



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



Université Saad Dahleb - BLIDA 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de Fin d'Etudes

En Vue de l'obtention d'un Diplôme de Master en science de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Option : Génétique et Physiologie

THÈME

Utilisation du Kit de Quantification d'ADN humain comme Kit de screening pour le profilage d'ADN

Réalisé Par : BOUKHIBAR Halima

TOUZOUT Naila Soraya

Soutenu publiquement devant le jury :

Mr.MOHAMED SAID.R	MCB	Université Blida 1	Président
Mr.BENYAHIA. N	MAA	Université Blida 1	Examineur
Mme.GUESSAIBIA.N	MCB	Université Blida 1	Promotrice
Mme.BENNABDELLAH.N	Lieutenant de la Police scientifique et technique		Invitée

Promotion: 2016/2017

Remerciements

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

Pour commencer, on adresse nos sincères remerciements à notre promotrice Madame GUESSAIBIA .N, Docteur et Maître de conférences B à l'université de Blida 1, Pour l'honneur qu'elle nous a fait en dirigeant ce travail, son encadrement fructueux et pour sa grande disponibilité et ses précieux conseils.

On remercie grandement les membres du jury composé de son président et également notre chef d'option de génétique et physiologie cellulaire Dr MOHAMED SAID.R qui nous a accompagné tout au long de notre cursus universitaire en nous transmettant tout son savoir avec une pédagogie exemplaire et une compétence avérée sans manqué de nous faire profiter de sa longue expérience que nous espérons ; pour lui rendre honneur ; avoir capitalisé dans le cadre de notre étude. Ces mêmes remerciements sont adressés également à Mr BENYAHIA.N pour la qualité de son enseignement dispensé avec compétence, pour son exemplarité dans la confiance en soi, son investissement sans limite et sa rigueur au travail et en définitive pour l'honneur qu'il nous fait d'avoir accepté d'apprécier le contenu de notre travail et évaluer son contenu que nous espérons être à la hauteur du savoir qu'il nous a transmis.

On tient à remercier tout le cadre de la police scientifique et technique notamment Mr BRAHITI.H, Mr BENAKMOUM.T, et Mlle BELABES.S, de nous avoir accueilli au sein de leur département avec simplicité et ouverture d'esprit de nous avoir accompagné avec dévouement et efficacité.

Par la même volonté et la même chaleur, on tient à remercier tout particulièrement Mme BENABDALLAH. N lieutenant de police près du département d'identification génétique de la police scientifique, pour son assistance pertinente, sa contribution perspicace auquel s'ajoutent une gentillesse et une modestie toute particulière. Nous la remercions également pour le sérieux dans le suivi de notre travail dans tous ces détails, et d'avoir partagé avec nous son expérience, ainsi que pour sa disponibilité et son professionnalisme au cours de notre stage.

Nos vifs remerciements vont à l'ensemble des membres du département de biologie et physiologie cellulaire, à nos enseignants pour leurs efforts et leur rigueur scientifique exceptionnelle, notamment à Mr SENINET Med Elhadi.

Merci, à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire. Qu'ils trouvent ici nos vifs respects et nos profondes gratitude.

Dédicace

Je dédie cet humble mémoire:

- A celle qui ma mise au monde et qui ma conduite là où je suis aujourd'hui de par son aide, son soutien et ses sacrifices, ma chère maman à qui je témoigne toute ma gratitude. Elle a été un modèle de courage, de labeur et de persévérance. Ce travail est le fruit de ses sacrifices et de ses efforts fournis pour mon éducation, mais il ne pourra exprimer tout l'amour et la reconnaissance que je lui porte.

- A ma tante et deuxième maman sans laquelle je ne serais rien en ce bas monde. Aucune dédicace ne saurait exprimer toute la reconnaissance et le respect que j'ai pour elle. Ses encouragements, son soutien et sa patience ont été mon moteur durant toutes ses années d'études. Qu'elle trouve ici toute ma reconnaissance, mon amour et ma fierté de l'avoir eu comme tante.

- A mes grands-parents partis trop tôt en espérant qu'ils soient fiers de moi de là où ils sont.

- A ma sœur, mon frère et mes tantes pour leur unique présence qui a été plus qu'un soutien. Qu'ils trouvent dans ce modeste travail l'expression de toute mon affection.

- A ma copine Boukhibar Halima pour sa confiance et son sérieux, je ne pouvais espérer meilleur binôme.

Soraya

Dédicace

À la prunelle de mes yeux, celle qui m'a donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir, ce travail est le fruit de tes sacrifices ! À ma mère.

À mon père, qui rien au monde ne vaut ses efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

À Mon frère, Mes sœurs et leurs conjoints, qu'ils n'ont cessé de me soutenir pendant mes études.

À Soraya, mon très cher binôme, et sa respectueuse famille, qui sans elle je n'aurais pu accomplir ce travail. Pour son sérieux et sa motivation tout au long de notre cursus.

À toutes les personnes qui ont contribué à réaliser cet humble travail de loin ou de près, qu'ils trouvent ici l'expression de mon affection et ma gratitude.

Halima.

Résumé

Afin de répondre aux besoins et aux exigences de la justice, la science forensique regroupant différentes méthodes d'analyses (chimiques, biologiques, informatiques etc.) est destinée à servir dans le cadre des enquêtes judiciaires. L'un des objectifs de ces analyses est de pouvoir identifier une personne à partir d'une trace biologique ce qui est appelé typage ADN.

Pour l'étude de la quantification d'ADN avec le Kit Quantifiler et l'obtention d'un profil génétique en utilisant le Kit AmpFISTER Identifier Plus, nous avons procédé à l'étude de la concentration et le profilage ADN de 101 échantillons de cas de routine.

On quantifie nos échantillons afin d'estimer la quantité totale des molécules d'ADN humain présentes dans un échantillon grâce à la RT-PCR, ces derniers seront ensuite séquencés par le 3130 xl Analyzer.

Par ailleurs, nous avons établi ces profils génétiques à partir de différents supports contenant des concentrations d'ADN variables afin de définir le rapport entre la quantité d'ADN et la qualité des profils génétiques obtenus.

Ces échantillons d'ADN ont été divisés en 4 groupes selon leur concentration, nous avons obtenues 85 échantillons avec une concentration d'ADN allant de 0 à 5 ng/μl qui ont abouties à 81% de profils interprétables et 19% de profils nuls, et les 16 échantillons restants présentant une concentration d'ADN supérieur à 5 ng/μl ont abouties à 93,75% de profils interprétables.

Les résultats obtenus démontrent que la qualité des profils génétiques est relative à la quantité d'ADN mais primordialement à sa qualité.

Mots clés : Science forensique, Typage ADN, Profils génétiques, ADN, Quantification, Kit Quantifiler, PCR, Séquençage.

Abstract

In order to meet the requirements of modern-day justice, the forensic science, which consists of various methods of analysis (chemical, biological, computing etc.), is used to make judicial investigations more reliable and accurate. One of the objectives of these analyses is to identify a person based on their biological track, and this process is called DNA typing.

To study the DNA quantification with the Quantifiler® Kit and obtain a genetic profile, the DNA concentration and profiling of 101 samples were selected.

The samples were quantified by using the RT-PCR to determine the total amount of molecules of human DNA found in a single sample, the latter will then be sequenced by 3130 xl genetic Analyzer.

We established these genetic profiles from various sources containing variable quantities of DNA to define the link between the amount and quality of DNA found in the obtained genetic profiles.

These DNA samples were divided into 4 groups according to their concentration to determine the type of genetic profile obtained, and then the results were listed. We obtained 85 samples with a concentration of DNA going from 0 to 5 ng/ μ l which ended with 81 % of an interpretable profiles and 19 % of an invalid profiles, and 16 remaining samples presenting a concentration of DNA upper to 5 ng/ μ ended with 93,75 % of an interpretable profiles.

The results demonstrate that the quality of genetic profiles does not necessarily depend on the amount of DNA but rather on its quality.

Keywords: forensic science, DNA typing, Genetic Profiles, DNA, Quantification, Quantifiler® kit , PCR, Sequencing.

ملخص

لما كانت العلوم الشرعية ترمي لتلبية حاجات ومتطلبات القضاء فإنها تضم العديد من منهجيات التحليل (الكيميائية والبيولوجية والحوسبية، وغيرها) التي تُستخدم في التحقيقات القضائية. على أن واحد من اهداف هذه التحاليل هو التمكين من تحديد هوية شخص ما انطلاقا من الأثر البيولوجي، وهو ما يسمّى بالتنميط الجيني.

وبغية دراسة التحديد الكمي للحمض النووي بعدة الكوانتيفايلر بلوس ®، والحصول على السمات الوراثية، عمدنا إلى تحديد التركيز وتنميط الحمض النووي لـ 101 عينة من الحالات الروتينية.

ضبطنا كمية هذه العينات بغرض تقدير الحجم الإجمالي لجزيئات الحمض النووي البشري الموجود في العينة الواحدة بفضل اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل (الذي يتيح ذلك بشكل لحظي). بعد ذلك قمنا بتعيين التسلسل الجيني لهذه العينات مستعينين بجهاز التسلسل 3130

وقد قسّمت عينات الحمض النووي على أربعة مجموعات وفقا لتركيزها من أجل تحديد نوعية السمات الوراثية المتحصل عليها، وصُنّفت النتائج ' حصلنا على 85 عينة مع تركيز الحمض النووي تتراوح من 0 إلى 5 نانوغرام / ميكرولتز مما أدى إلى 81٪ السمات الوراثية قابلة للتفسير و 19٪ السمات الوراثية غير قابلة للتفسير، و 16 عينة المتبقية مع تركيز الحمض النووي أكبر من 5 نانوغرام / ميكرولتز أدت إلى 93.75٪ من السمات الوراثية القابلة للتفسير.

وقد برهنت النتائج على أن نوعية السمات الوراثية لا تتعلق بالضرورة بكمية الحمض النووي المستعملة بل وبشكل اساسي بنوعيته.

الكلمات الرئيسية : العلوم الشرعية ، التنميط الجيني، السمات الوراثية، الحمض النووي ، التحديد الكمي ، عدة كوانتيفايلر ® ، تفاعل البوليميراز المسلسل ، التسلسل الجيني.

Liste des figures

Figure 1 : Organisation du génome humain.....	4
Figure 2 : Position des marqueurs STR utilisé en police scientifique sur les chromosomes humains	11
Figure 3 : Trois types de « Off-Ladder » allèles.....	11
Figure 4 : Polymorphisme d'un seul nucléotide SNP.....	12
Figure 5 : Illustration des résultats de typage STR à un seul locus hétérozygote pour un échantillon source unique	15
Figure 6 : Les principaux composants de l'électrophorèse Capillaire.....	17
Figure 7 : Paramètres recommandés par le fournisseur du Kit « Quantifiler » pour le système RT-PCR 7500.....	28
Figure 8 : Pan de dépôt des échantillons sur la 1ere plaque PCR en temps réel	29
Figure 9 : Principe de la technologie TaqMan.....	30
Figure 10 : Séparation et détection des allèles STR avec ABI prisme.....	35
Figure 11 : La courbe standard.....	38
Figure 12 : Profil génétique d'allelicladder du kit AmpFISTR® IdentifierPLUS ®.....	43
Figure 13 : Les éléments constituant du profil génétique	45
Figure 14 : Profils génétique d'une personne de sexe masculin de l'échantillon 142230.....	46
Figure 15 : Profil génétique complet de sexe masculin obtenu à partir de l'échantillon 160068.....	47
Figure 16 : Profil génétique Partiel de sexe masculin obtenu à partir de l'échantillon 143699.....	49
Figure 17 : Profil génétique nul obtenu à partir de l'échantillon 154138.....	51
Figure 18 : La division des profils génétiques selon leurs types (Interprétables, partiels, nuls).....	52

Liste des tableaux

Tableau I : Principales dates de développement de l'analyse ADN en pratique judiciaire.....	3
Tableau II : Système Codis.....	10
Tableau III : équipements d'extraction d'ADN nucléaire.....	22
Tableau IV : Protocole de préparation de la solution de lyse.....	23
Tableau V : Protocole de préparation du mélange Isopropanol/billes magnétique.....	23
Tableau VI : Les équipements et matériels de la quantification.....	26
Tableau VII : Cible du kit Quantifilier.....	27
Tableau VIII : Série de dilutions préparées à partir d'une solution mère.....	27
Tableau IX : Formules permettant le calcul des volumes des différents réactifs.....	28
Tableau X : indique les différents fluorochromes attachés aux marqueurs STR analysés par ce kit.....	31
Tableau XI : Matériels et équipements de l'amplification par PCR.....	31
Tableau XII : Programme utilisé pour la réalisation de la PCR.....	32
Tableau XIII : Matériels et équipements utilisés en post-amplification.....	33
Tableau XIV : Volumes des réactifs nécessaires à la post-PCR.....	33
Tableau XV : Réactifs nécessaires à l'électrophorèse capillaire.....	35
Tableau XVI : Matériels et équipements nécessaires à l'électrophorèse capillaire.....	36
Tableau XVII : Les résultats de la quantification des différents échantillons.....	38
Tableau XVIII : Résultats des échantillons obtenus en fonction des concentrations.....	40
Tableau XIX : Résultats des profils ADN obtenus en fonction des concentrations d'ADN.....	42
Tableau XX : Echantillons d'ADN ayant abouties à des profils génétiques nuls.....	50

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxy Ribonucléique

ARN : Acide Ribo Nucléique

ADNmt : Acide Désoxy Nucléique mitochondrial

ARNm : Acide Ribo Nucléique messenger

A : Adénine

ABI : Applied Biosystems

C : cytosine

CODIS : Combined DNA Index System

Ct : threshold Cycle

CCD : Charge Coupled Device

dNTP: Désoxy Nucléotides Triphosphate

G : guanine

HLA : Human Leukocyte Antigen

IPC : Internal PCR Control

Kvolt : kilo volt

kb : kilo base

Kpb : kilo paire de base

mg : milli gramme

ml : milli litre

min : minute

MSP : Séquençage Massivement Parallèle

N : nombre d'échantillons

ng : nano gramme

NGS : Séquençage de Nouvelle Génération

OL : Off Ladder

pb : Paire de base

POP 4 : Performance Optimized Polymer 4

PK : Protéinase K

rpm : rotation par minute

RFLP : Restriction Fragments Length Polymorphism

RFU : Relative Fluorescence Unité

RT-PCR : Real time-Polymerase Chain Reaction

RMP : Random Match Probability

STR : Short Tandem Repeat

SNP : Single Nucléotide Polymorphisme

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

T : thymine

Taq : Thermus aquaticus

Trs : tours

UV : Ultras Violet

μl: micro litre

V : Volume

VNTR : Variable Number Tandem Repeat

Table des matières

Introduction	1
Recherches bibliographiques	2
I. Historique	2
II. Le Génome Humain	3
II . 1 L'organisation du génome Humain.....	3
II . 1.1 L'ADN nucléaire.....	4
II . 1.2 L'ADN mitochondrial	4
II . 2 Le génome humain en criminalistique	5
II . 3 L'empreinte génétique et son importance en criminalistique	5
III. Les marqueurs utilisés pour l'identification génétique	6
III . 1 Les marqueurs génétiques en criminalistique.....	6
III . 2 Les différents polymorphismes	6
III . 2 . 1 Polymorphisme de longueur : « RFLP »	7
III . 2 . 2 Polymorphisme de répétition	7
III . 2 . 2.1 Séquence minisatellite VNTR	8
III . 2 . 2. 2 Séquence microsatellite STR	8
III . 2 . 2. 2.1 AllelicLadders.....	11
III . 2 . 2 . 3 Polymorphisme d'un seul nucléotide	12
IV. Traces biologiques d'ADN	12
IV.1- Les sources d'ADN et sa collecte en criminalistique	12
IV.2- Les type de traces biologiques	13
IV.2.1-Le sang	13
IV.2.2-Le sperme.....	13
IV.2.3- La salive.....	13
IV.2.4- Les os et les dents	13
IV.2.5- Les cheveux et les poils	14
IV.2.6- Les ongles	14
V. Extraction d'ADN	14
VI. Quantification d'ADN	14
VII. Applications des techniques de biologie moléculaire à la criminalistique	15
VII.1- Définition de la méthode PCR	15
VII.1.1- La PCR en temps réel (RT-PCR).....	16

VII.2- L'électrophorèse	16
VII.3- Electrophorèse capillaire	16
VIII. Profilage d'ADN	17
VIII.1- Profilage ADN en criminalistique	18
VIII.2- La réalité des profils ADN rencontrés	18
VIII.2.1-Profiles partiels	18
VIII.2.2- Les stutters.....	19
VIII.2.3- Les inhibiteurs	19
VIII.3- Les contrôle	20
VIII.3.1-contrôles positifs	20
VIII.3.2- contrôles négatifs	20
Matériels et Méthodes	21
I. Préparation des échantillons	21
I.1- Matériel biologique	21
I.2- Méthode.....	21
II. Examen et mise en tube	22
III. Extraction d'ADN nucléaire	22
III.1- Matériel	22
III.1.1- Equipements	22
III.2- Méthode	22
III.2.1- Lyse	23
III.2.2- Essorage	23
III.2.3- Liaison de l'ADN génomique aux billes magnétiques	23
III.2.4- Lavage.....	24
III.2.5- Séchage.....	25
III.2.6- Elution de l'ADN.....	25
IV. Quantification.....	25
IV.1- Matériels.....	25
IV.1.1- Matériels et équipements.....	25
IV.1.2- Réactifs et solutions.....	26
IV.2- Méthode.....	26
IV.2.1- Principe.....	25
IV.2.2- Mode opératoire.....	27

V.	Amplification par PCR	30
	V.1- Réactifs et solutions.....	31
	V.2- Matériels et équipements.....	31
	V.3- Méthode.....	32
	V.4- Post-amplification (Post-PCR).....	32
	V.4.1- Méthode.....	33
VI.	Electrophorèse capillaire	34
	VI.1- Réactifs et solutions.....	35
	VI.2- Matériels et équipements.....	35
	VI.3- Méthode.....	36
VI.	Validation des profils génétiques	36
 Résultats et discussions		
I.	Résultats et discussion de la quantification	37
	I.1- Résultats.....	37
	I.1.1- Courbe standard.....	37
	I.2-Discussion de la quantification.....	40
II.	Résultats et discussion du profilage ADN	42
	A.Profil complet.....	44
	B. Profil partiel.....	48
	C. Profil nul.....	50
	Conclusion	54

Introduction

Introduction

L'individu se distingue de ses semblables par un ensemble de caractéristiques qui rendent son identification possible, l'ADN étant une caractéristique majeure (polymorphismes), car il est différent et unique d'une personne à une autre hormis les vrais jumeaux qui ont un ADN identique. **(Coquoz et al, 2013)**

La probabilité pour que deux personnes aient un même ADN est très faible, cela peut s'expliquer par un grand polymorphisme qui caractérise le génome humain et ainsi différencie les individus entre eux. L'exploitation de ce polymorphisme est la base de toute expertise génétique qui a pour but l'identification humaine, ce qui rend de nos jours l'empreinte génétique l'un des outils les plus importants dans les enquêtes judiciaires. **(Butler, 2012)**

C'est en 1993, que le 1^{er} Kit d'analyse des polymorphismes a été commercialisé, ce qui a révolutionné les techniques d'analyse d'ADN et l'établissement d'empreintes génétiques. **(Doutremepuich, 2012)**

Ces profils génétiques peuvent jouer un rôle primordial dans la résolution d'affaires criminelles permettant l'identification fiable de l'auteur d'un crime, ou l'acquittement d'un suspect innocent.

Les progrès connus par les techniques d'analyses permettent désormais de déterminer simultanément les empreintes génétiques d'un grand nombre de personnes avec des quantités d'ADN de plus en plus faibles, les profils établis peuvent être comparés par des méthodes scientifiques avec d'autres enregistrés dans une base de données. **(Butler, 2012)**

Le travail que nous avons réalisé au sein du laboratoire de la police scientifique et technique, département d'identification génétique consiste à l'établissement de profils génétique à partir de concentrations d'ADN variables sur différents supports, dans le but d'étudier le rapport entre les résultats de la quantification d'ADN avec le kit Quantifiler® et l'obtention d'un profil génétique.

L'objectif principal de cette étude, est de déterminer s'il existe un rapport entre la quantité d'ADN d'un échantillon donné et la qualité des profils obtenus, et ce, à l'effet de valider ou/pas le seuil minimum fixé par le fabricant du kit de séquençage Identifiler® plus.

*Recherches
bibliographiques*

Chapitre I : Recherches bibliographiques

Sciences forensique

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

C'est une science qui trace le progrès et le développement de l'ADN appliqué à la criminalistique, en fournissant de vives démonstrations du potentiel étonnant du typage ADN, non seulement pour convaincre les coupables mais aussi pour exonérer les innocents **(Butler 2012)** donc les tests d'ADN en science forensique peuvent jouer un rôle dans la protection de l'innocent et l'implication des coupables. **(Butler, 2012)**

I- Historique

La découverte des premiers marqueurs génétiques est récente puisqu'elle date des années 1900 pour le groupe sanguin ABO par Landsteiner, les techniques sérologiques étaient un outil puissant mais limitées dans de nombreux cas de médecine légale. **(Landsteiner ,1900)**

En 1958, fut la découverte du système d'histocompatibilité tissulaire HLA par Dausset **(Dausset, 1958)** puis les années 1960/70 ont vu le développement de la biologie moléculaire, comprenant les enzymes de restriction, la méthode du séquençage par sanger et le southern blot, qui ont permis aux chercheurs d'examiner les séquences d'ADN.

