

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université de Blida 1

Faculté des Sciences de Vie et de la Nature

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Option : Génétique

Thème :

L'impact du Test sérologique sanguin Kastel Meyer sur le profilage ADN à partir de traces infimes

Présenté par :

MEFTAH LATIFA

REDAOUIA IKRAM

Soutenu le : 26-06-2018

Devant le jury :

Mme KEBASS.S	MCB	USDB1	Présidente
Mme LOUNACI.L	MAB	USDB1	Examinatrice
Mme GUESSAIBIA.N	MCB	USDB1	Promotrice
Mme BELABAS.S	Ingénieur d'état	LPS(DGSN)	Co-Promotrice
Mme EDDAIKRA .A	MAA	USDB1	Invitée

Promotion 2017-2018

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université de Blida 1

Faculté des Sciences de Vie et de la Nature

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Option : Génétique

Thème :

L'impact du Test sérologique sanguin Kastel Meyer sur le profilage ADN à partir de traces infimes

Présenté par :

MEFTAH LATIFA

REDAOUIA IKRAM

Soutenu le : 26-06-2018

Devant le jury :

Mme KEBASS.S	MCB	USDB1	Présidente
Mme LOUNACI.L	MAB	USDB1	Examinatrice
Mme GUESSAIBIA.N	MCB	USDB1	Promotrice
Mme BELABAS.S	Ingénieur d'état	LPS(DGSN)	Co-Promotrice
Mme EDDAIKRA .A	MAA	USDB1	Invitée

Promotion 2017-2018

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Nos remerciements s'adressent d'abord aux membres du jury, Mme KEBASSE.S et Mme LOUNICI,L pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous tenons, à exprimer nos gratitude à madame GUESSAIBIA. N , notre promotrice pour avoir accepté de diriger notre travail, malgré ses obligation, pour ses précieux conseils, sa regard critique a la rédaction de ce manuscrit, et surtout pour son soutien tout le long de ce travail.

Nos vifs remerciements s'adresse à :

Monsieur FERRAGH .A , Contrôleur de police, Directeur de la police judiciaire .

Monsieur ZEKRI .M, Contrôleur de police, et sous Directeur de la police Scientifique et technique

Monsieur BRAHITI.H commissaire principal de la police et chef de service du laboratoire de l'identification génétique.

Mme BELKHIRAT .S commissaire principal de la police et chef de département de l'identification génétique , de nous avoir accueillies au sein de son établissement, et de nous avoir offert la possibilité de réaliser ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à notre co-promotrice Mlle BELABAS.S Ingénieur d'état au département d'identification génétique pour le temps qu'elle nous a accordée, sa gentillesse, sa modeste et sa disponibilité, merci infiniment.

Mme HACINI. I et Mademoiselle MADJDOUB.M , pour le temps qu'elles nous ont consacré et leur gentillesse.

Aussi pour toutes les personnes du département d'Identification Génétique du Laboratoire Central de Police Scientifique et section ADN en particulier.

Nous tenons à remercier aussi tous nos enseignants qui ont participé à notre formation tout au long de notre cursus, sans oublier madame EDDAIKRA. A pour l'aide qu'elle nous a apportée lors des analyses statistiques.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde a moi, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon coeur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore. Que dieu t'a procure bonne santé et longue vie.

*Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à mes frères **Rachid** et **Rabeh** et mes sœurs **Farida** , **Moubaraka**, **Ibtissam** et **karima** ,à mes belles sœurs **Zahia** et **Fadia** ,sans oublier ma nièce **Meriem**, et mes neveux **Hicham**, **Aimen** et **Mouhamed** je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, amour et encouragements.*

*Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude, et frères de cœur, toi **Assma** , **Ahlem** et **Imen** .*

*Aux mes chères collègues **Naima**, **Hiba** et **Amina** pour l'aides et le soutien durant la réalisation de ce travail.*

*A mon binôme **Ikram** et toute la famille **Redaouia** .*

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit possible, je vous dis merci.

Q. H. F. F.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A mes chère sœurs IMEN et IHSEN, je dédie ce travail dont le grand mérite leur revient en premier lieu pour leur aides et encouragement, et leur soutien moral.

A mes neveux ANES et MOHAMED, ma nièce TASSNIM. .je souhaite le succès et la réussite dans leur vie.

A ma tante KHIERA et ces enfants ANIS , RAOUAN , RITADJ

A tous les membres de ma famille, petits et grands, veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

A ma très chère binôme MEFTAH LATIFA, en lui souhaitant le bonheur et succès dans sa vie, et toute sa famille.

MORSEM

Résumé

Durant la dernière décennie les analyses génétiques constituaient le principal recours de la police scientifique pour la résolution des affaires criminelles. Le sang est l'une des traces les plus importantes de preuves biologiques qui peuvent être recueillies pour les analyses médico-légales, notamment les tests présomptifs, tels que le test Kastel Meyer qui est un test chimique sensible et rapide pour la mise en évidence des traces de sang. L'impact du test Kastel Meyer sur la quantité d'ADN et la génération de profils génétiques a fait l'objet de ce travail. Un total de 32 échantillons prélevés sur des écouvillons, ainsi que des supports solides (pièce métallique –bois), est testé directement et indirectement par ce test .

Les résultats obtenus après les processus d'extraction par la méthode de la chimie des billes magnétiques (Kit Adem Tech) et la quantification par PCR en temps réel montrent que la concentration d'ADN récupérée à partir des échantillons testés directement par Kastel Meyer est plus faible que ceux testés indirectement.

Cette étude a révélé que les composants du test KM interfèrent avec la trace, en diminuant le potentiel de générer un profil d'ADN , lorsqu'il est appliqué directement sur des traces infimes de sang. Une approche alternative est proposée pour améliorer la sensibilité du test de KM tout en conservant la possibilité d'obtenir un profil ADN, il s'agit d'effectuer le test KM-indirect.

Mots clés : sang, test présomptif, Kastel Meyer, ADN, profil génétique, test direct et indirect, bille magnétique, PCR.

Abstract

Genetic analysis was the use of forensics for the resolution of criminal cases. Blood is one of the most important forms of biological evidence that can be recovered for forensic analysis including presumptive tests such as the Kastle Meyer test which is a sensitive and rapid chemical test for the evidencing of traces of blood.

The impact of the Kastle Meyer test on the amount of DNA and the generation of genetic profiles is the focus of this work. A total of 32 specimens collected on swabs as well, solid supports (piece metal -wood) are tested directly and indirectly by this reagent

The results obtained after the extraction processes using magnetic beads (adem tech kit) and real-time PCR quantification shows that the concentration of DNA recovered from the samples tested directly by Kastle Meyer is lower than the one tested indirectly.

This study revealed that KM test components interfere with trace by decreasing the potential to generate a DNA profile when applied directly to small amounts of blood traces. An alternative approach is proposed to improve the sensitivity of the KM test while maintaining the possibility of obtaining a DNA profile; it is to perform the KM-indirect test.

Keywords : The Blood , presumptive test, Kastle Meyer, DNA, genetic profil, direct and indierct test, magnetic beads, PCR .

ملخص

خلال العقد الماضي كان التحليل الجيني ملاذ الشرطة العلمية من أجل حل القضايا الجنائية، حيث يعتبر الدم أحد أهم الأدلة البيولوجية التي يمكن استخدامها خلال تحليل الطب الشرعي من خلال استخدام اختبارات كيميائية حساسة و سريعة من أجل الكشف على آثار الدماء مثل اختبار KM

إن تأثير KM على كمية الحمض النووي و تحديد المواصفات الجينية هو هدف هذه الدراسة حيث تم تطبيق هذا الاختبار بطريقة مباشرة و غير مباشرة من خلال استخدام 32 عينة من بينها écouvillons وقطعتي خشب و حديد.

تظهر النتائج المحصل عليها بعد استخلاص الحمض النووي عن طريق الخرز المغناطيسي وتقييم المردود الكمي عن طريق PCR إن كمية الحمض النووي المستخلصة من العينات التي تم اختبارها مباشرة أقل من تلك التي تم اختبارها بطريقة غير مباشرة بواسطة KM كشفت هذه الدراسة أن إحدى مكونات اختبار KM تأثر علي توليد النمط الوراثي. من أجل الحفاظ على المواصفات الجينية يجب التطبيق الغير مباشر لاختبار KM على عينات الدم الطفيفة.

كلمات البحث: الدم , اختبارات كيميائية , Kastel Meyer الحمض النووي, المواصفات الجينية , التطبيق الغير مباشر و المباشر, الخرز المغناطيسي, PCR.

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'ADN mitochondrial montrant la répartition des parties fonctionnelles et les deux régions fréquemment analysées en génétique criminalistique.....	5
Figure 2 : Schéma d'un microsatellite.....	8
Figure 3 : Mécanisme du test kastle-Meyer.....	15
Figure 4: Schéma de principe du test de détermination de l'origine humaine du sang.....	16
Figure 5 : Schéma explicatif du principe de la sonde Taq Man.....	19
Figure 6: Evolution de la quantité d'amplicons en fonction du nombre de cycles de PCR.....	20
Figure 7 : Modes de formation des stutters : a : réplication normale, b : apparition d'un stutter en raison d'un glissement en arrière, c : formation d'un stutter par glissement en avant de la polymérase.....	23
Figure 8: Recombinaison inégale et délétion/fusion. La recombinaison inégale conduit à la formation de gamètes porteurs soit d'une délétion, soit d'une duplication	24
Figure 9 : Schéma d'instrument de l'électrophorèse capillaire utilisé pour l'analyse de l'ADN.....	25
Figure 10 : traces du sang sur un support solide (bois).....	27
Figure 11 : trace du sang sur un support métallique	28
Figure 12 : Résultats de test OBTI.....	30
Figure13: Résultats de teste kastle Meyer indirect.....	38
Figure 14 : Résultats de teste kastle Meyer direct.....	38
Figure 15: Résultats de teste kastle Meyer sur les supports (métal et bois).....	39
Figure16 : Résultat positif du test OBTI	39

Figure17 : Présentation graphique de la concentration d'ADN des échantillons testés directement et indirectement par Kastel Meyer.....	41
Figure18 : Profil génétique obtenu à partir de l'échantillon de 10ul testé indirectement KM.....	44
Figure 19 : Profil génétique obtenu à partir de l'échantillon de 10ul testé directement par KM.....	45
Figure 20 : l'intensité des pics mesurée en RFU (Relative Fluorescence Unit) pour le profil STR obtenu à partir de l'échantillon testé indirectement et directement par KM successivement.....	46
Figure 21 : Profil génétique obtenu à partir de l'échantillon de 05ul indirectement par KM.....	47
Figure 22 :Profil génétique nul obtenu à partir de l'échantillon de 05ul directement par KM.....	48
Figure 23 : Profil génétique partiel obtenu à partir de l'échantillon testé indirectement par KM	49
Figure 24 : Profil génétique nul obtenu à partir de l'échantillon testé directement avec KM	50

Liste des Tableaux

Tableau I : liste des loci STR de chromosome Y utilisée en analysé forensique.....	4
Tableau II : Liste des loci analysés sur l'ADN autosomal.....	11
Tableau III : Résultats de la quantification d'ADN extrait (en ng/ μ l) à partir des traces infimes sur deux variantes ; le test KM-indirecte et le test KM- directe	40
Tableau IV: test chi-deux pour les échantillons testés directement et indirectement par Kastel Meyer.....	42
Tableau V : Comparaison entre nos résultats et les résultats des articles précédant.....	52

Liste des Abréviations

ABI:	Applied Biosystem
AND:	Acide Désoxyribo Nucléique
ADN mt :	Acide Désoxyribo Nucléique mitochondriale
ARN :	Acide Ribo-Nucleique
CCD :	Charge Coupled Device
CE :	électrophorèse capillaire
Cm :	Centimètre
DTT :	Dithiothréitol
Dntp :	desoxynucleoside triphosphate
FAM :	carboxyfluorescéine
HaeIII:	Haemophilus aegyptius
Hinfl:	Haemophilus influenza
HV :	région hyper variable
ID+ :	Identifiler plus
INDEL :	insertion-délétion
IPC :	Internal PCR Control
KM :	kastel Meyer
Kpb :	Kilo paire de base
Mgcl2 :	chlorure de magnésium
NAOH :	Sodium hydroxyde
Ng :	nano-gramme
PAR :	Région pseudo-autosomique
Pb :	paire de base
PCR :	Polymerase Chain Reaction

PK:	Protéinase K
POP:	Performance Optimised Polymere
QPCR:	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RFU:	Relative Fluorescent Unit
Rpm:	rotation par minute
SNP:	Single Nucleotide Polymorphisms
STR:	Short Tandem Repeat
Taq:	Thermus aquaticus
Trs:	Tours
UV:	Ultra Violet
VNTR:	Variable Number of Tandem Repeat
NRY :	Région non Recombiné de chromosome Y
Zn :	Zinc

Glossaire

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

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

Allèle drop out (ADO ou élimination d'allèle) : phénomène au cours duquel un des deux allèles n'est pas amplifié par PCR.

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

Amplicon : fragment d'ADN amplifié par PCR.

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

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

Electrophorèse capillaire : processus de séparations.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : synthèse bibliographique	
I- Génome et Criminalistique	3
I-1Génome Humain.....	3
I-2 Chromosome Y.....	3
I-3ADN Mitochondrial.....	4
I-4 Polymorphismes de l'ADN.....	6
I-4 .1 polymorphisme de longueur RFLP.....	6
I-4 .2 Polymorphisme de répétition	6
I-4 .2.1 Single Nucléotide Polymorphisme (SNP).....	6
I-4.2.2 Polymorphisme d'insertion-délétion ou « INDEL ».....	7
I-4.2.3 Les Séquence Minisatellites ou « VNTR ».....	7
I-4.2.4 Les Séquences microsatellites ou « STR ».....	7
II.- Développement des STR en criminalistique.....	8
III- Traces biologiques d'ADN	12
III-1 Source biologique d'ADN.....	12
III-1.1 Sang.....	12
III-1.2 Le sperme	12
III-1.3 Salive	12
IV-Méthodes et tests de révélation des traces de sang en criminalistique.....	13
IV-1 Le luminol.....	13
IV-2 Test adler.....	13
IV-3 Test au leuco-malachite vert	13
IV-4 Test de Thevenon- Rolland	13
IV-5 Test Kastel Meyer.....	13

IV-5.1 Définition.....	13
IV-5.2 Mécanisme.....	14
IV-5.3 Avantage	15
IV-6 Détermination de l'origine humaine du sang.....	15
IV-6.1 Test immunochromatographique du sang humain.....	15
V- Les Méthodes d'analyse d'ADN	16
V-1 L'extraction de l'ADN	16
V-1.1 Extraction organique.....	17
V-1.2 Extraction au Kit « DN-Adem tech ».....	17
V-2 Quantification de l'ADN par PCR « en temps réel ».....	18
V-3 Amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction).....	20
V-3.1 Composants de la PCR	21
V-3.2 Etapes de la PCR.....	21
V-3.3. Anomalies	22
V-3.3.1 Allèles micro-variants	22
V-3.3.2 Allèles nuls et allèles drop out	22
V-3.3.3 Stutters	22
V-3.3.Tri-allélisme	23
VI - Electrophorèse capillaire.....	24
VII -Etablissement de profil génétique	25

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I -Préparation des échantillons	27
I-1 Matériel biologique.....	27
I-2 Méthode.....	27

I- 2-1 Préparation des prélèvements sanguins sur écouvillons	27
I- 2-2 Etude sur des supports solides	27
II- examen et mise en tube.....	28
II-1 Le test kastel Meyer	29
II-1-1 Le test kastel Meyer direct.....	29
II-1-2 Le test kastel Meyer indirect.....	29
II-2Le test OBTI.....	29
III- Extraction de l'ADN à l'aide du kit Adem- Tech.....	30
III-1 La lyse	30
III-2 Liaison de l'ADN génomique aux billes magnétiques	30
III-3Lavages.....	31
III-4 Séchage.....	32
III-5 Elution de l'ADN.....	32
IV-Quantification de l'ADN par PCR en temps réel.....	33
V- Amplification de l'ADN par PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	34
VI-Post-PCR	35
VII-Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse capillaire.....	36
VII-1Analyse et validation des résultats.....	37
VII-2 Interprétation des résultats.....	37
Chapitre III : Résultats et Discussion	
I-Résultats des tests préliminaires.....	38
II- Résultats de la quantification de l'ADN	39
III- L'effet de test Kastel Meyer sur le rendement d'ADN	42
IV-Détermination de profils génétiques.....	43

V- Discussion.....	51
Conclusion.....	55
Références Bibliographique	
Annexes	

Bien que récent à l'échelle de la science, le recours à l'identification par empreintes génétiques en criminalistique initié en 1983 par Sir Alec Jeffreys est devenu de nos jours un élément technique incontournable au sein de l'enquête judiciaire. (Hoai *et al*, 2017)

La criminalistique, que l'on dénomme aussi science forensique, est définie comme étant l'ensemble des techniques et des méthodes d'analyses adaptées au service de l'enquête judiciaire.

Dans le cadre d'une affaire judiciaire, les traces biologiques laissées par l'auteur de crime ou la victime doivent être suffisamment discriminants pour être utilisées comme outils d'identification et de comparaison. Cette identification est basée sur le polymorphisme des individus, autrement dit les variations individuelles des séquences d'ADN dénommées marqueurs en criminalistique (Hoai *et al*, 2017).

Le principe d'identification des individus repose sur l'analyse du polymorphisme de courtes séquences de nucléotides répétées en tandem, appelées microsatellites ou STR (*Short Tandem Repeats*) (Hoai *et al*, 2017).

Tout individu laisse son ADN un peu partout : sur une brosse à dents, un mégot de cigarette, un cheveu pris dans les mailles d'un bonnet, ou encore du sperme, et plus systématiquement dans les traces de sang (Doutremepuich *et al*, 2010).

L'analyse du sang commence toujours par un examen minutieux à l'œil nu du scellé souillé, en décrivant la morphologie de la tache : giclée, trainée, gouttelette...etc. Cet examen en effet, conditionne leur prélèvement.

Une fois prélevée, la tache est soumise à la vérification systématique de la présence de sang à l'aide de tests chimiques. Ces tests de mise en évidence sont basés sur les propriétés peroxydasiques de l'hémoglobine du sang.

Le test de Kastel Meyer (KM) est une analyse de sang présomptive, d'abord décrite en 1903, dans lequel l'indicateur chimique est la phénolphtaléine qui est utilisé pour détecter la présence possible d'hémoglobine. Ce test est une forme d'analyse de sang catalytique, une des deux classes principales de tests médico-légaux, généralement employés par des laboratoires de police scientifique dans l'identification chimique du sang (Walker et Wood, 2006).

Introduction

Dans notre présent travail, nous nous sommes intéressées à l'impact du test sérologique Kastel Meyer sur la génération des profils génétiques. Nous avons deux variantes pratiques de ce test, le test KM-indirect et le test KM- direct, dont le dernier est effectué en appliquant des réactifs directement sur une trace infime de sang suspecte.

I. Génome et criminalistique

I.1 Génome Humain

Le génome humain, est constitué de 6 milliards de paires de bases (Pb) comporte environ 35000 gènes (International Human Genome Mapping Consortium, 2001 ; Venter *et al*, 2001).

