



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

UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB – BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Biologie

OPTION : Génétique

Validation des techniques de confirmation de traces de sperme par le test PSA , observation microscopique et obtention d'un profil génétique d'un échantillon donneur de BLIDA

Présenté par :

Mlle : Zehar Khadidja

Mlle : Boukirat Lilia

Date de soutenance : .././2022

Devant le jury composé de :

Mr BENYAHIA.N	MAA	USDB1	Président
Mme CHERRALLAH.A	MCB	USDB1	Examinatrice
Mme GUESSAIBIA.N	MCA	USDB1	Promotrice
Mme MEDDOUR.K.S	Chargé d'expertise	LPS(DGSN)	Co-promotrice

Année universitaire : 2021/2022



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



UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB – BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Biologie

OPTION : Génétique

**Validation des techniques de confirmation de traces de sperme par le test
PSA , observation microscopique et obtention d'un profil génétique à
partir d'un échantillon de donneur de Blida .**

Présenté par :

Mlle : Zehar Khadidja

Mlle : Boukirat Lilia

Devant le jury composé de :

Mr BENYAHIA.N	MAA	USDB1	Président
Mme CHERRALLAH.A	MCB	USDB1	Examinatrice
Mme GUESSAIBIA.N	MCA	USDB1	Promotrice
Mme MEDDOUR.K.S	Chargée d'expertise	LPS(DGSN)	Co-promotrice

Année universitaire : 2021/2022

REMERCIEMENTS

Au terme de ce master, accompli au laboratoire de biologie légale ADN de la police scientifique et technique en collaboration avec l'université Blida 1, nous adressons nos sincères remerciements à :

Avant tout, Louange à DIEU le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la force et l'opportunité de mener à bien ce modeste travail.

*Ces considérations vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté des Sciences Biologiques, pour la richesse et la qualité de leur enseignement, nos remerciements les plus sincères à **Monsieur MOHAMED SAID R.**, Notre chef d'option. On remercie très sincèrement les membres du jury d'avoir accepté de faire partie de la commission d'examination*

***Mr BENYAHIA .N** pour avoir bien voulu nous faire l'honneur de présider ce jury
Mme CHERRALLAH .A, qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*Nous adressons nos sincères et vifs remerciements à notre promotrice **Mme Guessaibia.N** pour avoir dirigé ce mémoire et nous avoir permis de le réaliser dans les meilleures conditions, ses connaissances transmises, ses judicieux conseils, sa patience, ses encouragements, sa disponibilité nous ont été d'une aide inestimable.*

*Nous exprimons également notre gratitude à notre co-promotrice **Mme MEDDOUR. K.S**, d'avoir accepté de nous encadrer, sa disponibilité, son aide, ainsi que pour sa gentillesse et ses conseils, qui nous ont été précieux afin de mener à bien notre travail.*

*Nous tenons à remercier vivement Monsieur ZEKRI, chef de la SDPST, Monsieur BRAHTI, chef de service et Madame BELKHIRAT, chef de département d'identification génétique, de nous avoir accueillies ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire de biologie légale / ADN et en particulier **Mme CHALLAL S, Mme BENABDELLAH N, Mme ZEGROUR S, Mr DJEBBAR H et Mr BECHAR**. Pour leur aides, leurs attentions et leurs gentillesse tout au long du stage, et d'avoir mis à notre disposition tous les moyens afin de réaliser notre travail pratique dans une ambiance*

Dédicaces :

*Je dédie ce modeste travail a ceux qui mon données la vie est on fait ce que
je suis aujourd'hui mes chers parent*

*A ma lumière , mon idole celle qui a veiller a mes cotes depuis mon jeune
âge jusqu'à aujourd'hui ma mère, sache que tous les mots du monde ne
suffisent pas pour décrire a quel points je t'aime*

*Aux prunelles de mes yeux mes confidentes , **Hadjer et Marwa** ma vie
n'aurait aucun sens sans vous, vous avais fait de ma vie un paradis je
vous remercie d'avoir toujours étai la a mes cotés et de m'avoir soutenu ,
a tout nos moments passer ensemble je vous aiment énormément*

*A mes **beaux frères** , mes **neveux et nièces**.*

*A toute la famille **kherfi et Zehar** je vous aimez .*

*A ma très chers Binôme **Lilia** et toute la famille **Boukirat** , en témoignage
de l'amitié qui nous unis , les souvenirs et tout les moment que nous
avons passer ensemble .*

*A mes meilleurs amies :**Sarah , Linda , Ferial , Rania , Nafila** vous êtes le
meilleur cadeau que dieu ma donner.*

A 'Y ' merci pour ton soutien .

*A tout mes amies que j'ai rencontrer tout au long de mon parcours
universitaires je garderais de très beau souvenirs .*

Zehar Khadidja

Dédicaces

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

Je dédie ce modeste travail :

à mes très chers parents, tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Sans vos conseils, vos prières et vos bénédictions, ce travail n'aurait jamais pu être réalisé. Puisse ce travail vous donner une légitime fierté.

*A ma très chère sœur **SAMIRA** ,pour l'aide que tu m'as apporté, ton profond attachement et tes encouragements qui m'ont permis de réussir mes études . je t'aime énormément.*

*A mes oncles, Tantes, cousins ,cousines en particulier **KARIMA** et mon beau frère **Abdnour** ainsi qu'à toute la famille **BOUKIRAT** et **BAHOUT** .*

*A mon binôme **khadidja** ;En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments mémorables de joie que nous avons passés ensemble ;*

*A mes amies :**sarah,wiam,celine,kamilia , nafila**, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont apporté beaucoup de joie et de plaisir.je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

A tout mes amies que j'ai rencontrer tout au long de mon parcours universitaires je garderais de très beau souvenirs .

Boukirat Lilia .

Résumé :

L'introduction des tests d'ADN dans un contexte médico-légal, dans les années 80, a contribué de manière importante au bon déroulement de la justice criminelle, ces tests fournissent généralement des informations sur la présence des traces biologiques qui permettant d'identifier un individu par son ADN isolé à partir de différentes sources .

Chacun de ces liquides biologiques comporte un ou plusieurs tests de dépistage chimique et immunologique utilisés dans les laboratoires de la police scientifique et technique. Pour cela, tous les tests préliminaires, doivent être validés.

Notre étude a comme objectif de valider les méthodes de détection de sperme dans les cas d'agression sexuelle par le test spécifique de prostate ou PSA et la coloration d'érythrosine ammoniacle pour l'observation microscopique afin d'établir des profils génétiques exploitables.

Nous avons vérifié la fiabilité du kit seratac PSA et la coloration d'érythrosine par l'étude de trois critères importants de validation à savoir : la sensibilité reproductibilité et la répétabilité.

Nos résultats ont pu déterminer le seuil analytique de sensibilité ,reproductibilité et répétabilité par rapport à différents supports ,à savoir :le nylon ,l'écouvillon ,les couches ,les serviettes et le coton ;et de démontrer la présence de spermatozoïdes par la coloration d'érythrosine ammoniacale ,sur les différentes supports sus -cités .

Ces tests ont été vérifiés par l'obtention d'un profil génétique.

Mots clés : validation ,PSA,,coloration à l'érythrosine ammoniacle ,profil génétique ,sperme

Abstract :

The introduction of DNA testing in a forensic context in the 1980s was an important contribution to the smooth functioning of criminal justice, these tests generally provide information on the presence of biological traces that make it possible to identify an individual by his DNA isolated from different sources .

Each of these biological fluids contains one or more chemical and immunological screening tests used in the laboratories of the scientific and technical police. For this, all preliminary tests must be validated.

The objective of our study is to validate methods for detecting semen in sexual assault cases through the specific prostate test or PSA and the staining of erythrocytes for microscopic observation in order to establish exploitable genetic profiles.

We checked the reliability of the seratac PSA kit and the staining of erythrocytes by studying three important validation criteria: reproducibility sensitivity and repeatability.

Our results were able to determine the analytical threshold of sensitivity, reproducibility and repeatability in relation to different media, namely: nylon, swab, diapers, towels and cotton;and to demonstrate the presence of spermatozoa by the staining of ammonia erythrocytes, on the various media mentioned above.

These tests were validated by obtaining a genetic profile

Keywords: validation , prostate specific antigen, the genetic profiles,sperm, ammoniacl erythrocytes staining.

ملخص

لقد كان لادخال تحاليل الحمض النووي في مجال الطب الشرعي في الثمينات دور مهم في الاداء الجيد للعدالة الجنائية ،حيث تمنح هذه الاختبارات بشكل عام معلومات عن وجود اثار بيولوجية تمكن التعرف على الفرد من خلال حمضه النووي المعزول من مصادر مختلفة.

تحتوي كل من هذه العينات البيولوجية على اختبار او اكثر قد يكون كيميائي او مناعي يستخدم من طرف الشرطة العلمية و التقنية مما يضطر على التحقق من صحة جميع الاختبارات الأولية المستخدمة.

الهدف من دراستنا هو التحقق من صحة هذه الاختبارات و تحاليل الكشف عن السائل المنوي في حالات الاعتداءات الجنسية, بواسطة تحليل مستضد البروستات المحدد و تقنية الرصد المجهرى عن طريق صبغة اريثروسين من خلال دراسة بعض المعايير :التكرار و توافق استخراج نفس النتائج باستعمال نفس الطريقة من طرف عدة تقنيين

تمكنت نتائجا من تحديد الحد الاقصى فيما يتعلق بجميع الانسجة المدروسة باثبات وجود الحيوانات المنوية حيث تم بعدها التحقق من صحة هذه الاختبارات بواسطة الحصول على بصمة وراثية.

الكلمات المفتاحية السائل المنوي , صبغة اريثروسين, مستضد البروستات المحدد,بصمة وراثية

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADN mt : Acide Désoxyribonucléique mitochondrial

AE : Elution Buffer

AL : Lysis Buffer

ATE : Tissue Elution Buffer

ATL : Tissue Lysis Buffer

AW : Wash Buffer

C° : Degrés Celsius

CCD : Charge Coupled Device

CE : capillary electrophoresis

CODIS : Combined DNA Index System

DNTP : Désoxy nucléotide triphosphate

DTT : Dithiothréitol

FAM : 6- Carboxyfluorocein

ID+ : Identifilier plus

LIZ: Internal lane Size Standard

NAOH: Sodium Hydroxyde

Pb : Paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

POP4 : Performance Optimized Polymer 4

PSA : Prostate Spécific Antigen

QPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

RPM : Rotations par minute

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

STR : Short Tandem Repeat

SWGDM : Scientific Working Group on DNA Analysis Methods

Taq : *Thermus aquaticus*

VNTR : Variable Number of Tandem Repeat

Zn : Zinc

μL : micro litre

Liste des Figures :

Figure 1: Structure simplifiée de l'ADN mitochondrial (Angil Aggrawal 2014).....	3
Figure 2: Composition du génome humain (Jasinska, A.el al 2004)	4
Figure 3: Schéma explicatif d'un exemple de SNP : une paire de base GC est remplacée à un seul(Hashiyada,M 2011).....	5
Figure 4: Exemple de microsatellite (Sozer A.C., 2014).....	7
Figure 5: La composition du sperm humain(Alberts B et al ,2002).....	12
Figure 6: Observation microscopique d'échantillon du sperme utilisé (originale 2022).	20
Figure 7: Réaction anticorps –antigène du test PSA (guide du kit seratec PSA).....	22
Figure 8: Témoin positif et témoin négatif du test PSA (original 2022)	22
Figure 9: Microscope optique (original 2022).....	24
Figure 10:Représentation schématique de la technologie TaqMan (Stratagene Company 2007).....	27
Figure 11: Modèle graphique de la PCR en temps réel ou l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.....	28
Figure 12: Les fluorochromes du kit d'amplification (Coquoz, 2003).	33
Figure 13:Résultat du témoin positif et négatif du test PSA.....	35
Figure 14 (A,B,C,D) : Resultats du test PSA de la gamme des dilutions de sperme (original	39
Figure 15:(A,B,C,):Observation microscopique par la coloration d'erythrosine de la gamme de dilution de sperme humain GX100.....	43
Figure 16 (,D,E) :observation microscopique par la coloration d'erythrosine de la gamme de dilution de sperme humain(original 2022).....	43
Figure 17:Profil génétique du sperme (original 2022).....	44

Liste des Tableaux :

Tableau I: Liste des loci analysés sur l'ADN autosomal (Doutremepuich 2012).	8
Tableau II:Les différentes sources d'ADN.	11
Tableau III : La chronologie de la découverte de PSA (Rao et al 2007).	15
Tableau IV:Les dilutions de sperme.	20
Tableau V : les Cibles du kit quantifier DUO.	28
Tableau VI: Préparation de la gamme de standards.	29
Tableau VII : Réactifs du kit Quantifier DUO.	29
Tableau VIII:Calcul des réactifs de la RT-PCR.....	30
Tableau IX: Le plan de dépôt des échantillons dans la plaque de PCR.....	30
Tableau X: Préparation du mélange réactionnel de la PCR multiplexe	32
Tableau XI :Réactifs de post amplification.....	33
Tableau XII :Résultats de la sensibilité du test PSA	36
Tableau XIII:Résultats de la 1er répétabilité du test PSA.....	37
Tableau XIV:Résultats de la 2em répétabilité du test PSA	38
Tableau XV:Résultats de la sensibilité de la coloration d'erythrosine ammoniacle	40
Tableau XVI:Résultats de la 1er répétabilité de la coloration d'erythrosine ammoniacle	40
Tableau XVII:Résultats de la 2eme répétabilité de la coloration d'erythrosine ammoniacle ..	41

Sommaire :

Introduction :	1
Chapitre 1 : synthèse Bibliographique.	2
I Organisation de L'ADN	2
I.1 Composition du génome humain :	2
I.1.1 l'ADN génomique :	2
I.1.2 L'ADN mitochondrial :	2
II Les polymorphismes génétiques.....	3
II.1 polymorphisme de séquence :	4
II.1.1 polymorphisme d'un seul nucléotide :	4
II.2 Polymorphisme de longueur :	5
II.2.1 Polymorphisme restriction « RFLP» :	5
II.2.2 Les minisatellites (VNTR)	6
II.2.3 Les microsatellites (STR).....	6
II.2.3.1 Marqueurs haplotypiques :	7
II.2.3.2 Marqueurs du Chromosome Y :	8
III L'ADN en sciences médico-légales :	9
III.1 Historique de la génétique judiciaire :	9
III.2 Facteurs de dégradation de l'ADN.....	12
IV Traces de sperme :	12
IV.1 Les spermatozoïdes	13
IV.2 Le plasma séminal	13
V Prélèvement en cas d'agression sexuelle	13
V.1 Prélèvements sur la victime :	13
V.2 Prélèvements de comparaison:	13
V.3 Testes préliminaires pour la détection de sperme :	13
V.3.1 L'antigène prostatique spécifique – PSA	14
V.3.2 Chronologie de la découverte de la PSA	14
V.4 Examen microscopique(coloration par erythrosine ammoniacle)	15
VI Démarche d'obtention d'un profil génétique :	15
VI.1 Extraction d'ADN :	15
VI.2 Quantification de l'ADN :	16
VI.3 L'Amplification de l'ADN :	16
VI.4 Post-amplification :	17

VI.5	Electrophorèse capillaire :	17
VI.6	Validation de profil génétique :	17
VI.7	la validation de la méthode d'analyse :	18
VI.7.1	Les critères de la validation :	18
VI.7.1.1	La sensibilité :	18
VI.7.1.2	La répétabilité :	18
VI.7.1.3	La reproductibilité :	18
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes		19
I	I Matériel :	19
I.1	Matériel biologique :	19
I.2	Matériel non biologique : (l'annex 1).....	19
II	Méthodes :	19
II.1	Nettoyage et préparation de la surface de travail	19
II.2	Vérification de la qualité du sperme :	19
II.3	Préparation des échantillons pour la validation	20
II.3.1	Obtention des taches de sperme :	21
II.3.2	Tests préliminaires :	21
II.3.3	Préparation du test PSA :	21
II.3.3.1	Préparation du macérat :	21
II.3.3.2	Test de confirmation à la PSA :	21
II.3.3.3	Interpretation de test :	22
II.3.3.3.1	La sensibilité du test :	22
II.3.3.3.2	La répétabilité du test :	23
II.3.3.3.3	La reproductibilité du test :	23
II.3.3.4	Mode opératoire :	23
II.4	Examen microscopique par erythrosine ammoniacle :	23
II.4.1	Composition de l'erythrosine ammoniacle :	23
II.4.2	Préparation des lames colorées :	23
III	Extraction d'ADN avec le kit QIagen	25
IV	Quantification DUO de l'ADN	26
IV.1	Principe.....	27
IV.2	Mode opératoire	28
IV.2.1	Préparation de la gamme de standards :	28
IV.2.2	Préparation du réactif master mix :	29
IV.2.2.1	Composant du kit Quantifiler DUO.....	29
IV.2.3	Préparation de la plaque de 96 puits.....	30

V	Amplification par PCR multiplexe :.....	31
V.1	Mode opératoire	31
VI	Post amplification :.....	32
VII	Analyse des fragments :.....	34
VIII	Validation des données brutes :.....	34
Chapitre III : Résultats et discussion.....		36
I	Résultats et discussion :.....	35
I.1	Résultats des tests préliminaires :.....	35
I.1.1	Résultats de la validation d'examen immunologique (Recherche de la Prostat Serum Antigen) :.....	35
I.1.1.1	Résultats du test PSA de la gamme de dilution du sperme :	36
I.1.1.1.1	La sensibilité :.....	36
I.1.1.1.2	La répétabilité et la reproductibilité	37
I.1.1.1.3	Interprétation et discussion	38
I.1.2	Résultats de l'observation microscopique de la gamme de dilution :	40
I.1.2.1	La sensibilité.....	40
I.1.2.2	La répétabilité et la reproductibilité :	40
II	Obtention des profils génétiques de donneur :	44
Conclusion :.....		45

INTRODUCTION GENERALE

Introduction :

Les techniques de profilage de l'ADN médico-légal sont devenues un aspect de plus en plus important des enquêtes criminelles ces 3 dernières décennies, elle peuvent jouer un rôle crucial pour la résolution et l'analyse de nombreuses affaires judiciaires(**Ludes, 2021**) .

