



LA REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB – BLIDA1

FACULTE DES SCENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention
du diplôme de Master en science de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Option : Génétique

THEME

**Validation de tests de détection de traces biologiques
KASTEL MEYER, OBTI (hémoglobine) et PSA (liquide séminal).
Étude de profilage dans des enquêtes médico-légales.**

Réalisé par :

BOUNAB Amani

MERKANTIA Malika

Soutenu publiquement devant le jury :

Mr. BENYAHIA. N	MAA	USDB	Président
Mme. MOKRANE	MCB	USDB	Examinatrice
Mr. BESSAD. M. A	MCA	USDB	Promoteur
Mme. ZEKRI. AMEL	CP	SLCPS	Co-Promotrice

Promotion 2021-2022

Remerciement

Nous souhaitons tout d'abord remercier Monsieur Bensaad Amine et Madame Zekri Amel , qui en tant que Directeurs de mémoire , se sont toujours montrés à l'écoute et très disponibles tout au long de la réalisation de ce mémoire , ainsi que pour l'inspiration , l'aide et le temps qu'ils ont bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour .

Nous tenons aussi à remercier sincèrement l'équipe du département ADN de la police scientifique et technique pour l'accueil qu'ils nous ont réservés, le temps que chacun de ses membres nous a accordé et en particulier monsieur Bachar, pour toutes les informations, réflexions et corrections ... Qu'il nous a apporté et qui ont nourrit ce travail.

Enfin , nous adressons nos plus sincères remerciements à nos parents pour leur contribution , leur soutien et leur patience .sans oublier tous nos proches et amis , qui nous ont toujours encouragés au cours de la réalisation de ce mémoire

Merci à tous et à toutes .

Dédicace

A la prunelle de mes yeux, celle qui ma Donner la vie, la tendresse et le courage pour réussir ; ce travail est le fruit de tes sacrifices ; ma maman.

A mes chères sœurs Amina et Samar qui ont toujours été présentes à tous les moments phares de ma vie, qui ont partagé mes joies et m'ont aidé dans les difficultés ainsi que leurs époux Amar et Chemss eddine.

A mes chers frères Didou et Mounir qui sont mes piliers et mes protecteurs.

A mon neveu Adem et les petites princesses ; mes nièces Melissa et Alaa qui apportent de la joie, pleins de tendresse et d'amour dans notre vie.

A mes chères amies Zineb, Youssra, chanez, choubeila et Abir.

Enfin, et pas des moindre, ma chère et tendre amie et binôme avec qui j'ai partagé le meilleure et le pire de la réalisation de ce PFE.

Amani.

Dédicace

C'est avec l'expression de ma gratitude que je dédie ce modeste travail de fin d'étude à tous mes proches et amis.

A mon père, mon précieux offert de dieu, qui m'a fourni toutes les conditions nécessaires pour réussir, qui n'a jamais dit non à mes requêtes et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse.

A ma douce et tendre maman, à la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui a su me soutenir et veiller sur moi durant les moments difficiles.

A mes grands frères rabie et oussama qui m'ont toujours protégé et encouragé tout au long de ma vie.

A mon adorable petite sœur kawthar qui sait toujours comment procurer de la joie et le bonheur à toute la famille.

A ma petite lumière, ma cousine fatma zohra qui a su croire en moi et qui n'a cessé de m'encourager et m'orienter par ces conseils.

A ma meilleure amie zineb qui a su me supporter et m'aider quand j'en avais le plus besoin et avec qui j'ai passé des moments incroyables.

Je dédie aussi ce travail à mon binôme et meilleure amie Amani pour son soutien moral, sa patience, sa compréhension et son amour tout au long de ces années.

Malika.

Résumé

Les traces biologiques retrouvées sur les scènes de crimes sont une preuve potentielle de la culpabilité ou de l'innocence d'un individu. Elles posent cependant des difficultés qui relèvent du type d'échantillon, du support sur lequel il se trouve, sa qualité et la méthode de récupération et d'analyse de cet échantillon.

Notre objectif est d'identifier la nature, la conservation et l'utilisabilité des échantillons retrouvés sur les scènes de crime.

Nous proposons, dans le cadre de ce projet de fin d'étude, de vérifier la fiabilité de kits utilisés par le département d'ADN de la police scientifique et technique dans l'examen de traces biologiques : la PSA pour le sperme ; le Kastel Meyer et l'OBTI pour le sang en vue d'obtenir un profil génétique.

Les résultats obtenus permettent de valider les trois tests. Nous avons en outre expérimenté les différentes méthodes d'extraction (Prepfilier, Qiagen et PCI) afin de vérifier leur impact sur les résultats des tests en question et l'impact du KM sur la quantité de l'ADN de l'échantillon (après quantification).

Les échantillons préalablement étudiés via les deux tests sanguins (confirmés sang humain) ont été soumis au processus de profilage. Nous avons pu établir des profils génétiques à partir de différents supports contenant différentes concentrations d'ADN afin de définir le rapport entre la quantité d'ADN et la qualité des profils obtenus. Les résultats montrent que le profil dépend étroitement de la qualité de l'ADN.

Mots clés : Kastel Meyer- OBTI- PSA-sang - sperm - profil génétique-ADN- validation de kit.

Abstract

The biological traces found at the crime scenes are the potential evidence of individual's guilt or innocence , however they pose difficulties who're falling within the type of the sample , of the support in which they are located it's quality and it's method of recuperation and analysis of this sample . Our aim is to identify the nature , the preservation and the Usability of the samples found on the crime scene We propound in the framework of this final year's project to verify the trustability of the Kits used by the DNA department of the scientific and technical police and the biological traces test : the PSA for the sperm ; the kastel meyer and the OBTI for the blood in order to get a genetic profile .

The obtained results allows to validate these three tests , furthermore we have experimented differents extraction procedures (perpfiler , Qiagen , and PCI) in order to establish their impact on the results of the tests in question and the KM impacts on the quantity of the sample's DNA (after quantification) .

The previous studied sample through the two blood tests (confirmed to be human's blood) have been submitted to the profiling process , we were able to establish genetical's profile from distinct support containing different DNA condensation as to state the relation between the DNA quantity and the quality of the obtained profiles , the results shows that the profile depends closely to the quality of the DNA .

Key words : kastel meyer - OBTI - PSA - genetic's profile - blood -sperm - DNA - kit's validation

.

ملخص

الأثار البيولوجية التي تم العثور عليها في مسرح الجريمة هي دليل قاطع على إدانة أو براءة الشخص. و مع ذلك فإنه يطرح صعوبات تتعلق بنوع العينة و الدعم الذي تقدمه و جودتها و طريقة استردادها و كذا تحليلها. هدفنا هو تحديد طبيعة و حفظ و استخدام العينات الموجودة في مسرح الجريمة. نقترح في إطار مشروع نهاية الدراسة هذا، للتحقق من موثوقية المجموعات المستخدمة من قبل قسم الحمض النووي التابع للشرطة العلمية و التقنية في فحص الأثار البيولوجية، PSA للحيوانات المنوية و kastel Meyer و OBTI للدم و ذلك من أجل الحصول على ملف جيني. النتائج التي تم الحصول عليها تجعل من الممكن التحقق من صحة الإختبارات الثلاثة. لقد جؤبن أيضا طرق الاستخراج المختلفة (prepfiler, qiagen, PCI) للتحقق من تأثيرها على نتائج الإختبارات المدينة و تأثير KM على كمية الحمض النووي في العينة (بعد التحديد الكمي) تم إخضاع العينات التي تمت دراستها سابقاً عن طريق فحصي الدم (دم بشري مؤكد) لعملية التتميط. تمكنا من إنشاء دعامات مختلفة تحتوي على تركيزات مختلفة من الحمض النووي من أجل تحديد العلاقة بين كمية الحمض النووي ونوعية الملفات الشخصية التي تم الحصول عليها. تظهر النتائج أن المظهر الجانبي يعتمد بشكل وثيق على جودة الحمض النووي.

كلمات مفتاحية: KASTEL MEYER، OBTI، PSA، الملف الجيني، دم، سائل منوي، حمض نووي، تأكيد العدة.

Liste des figures

Figure 1:Exemple de minisatellite VNTR (Loistron S, 2009)	5
Figure 2: Exemple de microsatellite STR (Loistron S, 2009).....	5
Figure 3:Exemple de polymorphisme d'un seul nucléotide SNP.....	7
Figure 4: présentation de l'ADNmt, de la région de control et des régions hypervariables	8
Figure 5: le test PSA.....	10
Figure 6: principe du test PSA	10
Figure 7:formule du principe de réaction chimique du test Kastel Meyer	11
Figure 8: présentation du test OBTI	11
Figure 9: principe du test OBTI	12
Figure 10:les effets stochastiques avec de faibles niveaux d'ADN	13
Figure 11: Principe de la quantification par PCR en temps réel (Jérôme Piquereau ;2011).....	17
Figure 12 : Amplification par PCR (F. Uhel · L. Zafrani 2019)	18
Figure 13:Principe de l'électrophorèse capillaire.....	19
Figure 14: préparation de la paillasse.....	23
Figure15: Dépôt de l'échantillon sur les supports	25
Figure 16: Témoin positif et négatif du kit PSA	25
Figure 17: Témoins positif et négatif du test Kastel Meyer:	27
Figure 18 : Témoins positif et négatif du test OBTI	28
Figure 19:électrophoregramme d'un profil ADN (jamiesom,2016).....	43
Figure 20:pourcentage des résultats du test PSA	47
Figure 21:pourcentage des résultats de la répétabilité du test PSA.....	49
Figure 22:résultats du test KM et OBTI de l'année 2022	49
Figure 23 : résultats du KM sur lysat (Qiagen)	51
Figure 24 : résultats de l'OBTI sur lysat (Qiagen).....	51
Figure 25 : pourcentages des résultats de reproductibilité	53
Figure 26: pourcentage des résultats des tests avec le lysat	54
Figure 27: résultats de la sensibilité du Kastel meyer (ancien) et OBTI.....	55
Figure 28: Résultats de la sensibilité du test KM (nouveau).....	56
Figure 29 :Profil du Ladder du kit IDENTIFILER PLUS.....	60
Figure 30:controle Négatifs (IDENTIFIER PLUS PCR Amplification Kit user guide 2022).....	61
Figure 31: Control Positif (IDENTIFILER PLUS PCR Amplification Kit user guide ;2022)	62
Figure 32:Profil génétique complet 01	63
Figure 33:Profil génétique complet 02	64
Figure 34:Profil génétique 03	65
Figure 35:Profil génétique complet 4.....	66

Liste des tableaux

Tableau 1: principales dates de développement de l'analyse ADN en pratique judiciaire (Doutremepuich, 2012).	3
Tableau 2: comparaison entre les VNTRs et les STRs	6
Tableau 3: tableau des dilutions du sperme.....	24
Tableau 4: tableau des supports de la PSA.....	24
Tableau 6: tableau de la répétabilité de la PSA.....	26
Tableau 7:échantillons soumis au test KM et OBTI- reproductibilité	29
Tableau 8: échantillons soumis au tests KM et OBTI -répétabilité.	30
Tableau 9: liste des dilutions	31
Tableau 10: Dates de fabrications des km et OBTI.....	31
Tableau 11: Différents supports utilisés pour les échantillons.....	32
Tableau 12: les cibles du kit Human Quantifiler.....	38
Tableau 13:Formules permettant le calcul des volumes des différents réactifs	39
Tableau 14: : indications des différents fluorochromes attaches aux STR analyses.....	39
Tableau 15 : volumes des différents réactifs	40
Tableau 16 : Volumes des réactifs nécessaires à la post PCR.....	41
Tableau 17 : tableau récapitulatif des quatre paramètres de validation des tests à partir de trace de sang.....	44
Tableau 18 : Résultats du test PSA avec des dilutions effectuer sur différents supports.....	46
Tableau 19: Résultats de la répétabilité du test PSA avec des dilutions effectuer sur différents supports	47
Tableau 20 : Résultats de la reproductibilité des tests KM et OBTI.....	50
Tableau 21:Résultat de la reproductibilité à partir du lysat.....	51
Tableau 22:résultat des tests utilisés sur lysats extraits de différents kits d'extractions	53
Tableau 23:résultats de la répétabilité	54
Tableau 24: résultats de la sensibilité.....	56
Tableau 25:résultats des tests préliminaires obtenu pour chaque échantillon.....	57
Tableau 26:Résultats de quantification	58

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ATL	Tampon de lyse tissulaire
PK	Protéinase Kinase
AW1	Tampon de lavage 1
AW2	Tampon de lavage 2
Buffer ATE	Tampon d'éluion 20ml
Buffer AL	Tampon de lyse
ECH	Echantillon
KM	Kastle-Meyer
PCR	Réaction en chaine par Polymérase
RT-PCR	Réaction en chaine par polymérase « en temps réel »
STR	Courte répétions en tandem
VNTR	Nombre variable de répétitions en tandem
SNP	Polymorphisme d'un seul nucléotide
EC	Electrophorèse Capillaire
µl	Microlitre
Rpm	Rotation par Minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate solution
EP	Eau Pure
ISO	Organisation internationale de normalisation
PCI	Phénol chloroforme isopropanol
CTS	Services de tests collaboratifs
PSA	Antigène spécifique de la prostate
PFE	Projet de fin d'étude

Sommaire

I. Introduction.....	1
Synthèse Bibliographique	2
I.1- Le génome humain	2
I.2- L'ADN en criminalistique	3
I.3-Le polymorphisme	4
I.3-1- le polymorphisme nucléaire.....	4
I.3.1.1-Les minisatellites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeats).....	4
I.3.1.2- Les microsatellites ou STR (short repeat tandem).....	5
2.1.3-Le polymorphisme de nucléotide unique ou les SNP (Single nucléotide polymorphism)..	6
I.3.2- Le polymorphisme mitochondrial	7
I.4-Les sources d'ADN en criminalistique.....	8
I.4.1- Le sang	8
I.4.2- La salive	9
I.4.3- Le sperme	9
I.5- Les tests de détection de traces de sperme en criminalistique : la PSA.....	9
1.6- les tests de détection de traces de sang en criminalistique	11
I.6.1- Test d'orientation (Kastel Meyer).....	11
I.5.2- Test de confirmation (OBTI)	11
I.6- L'empreinte génétique	12
I.6.1- Les étapes d'obtention d'un profil génétique.....	14
I.6.1.1- L'extraction d'ADN	14
I.6.1.2- La quantification par PCR en temps réel	15
I.6.1.3 - L'amplification par PCR.....	17
I.6.4- L'électrophorèse capillaire.....	18
I.7- Assurance qualité	19

I.7.1- Introduction à l'assurance qualité	19
I.7.2- Validation d'une méthode selon la norme l'ISO / CEI 17025	20
II –Matériel et méthode.....	21
II.1.1-Matériel biologique	21
II.1.2-Matériels non Biologique	21
II.2 –Méthode de validation des tests.....	23
II.2.1- Préparation de l'espace de travail	23
II.2.2- l'étude des traces de sperme	24
II.2.2.1- préparation des échantillons pour le test PSA (Antigène spécifique de la prostate)	24
II.2.2.2-Protocole de macération.....	25
II.2.2.3- Protocole de la PSA	25
II.2.2.4- La Reproductibilité	26
II.2.3- l'étude des traces de sang.....	27
II.2.3.1- Préparation de réactif pour le test Kastle Meyer.....	27
II.2.3.2- Présentation Test OBTI Hexagone	28
II.2.4- Paramètre de validation des tests d'orientation (KM) et de confirmation (OBTI).....	28
II.2.4.1- Répétabilité	28
II.2.4.2- Reproductibilité	29
II.2.4.3- Spécificité	30
II.2.4.4- Sensibilité.....	30
II.2.4.5 - Impact du support	31
II.2.4.6- La justesse.....	33
II.2.4.7- Contamination inter échantillons	33
II.3-Profilage.....	33
II.3.1-Processus de l'extraction de l'ADN.....	33
II.3.1.1-Mode opératoire du kit Qiagen	33
II.3.1.2-Extraction organique au phénol / chloroforme /Isoamyl alcool	35

II. 3.1.3- Extraction par le kit Prepfilier.....	36
II.3.2-Quantification par PCR en temps réel	38
II.3.2.1- Les réactifs :.....	38
II.3.2.2- Mode opératoire :.....	38
II.3.3- Amplification par PCR multiplex	39
II.3.3.1- le Kit de l'amplification	39
II.3.3.2- Méthode	40
II.3.4- Post-amplification (Post -PCR)	40
II.3.4.1- présentation de la post PCR	40
II.3.4.2- Méthode	41
II.3.5- L'Electrophorèse capillaire.....	42
II.3.6- Validation des profils génétiques.....	42
III-Résultats et discussions	46
III.1- Résultats et discussions de la validation du test PSA	46
III.1.1-Résultat de la sensibilité.....	46
III.1.2-Résultats de la Reproductibilité.....	47
III.2- Résultats et discussions de la validation des tests KM et OBTI.....	49
III.2.1-Résultats de la répétabilité.....	49
II.2.2- Résultats des tests KM et OBTI sur lysat	51
III.1.3- Résultats des tests sur lysat extrait de différents kits à partir de sang pur.....	53
III.2.4- Résultats de la reproductibilité des tests KM et OBTI.....	54
III.2.5- Résultats de la sensibilité.....	55
III.2.6- Résultats de l'impact du support sur les tests KM et OBTI.....	57
III.3- Détermination des profils génétique	57
III.3.1-Résultats de la quantification d'ADN.....	57
III.3.2- Résultats des profils génétiques.....	58
III.3.3- Interprétation des résultats.....	67

Conclusion	68
Références Bibliographiques	69

I. Introduction

L'enjeu de la criminalistique dans l'instauration de la justice et son impact sur la vie des individus : suspects, victimes et leurs familles rend l'étude des traces biologiques et sa fiabilité un élément primordial dans la résolution des enquêtes.

En criminalistique, les spécialistes sont souvent confrontés à différentes difficultés liées au type de matériel biologique, au support sur lequel se trouve ce matériel, à la façon de le récupérer et à la méthode la plus propice à son analyse afin d'aboutir en dernier lieu à un profil génétique.

Le sang étant l'une des traces biologiques les plus répandues sur les scènes de crimes, il peut être retrouvé en grandes quantités ou d'infimes traces ; sur l'arme du crime, sur des objets de différentes natures et des vêtements de diverses matières. Il est donc souvent analysé par la police scientifique afin d'en identifier la nature et la conservation de l'échantillon ainsi que la possibilité de l'utiliser pour obtenir un profil génétique.

Une autre trace biologique est souvent retrouvée sur les scènes de viol est le sperme qui peut révéler l'identité du criminel.

Nous nous sommes intéressés de ce fait à la validation d'un kit immunochromatographique relatif à l'étude du sperme et de deux méthodes d'essais pour la révélation des traces de sang. Notre recherche s'est orientée en outre vers l'élaboration d'un profil génétique à partir de trace de sang. Ainsi qu'au processus d'obtention de profil génétique à partir de ce matériel biologique au département d'ADN de la police scientifique et technique de Châteauneuf Alger.

Ainsi, dans le cadre de ce travail, nous avons procédé à la validation de trois tests utilisés par le département d'ADN de la police scientifique et technique de Châteauneuf Alger : d'une part la PSA pour l'étude de sperme et d'autre part le Kastel Meyer et l'OBTI pour étudier les traces de sang à travers différents paramètres : la reproductibilité, la répétabilité, la spécificité et la sensibilité et ce en adoptant différentes variables qui peuvent être retrouvées sur les scellés d'enquêtes réelles.

Notre étude s'intéresse par ailleurs aux profils génétiques obtenus à la suite de l'utilisation de ces deux tests sur les échantillons prélevés uniquement à partir de traces de sang.

Synthèse Bibliographique

L'étude des traces biologiques réalisée dans le cadre de la résolution d'enquêtes par la criminalistique nécessite une mise au point sur certaines notions nécessaires au déroulement de la recherche et à l'interprétation des données recueillies.

Le présent chapitre regroupe quelques définitions des notions relatives à la génétique, aux méthodes employés par cette discipline, aux principes des tests utilisés dans l'étude des traces biologiques (PSA- KM et OBTI dans notre cas).

I.1- Le génome humain

L'ADN est l'élément de preuve en police scientifique mais son utilisation dans le monde des enquêtes judiciaires est passé par plusieurs étapes. En effet, chaque cellule stocke des informations du patrimoine génétique à transmettre aux générations futures. Ces informations sont véhiculées par l'ADN c'est-à-dire le génome qui est issu de la mère et du père.

L'ADN se compose de quatre nucléobases : l'adénine(A), l'cytosine (C), la thymine (T) et la guanine(G) et dont l'agencement et les différentes combinaisons donnent les différences biologiques entre les êtres humains.

En 1985, après avoir établi que l'ADN contient des séquences répétitives variables d'un individu à un autre on a commencé à utiliser le génome humain pour déterminer le profil génétique en tant que « empreinte génétique » révélatrice de l'identité du criminel (Jeffrey, et al, 1985).

I.2- L'ADN en criminalistique

La criminalistique a très rapidement adopté la génétique pour obtenir des preuves irréfutables, le premier marqueur employé est celui des groupes sanguins à partir des années 1900. Ces marqueurs ont rapidement été remplacés par « l'empreinte génétique », c'est-à-dire en appréhendant directement l'ADN. (Jeffrey, et al,1985).

Ce développement est encore plus fulgurant avec le développement technologique qui a permis de mettre au point une technique rapide, fiable et très sensible : la PCR (Polymérase Chain Réaction). (Doutrempuich, 2001).

Depuis, différentes méthodes ont été développées dans ce domaine comme le précise le tableau suivant :

Tableau 1: principales dates de développement de l'analyse ADN en pratique judiciaire (Doutrempuich, 2012).

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

I.3-Le polymorphisme

Le polymorphisme désigne les différentes formes que peut prendre un même gène. Il existe plusieurs formes de polymorphisme dont les groupes sanguins (ABO) et même certaines mutations génétiques responsables de cancer.

Le polymorphisme est à la base de l'identification des êtres humains et de leurs spécificités. (Loistron, 2009). On distingue alors plusieurs formes de polymorphisme :

I.3-1- le polymorphisme nucléaire

L'ADN (nucléaire) est formé de 5% de séquences codants pour des gènes homologues entre les individus d'une même espèce « l'euchromatine » et de 95% de séquences répétitives qui ne commandent aucune synthèse protéique (Primrose S. et coll, 2004).