Cependant l'ADN est constitué de deux parties distinctes. La première contient des régions codantes, qui sont responsables de l'expression des protéines. Alors que la deuxième partie qui contient des régions non codantes, représente plus de 90% du génome, c'est-à-dire qu'elle ne comporte pas d'information en rapport direct avec la synthèse des protéines, une grande partie de cette séquence d'ADN non codante est répétitive ; la même séquence est répétées à plusieurs reprises que ce soit en tandem ou dispersée dans le génome (Venter *et al*, 2001).

Certaines parties non codantes de l'ADN sont semblables chez tous les être humains, alors que d'autres varient considérablement d'une personne à une autre, c'est cette variabilité qui permet de distinguer des individus grâce à l'analyse d'ADN (Butler, 2005) .

Des marqueurs polymorphes qui diffèrent d'un individu à l'autre se focalisent dans les régions non codantes, sont appelés loci . Ainsi, Des milliers de loci ont été caractérisés et cartographiés à des régions particulières de chromosomes humains grâce au projet du génome humain. Une copie de chaque locus réside à la même position sur chaque chromosome de la paire homologue .Les deux allèles d'un locus peuvent être hétérozygotes, ceci est dû au phénomène mutationnel qui se produit au fil du temps (Wyman *et al* ,1980) .

I.2 le chromosome Y

Le chromosome Y est présent uniquement chez les mâles, il est de longueur de 57701691bp, il renferme 104 gènes, dont 76 parfaitement connus, et 30623 SNPs. Le chromosome Y est formé de 2 parties distinctes, séparées par une région riche en séquences *Alu*. Les régions homologues aux chromosomes X et Y sont situées à chaque extrémité des deux bras du chromosome Y et appelées régions pseudo-autosomiques, *PAR1* et *PAR2*. La région pseudo-autosomale, située sur la partie la plus distale du bras supérieur (*PAR1*, sur le bras Yp), subit une recombinaison obligatoire pendant la méiose, avec une région homologue de la portion distale du bras supérieur du chromosome X . (Gusmaõ et Carracedo ,2003)

En 2003, la communauté scientifique américaine (*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, SWGDAM*) a défini 9 microsatellites du chromosome Y définissant l'haplotype

"minimal" et deux marqueurs supplémentaires créant l'haplotype "étendu", qui font partie des kits pour application en criminalistique commercialement disponibles aujourd'hui (Petkovski, 2006).

Tableau I : liste des loci STR de chromosome Y utilisée en analysé forensique (Petkovski, 2006)

Minimal haplotype	Extended haplotype	PowerPlex [®] Y	AmpF/STR [®] Yfiler [®]
DYS19	DYS19	DYS19	DYS19
DYS385 a/b	DYS385 a/b	DYS385 a/b	DYS385
DYS389 I	DYS389 I	DYS389 I	DYS389 I
DYS389 II	DYS389 II	DYS389 II	DYS389 II
DYS390	DYS390	DYS390	DYS390
DYS391	DYS391	DYS391	DYS391
DYS392	DYS392	DYS392	DYS392
DYS393	DYS393	DYS393	DYS393
	DYS438	DYS437	DYS437
	DYS439	DYS438	DYS438
		DYS439	DYS439
			DYS448
			DYS456
			DYS458
			DYS635
			GATA H4

Il existe de nombreuses applications à l'analyse du chromosome Y : lors d'agressions sexuelles (criminalistique), de recherche de personne disparue, de test de parenté, ou encore lors de recherche anthropologique ou généalogique (Loistron ,2009) .

I.3 ADN mitochondriale

Selon les espèces, il représente 1 à 5 % de l'ADN total. La mitochondrie est un petit organite cytoplasmique. Elle contient un petit génome circulaire (chondrome), de 16569 pb, formé de deux brins H et L (selon la composition en guanine et en cytosine), avec 37 gènes codants (Anderson *et al.*,1981). Ce génome code pour les chaînes polypeptidiques nécessaires au fonctionnement de la mitochondrie et pour les ARN , toute ses séquences sont codantes (Loistron, 2009).

Deux régions d'ADN mt retrouvées dans la région de contrôle sont avérées fortement polymorphes dans la population humaine, celles-ci sont : la région hypervariable I (HV1), avec une longueur de 342 Pb ,et la région hypervariable II (HV2) , avec une longueur de 268pb .L'analyse de

ces deux régions se fait par séquençage et les résultats sont obtenus par comparaisons avec une séquence de référence (Doutremepuich, 2012).

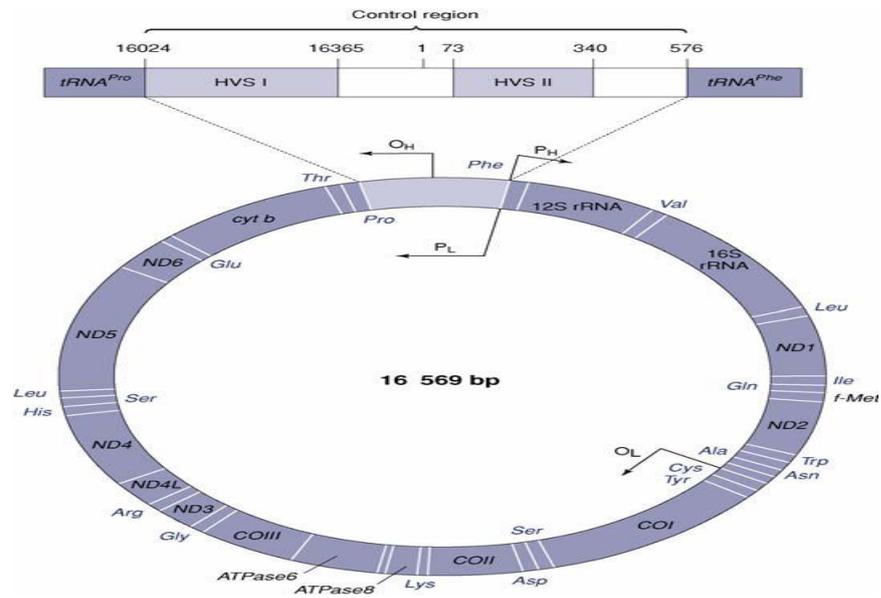


Figure 1 : Représentation schématique de l'ADN mitochondrial montrant la répartition des parties fonctionnelles et les deux régions fréquemment analysées en génétique criminalistique (Jobling *et al*, 2004).

L'ADNmt présente les caractéristiques suivantes (Giles *et al*, 1980):

- La transmission de l'ADN mt aux descendants s'effectue exclusivement par la lignée maternelle ;
- L'absence de recombinaison génétique sur l'ADN mt ;
- Le taux de mutation de l'ADN mt est de 5 à 17 fois supérieures à celui de l'ADN nucléaire. En effet les processus de réparation des erreurs lors de la réplication et de la transcription de l'ADN mt sont peu nombreux ;
- Le nombre élevé de copies de molécules d'ADN mt (environ 500 mitochondries par cellule mammalienne contenant une dizaine de copies d'ADN par mitochondrie) ;
- La région de contrôle de l'ADN mt est très polymorphe et présente un taux de mutation approximativement dix fois supérieur à la région codante (Parsons et Cobel , 2001).

I.4 Polymorphismes de l'ADN

I.4.1 polymorphisme de longueur RFLP

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) résulte de variations individuelles de localisation des sites de coupures d'enzymes de restriction , générant une variabilité dans la longueur des fragments digérés produits (Kaplan et Delpech, 1994 ; Butler , 2005).

Ces polymorphismes sont révélés par la méthode du southern blot, après digestion enzymatique (généralement par l'enzyme HinfI en Europe et par HaeIII aux Etats Unis) de l'ADN extrait afin d'observer , grâce à leur reconnaissance par une sonde marquée, des fragments différent par leur longueur (Botstein *et al* ,1980 ;Wyman *et al* ,1980)

I.4.2 Polymorphisme de répétition

I.4.2.1 Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)

Les SNPs sont des marqueurs bi-alléliques correspondant à la substitution d'un seul nucléotide à une position spécifique dans le génome (Loistron , 2009) .Il est rapporté que les SNPs sont issus de mutations survenues dans les cellules germinales et ayant échappé au système de réparation de l'ADN (Butler,2005)

Le défaut principal des SNPs en génétique criminalistique est leur polymorphisme très limité. Toutefois, on peut aisément compenser ce faible polymorphisme par l'analyse de nombreux SNPs. La puissance combinée des SNPs permet d'obtenir un pouvoir de discrimination élevé ;il est estimé que pour atteindre le même pouvoir de discrimination de 10 STRs, il faudrait analyser entre 50 et 80 SNPs (Krawczak, 1999 ; Gill, 2001).

I.4.2.2 Polymorphisme d'insertion-délétion ou « INDEL »

Les Indels constituent une autre forme de polymorphisme bi-allélique, qui peuvent être des insertions ou des délétions de segments d'ADN variant de un à une centaine de nucléotides. Le

polymorphisme biallélique indel présente donc le plus souvent une différence de longueur de quelques nucléotides (Weber *et al*, 2002).

Environ 71% de ces indels présentent de 2 à 4 nucléotides de différence et seulement 4% présentent une différence de plus 16 nucléotides de longueur. Ces marqueurs bialléliques sont facilement typés et peuvent être utiles en identification humaine car leur taux de mutation est beaucoup plus faible que celui des STRs (Butler, 2005).

I.4.2.3 Les Séquences Minisatellites ou « VNTR »

Les minisatellites ou nombre variable de répétitions en tandem (VNTR) sont des régions qui contiennent un haut degré de polymorphisme (Decorte et Cassiman, 1991).

Le motif de base de ces marqueurs compte entre 9 à 100 paires de bases. Il est répété entre 2 et 100 fois à chaque locus (Tautz, 1993 ; Loistron, 2009). Ce qui aboutit à des fragments de 500 pb à 20 Kpb. Les minisatellites se trouvent plus fréquemment dans les régions proches des télomères mais ils peuvent être aussi présents sur d'autres sites chromosomiques (Petkovski, 2006).

L'analyse de ces séquences par Southern blot cependant, consomme beaucoup d'ADN et n'est pas applicable à des échantillons d'ADN dégradés, souvent récupérés à partir de liquides organiques trouvés sur les lieux du crime (Decorte et Cassiman, 1991).

I.4.2.4 Les Séquences microsatellites ou « STR »

Le caractère polymorphe des régions non codantes est dû à de nombreuses séquences répétitives d'acides nucléiques, dont par exemple les STRs (Short Tandem Repeat) ou microsatellites, pour lesquels le nombre de répétitions varie d'un individu à l'autre. Ce sont ces dernières qui sont analysées en sciences forensiques (Robertson, 1990; International Human Genome Mapping Consortium, 2001; Venter *et al*, 2001).

Le motif de base des microsatellites ou STRs, compte entre 2 et 6 pb et est réitéré entre dix et environ cinquante (10 à 50) fois à chaque locus, générant des allèles variant en taille entre 50 et 500 pb (Litt et Luty, 1989; Tautz, 1989).

Les STRs ont une distribution plutôt uniforme dans le génome, avec la présence d'un locus tous les 6 à 10 kb (Beckman et Weber, 1992). Leur variabilité semble principalement liée à des dérapages de réplication (Di Rienzo *et al*, 1994).

Certaines séquences STRs ont été choisies pour être utilisés en criminalistique car elles comportent généralement une répétition en tandem de seulement trois ou quatre paires de bases, qui peuvent être répétées dans la molécule d'ADN plusieurs fois ou plusieurs dizaines de fois. Évidemment, une unité de trois ou quatre paires de bases seulement est extrêmement petite, ce qui constitue à la fois un problème et un avantage pour les fins escomptées. (Butler *et al*, 2007)

L'avantage est qu'une très petite quantité d'ADN, même très dégradé, peut être suffisante pour être utilisée en criminalistique (Butler *et al*, 2007). Le problème, est que pour pouvoir procéder efficacement à une analyse, il faut grandement augmenter le nombre des très courtes séquences d'ADN. On y parvient grâce à l'utilisation d'une technique appelée PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne).

Le pouvoir de discrimination élevé fait de ces polymorphismes des marqueurs de choix pour l'identification des individus. Actuellement, plus de 10⁴STRs ont été découverts, mais plus d'une vingtaine environ sont couramment analysés dans le domaine médico-légal (Ruitberg *et al*, 2001), tels que le D8S1179 et l'amélogénine.

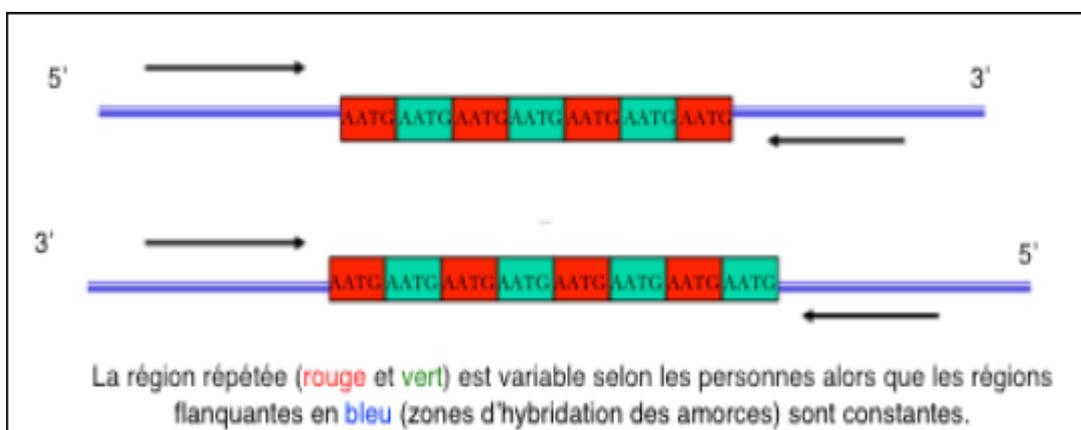


Figure 2 : Schéma d'un microsatellite (Ricordel, 2015).

II. Développement des STR en criminalistique

Les séquences STR ont été choisies pour être utilisées en criminalistique car une très petite quantité d'ADN, même très dégradé, peut être suffisante pour être utilisée en criminalistique (Butler *et al*, 2007).

L'utilisation des marqueurs STR ne nécessite qu'un nombre limité de marqueurs sur les milliers de microsattellites générés à des fins de cartographie génétique. Les marqueurs sélectionnés en identification humaine doivent toutefois posséder plusieurs caractéristiques (Schumm, 1996; Buckleton *et al*, 2004) :

- Les loci STR sont choisis en fonction de leur localisation sur le chromosome, l'absence de liaison génétique avec d'autres marqueurs sélectionnés étant nécessaire.
- Les allèles doivent être non codants et polymorphes, seuls les STR qui présentent un degré élevé de variabilité dans la population générale devant être sélectionnés.
- Le taux de mutation des marqueurs sélectionnés pour les tests de paternité doit être extrêmement faible pour éviter de fausses exclusions des pères présumés.
- Les produits amplifiés doivent être facilement séparés par électrophorèse, ce qui implique le rejet des marqueurs complexes hypervariables.
- Une faible probabilité de correspondance fortuite doit caractériser chaque locus STR, avec une hétérozygotie observée supérieure à 70 %. Un pouvoir de discrimination élevé sur l'ensemble des marqueurs sélectionnés est indispensable, habituellement supérieur à 0,9.
- La longueur des allèles doit être dans la gamme 90-500 pb pour éviter le phénomène d'amplification préférentielle des petits fragments. Par ailleurs, plus le poids moléculaire des allèles est élevé, moins précise est leur mesure. Les allèles les moins longs sont moins affectés par la dégradation et sont donc moins susceptibles de présenter des allèles drop out qui est un phénomène au cours duquel un des deux allèles n'est pas amplifié par PCR
- La faible prévalence des stutters qui sont des produits secondaire inévitable observés lors de l'amplification des STRs et se produit généralement à une unité répétée plus courte que l'allèle parent pour les marqueurs sélectionnés doit être une règle.
- La possibilité d'amplification et de détection de très faibles quantités de matrice ADN (généralement 1 ng) doit être considérée.
- La robustesse, la fiabilité et la reproductibilité des données sont essentielles.

Les différentes étapes intervenant dans le développement et la caractérisation des loci STRs en génétique médico-légale inclut (Carracedo, 2004; Butler *et al*, 2007) :

- La sélection des loci STR dans la littérature.
- La conception d'amorces PCR.
- La mise au point de PCR monoplexe pour chaque marqueur.
- La création des brins et des panels dans GeneMapper ID.
- La construction de l'échelle allélique (ladder).
- L'analyse des STRs en PCR multiplexe.
- L'étude de ces variations génétiques dans les populations d'intérêt (fréquence, hétérozygotie, liaison génétique, pouvoir de discrimination, ...).
- L'établissement de la nomenclature des allèles par séquençage.
- L'évaluation de la probabilité de correspondance fortuite pour les loci STR.
- La détermination du taux de mutation des STR sur un ensemble d'échantillons.
- La détermination du taux de mutation des STR sur les amorces PCR.
- L'évaluation de la performance des marqueurs mis au point avec d'autres laboratoires ou organismes de recherche.
- La publication des données et des résultats.

Le domaine criminalistique s'intéresse à analyser 15 STR autosomaux localisés sur tout le génome qui sont représentés dans le tableau II

Tableau II : Liste des loci analysés sur l'ADN autosomal (Doutremepuich, 2012)

Locus	Chr	Position	Taille des fragments	Motif Répété	Echelle allèlique
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 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 pb à 140 pb	(AAGG)n	Entre 9 et 18.2
vWA	12	12p12pter Située dans l'intron 40 du gène humain VWA	De 135 à 167 pb	(TCTR)n	Entre 11 et 22
TPOX	2	2p13 Située dans le gène de la thyroïde -péroxydase	De 232 à 248 pb	(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

III. Traces biologiques d'ADN

En criminalistique, les traces biologiques exploitables correspondent à des substances issues des êtres vivants, échangées ou laissées sur une scène de crime dans le cadre de crimes de sang, d'agressions sexuelles ou de cambriolages, à titre d'exemple, les enquêtes s'intéressent particulièrement à des traces qui pourraient être détectées lors de l'investigation des lieux. Le laboratoire en charge devra alors déterminer si la trace est de nature biologique (Godwin *et al*, 2007 ; frumkin *et al*, 2010)

III.1 Source biologiques d'ADN

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, le sang, le sperme, les éléments pileux et les cellules épithéliales (Doutremepuich *et al*, 2010)

III.1.1 Sang

Le sang est une suspension de cellules (les globules rouges et les globules blancs) dans un liquide appelé le sérum. L'hémoglobine, protéine spécifique du sang, est contenue dans les globules rouges. A noter que les globules rouges ne sont pas des cellules normales : ils ne contiennent pas d'ADN. Tout l'ADN présent dans notre sang provient donc de nos globules blancs que l'on trouve à raison d'environ 5'000 - 10'000 cellules par μl (soit 5 - 10 milliards de cellules par litre) (Pun *et al*, 2008)

III.1.2 Le sperme

Le sperme est un liquide biologique de composition complexe, produit par les organes sexuels masculins. La densité du sperme en spermatozoïdes est en moyenne de 100.000cellules/ml et donc très riche en ADN, une trace de sperme devrait en principe fournir un résultat à l'analyse. la manière d'effectuer le prélèvement vaginal étant à cet égard déterminante pour détecter des spermatozoïdes à l'examen microscopique ne signifie pas l'absence totale de tout l'ADN de l'agresseur. Parfois on obtient le profil de l'agresseur à partir d'un prélèvement auquel aucun spermatozoïde n'était détecté à l'examen microscopique (Coquoz *et al*, 2003).