En 1978, le polymorphisme de l'ADN a pu être détecté par l'utilisation du Southern blot. **(Goodwin et al, 2011).**

En 1980, David Botstein et ses collaborateurs ont été les premiers à exploiter les petites variations trouvées entre les personnes au niveau génétique comme repères pour construire une carte génétique humaine. Le type de variation particulier utilisé est appelée restriction fragment length polymorphism ou RFLP. **(Mansuet-Lupo, 2007)**

C'est en 1985 que Jeffreys *et al.* décrivent des régions génomiques très polymorphes, formées par de courtes séquences d'ADN qui se répètent en tandem. Ainsi que l'empreinte digitale et le profilage d'ADN **(Jeffreys et Wilson, 1985)**, la même année, il développe des logiciels RFLP multi-locus. **(Butler, 2012)**

En 1986, la PCR (polymerase chain reaction) a été inventé par Kary Mullis, qui a reçu une partie du prix Nobel de chimie pour son invention. **(Butler, 2012).**

Tableau I — Principales dates de développement de l'analyse ADN en pratique judiciaire
(Doutremepuich, 2012)

La Date	L'évènement
1991	Développement des analyses des STR
1993	Mise en place du 1 ^{er} kit commercial des analyses des STR
1995	Développement du 1 ^{er} analyseur de STR en fluorescence ABI 31
1996	Développement de l'analyse de l'ADN mitochondrial
2000	Développement de kit commerciaux permettant l'analyse de 16 STR simultanément
2001	Développement de l'analyse du chromosome Y
2002	Développement de la recherche sur les SNP
2010	Développement de séquenceurs de seconde génération

II- Le génome humain

Le résultat du séquençage du génome humain est de trois milliards de bases (A, C, G et T) dans un ordre particulier qui contient en quelque sorte des instructions pour la construction d'un corps humain se compose de 22 paires appariées de chromosomes autosomiques et de deux chromosomes déterminant le sexe (gonosomes), Ainsi, les cellules humaines normales contiennent 46 chromosomes ou 23 paires de chromosomes différents.

Le matériel génétique dans les chromosomes est composé de régions «codantes» et «non codantes». Les régions codantes sont connues sous le nom de gènes et contiennent les informations nécessaires à une cellule pour fabriquer des protéines. (Butler, 2012)

II.1- Organisation de génome humaine

La cellule contient deux types d'ADN : l'ADN nucléaire hérité des deux parents et l'ADN mitochondrial hérité uniquement de la mère, l'organisation de ce génome est représentée dans la **Figure 1**.

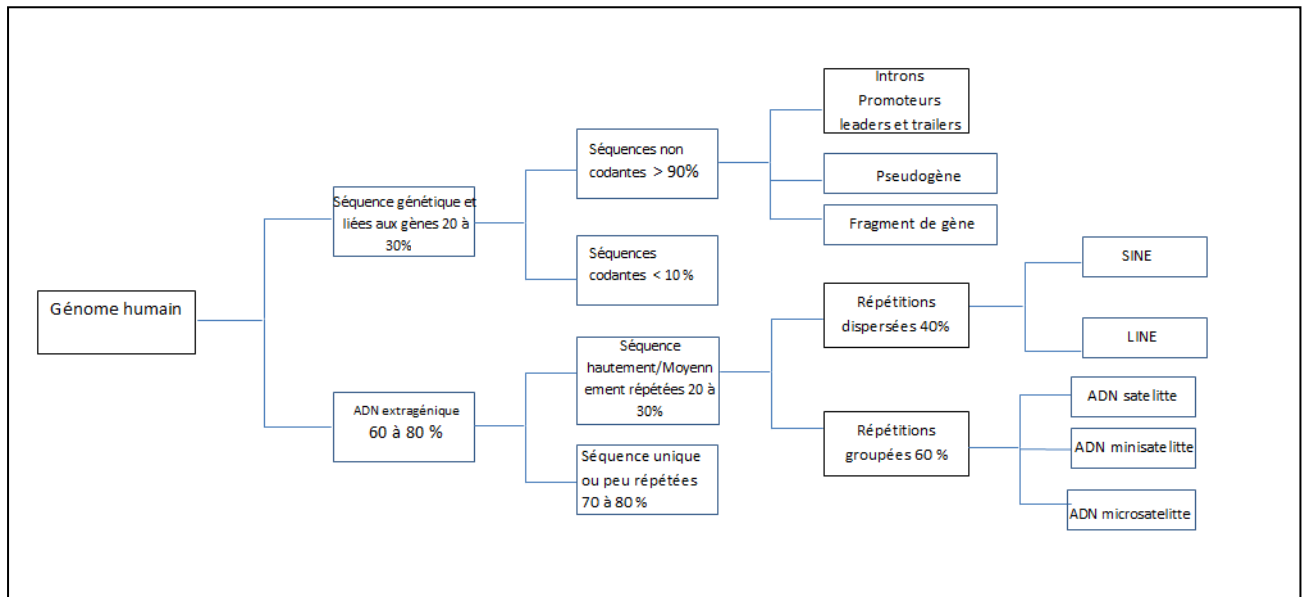


Figure 1 : Organisation du génome humain (Winter *et al.* 2006)

II.1.1- ADN nucléaire

L'ADN nucléaire est formé de seulement 5% de séquences codant pour des protéines, appelées gènes et dont l'homologie entre les individus d'une même espèce est grande. Le reste est constitué en grande partie de séquences répétitives, très polymorphes et dont la fonction précise n'est pas encore élucidée. Ces séquences répétées en tandem se situent soit dans les introns des gènes, soit entre les gènes. (Weber *et May*, 1989)

Cet ADN est réparti en 46 chromosomes, il existe en deux copies, l'une maternelle et l'autre paternelle. Il est linéaire et associé à des protéines pour former la chromatine, cette chromatine peut être dans deux états :

- Euchromatine : chromatine relâchée, donc accessible, fonctionnelle et elle représente 90% du génome humain
- Hétérochromatine : chromatine condensée, donc inaccessible et inactive, elle représente 10% du génome humain

II.1.2- ADN mitochondrial

Les mitochondries sont des organites du cytoplasme, c'est un héritage purement maternel contenant les protéines de la chaîne respiratoire impliquées lors de la synthèse de l'ATP.

Ces mitochondries possèdent leur propre génome, ainsi que leur propre machinerie pour synthétiser des protéines (Beaumont, 2016).

L'ADN mitochondrial diffère en de nombreux points de l'ADN nucléaire : il est monocaténaire et circulaire et ne contient que 16 569 nucléotides. Le polymorphisme n'est pas lié ici à des variations de longueur, mais à des variations dans la composition en nucléotides, par rapport à une séquence dite de référence. (Mansuet-Lupo *et al.*, 2008).

Chaque mitochondrie contient environ une dizaine de copies d'ADNmt. Il est possible dès lors aisément de calculer que chaque cellule peut contenir plusieurs milliers de copies d'ADNmt. Cette caractéristique est d'un grand intérêt pour les sciences forensiques.

Il est perçut que l'ADNmt pourrait être une solution de secours dans le cas où l'ADN nucléaire est en quantité insuffisante. **(Coquoz *et al*, 2013).**

II.2- Le génome humain en criminalistique

En 1985, Sir Alec Jeffreys démontra que l'ADN contenait des séquences qui se répétaient, et surtout, ce nombre de répétitions variait d'une personne à l'autre en étant transmis par voie mendélienne aux enfants. Cette découverte fut appliquée dès 1986 sur des prélèvements effectués sur deux scènes criminelles.

L'analyse ADN est appelée alors DNA fingerprint ou « Empreinte génétique ». Elle illustre bien l'intérêt de l'ADN en pratique judiciaire : exclusion d'un suspect, puis inclusion d'une autre personne.

L'objectif des analyses est de pouvoir identifier une personne à partir d'une trace biologique.

Aussi, les analyses doivent s'attacher à retrouver des différences, au niveau :

- Soit des unités répétitives (Short Tandem Repeat) présent au niveau de l'ADN nucléaire
- Soit du séquençage de l'ADN mitochondrial

Les analyses effectuées aujourd'hui comportent donc l'analyse de l'ADN nucléaire et/ou l'analyse de l'ADN mitochondrial. **(Jeffreys *et al*, 1985).**

II.3- L'empreinte génétique et son importance en criminalistique

La technique des empreintes génétiques a révolutionné les sciences médico-légales. Elle est basée sur le concept qu'aucun individu n'a le même ADN, excepté les vrais jumeaux. **(Coquoz *et al*, 2013).**

Le typage de l'ADN, depuis sa mise en place au milieu des années 1980, a révolutionné la science médico-légale et la capacité des forces de l'ordre de faire correspondre les auteurs à des scènes de crime. **(Butler, 2012).**

L'ADN nucléaire est formé de séquences répétées en tandem très polymorphes qui se situent soit dans les introns des gènes, soit entre les gènes.

On distingue deux types de marqueurs parmi ces séquences : les variable number tandem repeat (VNTR) ou minisatellites qui ont été les premières séquences décrites par Jeffreys, et les shorts tandem repeat (STR) ou microsatellites décrits plus tard en 1989 par Weber **(Weber *et May*, 1989).**

Le nombre de ces répétitions est variable d'un individu à l'autre, constituant une série d'allèles. Ces zones sont héritées des deux parents, selon la transmission mendélienne. Elles

sont réparties dans tout le génome et ne sont pas codantes, contrairement aux premiers marqueurs génétiques, comme le HLA. (**Dausset *et al*, 1974**)

Les grands domaines d'application des empreintes génétiques sont la criminalistique, la recherche de parenté et la recherche d'identité de victimes de catastrophes. (**Mansuet-Lupo, 2008**).

III- Les marqueurs utilisés pour l'identification génétique

III.1- Les marqueurs génétiques en criminalistique

Les zones de l'ADN analysées en police scientifique à des fins d'identification présente des polymorphismes appelés également marqueurs génétiques. L'analyse d'un marqueur génétique peut être effectuée sur la protéine codée par le gène ou sur l'ADN constituant le gène de cette protéine. Au cours de son histoire la police scientifique a développé l'analyse des marqueurs génétiques au fur et à mesure de leur découverte dans la recherche biomédicale. Il y eut d'abord les groupes sanguins ABO, Rhésus, puis de multiples autres caractères. (**Coquoz *et Taroni*, 2006**).

III.2- Les différents polymorphismes

Tous les individus qui composent l'espèce humaine sont génétiquement très proches les uns des autres, mais la présence d'un grand polymorphisme dans l'information génétique crée une biodiversité qui rend chaque être humain unique. Ce polymorphisme est la base des moyens d'identification par les empreintes génétiques, qui sont constituées par plusieurs marqueurs génétiques.

En d'autres termes, les différences dans les séquences d'ADN sont mineures. Il existe malgré tous des variations interindividuelles qui permettent la merveilleuse diversité que l'on peut observer tous les jours. Ces variations constituent ce qu'on appelle des polymorphismes. Selon l'usage on parle du polymorphisme dès que la variation est suffisante pour que l'allèle le plus fréquent ait une fréquence $<95\%$.

Des marqueurs polymorphes (variables) qui diffèrent d'un individu à l'autre peuvent être trouvés dans toutes les régions non codantes du génome humain (**Butler, 2012**), si l'on compare l'ADN de deux personnes prises au hasard, on trouve en moyenne une différence tous les 1200 nucléotides (**Coquoz, 2013**).

Au sein du génome, différents phénomènes plus au moins complexes sont responsables du polymorphisme :

- Des mutations qui ne changent pas la longueur de l'ADN
- Des insertions ou des délétions
- Des réarrangements chromosomiques dus à des recombinaisons génétiques ou à l'insertion de transposons (**Tagu, 1999**).

La variation de l'ADN, autrement dit polymorphisme est présentée sous la forme de différents allèles ou de diverses possibilités d'un locus particulier. Deux formes de variation sont possibles au niveau de l'ADN, les polymorphismes de longueur et des polymorphismes de répétition. **(Butler, 2012).**

III.2.1- Polymorphisme de longueur : « RFLP »

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) est une analyse de polymorphismes. Ces polymorphismes étant constitués de séquences répétitives, les différents allèles se distinguent par leur longueur. **(Coquoz et Taroni ,2006)**

C'est la première technique qui a été adaptée pour l'analyse de l'ADN médico-légal, pour déterminer les variations de la longueur d'un fragment d'ADN défini **(Rudin et Inman, 2002).**

L'enzyme de restriction reconnaît et coupe l'ADN double brin à une séquence spécifique de 4 à 8 nucléotides encadrant un site contenant des répétitions recherchée (site VNTR) **(Kan et Dozy, 1978)**

III.2.2- Polymorphisme de répétition

Les séquences répétitives représentent approximativement 50% du génome humain entier **(Lander et al, 2001)**. Ces séquences représentent des copies parfaites ou presque parfaites de motifs d'ADN de longueur variable.

La différence dans le nombre d'unité répétitive provoque la variation entre les différents allèles, ce qui se traduit par des allèles avec des longueurs différentes. C'est la raison pour laquelle les polymorphismes de répétition en tandem sont connus comme des polymorphismes de longueur **(Goodwin et al, 2007)**

Les catégories de répétitions en tandem les plus utilisées à des fins d'identification génétique sont les VNTRs et STRs.

Les séquences répétitives présentent une caractéristique précieuse pour la police scientifique. Ce sont des séquences que l'on trouve en plusieurs copies dans le génome et qui constituent près de 50% du génome humain, elles sont le siège d'un considérable polymorphisme car le nombre de répétitions varie considérablement d'un individu à l'autre; on parle de polymorphisme de longueur. **(Coquoz et Taroni, 2006).**

III.2.2.1- Séquence minisatellite VNTR (variable number tandem repeats)

Premières séquences décrites par Jeffreys en 1985 qui ont révolutionné l'utilisation de l'ADN en matière d'identification et de filiation **(Tautz, 1993)**, elles ont un élément répétitif constitué de répétitions en chaîne de 17 à 70 nucléotides, appelé VNTR **(Ould-Ahmed, 2009).**

Ce motif répétitif est réitéré entre deux et quelques centaines de fois à chaque locus (**Tautz, 1993**) ce qui aboutit à des fragments de 500 pb à 20 kpb. Le nombre de répétitions est variable d'un individu à un autre, et cette variabilité est à la base de l'empreinte génétique (**Loistron, 2009**)

Les VNTRs, se trouvent toujours dans l'euchromatine (**Farce, 2000**), plus fréquemment dans les régions proches des télomères, mais ils peuvent aussi être présents sur d'autres sites chromosomiques (**Petkovski, 2006**)

III.2.2.2- Séquence microsatellite STR (short tandem repeat)

Décrites par Weber, leur élément répétitif est constitué de moins de six nucléotides (généralement quatre). Ces zones sont héritées des deux parents, selon la transmission mendélienne. Elles sont réparties dans tout le génome et ne sont pas codantes (**Weber, 1989**)

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 (**Venter et al, 2001**).

Le motif de base des microsatellites ou STRs, compte entre 2 et 6 pb et est réitéré entre deux et environ cinquante (10 à 50) fois à chaque locus, générant des allèles variant en taille entre 50 et 500 pb (**Litt et al., 1990**). 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 utilisées en criminalistique car elles comportent généralement la répétition en tandem de seulement trois ou quatre paires de bases, qui peuvent être répétées dans la molécule de l'ADN plusieurs fois ou plusieurs dizaines de fois. Évidemment, une unité de trois ou quatre paires de bases seulement est extrêmement petite, ce qui constitue à la fois un problème et un avantage pour les fins escomptées.

L'avantage est qu'une très petite quantité d'ADN, même très dégradé, peut être suffisante pour être utilisée en criminalistique. Le problème, est que pour pouvoir procéder efficacement à une analyse, il faut grandement augmenter le nombre des très courtes séquences d'ADN. (**Ruitberg et al, 2001**).

La méthodologie standard actuelle dans le typage de l'ADN forensique repose sur l'amplification des marqueurs de courtes répétitions en tandem (STR) par la réaction en chaîne de polymérisation (PCR) et la taille des allèles déterminée pour chaque locus à l'aide d'une électrophorèse capillaire. (**Van Neste et al, 2012**)

En tant que deuxième génération de marqueurs génétiques d'ADN, les marqueurs à répétition en tandem (STR) sont largement distribués dans le génome humain, ce sont les marqueurs traditionnels utilisés pour la parenté, les personnes disparues et la comparaison directe des tests d'identité humaine.

La technique de profilage STR basée sur la PCR est devenue l'étalon-or pour l'identification humaine dans la médecine légale et est largement utilisée dans la détection de données biologiques de routine et l'établissement de bases de données. (**JunpingHana et al. 2017**)

Ces marqueurs ont une valeur considérable en raison de leur nature hautement polymorphe, de leur taille d'amplicon et de leur capacité à être multiplexée. (**Frank et al, 2016**)

Le séquençage massivement parallèle (MPS), également connu sous le nom de séquençage de nouvelle génération (NGS), permet un séquençage à haut débit des amplicons STR, il peut identifier la variation de séquence dans les STR ainsi que leurs longueurs d'allèles qui ont été traditionnellement obtenues par électrophorèse capillaire. (**Van Neste et al, 2012**)

Les polymorphismes bi-alléliques d'insertion / délétion (INDEL) sont le deuxième polymorphisme le plus abondant, découvert à ce jour, chez les humains et a été démontré comme une alternative utile au test traditionnel à répétition en tandem court (STR) en génétique médico-légale. (**Pereira et al, 2009**)

En raison de leur petite taille d'amplicon, les INDEL sont plus avantageux que les STR pour le typage d'échantillons d'ADN compromis. (**Pereira et Gusmão, 2012**)

La petite différence dans la taille de l'allèle minimise potentiellement l'amplification préférentielle des allèles de plus petite taille d'un hétérozygote, une occurrence plus fréquente avec un test STR traditionnel. Aussi les INDEL présentent un faible taux de mutations et ne génèrent pas de stutter lors de l'amplification par PCR. Enfin, la facilité de multiplexage des INDEL permet le développement de panneaux avec des probabilités relativement faibles de concordance aléatoire (RMP) pour les tests d'identité humaine (HID). (**Gettings et al, 2015**)

En 1996 le laboratoire du FBI a parrainé un effort communautaire de recherche en médecine légale pour établir des loci STR essentiels à inclure dans la base de donnée nationale d'ADN connue sous le nom de CODIS (Combined DNA Index System) (**Figure 2**)

Tableau II : Système Codis (Butler, 2012)

Locus	Chromosome	Motif répété	Taille des fragments	Nombre d'allèles
CSF1PO	5	TAGA	5-16	20
FGA	4	CTTT	12.2-51.2	80
TH01	11	TCAT	3-14	20
TPOX	2	GAAT	4-16	15
VWA	12	[TCTG] [TCTA]	10-25	28
D3S1358	3	[TCTG] [TCTA]	2-21	24
D5S818	5	AGAT	7-18	15
D7S820	7	GATA	5-16	30
D8S1179	8	[TCTA] [TCTG]	7-20	17
D13S317	13	TATC	5-16	17
D16S539	16	GATA	5-16	19
D18S51	18	AGAA	7-39.2	51
D21S11	21	[TCTA] [TCTG]	12-41.2	82
Amelogenine	x, y	Non applicable		

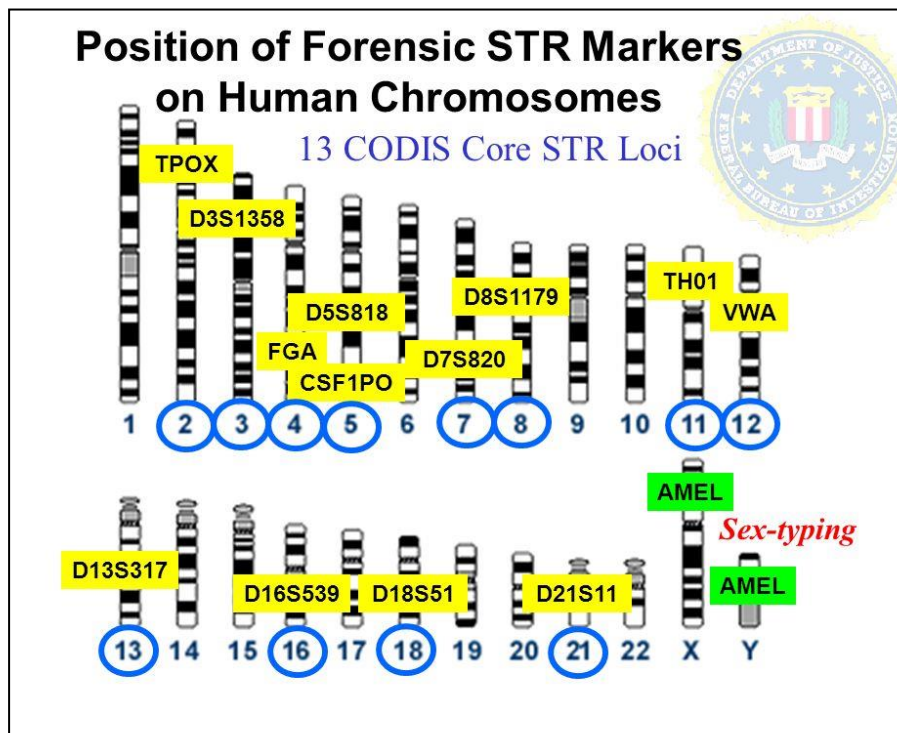


Figure 2 : Position des marqueurs STR utilisé en police scientifique sur les chromosomes humains (Butler, 2012)