La criminalistique est généralement axée sur l'association d'une trace à sa source (**Acosta, 2002**),car le contact entre l'auteur et la victime, ou son environnement, ou les deux, laisse toujours des preuves qui sont transférées de l'auteur à la victime ou sur les lieux.

le matériel biologique trouvés sur la scène de crime peuvent être recueilli à partir de diverses sources (**sang ,sperme ,poiles ,ongles..**) , L'identification de ces liquides est considérée comme la forme la plus importante de preuve à l'état de trace dans l'analyse judiciaire.

(**Martinez et al, 2015**).

Près des deux tiers des cas faisant l'objet de tests d'ADN médico-légaux comportent des preuves d'agression sexuelle (**Zapata et al ,2017**) , La détection du sperme est l'éléments clé pour ces affaires. généralement l'analyse est difficile à résoudre en raison de la rareté ou de l'absence de spermatozoïdes dans les échantillons de preuves (**Soares-Vieira et al ,2007**) .

À ce jour, plusieurs méthodes et tests enzymatiques ou immunologiques ont été utilisées pour analyser des échantillons et confirmer la présence de fluides séminaux.

Le but de notre projet de fin d'étude au laboratoire de Police Scientifique et Technique, a consisté à valider et vérifier l'efficacité de test préliminaire l'Antigène Spécifique de Prostate ou PSA adapté au sperme humain et la méthode d'observation microscopique par la coloration d'érythrosine ammoniacle . Nous nous appuyons sur trois critères de validation la sensibilité, la reproductibilité et la répétabilité.

Chapitre 1 : synthèse Bibliographique

Chapitre 1 : synthèse Bibliographique.

I Organisation de L'ADN

Tout organisme vivant est constitué d'un assemblage de cellules, génétiquement identiques, dans lesquelles se trouve l'intégralité des informations relatives à son fonctionnement. Ces informations sont contenues dans un biopolymère : la molécule d'ADN.

L'ADN a été décrit pour la première fois par Watson et Crick en 1953, il s'agit d'une molécule double brin qui adopte un arrangement hélicoïdal. Le génome de chaque individu contient une grande quantité d'ADN qui est une cible potentielle pour le profilage. (**Watson J.D., Crick F.H.C ,1953**) .

Environ 5 % de notre ADN comportent les séquences codantes, elles permettant la synthèse des protéines, éléments de base constitutifs des cellules et des tissus . Le reste de notre ADN est composé de séquences nucléotidiques qui ne portent aucune information génétique ,ce sont des séquences non codantes. Ces séquences présentent un intérêt particulier en criminalistique car elles sont le siège de polymorphismes. (**Briant E,2010**) Il existe 2 types évolutifs distincts de l'ADN humain :l'ADN nucléaire ou génomique, qui est situé dans le noyau et l'ADN mitochondrial (Mt DNA),localisé dans les mitochondries.

I.1 Composition du génome humain :

I.1.1 l'ADN génomique :

Chez l'homme, la taille du génome nucléaire a été estimée à environ 3 .300.5551.249 paires de bases (**Lander et al. ,2001**) constituant plus de 99,7 % du contenu total de l'ADN cellulaire . celui-ci est organisé en petites structures appelée chromosomes, qui sont faits d'ADN et de protéines .ainsi chez l'homme, les cellules somatiques contiennent 23 paires de chromosomes (**Semikhodskii A ,2007**).

I.1.2 L'ADN mitochondrial :

Il est situé dans les mitochondries, dont le nombre varie entre 200 et 400 dans la plupart des cellules humaines. L'ADN mitochondrial est organisé en un seul petit chromosome circulaire (**Semikhodskii A, 2007**).

La structure de base de l'ADNmt consiste en une région codante, qui contient les séquences de 2 ARN ribosomiques, 22 ARN de transfert et 13 protéines, et une région non codante appelée région de contrôle, qui est de 969 pb de longueur.

La région de contrôle montre une variabilité entre les individus. elle est divisé en région hypervariable 1 ou HVR1 (16.000-16,569pb) et région hypervariable 2 ou HVR2 (1-400pb) .

la variabilité de la région de contrôle entre des individus non apparentés est d'environ 1 à 3 %. C'est la responsabilité de l'identification. (Aggrawal , 2014) .

Le génome mitochondrial présente plusieurs caractéristiques uniques, notamment le nombre de copies multiples par cellule, l'hérédité maternelle, le manque de recombinaison, les taux de mutation élevés et une résistance plus élevée à la digestion des nucléases que l'ADN nucléaire (Budowle *et al*, 2003) .

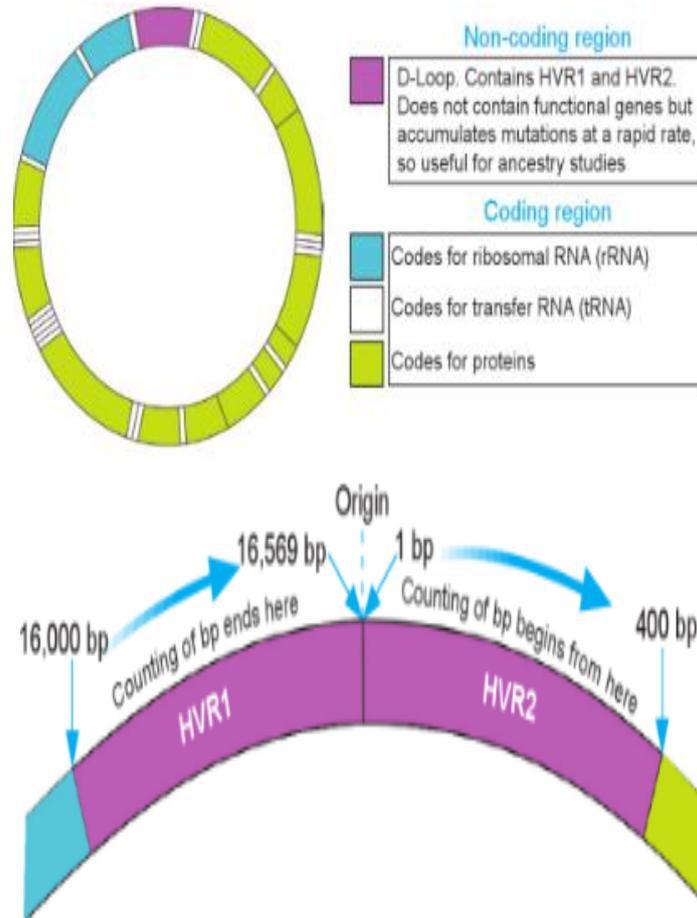


Figure 1: Structure simplifiée de l'ADN mitochondrial (Aggrawal A ; 2014)

II Les polymorphismes génétiques

Tous les individus de l'espèce humaine sont génétiquement très proches les uns des autres. Mais seulement 0,1% de l'ADN est unique à chaque individu, ce qui représente justement la séquence ciblée par l'enquêteur ; les 99,9% restants des séquences d'ADN humain sont identiques pour chaque personne.

Ce polymorphisme est la base des moyens d'identification par les empreintes génétiques, qui sont constituées par plusieurs marqueurs. Ce dernier est défini par plusieurs critères : sa transmission mendélienne ; son caractère stable au cours de la vie d'un individu ; son grand polymorphisme, c'est à dire, la présence d'un grand nombre d'allèles ; son fort taux d'hétérozygotie. (Mansuet-Lupo *et al* 2007).

Environ 50 % du génome est constitué de séquences qui sont répétées, soit les unes à la suite des autres, en tandem, soit de façon dispersée dans le génome.(Robert ,2010) .

Ces derniers sont les principales cibles des analyses ADN médico-légales. (K. Tamaki,*et al* 2005)

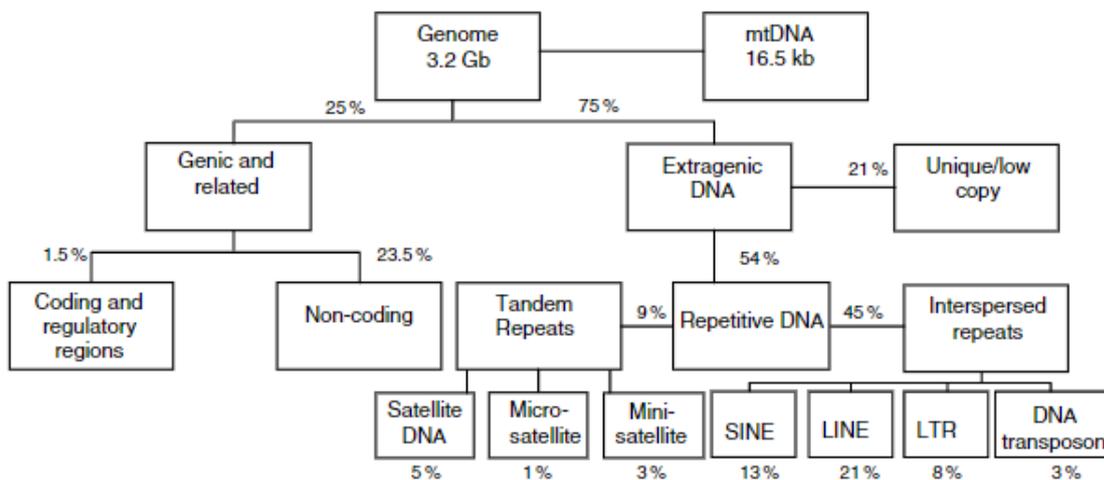


Figure 2: Composition du génome humain (Jasinska, A.*et al* 2004)

II.1 Polymorphisme de séquence :

II.1.1 Polymorphisme d'un seul nucléotide :

Une variation d'une seule séquence de base entre des individus à un point particulier du génome est souvent appelée polymorphisme nucléotidique unique ou SNP (Butler . M 2011) dont environ 1.4 million de polymorphismes ponctuels été identifiés dans le génome humain (Lander *et al*,2001).

Les SNP sont classés en fonction de la nature des nucléotides modifiés :

Les SNP non codants sont trouvés dans les régions 5' ou 3' non transcrites (NTR)et dans la régions 5' ou 3' non traduites (UTR) ou encore dans les introns ou dans les régions inter génique .

Les SNP codant s'aboutissant au changement d'un acide aminé sont des polymorphismes de substitution. la majorité des SNP sont bi-alléliques c'est-à-dire 2 allèles possible et 3 génotypes possible (**Butler M et al , 2007**) .

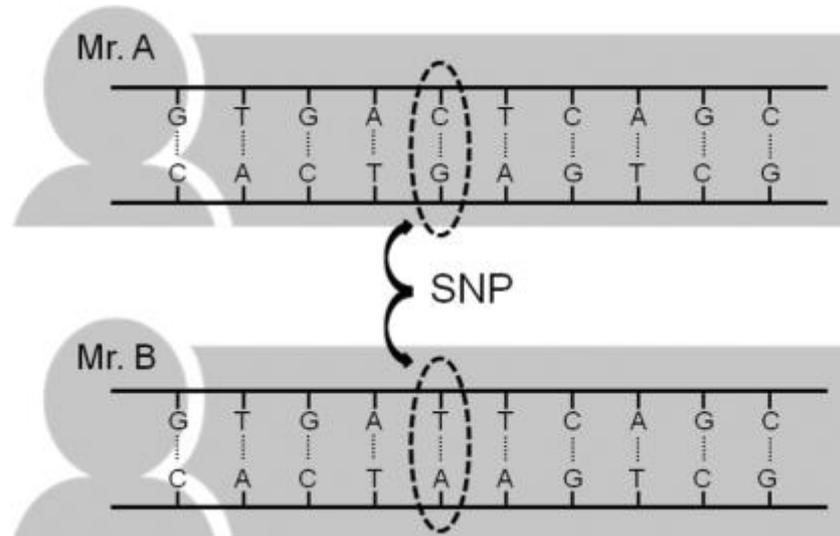


Figure 3: Schéma explicatif d'un exemple de SNP : une paire de base GC est remplacée à un seul (**Hashiyada,M 2011**)

II.2 Polymorphisme de longueur :

II.2.1 Polymorphisme restriction « RFLP » :

Au milieu et à la fin des années 1980, la technique connue sous le nom de Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) a été introduite à la science judiciaire et est devenue le premier essai utilisé pour l'analyse de l'ADN judiciaire (**Mozayani et al , 2011**)

Il s'agit d'une technique qui exploite les variations dans les séquences d'ADN homologues. Ce sont les différences dans les molécules d'ADN homologues qui peuvent être détectées par la présence de différents fragments de longueur après la digestion de l'ADN avec des enzymes de restriction spécifiques. Les échantillons d'ADN sont coupés en morceaux par enzyme(s) de restriction et les fragments résultants sont séparés selon leurs longueurs par électrophorèse sur gel d'agarose.

Les allèles des RFLP sont généralement déterminés par des méthodes basées sur la PCR, comme la PCR-RFLP. (**Grodzicker T et al, 1975**)

II.2.2 Les minisatellites (VNTR)

Ces minisatellites également appelés les VNTR (Répétition en tandem à nombre variable) ont été les premiers polymorphismes utilisés dans le profilage de l'ADN et ils ont été utilisés avec succès dans les affaires judiciaires pendant plusieurs années (Jeffreys *et al*, 1985). Ce sont de courts segments identiques d'ADN alignés tête à queue de façon répétitive. La longueur habituelle d'une unité de répétition de 6-100 nucléotides, est répétée jusqu'à plusieurs centaines de fois. (Semikhodskii A 2007) Ils sont intercalés dans le génome humain, mais souvent groupés près de la fin des chromosomes, et les plus longs sont généralement localisés dans les régions sous-téломériques des chromosomes (Debrauwère *et al.*, 2000).

Les VNTR ont été utilisés à l'origine comme marqueurs pour la cartographie génétique puisqu'ils sont très polymorphes en ce qui concerne le nombre de répétitions en tandem à un locus VNTR donné (Gelfand *et al.*, 2014).

Leur utilisation était limitée par le type d'échantillon qui pouvait être analysé avec succès parce qu'il fallait une grande quantité d'ADN de poids moléculaire élevé.

L'interprétation des profils VNTR pourrait également poser problème, c'est pourquoi leur utilisation en génétique judiciaire a maintenant été remplacée par de courtes répétitions en tandem (STR) (Goodwin *et al*, 2007).

II.2.3 Les microsatellites (STR)

Représente des séquences d'ADN répétées en tandem et sont également appelées répétitions de séquences simples ou répétitions courtes en tandem (STR). Ils consistent en une unité centrale de 1 à 6 bp générant des allèles variant en taille entre 50 et 300 pb qui sont répartis dans tout le génome, y compris les 22 chromosomes autosomiques et les chromosomes sexuels X et Y. (Goodwin *et al*, 2007). La plus part des loci STR se trouvent dans les régions non codantes, tandis que seulement 8 % sont situées dans les régions codantes (Ellegren, 2004).