III.1.3 Salive

Au cours des dernières années la salive est devenue une très importante trace biologique pour les chercheurs du domaine forensique. Ce fluide corporel a gagné une popularité dans l'enquête

médico-légale et judiciaire en raison de sa collection facile, sa manipulation facile et surtout bénéficie d'un stockage simple et a faible cout (Pereira, 2014).

La substance la plus spécifique de la salive dont nous disposons actuellement est une enzyme, l' α -amylase. Là encore, pour tester sa présence, on s'appuie sur des tests, par exemple le test Phadebas (Coquoz *et al*, 2003).

IV. Méthodes et tests de révélation des traces de sang en criminalistique

Nous appelons « tests indicatifs », les tests de natures diverses qui permettent d'attester de la nature biologique d'une trace, ces tests indicatifs peuvent prendre pour cible des composés chimiques particulièrement concentrés dans certaines matières (Coquoz *et al*, 2003).

IV.1 Le luminol

Ce test utilise un réactif contenant une substance chimique appelée luminol ou aminophthaldazine, qui donne une luminescence bleue lorsqu'il est mélangé avec un oxydant (H_2O_2). La chimioluminescence du luminol a un maximum d'émission vers 440nm (Sourcebook, 1983 ; Coquoz *et al*, 2003).

IV.2 Le test adler

Ce test utilise la Benzidine ; une réaction positive se traduit par l'apparition de la coloration bleue lorsqu'il est mélangé avec un oxydant (H_2O_2). Ce produit connu pour être cancérigène a été abandonné par la plupart des laboratoires (Newton, 2007).

IV.3 Le test au leuco-malachite vert

Il utilise la 4-benzylidène bis N-N diméthylaniline qui donne une coloration verte lorsqu'il est mélangé avec un oxydant (H_2O_2) (Ricordel, 2015).

IV.4 Le test de Thevenon- Rolland

Il utilise la 4-diméthylaminoantypyridine qui donne une coloration violette lorsqu'il est mélangé avec un oxydant (H_2O_2) (Ricordel, 2015).

IV.5 Le test Kastel Meyer

IV.5.1 Définition

Le test Kastel-Meyer est un test chimique rapide et simple pour la détection des traces de sang, il est utilisé dans les analyses en science forensique (Sloots *et al*, 2017).

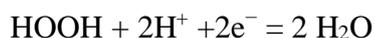
Il s'agit de l'un des tests les plus utilisés dans le monde anglo-saxon. Il donne une intense coloration rose-mauve en présence de sang (Coquoz *et al*, 2003).

IV.5.2 Mécanisme

Ce test utilise un réactif formé par un mélange de phénolphtaléine, d'hydroxyde de sodium et de zinc .

Ainsi , la phénolphtaléine utilisée dans ce test a été modifiée de sa forme conventionnelle, puisqu'elle a été réduite par deux électrons et est pré-dissoute dans la solution alcaline. Ceci est typiquement réalisé en faisant bouillir une solution alcaline de phénolphtaléine avec le zinc en poudre, qui réduit la phénolphtaléine. Sur la réduction, la couleur rose très intense de la forme cationique de phénolphtaléine s'efface à une couleur jaune faible. C'est cette forme de phénolphtaléine qui est présente dans le test de Kastel-Meyer. Pour produire la couleur rose intense indicative d'un test positif, la phénolphtaléine réduite doit être oxydée par rapport à sa forme normale, colorée (Walker et Wood ,2006).

Dans la réaction, l'eau oxygénée réagit avec l'hémoglobine dans le sang. La phénolphtaléine ne participe pas directement à ce processus ; au lieu de cela, elle agit comme une source externe d'électrons. Dans sa réaction avec l'eau oxygénée, l'hémoglobine se comporte comme une peroxydase, réduisant le peroxyde en eau. Cette activité épuise les électrons de l'hémoglobine qui sont, à leur tour, refournis par la phénolphtaléine. La donation d'électrons à l'hémoglobine convertit la phénolphtaléine incolore en phénolphtaléine intensément colorée. On montre la réduction catalysée d'hémoglobine de peroxyde qui arrive dans la réaction ci-dessous :



La consommation de protons pendant la réaction a l'effet d'augmenter le potentiel hydrogène de la solution, mais la quantité de base produite est négligeable comparée à la base présente déjà dans le mélange du réactif (Walker et Wood ,2006) (figure 3).

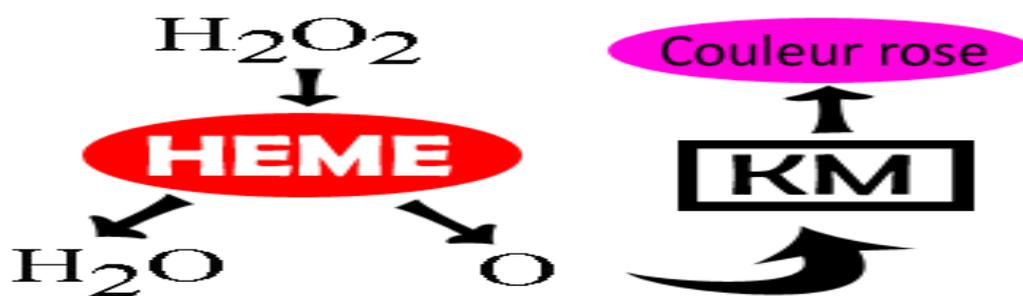


Figure 3: Mécanisme de test kastel-Meyer (Walker et Wood ,2006).

IV.5.3 Avantage

Le test KM est le test le moins coûteux, le plus facile à réaliser, et il donne rapidement des résultats. Il permet de révéler le sang en quantité très infime voire non-visible à l'œil nu. (Shanan *et al*, 2007).

IV.6 Détermination de l'origine humaine du sang

IV.6 .1 Test immunochromatographique du sang

Lorsqu'un test indicatif fournit un résultat positif, nous passons à l'autre étape qui est représentée par les tests immunochromatographiques, car ces derniers peuvent confirmer que le sang est de nature humaine en utilisant des anticorps qui interagissent spécifiquement avec l'hémoglobine humaine (Figure 4). La méthode dont l'utilisation est la plus simple, se déroule en une seule étape, par exemple le test OBTI (Coquoz *et al*, 2003). Ce test est réalisé grâce à un kit fourni qui est Hexagon OBTI.

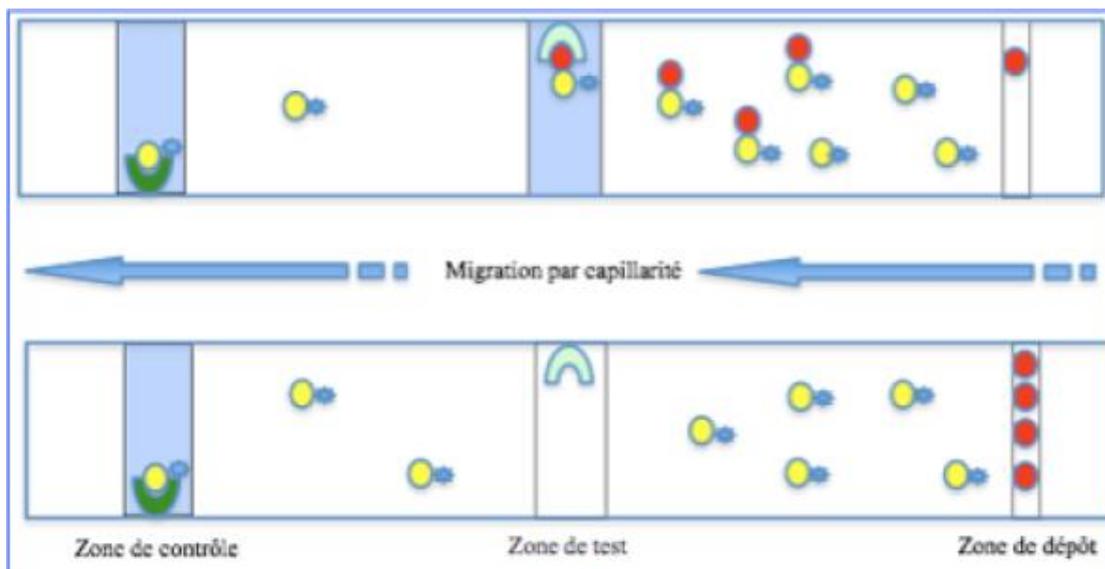


Figure 4 : Schéma de principe du test de détermination de l'origine humaine du sang (Ricordel , 2015).

L'échantillon est déposé sur le support du test ; l'hémoglobine humaine (rond rouge) réagit avec les anticorps anti-hémoglobine humaine (AC1) (rond jaune) conjugués à des particules bleues. Les complexes ainsi formés migrent et réagissent avec un deuxième anticorps anti-hémoglobine humaine (arc vert clair) : l'apparition d'une ligne bleue (en pratique l'apparition d'une ligne rose) dans la zone test indique un résultat positif. L'excès de réactif migre vers une seconde ligne pour réagir avec d'autre anticorps (vert foncé) antiAC1. Cette ligne, représentant le témoin lorsqu'elle devient bleue, elle indique le bon fonctionnement du test. La réaction est donc positive quand les deux lignes sont bleues. La réaction est négative quand seulement la zone de contrôle est bleue (Ricordel , 2015).

V. Les Méthodes d'analyse d'ADN

V.1 L'extraction de l'ADN

Les quantités d'ADN extraites varient d'un échantillon à un autre. Les prélèvements biologiques (sang, sperme, cheveux, salive), contenant souvent des substances qui peuvent inhiber l'amplification de l'ADN. L'extraction s'effectue soit avec la méthode classique organique phénol/chloroforme, soit avec la méthode de la chimie des billes magnétiques. L'ADN purifié ainsi récupéré est prêt à être quantifié et employé pour une amplification STR.

V.1.1 Extraction organique

L'extraction organique basée sur la méthode phénol-chloroforme a été progressivement éliminée dès le milieu des années 1990, principalement en raison de la nature toxique du phénol mais qui reste toutefois utilisée dans certains laboratoires d'Analyse génétique (Goodwin *et al* , 2007).

Cette méthode implique l'ajout en série de produits chimiques (tampon de lyse, protéinase k, DTT) qui permettent de lyser la membrane cellulaire et décomposer les protéines qui protègent les molécules d'ADN , ensuite un mélange de phénol-chloroforme est ajouté pour séparer les protéines de l'ADN . l'ADN est plus soluble dans la partie aqueuse que dans la phase organique ,si bien qu'après centrifugation ,les protéines indésirables et les débris cellulaires sont séparés de l'ADN double brin (Butler,2007).

La solution qui contient l'ADN sera encore purifiée pour éliminer tous les sels et inhibiteurs, soit en utilisant des systèmes de filtration ou la précipitation à l'éthanol.

Bien que le procédé d'extraction organique fonctionne bien, il prend du temps et nécessite l'utilisation de produits chimiques dangereux. De plus, le transfert de l'échantillon entre de multiples tubes augmente les risques d'erreur ou de contamination (Butler, 2007).

V.1.2 Extraction au Kit « DN-Adem tech »

Le Kit « DN-Adem tech » est spécialement conçu pour une extraction optimale de l'ADN à partir d'échantillons forensiques, il repose sur l'utilisation des billes magnétiques.

Après digestion enzymatique et solubilisation des lipides dans une solution spécifique, L'ADN chargé négativement est mis en contact avec des billes magnétiques chargées positivement afin qu'il s'accroche à celles-ci. La solution est éliminée alors que les billes sont maintenues à l'aide d'un aimant. Une autre solution de composition différente est ensuite ajoutée aux billes afin de neutraliser leur charge. L'ADN est alors libéré dans cette seconde solution (Gaboyard *et al*, 2015).

Ce kit a été développé pour améliorer l'efficacité de l'extraction de l'ADN à partir d'un large panel de types d'échantillons. Ces échantillons comprennent des taches de sang, des cheveux, des mégots de cigarettes, et des traces de contact, régulièrement rencontrées dans l'analyse de l'ADN médico-légal (Gaboyard *et al*, 2015).

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

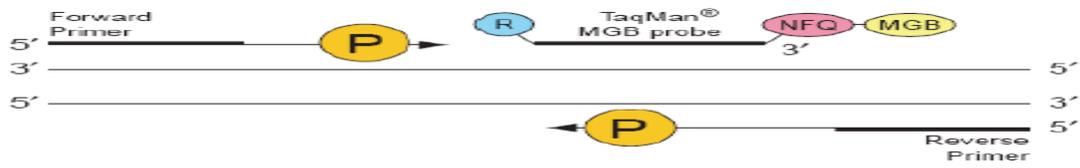
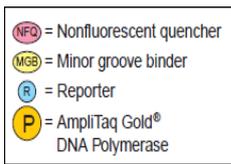
Principe

La PCR est basée sur une réaction enzymologique, et sur la mesure en continue de son produit (amplicon). A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN totale est détectée grâce à une sonde moléculaire spécifique dite TaqMan. La sonde TaqMan porte à son extrémité 5' une molécule fluorescente (fluorochrome) dite Reporter et à son extrémité 3' un Quencher.

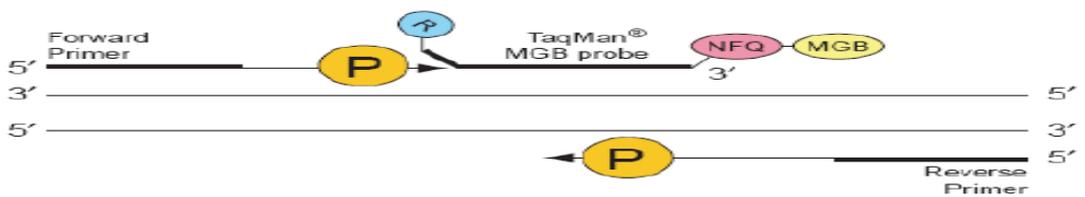
Le Reporter est une molécule qui, après excitation par un faisceau laser, émet un signal de fluorescence à une longueur d'onde spécifique qui est mesuré à la fin de chaque cycle de PCR.

En absence d'amplification, la sonde reste intacte, le Quencher (suppresseur) absorbe en grande partie la fluorescence du Reporter (émetteur) et seule une fluorescence résiduelle est émise. En revanche, s'il y a amplification, la sonde TaqMan est hydrolysée lors de l'étape d'élongation de l'ADN (activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase).

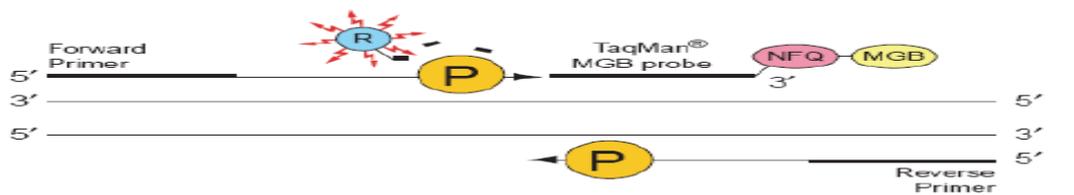
Le "Reporter" est alors libéré et sa fluorescence n'est plus absorbée par celle du Quencher. (figure 5) (User Manual, 2012) .



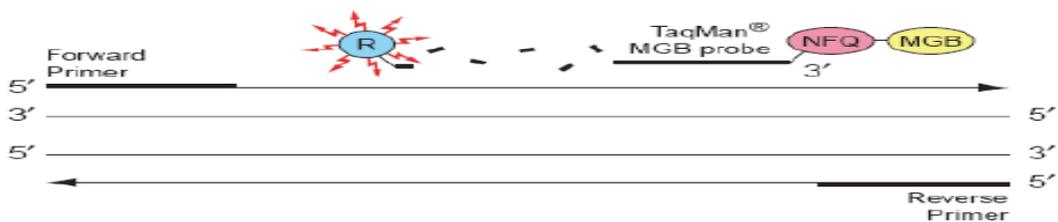
1. **Polymérisation** : Le reporter R , fluorescent (FAM) et le quencher (Q) non fluorescent sont attachés respectivement aux extrémités 5'et 3' de la sone Taq man .



2. **Déplacement** La sonde étant intacte, la fluorescence émise par le reporter et réprimée par le quencher .



3. **Clivage** Durant chaque cycle d'extension la polymérase clive le fluorophore de reporter.



4. **Fin de la polymérisation** :Une fois séparé du quencher , le reporter émet sa fluorescence caractéristique.

Figure 5: Schéma explicatif du principe de la sonde Taq Man (Guide Quantifiler kits, User Manual, 2012) .

L'obtention de la cinétique complète de la réaction de PCR permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible.

Les données de fluorescence sont exprimées en logarithme afin d'identifier facilement la phase exponentielle et mesurable qui prend alors une apparence linéaire. Cette partie alors appelée segment quantifiable permet de calculer la concentration d'ADN initiale (figure 6) (Pun *et al.*, 2008).

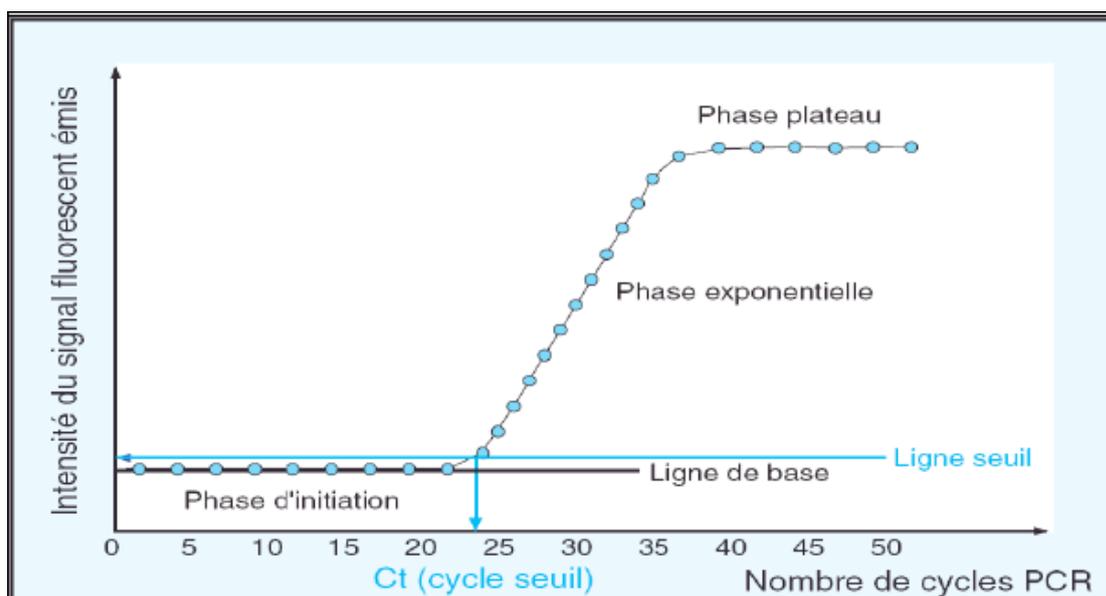


Figure 6 : Evolution de la quantité d'amplicons en fonction du nombre de cycles de PCR (Pun *et al.*, 2008).

V.3 Amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

La mise au point de la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) par K.Mullis et ses collaborateurs en 1988 a révolutionné la biologie moléculaire et la médecine moléculaire (Saiki *et al.*, 1988).

Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase. Il s'agit d'une répllication *in vitro* de séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de générer des dizaines de milliards d'exemplaires d'un fragment d'ADN particulier (séquence d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel).