III.2.2.2.1- Allelic Ladders

Un Ladder est un mélange artificiel des allèles communs présents dans la population humaine pour un marqueur STR particulier. (**Sanjantila *et al.* 1992**). Ils sont générés avec les mêmes amorces que les échantillons testés et fournissent ainsi une taille d'ADN de référence pour chaque allèle inclus dans le Ladder. Ils ont montré qu'ils étaient importants pour des déterminations précises du génotype (**Smith, 1995**). Ces Ladder servent de norme comme un bâton de mesure pour chaque locus STR (**Figure 3**) (**Butler, 2012**). Les fabricants commerciaux fournissent maintenant des Ladders dans leurs kits de typage STR afin que les laboratoires individuels n'aient pas à produire leurs propres Ladder. (**Butler, 2012**)

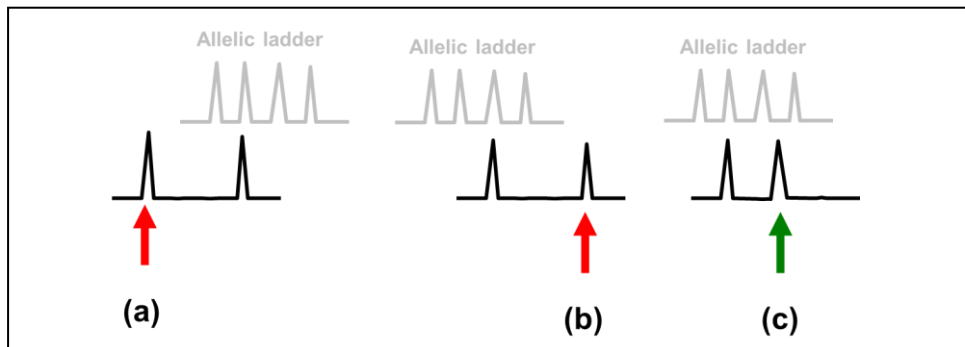


Figure 3 : Trois types de « Off-Ladder » allèles (**Butler, 2012**)

III.2.2.3- Polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP)

Les SNPs sont des marqueurs bi-alléliques correspondant à la substitution d'un seul nucléotide à une position spécifique dans le génome (**Figure 4**), ce qui crée des allèles différents (**Loistron, 2009**)

Les régions d'ADN ciblées pour l'analyse de SNP sont de petites tailles, ce qui se révèle intéressant pour l'analyse de molécules d'acides nucléiques fragmentées. Ceci est particulièrement important en criminalistique pour l'identification génétique. Ces marqueurs peuvent être aussi utilisés pour la détermination d'origine ethnique d'une personne. Les SNP présentent un taux de mutations bien inférieur à celui des microsatellites (STR), pour cela ils sont considérés comme des marqueurs génétiques stables (**Petkovski, 2006**)

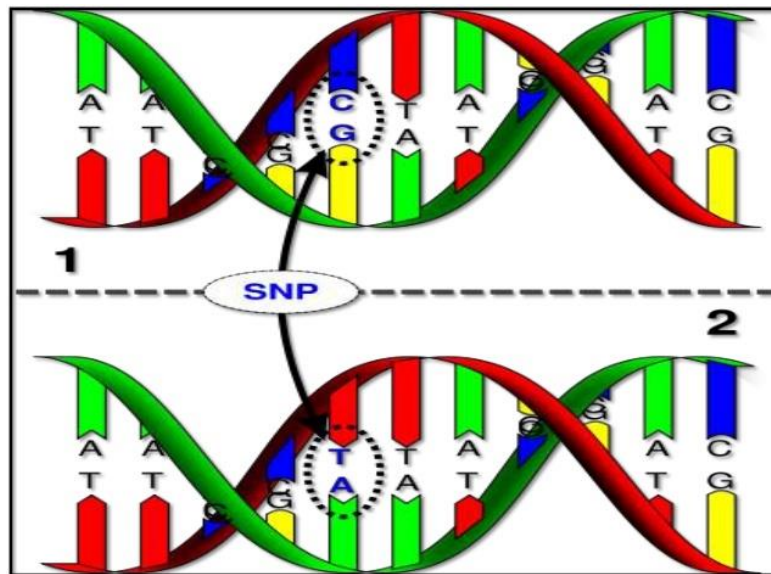


Figure 4: Polymorphisme d'un seul nucléotide SNP (Hall, 2008)

IV. Traces biologiques d'ADN

IV.1- Les sources d'ADN et sa collecte en criminalistique

L'ADN est présent dans chaque cellule nucléée et est donc présent dans les matériaux biologiques. Sur les scènes de crime, l'ADN est isolé et analysé à partir d'une variété de matériaux biologiques. La collecte de preuves ADN sur une scène de crime doit être effectuée soigneusement afin de produire des profils d'ADN qui sont significatifs et légalement acceptés.

Les preuves doivent être soigneusement recueillies, conservées, entreposées et transportées avant toute analyse effectuée dans un laboratoire d'ADN médico-légal. (Butler, 2012)

IV.2- Les types de traces biologiques

En criminalistique, les traces biologiques exploitables correspondent à des substances issues des êtres vivants, échangées ou laissées sur une scène de crime, d'agressions sexuelles ou de cambriolages, à titre d'exemple, les enquêteurs s'intéressent particulièrement à des traces biologiques. Le laboratoire en charge devra déterminer sa nature, mettre en évidence la présence d'ADN par quantification, et la dernière étape est l'analyse en réalisant un typage génétique. (goodwin *et al.*2007, Frumkin *et al.* .2010)

IV.2.1-Le sang

Le sang est un liquide dans lequel baignent de nombreuses cellules (globules rouges, globules blancs). Les globules rouges contiennent l'hémoglobine mais ne possèdent pas de noyau cellulaire et donc pas d'ADN. Tout l'ADN présent dans notre sang provient donc de nos globules blancs.

Le sang est la trace biologique traditionnelle par excellence, avec les analyses par PCR il est possible de dire que toute trace de sang visible à l'œil nu peut être analysée. **(Coquoz et Taroni 2006)**

IV.2.2-Le sperme

Le sperme est une suspension de cellules, les spermatozoïdes, dans un liquide, le plasma séminal. Il est très riche en ADN et si elle est découverte, une trace de sperme devrait fournir un résultat à l'analyse. D'autres cellules (cellules épithéliales, leucocytes) que les spermatozoïdes sont également présentes dans le sperme, ce qui permet d'envisager d'obtenir un profil ADN même d'un sperme azoospermique **(Coquoz et Taroni 2006)**

IV.2.3- La salive

La salive est un liquide contenant des cellules décrochées des parois des glandes salivaires ou des parois buccales, elle est susceptible d'être retrouvée dans une bien plus grande variété d'échantillons que le sang ou le sperme (timbres, rabats d'enveloppes, mégots de cigarettes, verre, etc). Les traces de salives contiennent toutefois très peu de matériel biologique. Elles font partie des traces biologiques modernes, qui n'ont commencé à être exploitées à large échelle que depuis l'arrivée des analyses d'ADN utilisant la PCR. **(Coquoz et Taroni, 2006)**

IV.2.4- Les os et les dents

Les os et les dents ne sont en principe pas retrouvés comme traces. Ils servent à l'identification de cadavres. L'ADN des os et des dents a de bonnes chances de survie même longtemps après le décès, et même si le cadavre a subi des dommages graves. **(Alonso, 2001)**

IV.2.5- Les cheveux et les poils

Les cheveux et les poils sont une catégorie d'échantillons qui a été exploitée dès l'introduction de la microscopie en police scientifique. **(Scheck, 2000)**

L'examen morphologique permet de trier les cheveux et donc d'économiser les analyses d'ADN sur des cheveux ne correspondant de toute façon pas aux suspects, ou pour sélectionner les cheveux ayant des chances raisonnables de fournir un profil d'ADN. **(Higuchi, 1992)**

L'ADN retrouvé dans les cheveux provient de leur racine. Les tiges des cheveux sont du matériel mort dans lequel on ne trouve au mieux que très peu d'ADN très fortement dégradé. **(Coquoz et Taroni, 2006)**

IV.2.6- Les ongles

Les ongles sont de bonnes sources d'ADN. Ils sont rarement retrouvés comme traces mais la police scientifiques s'y intéresse parce qu'il est possible d'y trouver des cellules d'un agresseur sous les ongles d'une victime. Dans ces cas, il est souvent difficile d'extraire l'ADN étranger sans extraire en même temps l'ADN des ongles. Il y'a alors le risque d'obtenir un profil ADN mélangé. **(Coquoz et Taroni, 2006)**

V- Extraction d'ADN

L'introduction du typage ADN au milieu des années 1980, a révolutionné la science médico-légale et la capacité de l'application de la loi, à faire correspondre les auteurs avec des scènes de crime. (Butler, 2012)

L'extraction d'ADN n'est pas une méthode d'analyse en soi. C'est simplement une étape obligatoire pour réaliser des analyses d'ADN que ce soit par la police scientifique (criminalistique) ou en science médicale. L'extraction d'ADN est un processus chimique complexe qui permet de dissoudre des molécules d'ADN à partir de traces biologiques.

Les processus chimiques des analyses d'ADN sont facilement inhibés par toutes sortes de substances interférentes présentes dans les traces biologiques. Il est donc nécessaire de dissoudre l'ADN des traces et de le purifier c'est-à-dire se débarrasser des molécules potentiellement interférentes. Diverses méthodes sont possibles et de nombreux kits sont disponibles sur le marché pour réaliser les opérations d'extraction et de purification de l'ADN. (Coquoz et Taroni, 2006)

VI- Quantification d'ADN

Lorsque des preuves biologiques provenant d'une scène de crime sont traitées pour isoler l'ADN présent, toutes les sources d'ADN sont extraites et sont présentes dans les échantillons à examiner. Ainsi, l'ADN non humain, tel que le matériel bactérien, fongique, végétal ou animal, peut également être présent dans l'ADN total récupéré à partir de l'échantillon avec l'ADN humain d'intérêt.

Pour s'assurer que l'ADN récupéré à partir d'une extraction est humain plutôt que d'une autre source il est nécessaire d'effectuer une quantification de l'ADN spécifique à l'homme. Ce n'est qu'après que l'ADN d'un échantillon ai été isolé que sa quantité et sa qualité peuvent être évaluées de manière fiable.

L'amplification par PCR d'un trop grand nombre d'ADN entraîne des électrodéogrammes exagérés qui rendent l'interprétation des résultats plus difficile et plus longue à réviser. Trop peu d'ADN peut entraîner la perte d'allèles en raison de l'amplification stochastique et de l'échec pour échantillonner également les allèles STR présents dans l'échantillon. **La figure 5** illustre le principe de «Goldilocks» de ne pas vouloir trop ou trop peu d'ADN dans une réaction de PCR pour produire un profil STR. (Butler, 2012)

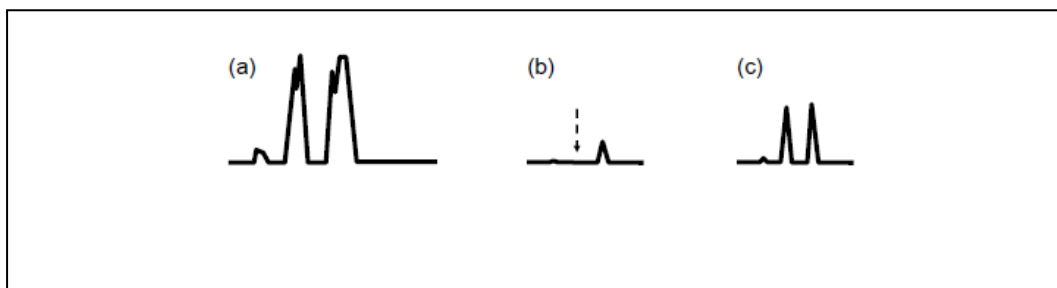


Figure 5 : Illustration des résultats de typage STR à un seul locus hétérozygote pour un échantillon source unique avec (a) trop grande quantité d'ADN amplifié (b) trop petite quantité d'ADN (c) quantité d'ADN optimal pour l'obtention de pics représentatifs

VII- Applications des techniques de biologie moléculaire à la criminalistique

VII.1- Définition de la méthode PCR (Polymérase chaîne reaction)

Cette technique développée en 1985 par Mullis permet d'amplifier une quantité d'ADN de manière très importante et beaucoup moins lourde qu'avec le clonage traditionnel, puisque l'ensemble de l'opération se fait in vitro.

L'inconvénient est que l'on amplifie que des petits fragments d'ADN de quelques milliers de bases, et que l'on obtient des quantités d'ADN bien inférieures à celles obtenues par le clonage cellulaire, mais cependant suffisantes pour réaliser une analyse quantitative.

(Beaumont, 2016)

Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN. À partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée. Sa nature exponentielle rend cette technique attrayante pour des analyses quantitatives.

Théoriquement, il existe une relation quantitative entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité du produit amplifié à n'importe quel cycle. **(Poitras et Houde, 2002)**

VII.1.1- La PCR en temps réel (RT-PCR)

Le développement de la PCR quantitative en temps réel a éliminé les variabilités traditionnelles associées à la PCR quantitative et permet la quantification du produit de la PCR de façon fiable et routinière. C'est une technologie basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. **(Poitras et Houde, 2002)**

Russell Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR (polymerase Chain Reaction) en élaborant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait. En traçant l'augmentation de l'émission de fluorescence en fonction du nombre de cycles, le système produit des courbes d'amplification exhibant un schéma plus complet du processus de la PCR. **(Higuchi et al, 1992).**

Le fait d'automatiser cette technologie la rend très performante pour des applications d'analyses à grande échelle. **(Martell et al, 1999).**

VII.2- L'électrophorèse

C'est une technique permettant de séparer des molécules par leurs différences de mobilité dans un champ électrique. Cette technique est destinée à s'appliquer à toutes les molécules chargées, c'est l'outil de base des analyses d'ADN depuis leurs débuts. Dans le contexte forensique, elle peut également trouver des applications dans l'analyse de stupéfiants.

Pour se déplacer dans le champ électrique, les molécules à séparer doivent se trouver dans un milieu liquide stabilisé par un support d'électrophorèse gélatineux (agarose, polyacrylamide).

La charge électrique des molécules est déterminante pour leur séparation. Plus une molécule est riche en charges électriques, plus vite se déplacera-t-elle dans le champ électrique. (Coquoz *et al*, 2013)

VII.3- Electrophorèse capillaire

C'est une électrophorèse qui a la particularité de se dérouler dans un tube presque aussi fin qu'un cheveu (un tube capillaire) (Figure 6). L'utilisation d'un capillaire permet d'utiliser des tensions électriques beaucoup plus élevées. Par la finesse du capillaire, l'échange de chaleur avec l'environnement est beaucoup plus rapide, ce qui évite un échauffement excessif du capillaire. Les tensions électriques élevées utilisées permettent d'avoir des temps de séparation extrêmement courts donc la séparation est très rapide. (Coquoz *et al*, 2013)

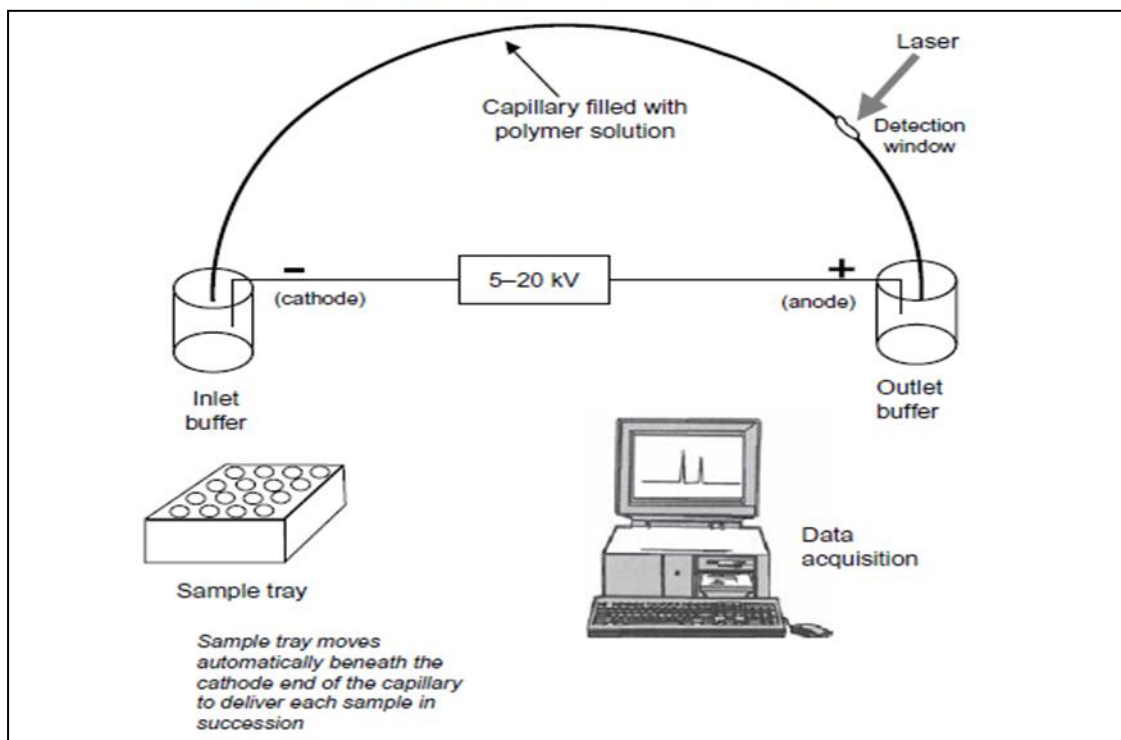


Figure 6: Les principaux composants de l'électrophorèse Capillaire (Butler, 2012)

VIII- Profilage d'ADN

Le profilage d'ADN est le processus de détermination du génotype présent à des endroits spécifiques le long de la molécule d'ADN. Des locis multiples sont généralement examinés dans le test d'identité humaine pour réduire la possibilité d'une correspondance aléatoire entre des individus non apparentés.

C'est une technique sensitive employée par les médecins légistes et des scientifiques, elle permet de rassembler et examiner des informations du passé qui sont ensuite utilisés dans la cour de justice, pour identifier les gens par leurs caractéristiques d'ADN. Cette technique a seulement besoin de quelques cellules de peau, de cheveux, d'une petite quantité de sang ou même de la salive pour identifier une personne (Saad, 2005)

Le profilage d'ADN est spécialement utilisé pour identifier un suspect pour résoudre un crime, mais elle peut aussi être utilisée pour affirmer si les gens sont reliés biologiquement les uns aux autres, comme par exemple avec les tests de paternité. **(Saad, 2005)**

VIII.1- Profilage ADN en criminalistique

Des méthodes nouvelles et améliorées se sont développées au fil des ans, de sorte que des tests avec un degré élevé de discrimination peuvent maintenant être effectués en quelques heures.

À des fins d'identification humaine, il est important d'avoir des marqueurs d'ADN qui présentent la plus grande variation possible ou un nombre de marqueurs moins polymorphes qui peuvent être combinés afin d'obtenir la possibilité de discriminer les échantillons. **(Butler, 2012)**

La meilleure solution incluant une grande puissance de discrimination et une vitesse d'analyse rapide a été obtenue avec des marqueurs d'ADN à courtes répétitions en tandem (STR) **(Butler, 2012)**. La petite taille des allèles STR par rapport aux allèles VNTR rend les marqueurs STR meilleurs candidats pour une utilisation en médecine légale où l'ADN dégradé est commun. **(Butler, 2012)**. Les STR multiples sont précieux car ils peuvent produire des résultats hautement discriminants et peuvent mesurer avec succès des mélanges d'échantillons et des matériaux biologiques contenant des molécules d'ADN dégradées. De plus, la détection de STR multiplexes peut être automatisée, ce qui est un avantage important à mesure que la demande de tests d'ADN augmente. **(Butler, 2012)**

VIII.2- La réalité des profils ADN rencontrés

Les profils ADN obtenus lors des analyses des traces ne correspondent pas toujours aux exemples idéaux, ils peuvent prendre l'allure particulière des profils de mélange lorsque les traces contiennent l'ADN de plusieurs personnes, ou celui des profils partiels lorsque l'ADN des traces est trop dégradé pour obtenir un résultat avec tous les STR du Kit multiplex. Dans les deux cas, les profils ADN obtenus ont une valeur probante amoindrie et les rapports d'expertise ne parviennent pas à afficher des valeurs de probabilité aussi impressionnantes que dans les cas plus simples **(Coquoz et Taroni, 2006)**.

VIII.2.1-Profiles partiels

L'exploitation de traces de plus en plus infimes et exotiques a également augmenté les risques d'obtenir des profils partiels.