Les STRs. sont divisés sur la base de la longueur des répétitions sous forme de mono-, di-, tri-, tetra-, penta et hexa nucléotides, en raison de leur nature polymorphe. (Butler, 2012)

Ces séquences sont devenues populaires en tant que marqueurs de répétition d'ADN parce qu'ils sont basés sur la PCR, donc ils peuvent être amplifiés avec succès à partir de mauvaises ou de faibles quantités d'ADN, ce qui en fait des marqueurs utiles pour les études impliquant l'ADN ancien (Wandeler *et al*, 2007).

Ils ont été utilisés pour une grande variété d'applications, y compris la cartographie du génome, la criminalistique, l'analyse de la filiation et la génétique des populations. **(Ellegren, 2000; Esselink et coll., 2004; Kalia et coll., 2011).**

Ces marqueurs présentent une variabilité élevée dans une population, puisque leur taille varie d'un individu à l'autre, ce qui donne lieu à un degré élevé d'association de la preuve pour un suspect **(Butler .M, 2012)**

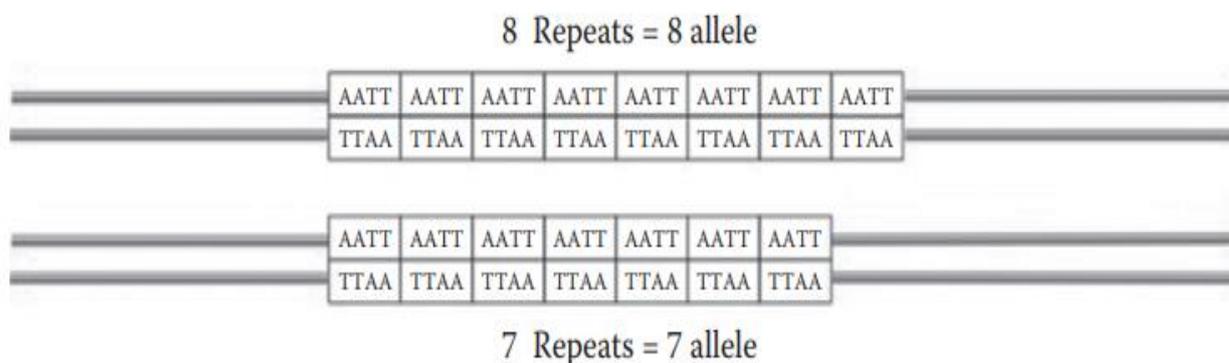


Figure 4: Exemple de microsatellite **(Sozer A.C., 2014).**

II.2.3.1 Marqueurs haplotypiques :

L'analyse de l'ADN autosomal est basée sur l'étude de plusieurs loci (15) (Tableau I). Elle permet

D'établir un Génotype unique à chaque personne. **(Doutremepuich, 2012).**

Les marqueurs autosomaux subissent un brassage génétique à chaque génération puisqu'ils sont transmis de manière biparentale. Il existe d'autres marqueurs qui sont uniparentaux mais ils sont moins informatifs pour l'identification individuelle, car ils sont transmis d'une génération à l'autre sans changement sauf dans le cas de mutations. **(Petkovski, 2006).**

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

Locus	Chr	Position	Taille des fragments	Motif répété	Echelle allélique
D8S1179	8	8q	de 128 à 168 pb	(TCTR)n	entre 8 et 19
D21S11	21	21q11-q21	de 189 à 243 pb	(TCTA)n	entre 24.2 et 38
D7S820	7	7q11.21-q22	de 215 à 247 pb	(AGAT)n	entre 6 et 15
CSF1PO	5	q33.3-34 située dans le gène du récepteur cfms proto — oncogène pour le CSF1.	de 295 à 327 pb	(AGAT)n	entre 7 et 15
D3S1358	3	3p	de 114 et 142 pb	(TCTA)n	entre 9 et 19
TH01	11	11p15.5 située dans l'intron 1 du gène de la tyrosine hydrolase	de 154 pb à 178 pb	(TCAT)n	entre 5 et 11
D13S317	13	13q22-q31	de 165 à 197 pb	(AGAT)n	entre 5 et 15
D16S539	16	16q24-qter	de 264 à 304 pb	(AGAT)n	entre 5 et 15
D2S1338	2	2q35-37.1	de 289 à 341 pb	(TGCC)n	entre 15 et 28
D19S433	19	19q12-13.1	de 106 à 140 pb	(AAGG)n	entre 9 et 18.2
vWA	12	12p12 pter située dans l'intron 40 du gène humain VWA	de 135 à 167 pb	(TCTR)n	entre 11 et 22
TPOX	2	2p13 située dans le gène de la thyroïde-péroxidase	de 232 à 248pb	(AATG)n	entre 8 et 12
D18S51	18	18q21.3	de 273 à 341 pb	(AGAA)n	entre 9 et 26
D5S818	5	5q21-31	de 135 à 171 pb	(AGAT)n	entre 7 et 16
FGA	4	4q28	de 219 à 267 pb	(TTTC)n	entre 16.2 et 30

II.2.3.2 Marqueurs du Chromosome Y :

le chromosome Y humain est le deuxième plus petit chromosome humain avec une longueur d'environ 60 millions de nucléotides (**Butler , 2009**) ce dernier est héréditaire et

uniparental, ce qui signifie qu'il est transmis de père en fils. il est constitué en majorité de séquences d'ADN qui lui sont spécifiques. de ce fait et contrairement aux autosomes, il ne se recombine pas au cours de division à l'exception de ces deux régions pseudo autosomiques (PAR1 ET PAR 2) situées aux deux extrémités des bras qui s'apparient et peuvent se recombiner avec la région chromosomique homologue X pendant la méiose mâle (**Jobling, et al 2003**).

le chromosome Y est par conséquent transmis sans modification d'une génération à la suivante, les seules modifications observées correspondent à des mutations qui surviennent au cours de l'évolution. ;

L'analyse de marqueurs STR du chromosome Y permet de retracer des lignées paternelles sur des dizaines de générations puisqu'un individu de sexe masculin aura le même chromosome Y (**Kayser et al., 2001**)

Ainsi l'analyse est capable de simplifier l'interprétation dans les cas où il y a un mélange d'ADN masculin et féminin en se concentrant sur la partie masculine de l'ADN seulement (**Mozayani, A et al 2011**)

III L'ADN en sciences médico-légales :

III.1 Historique de la génétique judiciaire :

Les principales dates ayant marqué le développement de l'analyse ADN dans le domaine médico légal sont les suivantes :

- En 1900, Karl Landsteiner distingue les principaux groupes sanguins et observe que les individus peuvent être placés dans différents groupes en fonction de leur groupe sanguin. Il s'agissait de la première étape du développement de l'hématologie médico-légale.
- 1915 : Leone Lattes décrit l'utilisation du génotypage ABO pour résoudre le cas de paternité.
- 1931 : On a mis au point une technique d'absorption-inhibition du génotypage ABO. Par la suite, divers marqueurs de groupes sanguins et marqueurs solubles de protéines sériques ont été caractérisés. (**Goodwin et al ,2011**)
- Dans les années 1960 et 1970, l'évolution de la biologie moléculaire, la restriction des enzymes, le transfert sud (**southern EM 1975**) et le séquençage Sanger ont permis aux chercheurs d'examiner les séquences d'ADN. (**sanger f et al 1977**)
- 1978 : Détection de polymorphismes d'ADN à l'aide du transfert Southern. (**kan YW 1978**)

- 1980 : Premier locus polymorphe signalé. (**wyaman AR et al 1980**)
- 1983 : Un développement critique dans l’histoire de la génétique judiciaire est venu avec l’avènement du processus de PCR qui peut amplifier des régions spécifiques de l’ADN, qui a été conceptualisé par Kary Mullis, un chimiste; plus tard, il a reçu le prix Nobel en 1993 . (**saiki RK et al 1985**)
- 1984 : Alec Jeffrey introduit l’empreinte ADN dans le domaine de la génétique médico-légale, et prouve que certaines régions de l’ADN ont des séquences répétitives, qui varient selon les individus. En raison de cette découverte, la première affaire judiciaire a été résolue à l’aide d’une analyse ADN. (**Gill P et al 1985**) .

L’ADN d’une personne peut être transféré par contact sur des objets ou sur des personnes. Cet ADN provient des cellules issues de différentes matrices (**Doutremepuich .C 2012**)

Tableau II: Les différentes sources d'ADN. (original 2022)

La trace	La source d'AND	Auteur
Le sang	Toute trace de sang visible à l'œil nu peut être analysée par amplification d'ADN présent dans les globules blancs du sang .	(Coquoz et Taroni ,2006)
Le sperme	L'extraction de l'ADN des spermatozoïdes est compliquée à cause de la structure de ces derniers puisque l'ADN se trouve seulement dans la tête du spermatozoïde.	(Gill, Pet al,1985)
La salive	La salive est une sécrétion complexe aux multiples fonctions qui, bien que constituée essentiellement d'eau, contient également un grand nombre d'éléments minéraux et organiques. - Ce liquide contient aussi des cellules buccales qui constituent une source d'ADN qui va permettre d'établir de manière simple et non invasive une empreinte génétique ,et ainsi apporter une aide considérable à l'identification des individus.	(J Righetti 2002)
Les élément pileux	-le taux de succès d'analyse de l'ADN d'éléments pileux est liée à la qualité des racines. L'ADN retrouvé dans les cheveux provient de leurs racines.	(Coquoz et Taroni,2006)
	-Les poils naturellement relâchés ont tendance à avoir très peu de follicule attaché et ne sont pas une bonne source d'ADN, tandis que les poils arrachés ou les poils enlevés en raison d'une action physique ont souvent la racine attachée, qui est une riche source de matériel cellulaire.	Goodwin et al (2007)
Les dents	-La source principale d'ADN des échantillons d'origine dentaire se trouve protégée par l'émail, la dentine et le cément,son ADN permet l'analyse des échantillons provenant de populations historiques .	(Sweet DJ et Sweet CHW 1995)
L'Urine	Ce liquide contient toutes les substances dont le corps se débarrasse .	Coquoz and taroni 2006
	Bien que le typage de l'ADN par l'urine soit rare, il peut être possible si l'échantillon est très concentré.	In Singh ,J et al 2021

III.2 Facteurs de dégradation de l'ADN

De nombreux échantillons prélevés sur une scène de crime peuvent avoir été exposés à l'environnement pendant des heures, des jours ou même plus longtemps. Les facteurs environnementaux (l'humidité, la chaleur et la lumière) peuvent conduire à la dégradation de molécule d'ADN, ce qui va compliquer l'analyse du profil génétique par la suite.

IV Traces de sperme :

La trace est définie comme étant une marque, un signal ou un objet qui est un signe apparent (pas toujours visible à l'œil nu) et qui est le vestige d'une présence d'une action (Margot,2014).

Le sperme est l'une des traces trouvées dans les scènes de crime, c'est une trace typique des délits sexuels ; son analyse peut fournir des renseignements cruciaux pour les enquêtes. Il peut être prélevé sur la victime ou sur ses vêtements (N KUMAR , et U SINGH 2018) .

Il s'agit d'un fluide de composition complexe produit par les organes sexuels masculins. Il comprend une partie cellulaire, les spermatozoïdes et une partie liquide, le plasma séminal. (wiliam J et al 2006)

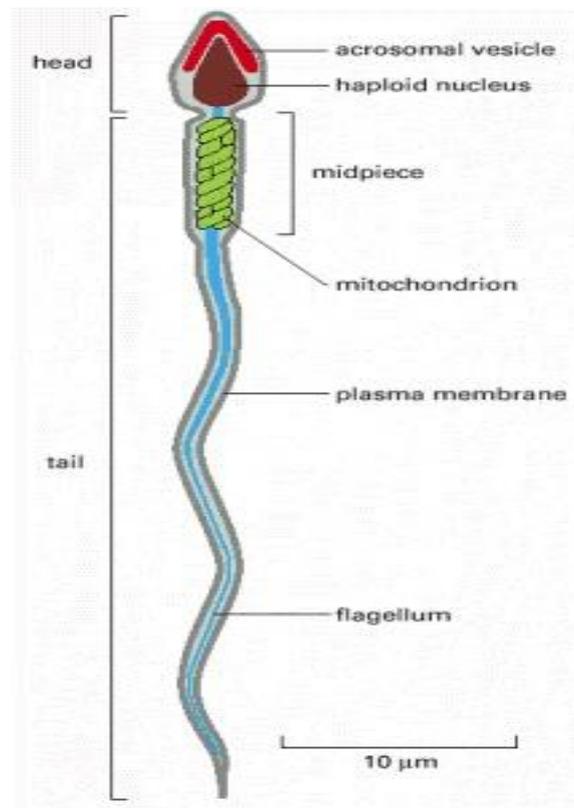


Figure 5: La composition du sperme humain (Alberts B et al ,2002).

IV.1 les spermatozoïdes

Ce sont les cellules reproductrices mâles ; chacune consistant en une tête, une queue et un milieu.

Chez l'homme, la tête est un disque minuscule d'environ 4,5 µm de long et 2,5 µm de large ,la queue est d'environ 40 µm de long (Tilstone, W *et al* 2003) .

IV.2 Le plasma séminal

Le plasma séminal, est un mélange de sécrétions dérivées des organes reproducteurs accessoires mâles : les vésicules séminales, la prostate, les glandes bulbo-urinaires ,urétrales ... (knight B *et al* 1996). Il contient également des enzymes comme la phosphatase acide prostatique et l'antigène prostatique spécifique (LYNCH *et al.* 1994) .

V .Prélèvement en cas d'agression sexuelle

V.1 Prélèvements sur la victime :

La réalisation d'une analyse génétique à partir du prélèvement vaginal peut être effectuée par 3 types d'exploration biologiques sur le liquide prélevé

- ✓ un examen recherchant des protéines spécifiques du liquide séminal par méthode biochimique ou immunologique.
- ✓ un examen cytologique recherchant des spermatozoïdes de l'agresseur ;
- ✓ un examen de biologie moléculaire, permettant d'établir un profil moléculaire de l'agresseur (Allery *et al* ,1998).

V.2 Prélèvements de comparaison:

Afin d'identifier les échantillons prélevés sur les lieux du crime, des échantillons de référence doivent être prélevés à des fins de comparaison. Traditionnellement, des échantillons de sang ont été prélevés et ceux-ci fournissent un approvisionnement abondant d'ADN; Les tampons buccaux qui sont frottés sur la surface interne de la joue aussi ont remplacé les échantillons de sang dans de nombreux scénarios. Les échantillons de référence sont fournis par un suspect et, dans certains cas, par une victime. (Goodwin *et al* ;2007).

A la fin de l'analyse d'ADN, les experts en criminalistique font une comparaison des profils d'ADN obtenus a partir des échantillon prélevés en scène de crime avec les profils d'ADN de référence (Brown *et Davenport*, 2015).

V.3 Testes préliminaires pour la détection de sperme :

De nombreuses techniques ont été mises au point pour déterminer le type de matériel biologique présent sur les lieux d'un crime ou sur des éléments liés à une enquête criminelle,

(**Allan J et Scott B 2016**) .Chacun de ces matériels biologiques comporte un ou plusieurs tests de dépistage qui sont de nature présomptive, et certains d'entre eux sont des tests de confirmation qui permettront d'identifier de façon concluante leur présence. (**John Wiley et al 2007**) .

En règle générale, un test présomptif est très sensible mais pas spécifique, tandis qu'un test de confirmation est moins sensible mais plus spécifique pour la tache qu'il est conçu pour détecter.

V.3.1 L'antigène prostatique spécifique – PSA

L'antigène spécifique de la prostate où la p30 est une glycoprotéine produite dans la glande prostatique et sécrétée dans le liquide séminal. C'est l'une des principales protéines, qui sert à liquéfier le liquide séminal. (**Schmidt S,et al 2001**) .

La p30 peut également être détectée dans d'autres liquides corporels mâles ou femelles, bien que les concentrations soient généralement beaucoup plus faibles que dans le liquide séminal, Ces valeurs élevées font de la PSA un marqueur intéressant dans le travail médico-légal, permettant la détection de faible quantité de liquide séminal (**Haimovici Fet al 1995**) .

La détection de l'antigène p30 confirme la présence de sperme même dans les échantillons qui impliquent des individus vasectomisés ou azoospermiques. (**Hochmeister et al 1997**) .