En effet, si la séquence d'intérêt est présente dans l'extrait d'ADN, il est possible de l'amplifier sélectivement en très grande quantité. La puissance de la PCR repose sur le fait que la quantité d'ADN matriciel n'est pas, en théorie, un facteur limitant. On peut donc amplifier des séquences nucléotidiques à partir de quantités infimes d'extrait d'ADN (Doutremepuich, 2001).

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

V.3.1 Composants de la PCR

L'amplification par PCR nécessite un certain nombre de composants et de contrôles pour que soient validés les résultats obtenus :

- ❖ **ADN** : Il doit être en quantité suffisante pour être amplifié.
- ❖ **Amorces** : Elles doivent être spécifiques.
- ❖ **Enzyme d'amplification** : la Taq polymérase.
- ❖ **Tampon d'amplification** : Il contient des composants permettant le fonctionnement optimal de la polymérase, notamment le chlorure de magnésium ($MgCl_2$) qui est un composant critique de la PCR (chélateur). La concentration de chlorure est typiquement de l'ordre de 1.5 Mm à 2.5 Mm.
- ❖ **DNTPs** (désoxyNucleotides TriPhosphates) : Ils sont incorporés durant la polymérisation.
- ❖ **Contrôles** : Au moins deux contrôles de la PCR sont nécessaires : un contrôle positif qui permet de vérifier les conditions expérimentales et l'efficacité de la méthode, et un contrôle négatif contenant tous les ingrédients de la PCR à l'exception de l'ADN pour vérifier que les réactifs de la PCR ne sont pas contaminés (Saiki *et al*, 1988 ;Sambrook et Russell, 2001).

V.3.2 Etapes de la PCR

La PCR est constituée par la répétition d'un cycle de réactions 28 à 35 fois successivement, qui sont en fonction de la température. Chaque cycle comprend trois périodes de quelques dizaines de secondes :

- a. Activation de la taq polymérase.
- b. La dénaturation : L'ADN est dénaturé à 95°C environ, pendant 30 secondes à 1 minute, pour séparer les brins.
- c. L'hybridation : La température est abaissée vers 50-70°C. ce qui permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux primers de s'hybrider.
- d. L'élongation : la température est augmentée à 72°C, pendant 1 à 2 minutes. A cette température, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténares amorcés et catalyse la réplication en utilisant les dNTP présents dans le mélange réactionnel (Loistron , 2009) .

V3.3. Anomalies

V.3.3.1 Allèles micro-variants

Les allèles STRs contenant une ou plusieurs unités de répétition qui diffèrent légèrement du prototype répétitif sont nommés allèles micro-variants. Il peut s'agir d'une délétion ou d'une insertion d'un seul nucléotide sur une ou plusieurs unités répétitives. Généralement, les allèles micro-variants sont facilement identifiables. Cependant, les allèles qui diffèrent par uniquement une seule paire de base par rapport aux allèles standards peuvent être confondus avec l'adénylation (processus permettant l'ajout des poly adénines pendant la PCR). Les répétitions partielles sont souvent rares à l'exception de l'allèle 9.3 du locus THO1 (Butler, 2005).

V.3.3.2 Allèles nuls et allèles drop out

Comme pour toute zone de l'ADN, il existe un certain polymorphisme des zones de l'ADN situées en bordure des STRs, quelques rares individus possèdent donc un allèle ne présentant pas la même séquence que la grande majorité de la population pour la zone reconnue par l'une des amorces d'un STR. Il en résulte que l'amorce n'est qu'imparfaitement complémentaire à cet allèle, qu'elle s'y hybride mal, que l'amplification de cet allèle est dès lors inefficace et qu'il ne donnera pas de produit d'amplification détectable. Un tel allèle présent mais non détecté s'appelle un allèle drop out .Un individu possédant un tel allèle apparait faussement homozygote (Kline *et al*, 1998 ;Budowle, 2001).

V.3.3.3 Stutters

L'amplification par PCR de séquences répétitives produit inévitablement des produits secondaires non désirés que l'on dénomme Stutter. Ces produits secondaires apparaissent de façon

aisément reconnaissable sur les profils ADN sous la forme d'un pic de taille réduit correspondant à un allèle ayant un élément répétitif de moins que l'allèle nominal (Brookes *et al* , 2012).

Les stutters se forment pendant la phase d'élongation de la PCR et proviennent d'un mésappariement lors de la réplication qui va entraîner une insertion (rare) ou une délétion. Ces artéfacts sont plus fréquents pour les loci présentant un motif de base court (Amory, 2007). Dans les STRs ayant une séquence répétitive de deux paires de base, le pic du stutter est presque aussi grand que celui de l'allèle nominal. C'est dans cette logique que les STRs penta-nucléotidiques ont été préconisés pour remplacer les STRs actuellement utilisés en génétique médico-légale et qui présentent des unités de répétition principalement tétra-nucléotidiques (Balding, 2005) (Figure 7).

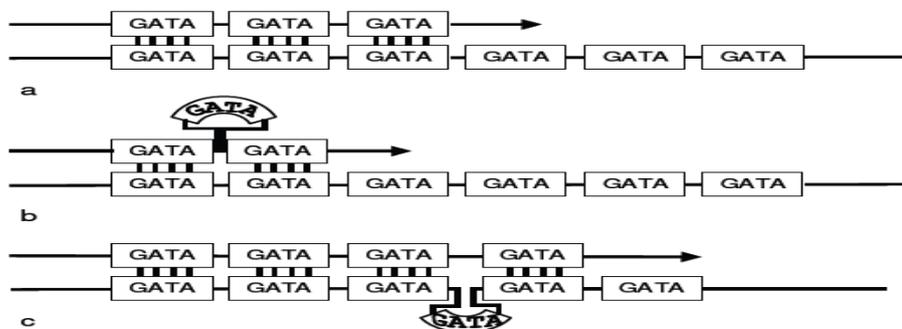


Figure 7: Modes de formation des stutters : a : réplication normale, b : apparition d'un stutter en raison d'un glissement en arrière, c : formation d'un stutter par glissement en avant de la polymérase (Amory, 2007).

V.3.3.4 Tri-allélisme

Des profils à trois allèles pour un marqueur ont déjà été observés en l'absence de causes génétiques identifiées. La cause de tels profils n'est pas encore parfaitement claire. On pourrait imaginer une duplication de la zone de l'ADN portant le marqueur. Mais il peut également s'agir d'une mutation somatique. En d'autres termes, une partie des cellules de l'échantillon porterait un allèle mutant issu d'une mutation qui s'est produite au cours du développement. La fréquence de tels phénomènes semble rare et concentrée sur certains marqueurs particuliers, notamment TPOX où un tel profil se rencontre chez environ 2 personnes sur 100 (Coquoz et Taroni, 2006).

Les duplications peuvent résulter de la recombinaison "illégitime" entre séquences très semblables mais non homologues. Ces séquences favorisent l'apparition d'erreurs d'alignement (mésappariements), conduisant à des crossing-over inégaux. Ce mécanisme aboutit à l'élimination d'une région sur l'un des chromosomes et à la duplication sur l'autre chromosome. Ces erreurs d'appariement sont fréquentes dans les régions de répétitions en tandem, compte tenu de la forte homologie de séquences entre les répétitions (Figure 8) (Schibler *et al*, 2000).

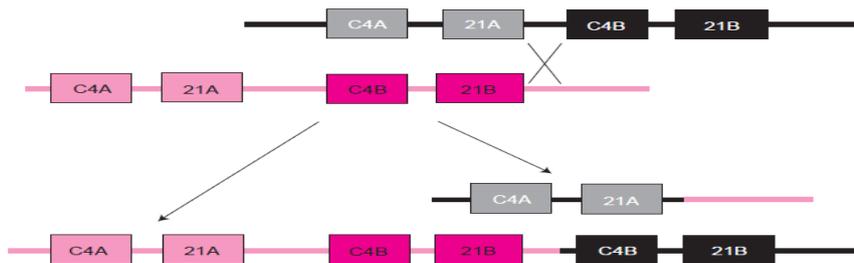


Figure 8 : Recombinaison inégale et délétion/fusion. La recombinaison inégale conduit à la formation de gamètes porteurs soit d'une délétion, soit d'une duplication (Schibler *et al*, 2000).

VI . Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse est une technique physicochimique qui sépare des constituants ionisés dans un champ électrique. depuis une vingtaine d'Années, le développement de nouveau supports migratoires (gel de polyacrylamide, d'agarose et capillaire de silice) a donné à l'électrophorèse un nouvel essor (Butler *et al*, 2001) .

Les éléments primaires d'un instrument d'électrophorèse capillaire (CE) de base comprenant un capillaire en verre étroit, deux flacons tampons et deux électrodes connectées à une alimentation haute tension. Les systèmes CE contiennent également une source d'excitation laser , un détecteur de fluorescence , un auto-échantillonneur pour contenir les tubes et un ordinateur pour contrôler l'injection et la détection d'échantillon (Koumi *et al*, 2004).

La détection de l'échantillon est effectuée automatiquement par l'instrument CE en mesurant l'intervalle de temps entre l'injection d'échantillon et la détection d'échantillon avec un laser placé près de la fin du capillaire. La lumière laser est éclairée sur le capillaire à une position fixe. Les

molécules d'ADN plus petites arrivent au point de détection d'abord suivi par les molécules plus grandes dans l'ordre de leur vitesse de migration, qui est en corrélation avec la longueur ou le nombre de paire de bases (Slater *et al* , 2000).

Les données des séparations CE sont tracées en fonctions de l'intensité relative de fluorescence observée à partir de l'émission de fluorescence des colorants passant par le détecteur. Les signaux d'émission fluorescents provenant de colorants attachés aux molécules d'ADN peuvent ensuite être utilisés pour détecter et quantifier les molécules d'ADN passant par le détecteur (Singer et Johnson , 1997) (figure 9) .

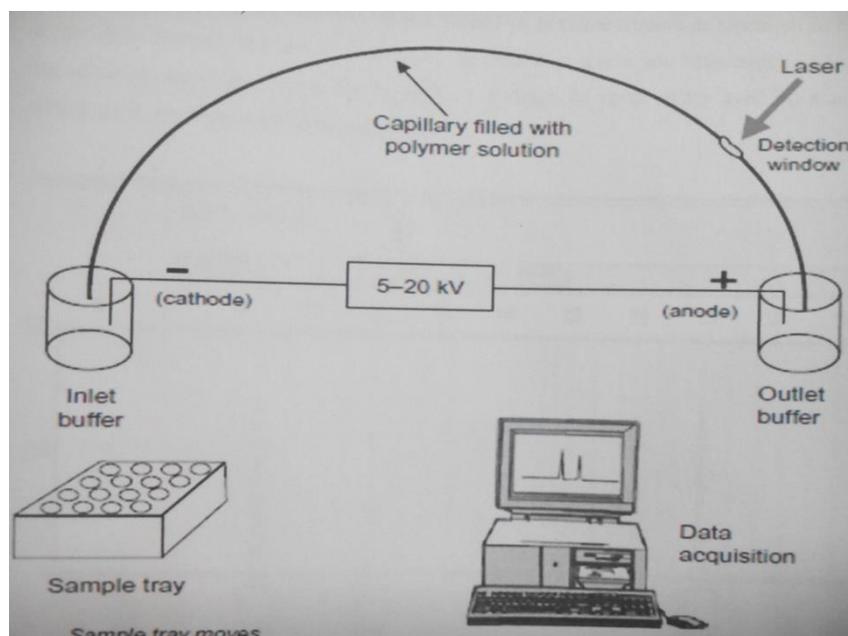


Figure 9 : Schéma d'instrument de l'électrophorèse capillaire utilisé pour l'analyse de l'ADN (Butler , 2011).

VII .Etablissement de profil génétique

Une fois qu'un échantillon d'ADN est analysé, un profil d'ADN est produit .Ce dernier est un code alphanumérique informatisé obtenu à partir de la sortie du processus analytique de l'ADN .c'est la combinaison de génotype pour tous les loci STRs analysés .il comprend les noms des loci STRs et des allèles détectés pour chacun d'eux.

Une fois qu'un profil STR est obtenu, il est soumis à une analyse initiale pour déterminer si la source d'ADN provient d'une seule personne ou de plus d'une personne. Ceci est généralement réalisé en examinant le nombre d'allèles à chaque locus et en analysant la surface du pic et les rapports entre les pics alléliques.

Lorsque le profil d'ADN de l'un des contributeurs est connu le profil du donneur inconnu peut être déduit .cela peut généralement être accompli en soustrayant la contribution du donateur connu du profil mixte, tout en tenant compte des zones de point des allèles. Dans les échantillons dans lesquelles l'identité des contributeurs est inconnue, les individus peuvent être inclus ou exclus comme contributeurs possibles en utilisant des approches statistiques spécial (Semikhodskii, 2007).

Ce travail a été réalisé au niveau de département d'Identification Génétique, au sein du Laboratoire de la Police Scientifique et Technique -Châteauneuf, pour une période de quatre mois, de Février à Mai 2018.

L'objectif de ce travail est la mise en évidence de l'impact du test sérologique Kastel - Meyer sur la génération du profil génétique à partir des traces de sang infimes prélevées sur écouvillons et sur des supports métallique et de bois.

I -Préparation des échantillons

I-1 Matériel biologique

Sang à l'état liquide dilué à 1/100 : 1 µl de sang + 99 µl de l'eau distillée (voir Annexe 1).

I-2 Méthode

I-2-1 Préparation des prélèvements sanguins sur écouvillons

A partir du sang dilué au 1/100, des volumes de 10, 5, 2.5, et 1.25 µl ont été déposés sur des écouvillons stériles en consensus de trois réplicats. Nous avons procédé au séchage de ces écouvillons à température ambiante pendant 24h (voir Annexe 2).

I-2-2 Etude sur des supports solides

Nous avons effectué notre travail, aussi, sur deux supports (bois –pièce métallique) présentant des traces suspectes.

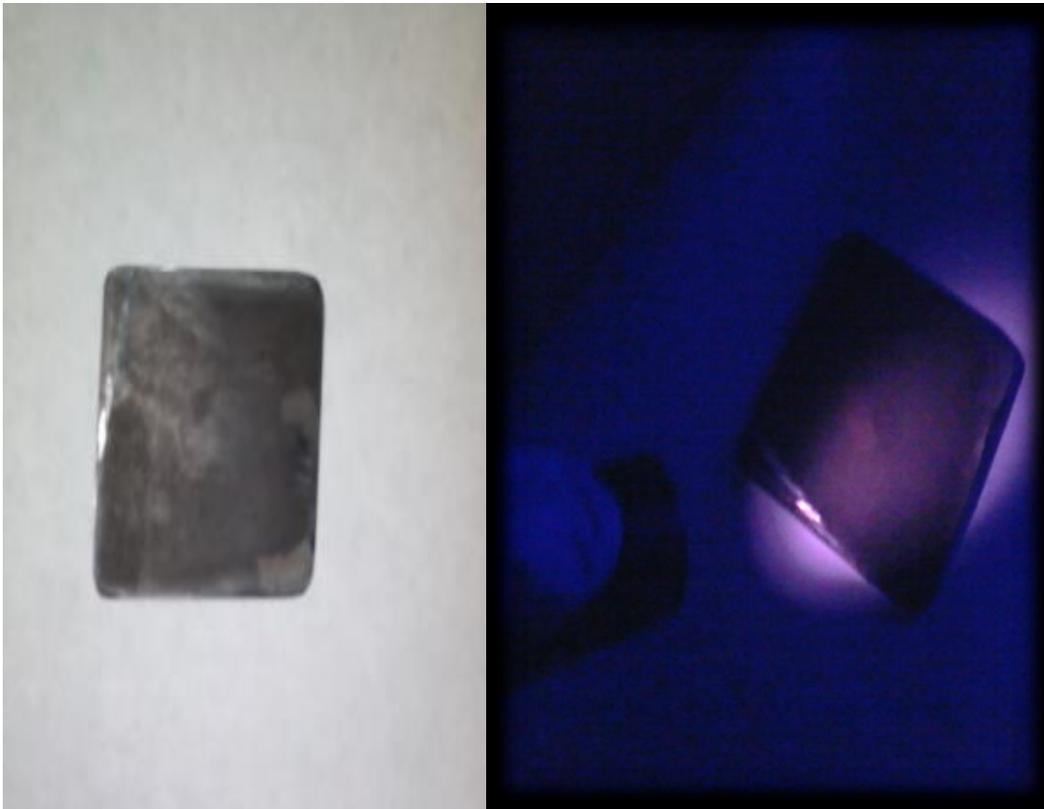
Une recherche de traces de sang a été effectuée sur les deux supports sous-nommés :

-Pour le bois, une recherche à l'œil nu a permis de repérer une trace suspecte (figure10).



Figure10: traces du sang sur un support solide (bois) (original)

-Pour la pièce métallique, la recherche de la trace de sang à l'œil nu s'est avérée infructueuse. Ce n'est que par la révélation par la lumière UV a 450 nm que nous avons pu repérer une trace suspecte (figure11)



A : observation de la trace à l'œil nu B : la révélation de trace par la lumière UV

Figure 11: Révélation de la trace de sang sur un support métallique (original ,2018)

Les échantillons prélevés sur ces deux supports ont également été effectués en consensus de deux répliquats.

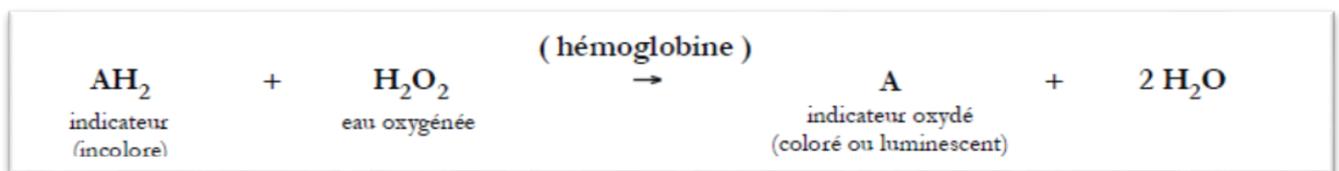
II- examen et mise en tube

Avant toute étude moléculaire, l'échantillon prélevé sur le lieu de crime est révélé par des tests préliminaires appelés « tests indicatifs » ; ce sont des tests de nature chimique permettant d'identifier la nature des traces .Parmi ces tests , nous avons le test sérologique Kastel Meyer et le test immunologique OBTI.

II-1 Le test kastel Meyer :

c'est un test chimique basé sur la réaction d'oxydation avec l'hémoglobine du sang en présence d'un indicateur coloré (Coquoz et al, 2003) , une réaction positive (présence de sang) se traduit par l'apparition d'une couleur rose , tandis que la réaction négative (absence de sang)par un aspect incolore . Le test Kastel Meyer est très sensible, il peut détecter la présence de sang même dans un cas de trace infime.

La réaction chimique catalysée par l'Hémoglobine est la suivante :



Pour le réaliser il faut créer un réactif composé de :

- 10 g de zinc (en poudre) (Zn)
- 20 g de sodium (NaOH)
- 2 g de phénophtaléine
- 100 ml d'eau distillée

En ce qui concerne la méthode de travail, nous l'avons réalisée en deux étapes :

II-1.1 Un test de Kastel Meyer direct : prélever sur écouvillon la trace, effectuer directement le test Kastel Meyer, et lancer l'écouvillon testé positif pour le processus STR.