Les profils partiels sont en général obtenus à partir de traces contenant de l'ADN partiellement dégradé, cette dégradation peut être due à la température, l'humidité, à la lumière (UV) ou une exposition à des substances chimiques variées, toutes ces conditions peuvent être combinées dans un environnement extérieur. Si la dégradation est relativement importante, le profil ADN obtenu avec un Kit d'analyse de STR en multiplex ne va fournir aucun résultat avec les STR de grande taille.

La trace ne contient en effet plus de morceaux d'ADN intacts de la taille nécessaire pour ces STR. Ainsi seuls les STR possédant des allèles de petite taille vont fournir un résultat à l'analyse **(Coquoz et Taroni, 2006)**.

L'ADN se dégrade à travers une variété de mécanismes incluant à la fois des enzymes et des processus chimiques. **(Lindahl, 1993)**

Une fois qu'une cellule (ou un organisme) meurt, son ADN est face à une dégradation par des nucléases cellulaires, ou des bactéries, de champignons ou d'insectes, en fonction des conditions environnementales **(Coquoz et Taroni, 2006)**

Le clivage hydrolytique et la détérioration de la base oxydante peuvent limiter le succès de la récupération et l'amplification de l'ADN. La cible principale pour le clivage hydrolytique est la liaison glycosidique à base de sucre. La rupture engendre ici une perte de nucléobases, alors l'efficacité d'amplification par PCR sera réduite ou la région cible ne pourra pas être amplifiée du tout.

Donc, la chaleur et l'humidité, qui accélèrent le clivage hydrolytique, sont des ennemis de la molécule de l'ADN intacte, ainsi que, l'irradiation UV (par exemple, la lumière directe du soleil) **(Butler, 2012)**.

VIII.2.2- Les 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 d'ADN sous la forme d'un pic de taille réduite correspondant à un allèle ayant un élément répétitif de moins que l'allèle nominal. Ces stutters se forment au cours de la réaction de copiage et ils sont d'autant plus prononcés que l'élément répétitif est court. Dans les STR ayant une séquence répétitive de 2 paires de bases, le pic de stutter est presque aussi grand que celui de l'allèle nominal. **(Coquoz et Taroni, 2006)**

VIII.2.3- Les inhibiteurs

L'absence de résultat lors de l'analyse d'un échantillon peut donc certes être dû à l'absence d'ADN, ou à la présence d'ADN dégradé, mais aussi à la présence d'inhibiteurs. En l'absence de résultat d'analyse, il ne faut donc pas conclure trop hâtivement à l'absence d'ADN. Il faut pouvoir exclure que l'on soit confronté à une situation d'inhibition. Le processus d'extraction de l'ADN est bien sûr destiné à fournir une préparation relativement pure d'ADN. Mais certaines substances peuvent néanmoins se co-purifier avec l'ADN. C'est par exemple le cas des colorants des jeans. **(Coquoz et Taroni, 2006)**

Deux inhibiteurs de la PCR couramment rencontrés dans les cas de médecine légale sont l'hémoglobine ou les teintures indigo dans le jeans et la mélanine trouvée dans les échantillons de cheveux. **(Butler, 2012)**

VIII.3- Les contrôle

VIII.3.1-contrôles positifs

Les contrôles positifs sont des échantillons contenant de l'ADN connu à une concentration connue. Ils permettent de s'assurer que le processus d'analyse fonctionne. Si aucun échantillon d'une série d'analyse ne fournit de résultat, le contrôle positif est là pour s'assurer que cette absence de résultat n'est pas due à une déficience du processus d'analyse. Le contrôle positif permet en outre de vérifier que les démarches de reconnaissance des allèles fonctionnent de façon satisfaisante et que les allèles dans un profil d'ADN sont étiquetés avec le nom adéquat. Le profil ADN du contrôle positif doit donc être connu. La teneur en ADN du contrôle positif étant connue, il permet en outre de vérifier que les méthodes d'analyse permettent d'atteindre la sensibilité voulue. **(Coquoz et Taroni, 2006)**

VIII.3.2- contrôles négatifs

Afin de vérifier si des contaminations se produisent au sein des laboratoires, ceux-ci incluent dans chaque série d'analyse ce que l'on appelle des contrôles négatifs (on parle aussi parfois de « blanc », ou de contrôle sans ADN). Il s'agit d'échantillon vides subissant néanmoins exactement les mêmes opérations d'extraction et d'analyse d'ADN que les traces, et qui ne doivent logiquement fournir aucun profil ADN. Si ces contrôles négatifs donnent un profil ADN, cela démontre l'existence d'une contamination. Le profil ADN obtenu devrait d'ailleurs permettre d'identifier la source de la contamination et aider à prendre les mesures correctives adéquates. **(Coquoz et Taroni, 2006).**

*Matériels et
méthodes*

Chapitre II : Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée à la Sous-Direction de la Police Scientifique et Technique, au Département d'Identification Génétique / ADN ce trouvant à Château neuf- Alger pendant une période de 6 mois.

L'objectif de cette étude est d'établir des profils génétiques en utilisant différentes concentrations d'ADN prélevées sur différents supports, afin de savoir s'il existe un rapport entre la quantité et la qualité de l'ADN pour l'obtention d'un profil complet, partiel ou nul.

I. Préparation des échantillons

I.1- Matériel biologique

Durant cette étude, nous avons analysé 101 prélèvements de traces biologiques (traces de contact, sang, salive, sperme, muscle, ongle, ect..) effectués sur différentes scènes de crime et ce à partir de:

- Vêtements et accessoires (pull, pantalon, jean, tricot de peau, chaussures, ceinture, lunettes, sous-vêtement) ;
- Draps, rideau, oreillers ;
- Mégots de cigarette ;
- Chewing-gums ;
- Couteaux ;
- Cigarettes, verres, gobelets, bouteilles, bouchons ;
- Papier mouchoir, papier journal ;
- Sachets.

I.2- Méthode

Pour cette étude les échantillons récoltés ont subi différentes étapes au cours de leur analyse, chaque étape a été effectuée dans une salle équipée à cet effet.

Durant la préparation des échantillons et de leurs supports, une attention particulière a été prise en considération à l'effet d'atteindre notre objectif en évitant tout type de contamination; du papier paille, des gants, des masques et des charlottes stériles ont été utilisés tout au long de la manipulation.

II. Examen et mise en tube

Etant donné le nombre important des échantillons utilisés pour notre étude, ces derniers ont été préalablement préparés et mis en tube par les ingénieurs biologistes du département d'identification génétique de la police scientifique et technique.

III. Extraction d'ADN nucléaire

Le kit utilisé pour cette extraction est le Crime Prep Adem-kit du laboratoire Ademtech.

III.1- Matériels

III.1.1- Equipements

Les équipements utilisés pour l'extraction d'ADN nucléaire sont répertoriés dans le **Tableau III**

Tableau III : équipements d'extraction d'ADN nucléaire

Equipements
Tubes eppendorf
Kit crime prepadem-kit du laboratoire Ademtech
Portoirs à tubes eppendorf
Bloc agitateur chauffant
Portoir magnétique du laboratoire Ademtech
Agitateur IKA VIBRAX VXR basic

III.2- Méthode

Avant de procéder à l'extraction d'ADN, les échantillons ont été répertoriés dans des séries d'extraction selon le protocole utilisé. Un tube eppendorf de 2 ml vide a été réservé pour le témoin négatif de chaque série d'extraction afin de repérer toute source de contamination durant la procédure. Le témoin négatif a subi les mêmes traitements qu'un échantillon biologique, mais il ne contient que les réactifs et les solutions utilisés pour l'extraction d'ADN.

III.2.1- Lyse

On commence par préparer la solution de lyse selon le **Tableau IV**

Tableau IV : Protocole de préparation de la solution de lyse

Crime Lysis Buffer Il doit être translucide, s'il présente un aspect laiteux, il est préconisé de le réchauffer à une température ambiante 37°.	400 µl X nombre d'échantillons
Protéinase K	50 µl X nombre d'échantillons
Solution DTT 3 M	4.5 µl X nombre d'échantillons

- Ajouter 454.5 µl de la solution de lyse dans tous les tubes contenant les échantillons.
- Mélanger la solution par pipetage.
- Placer les tubes sur un agitateur chauffant et laisser incuber à 55°, 800 rpm pendant 60 minutes.

III.2.2- Essorage

On essore les échantillons en utilisant un tube passoire (spin basket) et on récupère le lysat.

III.2.3- Liaison de l'ADN génomique aux billes magnétiques

- On ajoute au lysat 250 µl de **LB BUFFER** et on mélange en pipetant et en repipetant.
- Un pré-mélange Isopropanol/billes magnétiques doit être préparé comme dans le **Tableau V** ci-dessus :

Tableau V : Protocole de préparation du mélange Isopropanol/billes magnétique

Isopropanol	250 µl X nombre d'échantillons
Billes magnétiques : ADAMBEADS	15 µl X nombre d'échantillons

- Ajouter 265 µl du mélange Isopropanol/Billes magnétique aux échantillons, mélanger bien en pipetant et repipetant.
- Incuber à une température ambiante (agitateur) à 1000 Trs/min pendant 10 minutes pour faciliter les interactions ADN/Billes magnétiques.

III.2.4- Lavage

Après fixation de l'ADN aux billes magnétiques, on lave les billes pour éliminer les impuretés et les inhibiteurs. Trois(03) lavages consécutifs sont nécessaires, après avoir éliminé le surnageant à l'aide d'une pipette 20-200 µl.

1^{er} Lavage WASHING BUFFER 1

- Mettre les eppendorfs contenant les échantillons et les billes magnétiques sur le portoir magnétique pendant au moins 5 minutes.
- Tout en gardant les eppendorfs fixés sur le portoir magnétique, éliminé le surnageant sans toucher la paroi du tube.
- Retirer les eppendorfs du portoir magnétique et ajouter 500µl du **Washing Buffer 1**.
- Remettre les eppendorfs contenant les échantillons et les billes magnétique sur le portoir magnétique pendant au moins 5 minutes.
- Tout en gardant les eppendorfs fixés sur le portoir, éliminé le surnageant sans toucher la paroi du tube.
- Retirer les eppendorfs du portoir magnétique.

2eme Lavage WASHING BUFFER 2

- Ajouter 500 µl du **Washing Buffer 2** aux échantillons.
- Mettre les eppendorfs contenant les échantillons et les billes magnétiques sur le portoir magnétique pendant au moins 5 minutes.
- Tout en gardant les eppendorfs fixés sur le portoir, éliminé le surnageant sans toucher la paroi du tube.
- Retirer les eppendorfs du portoir magnétique.

3eme Lavage ETHANOL 70%

- Ajouter 500 µl d'Ethanol 70% aux échantillons.
- Mettre les eppendorfs sur le portoir magnétique pendant au moins 5 minutes.
- Tout en gardant les eppendorfs sur le portoir, éliminé le surnageant sans toucher la paroi du tube.

III.2.5- Séchage

- Laisser sécher les eppendorfs sur le portoir magnétique pendant 5 minutes à température ambiante sans dépasser le délai.

III.2.6- Elution de l'ADN

- Retirer les eppendorfs du portoir magnétique puis ajouter 60 µl de l'**Elution Buffer** (tampon d'éluion).
- Incuber pendant 10 minutes à 75° et 1000 Trs/min (Bloc chauffant + agitateur).
- Remettre les eppendorfs sur le portoir magnétique pendant 5 minutes.
- Récupérer le surnageant (ADN pure) et le transférer dans un nouvel eppendorf identifié (Extractum).
- Aliquoter 6 µl pour la quantification, le reste se conserve à -20°.

IV- Quantification

L'objectif de la quantification est d'estimer la concentration totale des molécules de l'ADN humain présentes dans un échantillon. Les résultats obtenus vont nous permettre d'obtenir plusieurs informations :

- * Si la concentration de l'ADN humain détecté est suffisante pour procéder à une analyse ADN;
- *Déterminer la quantité d'extractum à utiliser pour optimiser les réactions effectuées (dilution ou concentration);
- * Détecter les éventuels inhibiteurs par la détermination de l'IPC (Internal PCR Control) et, ainsi, pouvoir adapter les protocoles d'analyse en conséquence.

IV.1- Matériels

IV.1.1- Matériels et équipements

Les équipements de la quantification de l'ADN sont répertoriés dans le **Tableau VI**

Tableau VI : Les équipements et matériel de la quantification.

Equipements
Kit Quantifiler Human DNA (Applied Biosystem USA)
Plaque PCR à 96 puits
Thermocycleur7500 Fast Real-Time PCR System
Vortex (Heidolph REAX control)

IV.1.2- Réactifs et solutions

- Kit de quantification « Quantifiler Human DNA » (Applied Biosystem, USA) contenant les réactifs suivants :

- Primers set : (Amorce) Sonde Taqman, plus contrôle PCR interne (IPC)
- ADN standard : ADN purifié à 200 ng/μl
- Mélange réactionnel (Réaction mix) : Taq polymérase gold, des dNTPs, mg²⁺

- Eau ultra pure

IV.2- Méthode

IV.2.1- Principe

Basée sur une réaction enzymologique, la PCR, et sur la mesure en continue de son produit d'amplification (amplicon).

A chaque cycle d'amplification, la concentration d'ADN total est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. 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 peuvent donc être 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 initial.

Tableau VII: Cible du kit Quantifiler®

Kit	Gene cible	Localisation	Longueur d'amplicon	Région amplifiée
HumanQuantifiler	Humantelomerase reverse transcriptase	5p15.33	62 bases	Intron

IV.2.2- Mode opératoire

Avant de procéder à la quantification, une série de 8 dilutions a été préparée à partir d'une solution mère d'ADN standard (200 ng/μl). Cette série de standards a été préparée selon les recommandations du fournisseur (**Tableau VIII**) et a pour but d'établir une courbe d'étalonnage, à partir de laquelle le logiciel SDS calcule la concentration d'ADN dans chaque échantillon.

- Commencer par remplir le plan de dépôt quantification Real Time PCR.

1- Préparer la gamme standard à partir de l'ADN standard de 200 ng/μl, et procéder aux dilutions suivantes avec de l'eau pure :

Tableau VIII : Série de dilutions préparées à partir d'une solution mère

Std	Concentration	Facteur de dilution	Volume du standard
Std 1	50 ng/μl	1/4	30μl eau pure + 10μl (solution mère)
Std 2	16.7 ng/μl	1/3	10μl(Std1) + 20μl eau pure
Std 3	5.56 ng/μl	1/3	10 μl(Std2) + 20 μl eau pure
Std 4	1.85 ng/μl	1/3	10 μl(Std3) + 20 μl eau pure
Std 5	0.62 ng/μl	1/3	10 μl(Std4) + 20 μl eau pure
Std 6	0.21 ng/μl	1/3	10 μl(Std5) + 20 μl eau pure
Std 7	0.068 ng/μl	1/3	10 μl(Std6) + 20 μl eau pure
Std 8	0.023 ng/μl	1/3	10 μl(Std7) + 20 μl eau pure

2- Mélanger l'ADN à quantifier en faisant des va et viens pendant 10 secondes avec la pipette et éviter de vortexer pour ne pas perdre l'ADN sur les parois du tube.

3- Vortexer le témoin négatif (permet de s'assurer que le mix n'est pas contaminé) et l'ADN standard.

4-Mélanger doucement par retournement le Réaction Mix.

5- Vortexer les primers.

6- Calculer les volumes des différents réactifs nécessaires au mix (**se référer au tableau IX**) :

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

Réactifs	Volume
Réaction Mix	$V = 12.5 \times (N+2)$
Primer	$V = 10.5 \times (N+2)$

N étant le nombre d'échantillons.

7- Préparer le Mix dans un tube eppendorf.

8- Répartir 23μl de ce mix dans chaque puits de la plaque PCR à 96 puits.

9- Ajouter dans chaque puits 2μl de chaque échantillon et standards.

10- Recouvrir la plaque avec du papier adhésif transparent à fin d'éviter les contaminations et laisser passer les lumières fluorescentes.

11- placer la plaque dans le thermocycleur 7500 Fast et lancer le programme 960

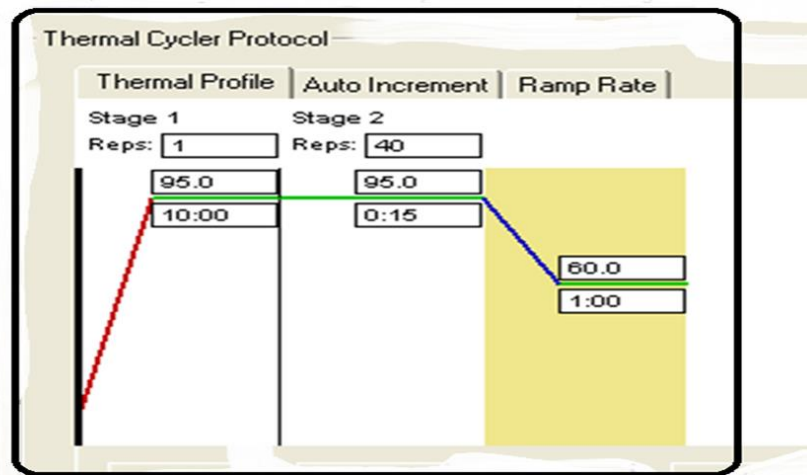


Figure 7 : Paramètres recommandés par le fournisseur du Kit « Quantifiler® » pour le système RT-PCR 7500.

La figure Ci-dessous représente le plan de dépôt des échantillons sur les deux plaques optique utilisé lors de la quantification :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 1	Std 1	Ech 1	Ech 9	Ech 17	Ech 25	Ech 33	Ech 41	Ech 48	Ech 56	Ech 64	Ech 72
B	Std 2	Std 2	Ech 2	Ech 10	Ech 18	Ech 26	Ech 34	Ech 42	Ech 49	Ech 57	Ech 65	Ech 73
C	Std 3	Std 3	Ech 3	Ech 11	Ech 19	Ech 27	Ech 35	Ech 43	Ech 50	Ech 58	Ech 66	Ech 74
D	Std 4	Std 4	Ech 4	Ech 12	Ech 20	Ech 28	Ech 36	Ech 44	Ech 51	Ech 59	Ech 67	Ech 75
E	Std 5	Std 5	Ech 5	Ech 13	Ech 21	Ech 29	Ech 37	Ech 45	Ech 52	Ech 60	Ech 68	Ech 76
F	Std 6	Std 6	Ech 6	Ech 14	Ech 22	Ech 30	Ech 38	Ech 46	Ech 53	Ech 61	Ech 69	Ech 77
G	Std 7	Std 7	Ech 7	Ech 15	Ech 23	Ech 31	Ech 39	Ech 47	Ech 54	Ech 62	Ech 70	Ech 78
H	Std 8	Std 8	Ech 8	Ech 16	Ech 24	Ech 32	Ech 40	Tmn +	Ech 55	Ech 63	Ech 71	Tmn -

Figure 8: Plan de dépôt des échantillons sur la 1ere plaque PCR en temps réel (**original**)

Le Kit Quantifiler™ utilise une sonde TaqMan qui s'hybride spécifiquement à une séquence cible de l'ADN humain (Un fragment de 62 Pb du gène codant pour la télomérase réverse transcriptase humaine localisé dans 5p15.33) cette sonde est marqué à son extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter) et à son extrémité 3' par une molécule appelée suppresseur de fluorescence (quencher).

Si la sonde est intacte, aucune fluorescence n'est détectée en raison de la proximité de ces deux molécules. Lors de la phase de l'élongation de la réaction PCR, la sonde s'hybride à une séquence cible et va être dégradée par l'ADN polymérase grâce à son activité 5' nucléase. Le fluorochrome émetteur, alors séparé du suppresseur, va pouvoir émettre de la fluorescence qui sera détectée par la camera CCD de l'appareil.

Pendant la phase exponentielle de la PCR, l'augmentation du signal de fluorescence détecté est proportionnelle à la quantité d'amplicons générée. Il est possible de déterminer le nombre de molécule d'ADN cible de départ en fonction du nombre de cycle nécessaire pour atteindre une valeur seuil de fluorescence. Un échantillon d'ADN de concentration connue (50ng/μl) sert à réaliser une gamme de dilution qui permet de produire une courbe standard à partir de laquelle sont déduites les concentrations des échantillons.