On distingue plusieurs types de polymorphisme nucléaires selon la taille et la répétition du nombre d'unités de base.

I.3.1.1-Les minisatellites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)

Ce type de répétition en tandem en nombre variable, les VNTR ont révolutionné l'utilisation de l'ADN en matière d'identification et de filiation. Ces séquences d'ADN sont constituées de motifs de quelque dizaine de nucléotide en tandem répétés un nombre variable de fois allant de 15 jusqu'à quelques centaines dans différentes positions chromosomiques.

Chez l'être humain, les VNTR sont des minisatellites où des séquences de tandem de 1 à 5 Kb sont répétés un nombre variable de fois allant de 15 à 100 dans un locus particulier (figure1).

En raison de cette variabilité, l'ensemble des fragments qui apparaissent sur l'autoradiographie du transfert Southern est hautement spécifique de chaque individu. On appelle en fait ces Profils de bandes des empreintes d'ADN (Nakamura, 1987; Petkovski, 2006, Laurent, 2017) . Ces marqueurs étaient fréquemment utilisés dans le domaine de la criminalistique.



Figure 1: Exemple de minisatellite VNTR (Loistron S, 2009)

I.3.1.2- Les microsatellites ou STR (short repeat tandem)

Les STR sont des microsatellites où des séquences de tandem de 1 à 5 pb sont répétées un nombre variable de fois allant de 4 à 33 fois dans un locus particulier (figure 2). Il s'agit de séquences répétitives courtes dont le nombre de répétition varie d'un individu à un autre constituant une série d'allèles (Mansuet-Lupo, et al 2007).

Les loci microsatellites peuvent être amplifiés par PCR permettant ainsi l'analyse d'ADN même partiellement dégradé (Schumm et al, 1995). Ils sont abondants et bien distribués dans le génome ce qui offre une bonne source de marqueur polymorphique pour les études de liaisons génétiques et d'associations de génotypes avec des phénotypes. (Edwards et al., 1992)

En criminalistique, 16 loci localisés sur différents chromosomes sont analysés (dans le marqueur de sexe amélogénèse). Afin d'établir le profil génétique d'un individu, il arrive parfois que le profil ne puisse pas être déterminé ; par exemple, lorsque la quantité d'ADN féminin est supérieure à celle de l'ADN masculin. Il est alors possible de définir un haplotype basé exclusivement sur les STR du chromosome Y.



Figure 2: Exemple de microsatellite STR (Loistron S, 2009)

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

Tableau 2: comparaison entre les VNTRs et les STRs

	VNTR	STR
Points de ressemblance	<p>Ils sont responsables du polymorphisme génétique</p> <p>Ils sont un type de répétition en tandem</p> <p>Ils représentent une structure du génome des Eucaryotes</p> <p>Ils se situent dans la région non codante de l'ADN</p> <p>Ils sont utilisés comme des marqueurs génétiques dans la génétique médico-légale.</p> <p>Une mutation au niveau des deux types peut causer des maladies génétiques</p>	
Points de divergence	C'est un type d'ADN minisatellite.	C'est un type d'ADN microsatellite.
	Type de répétition en tandem dont la séquence est de 1 à 5 Kb.	Type de répétition en tandem de 1 à 5 pb.
	Le nombre de répétition est de 15 à 100 nucléotides.	Le nombre de répétition est de 5 à 30 fois.
	Produit des séquences hétérogènes	Produit des séquences homogènes

2.1.3-Le polymorphisme de nucléotide unique ou les SNP (Single nucléotide polymorphism)

Les SNPs (figure3) apparaissent comme de nouveaux marqueurs d'intérêt pour la communauté médico-légale en raison de leur faible taux de mutations et de leur redondance dans le génome. Il sont aussi majoritairement localisés dans les régions non codantes du génome (keyser et petkovski,2006).

Au cours des dernières années, le polymorphisme mononucléotidique a remplacé les STR comme marqueur de choix pour la majorité des études sur l'organisme modèles et notamment l'humain vu leur faible taux de mutation.

Cette particularité permet en outre d'analyser de plus petits fragments d'ADN qu'avec les STR ; ce qui permet de traiter des échantillons d'ADN dégradés ou de petites tailles (Brenner et al., 2003 ; Prinz et al., 2003).

Dans le domaine médico-légal, les SNP permettent de définir les haplo groupe du chromosome Y de l'ADN ou de l'ADN mt, d'analyser l'origine géographique des échantillons et de réaliser des tests de paternité grâce au faible taux de mutations et surtout dans l'analyse des échantillons dégradés par l'utilisation d'amplicons courts (Gabriele et al 2002)

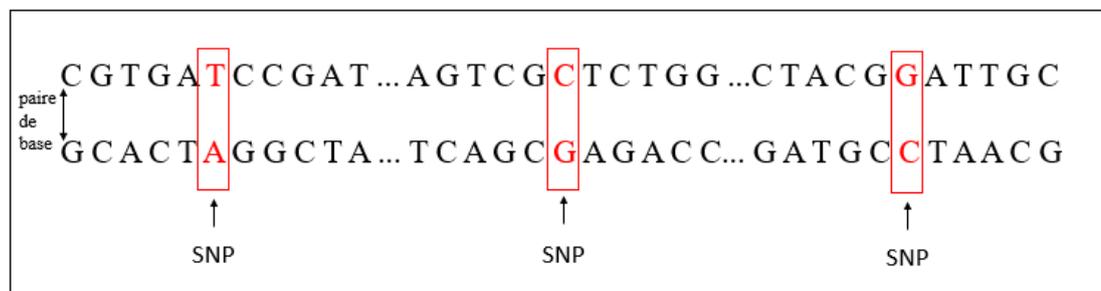


Figure 3:Exemple de polymorphisme d'un seul nucléotide SNP

I.3.2- Le polymorphisme mitochondrial

Les mitochondries sont des petites organites cytoplasmiques composants les cellules. Elles contiennent un ADN spécifique appelé "ADN mitochondrial" présent à de multiples exemplaires dans chaque cellule.

L'ADNmt est une petite molécule d'ADN double brin circulaire qui ne contient que peu d'AN non codant et pas de séquences répétitives, le polymorphisme sur cet ADN est donc limité essentiellement à des variations de séquences localisés sur « la région de contrôle » parfois appelée « D- loop » (Keyser et al ,2013).

L'analyse de la police scientifique s'effectue sur les polymorphismes présents sur les deux portions les plus variables de la région de contrôle HV1 et HV2 (figure 4). Ces deux Régions hypervariables s'étendent aux alentours des nucléotides 16024 à 16365 pour la HV1 et 73 à 340 pour la région HV2.(Coquoz,2006)

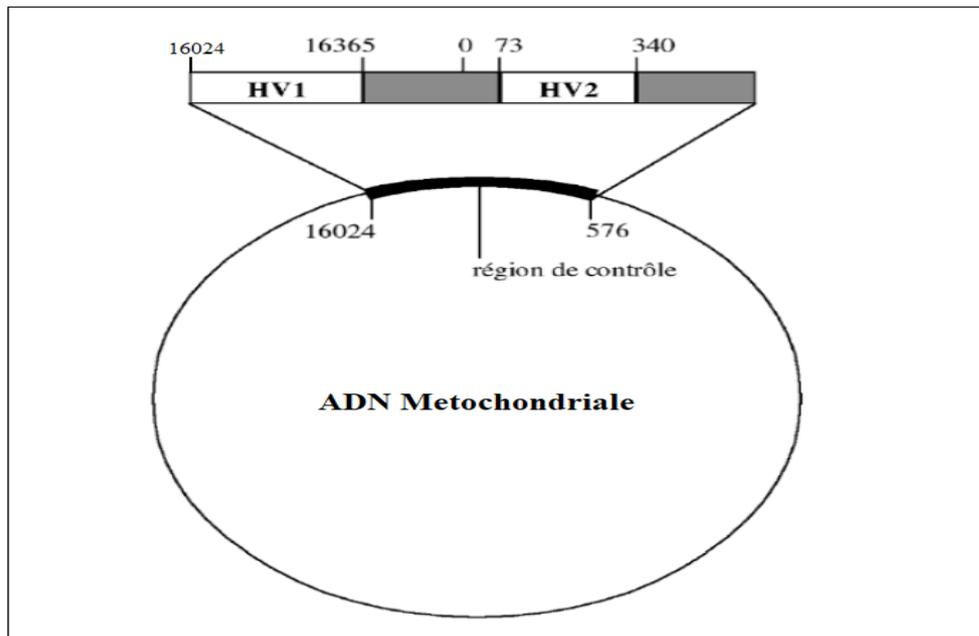


Figure 4: présentation de l'ADNmt, de la région de control et des régions hypervariables (Coquos, et al., 2013)

I.4-Les sources d'ADN en criminalistique

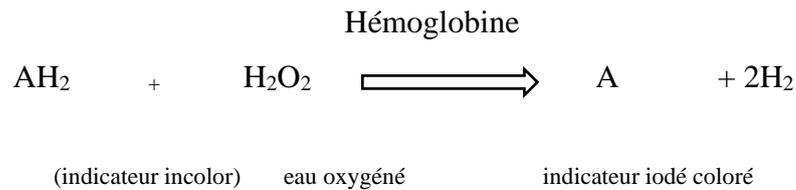
Les scènes de crimes regorgent d'éléments et d'indices qui peuvent dévoiler des détails sur le crime ou même l'identité du criminel. Les indices recueillis font objet d'analyses génétiques qui permettent donc de déceler le profil génétique du criminel.

Les traces biologiques qu'on peut trouver sur une scène de crime et qui font le plus souvent objets d'étude en criminalistique pour établir un profil génétique sont : **la salive, les poils, le sperme et le sang, les ongles, le muscle, les os et essentiellement des trace de contact** .

I.4.1- Le sang

Il est le substrat biologique par excellence retrouvé sur les scènes de crimes car elles dissimulent toujours des traces de sang ; le sang du criminel ou celui de la victime. (Nicolas et abrespy,1969). Le sang peut être retrouvé en grande quantité sous forme de flaque, en goutte ou en projection.

Le sang se compose de globules rouges dépourvus d'ADN, ils contiennent l'hémoglobine, protéine spécifique du sang. Cette composante est exploitée par la totalité des tests chimiques dont le but est d'identifier les traces de sang. Il est un catalyseur de l'oxydation de toute sorte de substances oxydables par l'eau oxygéné selon la formule suivante :



Il existe différentes substances oxydables qui composent différents tests indicatifs pour le sang. Ils se différencient par leur couleur, leur sensibilité et leur spécificité.

Il se compose aussi de globules blancs qui contiennent le noyau et d'oligoéléments ce qui en fait la source d'ADN du sang. (Pun et al, 2008).

I.4.2- La salive

La salive est une sécrétion complexe à la multiple fonction, contenant des cellules desquamées des muqueuses buccales ou des glandes salivaires constituant une bonne source d'ADN permettant d'établir de manière simple une empreinte génétique (Jean-Marie Righetti, 2002)

I.4.3- Le sperme

En criminalistique, le liquide séminal est souvent retrouvé sur les scènes de crime. Il est analysé pour identifier un agresseur en cas de viol.

Le sperme est une suspension de cellules « les spermatozoïdes » dans un liquide appelé « le liquide séminal ». Le sperme est riche en ADN grâce aux spermatozoïdes mais aussi aux cellules épithéliales très utiles en cas « d'oligospermie » ou « d'azoospermie » ce qui permet d'obtenir un profil génétique même quand aucun spermatozoïde n'est détecté (Coquoz et al, 2003).

I.5- Les tests de détection de traces de sperme en criminalistique : la PSA

C'est un test immuno-chromatographique (figure 5) destiné à détecter la P30, une glycoprotéine produite exclusivement par les cellules épithéliales du tissu prostatique et qui a pour fonction de fluidifier le liquide séminal.

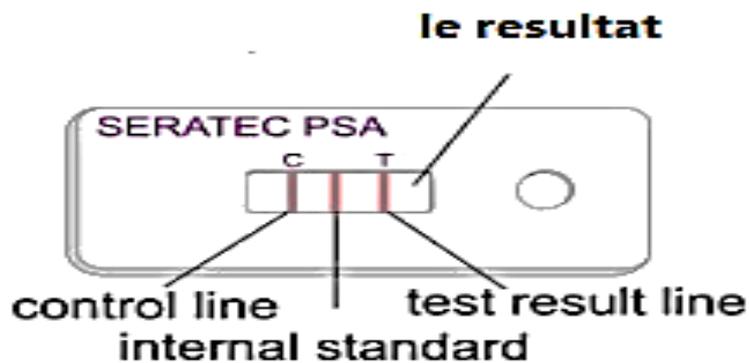


Figure 5: le test PSA

Le test PSA utilise deux anticorps monoclonaux anti - PSA murins reconnaissant deux épitopes différents de la PSA (figure 6). L'un de ces anticorps est immobilisé dans la région test (T) de la membrane. Plus loin, la région du contrôle © et la région du standard interne (I) contiennent des anticorps polyclonaux anti - anticorps de souris. Le puits de dépôt contient le second anticorps monoclonal anti - PSA murin fixé à des particules d'or.

Les régions © et (I) développant deux lignes qui sont indépendantes de la présence de PSA dans l'échantillon mais permettent de vérifier que le test est correctement exécuté.

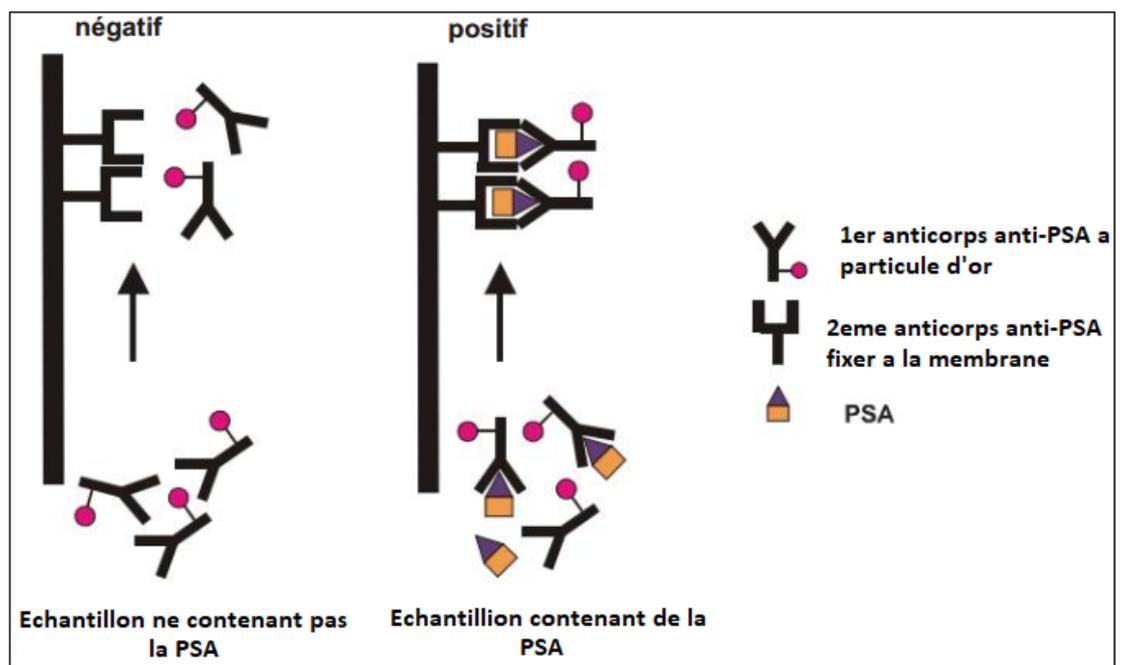


Figure 6: principe du test PSA

1.6- les tests de détection de traces de sang en criminalistique

Les experts en criminalistique disposent de différents tests qui leur permettent d'appréhender les traces de sang retrouvées sur les scènes de crimes.

I.6.1- Test d'orientation (Kastel Meyer)

Le teste kastle Meyer est une forme de test sanguin catalytique, facile à réaliser et qui fournit rapidement des résultats. Cette réaction, d'une extrême sensibilité, peut se révéler positive avec d'autres produits (rouille, certaines substances minérales), c'est pour cette raison qu'il est important de confirmer ces résultats positifs non spécifiques.

Le principe de ce test, est basé sur la réaction résultante dans laquelle la phénolphthaléine catalysée par le fer contenu dans l'hémoglobine avec du peroxyde d'hydrogène comme oxydant permettent ainsi de lui donner une coloration rose vif (figure7). (Sloots James, 2017)

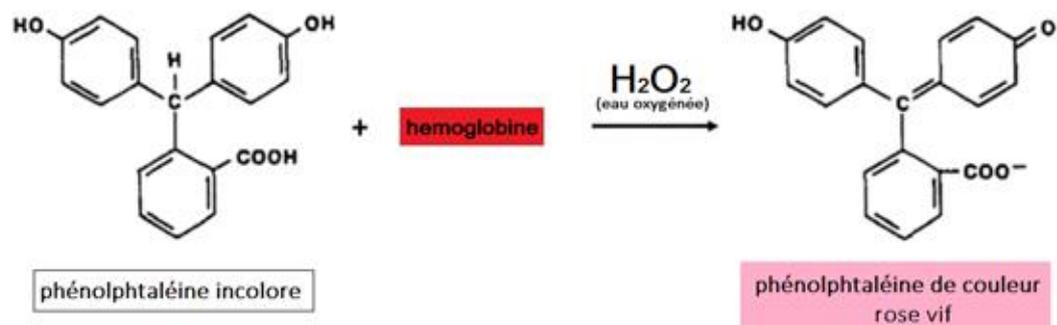


Figure 7: formule du principe de réaction chimique du test Kastel Meyer

I.5.2- Test de confirmation (OBTI)

C'est un Test immuno-chromatographique qui se base sur une réaction anticorps-antigène et qui permet de confirmer la présence de traces de sang humain (figure 8).



Figure 8: présentation du test OBTI

Toutefois ce résultat peut s'avérer positif en présence de sang d'autres espèces telles que les primates (gorille, langur) et les mustélidés (belette).

Le principe du test se base sur l'hémoglobine humaine (hHb) présent dans l'échantillon qui se fixe au réactif constitué de particules colorées et d'anticorps monoclonaux anti-Hb humaine (figure 9).

La migration dans le buvard, permet ensuite au complexe HB-anticorps d'atteindre la première région, où il est capturé par le deuxième anticorps anti-hémoglobine immobilisé, laissant derrière lui une bande colorée, l'excès d'anticorps est transporté vers une deuxième zone, où il est capturé par l'anticorps anti-anticorps, et une bande colorée apparaît également.

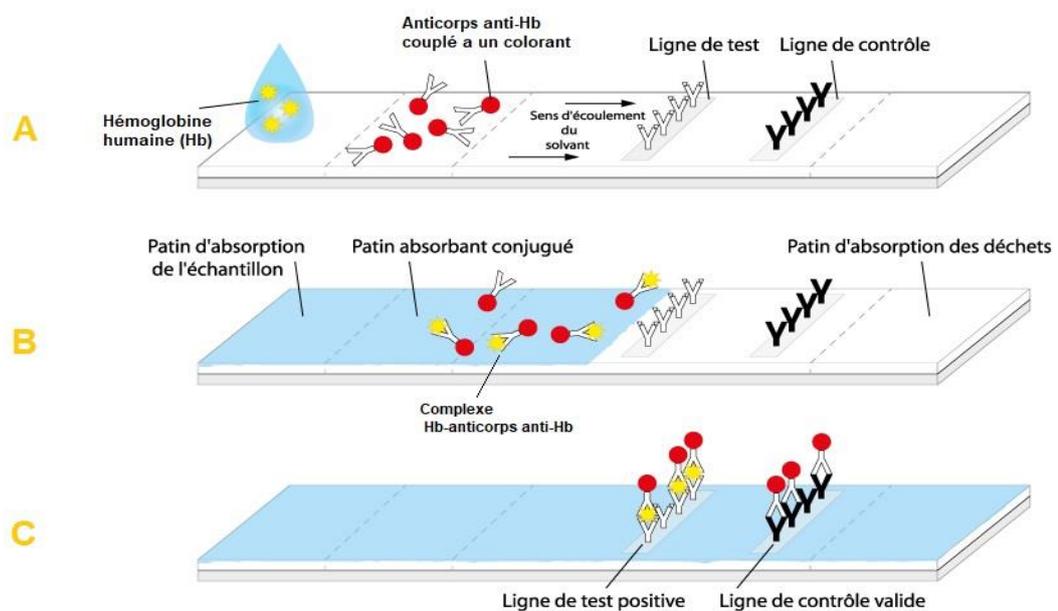


Figure 9: principe du test OBTI

I.6- L'empreinte génétique

L'analyse de l'ADN ou l'ensemble des variations du nombre de répétitions des STR's constitue une empreinte génétique (profil génétique), elle se base sur le polymorphisme génétique entre individus (Mansuet-Lupo et Coll., 2006).

Il s'agit d'un code alphanumérique informatisé obtenu à partir de l'analyse d'ADN et dont la combinaison d'allèles est unique à chaque individu (Coquoz, 2006).

Le profil génétique est caractérisé par l'affichage de pics dont les marqueurs contiennent chacun un ou deux allèles selon que l'individu soit homozygote ou hétérozygote. Chaque

pic sera caractérisé par sa position qui dépend de la vitesse de migration (relative à la taille) et par l'intensité de la fluorescence initiale qui permet la distinction entre des fragments de taille très proche ou identiques mais correspondants toutefois à des amplicons STR différents.

A partir du moment où le profil STR est obtenu, il est analysé et confronté au profil de l'individu à examiner (en l'occurrence le suspect) dans le but de traduire les données en un résultat : concordance ou exclusion d'un mélange.

Le profil génétique n'est pas toujours obtenu de façon catégorique au bout d'une analyse ADN. En effet, le résultat dépend fortement de la qualité et de la quantité de l'ADN contenu dans l'échantillon. On parle alors de limite de détection ou de seuil stochastique où la quantité de l'ADN ne permet pas de détecter un ADN fiable où les allèles présenteraient un réel déséquilibre (un allèle intact et un autre altéré).

Les effets stochastiques (figure 10) observables lors du profilage (Butler et Hill, 2010)

Les allèles **drop in** sont des allèles qui apparaissent sur le profil et qui n'appartiennent pas à l'individu.

Les allèles **drop out** sont des allèles qui ne présentent aucun pic.

Les **high stutters** ou les **artefacts** sont des produits plus courts que les allèles attendus produit d'amplification dépassant les 10%.