II-1.2 Un test de Kastel Meyer indirect : prélever la trace sur écouvillon, diviser ce dernier en deux, à savoir une partie pour le test kastel Meyer, après révélation du test positif lancer le reste de la trace pour le processus STR.

II-2Le test OBTI

Ce test est basé sur la réaction immunologique antigène-anticorp en utilisant des anticorps spécifiques aux antigènes de l'hémoglobine humaine permettant ainsi, de mettre en évidence le sang humain (Coquoz et al , 2003)



Figure 12: Résultat de test OBTA.

III- Extraction de l'ADN à l'aide du kit Adem- Tech

III-1 La lyse :

La lyse cellulaire permet de détruire la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire des cellules.

➤ **Mode opératoire :**

- Préparer la solution de lyse (voir Annexe 5)
- Ajouter 454.5 µl d'une solution de lyse dans le tube contenant d'échantillon
- Mélanger la solution en réalisant des cycles d'aspirations / refoulements à l'aide d'une pipette.
- Incuber à 56°C dans un agitateur chauffant à 1000 rpm pendant 60 minutes.
- Essorer les échantillons en utilisant un tube passoire (Spin basket) ,récupérer le lysat.

III-2 Liaison de l'ADN génomique aux billes magnétiques :

- Ajouter au lysat 250 µl de LB BUFFER (lyses binding Buffer)

- un pré-mélange Isopropanol/billes magnétiques doit être préparé (250 μ l / 15 μ l)

ISOPROPANOL	250 μ l x nbr d'échantillon
Billes magnétiques : ADEMBEADS	15 μ l x nbr d'échantillon

- Ajouter 265 μ l du mélange (Isopropanol /billes magnétiques) à l'échantillon
- Incuber à température ambiante sous agitation à 1000 trs/min pendant 10 min

III-3Lavages :

Après fixation de l'ADN aux billes magnétiques, laver les billes pour éliminer les impuretés et les inhibiteurs, nous réalisons trois (03) lavages :

1^{er} LAVAGE WASHING BUFFER1 :

- Mettre les Eppendorfs contenant les échantillons et les billes magnétiques sur le portoir magnétique pendant au moins 05 min.

Tout en gardant les Eppendorfs fixés sur le portoir magnétique, éliminer le surnageant : il faut faire attention à ne pas toucher la paroi du tube

- Retirer l'Eppendorf du portoir magnétique et ajouter 500 μ l du Washing Buffer1
- Mettre les Eppendorfs contenant les échantillons et les billes magnétiques sur le portoir magnétique pendant au moins 05 min.

Tout en gardant les Eppendorfs fixés sur le portoir magnétique, éliminer le surnageant : il faut faire attention à ne pas toucher la paroi de tube.

- Retirer les Eppendorfs du portoir magnétique

2eme LAVAGE : WASHING BUFFER2

- Ajouter 500 µl du Washing Buffer2 aux échantillons.
- Mettre les Eppendorfs contenant les échantillons et les billes magnétiques sur le portoir magnétique pendant au moins 05 min.

Tout en gardant les Eppendorfs fixés sur le portoir magnétique, éliminer le surnageant, il faut faire attention à ne pas toucher la paroi du tube.

- Retirer les Eppendorfs du portoir magnétique.

3eme LAVAGE : ETHANOL 70%

- Ajouter 500 µl d’Ethanol à 70% aux échantillons.
- Mettre les Eppendorfs sur le portoir magnétique pendant au moins 05 min.

tout en gardant les Eppendorfs fixés sur le portoir magnétique, éliminer le surnageant ,il faut faire attention à ne pas toucher la paroi du tube.

III-4 Séchage

- laisser sécher les Eppendorfs sur le portoir magnétiques pendant au moins 05 min à température ambiante. (Ne pas dépasser ce délai)
- le séchage se fait par ouverture des eppendorfs (sous la hotte).

III-5 Elution de l’ADN :

- Retirer les Eppendorfs du portoir magnétique puis ajouter 60 µl du Tampon d’Elution (Elution Buffer)
- Incuber les Eppendorfs pendant 10 min à 75°C et 1000 Trs/ min dans l’agitateur chauffant .
- Remettre les Eppendorfs sur le portoir magnétique pendant au moins05 min.
- Récupérer le surnageant (ADN pur) et le transférer dans un nouvel Eppendorf identifié qu’on appelle Extractum.
- Aliquoter 6 µl pour la quantification, le reste à -20°C pour la conservation.

IV-Quantification de l'ADN par PCR en temps réel

La quantification nous permet de déterminer la concentration de l'ADN contenu dans l'extractum. Le principe de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un « reporter », le FAM 6-carboxyl-fluorescein. La quantité d'amplicons se traduit par l'augmentation du signal fluorescent. La quantification est analysée avec le Quantifiler human DNA kit (applied biosystems). La gamme de concentration pouvant être détectée est comprise entre 23 pg/ μ l et 50 ng/ μ l pour 2 μ l d'extractum. L'analyse se fait par l'appareil ABI PRISM R 7500 Fast (Applied Biosystems) .

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

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

➤ Les réactifs

- Kit de quantification Quantifiler[®] Human (Applied Biosystems), contenant un flacon de Reaction Mix, trois flacons de Primers et un flacon d'ADN Témoin.

➤ Mode opératoire

- Préparation de dilutions en série de l'ADN Témoin.(voir Annexe7)

- Préparation du mix pour la quantification ADN.

Composant	Volume par réaction de 25 μ l	Concentration finale
Reaction mix (Taq gold [®])	12,5 μ l	1x

ADN polymerase, dNTPS, Passive reference-ROX)		
Primers mix (sonde TaqMan -FAM, amorces, IPC-VIC)	10,5 µl	1x
Volume total du mix	23 µl	

- Ajout de 2 µl des dilutions d'ADN témoin, des échantillons à quantifier et du diluant (eau Milli Q) pour le témoin négatif.
- Centrifugation de la plaque pendant quelques secondes.
- Placement dans le thermocycleur et lancement du programme.

V- Amplification de l'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Cette technique permet la copie simultanée de séquences d'ADN *in vitro* et est réalisée dans des microtubes qui sont placés dans un thermocycleur assurant des étapes successives de chauffage et de refroidissement rapides à des températures précises.

Des cycles thermiques successifs sont réalisés (autour de 30 cycles en général), chaque cycle comprenant :

- Une dénaturation des deux brins d'ADN.
- Une hybridation des oligonucléotides (amorces) complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible.
- Une réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (Taq polymérase).

Deux autres phases sont généralement rajoutées à celles précédemment citées : un démarrage à chaud "hot start" et une phase d'extension finale des produits PCR.

A chaque cycle, le nombre de copies de fragments d'ADN est doublé : 2^n molécules d'ADN sont ainsi théoriquement obtenues après n cycles.

Dans notre étude, nous avons utilisé le kit Identifiler[®] Plus qui permet la co-amplification de 15 STRs en plus du locus amélogénine, les conditions d'amplification du kit ayant un protocole et des paramètres de PCR spécifiques

(AmpFISTR[®] Identifiler[®] Plus PCR amplification kit user's guide, 2012).

Kit utilisé	Réactifs	Volume
Kit Identifier® Plus	Master mix	$V (\mu\text{l}) = 10 \times (N+1)$
	Amorces	$V (\mu\text{l}) = 5 \times (N+1)$

- Préparation du mix.
- Répartition de 15 μl de ce mix dans chaque tube.
- Ajout de 10 μl de chaque échantillon.
- Placement des tubes dans le thermocycleur et lancement du programme selon le kit utilisé.

Kit Identifier® Plus			
Hot start	28 cycles pour le kit Identifier® Plus		Extension finale
	Dénaturation	Hybridation/Extension	
95°C 11 min	94°C 20 s	59°C 3 min	60°C 10 min

VI-Post-PCR

Le but de cette étape est de dénaturer les fragments d'ADN en séquences monocaténares, le maintien en simples brins étant assuré par addition de formamide.

La préparation des échantillons pour une analyse en électrophorèse capillaire nécessite en outre l'ajout de deux échelles de mesure :

- Un standard de taille : échelle de taille comportant des fragments d'ADN synthétiques de tailles connues (en paires de bases) et migrant avec chaque échantillon. Cette échelle permet ainsi d'extrapoler la taille des fragments.

- Un ladder allélique : échelle allélique comportant les allèles connus de chaque marqueur génétique (STR) et permettant d'attribuer l'allèle approprié aux fragments d'ADN d'après leur taille (pb) et le fluorochrome associé.

Le protocole ci-dessous a été suivi :

- Préparer le mélange standard de taille/formamide selon les volumes préalablement calculés :

Réactifs	Volume Kit Identifier® Plus
Formamide	$V(\mu\text{l}) = 8,7 \times (N+1)$
Standard de taille	$V(\mu\text{l}) = 0,3 \times (N+1)$

- Vortexer le mélange pendant 5 à 10 secondes puis centrifuger le tube brièvement.
- Répartir 9 μl du mélange (standard de taille/formamide) dans les puits des échantillons et ladder en suivant le plan de plaque.
- Déposer 3 μl d'échantillon suivant le plan de plaque.
- Déposer 1,5 μl des témoins positif et négatif.
- Déposer 1,5 μl de ladder dans le puits correspondant.
- Bien fixer à plat un septa propre et sec sur la plaque d'échantillons.
- Déposer la plaque dans un thermocycleur réglé sur le programme de dénaturation 3 minutes à 95°C.
- Placer immédiatement la plaque sur un bac à glace pendant 3 minutes.
- Centrifuger la plaque.
- Adapter le retainer plate et placer la plaque sur le séquenceur.

VII-Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse capillaire

Les produits de post PCR sont soumis à une électrophorèse. Le séquenceur utilisé dans notre travail était « Applied Biosysteme 3130x/Gentic Annalyze » à 16 capillaires (36cm) les amplicons migrant selon leur taille dans un capillaire sous l'influence d'un champ électrique.

Les capillaires sont remplis d'un polymère POP 4 (Performance Optimized Polymere 4) jouant le rôle de tamis moléculaire, les petites molécules d'ADN migrant plus facilement sous l'effet du champ électrique tandis que les grosses molécules sont retardées dans leur migration. Il y a donc une séparation électrophorétique des fragments d'ADN. Dès qu'une molécule migre et arrive au niveau de la fenêtre de détection, elle est bombardée par le faisceau laser du séquenceur et émet une fluorescence qui est captée par une caméra CCD (Charge Coupled Device). Les données sont alors collectées par le logiciel "Data Collection".

VII-1 Analyse et validation des résultats

Les données collectées sont traitées par le logiciel "Gene Mapper", qui permet dans un premier temps d'assigner une taille aux fragments identifiés en les comparant avec le standard de taille (LIZ500[®]), puis d'identifier spécifiquement chaque groupe d'allèles en le comparant avec une échelle allélique (le ladder) qui est un produit amplifié contenant le maximum d'informations sur les allèles trouvés pour chaque marqueur dans la population humaine.

Le résultat des traitements par ce logiciel est la génération d'électrophorégrammes, que l'on dénomme également profils génétiques, comportant ainsi plusieurs pics correspondant aux allèles détectés. Selon le spectre de longueur d'ondes, chacun des fluorochromes sera représenté par une couleur : bleue pour le FAM[®], verte pour le VIC[®], rouge pour le PET[®], orange pour le LIZ[®], et jaune pour le NED[®].

La validation d'un profil génétique par un analyste est alors tributaire de la vérification d'un certain nombre de critères, notamment la vérification de la migration du standard de taille et du ladder, le profil des témoins positif et négatif et l'observation de l'allure générale du profil (hauteur des pics, seuil d'acceptabilité, ...). Ce n'est qu'à l'issue de la validation de ces caractères que le résultat peut être exploité.

VII-2 Interprétation des résultats

Une double interprétation a été effectuée sur l'ensemble des profils génétiques par deux analystes différentes selon un protocole mis au point par les experts du Département d'Identification Génétique du Laboratoire Central de Police Scientifique et Technique.

I. Résultats des tests préliminaires

Afin de déterminer le taux de succès de la génération de profils ADN à partir d'écouvillonnages testés directement ou indirectement par KM. Un total de 24 écouvillons tachés de sang, ce dernier dilué au 1/100, avec des volumes respectifs de 10, 05,2.5 et 1.25 µl, testés positifs à ce test, a fait objet de notre travail, à noter que ces écouvillonnages ont été analysés en consensus à trois répliquats .(Figure 13/14)

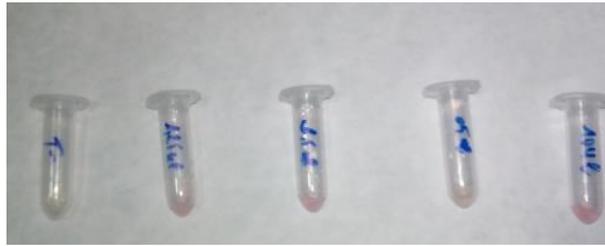


Figure 13 : Résultat du test Kastel Meyer indirect (original, 2018)

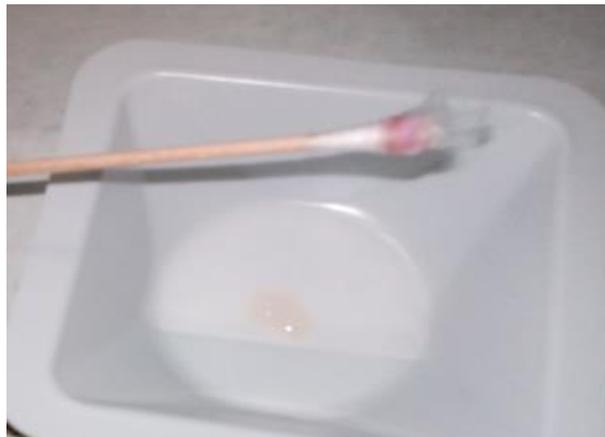


Figure 14 : Résultat du test kastel Meyer direct (original, 2018)

Aussi, des écouvillonnages effectués sur des supports suspectés présentant des traces de sang à savoir un morceau de bois et une pièce métallique ,sur lesquels nous avons effectué huit écouvillonnages ,testés directement et indirectement par KM qui se sont révélés positifs, à noter que ces écouvillonnages ont été analysés en consensus en deux répliquats (Figure 15).

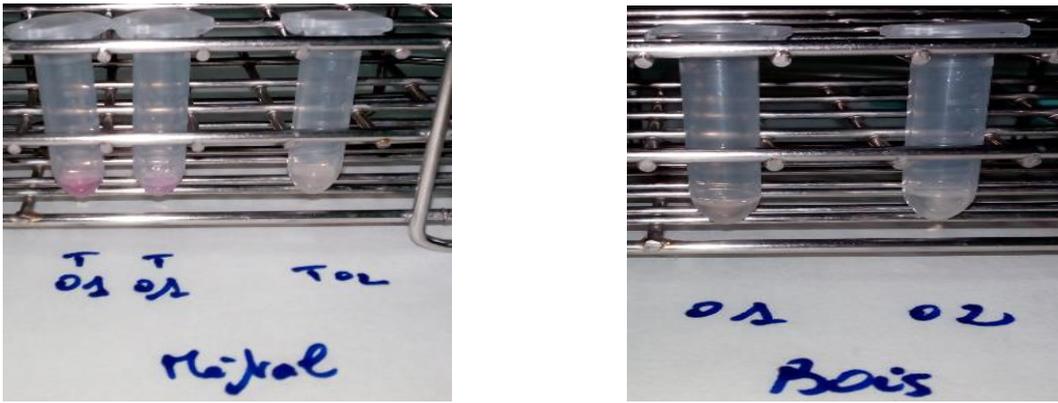


Figure 15 : Résultats du test Kastel Meyer sur les supports (métal et bois) (original, 2018)

-le test « OBTI » a confirmé la nature humaine du sang retrouvé sur les échantillons prélevés.(Figure 16)

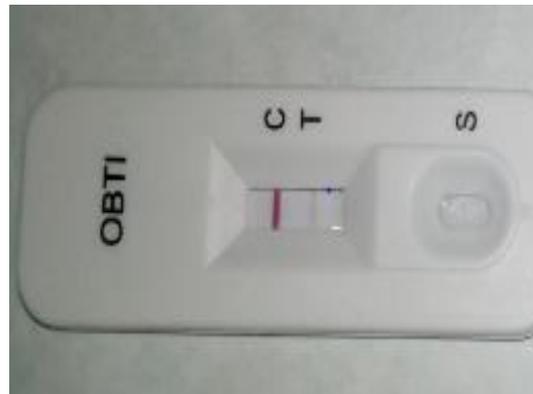


Figure16 : Résultat positif du test OBTI (original, 2018)

II. Résultats de la quantification de l'ADN

Après avoir détecté la présence de sang par le biais des résultats positifs des tests préliminaires, nous avons procédé à l'extraction de l'ADN à partir des échantillons testés directement et indirectement par le test KM. Par la suite, ces échantillons ont été quantifiés.

A l'aide du système q-PCR 7500 fast ABI, les concentrations d'ADN qui correspondent aux échantillons analysés ont été obtenus (tableau III), qui comprend, quatre (04) prélèvements sur un support métallique, quatre (04) sur un morceau de bois et vingt quatre (24) prélèvements sur écouvillons.

Parmi les 32 prélèvements, quatre (04) n'avaient aucune concentration d'ADN détectée, ayant subi un test KM direct, 21 prélèvements ont une concentration inférieure ou égale à 0.02 ng/μl,

testés directement et indirectement par KM, et les sept (07) prélèvements restants ont des concentrations supérieures à 0.02 ng/μl.

Tableau III : Résultats de la quantification d’ADN extrait (en ng/μl) à partir des traces infimes sur deux variantes ; le test KM-indirecte et le test KM- directe

	Concentrations d’ADN (ng/μl) des échantillons testés indirectement par KM	Concentrations d’ADN (ng/μl) des échantillons testés directement par KM
Écouvillons de 10 μl	0.2 0.19 0.15	0.08 0.06 0.04
Écouvillons de 5 μl	0.02 0.03 0.02	0.01 0.008 0.009
Écouvillons de 2.5 μl	0.01 0.009 0.01	0.0009 0.0005 Indéetectable
Écouvillons de 1.25 μl	0.002 0.001 0.002	Indéetectable Indéetectable Indéetectable
Bois	0.02 0.01	0.009 0.008
Métal	0.02 0.02	0.01 0.01

Ce tableau contenant les concentrations d’ADN en ng /μl, obtenues à partir des échantillons testés directement et indirectement par le test KM .De ce fait les concentrations d’ADN correspondant aux écouvillons de 10μl testés indirectement par KM varient entre 0.15 et 0.2 ng/μl alors que les écouvillons testés directement par KM varient entre 0.008 et 0.06 ng/μl. D’autre part les concentrations d’ADN correspondant aux écouvillons de 5 μl testés indirectement par KM varient entre 0.02 et 0.03 ng/μl, par contre les écouvillons testés directement avec KM varient entre 0.008 et 0.01 ng/μl.

Pour les écouvillons de 2.5μl testés indirectement par KM, les concentrations d’ADN varient entre 0.009 et 0.01ng/μl .Cependant, en ce qui concerne les écouvillons testés directement par KM, les concentrations varient entre indéetectable et 0.009 ng/μl, tandis que les écouvillons de 1.25μl testés indirectement par KM, les concentrations varient entre 0.001 et 0.002ng/μl ,alors que les écouvillons testés directement par KM sont tous indéetectable.

En ce qui concerne le métal, la concentration d'ADN testé indirectement par KM est de 0.02 ng/µl et 0.01 ng/µl pour les échantillons testés directement par KM.