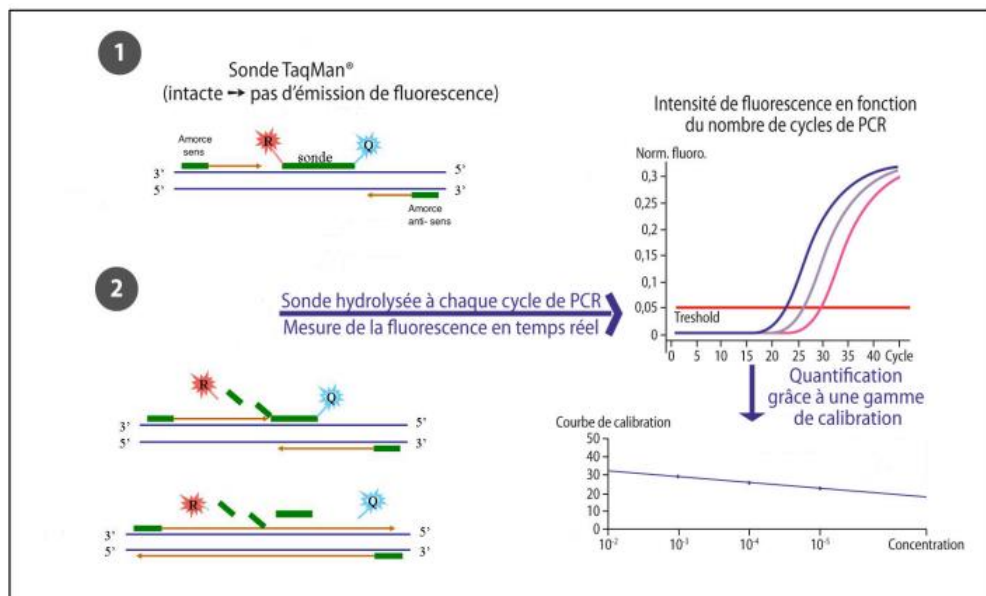


Figure 9: Principe de la technologie TaqMan (Applied Biosystems)

Principe de détection de l'ABI PRISM 7500 Fast system :

- La lampe « halogen tungsten » dirige la lumière dans chaque puits à travers le papier adhésif en excitant les fluorochromes.
- Un système composé de lentilles, filtres et miroir dichroïque focalise l'émission de fluorescence vers une caméra CCD (Camera Coupled Device)
- Basés sur des longueurs d'ondes, les filtres séparent la lumière en traversant la camera CCD
- Durant le run, la camera CCD détecte la fluorescence émise entre 500 et 600nm de chaque puits
- Le Software SDS (SequenceDetection System) collecte les données de la fluorescence émise de la caméra CCD.

V- Amplification par PCR

Pour cette étape d'amplification des échantillons d'ADN, on utilise le Kit AmpFISTER® Identifiler® Plus contenant tous les réactifs nécessaires pour l'amplification de l'ADN génomique humain. Tous ses réactifs sont développés par Applied Biosystèmes®

Le Kit AmpFISTER® Identifiler® Plus permet d'amplifier simultanément 15 allèles (marqueurs) de tétranucléotidiques et l'amélogénine (marqueur déterminant du sexe)

V.1- Réactifs et solutions

Le kit identifiler® Plus est composé du Master Mix, des primers et de l'allélique Ladder, dont chaque marqueur est attaché avec un fluorofore, ainsi que le gène scan Liz 500 qui est considéré comme un standard de taille.

Le tableau X : Indications des différents fluorochromes attachés aux marqueurs STR analysés par ce kit.

Kit Identifiler plus à 16 marqueurs	
Master Mix + Primers + Allélique ladder	
Fluorochrome (colorant fluorescent)	Marqueurs
6-FAM	D8S1179- D21S11- D7S820- CSF1PO
VIC	D3S1358- THO1- D13S317- D16S539- D2S1338
NED	D19S433- VWA- TPOX- D18S51
PET	Amélogénine- D5S818- FGA
Gène Scan LIZ 500 (standard de taille)	

V.2- Matériels et équipements

Les matériels et équipements utilisé pour l'amplification des échantillons sont listés dans le tableau ci-dessus :

Tableau XI : Matériels et équipements de l'amplification par PCR

La Hotte
Les embouts + vortex + portoir + tubes eppendorfs
Centrifugeuse + pipette Eppendorf
Plaque 96 puits + support de plaque
Thermocycler 9700 ABI

V.3- Méthode

1- Préparation de la plaque PCR :

Nous avons commencé par la préparation de la plaque PCR en identifiant et calculant les volumes des différents réactifs nécessaires au Mix pour n échantillons : $5\mu\text{l} \times n$ pour les primers + $10\mu\text{l} \times n$ pour le Master Mix

- Vortexer, afin d'homogénéiser les échantillons d'ADN à amplifier ainsi que l'ADN contrôle et les différents réactifs de la PCR, et centrifuger 3 à 5 secondes.
- Après homogénéisation et centrifugation du mix, répartir $15\mu\text{l}$ dans chaque puits, selon le plan de dépôt préparé.

La réaction PCR est réalisée dans un volume total de $25\mu\text{l}$ dont $10\mu\text{l}$ de chaque échantillon d'ADN sont ajoutés à $15\mu\text{l}$ du mix réactionnel.

- Dans chaque puits, mettre $1\mu\text{l}$ de chaque échantillon à amplifier et terminer par l'ADN contrôle (témoin positif et témoin négatif)

La dernière étape d'amplification consiste à placer la plaque dans un thermocycleur préalablement programmé pour STR après avoir vérifié tous les puits, et on la couvre avec une feuille en aluminium.

Des cycles thermiques successifs sont entrepris (28 cycles) par le thermocycleur ABI 9700. Le programme est illustré dans le **tableau XII**.

Tableau XII: Programme utilisé pour la réalisation de la PCR

Incubation initiale (1)	Phase de dénaturation(1)	Phase d'hybridation (2)	Phase d'extension (3)	Phase d'extension finale	Plateau final
Hold	28 cycle				Hold
95°C	94°C	59°C	72°C	60°C	4-25°C
11min	1min	1min	1min	10min	Infinie

V.4- Post-amplification (Post-PCR)

C'est une étape très importante pour l'analyse des fragments, elle consiste à dénaturer les fragments d'ADN amplifiés afin d'obtenir un ADN simple brin pour pouvoir effectuer l'électrophorèse capillaire et obtenir un profil génétique.

L'ADN simple brin (dénaturé) étant chargé négativement pourra migrer au niveau des capillaires du séquenceur en se fixant au Pop4 (gel qui tapisse les capillaires du séquenceur).

V.4.1- Matériels et équipement

Les équipements utilisés lors de la post-Amplification sont répertoriés dans suivant :

Tableau XIII : Matériels et équipements utilisés en post-amplification

Equipements
Plaque PCR à 96 puits
Vortex (Heidolph REAX control)
Kit AmpFISTER® Identifiler® plus
Thermocycleur9700 ABI
Cryobloc
Centrifugeuse

V.4.2- Méthode

- On commence par préparer une plaque pour la post-PCR.
- On calcule les volumes des réactifs nécessaires au mix pour n échantillons. Le Mix doit contenir HI-DI formamide qui est un agent intercalant permettant le maintien de la dénaturation de l'ADN ainsi qu'un standard de taille LIZ qui permet de mesurer l'ADN en paires de bases (pb).

Tableau XIV : Volumes des réactifs nécessaires à la poste PCR

Réactifs	Volume
Mix (Standard de taille LIZ + HI-DI formamide)	9µl (8.7µl formamide + 0.3 de LIZ) x (n)
Echantillons	3µl
Temoin (-)	1.5µl
Temoin (+)	1.5µl

- Vortexer le Mix avant utilisation.
- Répartir 9µl de ce Mix dans chaque puits de la plaque.
- Transférer 3µl de l'ADN préalablement amplifié de la plaque PCR en trouant au fur et à mesure le papier aluminium de chaque puits.
- Ensuite transférer 1.5µl du témoin positif et 1.5µl du témoin négatif

- Puis répartir 1.5µl du ladder (produit pré amplifié du Kit AmpFISTER® Identifier® contenant tous les allèles possibles pour les 16 marqueurs)
- Couvrir la plaque avec un septa spécifique pour que les capillaires puissent pénétrer et placer dans un thermocycleur préalablement programmé pour la dénaturation des fragments d'ADN pendant 3min à 95°C
- Placer la plaque dans un cryobloc gardé à 20°C pendant 5min pour provoquer un choc thermique, ensuite mettre la plaque sur une plate base et centrifuger pendant quelques secondes seulement car l'ADN mono brin est fragile et risque de se casser.
- Re-sceller la plaque avec un Retainer plaque.

VI- Electrophorèse capillaire

C'est une technique réalisée dans un tube presque aussi fin qu'un cheveu, aussi appelé capillaire. (Coquoz et Taroni., 2006).

L'utilisation de ces capillaire permet d'appliquer une différence de potentiel plus importante (ddp de 12 KV), la migration des fragments d'ADN sera donc plus rapide.

Le support de migration qui est dans les capillaires est un polymère liquide (POP4 « Performance Optimized Polymere 4 »), qui agit comme un gel en créant un environnement de tamisage pour des molécules d'ADN (la vitesse de migration étant inversement proportionnelle à la taille des molécules).

Après injection des produits PCR dans les capillaires (16 capillaires), une haute tension (15000 volts) est appliquée afin de séparer les fragments d'ADN en quelques minutes. Les fragments liés aux marqueurs fluorescents sont, lors de leur passage, excités par un laser et la lumière est captée par un détecteur « une caméra CCD ».

Le séquenceur « analyseur génétique ABI 3130 » est relié à un ordinateur auquel sont transférées les données brutes de l'analyse électrophorétique, puis grâce à un logiciel performant appelé « Gene Mapper » les données de l'électrophorèse capillaire sont analysées et validées, pour obtenir à la fin un profil génétique.

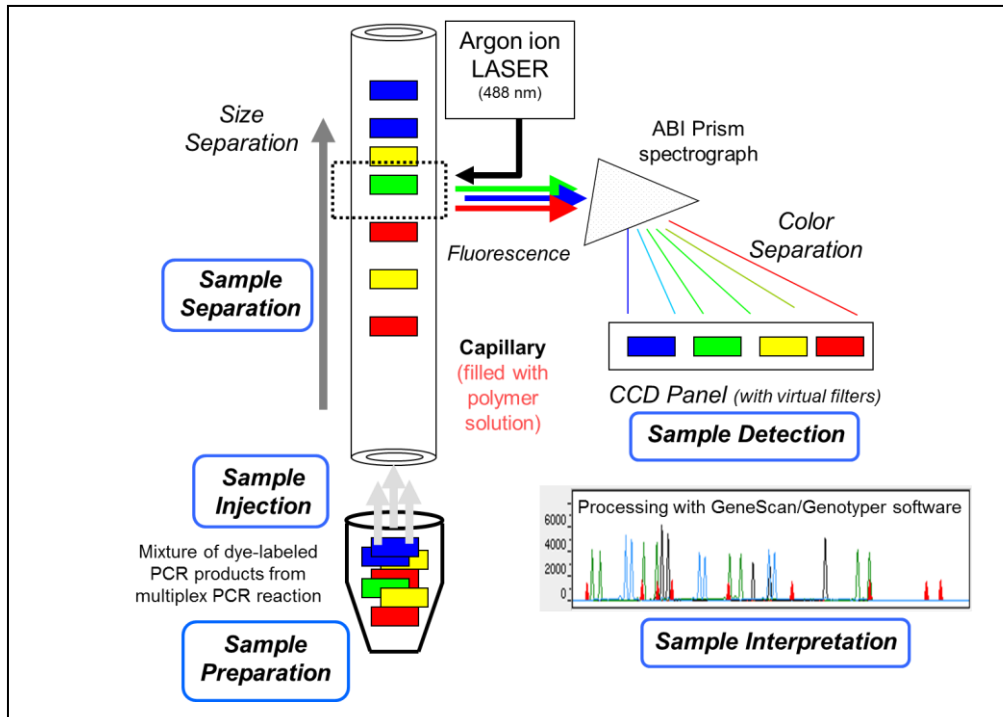


Figure 10: Séparation et détection des allèles STR avec ABI prisme (Butler 2012)

VI.1- Réactifs et solutions

Les réactifs utilisés en électrophorèse capillaire sont répertoriés dans le **Tableau XV** :

Tableau XV : Réactifs nécessaires à l'électrophorèse capillaire

Pop4 (ABI, USA)
Buffer (Tampon EDTA ABI, USA)
Eau ultra-pure

VI.2- Matériels et équipements

Le Matériel nécessaire à l'électrophorèse capillaire est listé dans le **Tableau XVI** ci-dessus :

Tableau XVI : Matériel et équipements nécessaires à l'électrophorèse capillaire

Equipements
Séquenceur 3130 xl Analyzer (AB Applied Biosystem)
Plaque PCR à 96 puits
Ordinateur AB Applied Biosystem

VI.3- Méthode

L'électrophorèse capillaire est réalisée grâce au séquenceur 3130 xl Analyzer doté de 16 capillaires à 36 cm de longueur.

Après centrifugation la plaque PCR est placée dans le séquenceur ensuite reliée au logiciel DATA collection (3130 xl Data Collection v3.0 ABI). Les fragments d'ADN chargés négativement migrent de la cathode (pôle négatif) vers l'anode (pôle positif) selon leur taille, et cela grâce au polymère POP4 qui a été remplie dans les capillaires sous l'effet d'un champ électrique appliqué à 15 kvolt, avec un temps d'injection de 5 secondes.

Durant la séparation, la vitesse de migration des fragments d'ADN est inversement proportionnelle à la taille des molécules. Lors de leur passage par une fenêtre de détection, les fragments d'ADN liés aux marqueurs fluorescents sont excités par un laser, ensuite la fluorescence émise est captée par une caméra CCD. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la taille des fragments d'ADN séparés.

A la fin du processus, les données brutes de la séparation sont collectées par le logiciel DATA collection (3130xl Data Collection v3.0 ABI)

VII- Validation des profils génétiques

Une fois l'électrophorèse capillaire terminée les données brutes sont récupérées et traitées par le logiciel GeneMapper ID (v3.2 Applied Biosystems) ensuite les ladder sont vérifiés afin de valider la plaque.

On vérifie s'il n'y a pas de décalage de lecture (shift) et cela en superposant les ladder. Si tous les ladder sont superposables cela signifie qu'il n'y a pas de shift. Puis on vérifie les standards de taille, s'il n'y a pas de décalage donc tous les allèles ont bien été assignés, ensuite on s'assure que le témoin positif a bien été amplifié et qu'il n'y a pas d'ADN dans le témoin négatif et donc pas de contamination. Enfin tous les échantillons sont vérifiés un par un, les profils sont nettoyés par élimination des off ladder (OL).

*Résultats et
discussions*

Chapitre III : Résultats et discussions

I- Résultats et discussion de la quantification

I.1- Résultats

I.1.1- Courbe standard

Pour le suivi de l'amplification par la PCR en temps réel des échantillons d'ADN, il est possible de tracer une courbe qui caractérise les différentes phases de la cinétique PCR et de mesurer la concentration (ng/ul) d'amplicons générés.

Nous commençons par vérifier les courbes d'amplification des différents échantillons afin de voir s'il y a amplification ou absence d'amplification de l'IPC, qui nous renseigne sur l'absence ou présence d'inhibiteurs.

Une série de dilutions d'un ADN standard à concentration connue permet de calculer la concentration d'ADN des échantillons inconnus par extrapolation. La courbe standard est une droite générée par le logiciel donnant le Ct (Cycle Seuil) en fonction du logarithme décimale (Log10) de la concentration en ADN après amplification de la série des dilutions standard.

Selon **Stratagene 2007**, un résultat fiable est obtenu avec au moins six dilutions standards et un coefficient de détermination très proche de 1.

La courbe standard générée à partir de cette quantification, a été produite avec un coefficient de régression linéaire $R^2=0.997689$, et un facteur d'efficacité d'amplification E qui varie entre 0.78 et 0.97 concernant les échantillons ayant des profils interprétables et inférieur à 0.78 pour les profils nuls.

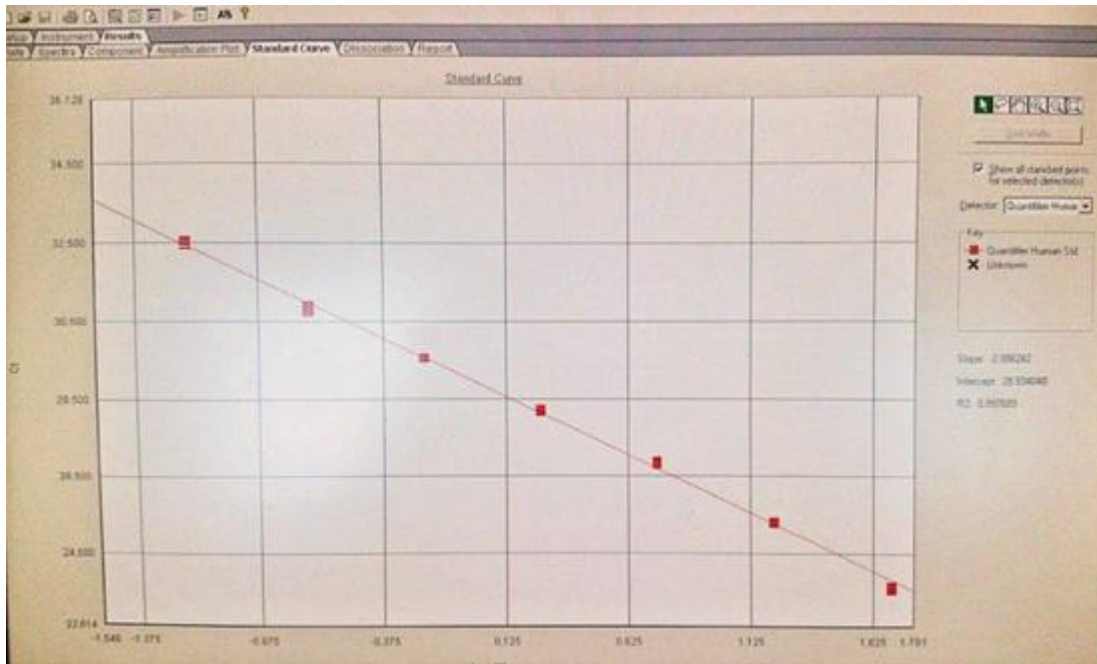


Figure 11: La courbe standard générée de la quantification en PCR temps réel par le thermocycleur 7500 fast (**Original**)

Après établissement de la courbe standard, à l'aide du system ABI 7500 Fast, les concentrations d'ADN correspondant aux échantillons analysés ont été répertoriées dans le tableau XIV.

Tableau XVII : Les résultats de quantification des différents échantillons

Numéro d'échantillon	Concentration de l'ADN (ng/μl)	Numéro d'échantillon	Concentration de l'ADN (ng/μl)
160068	37,36	154219	10,88
154241	15,12	154242	11,12
160113	20,8	160139	23,03
160140	13	140045	0.028
154138	5,8	140047	0.02
154141	9,17	140048	0.02
154143	9,5	140049	0.02
154221	5,19	140050	0.02
160115	7.9	140051	0.018
140631	0.003	142538	0.07
142230	0.002	142540	0.1
142231	0.002	142541	0.09
142274	0.04	142542	0.07

142276	0.03	143118	0.06
142277	0.03	143121	0.06
142278	0.03	143122	0.05
142279	0.03	143123	0.03
142280	0.03	143124	0.05
142281	0.03	123127	0.05
142283	0.03	143647	0.05
142284	0.03	143648	0.04
142293	0.034	143652	0.006
142528	0.07	143653	0.007
142529	0.07	143654	0.007
142530	0.07	143657	0.01
143658	0.009	154142	1.3
143659	0.008	154143	1.4
143687	0.006	154144	0.48
143688	0.006	154146	1.36
143697	0.004	154148	0.89
143699	0.04	154151	0.6
154108	0.16	154220	2.4
154140	3.9	154222	2.2
154224	4.3	154257	0.53
154226	3.3	160059	3.4
154240	2.4	160060	2.49
154244	4.2	160061	1.4
154250	0.1	160064	2.4
154251	0.1	160065	0.28
154252	0.15	160067	1.7
154256	0.23	160069	1.6
160070	1.01	160102	0.72
160092	0.24	160114	3.9
160096	3.8	160142	1.3
160098	0.28	160182	0.29
160099	0.35	160183	0.4
160184	0.67	160185	0.28
160186	2.6	160187	0.62
154139	0.25	131294	46.07

133167	583.24	133509	324.72
134051	442.29		

Les résultats de nos échantillons sont ensuite répartis en fonction de leurs concentrations dans le tableau XV ci-dessous.

Tableau XVIII : Résultats des échantillons obtenus en fonction des concentrations

Concentrations	[0-5[[5-10[[10-30[>30
Nombre d'échantillons	85	5	6	5

I.2- Discussion de la quantification

Durant notre étude, nous avons recueilli les résultats indiqués préalablement par la courbe standard et les tableaux XVII et XVIII, qui représentent les différentes concentrations des échantillons, obtenus par la quantification en PCR temps réel, réalisée par le thermocycleur ABI 7500 Fast, issues de l'extraction d'ADN par le kit Crime Prep Adem-kit de la firme Ademtech.

Nous avons utilisé la technologie de PCR en temps réel car c'est la plus populaire dans différents secteurs d'activité. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR, sa nature exponentielle la rend attrayante pour des analyses quantitatives.

Russell Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR (polymerase Chain Reaction) en élaborant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait. (**Bustin, 2000**)

A partir de la courbe standard générée lors de cette quantification, a été produit un coefficient de régression linéaire $R^2=0.997689$, très proche de 1 qui permet de vérifier la reproductibilité du pipetages indiquant que les dilutions standards ont bien été préparées et que la Q-PCR fonctionne correctement et donc fournit des résultats fiables, et qu'il est possible d'extrapoler le Ct, par conséquent de déduire la quantité d'Acide nucléique cible initialement présente. (**Tse et Capeau, 2003**)

La quantité de produits formés (amplicon) dépend d'un facteur primordial E qui varie dans notre cas de 0.78 à 0.97 pour les échantillons ayant un profil interprétable ce qui prouve

l'efficacité d'amplification, ce dernier est défini comme étant la proportion moyenne des molécules d'ADN ciblent se dupliquant à chaque cycle. (**Tse et Capeau ,2003**)

Les concentrations en ADN de nos échantillons obtenus suite à la quantification par PCR en temps réel sont très variables allant de la petite concentration d'ADN qui est de 0.002 ng/μl obtenue à partir des restes cellulaires sur goblet en plastique, à la plus grande concentration en ADN qui est de 583.24 ng/μl obtenue à partir d'un échantillon de muscle prélevé sur un cadavre humain.

