cell No.	PERIODE	DV_1 Mean	1
2	J ₇	0,061	****
1	J ₁	0,062	****
4	J ₁₄	0,087	****
5	J ₃₀	0,096	****
3	J ₉	0,107	****

Annexe 15 : La comparaison par ANOVA de Friedman à mesures répétées sur les 5 périodes.

Type=Tr_Cont Friedman ANOVA and Kendall Coeff. of Concordance ANOVA Chi Sqr. (N = 3, df = 4) = 4,533333 p = ,33862 Coeff. of Concordance = ,37778 Aver. rank r = ,06667				
Variable	Average Rank	Sum of Ranks	Mean	Std.Dev
J ₁	2,33	7,00	0,05	0,05
J ₇	2,00	6,00	0,06	0,06
J ₉	3,67	11,00	0,08	0,07
J ₁₄	2,67	8,00	0,10	0,14
J ₃₀	4,33	13,00	0,10	0,09

Type=Tr_Cont Tukey HSD test; variable DV_1 Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Within MS = ,00151, df = 8,0000			
Cell No.	PERIODE	DV_1 Mean	1
1	J ₁	0,055	****
2	J ₇	0,057	****
3	J ₉	0,079	****
5	J ₃₀	0,098	****
4	J ₁₄	0,101	****

Annexe 16 : Les concentrations d'ADN extrait à partir de sang (n=6), d'ongles (n=3) et de muscle (n=5) mesurées dès le prélèvement puis répétées après 1 an.

Type=Sang Descriptive Statistics (3 Données 2.sta)					
Variable	Valid N	Mean	Standard Error	Minimum	Maximum
J ₀	6	0,76	0,16	0,41	1,28
J _{1 an}	6	0,35	0,07	0,18	0,61

Type=Ongle Descriptive Statistics (3 Données 2.sta)					
Variable	Valid N	Mean	Standard Error	Minimum	Maximum
J ₀	3	41,03	5,51	31,60	50,70
J _{1 an}	3	23,87	3,41	18,00	29,80

Type=Muscle Descriptive Statistics (3 Données 2.sta)					
Variable	Valid N	Mean	Standard Error	Minimum	Maximum
J ₀	5	220,4	152,8	0,4	797,0
J _{1 an}	5	154,9	106,4	0,2	552,0

Annexe 17 : Les tests t pour échantillons appariés.

Type=Sang T-test for Dependent Samples Marked differences are significant at p < ,05000								
Variable	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv. Diff.	t	df	p
J ₀	0,756	0,384						
J _{1 an}	0,353	0,179	6	0,403	0,214	4,619	5	0,006

Type=Ongle T-test for Dependent Samples Marked differences are significant at p < ,05000								
Variable	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv. Diff.	t	df	p
J ₀	41,0	9,6						
J _{1 an}	23,9	5,9	3	17,2	3,7	8,140	2	0,015

Type=Muscle T-test for Dependent Samples Marked differences are significant at p < ,05000								
Variable	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv. Diff.	t	df	p
J ₀	220,4	341,6						
J _{1 an}	154,9	238,0	5	65,5	104,1	1,41	4	0,23

Annexe 18 : Les concentrations d'ADN à partir de sang (n=7) et de traces de contact (n=2) mesurées dès le prélèvement puis répétées après 6 mois.

Type=Sang Descriptive Statistics (4 Données 3.sta)					
Variable	Valid N	Mean	Standard Error	Minimum	Maximum
J ₀	7	0,61	0,17	0,00	1,11
J _{6 mois}	7	0,79	0,17	0,13	1,38

Type=Tr_Cont Descriptive Statistics (4 Données 3.sta)					
Variable	Valid N	Mean	Standard Error	Minimum	Maximum
J ₀	2	0,26	0,12	0,15	0,38
J _{6 mois}	2	0,31	0,11	0,19	0,42

Annexe 19 : Les tests t pour les échantillons appariés.

Type=Sang T-test for Dependent Samples Marked differences are significant at p < ,05000								
Variable	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv. Diff.	t	df	p
J ₀	0,61	0,44						
J _{6 mois}	0,79	0,45	7	-0,18	0,53	-0,92	6	0,394

Type=Tr_Cont T-test for Dependent Samples Marked differences are significant at p < ,05000								
Variable	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv. Diff.	t	df	p
J ₀	0,26	0,17						
J _{6 mois}	0,31	0,16	2	-0,04	0,00	-12,71	1	0,050