Et enfin pour le bois, la concentration d'ADN des échantillons testés indirectement par KM varie entre 0.01ng/µl et 0.02 ng/µl, par contre les écouvillons testés directement par KM varient entre 0.008ng/µl et 0.009 ng/µl .

Cet histogramme (Figure 17) représente la concentration d'ADN des échantillons testés directement et indirectement par Kastel Meyer. Nous avons observé une diminution de la concentration d'ADN dans le cas de l'application direct du test Kastel Meyer sur les échantillons et dans certains cas la concentration est indétectable.

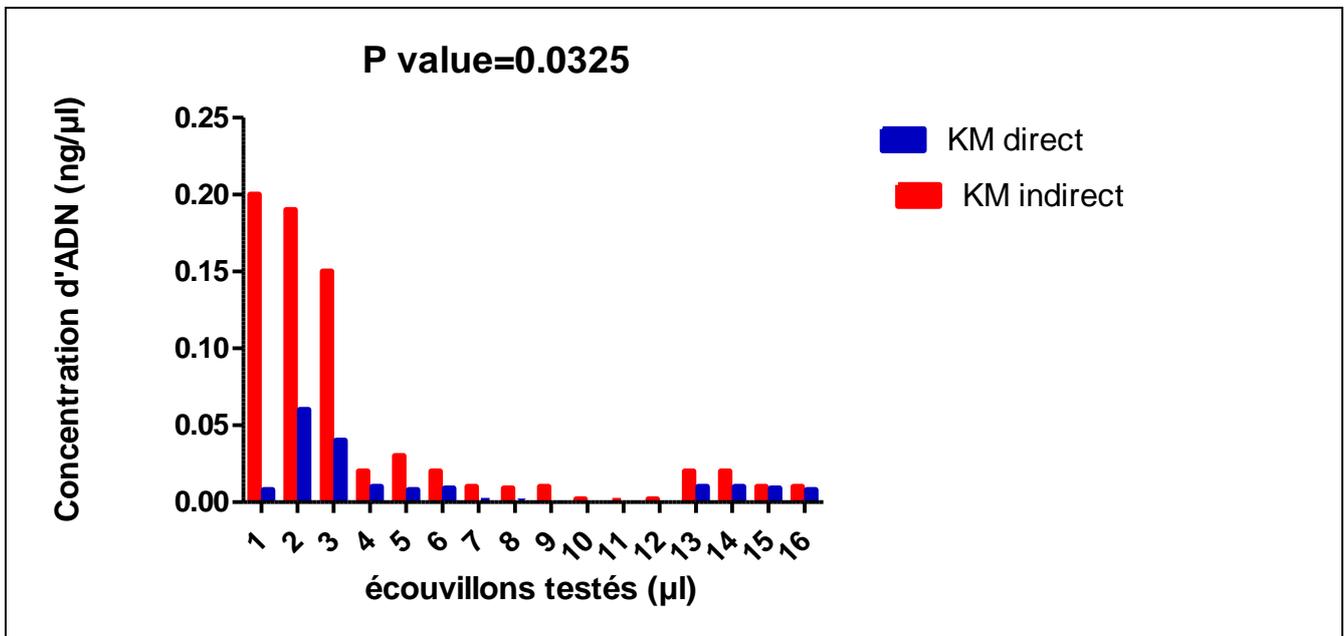


Figure17 : Présentation graphique de la concentration d'ADN des échantillons testés directement et indirectement par Kastel Meyer.

Les concentrations obtenues après quantification par PCR en temps réel sont comprises entre indétectable et 0.2 ng/µl.

A partir de ces résultats nous pouvons déduire que le réactif Kastel Meyer a un impact sur la diminution de la quantité d'ADN.

III. L’effet de test Kastel Meyer sur le rendement d’ADN

Au cours de cette étude nous avons réalisés une comparaison des concentrations d’ADN testées directement et indirectement par kastel Meyer, cette comparaison implique l’utilisation du test statistique chi-deux.

Nous avons proposés l’hypothèse nulle H0 : il n’y a pas de différence significative entre les concentrations d’ADN des échantillons testé directement et indirectement par le test Kastel Meyer.

Tableau IV: test chi-deux pour les échantillons testés directement et indirectement par Kastel Meyer.

Contingency				
1	Table Analyzed	Data 1		
2				
3	Chi-square			
4	Chi-square, df	4.571, 1		
5	P value	0.0325		
6	P value summary	*		
7	One- or two-sided	Two-sided		
8	Statistically significant? (alpha<0.05)	Yes		
9				
10	Strength of association			
11	Relative Risk			
12	95% confidence interval			
13	Odds ratio	11.88		
14	95% confidence interval	0.5835 to 241.9		
15	Difference between proportions			
16	Fraction of top, bottom row in left column	See Overview		
17	Difference between fractions			
18	95% confidence interval of difference			
19				
20	Data analyzed	DNA 1	DNA 2	Total
21	detectable	16	12	28
22	indetectable	0	4	4
23	Total	16	16	32

Les résultats obtenus à l'aide du test chi-deux des concentrations d'ADN testés directement et indirectement par KM sont apparus significatifs avec ($P < 0.05$) et ($X^2 = 4,571$), ce qui signifie que les concentrations sont comparables, et il y a une différence entre les concentrations d'ADN, donc H_0 est rejeté.

De ce fait, nos résultats concordent avec les résultats obtenus après la quantification, par conséquent, nous avons confirmé que le test Kastel Meyer a un impact sur l'ADN et la génération des profils STR.

IV. Détermination des profils génétiques

Après la séparation des amplicons par le séquenceur ABI 3130xl, et l'analyse des données, nous avons obtenu des profils génétiques (voir les figures 18.19.20.21.22.23.24).

Les profils génétiques se présentent sous forme de graphe comprenant une série de pics, chacun d'eux correspond à un allèle issu d'un marqueur bien déterminé. Selon que l'individu soit homozygote ou hétérozygote pour un STR analysé, nous aurons un ou deux pics par locus. L'échelle horizontale indique la taille des fragments d'ADN alors que l'axe vertical correspond à l'intensité de la fluorescence détectée des fluorochromes. Parmi ces fluorochromes, le FAM qui donne des pics bleu, le VIC donne des pics vert, le PET donne des pics rouge et le NED qui donne des pics jaune (Coquoz *et al*, 2003)

L'identification des allèles se fait par comparaison avec un étalon qui contient tous les allèles fréquents de la population, qui est le Ladder.

Les résultats des profils génétiques obtenus à partir des prélèvements testés par Kastel Meyer sont présentés comme suit :

-un profil génétique de 15 STR complet, d'une personne de sexe masculin, a été obtenu à partir des prélèvements testés directement et indirectement par KM pour les écouvillons de 10 μ l, cependant la concentration d'ADN est de 0.15 ng/ μ l pour le test indirect à 0.04 ng/ μ l pour le test direct. A noter que l'intensité des pics mesurée en RFU (Relative Fluorescence Unit) pour le profil STR obtenu à partir de l'écouvillon testé directement par KM, a diminué par rapport à celui obtenu à partir de l'écouvillon testé indirectement par KM.(Figure N°18/19).

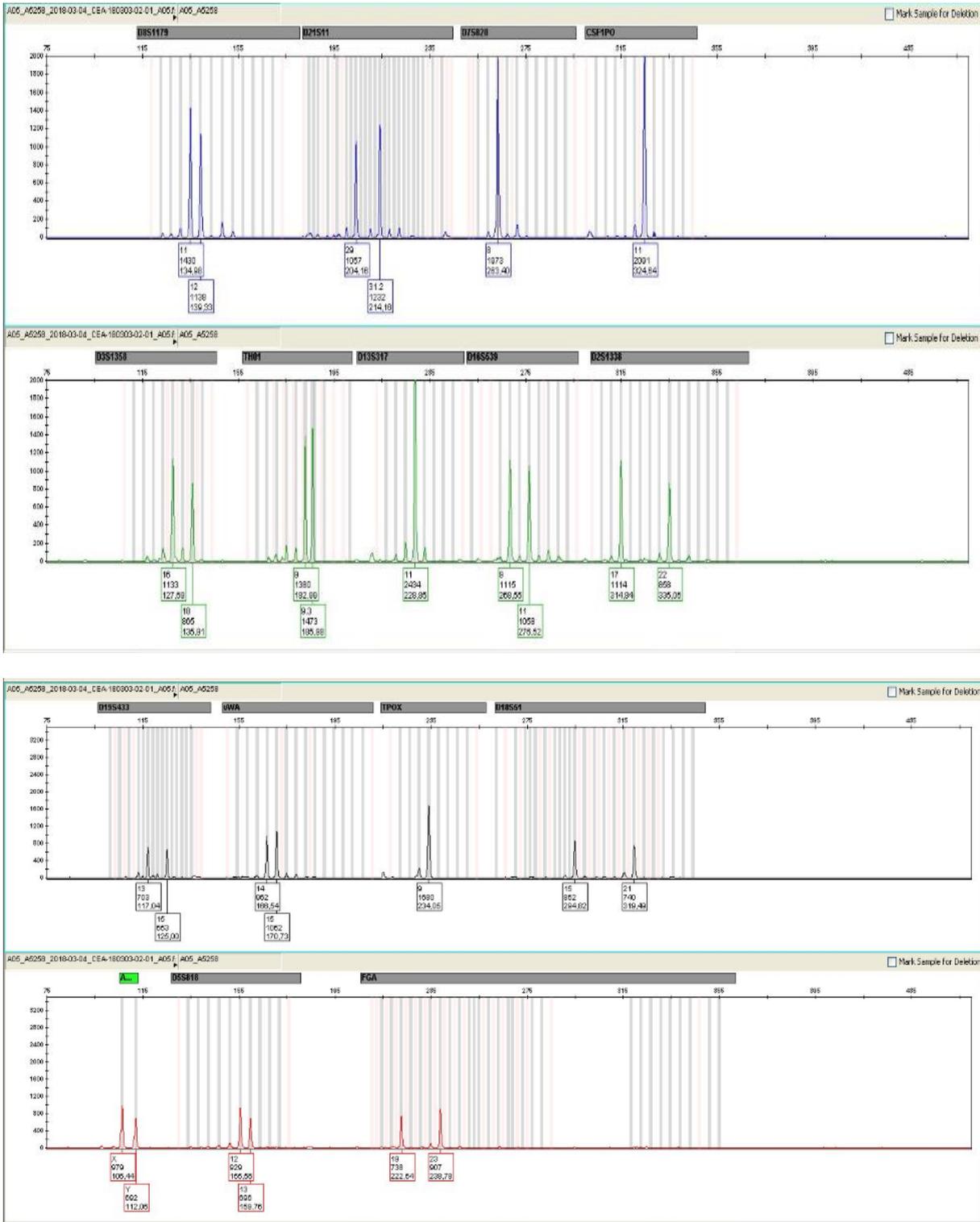


Figure18 : Profil génétique obtenu à partir de l'échantillon de 10µl testé indirectement par KM.

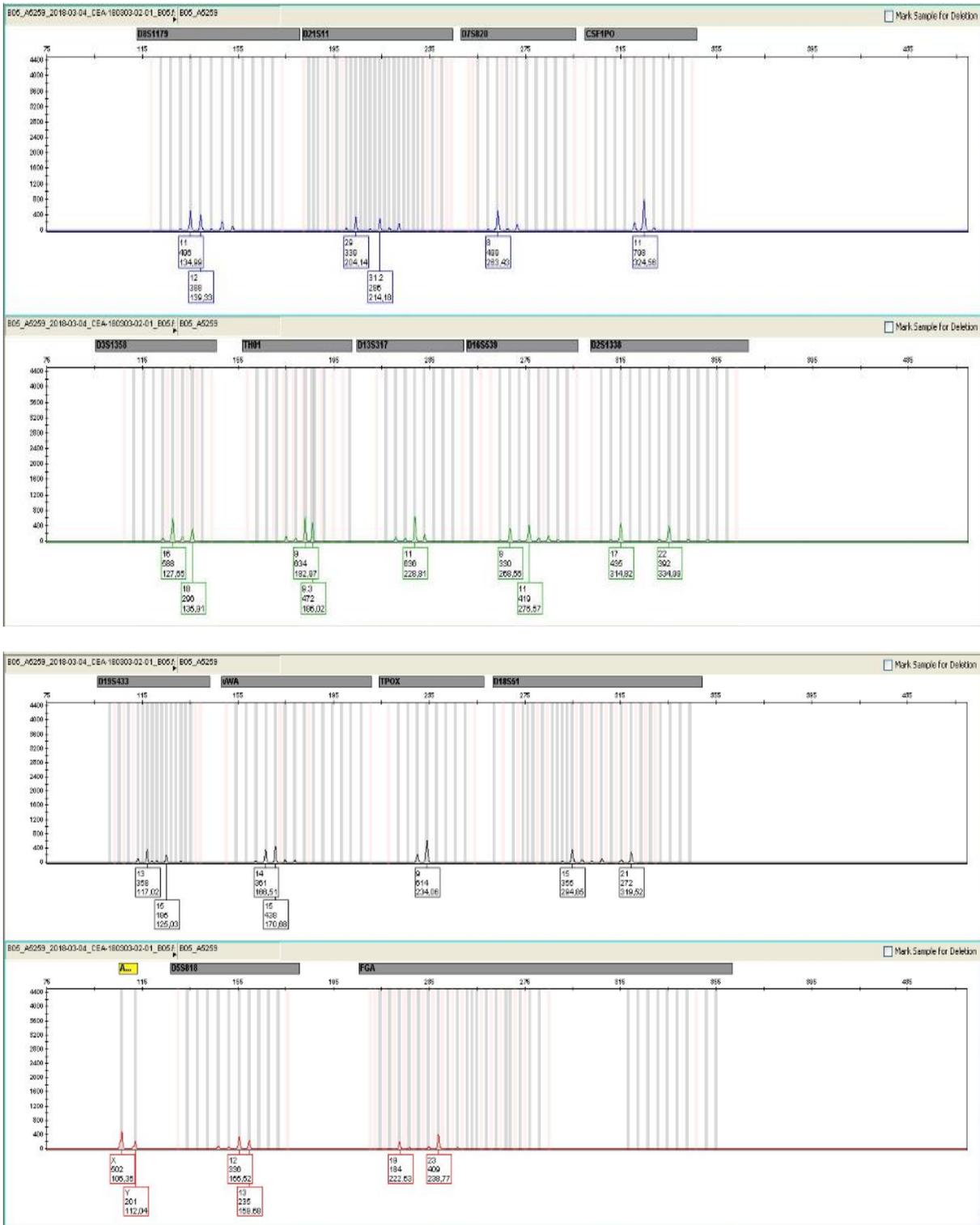


Figure 19: Profil génétique obtenu à partir de l'échantillon de 10µl testé directement par KM.

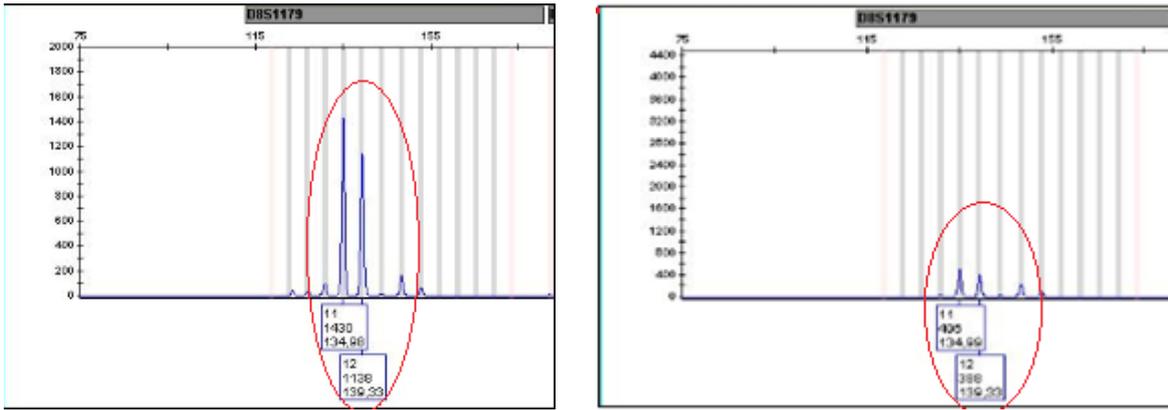


Figure 20 : l'intensité des pics mesurée en RFU (Relative Fluorescence Unit) pour le profil STR obtenu à partir de l'écouvillon testé indirectement et directement par KM successivement.

-un profil génétique de 15 STR complet, d'une personne de sexe masculin a été obtenu à partir du prélèvement testé indirectement par KM pour l'écouvillon de 05 µl dont la concentration est de 0.03ng/µl(Figure N°21). Néanmoins, aucun profil génétique n'a été obtenu à partir du même prélèvement testé directement par KM dont la concentration est de 0.01ng/µl.(Figure N°22.)