Les cases colorées en orange représentent les échantillons contenant une concentration d'ADN inférieure à 0.05 ng/μl, et par conséquent inférieure au seuil de la méthode préconisée par le fournisseur (**Applied Biosystem ,2001**) du kit d'amplification STR Identifiler® plus, de ce fait, ces échantillons ne devraient pas être retenus pour un profilage d'ADN.

Toutefois, nous avons retenu tous ces échantillons et prit à titre d'exemple les échantillons ayant une concentration inférieure à 0.01 ng/μl (11 échantillons, cases vertes) afin de vérifier la relation entre la quantité de l'ADN et la qualité du profil génétique engendré.

II- Résultats et discussion du profilage ADN

Lors de cette étape nous exposons les différents profils des traces analysées à l'aide du séquenceur 3130 xl à 16 capillaires et son logiciel *Gene MapperID X 1.1* (Applied Biosystems, USA), sachant que nous avons utilisé l'Identifiler plus comme kit d'amplification des STR, ce kit fait appel à 16 marqueurs. (**Répertorié dans le tableau II**)

Les graphes affichent des traces correspondants aux produits de PCR analysés par électrophorèse capillaire sous forme d'électrophorégramme où une série de pics est observée, représentant les différents allèles, de tailles et de hauteurs proportionnelles à la quantité du produit de la PCR détecté pour les échantillons analysés.

Le sexe étant également déterminé au cours du processus d'analyse (locus améloginine), celui-ci est utilisé pour pouvoir confirmer le sexe : Homme XY, Femme XX. Ces profils génétiques ne sont validés que si l'allelic Ladder présente des résultats conformes, soit donner tous les allèles connus chez l'homme. Tous les marqueurs doivent être amplifiés puis détectés et ainsi apparaître sur le graphique sous forme de pics. (**Figure 12**)

Les résultats analysés par le logiciel *GeneMapperID X 1.1* permettent d'établir des profils génétiques, se présentant sous trois formes :

- Profil complet
- Profil partiel
- Profil nul

Tableau XIX : Résultats des profils ADN obtenus en fonction des concentrations d'ADN

Concentrations Profils ng/μl	[0-5[[5-10[[10-30[>30
Profils complets	58	4	6	5
Profils Partiels	17	0	0	0
Profils nuls	10	1	0	0

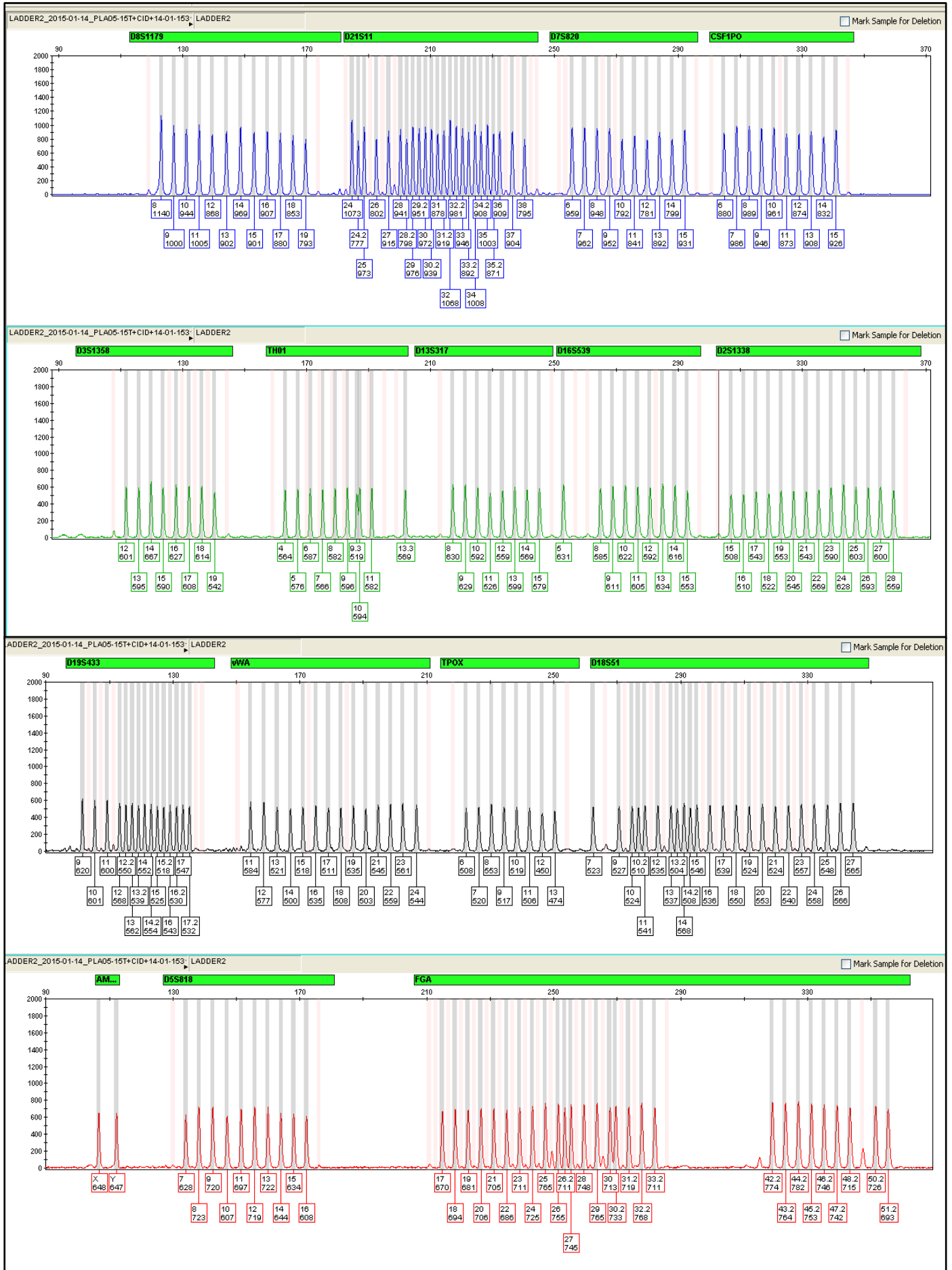


Figure 12 : profil génétique d'allelicladder du kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®(original)

A. Profil complet :

Le profil génétique complet se caractérise par une représentation complète des 16 systèmes (loci) et la fluorescence des répétitions des allèles se traduit par des pics dont la hauteur est exprimée en RFU (Relative Fluorescence Unit). Les allèles ayant un RFU inférieur à 100 ne sont pas pris en considération, car ils pourraient s'agir de fluorescence non spécifique.

Parmi les 101 échantillons testés, on a pris à titre d'exemple un échantillon (160068) prélevé à partir d'une trace de sang sur T-shirt, représentatif présentant un profil complet dont les pics ont une allure constante et des hauteurs supérieures à 100 RFU. (**Figure 15**)

On constate également que le degré de fluorescence (hauteur des pics) et la représentation de tous les systèmes sont proportionnels à la concentration d'ADN qui est de 37,36 ng/ μ l.

Malgré sa très faible concentration d'ADN (0,002 ng/ μ l), l'échantillon 142230 prélevé à partir d'une trace de contact sur gobelet en plastique, donne un très bon profil interprétable (**Figure 12**). Cet échantillon a pu être analysé grâce à la PCR qui a permis d'exploiter toutes les traces laissées par le contact de la peau sur des objets, permettant le transfert de quelques cellules cutanées. (**Wickenheiser, 2002**)

Ces bons profils interprétables peuvent être expliqués par l'absence d'inhibiteurs et le bon état de l'ADN dans ces échantillons. (**Coquoz et Tarroni; 2006**)

Les éléments constituant un profil génétique sont représentés dans la figure 13:

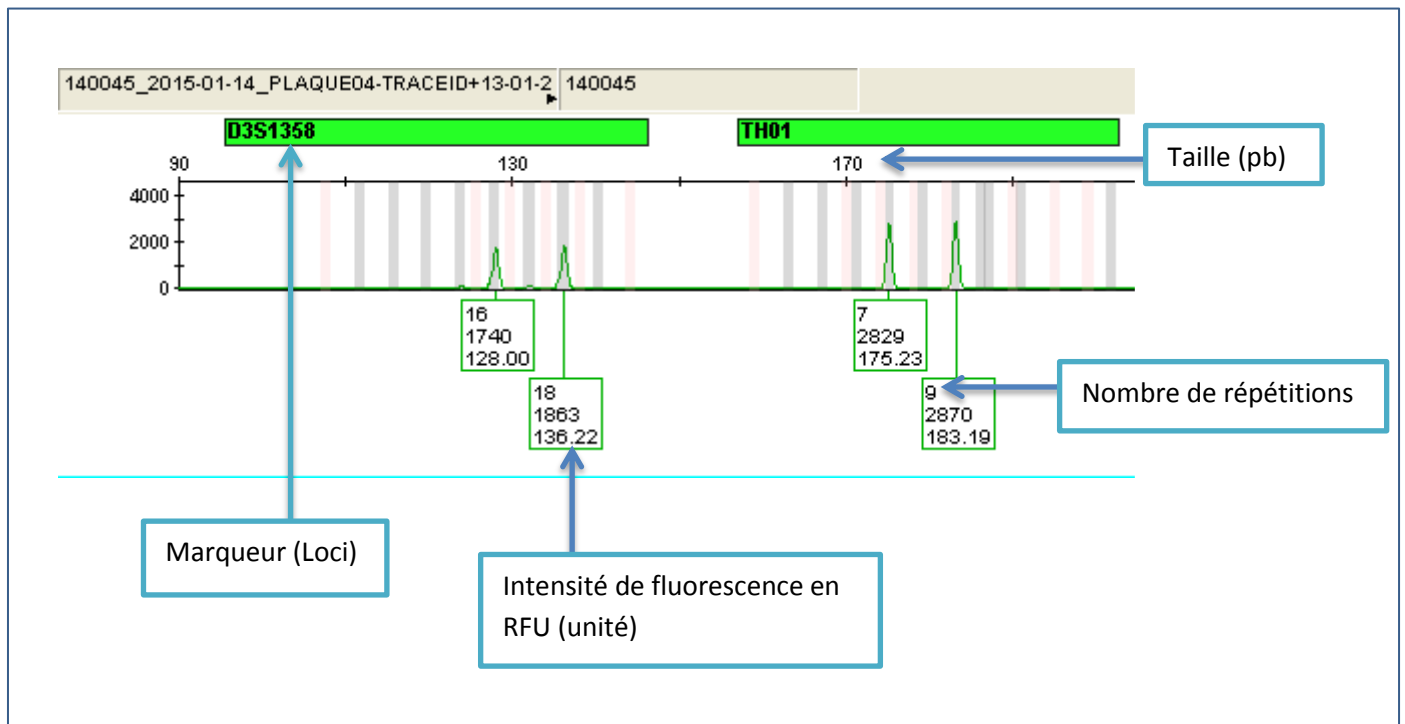


Figure 13 : Les éléments constituant un profil génétique (**original**)

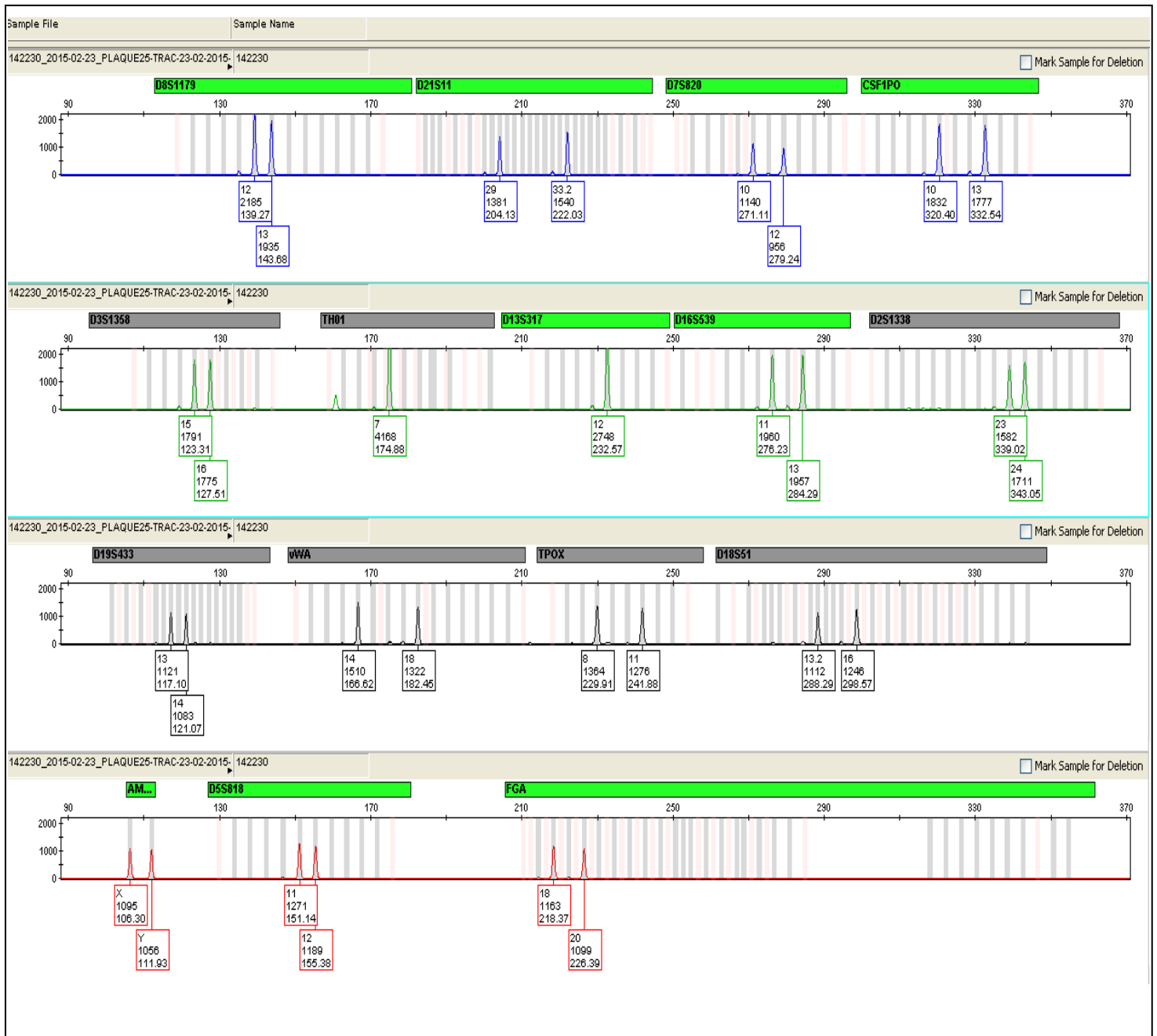


Figure 14 : Profils génétique d'une personne de sexe masculin, échantillon 142230(original)

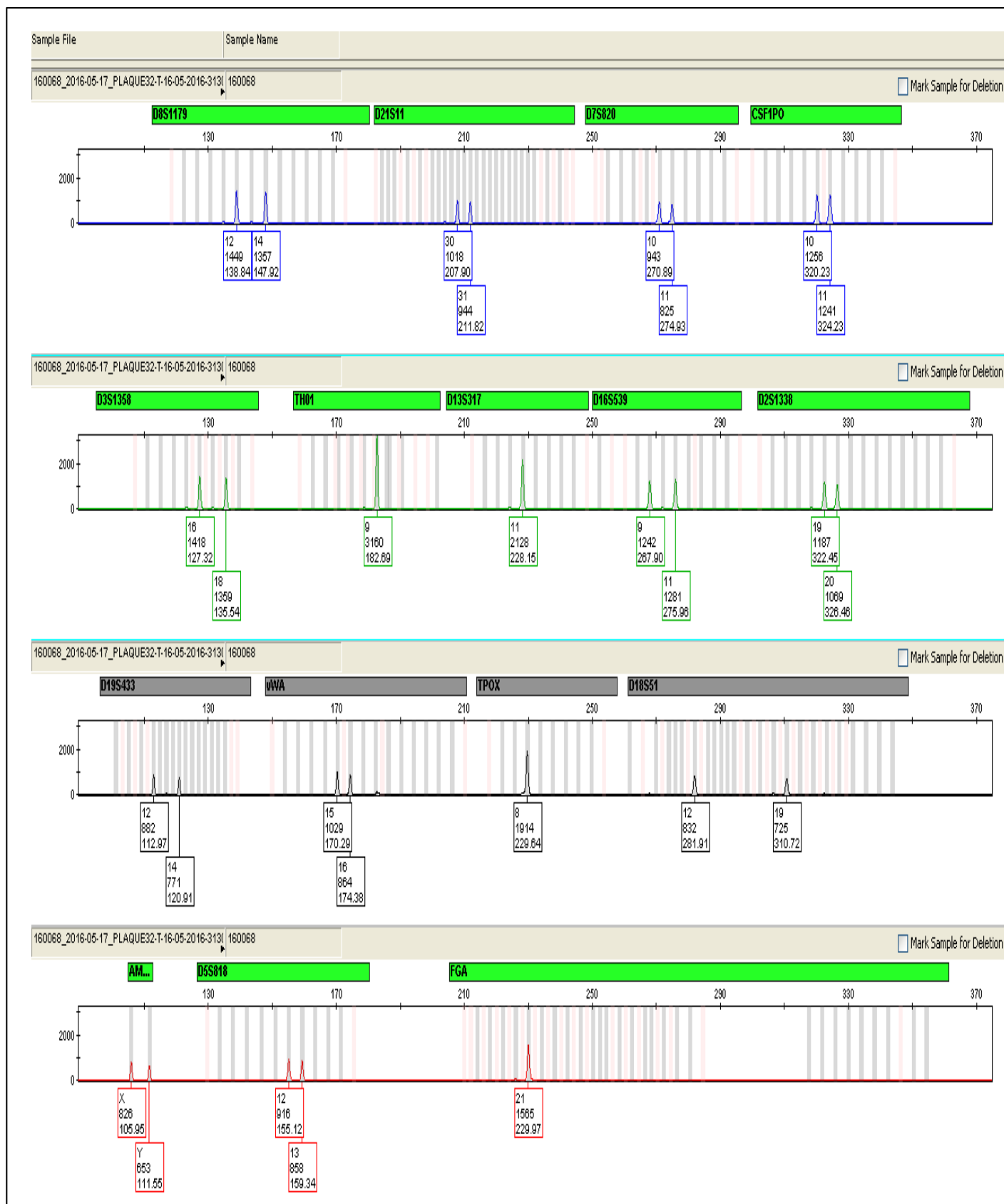


Figure 15 : Profil génétique complet de sexe masculin obtenu à partir de l'échantillon 160068 (prélevé à partir d'une tache de sang sur jean) après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS® (Original)

B- Profil partiel :

Un profil est dit partiel lorsque un ou plusieurs systèmes manquent, à savoir la non représentation et/ou une hauteur de pic inférieure à 100 RFU.

Parmi les 101 échantillons analysés nous avons obtenu 17 profils génétiques partiels, en prenant à titre d'exemple l'échantillon 143699 (prélevé à partir d'un mégot de cigarette) qui présente 8 systèmes sur 16, quatre loci manquants dont la hauteur des pics est inférieure à 100 RFU et quatre non amplifiés. (**Figure 16**)

Les concentrations d'ADN sont très différentes (**voir tableau XVII**) et varient de la plus petite concentration qui est de 0.003 ng/μl (Ech 140631) jusqu'à la plus grande qui est de 2.8 ng/μl (Ech 154240 prélevé à partir d'un écouvillon anal), cette dernière est approximativement 900 fois plus grande que la concentration de l'échantillon 140631, mais toutes deux ont également donné un profil partiel.