V.3.2 chronologie de la découverte de la PSA

- ❖ En 1960, Flocks a été le premier à travailler sur des antigènes de la prostate et 10 ans plus tard, En 1971, Hara a caractérisé une protéine unique dans le liquide de sperme, la gamma-seminoprotéine.
- ❖ Li et Beling, en 1973, ont isolé une protéine, E1, du sperme humain dans une tentative de trouver une nouvelle méthode pour atteindre le contrôle de la fertilité.
- ❖ En 1978, Sensabaugh a identifié la protéine p30 spécifique au sperme, mais a prouvé qu'elle était similaire à la protéine E1, et dont la prostate était la source.
- ❖ En 1979, Wang a purifié un antigène spécifique de la prostate ('prostate antigène'). Le PSA a été mesuré quantitativement dans le sang par Papsidero .
- ❖ En 1980, et Stamey a effectué les premiers travaux sur l'utilisation clinique du PSA comme marqueur du cancer de la prostate. (**Rao et al ;2007**)

Le travail initial sur la PSA dans le sperme a consisté à évaluer ses propriétés en tant que marqueur médico-légal pour les victimes de viol, mais bientôt son potentiel en tant que marqueur pour le cancer de la prostate est devenu évident.

Tableau III: La chronologie de la découverte de PSA (**Rao et al ;2007**).

L'année	Personne	Découverte
1960	Rubin H Flocks	Antigènes prostatiques spécifiques aux espèces
1964	Mitsuwo Hara	Antigène unique dans le sperme
1970	Richard J Ablin	Antigène prostatique spécifique
1971	Mitsuwo Hara	γ -séminou protéine
1973	Tien Shun Li Carl G Beling	Purification de l'antigène E1
1978	George Sensabaugh	p30
1979	Ming C Wang	Antigène prostatique provenant du tissu prostatique
1980	Lawrence C Papsidero	Antigène prostatique spécifique du sang

V.4 Examen microscopique (coloration par érythrosine ammoniacle)

Le test définitif de la présence de sperme humain consiste principalement en un examen microscopique et l'observation de spermatozoïdes. la morphologie du spermatozoïde est unique par rapport aux autres cellules du corps, et grâce à la formation, un enquêteur peut facilement faire la différence entre le sperme humain et les autres types de cellule. (**In Jamieson A et al ,2016**).

Les spermatozoïdes peuvent être facilement identifiés par leur forme distinctive lorsqu'ils sont examinés à l'aide d'un microscope photonique à haute puissance. (**Butler ,M 2011**) ce qui donne une idée sur la quantité des spermatozoïdes présents et donc des chance de succès de l'analyse d'ADN ultérieure et l'obtention de profils génétiques .

VI Démarche d'obtention d'un profil génétique :

VI.1 Extraction d'ADN :

L'extraction de l'ADN a deux objectifs principaux : premièrement, être très efficace et extraire suffisamment d'ADN d'un échantillon pour effectuer le profilage de l'ADN (ce qui est de plus en plus important lorsque la taille de l'échantillon diminue) , et deuxièmement, extraire de l'ADN suffisamment pur pour une analyse séquentielle , le niveau de difficulté ici dépend beaucoup de la nature de l'échantillon. Une fois que l'ADN a été extrait, il est important de quantifier l'ADN avec précision pour une analyse ultérieure.

Il existe de nombreuses méthodes pour extraire l'ADN. Le choix de la méthode dépend d'un certain nombre de facteurs, y compris le type et la quantité de l'échantillon ou la rapidité) les plus souvent utilisés sont l'extraction organique phénol chloroforme, l'extraction Chelex® 100 et l'extraction différentiel (**Butler M 2009**) .

L'extraction se fait via des traitements chimiques des échantillons, ce qui conduit à la lyse des cellules et la solubilisation de l'ADN (**pham-Hoai et al ,2017**) .

VI.2 Quantification de l'ADN :

Toutes les techniques d'analyse d'ADN actuellement utilisées dans la plupart des laboratoires judiciaires (l'analyse des STR, le séquençage de l'ADN mitochondrial..) exigent tous une quantité très précise d'ADN pour le traitement. Une fois que les échantillons de preuve et de comparaison ont été extraits, la quantité d'ADN dans chaque échantillon doit être mesurée au moyen d'un processus appelé « quantification de l'ADN » .

La technique la plus populaire disponible pour la quantification de l'ADN implique un processus connu sous le nom de réaction de chaîne de polymérase en temps réel (PCR) (**A Mozayani et al ,2011**) . L'ajout de la bonne quantité d'ADN à une PCR produira les meilleurs résultats en peu de temps. L'ajout d'une trop grande quantité d'ADN ou l'ajout d'une quantité insuffisante d'ADN entraînera un profil difficile, voire impossible à interpréter (**Nicklas et al ,2003**)

VI.3 L'Amplification de l'ADN :

La PCR en temps réel est basée sur la méthode révolutionnaire de la PCR, développée par Kary Mullis dans les années 1980, qui permet aux chercheurs d'amplifier des morceaux spécifiques d'ADN plus d'un milliard de fois. Les stratégies fondées sur la PCR ont fait progresser la biologie moléculaire en permettant aux chercheurs à manipuler l'ADN plus facilement .

Les différentes méthodes de PCR en temps réel développées vont des réactions monoplexes pour la quantification de l'ADN humain ou mitochondrial aux systèmes multiplexes qui permettent d'analyser jusqu'à quatre cibles pour la quantification de l'ADN humain, de l'ADN masculin humain, de l'ADN mitochondrial, détection des inhibiteurs de la PCR ou détermination de l'étendue de la dégradation de l'ADN (**Barbisin M et J G Shewale 2010**) .

VI.4 Post-amplification :

L'ADN doit être sous forme simple brin avant de faire passer les amplicons de l'échantillon sur le séquenceur, alors les produit d'amplification issus de la PCR vont subir l'étape de dénaturation, cette étape est effectuée grâce à un agent intercalant le formamide et la chaleur, suivie par un choc thermique pour assurer et prolonger la dénaturation de l'ADN (**Poitras et Houde, 2002**).

VI.5 Electrophorèse capillaire :

Pour établir un profil génétique Il faut déterminer la taille des fragments d'ADN amplifiés qui sont marqués par les fluorophores , par une technique de séparation appelé électrophorèse capillaire . cette séparation repose essentiellement sur la mobilité électrophorétique, les constantes d'ionisations ,le coefficient de partage entre les phases et la tailles des molécules . (**Labat L et al ,2000**) .

Elle consiste à faire migrer l'ADN sous l'effet d'un courant électrique dans de fins capillaires.Ces derniers sont remplis d'un polymère et sont immergés dans une solution tampon à leurs deux extrémités (**Briant E,2010**) .

Les résultats sont représentés par des pics de fluorescence dont la position sur l'axe des abscisses correspond à la taille du fragment amplifié, constitué du STR et des régions flanquantes (**Laurent et al ,2017**).

VI.6 Validation de profil génétique :

La dernière étape est l'interprétation des différents profils obtenus par un expert et les comparer à une base de données (**laurent et al ,2017**) .

Plusieurs types de profils peuvent être obtenus (**pham-hoai et al ,2017**) :

- ✓ Les profils simples.
- ✓ Les mélanges exploitables.
- ✓ Les mélanges non exploitables.
- ✓ Les profils partiels.

La base de données permet de déceler les concordances suivantes :

- nouveau profil de scène de crime et profil d'une personne déjà enregistré dans la base de données.
- profil d'une nouvelle personne et profil déjà enregistré pour une scène de crime.
- nouveau profil de scène de crime et profil déjà enregistré pour une scène de crime.

- profil d'une nouvelle personne et profil identique enregistré dans la base de données.

par exemple, lorsque ce profil a déjà été soumis sous un nom identique ou différent (Alleyne L *et al* 2009).

VI.7 La validation de la méthode d'analyse :

La validation, est une partie essentielle des opérations du laboratoire de sciences judiciaires. le principal objectif de la validation de la méthode est de démontrer que la procédure est adaptée à son utilisation prévue (William J. *et al* 2006).

La validation c'est le processus par lequel la communauté scientifique acquiert l'information nécessaire pour :

- a) Évaluer la capacité d'une procédure à obtenir des résultats fiables.
- b) déterminer les conditions dans lesquelles ces résultats peuvent être obtenus.
- c) Définir les limites de la procédure.

Le processus de validation identifie les aspects d'une procédure qui sont critiques et doivent être soigneusement contrôlés et surveillés (SWGDM,2004).

VI.7.1 Les critères de la validation :

La validation va dépendre des critères spécifiques qui sont :

VI.7.1.1 La sensibilité :

Consiste à documenter la quantité la plus faible de l'échantillon par laquelle le test générera un résultat. En termes de typage ADN . il est possible de procéder à la dilution en série d'une quantité connue de matière première et d'enregistrer la concentration à laquelle l'ADN peut être détecté et au-dessous de laquelle aucun résultat ne devrait être attendu. (Linacre 2009)

VI.7.1.2 La répétabilité :

Fournit des données sur la capacité d'un ensemble d'échantillons à produire des résultats similaires de manière cohérente dans des conditions apparemment identiques (en utilisant le même personnel ,le même laboratoire et le même matériel) (allan J *et* Bader,2016)

VI.7.1.3 La reproductibilité :

L'essai de reproductibilité consiste à la variation des mesures moyennes obtenues lorsque deux personnes ou plus mesurent les mêmes parties ou éléments en utilisant la même technique de mesure.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire central de la police scientifique et technique de la sûreté nationale à Alger Benaknoun ,pour un stage qui a duré 3 mois : de Mars à Juin 2022.

L'objectif de ce travail était d'évaluer et de vérifier la performance des techniques de détection et d'obtention de traces de sperme par le test antigène spécifique de la prostate ou PSA et l'observation microscopique par la coloration d'érythrosine ammoniacale lors d'une agression sexuelle et confirmation par un profil génétique .

I I Matériel :

I.1 Matériel biologique :

Pour la réalisation de cette étude, nous avons effectué l'analyse sur un échantillon de sperme provenant d'un seul donneur .La vérification de la présence des spermatozoïdes dans le sperme a été faite avant l'utilisation de celui-ci dans le reste des manipulations.

I.2 Matériel non biologique : (l'annex 1)

II Méthodes :

Plusieurs étapes ont été suivies pour mettre en évidence les traces de sperme et l'obtention d'un profile génétique, ces derniers sont représentées comme suit :

II.1 Nettoyage et préparation de la surface de travail

Il s'agit d'une étape préparatoire obligatoire elle consiste en :

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

II.2 Vérification de la qualité du sperme :

Le sperme obtenu à partir d'un laboratoire médical, sous anonymat à été d'abord vérifié pour la présence de spermatozoïdes.

La recherche des spermatozoïdes à été faite par une observation microscopique après la coloration d'érythrosine .

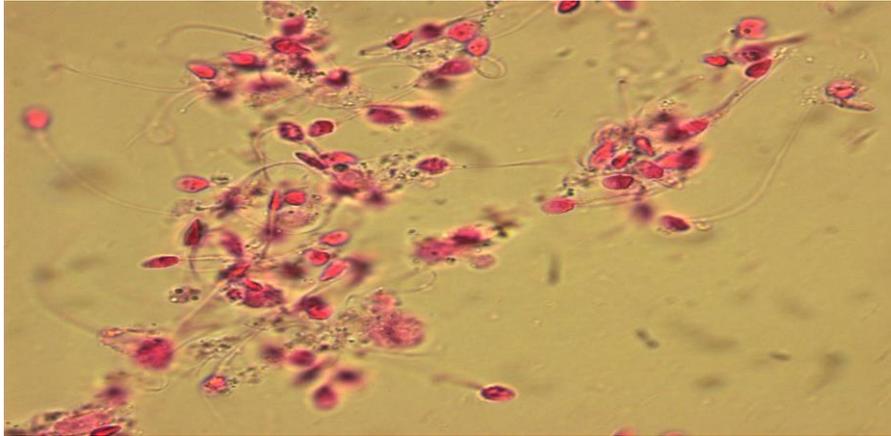


Figure 6: Observation microscopique d'échantillon du sperme utilisé (originale 2022).

II.3 Préparation des échantillons pour la validation

Afin d'évaluer la performance du kit PSA et la technique d'observation microscopique *ça* nécessite une validation, ou le processus d'établissement de la fiabilité de ces techniques. Dans cette étude les critères de validation retenus sont la sensibilité, la répétabilité, et la reproductibilité .

Des dilutions en série de sperme ont été effectuées à l'aide d'eau distillée (dH₂O) jusqu'à une concentration de 1:200000. Les rapports de dilution testés étaient de 1:10, 1:100, 1:500, 1:10,000 et 1:20000.

Tableau IV : Les dilutions de sperme

Facteur de dilution	Dilution
1 /10	100µl de sperme pur + 900 µl H ₂ O
1 /100	10µl de sperme pur +990 µl H ₂ O x 5 50 µl de sperme pur + 4950 µl H ₂ O
1 /500	1µl de sperme pur + 499 µl H ₂ O x2 2µl de sperme + 998 H ₂ O
1 /10000	1µl de sperme pur +999 µl H ₂ O
1 /20000	1µl de sperme pur +9999 µl H ₂ O

II.3.1 Obtention des taches de sperme :

Prélèvement de 10 µl de chaque dilution de sperme à partir du surnageant, qui ont été appliqués sur différents supports : écouvillon, coton, nylon, couche et serviette. chaque échantillon a été répété 3 fois, avec un témoin positif et négatif.

Le sperme (10µl) a été réparti sur chaque support dans 3 endroits différents pour obtenir 3 taches ; ensuite les morceaux sont séchés sous une hotte, afin d'éviter la contamination.

II.3.2 Tests préliminaires :

Les tests PSA et observation microscopique se font sur un macérât obtenu à partir des taches de sperme.

II.3.3 Préparation du test PSA :

II.3.3.1 Préparation du macérât :

-Les taches effectuées sur les supports sont découpées (1cm² du tissu) ensuite placées dans des tubes eppendorfs auxquels sont ajoutés 250µl l'eau ultra pure à l'aide d'une micropipette.

-La macération se fait pendant 2 heures pour récupérer un maximum de spermatozoïdes à une température ambiante.

-Le macérât est ensuite transféré dans des microtubes contenant des spins basket après centrifugation (1000 rpm pendant 5min)

-Le surnageant sera utilisé pour le test d'orientation Seratec PSA semiquant, et le culot sera utilisé pour l'examen de conformation microscopique.

II.3.3.2 Test de confirmation à la PSA :

La protéine p30 est présente dans les fluides séminales avec une concentration de 0,5-3.0 mg/ml (Yokota *et al* 2001), elle est détectée par le test sur membrane de PSA « PSA Membrane test assays ».

Le test est basé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-PSA conjugués à un colorant et pouvant se fixer à la PSA humaine.

le complexes antigène –anticorps obtenu migre à travers le dispositif absorbant vers la zone de réaction. Un anticorps monoclonal anti PSA humain est fixé à la membrane dans la zone de réaction. Cet anticorps immobilisé capture le complexe résultant en un complexe anticorps-antigène-anticorps.

Si la PSA humaine est présente, le complex antigène -anticorps avec les particules colorées entraînent la formation d'une ligne.

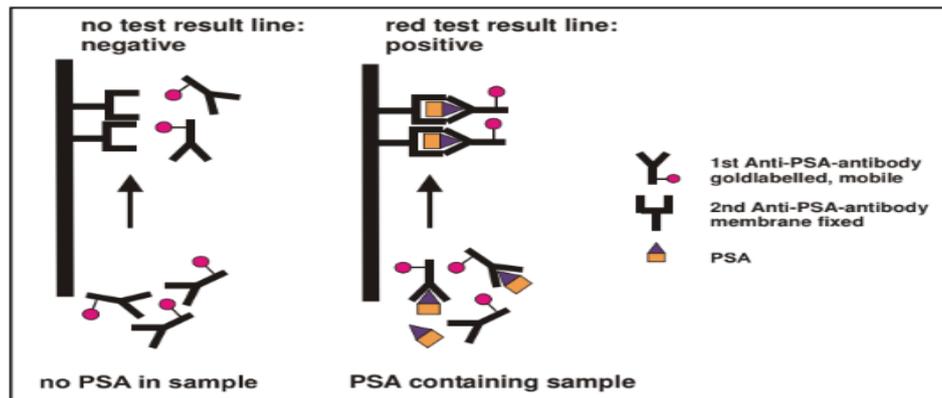


Figure 7: Réaction anticorps –antigène du test PSA (guide du kit seratec PSA).