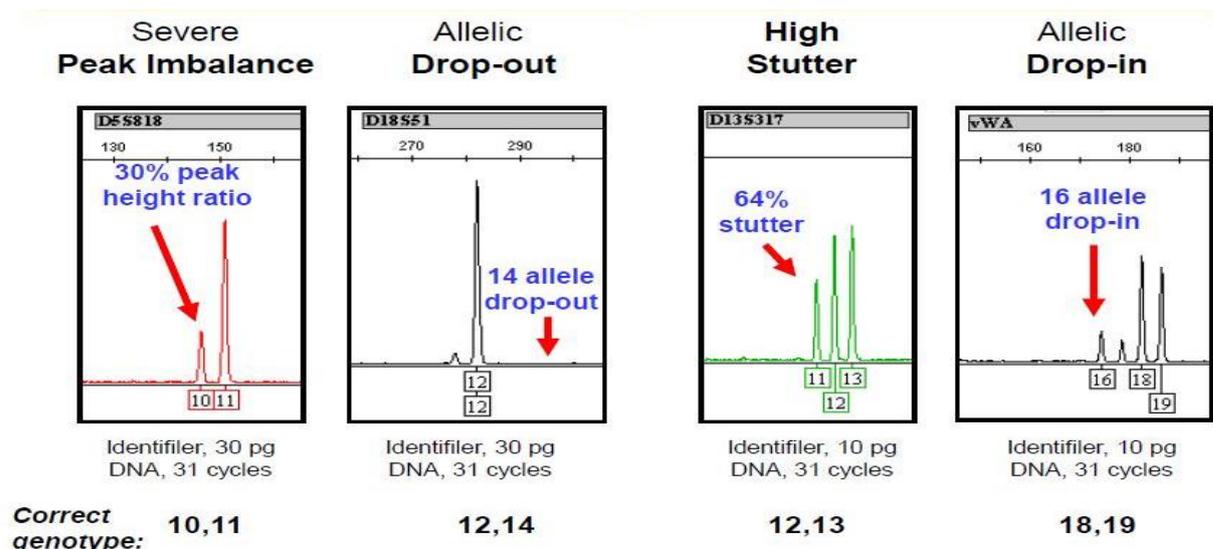


Figure 10: les effets stochastiques avec de faibles niveaux d'ADN

I.6.1- Les étapes d'obtention d'un profil génétique

Les échantillons biologiques récoltés sur la scène de crime subissent un processus complexe et bien établi afin d'en extraire l'ADN contenu et d'en identifier le profil génétique. Ce processus doit être bien respecté afin de garantir la réussite du profilage.

I.6.1.1- L'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN consiste en une digestion des membranes cellulaires et nucléaires des cellules pour libérer l'ADN et le solubiliser. Cette étape permet d'éliminer les protéines cellulaires qui protègent l'ADN et qui inhibent la capacité d'analyse de l'ADN et son amplification lors de la PCR. Elle permet de produire une solution stable d'ADN de haute qualité qui ne se dégrade pas durant le stockage (Butler et Hill, 2012).

Il existe différentes méthodes d'extraction d'ADN :

➤ **L'extraction organique** repose sur l'utilisation de solvants organiques ; un volume de phénol/ un volume de chloroforme afin de déprotéiniser l'ADN. L'ADN restant dans la phase aqueuse sera ensuite précipité au chloroforme, laver puis sécher et suspendu dans un tampon approprié (Butler, 2005).

Cette méthode permet de récolter de grandes quantités d'ADN mais elle présente de nombreux inconvénients dont la longue durée de manipulation ainsi que l'utilisation de produits toxiques comme le phénol.

➤ **L'extraction au Chelex** est basé sur l'utilisation d'une résine échangeuse d'ion chelex qui est composé de copolymères de styrène-divinyle-benzène contenant une paire d'ions iminodiacétates. Ils agissent comme des groupements chélateurs en liant les ions métalliques polyvalents comme le Fer ou le Magnésium qui protègent l'ADN des nucléases et peuvent agir comme des inhibiteurs de l'amplification. (Siegel et Saukko, 2000).

Rapide et peu coûteuse, elle n'élimine pas tous les inhibiteurs de la PCR et ne permet pas un long stockage de l'ADN.

➤ **L'extraction avec du papier FTA** est à base de cellulose et contient des produits chimiques capables de préserver l'ADN de l'action des nucléases et empêcher la croissance des bactéries. Les cellules déposées sur le papier sont lysées à son contact et l'ADN se lie à la

matrice du papier. Les lavages à l'aide d'un solvant permettent de séparer l'ADN des inhibiteurs (Butler,2005).

Cette technique est largement utilisée pour la collecte d'ADN à partir de la salive et permet de récupérer une grande quantité d'ADN et de le conserver longtemps allant jusqu'à plusieurs années.

➤ *L'extraction à l'aide du kit « DNA-Adem tech »* est basée sur la différence d'affinité. En utilisant des billes recouvertes d'un anticorps liant l'ADN ou d'un groupement fonctionnel qui interagit spécifiquement avec l'ADN, il permet de créer des liens réversibles avec l'ADN. Les billes seront ensuite séparées des autres composants cellulaires à l'aide d'un portoir magnétique et l'ADN purifié sera élu par extraction à l'éthanol (Dhaliwal, 2013).

➤ *L'extraction à l'aide du kit « Qiagen »* permet de fixer l'ADN d'un échantillon préalablement lysé sur des colonnes qui possèdent une membrane de gel-silice en présence d'une haute concentration ionique au cours d'une brève centrifugation. Les protéines et autres impuretés sont éliminées au cours de deux centrifugations en présence d'un tampon de lavage. (Butler, 2012 ; Dhaliwal, 2013).

Cette technique est celle employée par la police scientifique pour l'extraction d'ADN de tout type d'échantillon.

Il est à noter toutefois qu'elles reposent toutes sur le même principe et se base sur :

- La lyse cellulaire pour libérer la molécule d'ADN.
- La séparation des molécules d'ADN des autres matériaux cellulaires.
- L'isolation de l'ADN sous une forme compatible avec les applications en aval

dont l'amplification par PCR.

I.6.1.2- La quantification par PCR en temps réel

La quantification de l'ADN permet de déterminer si la quantité de l'ADN est suffisante à l'amplification et donc à l'établissement du profil génétique. En effet, la quantité d'ADN doit être incluse dans un intervalle optimal ; une quantité supérieure peut entraîner la formation d'artefacts tandis qu'une quantité insuffisante d'ADN entraîne l'échec du processus d'amplification « fluctuation stochastique » (Butler, 2005).

Il s'agit donc d'une variante de la PCR basée sur une réaction enzymologique et sur la mesure continue des amplicons(figure 11). A chaque cycle d'amplification, la quantité

totale de l'ADN est mesurée via la sonde moléculaire TaqMan. Cette sonde porte à son extrémité 5' un « reporter » (émetteur d'un signal de fluorescence après excitation au laser) et à son extrémité 3' un « Quencher » (suppresseur qui reçoit la fluorescence).

En absence d'amplification, la sonde reste intacte, le Quencher absorbe une grande partie la fluorescence du reporter et seule une fluorescence résiduelle est émise en raison de la proximité des deux molécules. (Coquoz, 2006).

S'il y a amplification, la sonde TaqMan est hydrolysée par l'ADN polymérase grâce à son activité 5'nucléase lors de l'étape d'élongation de l'ADN. Le reporter est alors libéré et sa fluorescence n'est plus absorbé par celle Quencher. L'augmentation du signal de fluorescence détectée est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés (Butler, 2005).

La présence d'inhibiteur pourrait empêcher la sonde de se lier à l'ADN cible et donc aucune fluorescence ne sera détectée. Il est nécessaire alors d'effectuer un contrôle interne d'amplicons (IPC) afin de différencier les faux positifs d'un résultat négatif. (Strayer, 2006).

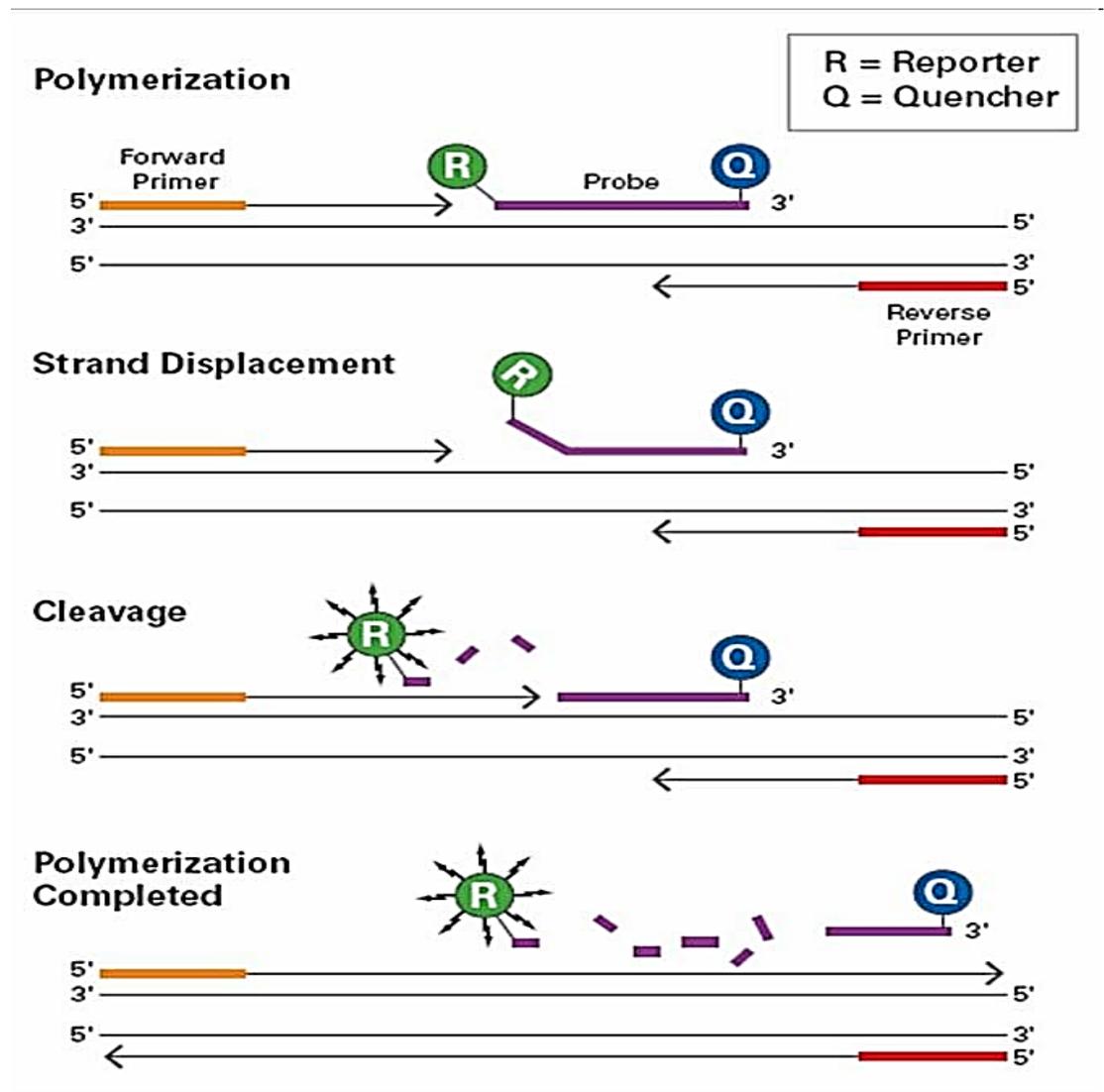


Figure 11: Principe de la quantification par PCR en temps réel (Jérôme Piquereau ;2011)

I.6.1.3 - L'amplification par PCR

La PCR, est une réaction enzymatique d'amplification d'ADN in vitro par l'utilisation de l'ADN polymérase (Taq Polymérase), une seule molécule pouvant amplifier jusqu'à 1 milliard de fois après 30 cycles d'amplification. (Lakshmi et al,2021).

L'ADN récolté sur les scènes de crimes est souvent en faible quantité et de mauvaise qualité, de ce fait la technique de PCR est la plus adaptée grâce à sa rapidité et sa sensibilité à l'analyse d'échantillons.

L'amplification de l'ADN passe par plusieurs cycles thermiques allant jusqu'à 40 cycles et chaque cycle se déroule en 3 étapes (figure 12) :

La dénaturation : sous une température de 94°C, elle permet de séparer les deux brins d'ADN afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares.

L'hybridation : sous une température entre 50°C et 65°C, elle permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider.

L'élongation (l'extension) : sous une température de 72°C, elle permet de catalyser la réaction de polymérisation en aval des amorces en utilisant les Dntp présents dans le mélange réactionnel.

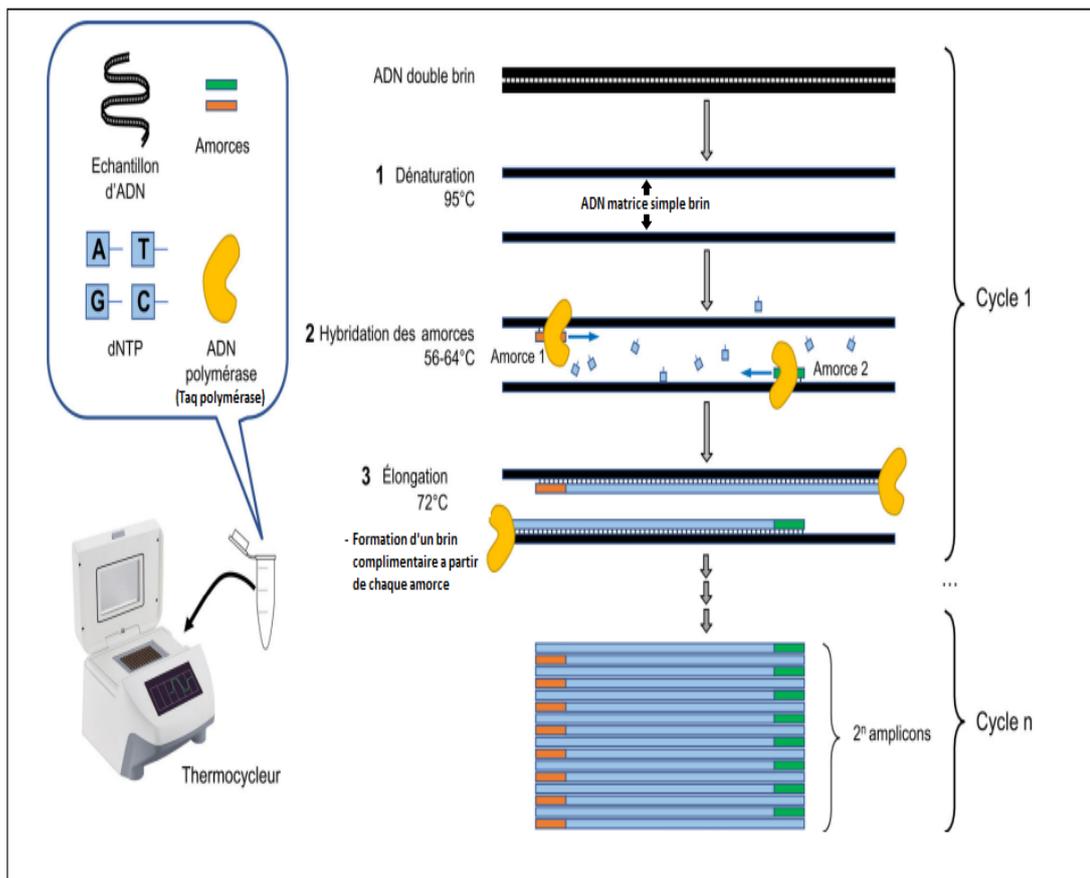


Figure 12 : Amplification par PCR (F. Uhel · L. Zafrani 2019)

I.6.4- L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une électrophorèse réalisée dans un tube capillaire presque aussi fin qu'un cheveu. C'est la technique de séparation la plus efficace pour la séparation et la détection de l'ADN amplifié selon leurs taille (nombre de répétitions de la séquence STR) grâce à la migration d'espèces chargées dans un champ électrique. (Butler et al,2001).

Dans une électrophorèse capillaire l'utilisation de capillaire permet d'appliquer une différence de potentiel plus importante (12kVolts) que pour une électrophorèse classique, la migration des fragments d'ADN se faisant donc de façon plus rapide.

Ensuite, les données de fluorescence sont collectées dans l'unité de détection et transmises à une caméra CCD pour analyse. La distance entre l'unité de détection et la zone de dépôt est variable (selon la taille du capillaire). Le faisceau laser argon excite les colorants fluorescents des deux côtés de la cellule de détection. Les colorants fluorescents excités réémettent une fluorescence spécifique (figure 13), caractérisant un ensemble de marqueurs. Ces données sont collectées par un logiciel (Butler et al., 2004 ; McCord et al., 2007)

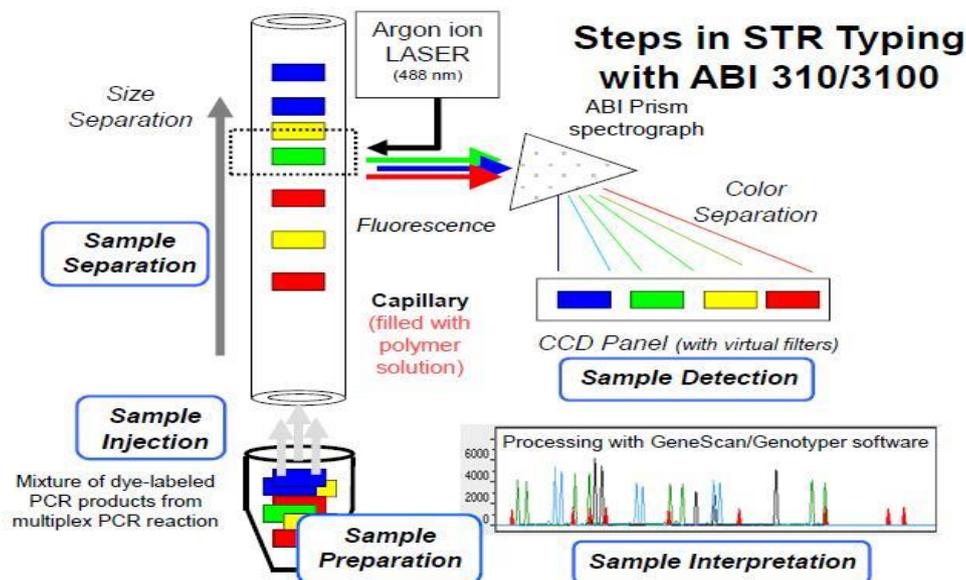


Figure 13: Principe de l'électrophorèse capillaire

I.7- Assurance qualité

I.7.1- Introduction à l'assurance qualité

C'est l'ensemble des actions préétablies et systématiques nécessaires pour donner la confiance appropriée en ce qu'un produit ou service satisfera aux exigences données relatives à la qualité.

L'assurance qualité dans la police scientifique suit les normes ISO/IEC 17025 qui est la référence internationale pour les laboratoires d'essais, permettent une normalisation des activités au sein du laboratoire ainsi qu'un contrôle de toute la filière analytique depuis la collecte de l'échantillon jusqu'à la délivrance du résultat. La norme contribue également à faciliter la coopération entre les laboratoires et d'autres organismes en assurant une meilleure acceptation des résultats.

Dans notre travail, nous avons collaborer avec les analyses spécialisées pour la validation des méthodes de détection des traces de sang en suivant un protocole bien précis qui décrit les différents paramètres de validation

I.7.2- Validation d'une méthode selon la norme l'ISO / CEI 17025

La validation de la méthode est une exigence essentielle de l'ISO / CEI 17025. Plus que cela, il sert de système pour garantir la fiabilité des résultats. De plus, la validation des méthodes équivaut à l'application constante de méthodes. En outre, cela signifie un meilleur accord entre les nations, les laboratoires et les analystes.

« Lorsque le client ne spécifie pas la méthode à utiliser, le laboratoire doit sélectionner une méthode appropriée et informer le client de la méthode choisie. »

« Le laboratoire doit vérifier qu'il peut correctement appliquer des méthodes avant de les mettre en œuvre en s'assurant qu'il peut attendre la performance requise. »

« Le laboratoire doit valider les méthodes non normalisées, les méthodes développées par le laboratoire et les méthodes normalisées employées en dehors de leur Domaine d'application prévu, ou autrement modifiées. »

Dans notre travail nous avons collaborer avec les analystes spécialisés pour la validation des méthodes de détection des traces de sang.

Matériel et méthodes

II –Matériel et méthode

Dans le cadre de notre PFE, nous nous sommes intéressés aux traces biologiques qui peuvent être retrouvées sur des scènes de crimes ; aux difficultés que peuvent rencontrer les techniciens lors de la récolte de ces traces et leur étude.

De ce fait notre étude s'est orientée vers l'étude de la validité de deux tests de révélation de traces de sperme (PSA) et des traces de sang (kastel Meyer et l'OBTI). Nous avons établi ensuite les profils génétiques à partir du sang.

II.1.1-Matériel biologique

Dans le cadre de notre étude nous avons utilisé du sperme frais ainsi que du sang (ancien et frais) à l'état liquide dans des tubes EDTA conformes dûment scellés de deux hommes et deux femmes.

II.1.2-Matériels non Biologique

Nous avons mené notre expérimentation au sein du département d'analyse d'ADN de la police scientifique et technique situé à Château-neuf- wilaya d'Alger pendant 3 mois et demi (du 24 mars au 6 juillet).

Les étapes de l'expérimentation étant répartis sur différentes salles (examen de scellés, extraction, quantification...) Les kits, les réactifs ainsi que l'appareillage et l'équipement utilisés sont recensés et présenté selon les salles dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : tableau des matériels non biologiques selon les salles.