Nous avons constaté par ailleurs que nonobstant la concentration de l'échantillon 154240 nettement au-dessus de la moyenne recommandée pour l'utilisation du kit Identifier (0.05 ng/μl), il a tout de même donné un profil génétique partiel. (**Applied biosystem 2003**)

L'obtention d'un profil partiel à partir de l'échantillon 154240 pourrait s'expliquer par le mauvais état de l'ADN ou sa dégradation partielle qui serait possiblement due aux conditions environnementales, à la mauvaise conservation de l'échantillon, ou bien la présence d'inhibiteurs ayant résistés à la purification de l'ADN. (**Coquoz et al, 2013**)

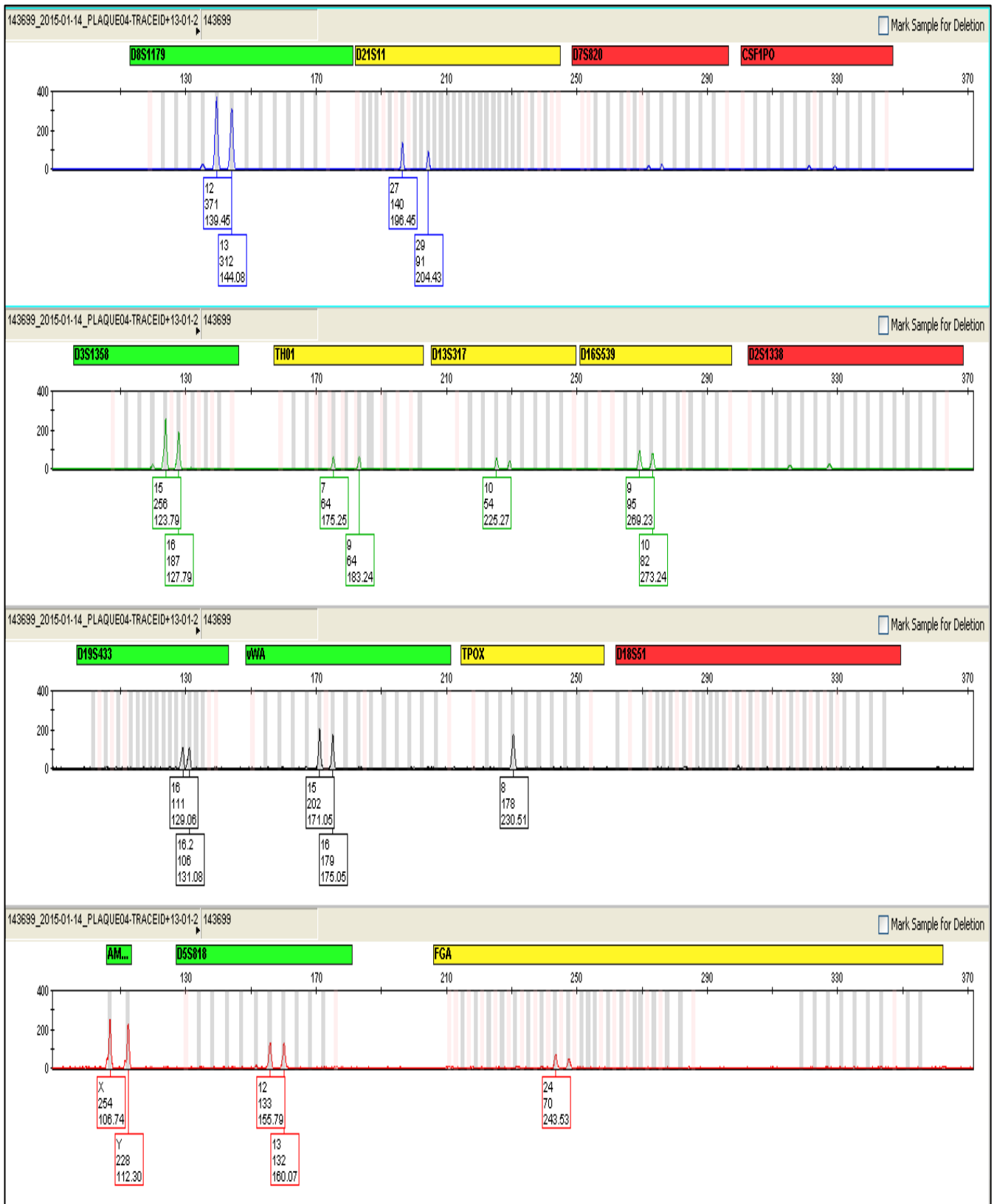


Figure 16 : Profil génétique partiel de sexe masculin obtenu à partir de l'échantillon 143699 (prélevé à partir d'un mégot de cigarette) après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® IdentifierPLUS®(Original)

C .Profil Nul :

Parmi les 101 échantillons analysés, nous avons obtenu 11 profils nuls c'est-à-dire ne présentant aucun marqueur, c'est le cas des échantillons répertoriés au tableau XVII ci-dessous:

Tableau XX: Echantillons d'ADN ayant abouties à des profils génétiques nuls

Numéro d'échantillon	Concentration d'ADN (ng/μl)
142277	0.03 ng/μl
142283	0.03 ng/μl
142284	0.03 ng/μl
142528	0.07 ng/μl
143647	0.05 ng/μl
143648	0.04 ng/μl
143652	0.006 ng/μl
160182	0.29 ng/μl
160184	0.67 ng/μl
140048	0.02 ng/μl
154138	5.8 ng/μl

L'obtention d'un profil nul à partir de l'échantillon 143652 (extrait à partir de restes cellulaires) peut s'expliquer par la faible concentration d'ADN qui est de 0.006 ng/μl, l'ADN des traces de contact étant généralement en quantité infimes et parfois dégradé, il est fréquent que les profils génétiques obtenues soient des profils partiels ou nuls. (**Coquozet al, 2013**)

L'échantillon 154138 prélevé à partir d'une tache de sang sur jean présente également un profil génétique nul, malgré sa concentration importante en ADN qui est de 5.8 ng/μl, ce profil génétique pourrait résulter d'une dégradation de l'ADN, de contaminations dont les origines sont diverses, des inhibiteurs contenus dans le textile du jean dont l'échantillon a été prélevé et non éliminés lors de l'opération de purification d'ADN, comme elles peuvent provenir d'un mauvais prélèvement de l'échantillon (**Butler 2012**)

Cela nous permettrait éventuellement de conclure que la qualité du profil génétique ne dépend pas forcément de la quantité d'ADN.

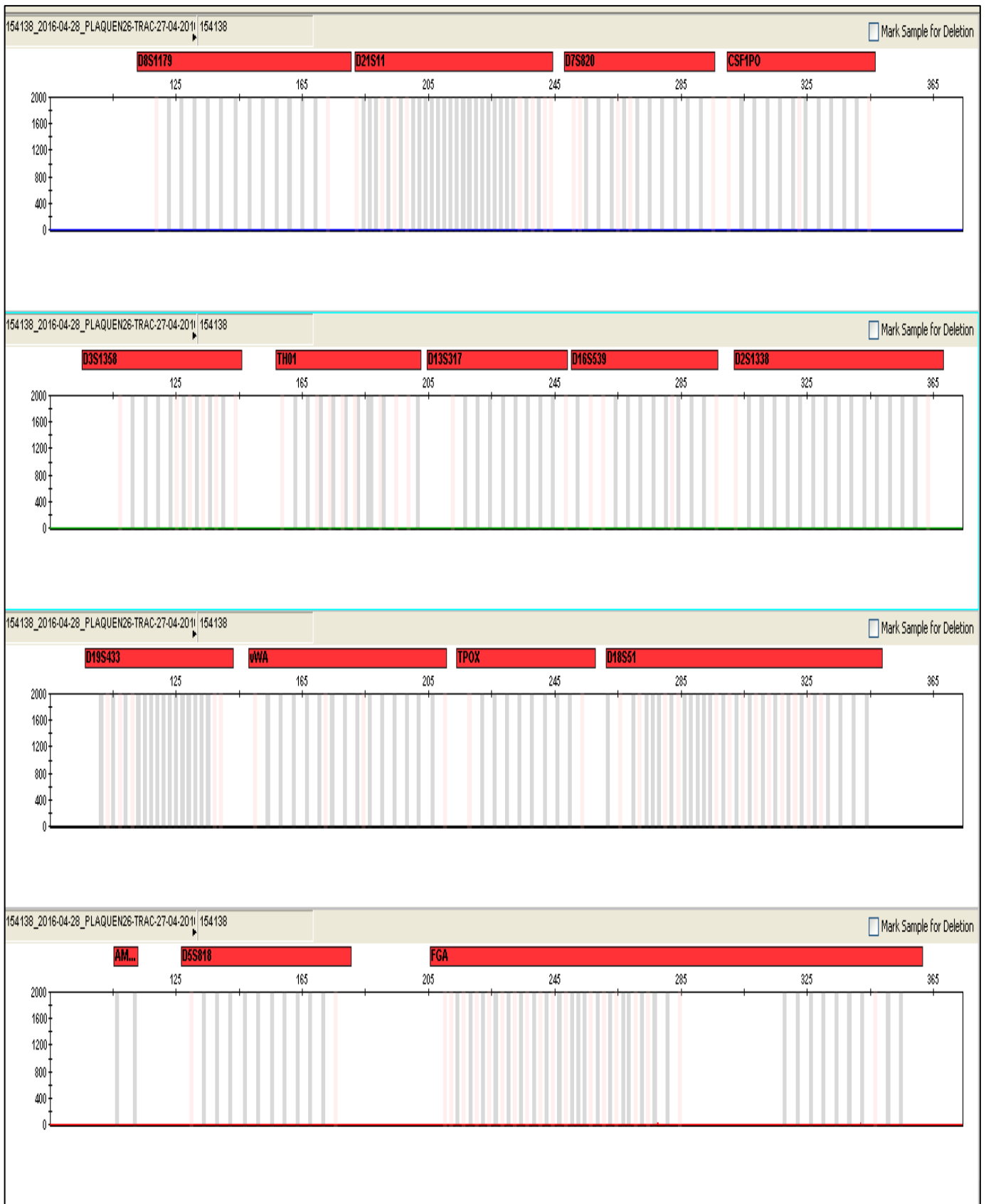


Figure 17 : Profil génétique nul obtenu à partir de l'échantillon 154138(tache de sang) après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® IdentifilerPLUS®(Original)

Interprétation globales des résultats obtenus :

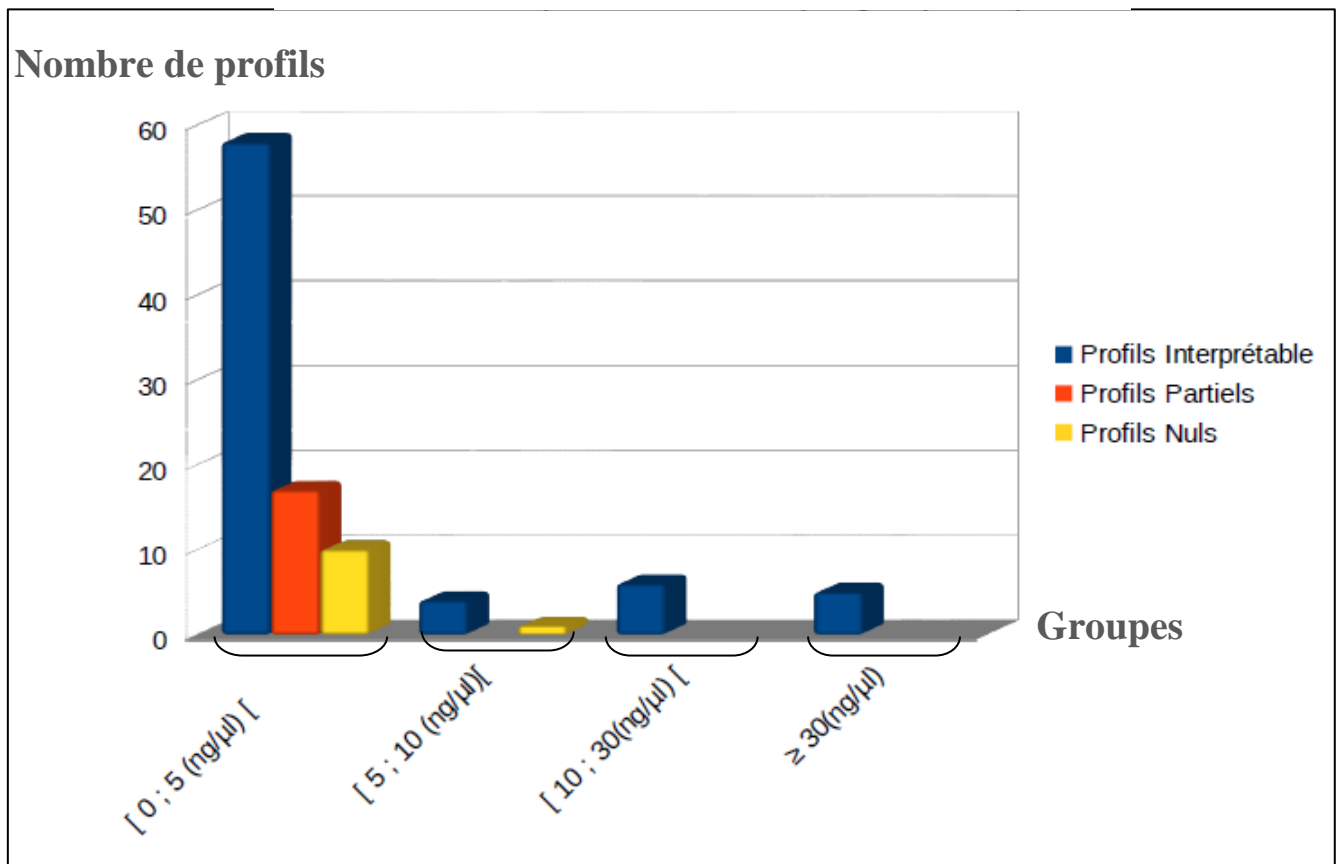


Figure 18 : Division des profils génétiques selon leurs types (Interprétables, partiels, nuls)

(Original)

Les résultats que nous avons obtenus après l'analyse des fragments de nos échantillons d'ADN, nous ont permis de donner les pourcentages suivants, 93,75% des échantillons contenant une concentration d'ADN supérieure à 5ng/μl ont donné des profils génétiques interprétables.

Les groupes 2, 3 et 4 contenant des concentrations d'ADN supérieures à 5 ng/μl ont révélés des résultats positifs suffisants pour parvenir à la conclusion qu'une quantité d'ADN supérieur à 5 ng/μl permet généralement d'aboutir à l'obtention d'un profil génétique interprétable (exploitable) car une concentration d'ADN importante augmente la probabilité d'aboutir à un bon profil.

Les résultats du premier groupe comprenant 85 échantillons avec une concentration d'ADN comprise entre 0 et 5 ng/μl, ne nous permettent pas de prédire de façon exacte et précise le type de profil que l'on pourrait obtenir.

Les 85 échantillons contenant une concentration d'ADN comprise dans un intervalle allant de 0 à 5 ng/μl ont présentés 68,24% de profils interprétables, 20% de profils partiels et 11,76% de profils nuls.

32 des 85 échantillons du groupe 1 comportent des concentrations d'ADN inférieurs au seuil préconisé par le fabriquant (0.05 ng/μl), 18 de ces 32 échantillons ont présenté des profils complets, 8 ont présenté des profils partiels et 6 ont abouti à des profils nuls soit 81 % de profils interprétables.

Il est possible d'avoir des profils interprétables si la concentration d'ADN est suffisante et non dégradée sachant que les inhibiteurs sont éliminés lors de l'extraction d'ADN après purification, mais il est également possible d'obtenir des profils nuls, lorsque la concentration d'ADN est trop minime ou endommagée. **(Kremser *et al* ,2009)**

En conclusion, la concentration d'ADN est importante pour l'obtention de profils interprétables mais c'est la qualité de cet ADN qui prime.

En effet, dans des conditions optimales, nous devrions obtenir pour tous les échantillons dont la concentration d'ADN est supérieure à 0.01 ng/μl un profil complet, ceci étant dit, lorsque l'ADN est en mauvais état ou bien en présence d'inhibiteurs même avec une concentration d'ADN supérieure à 0,01 ng/μl , il est improbable d'obtenir un profil génétique interprétable.

Conclusion

Conclusion

Au cours de ces dernières années, l'identification génétique a connu une grande évolution dans le cadre des procédures d'amélioration, de sensibilité, de performance et de rapidité des techniques permettant l'analyse et le typage de l'ADN ainsi que l'obtention des profils génétiques exploitables.

Dans le domaine médico-légal, l'analyse d'ADN débute par une extraction du matériel génétique à partir de trace biologique, cette extraction permet de récupérer de grande comme de petite quantité d'ADN.

Les acides nucléiques récupérés passent par une étape de quantification suivie d'une amplification dans le cas de petites concentrations.

Au cours de notre étude, nous avons pu montrer qu'à partir de différentes traces biologiques situées sur différent support, il nous a été possible d'obtenir des concentrations d'ADN variables qui ont abouti à l'obtention d'une majorité de profils exploitables, mais également à des profils partiels et nuls.

Dans notre cas précis, nous avons utilisé les deux kits Quantifiler human® et l'Identifiler® plus de la firme Applied Biosystems, qui nous ont permis respectivement de quantifier et d'amplifier l'ADN avec succès même sur des supports contaminés contenant une quantité remarquable d'inhibiteurs, ce qui se traduit par de faible pics de profils d'ADN interprétés par le logiciel Gene Mapper d'Applied Biosystems.

Les résultats obtenus montrent que toutes les concentrations d'ADN récupérées à partir de nos échantillons ne sont pas supérieures ou égales à la concentration recommandée par le fabricant du Kit utilisé durant notre étude (Identifiler Plus, ABI, USA) qui exige d'utiliser 0.05 ng/µl d'ADN pour chaque échantillon, afin d'obtenir un profil génétique complet et interprétable. Nous avons tout de même retenu pour l'amplification les 32 échantillons contenant une concentration inférieure au seuil préconisé par le fabricant, qui ont données 18 profils complets, 8 profils partiels et 6 profils nuls.

Ainsi, les résultats généraux obtenus dans le cadre de notre étude, soit 73 profils génétiques complets, 17 profils génétiques partiels et 11 profils nuls; donc presque toutes les concentrations d'ADN obtenues à partir du matériel biologique sur différents supports ont donné des profils complets et interprétables.

En définitif, nous avons pu constater que le seuil fixé par le fabricant du kit Identifiler plus n'est pas incontestable car après amplification des échantillons inférieurs au seuil fixé par ce dernier, il a été retenu que 56.25% des concentrations d'acides nucléiques d'échantillons inférieurs au seuil ont donné des profils génétiques complets et interprétables.

En conclusion et pour optimiser les chances d'aboutir à un résultat et d'avoir une identification sans aucune ambiguïté, il est fortement recommandé de ne pas suivre systématiquement les instructions des fabricants des kits de séquençage en ce qui concerne le seuil limite d'amplification d'ADN. En effet, dans le cadre de l'application stricte des instructions du fabricant, il a été relevé qu'il est possible d'obtenir des profils génétiques interprétables sur la base de concentrations d'ADN inférieures à celles préconisées par le fabricant.

Aussi, pour nous permettre une meilleure évaluation de nos résultats, il y a lieu :

- D'effectuer une bonne récolte des échantillons d'ADN au niveau des scènes de crimes,
- D'automatiser l'extraction d'ADN grâce à l'extracteur Qiagene par exemple,
- De conserver minutieusement nos échantillons d'ADN,
- De vérifier la validité de chaque kit avant utilisation,
- De prendre toutes les précautions nécessaires lors de l'analyse pour éviter toutes sortes de contaminations.

Ce constat nous permet soit d'éviter l'acquittement d'un coupable ou l'inculpation d'un innocent dans le domaine de la criminalistique.

Références

bibliographiques

A

- 1) Alonso,A. (2001)L'hyperphosphorylation induit l'auto-assemblage de tau en tanges de filaments hélicoïdaux appariés / filaments droits. New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Staten Island. 6923-8.
- 2) Applied Biosystems (2003) AmpF/STR Identifier ® PCR Amplification Kit User's Manuel,FosterCity,P/N 4323291.

B

- 3) Beaumont,S. (2016) Biologie moléculaire et génétique. 4ème édition.
- 4) Beckman ,J.S ., Weber,J.L .(1992)Enquête sur les microsatellites humains et de rat. Organisation de recherche agricole, Bet Dagan, Israël. 12 (4): 627-31.
- 5) Butler,J.M (2014) Forensic DNA typing, 3eme edition, Elsevier , USA. p20-358
- 6) Bustin, S.A (2000). Absolute quantification of mRNA using realtime, Academic Department of Surgery.UK.

C

- 7) Coquoz,R ., Comte,R ., Hall,D ., Hicks,T ., Taron,F (2013) Preuve par l'ADN: La génétique au service de la justice, 3eme édition. Ecole polytechnique fédérale. Lausanne, p1-284.

D

- 8) Dausset,J (1958) Iso-leuko-antibodies. ActaHaemat.20(1-4):156-66.
- 9) Dausset,J ., Degos,L ., Hors,J (1974) The association of the HL-A antigens with diseases. ClinImmunolImmunopathol .3(1):127-49.
- 10)Doutremepuich,C. (2012) Les empreintes génétique en pratique judiciaire, Bull.Acad. Natle Méd., 2012, 196, no 6, 1117-1130.
- 11) Di Rienzo,A ., Peterson,A.C ., Garza,J.C ., Valdes,A.M ., Slatkin,M ., Freimer,N.B (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. Neurogenetics Laboratory, University of California, San Francisco, USA. 94143.

E

- 12)Eric,S ., Lauren,M ., Linton,B .,Nusbaum ,T ., Zody,M.C ., Devon,K .,Dewar ,K ., Doyle,M ., FitzHugh,W .,Funke,R ., Gage,D ., Harris,K .,Heaford,A ., Howland ,J ., Kann ,L ., Lehoczky ,J .,LeVine ,R ., McEwan,P ., McKernan ,K .,Meldrim ,J ., Mesirov ,J.P ., Miranda,C ., Morris,W ., Naylor,J., Raymond,C .,Rosetti ,M .,

Santos,R .,Sheridan,A ., Sougnez ,C ., Stange-Thomann,N ., Stojanovic ,N (2001). Initial sequencing and analysis of the humangenome, Nature 409.(860-921).