II.3.3.3 Interprétation de test :

-La Ligne de contrôle (C) : sert de contrôle interne du fonctionnement et de la bonne exécution du test, elle doit toujours apparaître car elle est formée indépendamment de la présence de PSA dans l'échantillon.

-La Ligne interne standard : L'intensité de couleur de la ligne correspond a une concentration en PSA >4 ng/ml .

- La ligne de résultat du test (T) : uniquement visible sur les échantillons positifs a PSA : et dépend de la concentration en PSA de l'échantillon.



Figure 8: Témoin positif et témoin négatif du test PSA (original 2022) .

II.3.3.3.1 La sensibilité du test :

La sensibilité du test PSA Seratec a été étudié en fonction de différents dilution de sperme effectué ,s'étend de l'échantillon dilué au 1/10 à celui dilué au 1/20000 et aussi par rapport au différents supports (coton ,nylon, couche ,serviette et écouvillons), ce qui permet d'indiquer et d'identifier le plus haut degré de dilution de sperme pour obtenir un résultat positif c'est-à-dire un profil génétique exploitable.

II.3.3.3.2 La répétabilité du test :

L'étude de répétabilité de notre technique a été testée en analysant un échantillon en plusieurs réplicats,

Les analyses ont été effectuées par le même opérateur, dans le même laboratoire, utilisant les mêmes équipements et le même lot de réactifs pour confirmer les résultats obtenus.

II.3.3.3.3 La reproductibilité du test :

Pour assurer la reproductibilité de la méthode. la reproductibilité consiste à vérifier la similarité des résultats obtenus lors des échantillons analysés, elle a été fait par 3 opérateurs différents avec le même protocole et dans les mêmes conditions.

II.3.3.4 Mode opératoire :

- Il faut d'abord étiqueter et identifier les cassettes de test PSA.
- Le test est réalisé par l'ajout de 3 gouttes de l'échantillon environ 150 µl de macérât à l'aide de la pipette en plastique et les déposer sur une plaque de test PSA .
- Au bout de 10 min à une température ambiante, le liquide va être absorbé et le résultat va apparaître.

II.4 Examen microscopique par érythrosine ammoniacle :

L'identification microscopique est le test le plus définitif pour le sperme. Du fait que l'ADN peut être détecté s'il est traité avec un réactif de coloration.

Sur le plan technique, l'examen cytologique nécessite la réalisation de frottis avec étalement sur lame et coloration .

II.4.1 Composition de l'érythrosine ammoniacle :

- ✓ Pour le préparer on utilise le colorant erythrosine B salt (0,045 gr) en mélangeant avec 15ml d'ammoniaque, à 25% ensuite il faut le conserver à +4°C .

II.4.2 Préparation des lames colorées :

- Les frottis ont été réalisés avec 10µl de sperme (à partir de culot obtenu après la macération) sur une lame de(76X26 mm) . l'échantillon de sperme doit être vortexé avant chaque utilisation.
- Ensuite le séchage se fait sur la plaque chauffante(56°C pendant 3 à 5min) ,

- 2 à 3 gouttes de l'érythrosine Ammoniacle ont été ajoutés, une lamelle de verre (24X50mm) est ensuite déposée sur la lame pour que l'érythrosine pénètre dans les cellules .

L'observation de la lame est réalisée au microscope optique après l'ajout d'une goutte d'huile à immersion pour augmenter la résolution du microscope, elle permet d'immerger la lentille et l'échantillon. Le grossissement utilisé est G x100 à l'aide d'un programme ordinateur axiovision pour voir l'image plus nette .



Figure 09 : microscope optique (original 2022)

Le microscope été équipé des accessoires suivants :

- ❖ Objectifs à faible et fort grossissements pour permettre les différentes évaluations nécessaires.
- ❖ Oculaire , lentille qui grossit l'échantillon.
- ❖ Platine porte-échantillon.
- ❖ La vis macrométrique et la vis micrométrique permettent de monter et descendre la platine pour de grands ou de petits ajustement pour faire la mise en point .
- ❖ Les valets qui maintiennent une lame en place .
- ❖ diaphragme .

III Extraction d'ADN avec le kit Qiagen

L'extraction chimique et la purification de la molécule d'ADN sont réalisées avec le kit QIAamp DNA Mini « QIAGEN ». Ce kit utilise la technologie des membranes de silice « QIAamp » pour l'isolation et la purification des acides nucléiques, cette membrane est capable de fixer sélectivement l'ADN parce qu'elle est chargée positivement et l'ADN est chargé négativement.

Les tampons, le PH et les conditions de salinité sont optimisés pour assurer une liaison de l'ADN à la membrane ; tandis que les protéines et les contaminants qui peuvent inhiber la PCR sont éliminés par lavage.

Les étapes d'extraction de l'ADN à partir des taches de sperme ont été réalisées conformément aux instructions du kit Qiagen.

-Avant de commencer la lyse, si le tampon ATL (tampon de lyse tissulaire) contient des cristaux le faire chauffer à 70°C en appliquant une agitation douce.

Etape 01 :La Lyse :

1-Dans un tube de 2ml, immerger un échantillon de 0.5 cm² dans 300ul de tampon ATL, 20ul de PK du kit et 20 ul de DTT 1M.

2-Vortexer pendant 10 secondes et incubé pendant 1h à 56°C avec une agitation de 900rpm(en absence de bloc chauffant avec agitateur, faire agiter les échantillons pendant 10 secondes chaque 10 minutes.)

3- Centrifuger quelques secondes pour faire tomber les gouttelettes accumulées dans le couvercle de l'éppendorf.

4- Passer l'échantillon en tube passoire pour récupérer le lysat.

5- Ajouter 300ul de tampon AL (lysis Buffer) et vortexer pour bien mixer pendant 10 secondes.

6- incubé pendant 10min à 70°C sur le bloc chauffant avec agitateur de 900rpm, en absence de bloc chauffant avec agitateur, faire agiter les échantillons pendant 10 secondes chaque 3min.

Etape 02 :La purification :

1-Centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttelettes et ajouter 150ul d'éthanol absolu.

2-Vortexer pendant 15 secondes, centrifuger brièvement et déposer le tout doucement au centre

d'une colonne QIAamp MinElute column, préalablement identifiée sans toucher la membrane avec le cône de la pipette.

3-Centrifuger 1min à 8000 rpm.

4-Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer dans un nouveau tube de 02ml et ajouter 500µl de tampon AW1.

5-Centrifuger 1min à 8000 rpm

6-Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAamp MinElute dans in nouveau tube de 2ml et ajouter 700 µl de tampon AW .

7-Centrifuger 1 min à 8000 rpm.

8-Eliminer le tube contenant l'éluât transférer la colonne QIAamp MinElute column dans un nouveau tube de 02ml et ajouter 700µl d'éthanol absolu.

9- Centrifuger 1min à 8000 rpm.

10- Eliminer le tube contenant l'éluat ; transférer la colonne QIAamp MinElute column dans un nouveau tube de 02 ml.

11- Centrifuger 3min à 14000rpm.

12- Placer la colonne QIAamp MinElute column dans un nouveau tube de 1,5 ml stérile préalablement identifié, ouvrir le couvercle de la colonne et laisser sécher à température ambiante pendant 10 minute ou à 56° C pendant 03 minutes.

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

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

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

IV Quantification DUO de l'ADN

La quantification est effectuée grâce au kit « QUANTIFILER HUMAN DNA ». Ce kit permet la quantification simultanée de l'ADN humain et de l'ADN humain mâle ainsi que la détection des inhibiteurs de la PCR dans un seul puits de PCR en temps réel.

les systèmes de PCR en temps réel reposent donc sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction.

IV.1 Principe

La PCR en temps réel peut être réalisée en utilisant une sonde marquée spécifique de la cible dite sonde « TaqMan »

La chimie taqMan est basée sur l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique située entre les deux amorces PCR et étiquetée avec un fluorophore fixé par covalence à extrémité 5' - appelé le rapporteur et un quencher à l'extrémité 3'. La fluorescence détectée dans le thermocycleur PCR en temps réel est directement proportionnelle au fluorophore libéré et à la quantité de modèle d'ADN présente dans la PCR ((Black, 2009) . En absence d'amplification, la sonde reste intacte, le Quencher (suppresseur) absorbe en grande partie la fluorescence du reporter donc le reporter est réprimé.

Lors de l'amplification de la séquence cible, la sonde TaqMan est hydrolysée lors de l'étape d'élongation de l'ADN par l'activité exonucléasique 5'-3' de l'ADN polymérase, ce qui entraîne la séparation du rapporteur et le quencher fluorochrome. En conséquence, le signal de fluorescence du fluorochrome rapporteur deviendra détectable .

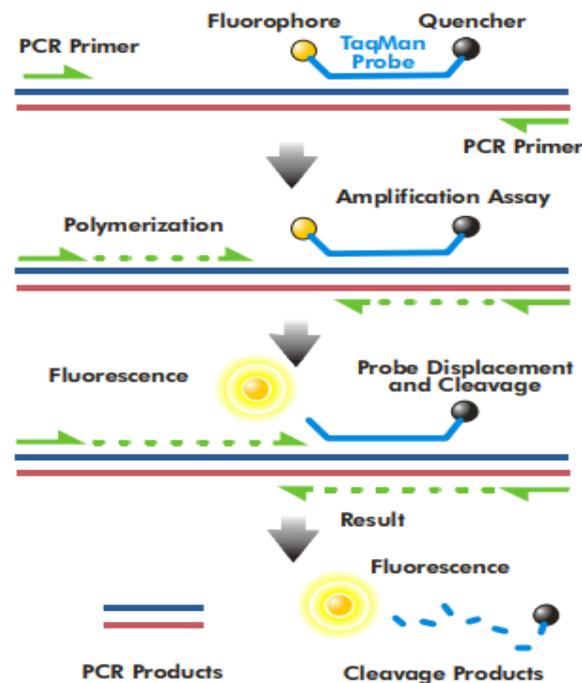


Figure 10: Représentation schématique de la technologie TaqMan (Stratagene Company 2007).

La cinétique de la réaction PCR met en jeu 3 phase : une phase d'initiation (amplification non détectable), une phase exponentielle et une phase plateau .(vassias 2012)

L'évolution de cette amplification peut être représentée par une courbe dont l'allure est celle d'une sigmoïde .(figure 10)

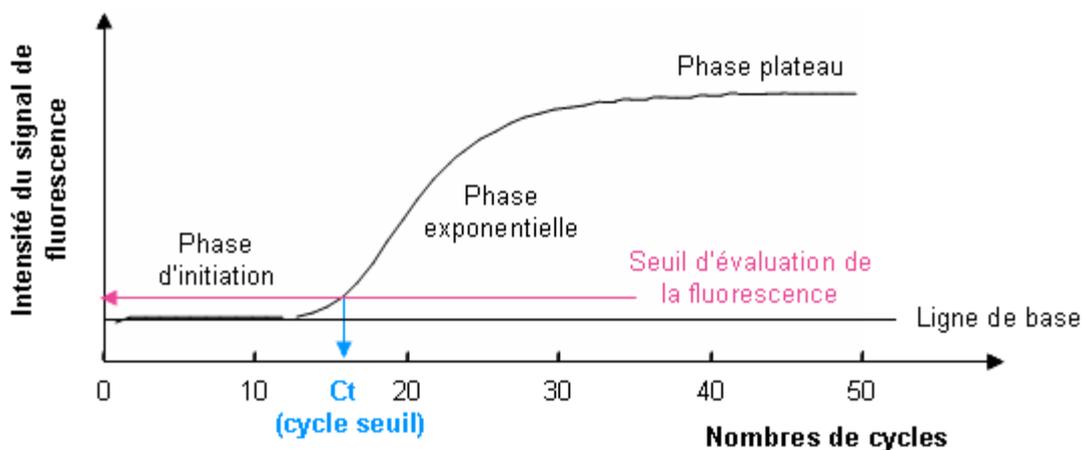


Figure 11: Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.

IV.2 Mode opératoire

Le protocole de la quantification comprend les étapes suivantes :

Tableau V: Les Cibles du kit quantifier DUO.

Kit	La cible	Gène cible	Localisation	Longueur d'amplification	Région amplifiée
Human Quantifier DUO	ADN Humain	RPPH1 (Ribonucléase PRNAH1)	14q11.2	140 pb	Intron
	ADN humain male	SRY Y11p.3 (Sex determining region Y)	Y p 11.3	130 pb	intron

IV.2.1 Préparation de la gamme de standards :

Une courbe étalon est réalisée par une série de différentes dilutions de l'ADN standard (gamme de standards) dont les concentrations en ADN sont connues (tableau VI). La solution mère d'ADN étant 200 ng.µl.

La courbe d'étalonnage sert comme une référence pour le logiciel afin de calculer la quantité des extraits des échantillons.

Tableau VI: Préparation de la gamme de standards.

Gamme standard	Concentration	Facteur de dilution	Dilutions
Std 1	50ng/µl	¼	30µl (eau ultra pure)+10µl(sol mère)
Std 2	16,7 ng/µl	1/3	20µl (eau ultra pure) +10µl STD1
Std 3	5,56 ng /µl	1/3	20µl (eau ultra pure) +10µl STD2
Std 4	1,85 ng /µl	1/3	20µl (eau ultra pure) +10µl STD3
Std 5	0,62 ng /µl	1/3	20µl (eau ultra pure) +10µl STD4
Std 6	0,21 ng/µl	1/3	20µl (eau ultra pure) +10µl STD5
Std 7	0,068 ng / µl	1/3	20µl (eau ultra pure) +10µl STD6
Std 8	0,023 ng / µl	1/3	20µl (eau ultra pure) +10µl STD7

IV.2.2 Préparation du réactif master mix :

Le « Master Mix » est constitué par les deux composants qui sont :le mélange réactionnel et le mix des primers .il est préparer selon le protocole suivant :

- Mélanger doucement par retournement le Réaction Mix
- Passer au vortex les tubes d'ADN q quantifier, le témoin négatif, les standards et les primers
- Le volume du mix réactionnel est préparé dans un eppendorf en fonction du nombre des échantillons à analyser, les ADN standards et le témoin négatif:
- Prélever 12.5x(n+2) µl Quantifier PCR Réaction Mix. (n=nombre d'échantillons)
- Ajouter 10.5x(n+2) µl Quantifier PCR Primer Mix.
- Passer au vortex le tube pendant 10 s.

IV.2.2.1 Les composants du kit Quantifier DUO

Tableau VII : Réactifs du kit Quantifier DUO.

Composition du kit	Mélange réactionnel	Volume par réaction	Condion de stockage
Réaction mix	ADN polymérase Taq Gold, un tampon, des dntpc, ,des sels ,Mg ⁺⁺ , ROX.	12,5 µl	+4°C
Mix des primers	les sondes RPPH1-SRY-IPC respectivement étiquetées avec VIC-FAM-NED.	10,5µl	-20°C
-Buffer dilution (diluant)	Tris HCL+EDTA 5 PH08.	10 µl	-20 C
-ADN standard	ADN male	200 ng / µl	-20°C

Tableau VIII : Calcul des réactifs de la RT-PCR.

Nombre d'échantillons : n échantillons+8 standards +un témoin positif et un témoin négatif	
Réactif	Volume
Réaction mix	12 ,5 *n
Primer	10 ,5 * n

IV.2.3 Préparation de la plaque de 96 puits

Le mélange réactionnel est réparti à raison de 23 µl par puits .

-Passer au vortex chaque tube de standard et d'échantillon d'ADN avant le prélèvement pendant 5 s.

-Dans chaque puits,2 µl de chaque échantillon d'ADN et standard sont ajoutés .

-la plaque est ensuite recouverte avec du papier adhésif et centrifugés pendant quelques secondes à 1600rpm . pour faire descendre les gouttelettes en haut de tube et ajuster les volumes.

-à la fin la plaque est placée dans le thermocycleur 7500 Fast et le programme 9600Emulation est ensuite lancé.

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std1 	Ech 	Ech7 	Ech15 	Ech24 	Ech32 	Ech40 					
B	Std 2 	Ech 	Ech8 	Ech16 	Ech25 	Ech33 	Ech41 					
C	Std 3 	Ech1 	Ech09 	Ech17 	Ech26 	Ech34 	Ech42 					
D	Std 4 	Ech2 	Ech10 	Ech18 	Ech27 	Ech35 	Ech43 					
E	Std 5 	Ech3 	Ech11 	Ech19 	Ech28 	Ech36 	Ech44 					
F	Std 6 	Ech4 	Ech12 	Ech21 	Ech29 	Ech37 	Ech44 					
G	Std 7 	Ech5 	Ech13 	Ech22 	Ech30 	Ech38 	Ech45 					
H	Std 8 	Ech6 	Ech14 	Ech23 	Ech31 	Ech39 	Ech46 	T+ 				T- 

Après la dilution des 8 standards, ces derniers sont déposés dans la première colonne de la plaque, suivie par l'extractum et l'AND standard de nos échantillons.