SALLES	APPAREILLAGE ET EQUIPEMENTS	KITS /REACTIFS
Examen de scellés	Ecouvillons Stériles -Micro Pipettes 100/1000µl Étaloné - Eppendorfs -Tips – Pince - Portoir -Masque-Blouses-Gants-Charlotte.	Kit PSA,Kit OBTI Hexagone - Réactifs Kastle Meyer -Eau Ultra Pure-Ethanol- solution De Peroxyde D’hydrogène (H2O2)
Extraction	Centrifugeuse -Bloc Chauffant - Vortex-Hotte- Eppendorfs -Tips -Micro Pipettes 100/1000µ 1 étaloné	Phénol Chlorophorme Isoamyl - Ethanol -ATL—PK -AW1 - AW2-ATE-DTT
Quantification	Thermocycleur 7500fast - Centrifugeuse Pour Plaque - Plaque Real Time PCR	Kit Humain Quanti-filer
PCR	Thermocycleur-Plaque PCR – Papier Aluminium-Support Plaque PCR	Kit PCR Identifier -Dntp-Mg2+ - Primers -Taq Polymérase
POST –PCR	Thermo bloc	Formamide -Standard De Taille – Allelic LADDER
Electrophorèse capillaire	Séquenceur 3100 (ABI PRISM) - Ordinateur	Support De Plaque -Tampon POP-4 -Tampon De Migration

II.2 –Méthode de validation des tests

Au cours de ce travail tous les tubes et échantillons ont été soigneusement identifiés.

II.2.1- Préparation de l'espace de travail

La préparation de l'espace est réalisée avant chaque examen de scellé en vue d'une analyse génétique de l'échantillon prélevé, une étape primordiale obligatoire doit être réalisée, elle se fait en plusieurs étapes :

- Nettoyer la paillasse au SDS 0,1%,
- Nettoyer le matériel et les équipements à utiliser,
- Répartir la surface de travail en 3 parties distinctes,
- Préparer les échantillons sur un papier paillasse (identification, codification, photographie de chaque échantillon individuellement)

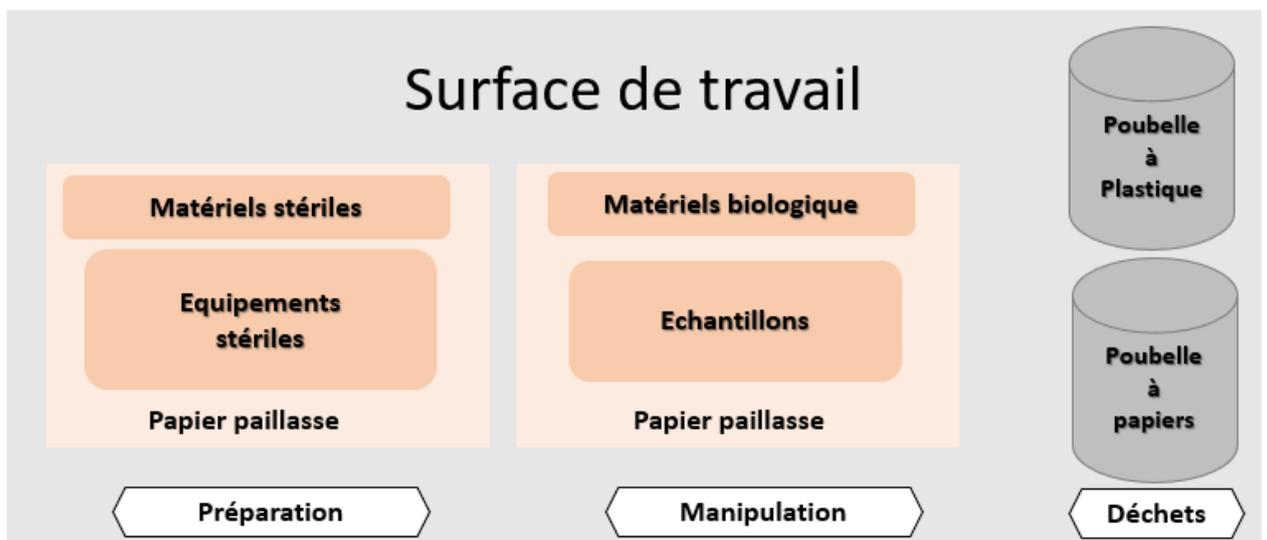


Figure 14: préparation de la paillasse

Nous nous intéressons dans le cadre de cette étude à deux types d'échantillons : le sperme et le sang que nous allons utiliser pour valider les trois tests recherchant les traces biologiques.

II.2.2- l'étude des traces de sperme

Dans le cadre de cette étude, nous avons adopté en premier lieu le sperme comme trace biologique à étudier afin d'obtenir enfin un profil génétique. Faute de moyens, nous avons mené notre étude jusqu'à la validation du kit PSA puis nous avons établis les profils uniquement à partir de traces de sang.

II.2.2.1- préparation des échantillons pour le test PSA (Antigène spécifique de la prostate)

Pour commencer, nous avons découpé cinq morceaux de chaque support : sous-vêtements (nylon et coton), couche et serviette hygiénique.

Nous avons effectué des dilutions de 1/10 jusqu'à 1/20000 (tableau3) à partir d'échantillons de sperme frais.

Tableau 3: tableau des dilutions du sperme

Dilutions	
Sperme 1/10	100 µl de sperme pur +900 µl d'eau ultra pure
Sperme 1/100	10 µl de sperme pur+ 990 µl d'eau ultra pure
Sperme 1 /500	1µl de sperme pur + 499 µl d'eau ultra pure
Sperme 1 /10000	1µl de sperme pur + 9999µl d'eau ultra pure
Sperme 1 /20000	1µl de sperme pur + 19999 µl d'eau ultra pure

NB : Des témoins positifs et négatifs ont été effectués pour chaque test

Nous avons ensuite déposé 5µl de chaque dilution sur les cinq échantillons de chaque support en trois duplicatas que nous avons laissé sécher pendant 1h à l'air libre.

Le nombre total des échantillons selon les supports est repris dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4: tableau des supports de la PSA

Supports	Nombre d'échantillons	Total
Sous-vêtement en Coton	15	60
Couche de bébé	15	
Sous-vêtement en Nilan	15	
Serviette	15	
Témoin négatif/ témoin positif	5/5	10

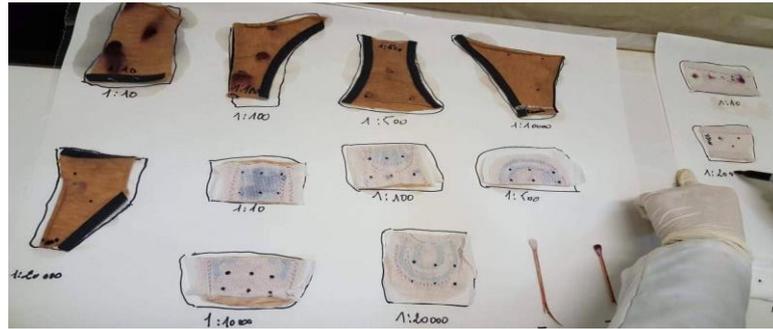


Figure15: Dépôt de l'échantillon sur les supports

II.2.2.2-Protocole de macération

- Nous avons découpé trois morceaux de chaque support analysé dans des tubes Eppendorf. Nous y avons ajouté 250 μ l d'eau ultra pure puis nous avons laissé macérer pendant 2h sous agitateur.
- Le macérat est ensuite récupéré dans un tube passoire et centrifuger a 14000 tpm pendant 5 minutes.
- Le surnagent est ensuite récupéré pour réaliser la PSA.

II.2.2.3- Protocole de la PSA

Nous avons déposé 150 μ l du macérat dans le puit de dépôt du test SERATEC PSA-SERMIQUANT, après quelque secondes le résultat apparait.

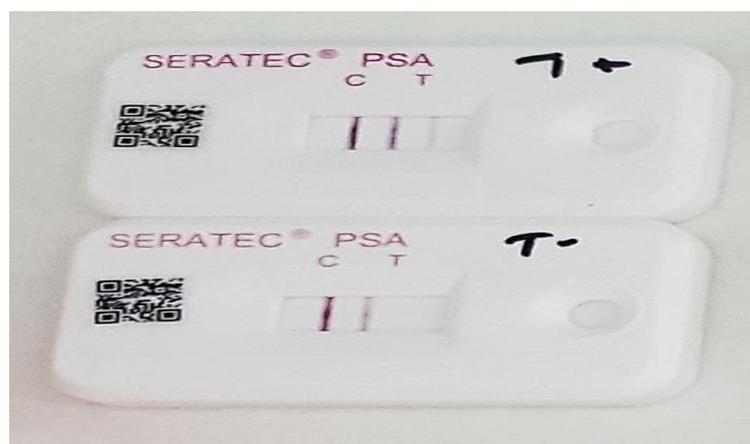


Figure 16: Témoin positif et négatif du kit PSA

II.2.2.4- La Reproductibilité

Nous avons effectué les mêmes analyses avec le même échantillon par un même matériel et un même étalonnage dans les mêmes conditions de travail mais avec trois opérateurs différents telle que présenter dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5: tableau de la répétabilité de la PSA.

Operateurs	Echantillons	Nombre d'échantillons	Total
1^{er} operateur	Sous-vêtement en Coton	36	108
	Couche de bébé		
	Sous-vêtement en Nylon		
	Serviette		
2^{eme} operateur	Sous-vêtement en Coton	36	
	Couche de bébé		
	Sous-vêtement en Nylon		
	Serviette		
3^{eme} operateur	Sous-vêtement en Coton	36	
	Couche de bébé		
	Sous-vêtement en Nylon		
	Serviette		

II.2.3- l'étude des traces de sang

Les traces de sang étudiées sont des substances récoltées sur les scènes de crime mais aussi des échantillons extraits de tubes de sang EDTA.

II.2.3.1- Préparation de réactif pour le test Kastle Meyer

Dans un erlenmeyer de 250ml on prépare :

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

Protocole :

Dans un Eppendorf contenant du sang dilué au dixième (1/10) on met :

- Trois gouttes du réactif de kastel Meyer
- trois gouttes de H₂O₂
- agitation

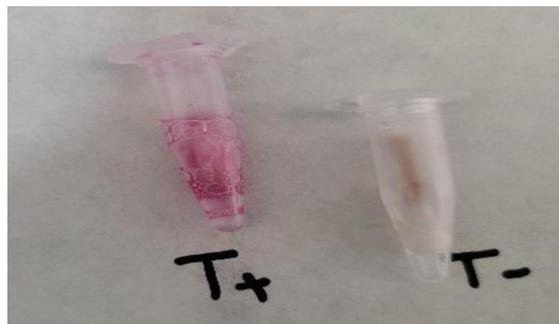


Figure 17: Témoins positif et négatif du test Kastel Meyer:

II.2.3.2- Présentation Test OBTI Hexagone

Nous avons cassé un écouvillon contenant du sang dilué au dixième (1/10) dans le flacon du Kit OBTI.

Le flacon est ensuite vortexé 2 à 3 secondes. Après avoir cassé le bout du flacon, nous avons versé trois gouttes dans le puits de dépôt de la cassette du test.



Figure 18 : Témoins positif et négatif du test OBTI

II.2.4- Paramètre de validation des tests d'orientation (KM) et de confirmation (OBTI)

La plus grande partie de notre mémoire consiste à la validation des tests KM et OBTI, nous avons travaillé en collaboration étrangère pour mettre en œuvre un plan de travail selon les normes de validation d'une technique, pour cela nous avons testé les paramètres dont deux consistent en une recherche bibliographique et les autres nous les avons réalisés nous même au sein du département d'ADN car nous avons réalisé plus de 463 essais.

II.2.4.1- Répétabilité

On l'appelle aussi la fiabilité intermédiaire, elle consiste à faire varier les différents paramètres avec un seul manipulateur (appareil différent, jour différent) qui peuvent influencer la méthode ; dans notre travail nous avons varié le matériel biologique (sang vieux, sang frais, le sexe ♀♂ ; le kit KM) et en parallèle on a testé des lysats avec deux méthodes d'extraction (Qiagen, prepfiler) pour un total de 84 essais(tableau 6).

Tableau 6:échantillons soumis au test KM et OBTI- répétabilité

Sang ancien		Sang frais		Total
KM	Homme 10 écouvillons	KM	Homme 10 écouvillons	84 essais
	Femme 10 écouvillons		Femme 10 écouvillons	
Témoin négatif		Témoin négatif		
OBTI	Homme 10 écouvillons	OBTI	Homme 10 écouvillons	
	Femme 10 écouvillons		Femme 10 écouvillons	
Témoin négatif		Témoin négatif		

-Tests effectués sur lysat extrait de différents kits à partir de sang pur

L'objectif de notre travail est de vérifier que le test Kastel Meyer et OBTI pouvaient donner des résultats positifs sur lysats effectués par 3 kit différents (Qiagen, Prepfilier, PCI).

Pour cela, nous avons pris 5µl de sang frais que nous avons déposé sur du papier paillasse en consensus de 18 répliques. Puis on a découpé le papier pour ne récupérer que la partie contenant du sang et on l'a déposé dans des tubes Eppendorf. Par la suite nous avons utilisé 9 de ces échantillons pour procéder au test Kastel meyer et OBTI, les 9 autres échantillons ont servi pour effectuer des lysats avec les différents kits d'extraction (03 échantillons pour chaque kit). Après lyse, ces échantillons ont servi à la réalisation des tests Kastel Meyer et OBTI.

II.2.4.2- Reproductibilité

La reproductibilité d'un test consiste à analyser un même échantillon par différent opérateurs avec un même lot de réactifs, un même instrument et un même étalonnage dans les mêmes conditions de travail.

Dans notre cas nous avons fait varier la méthode en la répétant trois fois, avec six opérateurs différents, avec les mêmes conditions (le sexe), le but est d'avoir le même résultat, pour un total de 360 essais pour tous les opérateurs (tableau 7).

Tableau 7: échantillons soumis au tests KM et OBTI -reproductibilité.

Opérateurs	Tests	Echantillons	Répétition	Total par operateur	Total
N = 6	KM	Homme 5 Ecou	3 Fois	15	360 essais
		Femme 5 Ecou	3 Fois	15	
	OBTI	Homme 5 Ecou	3 Fois	15	
		Femme 5 Ecou	3 Fois	15	

Ecou : Ecouvillons

II.2.4.3- Spécificité

La spécificité est une caractéristique déterminante de l'efficacité des tests. Elle désigne le fait que le test en question kastel Meyer ou OBTI est spécifique au sang.

Les tests qui permettent de détecter du sang affichent rarement de faux négatifs ; c'est-à-dire que si un test (en l'occurrence kastel Meyer) affiche une réaction négative cela signifie qu'il ne s'agit pas de sang en raison de la stabilité de la molécule d'hémoglobine. En revanche, un résultat positif est significatif de la présence de sang. (Protek labo France)

Cependant, en dépit de la grande sensibilité du K.M, il a la même réaction avec le sang humain qu'avec tout autre sang à base d'hémoglobine. Un faux positif est toujours possible ; étant donné que la présence d'agents oxydants ou de matières végétales contenant des peroxydes peut conduire à des faux positifs. Ceci dit, les tests restent fiables vu que les positifs sont rares et ne se produisent qu'en cas de traces très faibles ou diluées. (Coquoz et al, 2003).

Le test kastel Mayer n'est en outre pas spécifique au sang humain. L'origine de l'hémoglobine doit être donc déterminé via d'autres tests : OBTI. Le test de confirmation OBTI affiche donc une très grande spécificité il permet donc de déterminer si le sang est d'origine humaine.

II.2.4.4- Sensibilité

La sensibilité d'un test indicatif est de préciser le plus haut degré de dilution du matériel biologique qui permet de donner un résultat positif.

Dans le cas des tests indicatifs relatifs au sang, la sensibilité devrait dépasser 1/100 000. Le test permet donc de détecter une tache de sang très infime puisqu'il permet de déceler un millilitre de sang dilué dans 100 litres d'eau.

Dans notre étude, on s'est limité à 5 dilutions résumées dans ce tableau :

Tableau 8: liste des dilutions

Dilutions à partir de sang		Total
1/10	100 µl du sang pur +900 µl d'eau ultra pure	5 essais
1/100	100 µl du sang 1/10 + 900 µl d'eau ultra pure	
1 /1000	100µl du sang 1/100 + 900 µl d'eau ultra pure	
1 /10000	100µl du sang 1/1000 + 900 µl d'eau ultra pure	
1/100000	100µl du sang 1/10000+ 900 µl d'eau ultra pure	

Pour ce faire, nous avons utilisé deux kits datés de périodes différentes pour l'OBTI et le Kastel Meyer (tableau 9).

Tableau 9: Dates de fabrications des km et OBTI

KM	KM	OBTI	OBTI
Mars 2022	Juin 2022	Année 2018	Année 2022

II.2.4.5 - Impact du support

Dans notre étude nous nous sommes arrêtés aux supports les plus souvent rencontré : tissu ; armes blanches et des écouvillons (tableau 10).

Les échantillons sont issus de scellés d'enquêtes réelles qui ont été traités par le département d'ADN de la police scientifique et technique.

Les échantillons sont relevés à partir de différents supports afin d'en identifier l'impact sur la qualité des échantillons, la méthode de prélèvement et les résultats des tests d'orientation KM et de confirmation OBTI.

Tableau 10: Différents supports utilisés pour les échantillons

Echantillons	Supports
ECH1 : sous vêtement	
ECH2 : couteau	
ECH3 : pantalon	
ECH4 : chaussette	
ECH5 : marteau	

Par ailleurs, une recherche antérieure a été réalisée au département d'ADN de la police scientifique et technique pour vérifier l'impact du support sur l'obtention du profil génétique.

L'analyse de dix échantillons prélevés sur différents supports (tissus, arme blanche et chaussures) leur a permis d'obtenir 90% des profils génétiques.

Les résultats montrent ainsi que le support n'affecte pas (ou pas complètement) l'identification du profil génétique. (Obtention de profils génétiques à partir de traces de sang prélevées sur différents supports, master soutenu à l'USTHB, 2019-2020).

II.2.4.6- La justesse

C'est ce qu'on appelle aussi la concordance ou le contrôle qualité. Elle représente l'exactitude mesurant l'accord avec le résultat d'un échantillon de référence certifié. C'est aussi des tests inter-laboratoires des organismes étrangers qualifiés.

Deux tests inter-laboratoires de l'organisme CTS ont été effectués dans le cadre de la démarche qualité, qui se sont basés sur la recherche des traces de sang sur des échantillons envoyés du même organisme. Les tests KM et OBTI ont été effectués sur deux tests dont les résultats étaient positifs puis envoyé à l'organisme qui les a validés. (test 21_5804 DNA et test 20_5706 forensic biology)

II.2.4.7- Contamination inter échantillons

C'est ce qu'on appelle « cross-contamination ». Elle consiste à l'ajout d'un témoin négatif à chaque étape de la validation, pour vérifier qu'il n'y a eu aucune contamination. Au cours de notre travail, le témoin négatif est placé dans chaque étapes.

II.3-Profilage

L'élaboration d'un profil génétique passe par un processus complexe dont nous présentons les étapes comme suit :

II.3.1-Processus de l'extraction de l'ADN

Le profilage passe par plusieurs étapes dont l'extraction qui peut être effectuée à travers plusieurs méthodes ; Dans notre étude nous avons utilisé trois (3) méthodes d'extractions : Qiagen , PCI et Prepfiler .

II.3.1.1-Mode opératoire du kit Qiagen

L'extraction de l'ADN a été réalisée grâce à un kit de la firme Qiagen pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons de sang.

Il s'agit d'un système ayant recours à la technologie des membranes de silice basée sur l'interaction charge-charge entre l'ADN chargé négativement et la silice chargée positivement

a- Lyse cellulaire

- Dans un tube de 2 ml, immerger un échantillon de 0,5 cm² dans 300µl de tampons ATL et 20µl protéinase K du kit.

- Vortexer pendant dix secondes et incuber pendant une heure à 56°C sous agitation à 900 rpm.

Centrifuger quelque secondes pour faire tomber les gouttelettes accumuler dans le Couvercle du tube.

- Passer l'échantillon en tube passoir pour récupérer le lysat.
- Ajouter 300 µl du tampon AL et vortexer pendant 10 secondes.
- Incuber pendant 10 minutes à 70°C sous agitation à 900rpm.

b- Purification

- Centrifuger brièvement le micro tube pour faire tomber les gouttelettes et ensuite ajouter 150µl d'éthanol.
- Vortexer pendant quelques secondes, puis centrifuger brièvement et déposer le tout au centre d'une colonne préalablement identifié.
- Centrifuger pendant 1 minute à 8000 rpm.

1^{er} Lavage :

- Eliminer le micro tube contenant l'éluons, transférer la colonne dans un nouveau tube de 2ml puis ajouter 500µl du tampon AW1.
- Centrifuger une minute à 8000 rpm.

2^{ème} Lavage :

- Eliminer le tube contenant l'éluon puis transférer la colonne dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 500µl du tampon AW2.
- Centrifuger 1 minute a 8000 rpm.
- Eliminer le tube contenant l'éluon, transférer la colonne dans un nouveau tube de 2ml.
- Centrifuger pendant 3 minutes à 14000 rpm
- Placer la colonne dans un nouveau tube de 1.5 ml puis ouvrir le couvercle de la colonne et laisser sécher à température ambiante pendant 10 minutes.

Elution :

- Ajouter 50µl du tampon ATE, fermer le capuchon de la colonne et incuber pendant une minute à température ambiante, centrifuger une minute à 14000 rpm pour récupérer l'extractum puis jeter la colonne.

- Conserver les tubes d'ADN à -20°C.

II.3.1.2-Extraction organique au phénol / chloroforme / Isoamyl alcool

Ce protocole d'extraction se déroule en trois étapes, à savoir, la lyse, la purification (PCI) et la purification minérale. Il s'agit d'un protocole qui est appliqué à des échantillons infimes de natures différentes. Le protocole appliqué au niveau du laboratoire suit les étapes suivantes :

a- Etape de lyse

- Déposer 300 µl du tampon d'extraction, 10 µl de protéinase K (PK) (10mg / ml) et 05µl de DTT (Dithiothreitol) dans le tube eppendorf contenant l'échantillon.
- Laisser incuber soit 1h à 56 ° C .
- Récupérer le lysat après avoir passé l'échantillon dans un tube passoire (tube perforé avec une aiguille hypodermique stérile).
- Centrifuger le tout 3 min à 13000 rpm , puis éliminer le tube passoire et ne conserver que le tube eppendorf contenant le lysat pour l'extraction.

b- Etape de purification organique (PCI)

- Déposer 300µl du mélange PCI dans le tube contenant le produit de lyse
- Vortexer vigoureusement pour obtenir un mélange homogène de couleur blanche.
- Centrifuger les échantillons pendant 3 minute à 13000 rpm, puis prélever la phase supérieure aqueuse contenant l'ADN en faisant attention pour ne pas toucher l'interface en pipétant, ensuite transférer les échantillons dans de nouveau tubes eppendorf préalablement identifié.
- Transférer la phase aqueuse dans d'autre tubes propres identifiés, ajouter 300µl de chloroforme pour éliminer toute trace de phénol.
- Vortexer et centrifuger les échantillons pendant 3 minute à 13000 rpm , puis prélever la phase supérieure contenant l'ADN dans un nouveau tube.

c- Etape de purification minérale

- Insérer la colonne sur le réservoir du centricon et déposer 150µl d'eau ultra pure.
- Déposer la phase aqueuse récupérée au centre de la colonne humidifiée en évitant de toucher la membrane, ensuite compléter avec 750µl d'eau pure, puis centrifuger pendant 25 minute a 3000 rpm et séparé la colonne du réservoir.