F

- 13) Farce,M.H (2000) Génétique moléculaire : Principes et Application aux population Animales, ADN et chromosomes.
- 14) Frank R. Wendt, BSa,*, David H. Warshauer, PhD, Xiangpei Zeng, MD, PhD, Jennifer D. Churchill, PhD, Nicole M.M. Novroski, MSa, Bing Song, BSa, Jonathan L. King, MSa, Bobby L. LaRue, PhD,c, Bruce Budowle, PhD (2016) Massively parallel sequencing of 68 insertion/deletion markers identifies novel microhaplotypes for utility in human identity testing. Institute of Applied Genetics, Department of Molecular and Medical Genetics, University of North Texas Health Science Center, 3500 Camp Bowie Blvd., Fort Worth, TX, 76107, USA.
- 15) Frumkin,D ., Wassersstrom,A ., Davidson,A ., Grafit,A(2010). Authentication of forensic Science International , 4:95-103

G

- 16) Goodwin,W ., Linacre,A ., Sibte,H (2011) an introduction to forensic genetics, 2nd edition. P 6
- 17) Gettings Katherine Butler, Rachel A. Aponte, Kevin M. Kiesler, Peter M. Vallonea (2015) The next dimension in STR sequencing: Polymorphisms in flanking regions and their allelic associations, Department of Forensic Sciences, The George Washington University, Washington, DC 20007-1150, USA.

H

- 18) Higuchi,R ., Dollinger,G ., Walsh,P. S ., Griffith, R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology. Emeryville, Canada. 10: 431-417.
- 19) Hors,J ., Schmid,M ., Gony,J ., Sagleier,M ., Dausset,J (1974) HL-A antigens and predisposition to certain diseases. C R Seances Soc Biol Fil. 168(2-3):173-80.
- 20) Hall,D (2008) Optimisation des stratégies d'amélioration génétique du pin maritime grâce à l'utilisation de marqueur moléculaires. Licence Creative Commons.

J

- 21) Jeffreys, A.J., Wilson V., Thein S.L (1985) Individual specific fringer prints of human ADN. Nature.316, 76-79.
- 22) Jeffreys,A.J ., Wilson,V., Thein,S.L (1985) Hypervariableminisatellite regions in human DNA. Nature.316:76–9.
- 23) Journal of Molecular Endocrinology # 25: 169-193.
- 24) JunpingHana,b, Jing Suna, Lei Zhaoa, WentingZhaoa, Yao Liua, Caixia Li (2017) Validation study of a 15-plex rapid STR amplification system for humanidentification. Key Laboratory of Forensic Genetics, Beijing Engineering ResearchCenter of Crime Scene Evidence Examination, Institute of Forensic Science, Beijing, 100038,China.

K

- 25) Kan,Y .M ., Dozy,A.M (1978) Polymorphism of DNA sequence adjacent to human a globin structural gene : Relationship to sickle mutation. Proc. Nat AcadSci , USA .75 5631-563.
- 26) keyserC, Petrovski,E (2006) Utilisation des SNP pour l'identification humaine.Spectra analyse, n 249, p24-25

L

- 27) Landsteine, K (1900) à la connaissance des effets lytiques anti, fermentative et agglutinants de sérum sanguin et lymphatique. 27: 357-62.
- 28) Loistron,S (2009) Les empreintes génétique en médecine légale : Réalisation, Législation. ThèseDoctorat en chirurgiedentaire d'université de Nantes.
- 29) Lander,E.S., Linton,L.M, Birren,B., et al., (2001).Initial sequencing and analysis of the humain genome, Nature 409.(860-921).
- 30) Litt,M (1990) Five polymorphism microsatellite VNTRs on the human X chromosome.Département of biochemistry and medical genetics. Oregon Health Sciences University.Portland.
- 31) Lindahl,T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature,22;362(6422):709-15.

M

- 32) Mansuet-Lupo,A. (2007) Revue Immuno-analyse & Biologie Spécialisée Volume 22, numéro 4, pp 209–214.
- 33) Mansuet-Lupo,A ., Van Huffel,V., Rouger,P (2008) Les empreintes génétiques : nouvel outil en médecine légale. Médecine & Droit, Unité de polymorphisme génétique, institut national de la transfusion sanguine,Paris.88 24–28

- 34) Martell, M., Gomez, J., Lsteban, J.I., Sauleda, S., Quer, S., Cabot, B., Lsteban, R., Guardia, J. (2009 - 1999) High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantification of Hepatitis C virus RNA. *Journal Of Clinical Microbiology*. Department of Medicine, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. 37:327-332.

N

- 35) Norman, P., Smith, L. (1995). La théorie du comportement planifié et de l'exercice: une enquête sur le rôle du comportement antérieur, l'intention du comportement et la variabilité de l'attitude. *European Journal of Social Psychology*, 12, 403-415.

O

- 36) Ould-Ahmed, M. (2009) Caractérisation de la population des dromadaires (*Camelus dromadon*) en Tunisie. Thèse de doctorat en science Agronomique.

P

- 37) Pereira R. (2009) Un nouveau multiplex pour l'identification humaine utilisant des polymorphismes d'insertion / deletion. Institut de pathologie moléculaire et immunologique, Université de Porto, Porto, Portugal. 30 (21): 3682-90.
- 38) Pereira, R., Gusmão, L. (2012) Capillary electrophoresis of 38 noncoding biallelic mini-Indels for degraded samples and as complementary tool in paternity testing, *DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics*. Institute of Pathology and Molecular Immunology of the University of Porto, Portugal. pp 141-157.
- 39) Petkovski, E. (2006) Polymorphisme ponctuels des séquences et identification génétique. Etude par spectrophotométrie de masse MALDI TOF. Thèse Doctorat de l'université Louis Pasteur Strasbourg I.
- 40) Poitras, E., Houde, A. (2002) La PCR en temps réel: principes et application. *Reviews in Biology and Biotechnology By The Moroccan Society of Biology in Canada*. Vol.2, No 2 .P.2-11.

R

- 41) Rana, S. (2005) Découverte, développement et applications actuelles du test d'identité ADN. Baylor University Medical Center. Dallas, États-Unis 18 (2): 130-133.
- 42) Rudin, N., Inman K. (2002) .An introduction to forensic DNA analysis, 2nd Ed.

- 43) Ruitenbergh, A. (2001). Incidence de la démence: le genre fait-il la différence?. Département d'épidémiologie et de biostatistique, Erasmus Medical Center, Rotterdam, Pays-Bas. 22 (4): 575-80

S

- 44) Saad, R., Chey, W.D (2005) Un guide clinique pour gérer l'infection par *Helicobacter pylori*. Centre médical de l'Université du Michigan, 72 (2): 109-10, 112-3, 117-8.
- 45) Smart D-N-Adem-kit for profiling (cat #061442) Instruction manual for gDNA normalisation from Swabs.
- 46) Stratagene Company (2007). Introduction to quantitative PCR Methods and Applications, Guide 2007, San Diego, Californie, États-Unis .p11.
- 47) Sanjantila, A., Tishkoff, S.A., Pakstis, A.G., Stoneking, M., Kidd, J.R., Destro-Bisol, G., Sanjantila, A., Deinard, A.S.; Sirugo, G., Jenkins, T., Kidd, K.A., and Clark, A.G (1992) Short Tandem-Repeat Polymorphism/Alu Haplotype Variation at the PLAT Locus: Implications for Modern Human Origins, *Am J Hum Genet.* 67(4): 901–925

T

- 48) Tagu, D. (1999) Principes des techniques de biologie moléculaire, Editions Quae Institut National de la recherche Agronomique, Paris. P-111.
- 49) Tautz, D (1993) Note on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences, *Zoologisches Institute der Universität München, Germany.* 67:21-8.
- 50) Tse, C., Capeau, J (2003) Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel, Laboratoire de biochimie et d'Hématologie, Paris.

V

- 51) 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., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S (2001). The sequence of the human genome. *Science* Rockville, MD 291(5507) :1304-51.
- 52) Van Neste, C.F., Van Nieuwerburgh, D., Hoofstat, D. Deforce Forensic, STR analysis using massively parallel sequencing (2012), *Forensic Sci. Int. Genet.* Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Ghent, Belgium

W

- 53) Weber, J.L., May, P.E. (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* (3):388–96.
- 54) Winter, P.C., Hickey, G.I., Fletcher, H.L. (2006) *L'essentiel en génétique*, Berti édition, Paris. P 94-100
- 55) Wickenheiser, R.A. (2002) Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact, *Acadiana Criminalistics Laboratory*, New Iberia, Louisiana 70560, USA

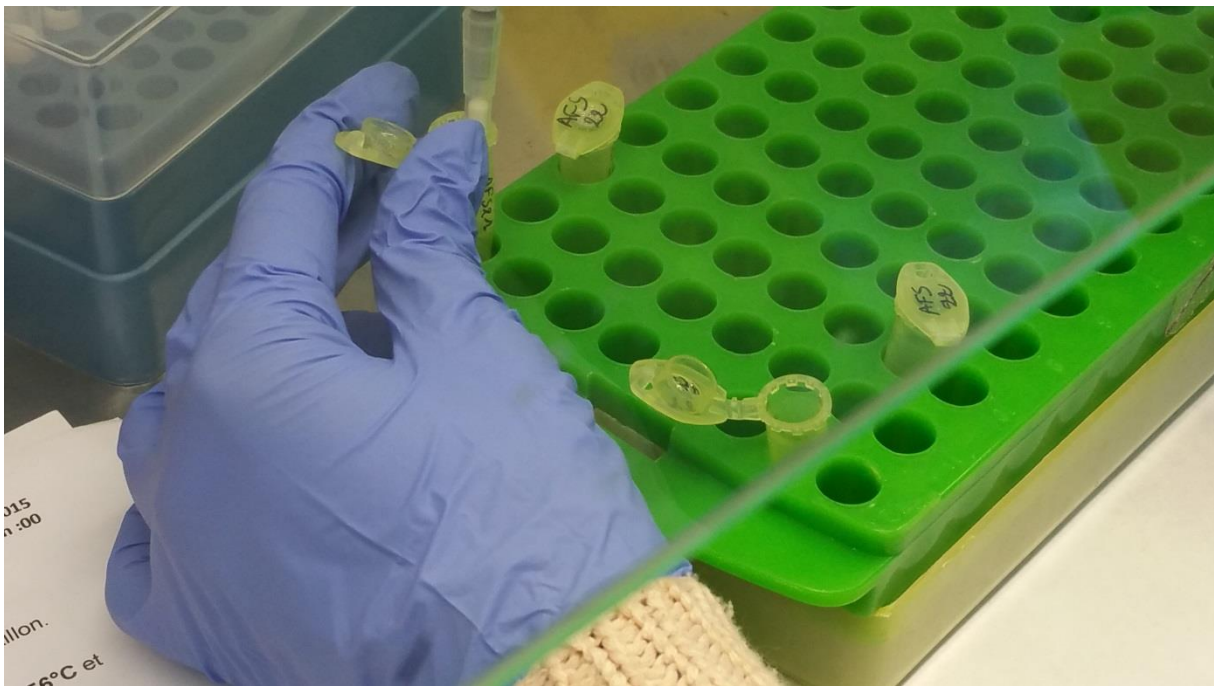
Annexes



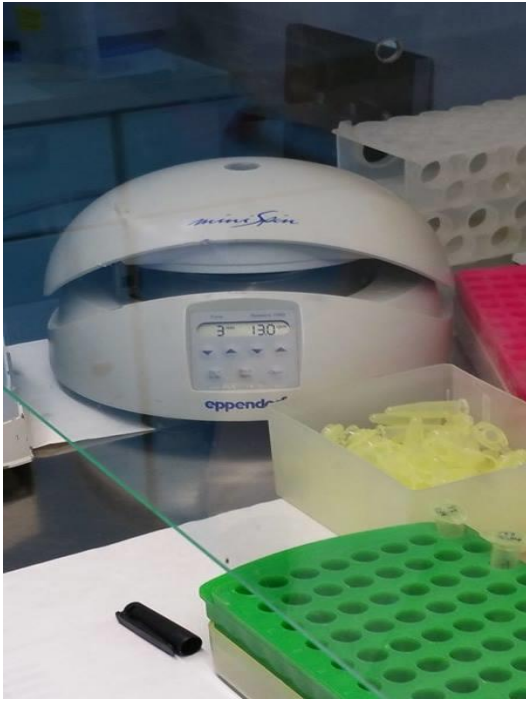
Annexe 1 : Bloc chauffant agitateur



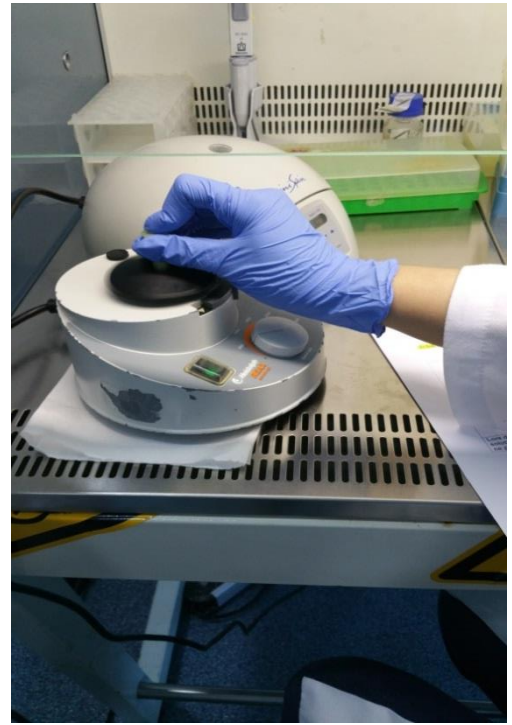
Annexe 2 : Agitateur



Annexe 3 : Portoir des tubes Eppendorf



Annexe 4 : Mini Spin (mini centrifugeuse)



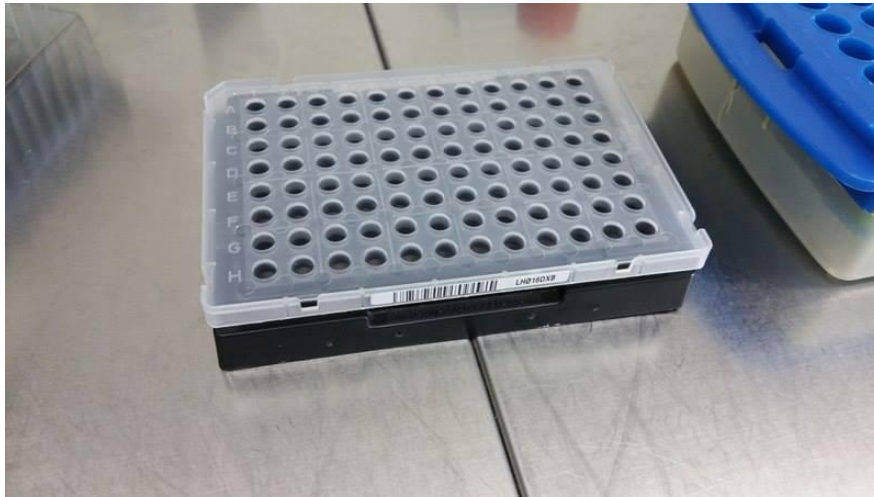
Annexe 5 : Vortex



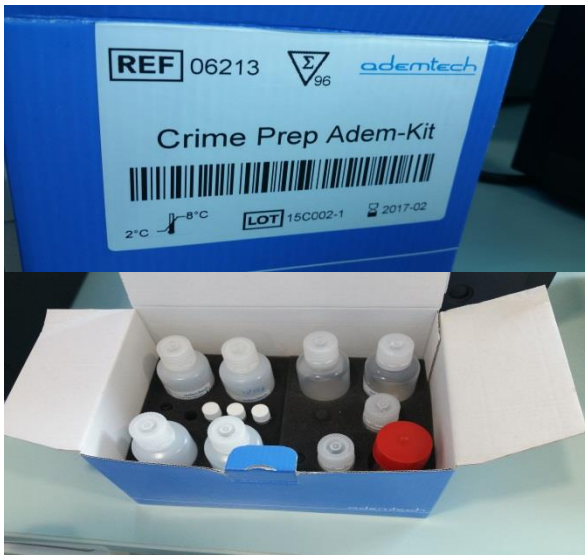
Annexe 6 : System de PCR en temps Réal 7500



Annexe 7 : Séquenceur (analyseur génétique
ABI 3130xl)



Annexe 8 : Plaque PCR à 96 puits



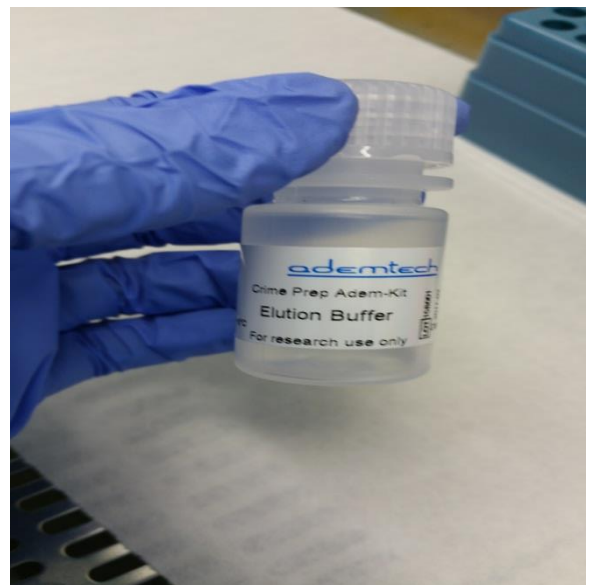
Annexe 9: Crime Prep Adem-kit



Annexe 10 : Solution LB Buffer



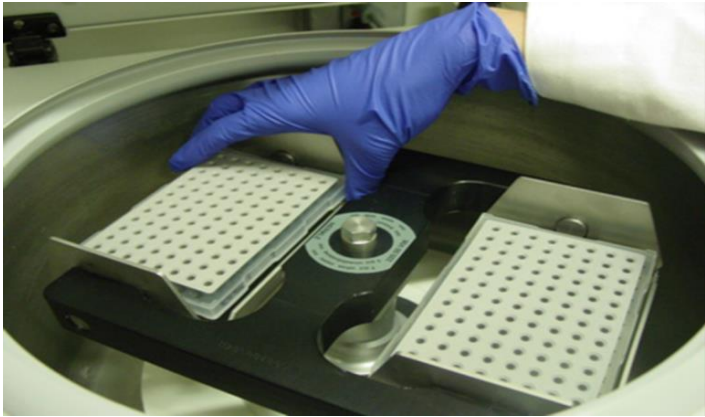
Annexe 11 : Solution de lavage WASHING BUFFER 1-2



Annexe 12 : Solution d'Elution Buffer



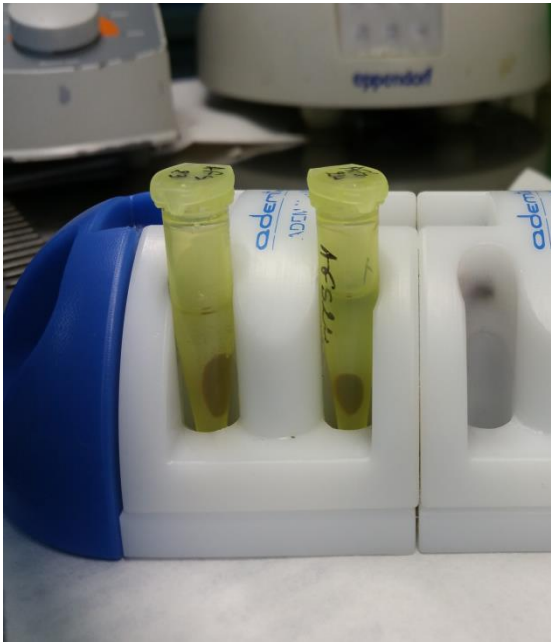
Annexe 13 : Thermocycleur 9700 ABI



Annexe 14: Centrifugeuse



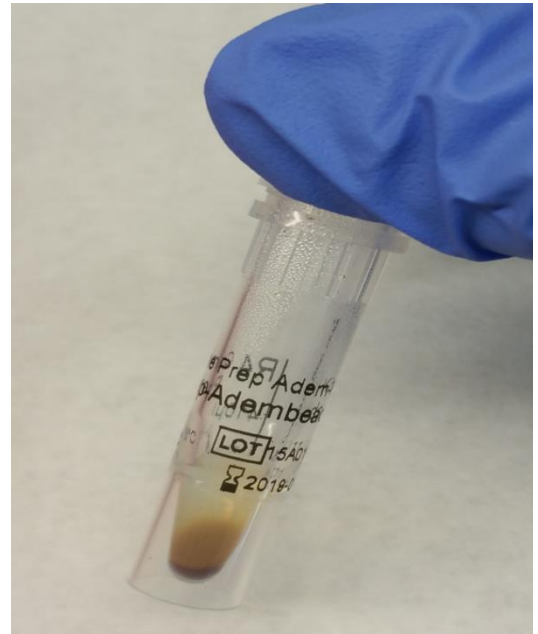
Annexe 15: Cryobloc



Annexe 16 : Culot d'ADN et billes magnétiques



Annexe 17 : Portoir magnétique



Annexe 18 : Solution de billes magnétique du Crime prepAdem Kit



Annexe 19 : Thermocycleur