V Amplification par PCR multiplexe :

La réaction en chaîne de polymérase multiplexe (PCR) est une variante de la PCR dans laquelle deux loci ou plus sont simultanément amplifiés dans la même réaction en utilisant plusieurs couples d'amorces (**Hengariu *et al*, 1997**) .

L'amplification de l'ADN a été réalisée avec le kit « identifier plus » ,il est destiné pour 200 réactions et qui permet d'amplifier 15 STR non codants ainsi que le marqueur du sexe nommé l'amélogénine qui est situé dans une région codante .

Ce kit utilise un système de 4 colorants fluorescents sur les amorces dans le but de différencier entre les 16 STR en fonction de leur couleur, afin d'éviter le chevauchement des fragments d'ADN au moment de l'électrophorèse capillaire.

V.1 Mode opératoire

Le mélange réactionnel est réparti à raison de 15µl par puits .

Les échantillons devant subir l'amplification se composent de solutions de 10 µL devant contenir chacune une concentration d'ADN entre 0,005 et 0,1 ng/µl pour le bon déroulement de cette PCR.(pour des concentrations élevées, les échantillons doivent être dilués avec de l'eau ultra pure.)

Ensuite il faut faire les calculs des volumes des réactifs nécessaires au nombre d'échantillons, tableau 5)

En plus des échantillons ajoutés dans les puits des plaques à analyser, sont également mis à amplifier un contrôles positif et un contrôle négatif, tout en respectant le plan de dépôt .
à la fin , la plaque est recouverte avec une feuille d'aluminium et placée dans le thermocycleur préalablement programmé pour STR

Des cycles thermiques successifs sont entrepris (28 cycles) par le thermocycleur ABI9700 selon 4 étapes :

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

Tableau X: Préparation du mélange réactionnel de la PCR multiplexe

Réactifs	Volume
Master mix	$V(\mu\text{l})=10*N$
Amorces	$V(\mu\text{l})=5*N$

- ✓ pour les échantillons les plus difficiles, y compris ceux qui sont dégradés et contiennent des inhibiteurs. et ne montrent aucune amplification avec Identifiler on peut utiliser le kit d'amplification « **MiniFiler™ PCR** » selon le même protocole .
- ✓ L'amplification MiniFiler™ produit des amplicônes nettement plus courtes en longueur que celles produites avec Identifiler®
- ✓ Le kit utilise des amorces de taille réduite pour cibler l'amelogenine et huit des plus grands loci STR amplifiés avec Identifiler® (**D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO et FGA**)

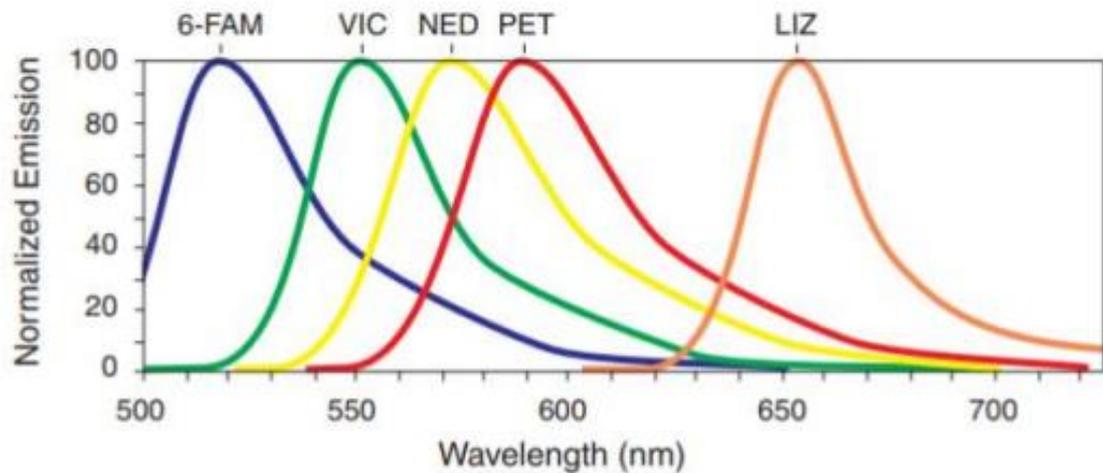
VI Post amplification :

C'est une étape de dénaturation des produits d'amplification issus de la PCR multiplex, pour obtenir les amplicons sous forme monobrin. Cette dénaturation irréversible est nécessaire pour la migration des produits PCR en électrophorèse capillaire.

Elle est réalisée par l'addition de formamide ,l'agent intercalant qui maintient l'ADN sous forme monobrin suivie d'un choc thermique , de plus Deux marqueurs de tailles doivent être introduits dans chaque échantillon.

-Liz : renseigne sur la taille des allèles appelée « Standard de taille » correspondant au nombre de répétitions du motif en paire de base

-Ladder : « Allelic Ladder Identifiler Plus » un mélange d'ADN pré amplifié qui contient tous les allèles possibles pour les 16 marqueurs permet l'identification des allèles.

Mode opératoire**Figure 12:** Les fluorochromes du kit d'amplification (Coquoz, 2003)**Tableau XI:** Réactifs de post amplification.

Réactif	Volume
Mix (Standard de taille LIZ + HI-DI formamide)	9 μ l (8.7 μ l formamide + 0.3 de LIZ) x (n)
Echantillons	4 μ l
Témoin (-) et témoin (+)	1,5 μ l
ladder	1,5 μ l

Protocole :

- Commencer par préparer une plaque pour la post PCR, puis, calculer les volumes des réactifs nécessaires au Mix pour n échantillons.
- Préparer le mix dans des tubes eppendorfs.
- Passer au vortex les tubes doucement pendant 10 à 15sec.
- Répartir 9 μ l du mélange réactionnel dans les puits des échantillons et ladder.
- Déposer 4 μ l d'échantillon
- Déposer 1.5 μ l de ladder
- Déposer 1.5 μ l des contrôles positifs et contrôle négatif dans les puits correspondants.
- Couvrir la plaque par un septa spécifique, et placer dans un thermocycleur préalablement programmé pour la dénaturation pendant 3 mn à 95 °C.
- Déplacer la plaque dans une cryobloc à -20 °C et centrifuger pendant 3 min à 13000 rpm.

VII Analyse des fragments :

Après l'étape d'amplification, les échantillons sont prêts à être analysés par une séparation d'électrophorèse capillaire. Elle est réalisée grâce au séquenceur 3130 xl Analyzer, comprenant 16 capillaires à (36 cm /30µm) de longueur contenant le polymère liquide POP4 (performance optimized polymer 4) comme un support de migration qui exerce un effet de tamisage moléculaire ce support contient aussi les sels nécessaires à la migration et l'urée (conditions dénaturantes).

Les fragments d'ADN lors de l'électrophorèse vont migrer le long du capillaire du pôle négatif (la cathode) vers le pôle positif (anode), selon leur taille sous l'effet du champ électrique (15 Kv).

Vers la fin de la migration, les molécules passent devant une fenêtre de détection où elles sont bombardées par un faisceau laser du séquenceur. Cette excitation provoque la libération de photons (fluorescence) qui sont captés par une caméra CCD « Charge Couple Device », le séquenceur est lié à un ordinateur auquel sont transférées les données analysées et validées, pour obtenir à la fin un profil génétique.

VIII validation des données brutes :

L'analyse et la validation des données obtenues sont traitées par un logiciel « GeneMapper ID » (v3.2 Applied Biosystems), les résultats sont présentés sous forme d'un profil génétique qui se traduit par plusieurs pics caractérisés par leur position, leur couleur et aussi par l'intensité de la fluorescence exprimée.

Ce logiciel attribue à chaque fragment d'ADN d'intérêt (STR) :

- un numéro allélique en le comparant avec une échelle allélique.
- une taille en pb en comparaison avec un standard.

Les profils génétiques obtenus sont validés selon des paramètres fixés par le laboratoire après une étude de validation.

Chapitre III : Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

I Résultats et discussion :

Afin de valider les techniques de détection de traces de sperme à travers des tests préliminaires PSA et l'observation microscopique par la coloration d'erythrosine ammoniacale à partir d'échantillons de sperme, nous avons choisi et testé trois critères (sensibilité, répétabilité, et reproductibilité).

I.1 Résultats des tests préliminaires :

I.1.1 Résultats de la validation d'examen immunologique (Recherche de la Prostate

Serum Antigen) :

la validation du test PSA repose sur l'apparition de 3 lignes dans la cassette de test en cas de la présence de sperme humain (liquide séminal), et l'apparition de 2 lignes seulement dans le cas où le sperme n'est pas détecté.

- Témoin positif : 20 μ l d'échantillon de sperme + tampon PSA
- Témoin négatif : 20 μ l de l'eau + tampon PSA



Figure 13: Résultats du témoin positif et négatif du test PSA

I.1.1.1 Résultats du test PSA de la gamme de dilution du sperme :

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

I.1.1.1.1 La sensibilité :

Tableau XII 1: Résultats de la sensibilité du test PSA

supports Dilution	Coton	Nylon	Ecouvillon	Couche	Serviette
1/10	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
1/100	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
1/500	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
1/10000	+	-	+	+	+
	+	-	+	+	+
	+	-	+	+	+
1/20000	+	-	-	+	-
	+	-	-	+	-
	+	-	-	+	-

+ : Résultat positif

- : Résultat négatif

- ❖ Le tests a permis la détection de la PSA dans le liquide séminal et donné des résultats positifs dans les échantillons dilués à une échelle minimum 1/10000 (après 15 minutes) , pour chacun des supports : serviette et écouvillon .
- ❖ Pour les supports (couche et coton) les résultats positifs ont été obtenus jusqu'à 1/20000 , tandis que dans l'échantillon du nylon la réaction à la PSA devient négative à partir de la dilution 1/500 ,en raison de son faible pouvoir absorbant de sperme .
- ❖ En résumé la sensibilité du test est diminuée en augmentant la dilution du sperme , elle dépend également de la qualité du support qui va l'absorber .
- ❖ Le test PSA utilisé pour la détection du liquide séminal a permis de donner des résultats cohérents et similaires à ceux de Hochmeister (1999), qui confirme que le

test est sensible à partir d'une dilution du sperme à 1/200 000, ce qui constitue la limite de détection pour donner un résultat positif .

I.1.1.1.2 La répétabilité et la reproductibilité

Tableau XIII: Résultats de la 1er répétabilité du test PSA

supports dilution	Coton	Nylon	Ecouvillon	Couche	Serviette
1/10	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
1/100	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
1/500	+	-	+	+	+
	+	-	+	-	+
	+	-	+	+	+
1/10000	-	-	+	+	-
	-	-	+	+	+
	-	-	+	-	+
1/20000	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-

Tableau XVI: Résultats de la 2^{em} répétabilité du test PSA

supports \ Dilution	Coton	Nylon	Ecouvillon	Couche	Serviette
1/10	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
1/100	+	+	+	+	+
	+	+	-	+	+
	+	+	-	+	+ -
1/500	+	-	+	+	+
	+	-	-	+ -	+
	+	-	-	-	-
1/10000	-	-	+ -	+	+
	-	-	-	+	-
	-	-	-	+	-
1/20000	-	-	-	+	+
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-

I.1.1.1.3 Interprétation et discussion

Les résultats démontrent que la sensibilité, la reproductibilité et la répétabilité sont dépendantes du degré de dilution du sperme ,ce qui permet de déterminer le seuil analytique du test .

On remarque par ailleurs que la sensibilité est fortement dépendante de la nature du support :

- ❖ Pour le support nylon ,nous avons obtenu 2 valeurs de dilution pour la sensibilité : 1/100 et 1/500, ceci s'explique par le fait que nous avons utilisé 2 types de nylon différents, cela est démontré dans le deuxième et troisième tableaux où nous avons testé le même type ,alors que pour le premier ,nous avons testé un autre .les résultats étant différents , par conséquent ,on ne peut pas établir le seuil analytique de détection à 1/500 .
- ❖ Pour le support écouvillon et serviette, la limite de détection est toujours la même 1/10000 ,à l'exception d'un seul échantillon ou le seuil était de 1/20000.

- ❖ Pour le support couche il est intéressant de noter que les nombreux trous et le constituant intérieure que ce substrat possède affectent le résultat d'analyse par l'absorption du sperme déposé sur la couche, ce qui a conduit à avoir quelques résultats différents.



A :support cotton



B: support nylon

Figure 14:(A,B,) Résultats du test PSA de la gamme des dilutions de sperme (original)

I.1.2 Résultats de l'observation microscopique de la gamme de dilution :

- Les tableaux résumant les résultats combinés de la sensibilité ,répétabilité et de la reproductibilité

I.1.2.1 la sensibilité

Tableau XV : Résultats de la sensibilité de la coloration d'érythrosine ammoniacale

Supports Dilution	Coton	Nylon	Ecouvillon	Couche	Serviette
1 /10	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
1/100	-	-	-	-	-
	+	-	-	+	+
	-	-	-	+	-
1/500	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
1/1000	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
1/20000	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-

I.1.2.2 la répétabilité et la reproductibilité :

Tableau XVI: Résultats de la 1er répétabilité de la coloration d'érythrosine ammoniacale

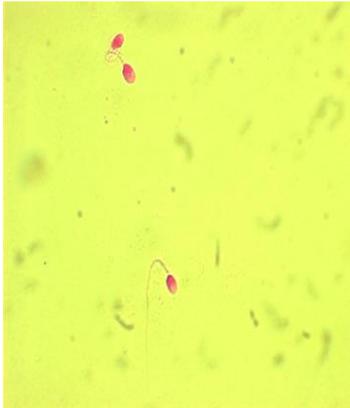
supports Dilution	Coton	Nylon	Ecouvillon	Couche	Serviette
1 /10	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
1/100	+	-	+	-	-
	+	-	+	+	-
	-	-	-	-	-
1/500	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
1/1000	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
1/20000	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-

Tableau XVII: Résultats de la 2eme répétabilité de la coloration d'erythrosine ammoniacle

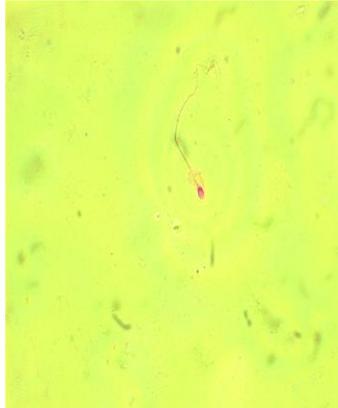
supports Dilution	Coton	Nylon	Ecouvillon	Couche	Serviette
1 /10	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
1/100	-	-	+	-	-
	+	-	+	+	-
	-	-	-	-	-
1/500	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
1/10000	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
1/20000	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-

- ❖ On peut déduire à partir des résultats des tableaux précédents que la coloration par l'erythrosine ammoniacle a permis la détection des spermatozoïdes sur les échantillons moins dilués de 1/10 jusqu'à 1/100 ou il ya a une forte concentration des spermatozoïdes , pour le reste des dilutions il y'avait pas spermatozoïdes .
- ❖ Dans la plupart des observations microscopiques, on remarque un changement dans la structure des spermatozoïdes lorsque la dilution est élevée ; ils perdent généralement leurs flagelles .
- ❖ On observe une similarité pour les résultats de la sensibilité avec la répétabilité, à l'exception d'une petite différence dans les résultats de la reproductibilité ,
- ❖ Par conséquent, comme ces résultats le montrent, plus les volumes de dilution sont augmentés moins les spermatozoïdes sont observés.