- Répéter cette étape deux à trois fois, en complétant à chaque fois avec de l'eau pure.
- Pour finir, éliminer le réservoir du microcon et centrifuger pendant 7 minute à 3000 rpm en inversant le contenu de la colonne du microcon dans un eppendorf préalablement identifié.

II. 3.1.3- Extraction par le kit Prepfilier

a- Lyse

- Dans le tube contenant l'échantillon, ajouter 300µl de tampon de lyse et 3µl de DTT, 1M.
- Vortexer pendant 5 sec puis centrifuger brièvement.
- Mettre le tube dans un bloc chauffant muni d'un agitateur, laisser incuber a 70°C à 900 rpm, pendant 40mn.
- Vortexer le tube contenant les particules magnétiques pendant 5 secondes. Retourner le tube pour confirmer qu'il n'y a plus de dépôt visible au fond du tube, puis centrifuger brièvement.
- Apres centrifugation, ajouter 180µl d'isopropanol à votre tube.
- Mettre le tube sur un agitateur un vortex muni d'un adaptateur à température ambiante, 1000 rpm pendant 10minute.

b- Lavage de l'ADN

- Mettre le tube sur le support magnétique et attendre jusqu'à ce que la taille du dépôt forme par les particules magnétiques sur la paroi du tube cessé d'augmenter (environ 10min)
- Tout en gardant le tube sur le support magnétique, utiliser une pipette de 1000µl pour se débarrasser de toute la phase aqueuse.
 - Effectuer les lavages en suivant les étapes ci-dessous :

1^{er} Lavage :

- Ajouter 600µl de tampon de lavage dans le tube contenant votre échantillon.
- Vortexer le tube à vitesse de 10000 rpm jusqu'à ce qu'il n'y ai plus de dépôt de particules sur le sur la paroi du tube, puis centrifuger brièvement.
- Mettre le tube sur le support magnétique pendant une minute.

- Tout en gardant le tube sur le support magnétique, utiliser une pipette pour retirer délicatement toute la phase aqueuse. Ne pas aspirer les particules magnétiques et ne pas toucher le dépôt de particules.

2^{ème} Lavage :

- Ajouter 300µl de tampon de lavage dans le tube contenant votre échantillon.
- Mettre le tube sur le support magnétique pendant une minute.
- Tout en gardant le tube sur le support magnétique, utiliser une pipette pour retirer délicatement toute la phase aqueuse. Ne pas aspirer les particules magnétiques et ne pas toucher le dépôt de particules.

3^{ème} Lavage :

- Ajouter 300µl de tampon de lavage dans le tube contenant votre échantillon.
- Tout en gardant le tube sur le support magnétique, utiliser une pipette pour retirer délicatement toute la phase aqueuse. Ne pas aspirer les particules magnétiques et ne pas toucher le dépôt de particules.
- Tout en gardant le tube sur le portoir magnétique, ouvrir le tube pour permettre aux particules magnétiques liées à l'ADN de sécher et cela pendant 7 à 10 minute.

c- Elution de l'ADN

- Mettre le bloc chauffant muni d'un agitateur à 70°C.
- Ajouter 50µl du tampon d'éluion. Ne jamais utiliser d'eau vous pouvez utiliser du tampon TE à 0.1%.
- Mettre le tube au bloc chauffant muni d'un agitateur et laisser incuber à 70°C à 900 rpm pendant 5min. Si vous utiliser un bloc chauffant qui n'est pas muni d'un agitateur, vortexer et centrifuger le tube toute les 2 minutes.
- Mettre le tube sur le support magnétique et patienter jusqu'à ce que la taille du dépôt sur la paroi du tube cesse d'augmenter.
- Pipeter la phase aqueuse qui contient l'ADN (génomique) du tube et transférer la dans un nouveau tube de 1,5 ml pour le stockage de l'extractum. Ne pas aspirer les particules magnétiques et ne pas toucher le dépôt de particules.

II.3.2-Quantification par PCR en temps réel

La quantification nous permet de déterminer la concentration de l'ADN contenu dans l'extractum. Le principe de la PCR en temps réel est basé sur la détection et la quantification d'un « reporter », le FAM 6 -carboxyl - fluorescein

La quantité d'amplicons se traduit par l'augmentation du signal fluorescence. La quantification est analysée avec le Quantifiler human DNA kit (applied biosystems) .la gamme de concentration pouvant être détectée est comprise entre 23 pg / μ let 50 ng / μ l pour 2 μ l d'extractum. L'analyse se fait par l'appareil ABI PRISM R 7500 Fast (Applied Biosystems)

La sonde Taq Man va cibler le gène de la télomérase, comme suit :

Tableau 11: les cibles du kit Human Quantifiler

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

II.3.2.1- Les réactifs :

Le Kit de quantification Quantifiler Human , contient un flacon de réaction mix , trois flacon de primers et un flacon d'ADN témoin.

II.3.2.2- Mode opératoire :

Avant de répartir les échantillons dans la plaque optique de 96 puits compatible avec le thermocycleur 7500, une série de 8 dilution a été préparée a partir de la solution mère d'ADN standard (200 ng/ μ l) en raccord avec les recommandations du fournisseur pour but d'établir une courbe d'étalonnage ce qui permettra au logiciel SDS de calculer la concentration d'ADN dans chaque échantillon.

- Remplir le plan de dépôt « quantification RT PCR ».
- Préparer la gamme standard à partir de l'ADN mère de (200ng/ μ l) et on effectuée avec de l'eau pure des dilutions la première de $\frac{1}{4}$ et sept autre de $\frac{1}{3}$.
- Mélanger l'ADN à quantifier en faisant des va et viens pendant 10 secondes avec la pipette afin de ne pas perdre l'ADN sur les parois du tube, ensuite vortexer le témoin

négatif (permet de s'assurer que le mix n'est pas contaminé) et l'ADN standard, puis mélangé doucement par retournement la Réaction Mix.

- Vortexer les primers et calculer les volumes des différents réactifs nécessaires aux mix (**Tableau**).

Tableau 12: Formules permettant le calcul des volumes des différents réactifs

Réactifs	Volume
Réaction Max	$V (\mu\text{l}) = 10.5 \times (96+4)=105$
Primer	$V(\mu\text{l}) = 12.5 \times (94+4)=125$

- Transférer le Mix dans un tube Eppendorf et ensuite on a réparti 23 μl du mix dans chaque puits de la plaque PCR et ajouté 2 μl de chaque échantillon et standards.
- Recouvrir la plaque avec du papier adhésif transparent afin d'éviter les contaminations et laisser passer les lumières fluorescentes, puis la placer dans le thermocycleur 7500 Fast et lancer le programme 960.

II.3.3- Amplification par PCR multiplex

Etant donné que nous n'avons pas manipulé la suite des étapes, nous nous contenterons de présenter dans cette partie la méthodologie telle qu'observée et présentée par les techniciens du département d'ADN de la police scientifique.

II.3.3.1- le Kit de l'amplification

Elle est assurée par le kit IDENTIFILER PLUS qui contient les réactifs suivant les primers . master mix , témoin positif , et qui permet d'amplifier simultanément 15 Loci STRs de tétranucléotidique et l'amélogénine (marqueur déterminant du sexe)

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

Tableau 13: : indications des différents fluorochromes attachés aux STR analyses.

Les 16 loci AmpFISTR identifier plus															
D8S 1179	D21S 820	D7S 820	CSF 1PO	D3S1358	TH01	D13S 317	D16S 539	D2S1 338	D19S 433	VWA	TPOX	D18 S51	AMEL	D5S818	FGA
<i>Fluorochrome correspondant aux marqueurs</i>															

FAM	VIC	NED	PET
------------	------------	------------	------------

II.3.3.2- Méthode

- Préparation de la plaque PCR :

Commencer par préparer la plaque PCR en identifiant et calculant les volumes des différents réactifs nécessaires au Mix pour les échantillons

Tableau 14 : volumes des différents réactifs

Réactifs	Volume
Réaction Mix	$V(\mu\text{l}) = 10 \times 7 = 70$ (nombre d'échantillons +3)
Primer	$V(\mu\text{l}) = 5 \times 7 = 35$ (nombre d'échantillons+3)

- A l'aide d'un vortex, on d'homogénéise les échantillons d'ADN à amplifier ainsi que l'ADN contrôle et les différents réactifs de la PCR, ensuite on les centrifuger 3 à 5 secondes.
- Après homogénéisation et centrifugation du mix, on répartit 15 μl dans chaque puits, selon le plan de dépôt préparé.
- Dans chaque puits, nous mettons 10 μl de chaque échantillon à amplifier et on termine par l'ADN contrôle et le témoin négatif.
- La réaction PCR est réalisée dans un volume total de 25 μl .
- Pour terminer, on placer la plaque dans le thermocycleurABI 9700 préalablement programmé pour STR après avoir vérifié tous les puits, on couvre la plaque avec une feuille en aluminium et des cycles thermiques successifs sont entrepris (28 cycles).

II.3.4- Post-amplification (Post -PCR)

II.3.4.1- présentation de la post PCR

C'est une étape très importante pour l'analyse des fragments car elle nous permet de passer d'un ADN amplifié double brins à un ADN simple brin, du fait que le séquenceur utilisé ne prend en charge que de l'ADN mono-brin. Elle consiste donc à dénaturer les fragments

d'ADN en séquences monocaténaïres pour pouvoir ensuite effectué l'électrophorèse capillaire et obtenir un profil génétique.

Cette dénaturation est réalisée à l'aide de la température et un traitement chimique par la formamide afin d'empêcher l'hybridation des brins séparés après refroidissement.

Le produit de la PCR était révélé par des électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide. Actuellement, le produit de la PCR est révélé par l'électrophorèse capillaire couplée au séquenceur où l'ADN est coloré au bromure d'éthidium.

II.3.4.2- Méthode

- On commence par préparer une plaque pour la post - PCR .

Ensuite on calcule les volumes des réactifs nécessaires au mix (Tableau). Le Mix doit contenir du « formamide » qui est un agent intercalant permettant le maintien de la dénaturation de l'ADN ainsi qu'un standard de taille LIZ qui permet de mesurer l'ADN en paires de bases (pb).

Tableau 15 : Volumes des réactifs nécessaires à la post PCR

Réactifs	Volume
Formamide	$V(\mu\text{l}) = 8,7 \times 4$ (nombre d'échantillons)
Standard de taille	$V(\mu\text{l}) = 0,3 \times 4$ (nombre d'échantillons)
Ladder	$V(\mu\text{l}) = 1,5 \times 4$ (nombre d'échantillons)

- Vortexer le Mix pendant 10 à 15 secondes
- Répartir 9 l de ce Mix dans chaque puits de la plaque.
- Ajouter 1 à 2 l de chaque échantillon à partir de la plaque PCR dans leurs puits correspondant en suivant le plan de dépôt.
- Puis répartir 1 l du ladder (produit pré amplifié qui contient tous les allèles possibles pour les 16 marqueurs) dans son puits approprié .
- Couvrir la plaque avec la septa trip puis placer la dans un thermocycleur pour la dénaturation pendant 3 minutes à 95 à C.
- Déposer la plaque dans un cryobloc   -20 à C pendant 3min pour provoquer un choc thermique, ensuite centrifuger durant quelques secondes à 1600 rpm pour homogénéiser la plaque et éviter la formation de bulle d'air.
- La plaque est ainsi disposée à être insérer dans le séquenceur.

II.3.5- L'Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est réalisée grâce au séquenceur ABI 3130 xl doté de 16 capillaires remplis d'un polymère POP4 ou les produit PCR migrent selon leur taille sous l'influence d'un champ électrique.

Après injection, une haute tension de 3000 volts est appliquée à travers le capillaire afin de séparer les fragments d'ADN en quelque minute. Les fragments liés aux marqueurs fluorescents sont, lors de leur passage excités par un laser, ensuite la fluorescence émise est captée par un détecteur.

Le séquenceur est relié à un ordinateur auquel sont transférées les données brutes de l'analyse électrophorétique, puis gravées sur un logiciel performant. Les données sont enfin analysées et validées afin d'obtenir un profil génétique.

II.3.6- Validation des profils génétiques

Une fois l'électrophorèse capillaire terminée les données brutes sont récupérées et traitées ensuite les ladders sont vérifiés afin de valider la plaque. Ce dernier est un produit amplifié renfermant le maximum d'allèles relatifs aux marqueurs trouvés dans la population humaine.

On vérifie s'il n'y a pas de décalage de lecture (shift) et cela en superposant les ladders. Si tous les ladders sont superposables cela signifie qu'il n'y a pas de shift. Ensuite, on vérifie qu'il n'y a pas de décalage donc tous les allèles et qu'ils sont bien été assignés, Enfin tous les échantillons sont vérifiés un par un, les profils sont nettoyés par élimination des off ladder (figure 19).

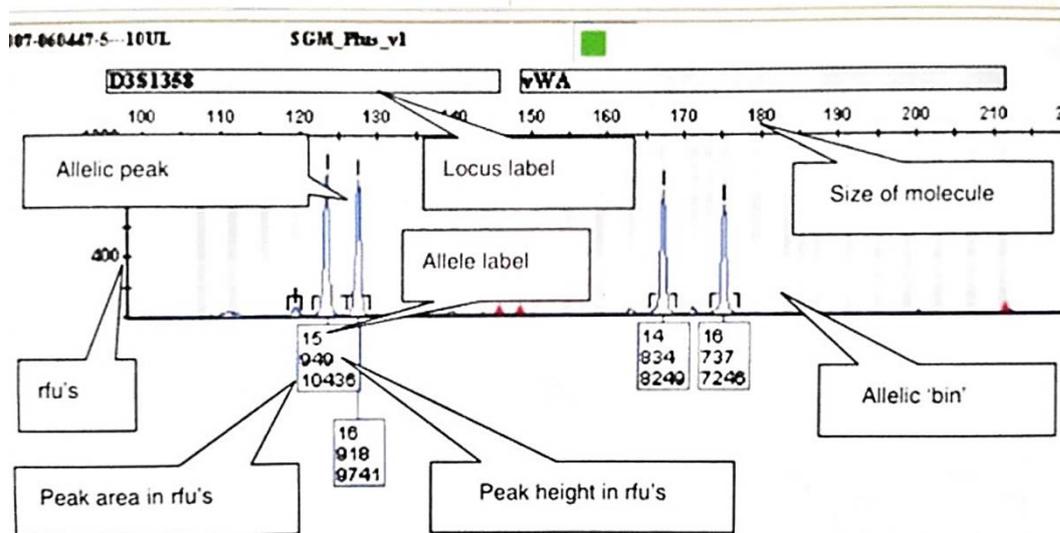


Figure 19: électrophoregramme d'un profil ADN (jamiesom,2016)

Les profils génétiques sont réalisés à l'aide d'un électrophorégramme qui mesure les réponses en unités de fluorescence relative (RFU) après amplification de l'échantillon d'origine.

Il affiche le profil sous forme d'une série de pics dont chacun correspond à un allèle d'un locus bien déterminé. Ces allèles sont désignés par rapport à une échelle allélique qui permet d'attribuer le nombre de motifs répétés ainsi que la hauteur des pics (RFU).

L'EPG identifie les loci par des cases grises (locus label). Les brins sont désignés par les bandes verticales grises. Ils permettent d'attribuer des numéros alléliques.

La lecture d'un profil génétique dans l'EPG se fait selon deux axes :

- L'axe horizontal (axe des abscisses), qui précise la taille des fragment amplifiés par PCR.
- L'axe vertical (axe des ordonnées), qui mesure la quantité des fragment (RFU).

Tableau 16 : tableau récapitulatif des quatre paramètres de validation des tests à partir de trace de sang.

Paramètre	Kit	Expérimentation		Nombre d'essais		Total d'essais
Reproductibilité	KM ancien +KM nouveau	Sang ancien	Homme	10	40 essais+2 témoins négatifs (KM ancien) 40 essais +2 témoins négatifs (KM nouveau/OBTI)	120 essais+ 4 témoins négatifs.
			Femme	10		
		Sang nouveau	Homme	10		
			femme	10		
	OBTI	Lysat prep		5		
KM	Lysat Qiagen		5			
Répétabilité	KM OBTI	6 opérateurs	Homme	5	10 essais+ 1 témoin négatif répété 3 fois par chaque opérateur	360 essais + 18 témoins négatifs
			femme	5		
Sensibilité	KM OBTI	Dilutions : 1/10.....1/100000	KM mars 2022	5	20 essais + 1 témoin négatif	20 + 4témoins négatifs.
			KM juin 2022	5		
			OBTI 2018	5		
			OBTI 2022	5		
Impact du support	KM OBTI	Cas réel : scellés armes blanches et vêtements		5	5 essais + é témoins.	10 essais=2 témoins

Résultats et Discussions

III-Résultats et discussions

L'étude que nous avons menée, dans le cadre de notre stage au département d'ADN de la police scientifique et technique dans le but de valider les tests préliminaires PSA (sperme) et Kastel Meyer et OBTI à partir de sang et prenant en compte différentes variables, nous a permis de vérifier les différentes caractéristiques et paramètres de validation (reproductibilité, répétabilité et sensibilité) des trois tests.

Nous présentons dans le présent chapitre les résultats obtenus dans chaque expérimentation afin de pouvoir ensuite les interpréter et obtenir des réponses à notre problématique.

III.1- Résultats et discussions de la validation du test PSA

III.1.1-Résultats de la sensibilité

Tableau 17 : Résultats du test PSA avec des dilutions effectuées sur différents supports.

Délutions	1/10			1/100			1/500			1/10000			1/20000		
Supports															
Sous-vêtement en Coton	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Couche de bébé	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Sous-vêtement en Nylon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Serviette hygiénique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

La PSA fournit des résultats positifs à partir de sperme humain sur différents supports atteignant une dilution maximale de 1/10000 pour la serviette hygiénique. La serviette hygiénique affiche ainsi une sensibilité plus accrue par rapport aux autres échantillons, qui ont donné des résultats positifs jusqu'à des dilutions 1/500.

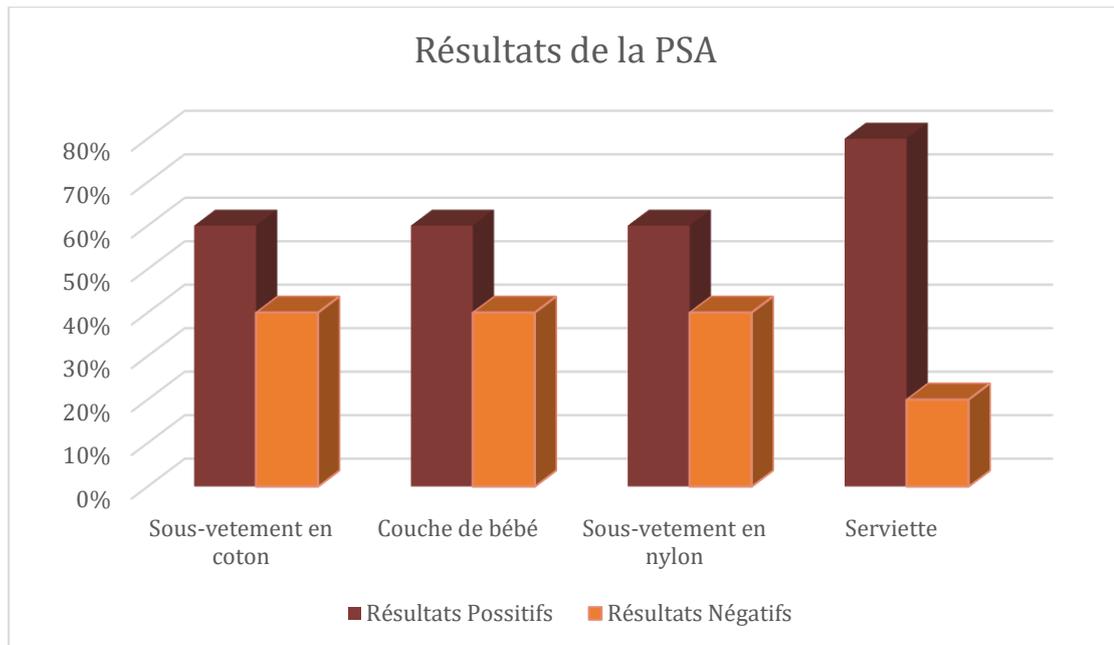


Figure 20: pourcentage des résultats du test PSA

Ces résultats montrent que le type de support utilisé a un impact sur les résultats des tests. Cet impact se concrétise dans une sensibilité minimum de 1/500 de détection pour la dilution de l'échantillon sur différents supports.