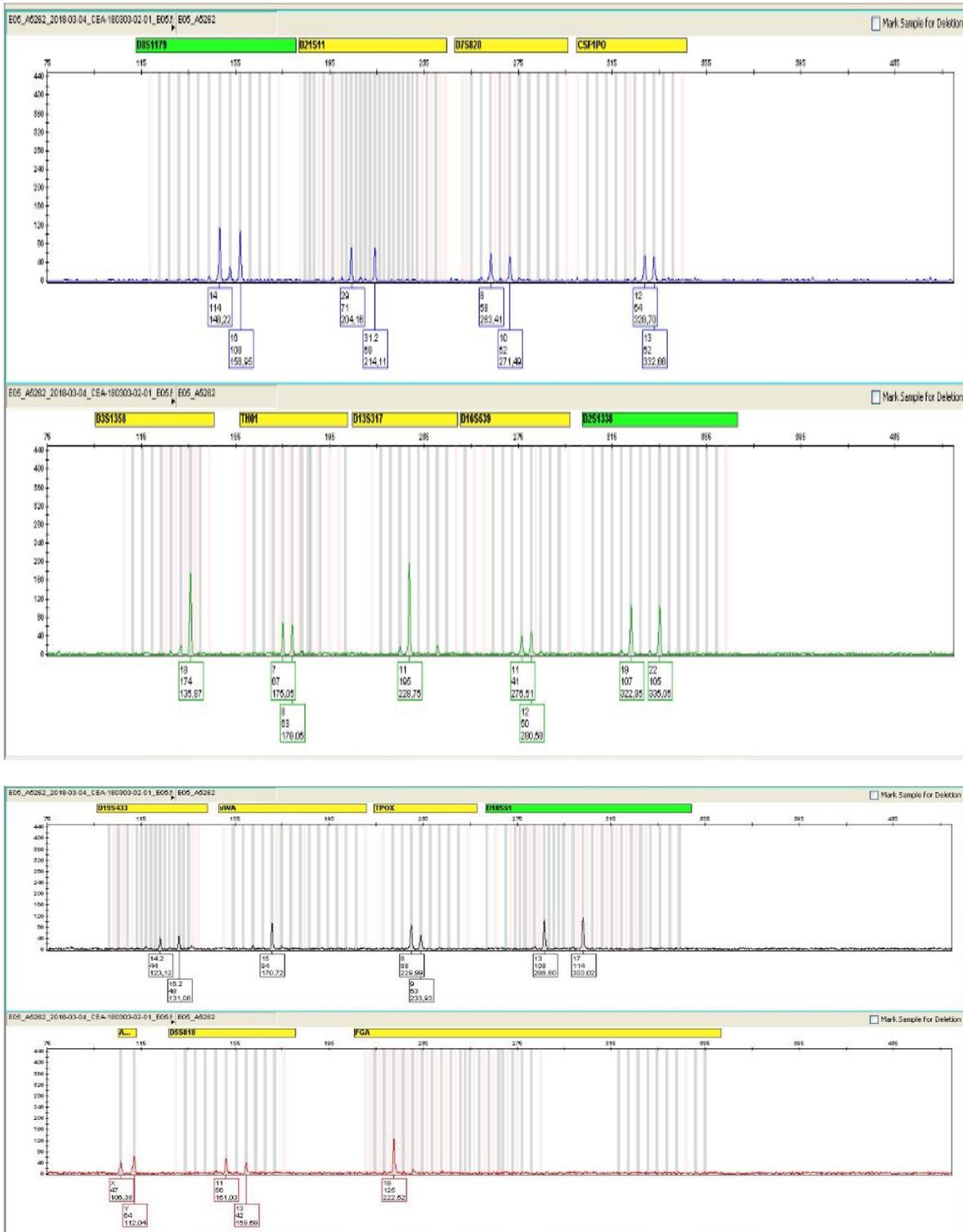


Figure 21: Profil génétique obtenu à partir de l'échantillon de 05µl testé indirectement par KM

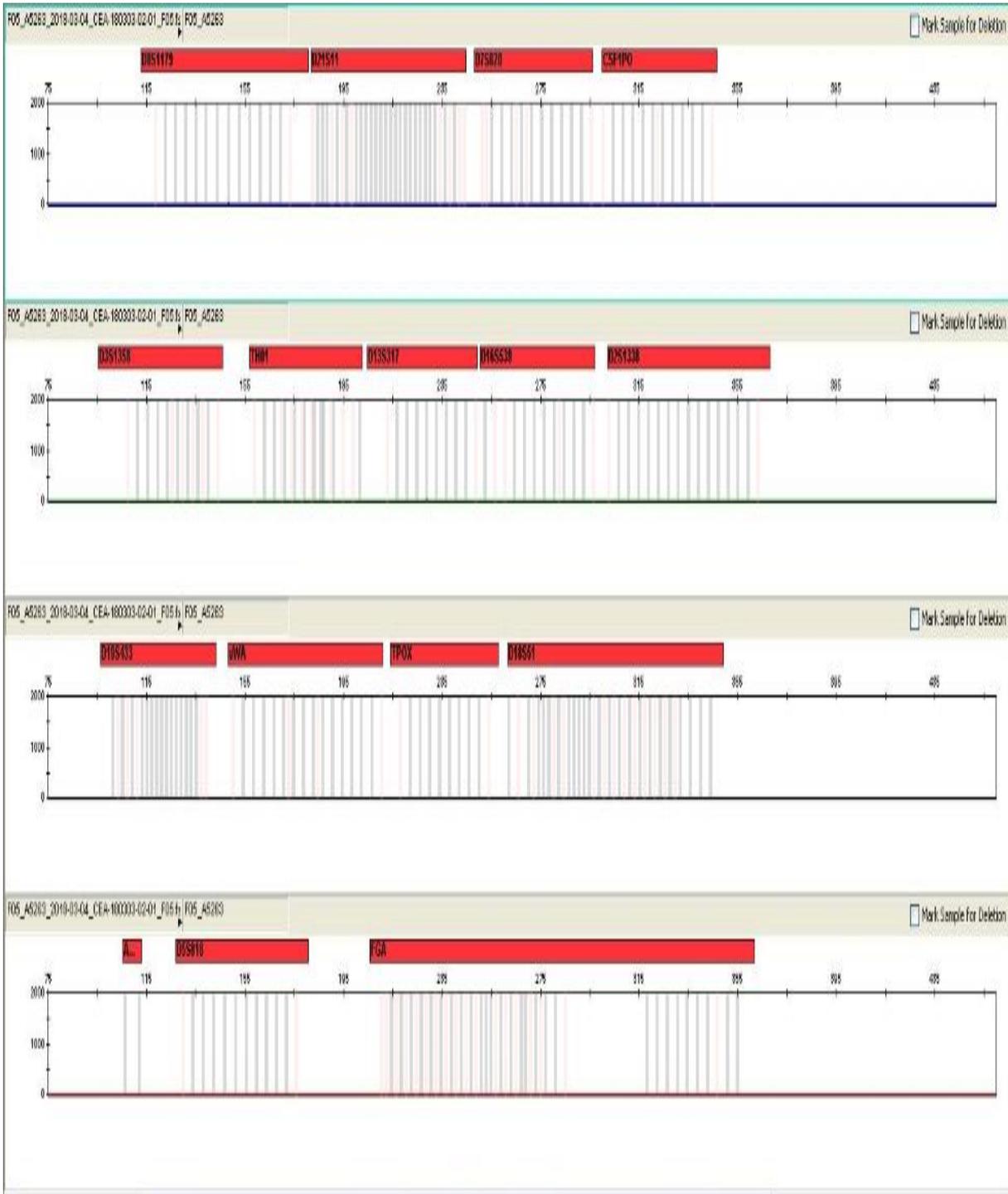


Figure 22 : Profil génétique nul obtenu à partir de l'échantillon de 05µl testé directement par KM

-un profil génétique partiel a été obtenu à partir du prélèvement testé indirectement par KM pour la pièce métallique dont la concentration est de 0.02ng/µl, cependant, ce résultat est exploitable après ré-analyse avec un temps d'injection plus important, appuyé avec un calcul statistique dans le cas d'une concordance avec la référence. Néanmoins, aucun profil génétique n'a été obtenu à partir de l'écouvillonnage effectué sur la pièce métallique testé directement par KM, dont la concentration est de 0.01ng/µl.(Figure N°23 /24)

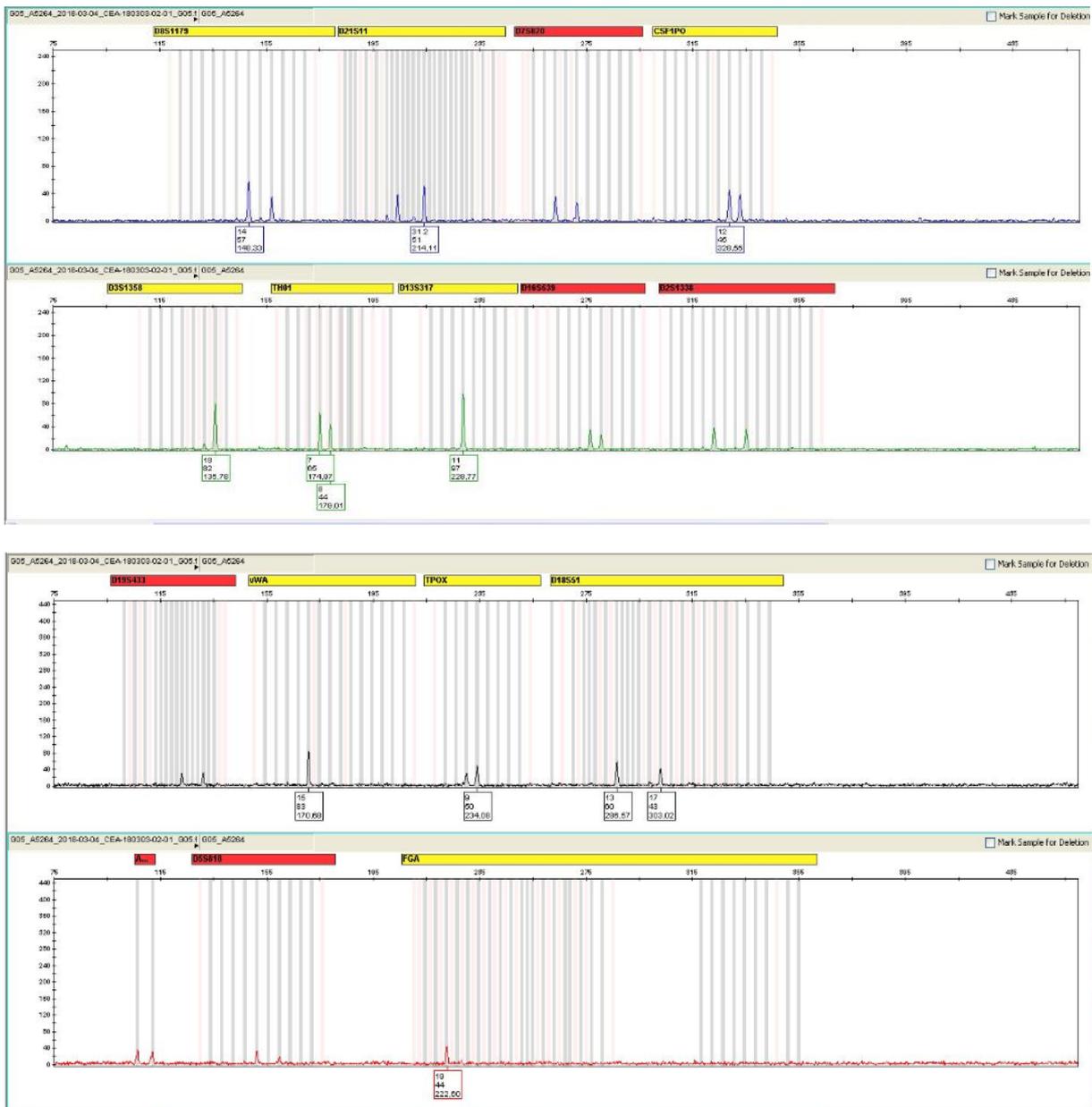


Figure 23 : Profil génétique partiel obtenu à partir de l'écouvillonnage effectué sur le métal testé indirectement par KM.

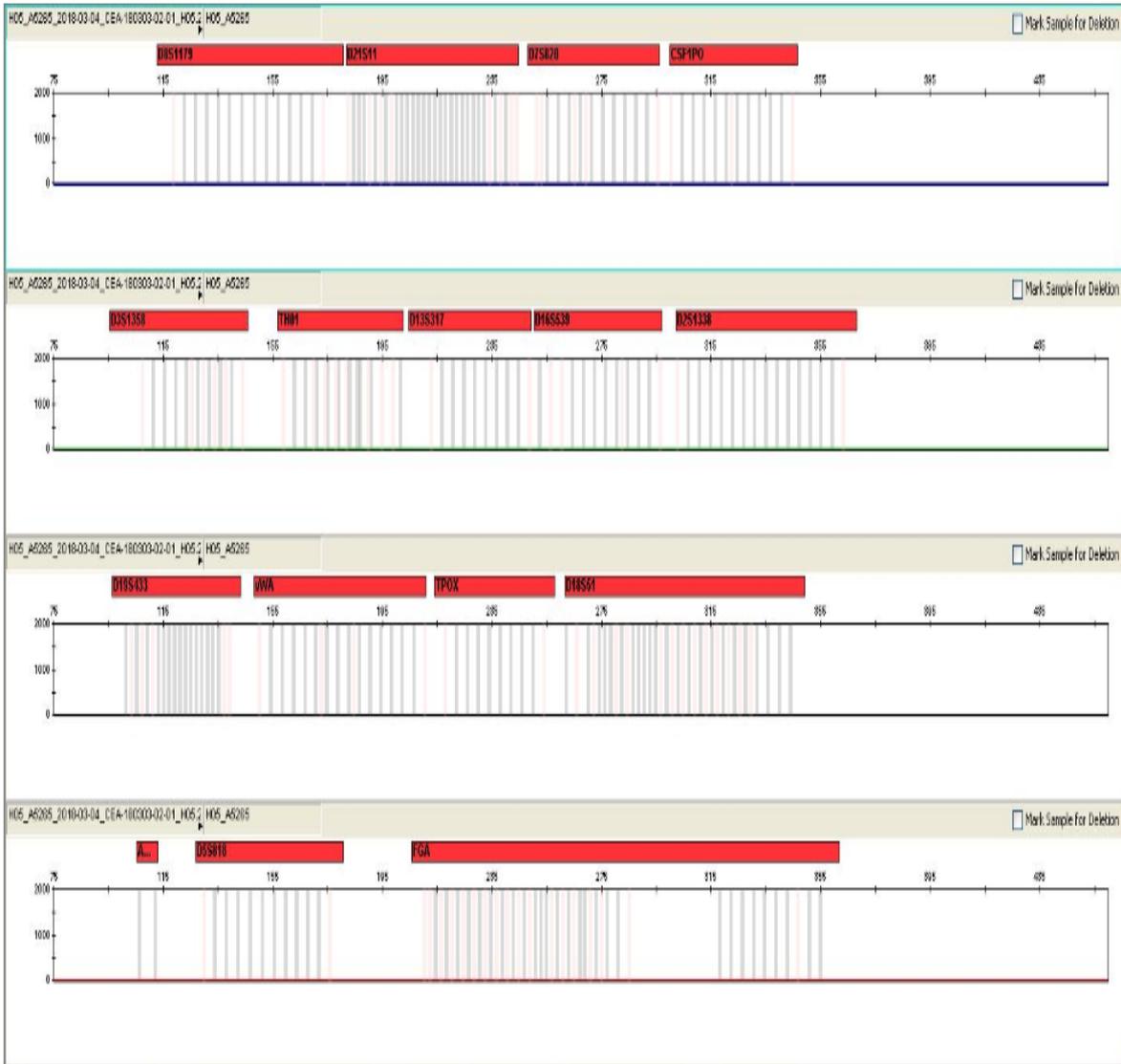


Figure 24 : Profil génétique nul obtenu à partir de l’écouvillonnage effectué sur le métal testé directement avec KM.

Enfin, notre travail a montré que pour des traces infimes testées indirectement et directement par KM positifs, le plus souvent la concentration d’ADN a diminué pour le scénario KM direct par rapport au KM testé indirectement, néanmoins le plus important, concernant la génération de profil STR, les échantillons testés directement par KM n'ont produit aucun profil d'ADN, ou des profils de mauvaise qualité.

V. Discussion

Vu leur puissance, les analyses d'ADN doivent avoir la priorité sur les tests indicatifs. L'étude de l'impact de test Kastel Meyer sur l'ADN et la génération de profils génétiques STR était l'objectif de plusieurs recherches.

En 1960 Hunt *et al* et puis Cox en 1991, ont montré que le test Kastel Meyer est un test présomptif pour la détection des traces de sang et leur application nécessite la présence de l'hydrogène peroxydase pour la révélation (coloration rose en présence d'hémoglobine), ainsi ce test ne détruit pas la trace de sang donc on peut poursuivre les analyses d'ADN.

Webb *et al* en 2006 ont confirmé que le test kastel Meyer a une nature non destructive de la molécule d'ADN ce qui permet de poursuivre le processus d'analyse.

Par contre il y a des auteurs qui indiquent qu'il existe des possibilités d'interférence des tests indicatifs sur l'ADN. Parmi ces auteurs, Coquoz en 2003, montre que le principe général est de ne jamais appliquer un test indicatif directement sur des trace. En effet il n'est pas certain que les réactifs utilisés soient tous parfaitement inoffensifs pour les molécules d'ADN.

En 1973 Ulman et McCarthy montrent que l'hydroxyde de sodium est capable de désaminer l'ADN au niveau des résidus cytosine à une température de 70°C, ceci permet d'engendrer des destructions des chaînes d'ADN, suite à une dépurination ce qui induit une hydrolyse de liaison entre le sucre et le groupement phosphate ce qui cause une scission de chaîne d'ADN.

Shanan et ces collaborateurs également avancent qu'il n'est pas nécessaire d'appliquer les tests présomptifs sur des échantillons suspectés présentant des traces de sang. De ce fait ils ont indiqué aussi que l'utilisation du test Kastel Meyer sur ces échantillons permet la réduction de la quantité d'ADN.

Ces résultats ont fait l'objet d'une étude en 2017 par Sloots et son équipe effectué au Centre des Sciences Forensiques (Toronto –Canada), dont l'observation est en utilisant des écouvillons contrôlés que l'application directe du test KM sur une trace infime, qu'elle soit sur écouvillon ou sur un support (pièce à conviction) réduit ou élimine la capacité d'isoler de l'ADN amplifiable à partir de faibles quantités de sang.

D'après leur expérimentation sur les trois composants du test présomptif Kastel Meyer (phénolphtaléine, zinc, hydroxyde de sodium) ; ils ont déduit que le composant responsable de la diminution de la quantité d'ADN est l'hydroxyde de sodium. De ce fait, il aura une diminution ou élimination totale de la capacité de générer des profils génétiques.

Après l'extrapolation de nos résultats qui sont effectués au sein du Département d'Identification Génétique, de la Police Scientifique et technique d'Alger, soutient l'étude de **James Sloots *et al***, nous pouvons avancer que l'application directe de réactif Kastel Meyer induit la réduction de la quantité d'ADN et la diminution de la capacité de générer des profils STR, donc il y a une interférence entre le réactif KM et l'ADN.

Tableau V : Comparaison entre nos résultats et les résultats des articles précédents.

Auteurs	Coloration (présence d'hémoglobine)	Sensibilité	Composants du test kastel Meyer	Impact sur la quantité d'ADN	Impact sur la génération des profils
Hunt <i>et al</i> , 1960	Résultat négatif lorsqu'elle est appliquée directement sur des petites traces de sang	sensible	–	Ce test ne détruit pas la tache de sang Donc elle n'a pas un impact sur l'ADN	on peut poursuivre les analyses ADN jusqu'à la génération de profils génétiques
Cox, 1991	Coloration rose en présence d'hémoglobine (résultat positif)	Plus sensible	–	Ce test n'a pas un impact sur la quantité d'ADN	Il y a une génération de profils génétiques
Webb <i>et al</i> , 2006	–	–	–	A une nature non destructive de la molécule d'ADN	on peut avoir une génération de profils génétiques
Coquoz <i>et al</i> , 2003	Coloration rose en présence d'hémoglobine grâce a l'activité peroxydase de l'hème (résultat positif)		Il se peut que certains composants du réactif(KM) inhibent les enzymes, impliquées dans la PCR	Il est possible que le réactif induise des modifications chimiques irréversibles de la molécule d'ADN grâce a sa forte affinité, Ce qui réduit le rendement.	Le rendement est inapte à être utilisé dans la génération de profils génétiques
Ulman et Mc-carthy, 1973	–	sensible	Le NaoH désamine l'ADN au niveau des résidus cytosines en uraciles à 70°C .Le groupement phosphate est chargé négativement ce qui	Cette désamination a un impact sur la molécule d'ADN, elle va engendrer des destructions au niveau de l'ADN suite a une dépurination	–

			couvrie partiellement les résidus cytosines.		
Shanan <i>et al</i> , 2007	Coloration rose en présence d'hème	-	-	La réduction de la quantité d'ADN	-
Sloots <i>et al</i> , 2017	Coloration rose en présence d'hémoglobine en cas d'application directe et indirecte du test Kastel Meyer	Plus sensible et spécifique	Parmi les trois composants du réactif KM l'hydroxyde de sodium est responsable de la diminution de la quantité d'ADN	Dans le cas de l'application directe du test KM sur des traces infimes de sang, la quantité d'ADN est basse	Diminution ou élimination totale de la capacité de générer des profils génétiques ,on aura soit des profils de mauvaise qualité ,soit des profils nuls.
Nos résultats	Coloration rose en présence du sang dans les deux cas direct /indirect	Sensible et spécifique	-	Le test Kastel Meyer interfère avec La molécule d'ADN, récupérée a partir des échantillons testés directement, donc on a détecté une réduction de la quantité d'ADN grâce au système Q-PCR	Dans le cas de l'application du test Kastel Meyer indirectement, la plupart , des profils génères sont des profils complets, alors que dans le cas de l'application directe du test Kastel Meyer ,on obtient des profils de mauvaise qualité (partiels) ou des profils nuls.