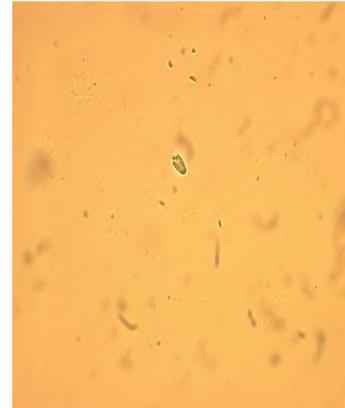
A : l'observation microscopique du support coton Gx100



Ct: 1/10

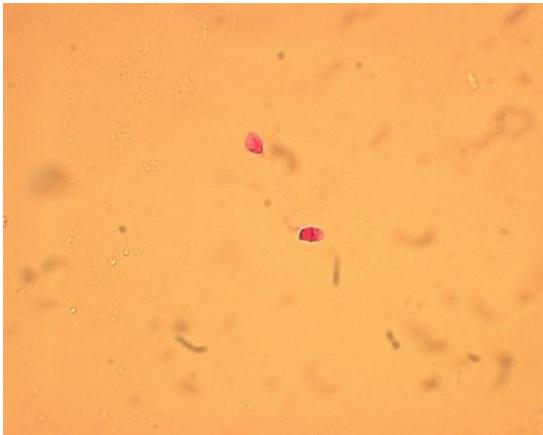


Ct : 1/100



Ct : 1/20000

B : l'observation du support écouvillons Gx10

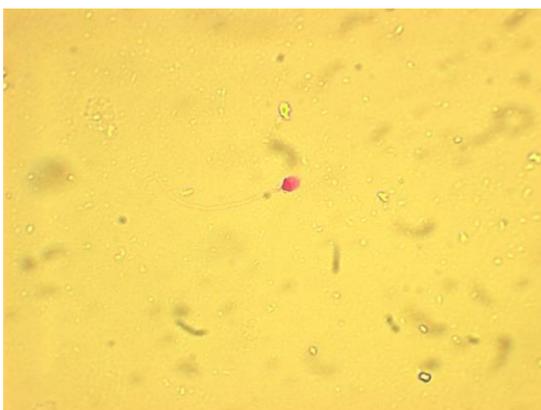


E : 1/10

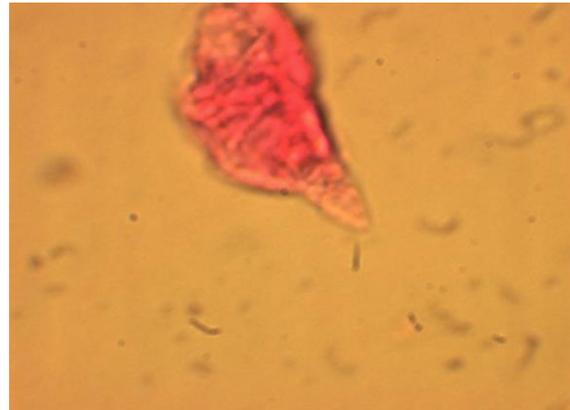


E : 1/100

C : l'observation microscopique du support Nylon Gx100



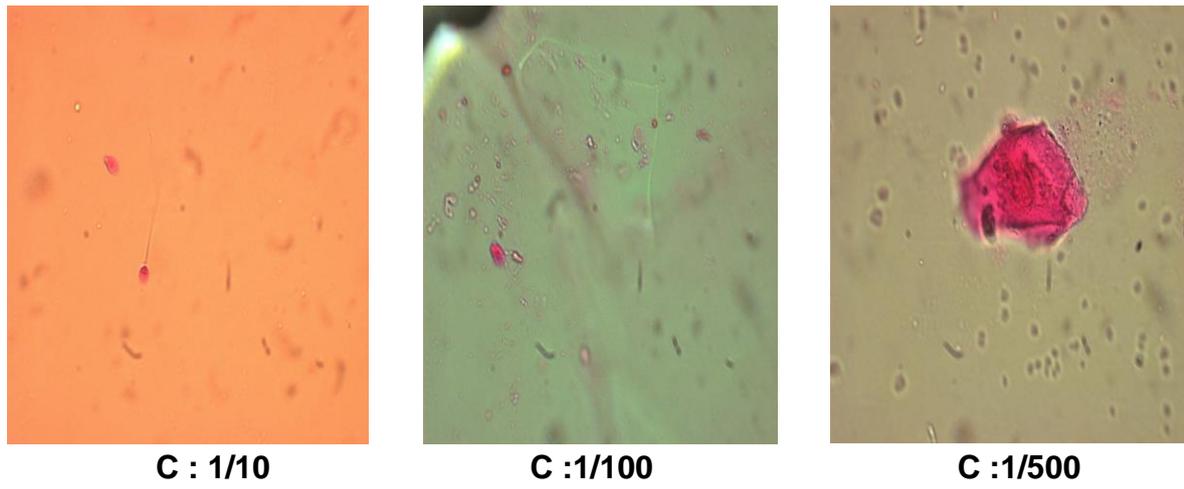
N : 1/10



N : 1/500

D: l'observation microscopique du Support Couch Gx100

Figure 15(A,B,C,D) : observation microscopique par la coloration d'erythrosine de la gamme de dilution de sperme humain(original 2022)



E : l'observation microscopique du support Serviette Gx100 :

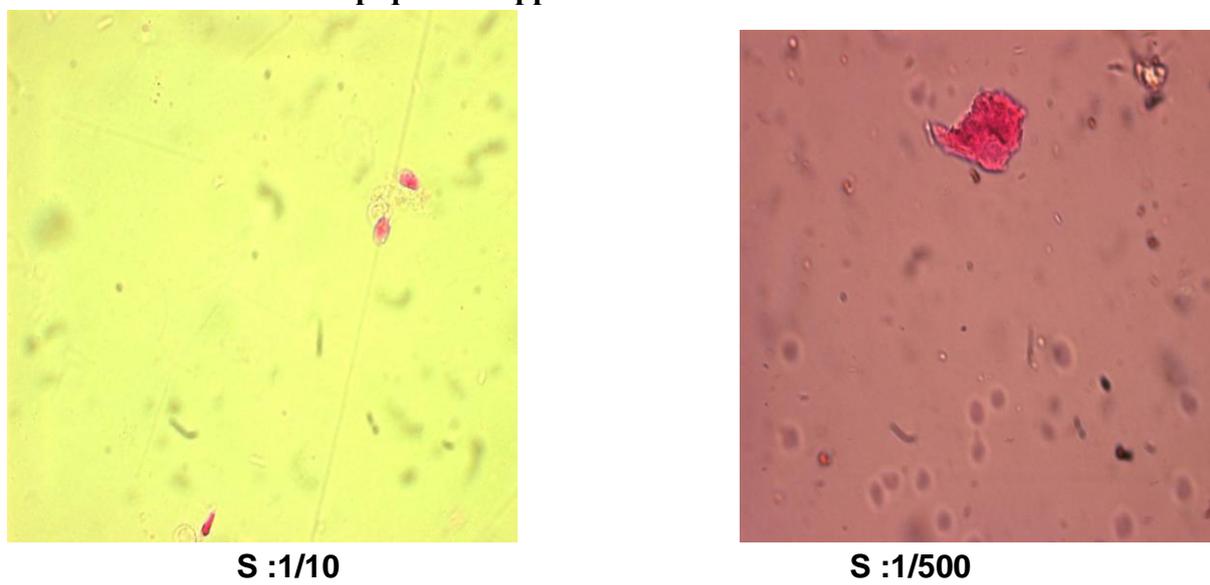


Figure 16:(D,E):observation microscopique par la coloration d'erythrosine de la gamme de dilution de sperme humain GX100

II Obtention de profil génétiques de donneur :

- suite à la panne du séquenceur de laboratoire on a pas pu avoir les résultats des profils génétiques de tout les échantillons sauf celui-ci .

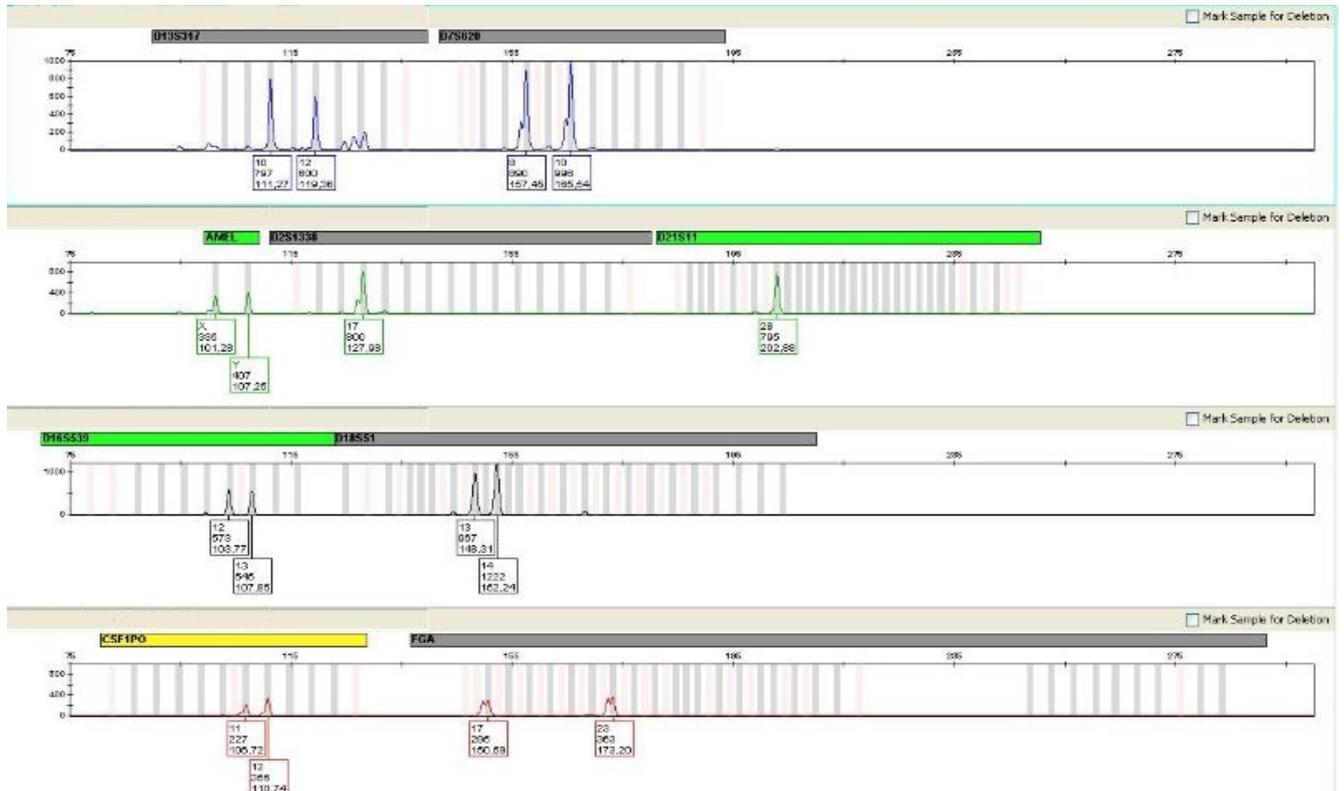


Figure 17: Profil génétique du sperme par le kit AmpFI STR[®] MiniFiler[™]

Conclusion :

Le profilage permet de dresser le profil de l'auteur d'une infraction afin de l'identifier .Il repose avant tout sur l'analyse de l'acte criminel : observation de la scène du crime, consultation des fichiers automatisés ,analyse victimologique et étude des prélèvements effectués par la police scientifique .

Les affaires d'agression sexuelle représentent une proportion importante des cas traités par les biologistes judiciaires.

Plusieurs études ont indiqué que les spermatozoïdes provenant de taches de sperme faites sur différents supports persistent, et c'est justement ce que l'on s'est proposé de démontrer en utilisant un test d'identification du sperme , comprenant une détection de l'antigène prostatique par la cassette seratec PSA ,ainsi que la détection microscopique de spermatozoïdes grâce à la coloration à l'erythrosine ammoniacle .Ces tests préliminaires ont été appliqués sur plusieurs supports à savoir : le nylon ,le coton, les couches ,les serviettes et l'écouvillon .

Nos résultats ont pu préciser une limite de détection pour les 3 critères de validation qui sont la sensibilité ,la reproductibilité et la répétabilité

L'ADN à été extrait par le kit Qiaagen et amplifié par RT- PCR ;ce qui nous a permis d'obtenir un profil génétique.

D'après notre étude , nous avons pu démontrer que les deux méthodes de détection de sperme sont fiables et efficaces pour l'analyse d'échantillons dans le cadre de l'identification génétique en criminalistique.

En perspective, il serait souhaitable de tester ces méthodes sur un nombre d'échantillons plus élevé pour valider et confirmer l'efficacité et la fiabilité de ces tests .

A

- **Acosta M. L** ; 2002 « Collecting evidence for domestic and sexual assault: highlighting violence against women in health care system interventions, »International Journal of Gynecology & Obstetrics, vol. 78, supplement 1, pp. S99–S104,.
- **Aggrawal A** 2014 APC Textbook of Forensic Medicine and Toxicology - Avichal Publishing Company chapitreV Forensic Microscopy page 529 -530
- **Alberts B, Johnson A, Lewis J** ; 2002. New York: Garland Science; Molecular Biology of the Cell. 4th edition.
- **Allery, J., Mieusset, R., & Rougé, D** ;(1998). Les méthodes de détection du sperme utilisées en médecine légale. Revue Française Des Laboratoires, 1998(307), 61–64. doi:10.1016/s0338-9898(98)80220-5
- **Alleyne L, Marzooqi A, Ingo B, Thomas F. Callaghan, Song C, Derek F, Neeraja G, Pierre Jt, Reidar N, Richard S, Werner S, Arthur T, Simon W; Clemens W.,** (2009). Guide Interpol sur l'échange de données génétique et sur les pratiques en matière d'analyse, 2ème édition.
- **Allan J et Scott B**, 2016 :A Guide to Forensic DNA Profiling chapitre 5 Biological Stains pp 49 -50
- An Overview For Users Of the SERATEC® PSA SEMIQUANT Tests

B

- **Briant E**; 2010 juin-juillet -août .l'actualité chimique -- n° 342-343 45
- **Brown, R., Davenport, J., (2015)**. Forensic Science: Advanced Investigations. (1st Ed.). p. 297
- **Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R** ;(2003) Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. Annu Rev Genomics Hum Genet 4:119–141.
- **Butler ,J.M.,Coble ,M.D .,Vallone ,P .M .,**2007 . STRs vs .SNPs :thoughts on the future of forensic DNA testing.Forensic Sci Med Pathol 3,200-204
- **Butler J.M. & Hill C.,** (2012). Biology and genetics of autosomal STR loci useful for forensic analysis, Forensic Science Review,pp 145-147
- **Butler J.M;** (2011). Advanced topics in Forensic DNA typing: Methodology. USA (p:49-69).

- **Butler, J. M. ;(2009).** Fundamentals of Forensic DNA Typing. Burlington: Elsevier Science pp 94

C

- **Chichester**, England: John Wiley & Sons. Pp 12 -14,17 ,32-36
- **Chee Seng Ku1, En Yun Loy1, Agus Salim1, Yudi Pawitan and Kee Seng Chia1**;2010 The discovery of human genetic variations and their use as disease markers: past, present and future .
- **Coquoz, R., ; (2006).** Preuve par l'ADN: La génétique au service de la justice. Lausanne: Presses polytechniques et universitaires romandes pp 202-205.

D

- **Debrauwère H., Nicolas A., Vergnaud G., Buard J., Tessier J. & Aubert D.,** (2000). Mécanisme d'instabilité des minisatellites. Médecine/sciences, 16 : 415-7.
- **Doutremepuich C.,** (2012). Les empreintes génétiques en pratique judiciaire." Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine 196.6: 1117-1130.

E

- **Ellegren, H; 2000.** Microsatellite mutations in the germline: Implications for evolutionary inference. Trends in Genetics 16: 551–558
- **Ellegren, H ;(2004).** Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics, 5(6), 435–445. doi:10.1038/nrg1348
- **Esselink, G. D., H. Nybom, and B. Vosman.;** 2004. Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (Microsatellite DNA Allele Counting-Peak Ratios) method. Theoretical and Applied Genetics 109: 402–408
- Evaluation of Prostate-Specific Antigen (PSA) membrane tests for the forensic identification

G

- **Gelfand Y, Hernandez Y, Loving J, Benson G** ;2014. VNTRs seek—a computational tool to detect tandem repeat variants in high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42: 8884–8894.
- **Gill, P. et al** ; (1985) Forensic application of DNA fingerprints. *Nature* 318, 577–579. 13. A confirmer
- **Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S**; (2007). An introduction to forensic genetics.
- **Grodzicker T, Williams J, Sharp P, Sambrook J** ;(1975) Physical mapping of temperature sensitive mutants of adenovirus. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 39:

H

- **Haimovici F, Anderson DJ** ;1995. Detection of semen in cervicovaginal secretions. *J AIDS Human Retrovirology*;8(3):236-238 .
- **Hashiyada, M.**, (2011). *DNA Biometrics, Computer and Information Science, Artificial Intelligence*, Jucheng Yang Ed., ISBN 978–953–307–618–8, Published: under CC BYNC-SA 3.0 license.
- **Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H.**, 1997. Multiplex PCR : Critical Parameters and Step –by-Step Protocol. *BioTechniques* 23,504-511.
- **Hochmeister Semen, Rudin. O, UVBorer, Kratzer. A, Gehrig. CH, and Dirnhofer. R**, (1997). Evaluation of Prostate-Specific Antigen (PSA) membrane tests for the forensic identification of semen. *J. For. Sciences*.
- **Hochmeister, Manfred N.; Budowle B.; Rudin O; Gehrig C; Urs Borer Michael Thali, 1 M.D.; and R Dirnhofer**, 1999. 1 M.D. Evaluation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Membrane Test Assays for the Forensic Identification of Seminal Fluid.