III.1.2-Résultats de la Reproductibilité

Tableau 18: Résultats de la répétabilité du test PSA avec des dilutions effectuées sur différents supports

Operateurs	Délutions Echantillons	1/10			1/100			1/500			1/10000			1/20000		
1 ^{er} opérateur	Sous-vêtement en Coton	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Couche de bébé	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Sous-vêtement en Nylon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Serviette hygiénique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 ^{eme} opérateur	Sous-vêtement en Coton	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Couche de bébé	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sous-vêtement en Nylon	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Serviette hygiénique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
3 ^{eme} opérateur	Sous-vêtement en Coton	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Couche de bébé	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	Sous-vêtement en Nylon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	Serviette hygiénique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

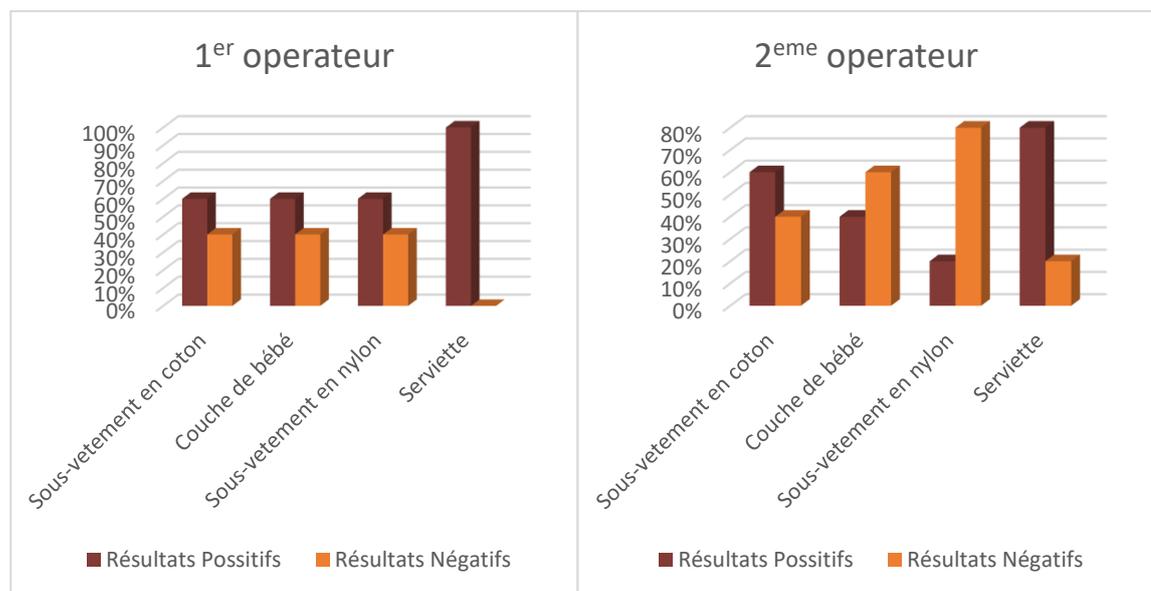
Les tests effectués par le premier opérateur ont permis de détecter la présence de sperme jusqu'à des dilutions à 1/500 pour le nylon, les couches et le coton et à 1/20000 pour la serviette hygiénique.

Les résultats varient pour le deuxième opérateur où la sensibilité est réduite à 1/10 pour le nylon; elle régresse aussi à 1/10000 pour le cas de la serviette hygiénique.

Le 3^{ème} opérateur affiche des résultats complètement chamboulés avec des négatifs suivis de positifs dans de plus grandes dilutions.

Nous pouvons donc confirmer que le support de l'échantillon a un impact sur les résultats du test; en effet, la sensibilité est plus élevée sur une serviette hygiénique que sur les couches. Les sous-vêtements en coton fournissent des résultats plus concluants que les sous-vêtements en nylon.

En outre, les résultats perturbés peuvent être dus à un problème technique ou à des erreurs de manipulation qui ont pu se produire au cours de ces tests, expliquant ainsi l'incohérence de ces résultats.



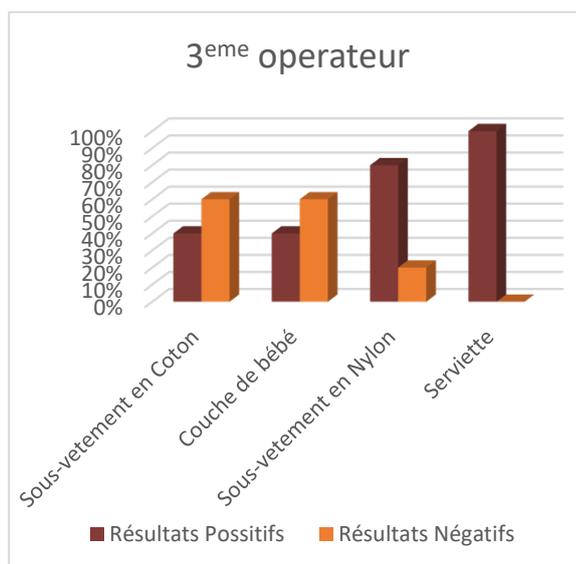


Figure 21: pourcentage des résultats de la répétabilité du test PSA

III.2- Résultats et discussions de la validation des tests KM et OBTI

Afin de valider les tests étudiés dans ce PFE, nous avons exploré différents paramètres des tests et nous avons obtenus les résultats suivants.

III.2.1- Résultats de la répétabilité

Dans le but de vérifier le paramètre de répétabilité du test KM et OBTI, nous avons testé un total de 84 écouvillons tachés de sang dilué au 1/10 ; frais et ancien, de sexe féminin et masculin.



Figure 22: résultats du test KM et OBTI de l'année 2022

Les résultats obtenus sont présentés selon les paramètres dans le tableau suivant :

Tableau 19 : Résultats de la répétabilité des tests KM et OBTI.

	S* 2021				S* 2022			
	Sexe ♀		Sexe ♂		Sexe ♀		Sexe ♂	
	KM	OBTI	KM	OBTI	KM	OBTI	KM	OBTI
E1	+	+	-	+	+	+	+	+
E2	+	+	+	+	+	+	+	+
E3	+	+	+	+	+	+	+	+
E4	+	+	+	+	+	+	+	+
E5	+	+	+	+	+	+	+	+
E6	+	+	+	+	+	+	+	+
E7	+	+	+	+	+	+	+	+
E8	+	+	+	+	+	+	+	+
E9	+	+	+	+	+	+	+	+
E10	+	+	+	+	+	+	+	+
T-	-	-	-	-	-	-	-	-

Résultat positif : (+)

Résultat négatif : (-)

S* : Sang liquide dilué au 10^{ème} (100µl de sang et 900µl d'eau pure)

2021 : Sang ancien

2022 : Sang frais

E1 - E10 : Nombre d'essai sur Ecouvillon

KM : Kastel Meyer

Le sang ancien prélevé en 2021 soumis au KM affiche un résultat positif pour tous les échantillons d'origine féminin, les mêmes résultats sont obtenus avec un sang d'origine masculin sauf pour l'écouvillon E1. Le test OBTI a permis de révéler que tous les écouvillons sont du sang d'origine humaine.

Pour le sang nouveau datant de 2022, le test KM a permis de révéler toutes les traces de sang homme et femme ; le test OBTI à confirmer quant à lui que le sang est d'origine humaine pour les deux sexes.

Les kits de révélation et d'orientation KM et OBTI ne sont pas affectés par l'âge du sang.

La nature de la trace de sang (tout sexe confondu) ainsi que son ancienneté n'ont pas d'impact sur les résultats des tests d'orientation et de confirmation.

II.2.2- Résultats des tests KM et OBTI sur lysat



Figure 23 : résultats du KM sur lysat (Qiagen)

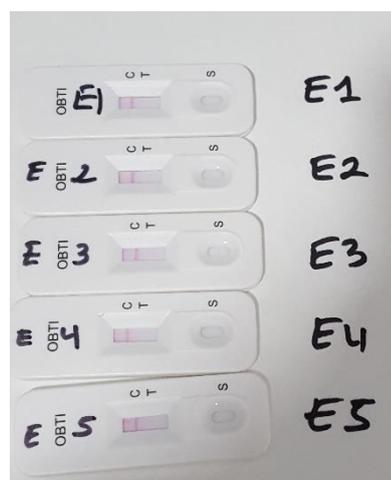


Figure 24 : résultats de l'OBTI sur lysat (Qiagen)

Tableau 20: Résultat de la répétabilité à partir du lysat

	LP		L Qiagen	
	KM	OBTI	KM	OBTI
E1 (rouille)	-	-	+	-
E2 (pantalon)	+	-	+	-
E3 (caleçon)	+	-	+	-
E4 (sang)	-	-	+	-
E5 (sang)	+	-	+	-

Résultat positif : (+)

Résultat négatif : (-)

E : Ecouvillon contenant 2µl du lysat obtenu via le kit Prepfilier/Qiagen selon les échantillons.

LP : lysat obtenu du kit prepfiler

LQ : lysat obtenu du kit Qiagen

PCI : lysat obtenu du kit PCI.

Les résultats du tableau ci-dessus permettent de vérifier l'impact que peut avoir le lysat extrait avec différents kits : Prepfiler et Qiagen sur la sensibilité et la spécificité des tests KM et OBTL.

En utilisant le lysat du kit Prepfiler, le KM est plus spécifique en affichant un résultat négatif avec la rouille (souvent responsable de faux positif) ; il est cependant moins sensible (écouvillon 4 négatif).

L'OBTL, est moins sensible que le KM avec des résultats négatifs pour les cinq échantillons.

Le KM a affiché des résultats positifs pour les cinq échantillons du lysat extrait du kit d'extraction Qiagen (y compris la rouille), alors que l'OBTL affiche toujours les mêmes résultats négatifs.

Nous avons par ailleurs complété ces résultats en expérimentant le lysat extrait via trois kits d'extraction à partir de 5 μ l de sang pur sur un support papier.

Les résultats obtenus nous permettent de vérifier la validité des tests KM et OBT

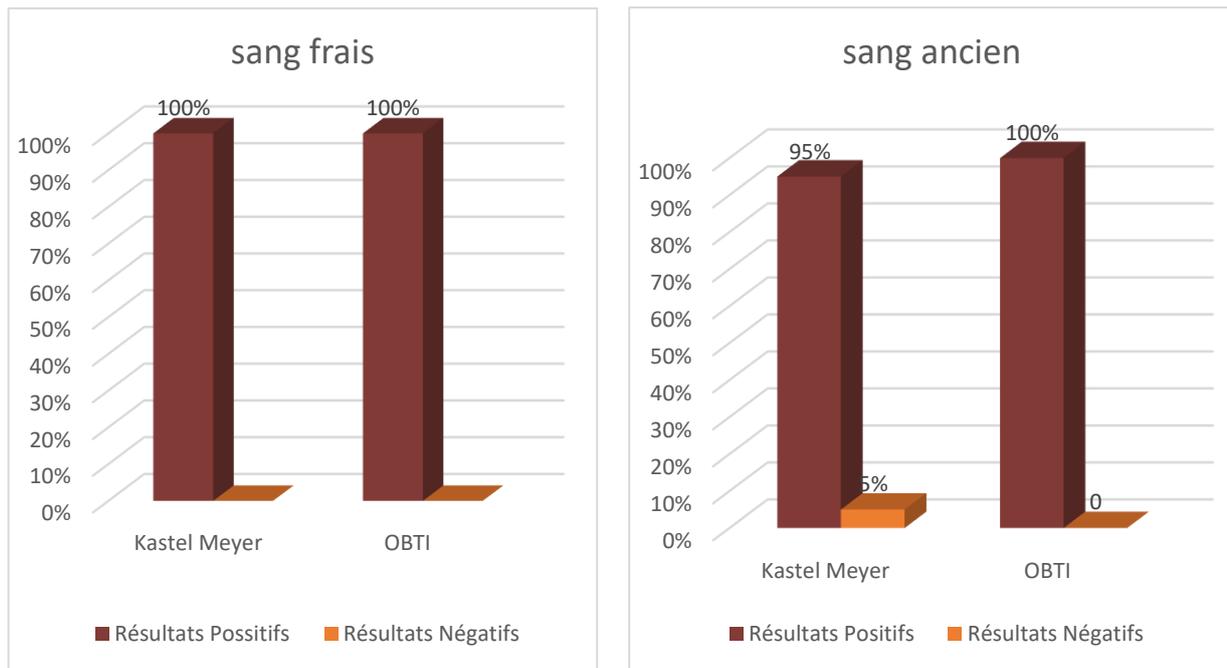


Figure 25 : pourcentages des résultats de reproductibilité

III.1.3- Résultats des tests sur lysat extrait de différents kits à partir de sang pur

Tableau 21: résultat des tests utilisés sur lysats extraits de différents kits d'extraction.

5µl sang pur soumis au lysat	LP Prefiler		LQ Qiagen		PCI	
	KM	OBTI	KM	OBTI	KM	OBTI
E1	+	-	+	-	-	-
E2	+	-	+	-	-	-
E3	+	-	+	-	-	-
E4	+	-	+	-	-	-
E5	+	-	+	-	-	-

Le test d'orientation KM donne des résultats positifs face aux tampons Prefiler tandis que le test de confirmation OBTI s'est avéré être moins concluant (tous les écouvillons ont donné une réaction négative). Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que le contenu du réactif Prefiler a inhibé cette réaction (une inhibition chimique ou une dégradation des récepteurs) dans le cas de l'OBTI alors que le KM a révélé des résultats positifs car l'enzyme n'a pas été touché par les compositions du tampon.

Les mêmes résultats ont été observés avec le kit KM et OBTI lors de l'utilisation du lysat extrait du kit Qiagen. En effet, les tampons soumis au KM sont positifs alors que les tampons de l'OBTI sont négatifs.

Ces résultats montrent que le lysat diffère selon le kit d'obtention ; ainsi, le tampon Prepfilier et Qiagen qui conservent le substrat enzyme pour le KM ont un effet inhibiteur sur l'OBTI ; les deux kits n'ont aucune sensibilité face au lysat obtenu via le kit PCI (inhibition chimique et dégradation des récepteurs (AG-AC)).

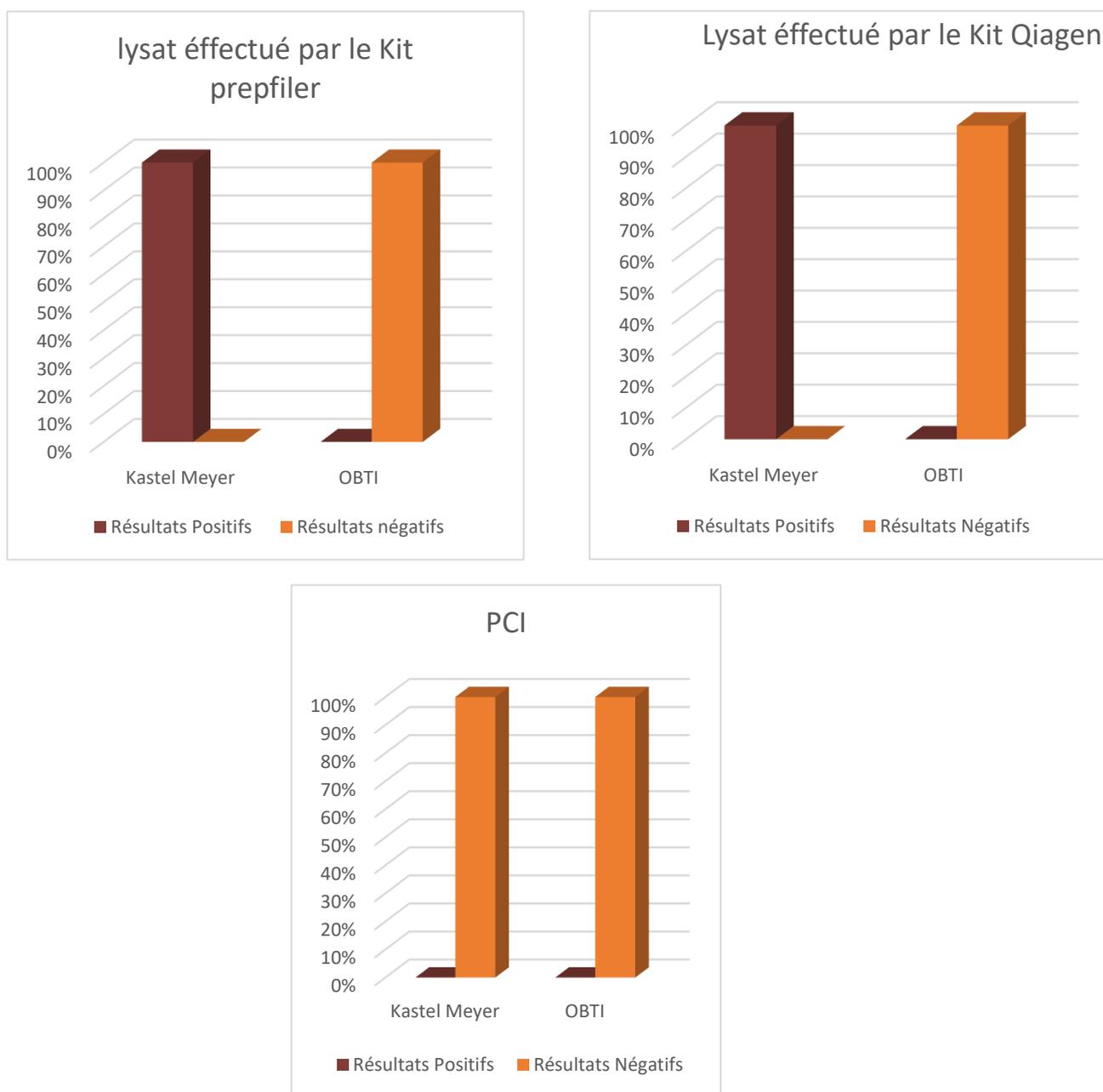


Figure 26: pourcentage des résultats des tests avec le lysat

III.2.4- Résultats de la reproductibilité des tests KM et OBTI

Tableau 22: résultats de la répétabilité

Ech	Test	1 ^{er} Répétabilité					2 ^{eme} Répétabilité					3 ^{eme} Répétabilité					
		E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	
Manip 1	Sexe ♀	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		OBTI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sexe ♂	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		OBTI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manip 2	Sexe ♀	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		OBTI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sexe ♂	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		OBTI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manip 3	Sexe ♀	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		OBTI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sexe ♂	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		OBTI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manip 4	Sexe ♀	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		OBTI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sexe ♂	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		OBTI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manip 5	Sexe ♀	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		OBTI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sexe ♂	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		OBTI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mani6	Sexe ♀	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		OBTI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sexe ♂	KM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		OBTI	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Résultat positif : (+)

Résultat négatif : (-)

E1 → **E15** : Nombre d'essai sur Ecouvillon

KM :Kastle Meyer

Le KM a donné les mêmes résultats positifs par le premier manipulateur à trois reprises en temps différents. Le test de confirmation OBTI a confirmé que tous les échantillons sont du sang humain.

La même opération a été réalisé par cinq (05) autres manipulateurs en parallèle. Les résultats ont confirmé que le KM ainsi que l'OBTI donnent les mêmes résultats positifs (sauf pour le cinquième échantillon du sixième manipulateur lors de la première répétition ; qui a donné un résultat positif lors de la deuxième et troisième répétition).

Les tests KM et OBTI sont des tests fiables et stables ; ils fournissent les mêmes résultats mêmes en étant manipulé par différents opérateurs.

III.2.5- Résultats de la sensibilité



Figure 27: résultats de la sensibilité du Kastle Meyer (ancien) et OBTI



Figure 28: Résultats de la sensibilité du test KM (nouveau)

Tableau 23: résultats de la sensibilité

Tests Dilutions	KM ancien (mars 2022)	KM nouveau (juin 2022)	OBTI 2018	OBTI 2022
SP	+	+	+	+
1/10	+	+	+	+
1/100	+	+	+	+
1/1000	+	+	+	+
1/10000	+	+	+	+
1/100000	-	+	+	+

Résultat positif : (+)

Résultat négatif: (-)

SP : Sang Pure

KM :Kastel Meyer

Pour confirmer la sensibilité des tests, nous avons réduit la quantité du tampon jusqu'à $1/10^4$. La sensibilité du KM déjà préparé (mars 2022) a été validé jusqu'à dilution du sang à $1/10^3$ avec un résultat négatif à $1/10^4$. La sensibilité du KM nouveau que nous avons préparé (juin 2022) a une sensibilité plus prononcée et supérieure affichant un résultat positif au $1/100000$.

L'OBTI a affiché un résultat positif dans les deux lots employés (2018 et 2022) jusqu'à dilution $1/10^4$.

L'OBTI a une stabilité accrue ; il affiche les mêmes résultats (positifs) pour le lot de 2018 et de 2022 contrairement au KM qui a une durée de vie réduite (trois mois) et dont la sensibilité est supérieure pour le KM le plus récent.

III.2.6- Résultats de l'impact du support sur les tests KM et OBTI

Le support pouvant avoir un effet sur la qualité de l'échantillon et les résultats obtenus via les tests KM et OBTI, nous avons soumis aux deux tests des échantillons prélevés de différents supports. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 24: résultats des tests préliminaires obtenu pour chaque échantillon

Echantillon	KM	OBTI
Sous vêtement	+	+
Couteau	+	+
Pantalon	+	+
Chaussettes	+	+
Marteau	+	+

Le KM fournit des réactions positives à partir du sang extrait des différents supports. Les mêmes résultats positives sont relevés sur le test OBTI.

Ces résultats montrent que le support n'a pas d'impact sur la qualité de l'échantillon et n'affecte pas la sensibilité et la spécificité des tests.

III.3- Détermination des profils génétique

Il aurait été souhaitable de réaliser le profilage à partir des extraits déjà étudiés; mais dans l'impossibilité de poursuivre avec le même matériel biologique, nous nous sommes orientés vers le profilage à partir d'autres échantillons de sang.

Notre objectif était de vérifier si la qualité (pureté) et la quantité (après quantification) de l'ADN avait un impact sur le profilage, ceci dit, nous avons décidé d'aborder différents profils afin de comprendre comment aborder une lecture des profils génétiques.

III.3.1-Résultats de la quantification d'ADN

Après avoir détecté la présence de sang par le biais de résultats positifs des tests préliminaires, nous avons procédé à l'extraction de l'ADN à partir des kit Qiagen.

Les concentrations des échantillons que nous avons obtenu vari de 0.1 à 0.86 ng/ µl (Tableau 26).

Tableau 25: Résultats de quantification

	Echantillons	Concentration d'ADN (ng/ μ l)
Sang ancien	Echantillon de sexe féminin	0.63
	Echantillon de sexe masculin	0.11
Sang frais	Echantillon de sexe féminin	0.86
	Echantillon de sexe masculin	0.1

Les quantités présentées dans le tableau représentent les concentrations d'ADN selon les échantillons en prenant en considération différentes variables (sexe et ancienneté de l'échantillon). En effet, les concentrations varient d'un échantillon à un autre ; elles sont plus élevées pour le cas du sang frais. Cependant, la variable sexe affiche un décalage avec des concentration plus élevée dans les échantillons d'origine féminine.

Les résultats de la quantification montrent qu'en dépit de la quantité réduite d'ADN de l'échantillon, les tests d'orientation KM et de confirmation OBTI affichent des résultats positifs. Ils sont donc sensibles à des quantités infimes d'ADN.

En outre, cette quantité dépend de l'ancienneté de l'échantillon, l'ADN du sang ancien a tendance à se dégrader.