Conclusion

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses recherches ont été conduites pour rendre les analyses génétiques en criminalistique plus sensibles, plus rapides et moins chères.

La détermination de la nature de la trace peut être réalisée directement sur une scène de crime ou au laboratoire. Elle permet d'identifier la nature de l'échantillon biologique : sang, salive ou sperme, celle-ci s'effectue à l'aide d'un test présomptif puis un test de confirmation.

Dans notre présent travail, nous avons étudié l'effet du test présomptif Kastel Meyer sur la quantité d'ADN et la génération de profils STR à partir de traces infimes de sang, testé directement et indirectement par ce dernier.

Les résultats obtenus montrent que les quantités d'ADN récupérées à partir des échantillons testés directement par KM est plus faible par rapport à celles testées indirectement.

Enfin, presque toutes les quantités d'ADN récupérées à partir des échantillons testés indirectement ont donné des profils complets et interprétables, alors que ceux testés directement ont donné des profils soit de mauvaise qualité, soit des profils nuls.

Cependant, une étude plus approfondie est proposée comme perspective, en effet, nous proposons d'élargir l'expérience ; toujours selon l'étude, en déterminant :

- si la perte d'ADN était due à un faible pH des réactifs de KM , ce qui réduirait la liaison aux billes magnétiques lors de l'extraction,

- laquelle des trois solutions réactives KM était responsable de la perte d'ADN (phénolphtaléine, hydroxyde de sodium, le zinc), en effet, selon l'étude, l'hydroxyde de sodium dans la solution de phénolphtaléine est principalement responsable de ce résultat, à savoir, réduire, voire éliminer la génération d'un profil génétique.

- effectuer le test KM direct sur un prélèvement contenant une autre source d'ADN (par exemple peau / tissu, salive, sécrétions nasales), en plus d'une petite quantité de sang, et voir si un profil génétique complet de 15 STR serait généré, qui serait probablement dû à la présence de cette matrice biologique intacte autre que le sang endommagé par KM.

Références Bibliographiques

- 1) Amory, S. (2007). La diffusion des gènes de la période protohistorique à l'époque actuelle dans le complexe spatial Altaï-baïkala. Thèse de doctorat en Archéologie, Ecole des Hautes Etudes en Sciences Sociales (EHESS), Paris, France.
- 2) Anderson, S.A.T., Bankier, B.J., Barrell, M.H.L., De Bruijn, A.R., Coulson J., Drouin, I.C., Esperon, D.P., Nieelich, B.A., Roe, F., Sanger, P.H., Schreir, A.J.H., Smith, R., Staden and Young, I.G . (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome .
- 3) Balding, DJ. (2005) Weight-of-evidence for forensic DNA profiles. 1st edition. John Wiley & Sons, 198 pages.
- 4) Beckman, J.S., Weber, J.L. (1992) Survey of human and rat microsatellites. *Genomics***12**:627-631.
- 5) Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980) construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms *Am.J.Hum.Genet.***32**(3):314-331
- 6) Brookes, C., Bright J.A., Habrison, S., Buckleton, J. (2012) Characterising stutter in forensic STR multiplexes. *Journal of Forensic Science International: Genetics* **6**(1), p58 -63 .
- 7) Buckleton, J.S., Ross, A., Roux, C., Ribaux, O., Walsh, S.J. (2004) DNA profiling and criminal Justice : A Contribution to a Changing Debate .p34-43 .
- 8) Butler, J.M. (2005) forensic DNA typing. Biology, technology and genetics of STR markers. 2nd, Elsevier Academic press, Burlington.
- 9) Butler ,J.M. (2007) fundamentals of forensic DNA Typing .Elsevier Academic Press ,San Diego ,USA.
- 10) 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**: 200-205.

Références Bibliographiques

- 11) Butler, J.M. (2011) Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology. 1st edition. Elsevier Academic Press, San Diego, 704 pages.
- 12) Carracedo, A. (2004) Methods in molecular biology: Forensic DNA typing protocols. 1st edition. Humana Press, 296 pages.
- 13) Coquoz, R., Taroni, F. (2006) Preuve par l'ADN: La génétique au service de la justice. 2ème édition. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, 327 pages.
- 14) Coquoz, R., Comte, J., Hall, D., Hicks, T., Taroni, F. (2003) preuve par l'ADN : la génétique au service de la justice (3ème Ed), presse polytechniques et universitaire romandes. science forensiques ,lausane .326 p.
- 15) Cox, M. (1991) Study of sensitivity and specificity of four presumptive tests for blood .
- 16) Di Rienzo, A., Peterson, C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., Freimer, N.B. (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA*91: 3166-3170.
- 17) Decorte, R., Cassiman, J.J. (1991) Detection of amplified VNTR Alleles by direct chemiluminescence : Application to the genetic identification of biological samples in forensic cases . fingerprinting : Approches and Applications.
- 18) Doutremepuich, C. (2001) 10 ans d'empreintes génétiques .Biology and technology behind STR Markers ,la sécurité d'Aujourd'hui , la documentation française . PARIS .
- 19) Doutremepuich, C. (2012) les empreintes génétiques en pratique judiciaire .bull.Acad.Natlé Méd.196,no 6,1117-1130.

Références Bibliographiques

- 20) Doutrempuich, C., Roca, I., Beaufiles, M., Esponda, A., Said, G. (2010) Homicide investigation :Anthropology and genetic Analysis for the crime scene in forensic genetic Research progress Fabricio Gonzalez .Andrade Editor ,Nova Publisher ,P73-90 .
- 21) Frumkin., Wasserstom, A., Davidson, A., Grafit, A. (2010)Authentication of forensic DNASamples .Forensic Science International,4:95-103.
- 22) Gaboyard, M., Lagardere, G., Audebert, L., Godichaud, S., Accoceberry, I., Gabriel, F., Dannaoui, E., Bougnoux M.E. (2015) Evaluation of a New Molecular Tool for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis and Detection of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. ECCMID.
- 23) Giles, R. E ., Blanc, H ., Cann, H .M and Wallace, D. C. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA.
- 24) Gill, P.(2001) an assessment of the utility of single Nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes .Int J Legal Med .;114(4-5): 204-10
- 25) Goodwin, w., Linacre, A., et Hadi, S. (2007) an introduction to forensic genetics .1st edition .John Wiley & Sons Ltd ,England .
- 26) Guide quantifiler kits ,user manuel . (2012) Applied Biosystems,life technologies ,Pub.Nb 4344790,Rev,F Foster city .CA94404 USA.P5-6.
- 27) Gusmao, L., Carracedo, A. (2003) profils AND–STRs spécifique au chromosome Y.
- 28) Hoai, E.P., Pussiau, A., Curci, J.Y . (2017) ADN, une perpétuelle avancée. Elsevier Masson SAS .
- 29) Hunt, A.C., Corby, C. and Dodd, B.E. (1960) the identification of human stain –a critical survey ,journal of forensic medicine
- 30) Internationnal Human Genome Mapping Consortium. (2001) A physical map on the human genome .Nature ,409(6822):p 934-41
- 31) Jobling, M.A., Kayser, M., Kittler, R., Erler, A., Hedman, M., Lee, A.C., Mohyuddin, A., Mehdi, S.Q., Rosser, Z., Stoneking, M., Sajantila, A., Tyler-Smith C., A comprehensive surveyof human Y-chromosomal microsatellites, Am. J. Hum. Genet.74 (2004) 1183–1197.

Références Bibliographiques

- 32) John ,S ., Ulman et Brian J,Mc Carthy (1973) .Alkali deamination of cytosine residues in DNA .
- 33) Kaplan,J.C.,et Delpech,M. (1994) Biologie Moléculaire et Médecine .2eme édition Flammarion ,FRANCE .
- 34) Kline ,M.C .,Jenkins B.,Rodgers S .,1998 ., J Forens .Sci.,43,250, non amplification of a VWA
- 35) Koumi,P.,Green,H.E.,Hartley,S.,Jordan,D.,Lahek,S.,Livett,R.J.,Tsang,K.W.,Ward,D.M.(2004) Evaluation and validation of the ABI 3700,ABI 3100 ,and the MegaBACE 1000 capillary array electrophoresis instruments for use with short tandem repeat microsatellite typing in a forensic environment .
- 36) Krawczak,M.,(1999)Informativity assesement for biallelic Single Nucleotide Polymorphisms.
- 37) Litt, M., Luty ,J.A (1989) A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:397-401.
- 38) Loistron,S.,(2009).Les empreintes Génétique en médecine légale :Réalisation, législation .thèse de Doctorat de l'Université de Nante .P18-27.
- 39) Newton, D .E., (2007) ,Forensic Serology .Forensic chemistry , new York .fact on file p48 .
- 40) Parsons,T.J.,Coble,M.D – increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome.
- 41) Petkovski,E(2006).Polymorphismes ponctuels de sequence et identification génétique. Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I p 1-114.
- 42) Preira,C.,(2014) . the Medico-legal importance and saliva criminalistics Systematization of its Application in forensic science . Portuguese Magazine of stomatology , dentistry and Maxillofacial surgery .Vol 55,n1,P3-6.
- 43) Pun,K.M, Comte ,J, Albrecht,C et Milon,M.P., (2008) AIDE – MÉMOIRE IDENTIFICATION PAR GÉNÉTIQUE FORENSIQUE.

Références Bibliographiques

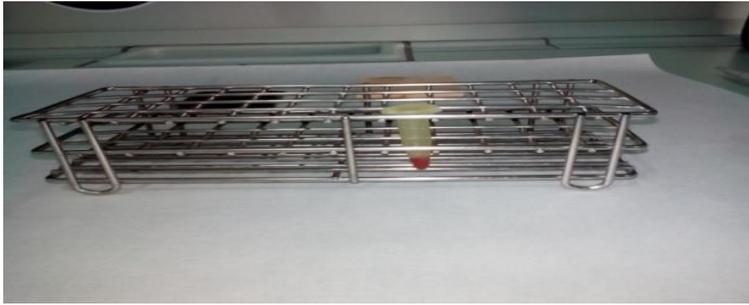
- 44) Ricordel,I., (2015) L'expertise en police scientifique : Chapitre 9. Les microsattellites au service de la justice.
- 45) Robertson ,A.M., Ross ,M., Burgoyne ,L.A., (1990) DNA in forensic science. Ellis Horwood Publisher, 24 pages
- 46) Ruitberg,C.M.,Reeder,D.J et Butler,J.M.,(2001).STR Base :a short Tandem repeat DNA Database for the human identity testing Community .Nucleic Acids Research ,29h(1):320-322 .
- 47) Saiki,R.K.,Gelfand,D.H.,Stoffel,S.,Scharf,J.S.,Higuchi,R.,Horn,G.T., Mullis,K.B.,et Erlich,H.A .,(1988)primer –directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase.science 239:487-491.
- 48) Sambrook,J.,Russell ,D.W.,(2001) Molecular cloning .a Manuel laboratory .third edition .cold spring Harbor laboratory press , New York ,USA .
- 49) Schibler ,D., Vaiman ,D., Cribiu, E.P .,(2000) Origine du polymorphisme de l'ADN. *INRA Prod. Anim.*Hors Série: 37-43.
- 50) Schumm ,J.W., (1996) New approaches to DNA fingerprint analysis. *Promega Corporation Notes Magazine*58: 37-43.
- 51) Semikhodskii ,A.,(2007) Dealing with DNA evidence :A Legal Guide . Routledge –Cavendish (196) : 13, 15, 17, 34-37 .
- 52) Shanani ,S., Tobe,I M.Sc.,Nigel Watson,I Ph.D.; and Niamh Nic Dae'íid,I Ph.D.2007. Evaluation of Six Presumptive Tests for Blood, Their Specificity, Sensitivity, and Effect on High Molecular-Weight DNA .
- 53) Singer,V.L.,et Johnson,I.D .,(1997) Fluophore characteristics:Making intelligent choices in application specific dye Selection :proceedings of the eight international Symposium of human identification.
- 54) Slater,G.W.,Desruisseaux,C.,Hubert,S.J.,Mercier,J.F.,Labrie,J.,Boileau,J.,Tessier,F., Pépin,M.P.,(2000) theory of DNA electrophoresis :a look at some current challenges electrophoresis .

Références Bibliographiques

- 55) Sloots ,J.,Lalonde ,W.,Reid,B.,Millman ,J.,(2017) Kastle-Meyer blood test Reagents are deleterious to DNA .S0379-0738(17)30407-3.
- 56) Sourcebook.,(1983) forensic serology ,immunology and biochemistry,U.S .department of justice, national institute of justice .
- 57) Tautz,D.,(1993) .Notes on definitions and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences .In D.J.Pena (Ed),DNA fingerprinting : State of Science .Basel :Birkhauser Verlag .
- 58) Tautz,D.,(1989) .hypervariability of simple sequences as a general source For polymorphic DNA Markers .Nucleic Acids Res .17(16) :646371.
- 59) Venter,J.C., Adams ,M.D., Myers,E.W., Li,P.W.,Mural ,R.J., Sutton,G.G., Smith,H.O.,Yandell,M., Evans,C.A.,Holt ,R.A et al .,(2001)The sequence of the human Genome Science .291(5507) : 1304-1351 .
- 60) Webb, J.L., Creamer, J.I., & Quickenden, T.I.,(2006). A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. *The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 21 (4): 214-220.
- 61) Weber, J.L.,David D .,Heil, J.,Fan Y .,Zhao, C.et Marth G .,(2002).Human diallelic insertion/deletion polymorphisms .Am.J.Hum.Genet.71:854-862
- 62) Walker, P .,et Wood ,E ., (2006).Forensic science experiments.
- 63) Wyman, A.R.,White,R.A.,(1980). a highly polymorphic locus in human DNA .Proc Natl . Acad. Sci. USA.77(11):6754-8 .

Annexes

Annexe 1 : Préparations du sang dilué (1 μ l + 99 d'eau distillé)



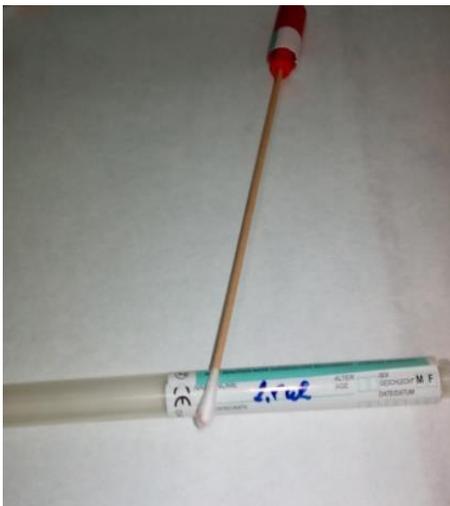
Annexe 2 : préparation des prélèvements sanguins sur écouvillons



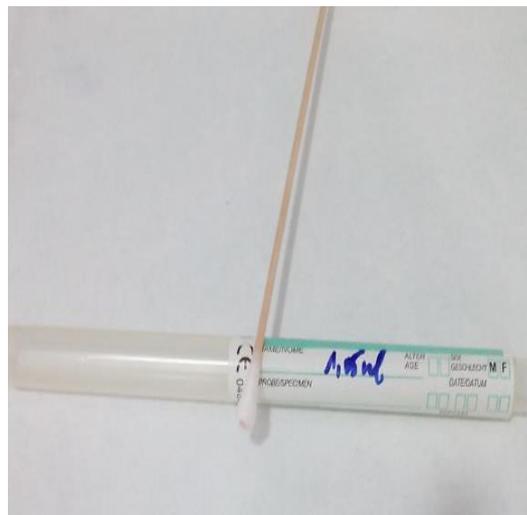
Prélèvement sanguin sur écouvillon de 10 μ l



Prélèvement sanguin sur écouvillon de 05 μ l



Prélèvement sanguin sur écouvillon de 2.5 μ l



Prélèvement sanguin sur écouvillon de 1.5 μ l

Annexes

Annexe 3 : Matériel et équipements d'examen et mise en tube

- Ecouillons stériles,
- Supports : métallique-bois
- Gants
- Micropipettes,
- Tips
- Eppendorfs

Annexe 4 : Matériel et équipement de l'extraction d'ADN

- Bloc chauffant avec agitateur
- Tubes Eppendorf 1.5 ml
- Portoir à 96 puits
- Portoir magnétique
- Tube Falcon 15 ml
- Micropipettes a volumes variable

Annexe5 : composition de la solution de lyse

Composants de la solution de lyse	Volumes
Crime lysis Buffer (tampon de lyse)	400 ul x nombre d'échantillons
Protéinase K	50 ul x nombre d'échantillons
Solution DTT 3M	4.5ul x nombre d'échantillons

Pour la préparation de la solution nous avons utilisé la pipette de 10-1000 ul .

Annexe 6 : Matériel et équipements de quantification d'ADN

- Micropipettes ependorfs+tips
- Microplaque à 96 puits
- Tubes ependorfs
- Système de PCR en temps réel (7500 real time PCR Applied Biosystem USA)
- Vortex
- Un film adhésive
- Centrifugeuse
- Logiciel SDS

Annexe7 : préparation de la gamme standard

Dilution en série	ADN témoin	Diluant (eau MQ)
200 ng/μl	ADN non dilué	-
50 ng/μl	10 μl	30 μl
16.7 ng/μl	10 μl	20 μl
5.56 ng/μl	10 μl	20 μl
1.85 ng/μl	10 μl	20 μl
0.62 ng/μl	10 μl	20 μl
0.21 ng/μl	10 μl	20 μl
0.068 ng/μl	10 μl	20 μl
0.023 ng/μl	10 μl	20 μl

Annexe8 : Conditions de cycle pour thermocycleur 7500 Fast

Etape	Température - Durée	Commentaire
Activation initiale de la PCR	95°C - 10 min	La PCR exige une incubation initiale pour activer la Polymérase
Cycle à deux étapes		
Dénaturation 40 cycles	95°C - 15 sec	Recueillir les données de fluorescence
Hybridation/élongation	60°C - 1 min	

Annexes

Annexe9 : équipements utilisés



Les kits ademtech



Ethanol 70 %



Portoir magnétique



vortex



Thermocycleur 9700



programme de thermocycleur



Lampe à UV (450-510 nm)



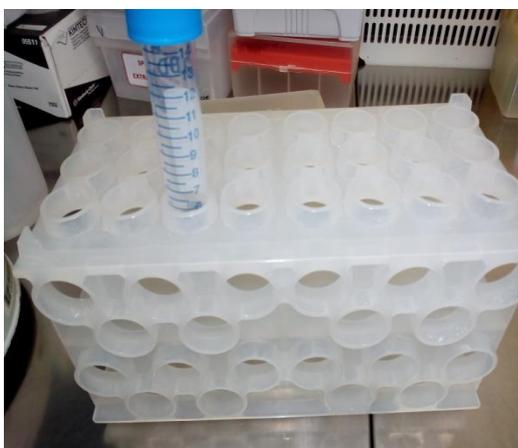
agitateur avec bloc chauffant



Système de PCR en temps réel 7500



portoir



Tube falcon 15 ml



Électrophorèse capillaire



Hotte



Micropipettes



Ecouvillon



les Kits Identifier plus