I

- **In Jamieson,A,&In Bader,S** ;(2016). Aguide to forensic DNA profiling scoot pp 384
- **In Singh, J., & In Sharma, N. R.** (2021). Crime scene management within forensic science. Pp 65

J

- **Jasinska, A., and Krzyzosiak, W.J.** (2004) Repetitive sequences that shape the human transcrip-tome.FEBS Letters567, 136–141
- **Jeffreys, A., Wilson, V. & Thein, S** ;(1985). Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. Nature 314, 67–73
- **Jobling, M. A., & Tyler-Smith, C**;(2003). The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. Nature Reviews Genetics, 4(8), 598–612. doi:10.1038/nrg1124
-

K

- **Kalia, R. K., M. K. Rai, S. Kalia, R. Singh, and A. K. Dhawan** ;2011. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. Euphytica 177: 309–334.
- **Kan YW, Dozy AM 1978**;. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. Proc Natl Acad Sci U S A 75(11):5631–5635
- **Kayser, M., Krawczak, M., Excoffier, L., Dieltjes, P., Corach, D., Pascali, V., de Knijff, P.** (2001). An Extensive Analysis of Y-Chromosomal Microsatellite

Haplotypes in Globally Dispersed Human Populations. *The American Journal of Human Genetics*, 68(4), 990–1018. doi:10.1086/319510

- **Knight B, Saukko P** ;1996. The pathology of wounds. *Forensic pathology*;3:136-73

L

- **Labat L, Deveaux M ,JP, D.,2000.** Applications de l'électrophorèse capillaire en toxicologie clinique et médico –légale .*Ann Toxicol Anal* 12 ,179-195.
- **laurent,F.-X ,vibrac ,G.,Rubio,A.,Thévenot,M.,T.,Pène ,L.,2017.** Les nouvelles technologies d'analyses ADN au service des enquêtes judiciaires .*Med Sci (Paris)* 33 ,971
- **Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921. doi: 10.1038/35057062
- **Linacre A ,william ,Good w** 2011, New York John Wiley & Sons, NY an introduction to forensic genetics p 33
- **Ludes, B.** (2021). L'amplification génique : une révolution en médecine légale et en criminalistique. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 205(4), 396-401. doi:10.1016/j.banm.2021.01.02.
- **Lynch, M. J., Masters, J., Pryor, J. P., Lindon, J. C., Spraul, M., Foxall, P. J. D., & Nicholson, J. K** ; (1994). Ultra high field NMR spectroscopic studies on human seminal fluid, seminal vesicle and prostatic secretions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 12(1), 5–19. doi:10.1016/0731-7085(94)80004-9

M

- **Martínez, P., Santiago, B., Alcalá, B., & Atienza, I.** (2015). Semen searching when sperm is absent. *Science & Justice*, 55(2), 118–123. doi:10.1016/j.scijus.2015.01.008
- **Mansuet-L et al. / Transfusion Clinique et Biologique** 14 (2007) 334–342 33523 .
- **Margot P** (2014) Traçologie: la trace, vecteur fondamental de la police scientifique. *RIPCTS*, Vol. 1: p.76.

- **M Barbisin , J G Shewale** 2010 Assessment of DNA Extracted from Forensic Samples Prior to Genotyping
- **Mozayani, A., & Noziglia, C.** (2011). The forensic laboratory handbook procedures and practice pp 30-38 . New York: Humana Press.
- **Mullis KB** and Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335–350, 1987

N

- **Naveen K , Uttam Singh** 2018 , International Journal of INFORMATION and computing science
- **Nicklas, J.A., and Buel, E.** (2003) Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 1160–1167.

O

- **Olson M, Hood L, Cantor C, and Botstein D.** A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434 –1435, 1989

P

- **Pham-Hoai,E.,Pussiau,A.,Curci,J.-Y.,**2017 .ADN, une perpétuelle avancée .Revue Francophone des Laboratoires 2017,67-76
- **Petkovski,E** (2006) Polymorphisme ponctuels des séquences et identification génétique. Etude par spectrophotométrie de masse MALDI TOF. Thèse Doctorat de l'université Louis Pasteur Strasbourg I.
- **Poitras E. et Houde A.** (2002). La PCR en temps réel: principes et application. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2: 2-11. Disponible sur : <https://biochimie.umontreal.ca/wpcontent/uploads/sites/37/2015/07/qPCR.pdf>

R

- **Rao, A. R., Motiwala, H. G., & Karim, O. M. A.** (2007). The discovery of prostate-specific antigen. *BJU International*, 0(0), 070902212121002–???. doi:10.1111/j.1464410x.2007.07138.x
 - **Righetti J** (2002) La Salive en médecine légale p03
 - **Robert, J.** (2010). Polymorphismes génétiques. *Bulletin Du Cancer*, 97(11), 1253–1264.
-

S

- **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and Arnheim N;**1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350 –1354,
- **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*;74(12): 5463–5467
- **Schmidt S, Franke M, Lehmann J, Loch T, Stöckle M, Weichert-Jacobsen K.** Prostate-specific antigen in female urine: a prospective study involving 217 women. *Urology* 2001;57(4):717-720
- **Semikhodskii A** 7 août .,2007 Dealing with DNA Evidence: A Legal Guide Couverture, Chapter 1 : Introduction to criminal DNA analysis p 4-5 .
- **Soares J.A -Vieira,** (2007) Y-STRs in forensic medicine: DNA analysis in semen samples of azoospermic individuals, *J. Forensic Sci.* 52 (3) 664–670
- **Southern EM 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*;98(03): 503–517
- **Stragene company** (2007) . An introduction to Quantitative PCR Méthodes Guide 2007,Stragene.
- **SWGDM** (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods), (2012).Validation guide-line.

- **Sweet DJ, Sweet CHW 1995.** DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains of homicide victim to crime scene. *J Forensic Sci* 1995;40(2):310-4.

T

- **Tamaki, K., & Jeffreys, A. J.** (2005). Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Legal Medicine*, 7(4), 244–250. doi:10.1016/j.legalmed.2005.02.00.
- **Tilstone, W. J., Savage, K. A., & Clark, L. A.** (2003). *Forensic science: An encyclopedia of history, methods and techniques*. Oxford: ABC-Clio

V

- **Vassias , I.,**2002 .Principe de l'amplification en chaine par polymérase .EMC Biologie médicale 7,1-5.

W

- **Wandeler, P., P. E. A. Hoeck, and L. F. Keller.** 2007. Back to the future: Museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* 22: 634–642.
 - **Watson J.D., Crick F.H.C.,** 1953Molecular structure of nucleic acids, *Nature*, , 171, p. 7372)Emmanuelle Briant,2010 l'actualité chimique - juin-juillet-août 2010 - n° 342-343 45
 - **Watson J.D., Crick F.H.C.,** 1953,Molecular structure of nucleic acids, *Nature*, 171, p. 7372)
 - **Wyman AR, White R**1980. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*;77(11):6754–6758
 - **William J., Tilstone, W. J., Savage, K. A., & Clark, L** et. (2003). . AForensic science: An encyclopedia of history, methods and techniques. Oxford: ABC-Clio.
-

Y

- **Yokota, M., Mitani, T., Tsujita, H., Kobayashi, T., Higuchi, T., Akane, A., & Nasu, M.** (2001). Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test for forensic examination of semen. *Legal medicine (Tokyo, Japan)*, 3(3), 171–176.
[https://doi.org/10.1016/s1344-6223\(01\)00031-1](https://doi.org/10.1016/s1344-6223(01)00031-1)
-

Z

- **Zapata, F., Ortega-Ojeda, F. E., & García-Ruiz, C.** (2017). Revealing the location of semen, vaginal fluid and urine in stained evidence through near infrared chemical imaging. *Talanta*, 166, 292–299. doi:10.1016/j.talanta.2017.01.086

Matériels non Biologique

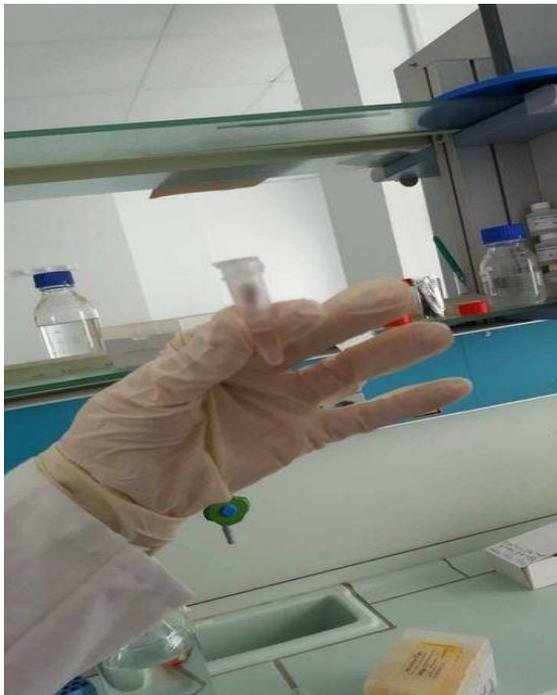
Salles	Etapes réalisées	Appareillage	kit
Salle de préparation de solution	Préparation de solution	- Balance- Spatule - lles - Eprouvette -	Erythrosine
Salle d'examen de scellés	-Vérification de la qualité du sperm -Obtention des taches de sperm -Test préliminaires (PSA ervation microscopique)	-Papier paillasse-Portoires -Micro pipettes (20 /100/500/1000µl) -Tips-Eppendorfs-Coupelles -pinces	Kit PSA Seratec, erythrosine mmmoniacle,éthanole
Salles de manipulation d'ADN	Extraction	-Portoires-Hote verticale -Micro pipette-eppendorfs -Centrifugeuses –Bloc chauffant -Vortex-Colonne QIAmp MinElute Column	QIAamp DNA Investigator Kit de QIAGEN
	Quantification	-Thermocycleur 7500 Fast lTime PCR -Centrifugeuse pour plaque, -plaque 96puits, un film adhésif transparent,	-Quantifiler™ Human DNA Quantification Kits, Eau ultra pure.
Salles blanches 3 salles	PCR et Post PCR	Thermocycleur 9700 ABI, Plaque pcr ,Support plaque pcr Vortex ,Centrifugeuses pour aques ,cryobloque à glace	-PCR AmpFISTR (®) Identifiler(®) plus, Et AmpFISTR® Identifiler® Plus Allelic Ladder Formamide
	Electrophorèse capillaire	Support de plaque à 96 puits, Séquenceur 3130XL Genetic analyser.TamponPoP-4	Tampon De migration, l'eau ultra pure,

Consommables : gants - Charlottes.- Bavettes.

Les composants du kit AmpFISTR® MiniFiler™

Composition du kit	Mélange réactionnel
Master Mix	une enzyme, des sels, des dNTP, une protéine porteuse et 0,05 % d'azide de sodium.
Mix des primers	amorces directes et inverses pour amplifier les cibles d'ADN humain.
Control DNA 007	0,10 ng/μL d'ADN génomique masculin humain dans de l'azoture de sodium à 0,05 % et un tampon.
Allelic Ladder	<ul style="list-style-type: none">• Ladder alléliques• allèles amplifiés.

Préparation du macérat



Le macérat



Testes préliminaires



**Cassette de PSA (original)
(original)**



Tampon de PSA



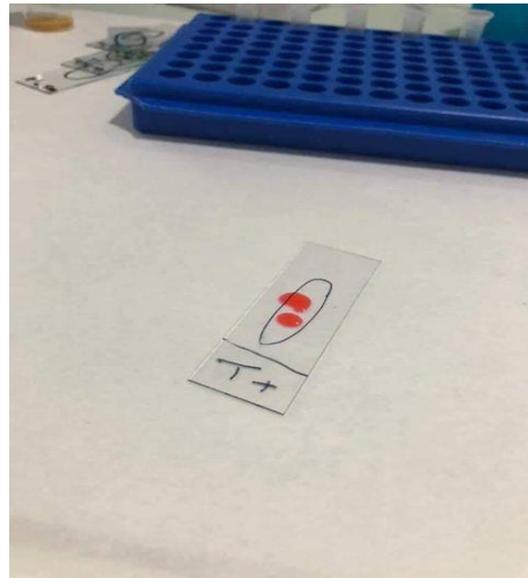
**Microscope photonique (original)
ammoniacle(original)**



Erythrosine



Bloque chauffant (original)



Lame coloré (original)



Pipette (original)



Portoire (original)



Tips (original)

Extraction



Agitateur (original)



Vortex (original)



réactifs et Kits d'extraction (original)



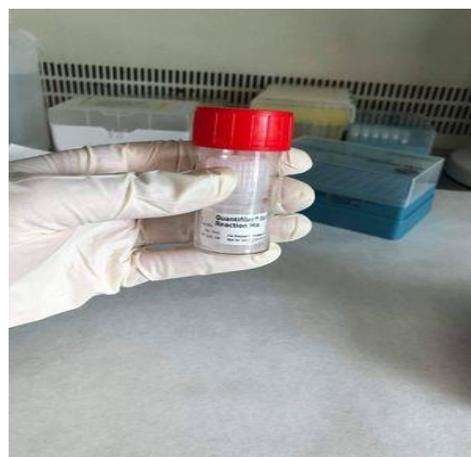


Centrifugeuse (original)

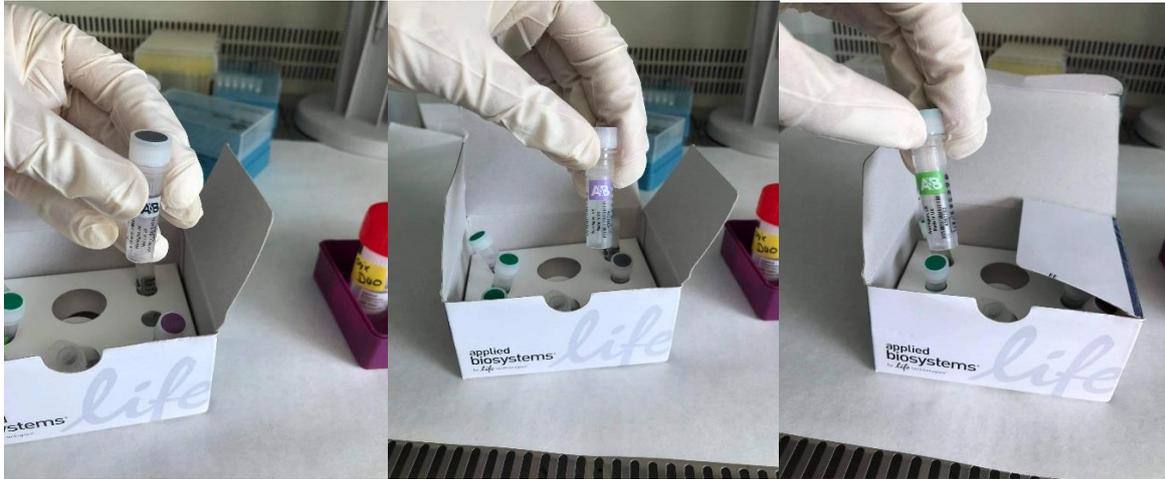
Quantification



**Thermocycleur 7500 fast real
(original)
Time Pcr (original)**



Reaction mix



Kit quantifier human DNA (original)



Mini centrifugeuse (original)

Amplification



Plaque 96puits avec feuille Aluminium (original)



Cycle d'amplification (original)



Kit AmpFISTR Identifier Plus



AmpFLSTR™ MiniFiler™ PCR Amplification Kit

Post Amplification



**Thermocycler 9700
ABI (original)**



Cryobloc (original)



Formamide (original)



3130xl Genetic Analyzer (original)