Reste cependant à explorer avec d'autres échantillons l'impact du sexe sur la quantité d'ADN (féminin supérieure au sexe masculin dans les résultats ci-dessus).

III.3.2- Résultats des profils génétiques

Nous avons amorcé notre profilage avec des échantillons différents des précédents ce qui rend notre étude relative uniquement à la lecture des profils.

Notre objectif étant de vérifier la culpabilité d'un suspect en superposant son profil aux profils obtenus.

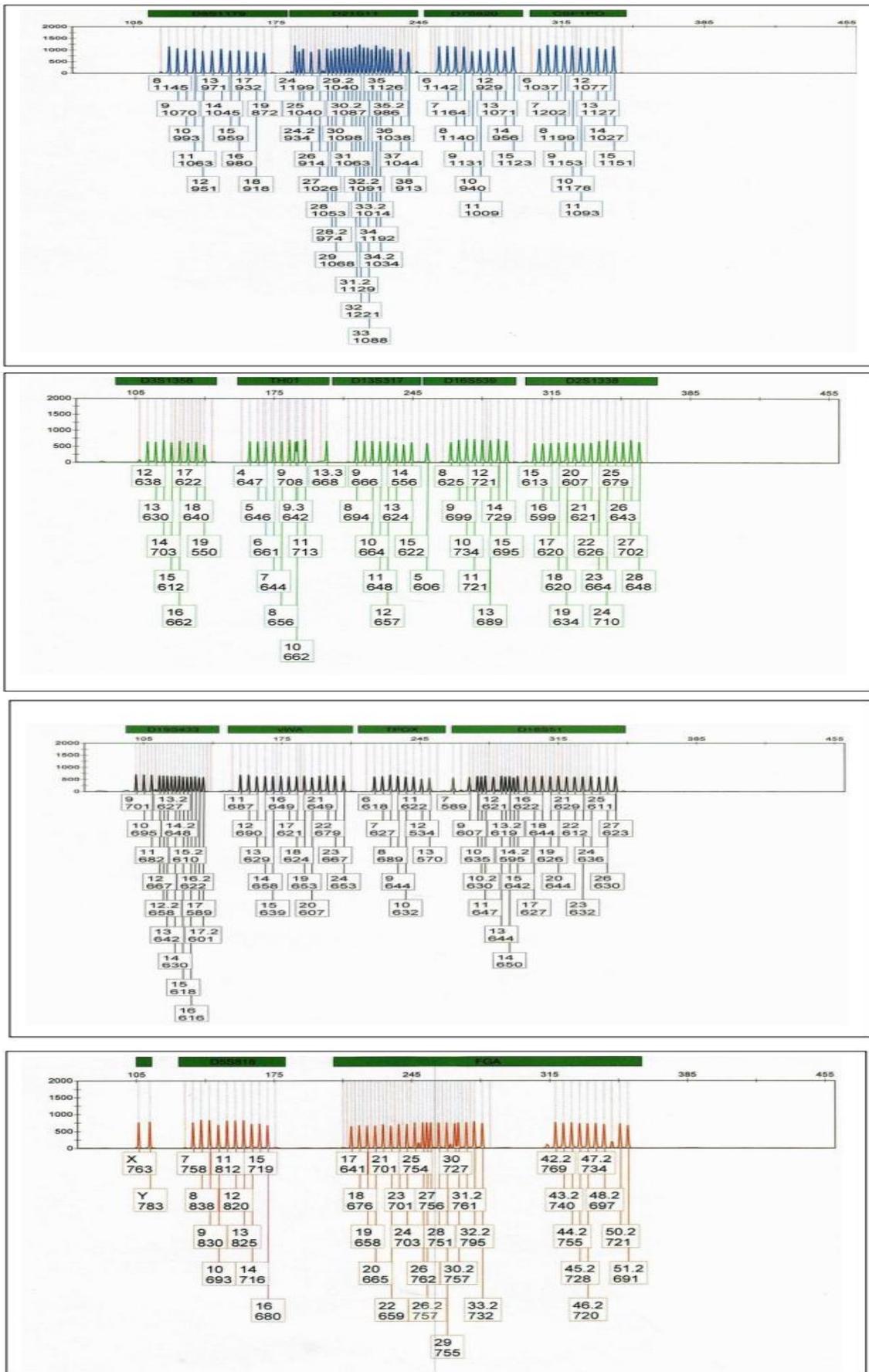


Figure 29 : Profil du Ladder du kit IDENTIFILER PLUS

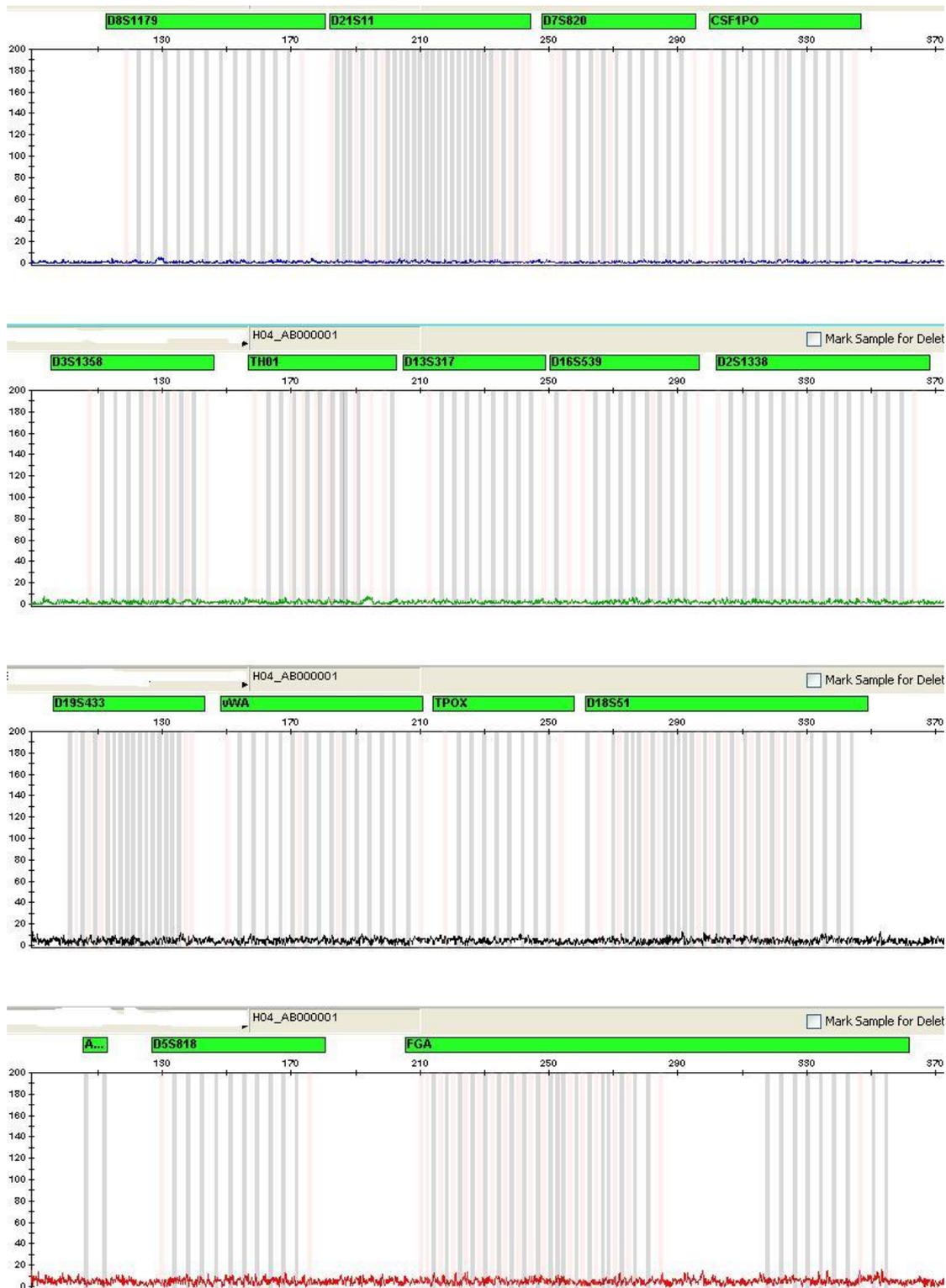


Figure 30: controle Négatifs (IDENTIFIER PLUS PCR Amplification Kit user guide 2022)

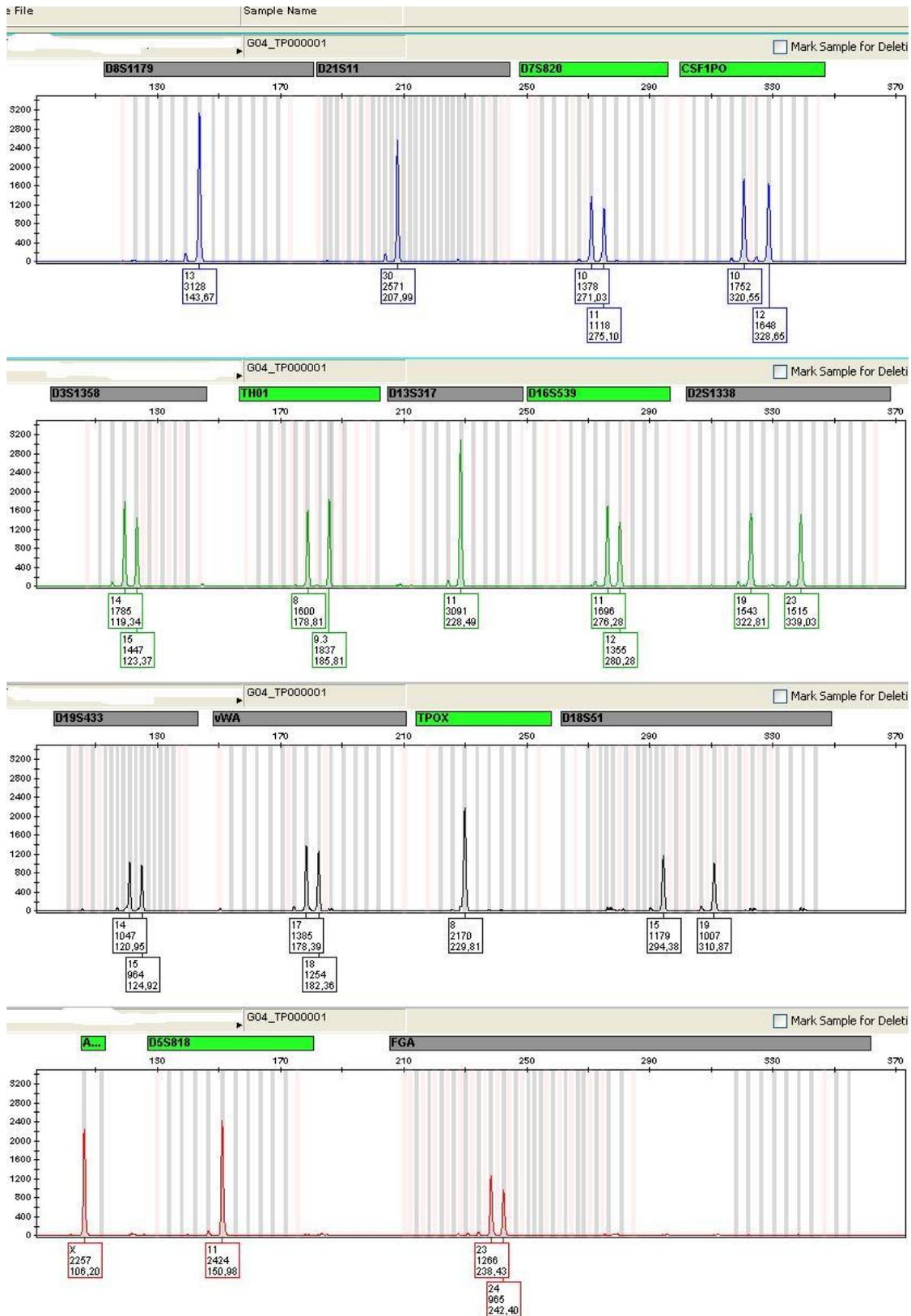


Figure 31: Control Positif (IDENTIFILER PLUS PCR Amplification Kit user guide ;2022)

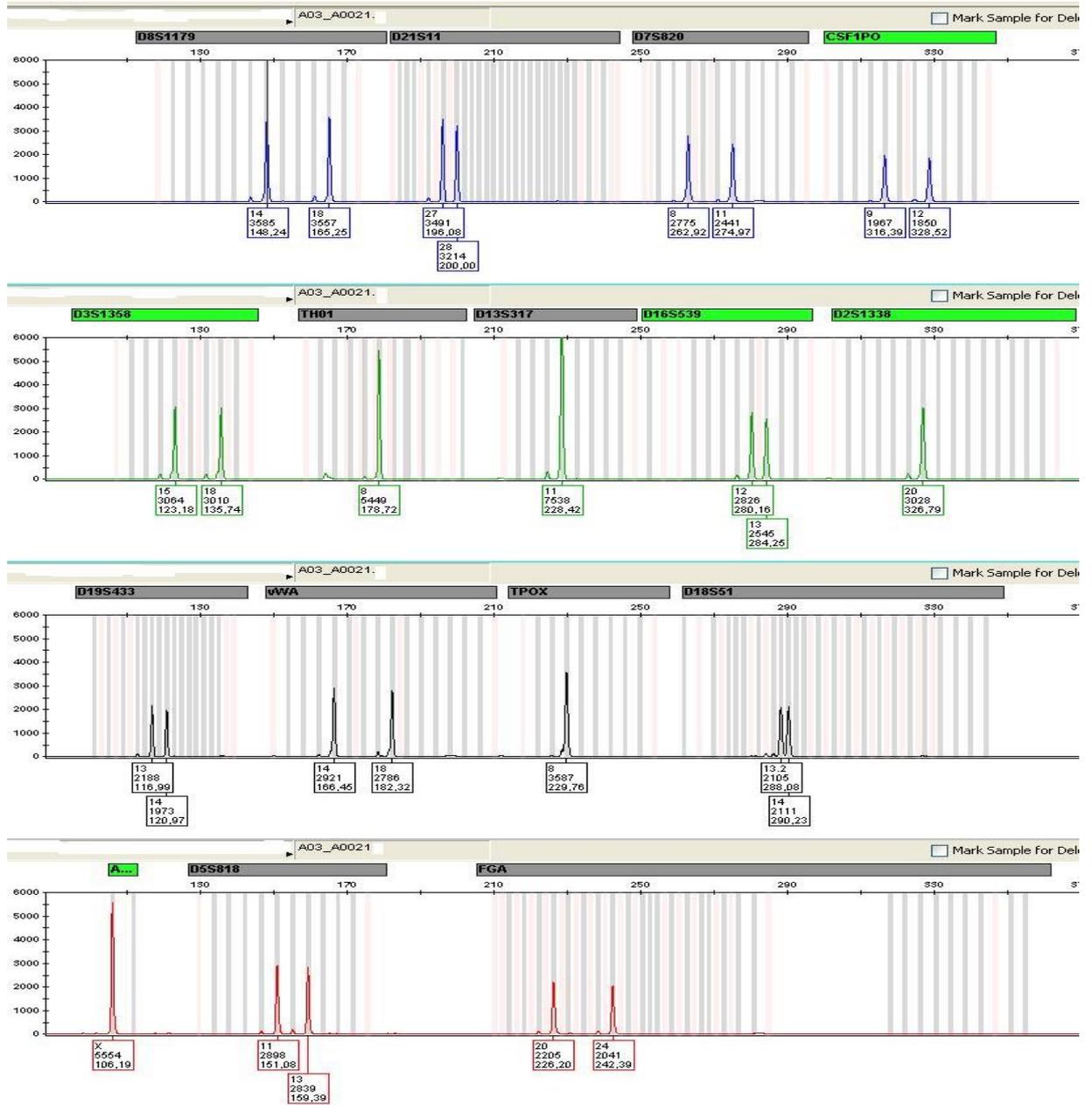


Figure 32: Profil génétique complet 01

Les 16 loci AmpFISTR identifier plus															
D8S 1179	D21 S11	D7S 820	CSF 1PO	D3S1358	TH01	D13S 317	D16S 539	D2S1 338	D19S 433	VWA	TPOX	D18 S51	AMEL	D5S818	FGA
Profil génétique complet															
14	27	8	9	15	8	11	12	20	13	14	8	13.2	X	11	20
18	28	11	12	18			13		14	18		14	X	13	24

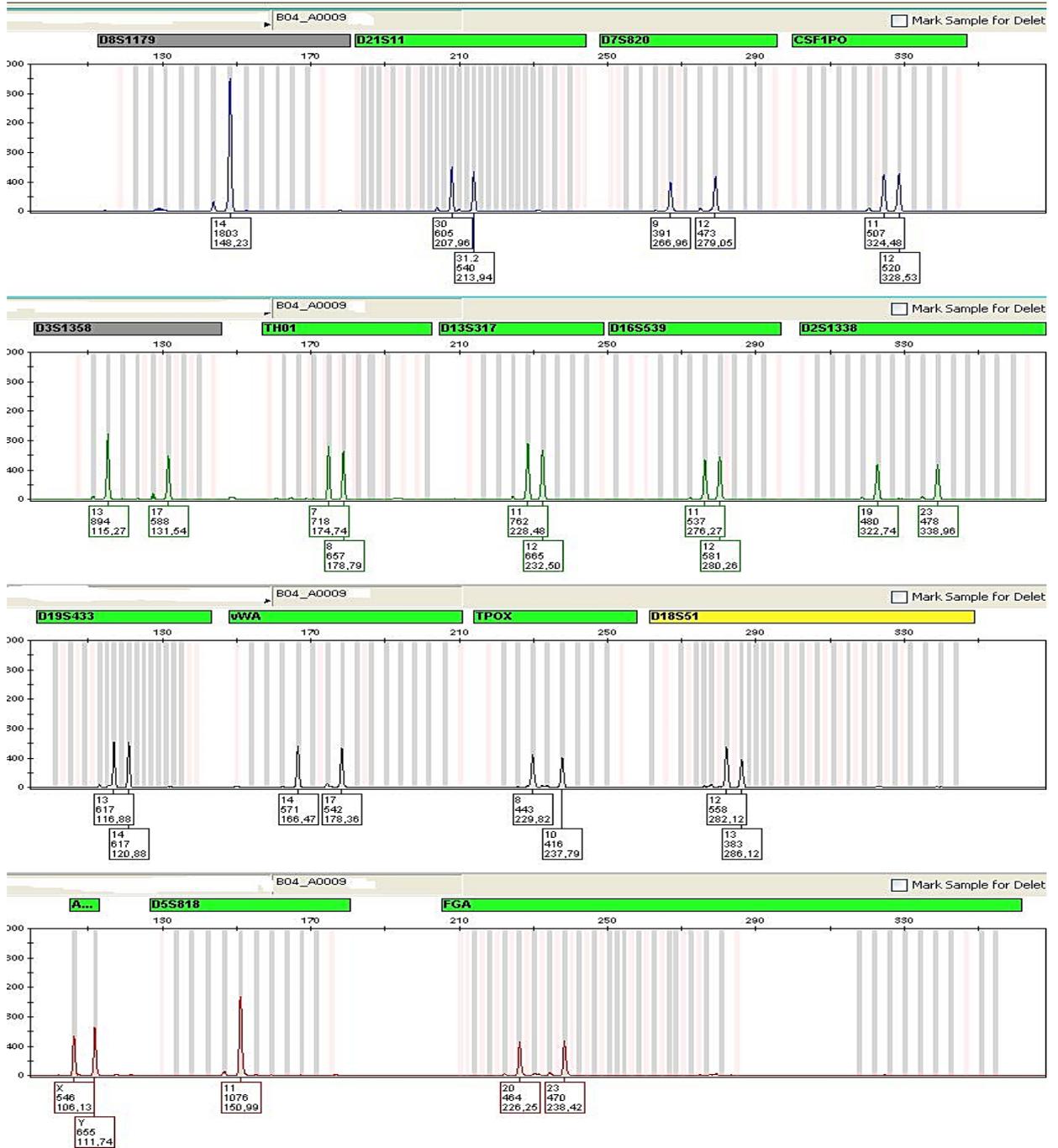


Figure 33: Profil génétique complet 02

Les 16 loci AmpFISTR identifier plus

D8S 1179	D21 S11	D7S 820	CSF 1PO	D3S1358	THO1	D13S 317	D16S 539	D2S1 338	D19S 433	VWA	TPOX	D18 S51	AMEL	D5S818	FGA
Profil génétique complet															
14	30	9	11	13	7	11	11	19	13	14	8	12	X	11	20
	31.2	12	12	17	8	12	12	23	14	17	10	13	Y		23

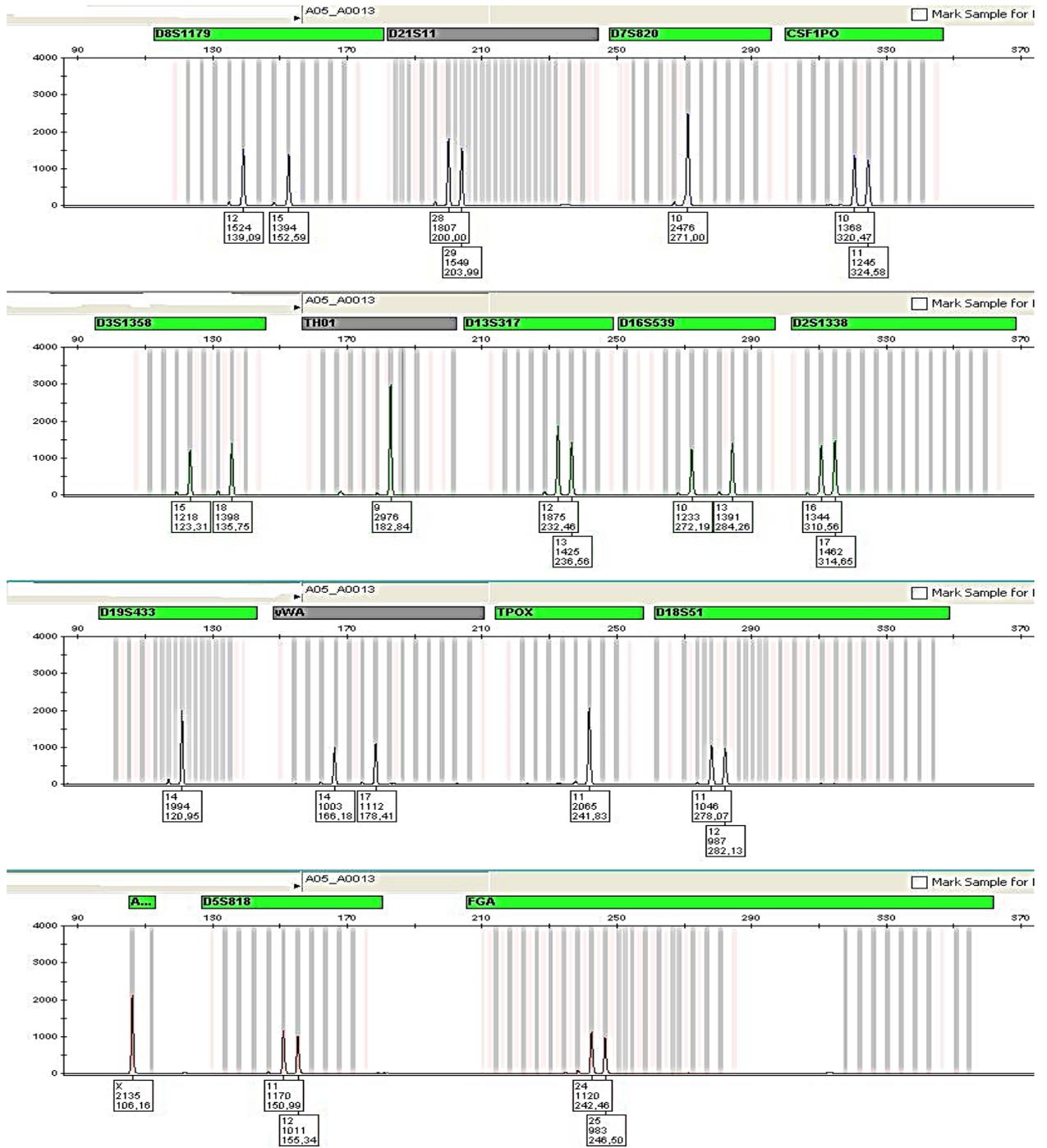


Figure 34: Profil génétique 03

Les 16 loci AmpFISTR identifier plus															
D8S 1179	D21 S11	D7S 820	CSF 1PO	D3S1358	THO1	D13S 317	D16S 539	D2S1 338	D19S 433	VWA	TPOX	D18 S51	AMEL	D5S818	FGA
Profil génétique complet															
12	28	10	10	15	9	12	10	16	14	14	11	11	X	11	24
15	29		11	18		13	13	17		17		12	X	12	12

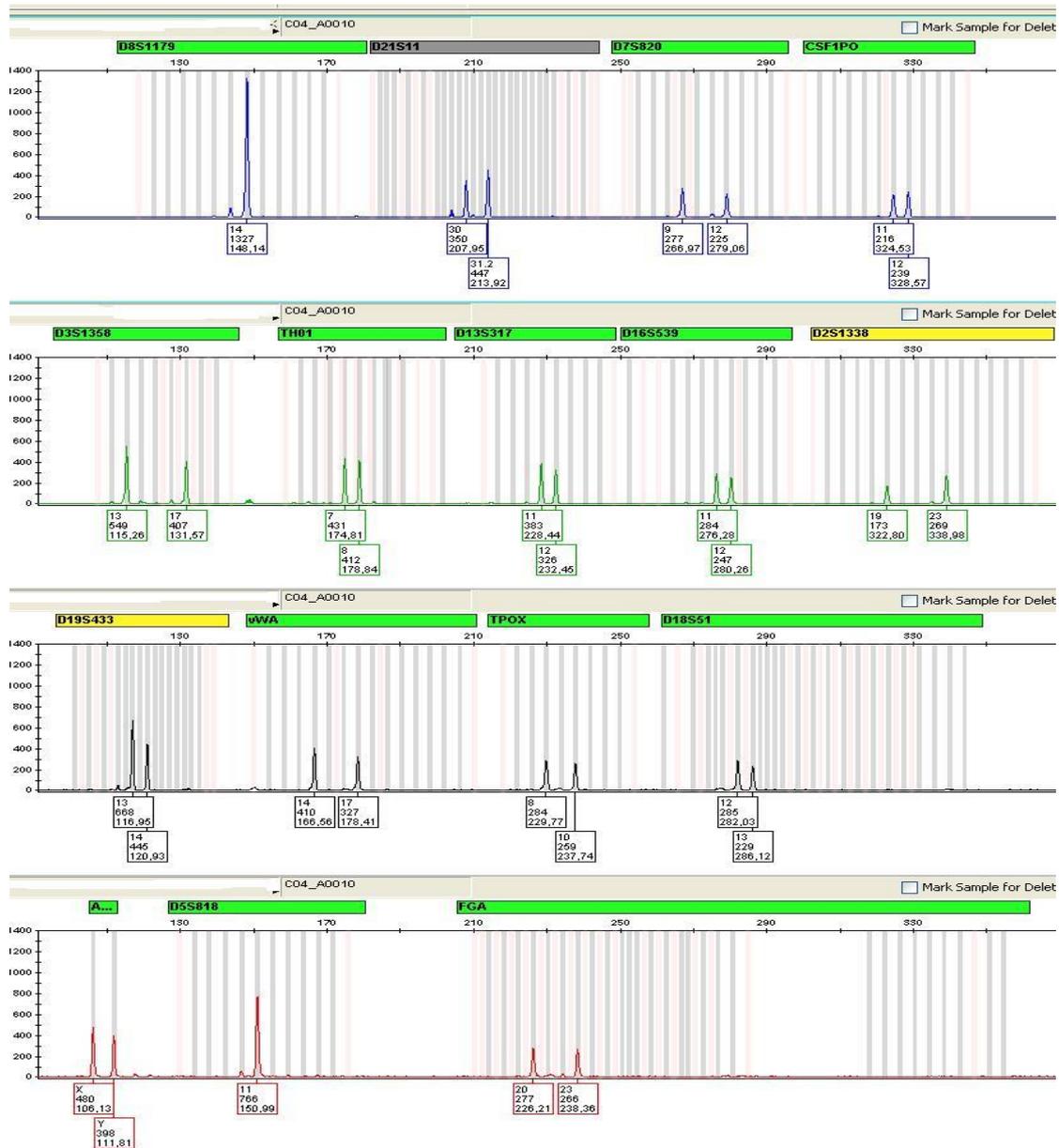


Figure 35: Profil génétique complet 4

Les 16 loci AmpFISTR identifier plus																
D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	VWA	TPOX	D18S51	AMEL	D5S818	FGA	
Profil génétique complet																
14	30	9	11	13	7	11	11	19	13	14	8	12	X	11	20	
	31.2	12	12	17	8	12	12	23	14	17	10	13	Y		23	

III.3.3- Interprétation des résultats

Les profils génétiques présentés sont des profils complets. Ils représentent l'intégralité des STRs du kit ce qui fournit plus de matière à l'analyse du profil.

Le profil contient un STR de mélogénie qui permet de déterminer le sexe de l'échantillon. Dans notre cas, il y est question de deux profils génétiques de sexe féminin (profil 1 et 3) et de deux de sexe masculin (profil 2 et 4). En outre, lorsqu'il y a présence de deux allèles à un locus, ce dernier est dit hétérozygote ; lorsque les deux allèles sont identiques, la personne est homozygote.

L'étude des profils nécessite aussi un ladder qui constitue la référence des STRs afin de garantir l'authenticité et la facilité de la lecture, un témoin positif et un témoin négatif.

Les profils génétiques ne sont validés que si le ladder et les différents témoins positifs et négatifs utilisés ont donné des résultats conformes.

Le Kit utilisé dans l'obtention du profil génétique se base sur 16 STRs. Ces STRs employés par le département d'ADN de la police scientifique dans la lecture des profils génétiques sont les plus fiables et les plus stables (avec le moins de mutations possible et peu de similitudes entre les individus).

Conclusion

Notre projet de fin d'étude s'inscrit dans un cadre criminalistique (réalisé au département d'ADN de la police scientifique) afin de valider des tests de révélation de traces biologiques et d'obtenir des profils génétiques à partir de ces traces biologiques.

En effet, l'objectif de notre travail était en premier lieu de valider trois tests d'essais à partir de deux traces biologiques différentes le kit PSA pour le sperme, le test d'orientation Kastel Meyer ainsi que le test de confirmation OBTI pour les traces de sang afin de vérifier leur fiabilité en appréhendant différents paramètres.

Les résultats obtenus montrent que le liquide séminal est révélé par le Kit PSA, nous avons de ce fait pu en déterminer la fiabilité et la sensibilité tout en révélant que le support a un impact sur les résultats du test.

Le test Kastel Meyer permet quant à lui d'identifier les traces de sang en les distinguant des autres traces qui peuvent lui être similaire ; sa précision et sa spécificité sont donc bien déterminé. Il a aussi été démontré que ce test a une sensibilité qui varie selon sa date de fabrication. Il a fourni les mêmes résultats à plusieurs reprises et en soumettant l'échantillon à différentes conditions. Plus spécifique que son prédécesseur, l'OBTI a permis de confirmer la nature humaine des traces de sang (comme attendus). Les résultats confirment aussi sa fiabilité et sa sensibilité.

L'étude que nous avons menée a permis en outre de montrer que les méthodes d'extraction du lysat ont un impact sur les résultats obtenus par le test Kastel Meyer ainsi que l'OBTI.

Notre étude s'est orientée en deuxième lieu vers l'obtention de profils génétiques à partir nouveaux échantillons de substances biologiques (le sang). Nous avons de ce fait pu déterminer le profil génétique à partir de ces traces en se basant sur les STRs.

Enfin nous pouvons affirmer que l'utilisation des tests facilite la révélation des traces biologiques qui constitue une étape primordiale à leur étude et à l'établissement d'un profil génétique susceptibles d'incriminer ou disculper un suspect. Par ailleurs, l'obtention d'un profil dépend sensiblement de la quantité et de la qualité de l'ADN de l'échantillon.

Cependant une étude plus approfondie permettrait d'expérimenter plus de supports : différents matériaux : bois, carton, verre, ...et différents types de tissus : Cotton, soie, nylon, laine.

Références Bibliographiques

1. Butler , J.M. (2001) Forensic DNA typing : Biology and technology behind STR markers . Ist edition . Nature Academic Press , Londres . 322p .
2. Butler J.M., (2005), Forensic DNA Typing, Biology, Technology, and Genetics of STR Markers 2nd edition, USA Elsevier.
3. Butler , J.M. , Hill , C.R. (2010) Scientific Issues with Analysis of Low Amounts of DNA . National Institute of Standards and Technology , Biochemical Science Division , Gaithersburg , Maryland , USA
4. Butler , J.M. , et Hill , C.R. (2012) Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis . Forensic Sci Rev 24:15.
5. COQUOZ , R. (2003) Preuve par l'ADN . La génétique au service de la justice . Pressex Polytechniques et Universitaires Romandes , Lausanne
6. COQUOZ Raphaël et TARONI Franco. Preuve par l'ADN : la génétique au service de la
7. COQUOZ Raphaël , Jennifer Comte , Diana Hall , Tacha Hicks , Franco Taroni , (2013) . Preuve par l'ADN la génétique au service de la justice. Ed, Presse polytechniques et universitaire romandes : 457p .
8. Dhaliwal , A (2013) DNA extraction and purification . Rutgers University , New Jersey , United States.
9. Doutremepuich C. (2001) . 10 ans d'empreinte génétique biology and technology behind STR Markers , Ed . La Sécurité d'aujourd'hui : 223p
10. Doutremepuich . C , (2012) . Les empreintes génétiques en pratique judiciaire . Ed , Bull . Acad . Natle Méd , 2012 , 196 , no 6 , 1117-1130 .
11. Edwards , A. , Hammond , H.A. , Jin , T , Caskey , C.T. , Chakraborty , R.1992 . Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups . Genomics 12 : 241 .
12. F. Uhel · L. Zafrani,(2019) ,Nouvelles techniques de biologie moléculaire.
13. Jeffreys , AJ . , Wilson , V. , and Thein , S.L. et al . 1985. Individual specific fringer prints of human DNA . Nature 316 : 76-79
14. Keyser.C , Petrovski , E (2006) Utilisation des SNP pour l'identification humaine.Spectra analyse , n 249 , p24-25

15. Loistron S. (2009). Les empreintes génétiques en médecine légale, réalisation, législation. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en chirurgie dentaire 22,25p.
16. Mansuet - Lupo , A . (2007) Revue Immuno - analyse & Biologie Spécialisée Volume 22 , numéro 4 , pp 209-214.
17. Primrose S.B ; Twyman R.M ; Old R.W. (2004) Principe de génie génétique . De boeck et larcier . pp : 279-280 .
18. Pun , K. , Comte , J. , Albrecht , C. , et Milon , M.P. (2008) Identification par génétique forensique.
19. Righetti Jean-Marie, (2002), la salive en médecine légale.
20. Strayer , C. (2006) Understanding the IPC in DNA Quantitation Assays . Scientific Style and Format
21. Schumm, J. W.Lins , A.M. , Sprecher , c.J. , et Micka , KA.(1995) . Systèmes à haut débit pour l'analyse des locus STR. Dans Actes du 6^{ème} Symposium international sur l'identification humaine. Scottsdale, Az.
22. Siegel , J.A. , et Saukko , P.J. (2000) Encyclopedia of forensic science . Academic Press , New York . USA
23. Sloots, James ; Lalonde, Wendy; Reid, Barbara; Millman, Jonathan (2017). "Kastle-Meyer blood test reagents are deleterious to DNA". Forensic Science International. 281: 141-146. doi:10.1016/j.forsciint.2017.10.006

Annexes

Préparation de la dilution a 1/10 :



Annexe 1 : Prélèvement de 100µl
de sang humain

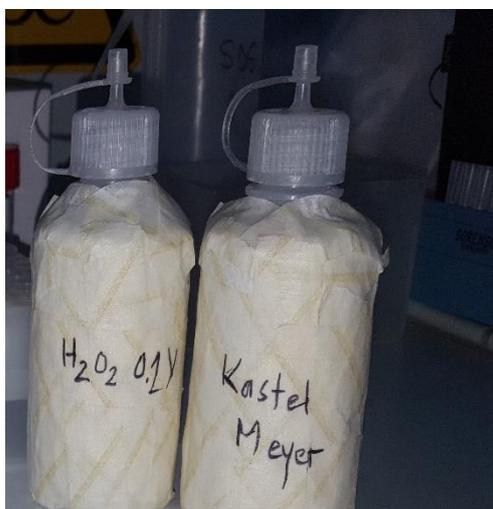


Annexe 2 : Prélèvement de 900µl
d'eau ultra pure



Annexe 3 : sang diluer au
1/10

- Test kastel Meyer :



Annexe 4 : réactifs du test kastel Meyer



Annexe 5 : Trois goutte du réactif de kastel Meyer

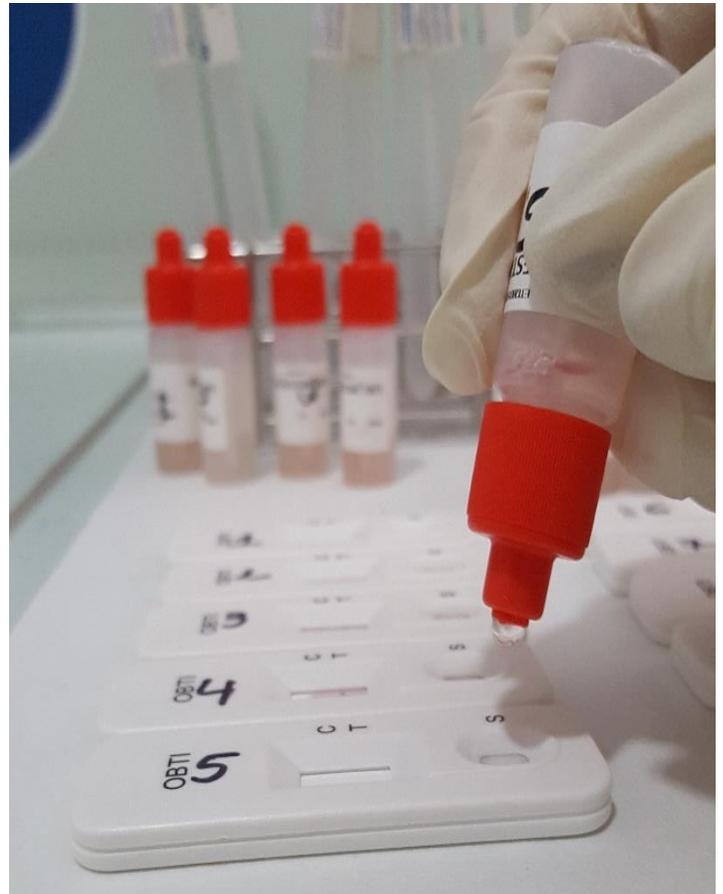


Annexe 6: trois goutte de peroxyde d'hydrogène

Test OBTI :



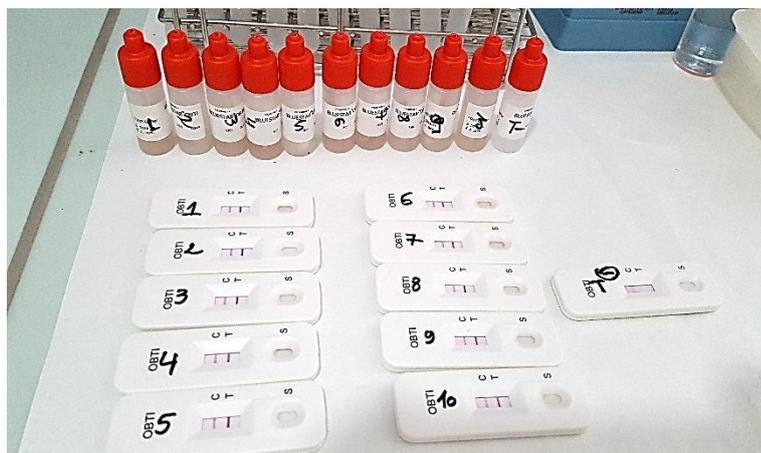
Annexe 9 : composent du test OBTI



Annexe 10 : pose de trois goutte du réactif OBTI dans le puit de dépôt



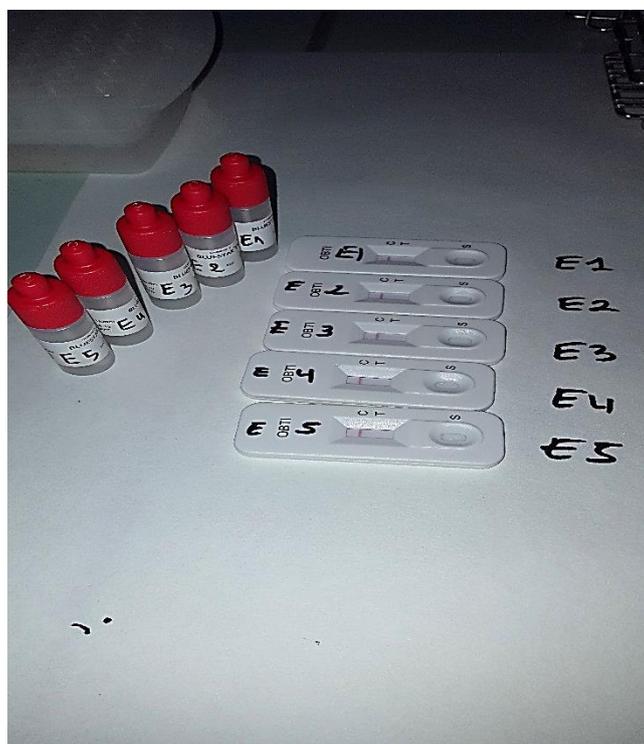
Préparation des dilutions



Résultats OBTI au 1/10ém



Résultats KM 1/10 sexe masculin
(reproductibilité)

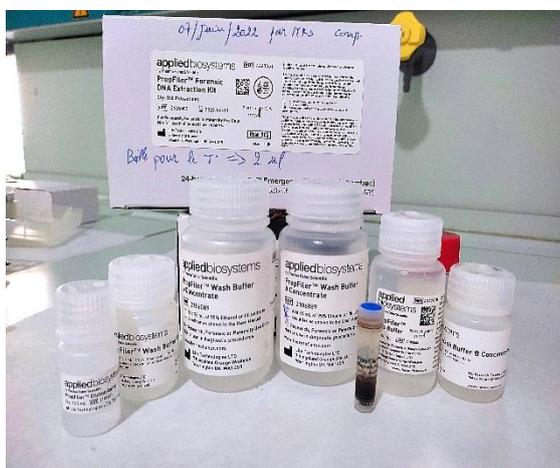


Résultat OBTI apres LYSAT

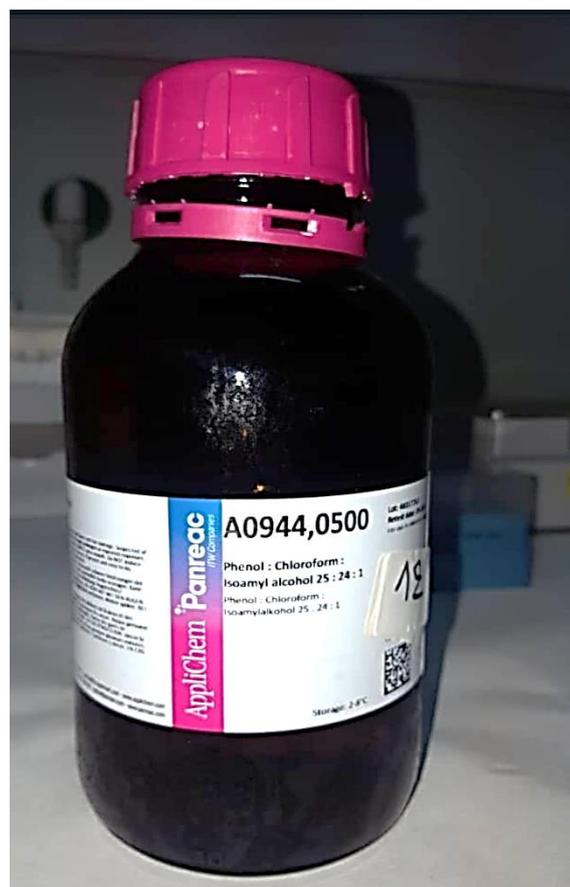
Kit d'extraction :



Kit d'extraction qiagen



Kit d'extraction prepfiler



Kit d'extraction PCI