



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA -1-
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de

Master : EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

Option : Génétique

THEME

**Obtention de profils génétiques à partir de traces de sang
prélevées sur scènes de crimes déposées sur vêtements et armes
de crime**

Présenté par :

Soutenu le : 15/07/2019

- GHRITLI Fatiha Nada
- SEDDAOUI Hiba

Devant le jury :

- | | | | |
|---------------------|----------------------|-----------|----------------|
| - Mme CHERRALLAH.A | MCB | USDB1 | Présidente. |
| - Mme AISSANI. R | MCB | USDB1 | Examinatrice. |
| - Mme GUESSAIBIA. N | MCB | USDB1 | Promotrice. |
| - Mme MEDDOUR.K.S | Chargée d'expertises | LPS(DGSN) | Co-promotrice. |
| - Mme KHODJA. K | Ingénieure d'état | LPS(DGSN) | Invitée |

Promotion : 2018 – 2019



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



UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA -1-
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de

Master : EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

Option : Génétique

THEME

**Obtention de profils génétiques à partir de traces de sang
prélevées sur scènes de crimes déposées sur vêtements et armes
de crime**

Présenté par :

Soutenu le : 15/07/2019

- GHRITLI Fatiha Nada
- SEDDAOUI Hiba

Devant le jury :

- | | | | |
|---------------------|-----------------------|-----------|----------------|
| - Mme CHERRALLAH.A | MCB | USDB1 | Présidente. |
| - Mme AISSANI. R | MCB | USDB1 | Examinatrice. |
| - Mme GUESSAIBIA. N | MCB | USDB1 | Promotrice. |
| - Mme MEDDOUR.K.S | Chargée d'expertises | LPS(DGSN) | Co-promotrice. |
| - Mme KHODJA. K | Ingénieure Principale | LPS(DGSN) | Invitée |

Promotion : 2018 – 2019

Remerciements

*En tout premier lieu, nous remercions le bon **Dieu**, tout puissant, de nous avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.*

Nous tenions à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de notre travail et qui nous ont aidées lors de la rédaction de ce mémoire.

Ces considérations vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté des Sciences Biologiques, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

*Nous adressons nos sincères reconnaissances à Mme **Guessaibia.N** pour avoir dirigé ce mémoire et nous avoir permis de le réaliser dans les meilleures conditions, ses connaissances transmissent, ses judicieux conseils, sa patience, ses encouragements, sa disponibilité nous ont été d'une aide inestimable. « Vous êtes le professeur qui a réussi à nous inspirer, à nous inculquer l'esprit de la recherche scientifique, mais aussi qui a réussi à nous donner l'envie de nous spécialiser en génétique ». Merci pour tout ce que vous avez fait ! Vous étiez et vous resterez un modèle de l'enseignement.*

*Le projet de fin d'études a été réalisé au niveau de la sous-direction de la police scientifique et technique. Nous tenions à remercier vivement Monsieur le sous-directeur **ZEKRI.M**, Contrôleur de Police et Monsieur le chef de service du laboratoire, Commissaire Principal de La police le docteur **BRAHITI.H**. Nous tenions à remercier spécialement Mme **BELKHIRAT.S**, chef du département d'identification génétique, qui fut la première à nous faire découvrir le sujet qui a guidé notre mémoire.*

*Nous exprimons également notre gratitude à Mme **MEDDOUR. K.S** et Mr **BENHMED. B** d'avoir accepté d'administrer ce travail ainsi que pour leurs gentillesse, leurs patiences, leurs soutiens et leurs rigueurs dans le travail, leurs conseils qui nous ont été précieux afin de mener notre travail à bon port. « Votre travail est stressant. Vous ne comptez plus les heures. Et pourtant vous avez toujours été attentifs et compréhensifs. Nous tenions à vous remercier pour votre engagement à nos côtés, pour votre sacrifice et votre soutien tout au long du projet ». Merci infiniment.*

*Nous remercions également Mme **AISSANI.R**, d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail, Ainsi que Mme **CHERRALLAH.A**, pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à notre travail en présidant ce jury. Ainsi que pour les connaissances qu'elles nous ont transmises.*

*Nous tenions à remercier tout particulièrement, l'ensemble de l'équipe sympathique du Laboratoire Centrale de La Police Scientifique et Technique et en particuliers **KHOUAS.L**, **AZOUZ. L**, **CHAALAL. S**, **KHODJA. K**, **BENABDELLAH. N**, **MAMOUNI. A**, **BECHAR. M**, **BELLABES. ZEKRIA**, **ZEGROUR. S** qui ont accepté de nous offrir leurs précieux temps pour la réalisation des enquêtes et ayant répondu à nos sollicitations au cours de ce stage, leurs accueils, leur aides, leurs attentions et leurs gentillesse tout au long du stage, ont fait de ces six mois un moment très plaisant et intéressant.*



Dédicaces

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

*A mes frères **Abdelkader** et **Billel** et sœurs **Souad**, **Latifa** et **Meriem**, votre compréhension, disponibilité, attention, soutien moral constant n'ont pas été vains. C'est l'occasion pour moi de vous remercier très sincèrement pour votre concours tout le long de mes études.*

*A mes nièces : **Hadil**, **Amel** et **Alaa***

*A mes neveux : **Aimen**, **Wassim**, **Moncef**, **Mohamed**, **Abderrahmane** et **Mehdi***

*A ma très chère amie et sœur que j'aime du fond du cœur, **Soumia** pour l'amitié qui nous lie depuis toutes ces années.*

*A toute la famille **SEDDAOUI** et **ZEROUANE**.*

A tous mes amis sans exception.

*Enfin à mon cher binôme **Nada**, et la famille **GHRJILLI**, pour sa patience et soutien durant tout ce travail. En souvenir à tous ces moments mémorables de joie que nous avons partagés, mais aussi un peu les moments difficiles.*

SEDDAOUI.H





Dédicaces

C'est avec grande joie que je dédie ce travail :

A La mémoire de mes grands-mères

A Mon cher grand père, pour tout son sacrifice, son amour, sa tendresse, son soutien et ses prières tout au long de mes études.

A La lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, la prunelle de mes yeux, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore. Que dieu te procure bonne santé et longue vie.

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

*A Mes frères chéris **Chahine** et **Nazim**, et à ma sœur de cœur **Wissam**, toujours présents pour moi et pour tout, je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premiers lieu pour leurs conseils, aides, amour et encouragements.*

*A mes oncles, Tantes, cousins et cousines ainsi qu'à toute la famille **Ghritli** et **Mellak**,*

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes cotes, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures, ma chère famille, mes aimables amis, collègues d'études,

*A mon binôme **Hiba** et toute la Famille **Seddaoui**. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

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

GHRITLI.F. N



Glossaire

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

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

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

Amplicon : fragment d'ADN amplifié par PCR.

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

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

Electrophorèse capillaire : processus de séparations.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Liste des abréviations

ABI prism	: Applied Biosystem
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ADN mt	: Acide Désoxyribonucléique mitochondrial
CCD	: Charge Coupled Device
CODIS	: Combined DNA Index System
Ct	: Cycle threshold
DTT	: Dithiothréitol
EPG	: Eléctrophorégramme
FAM	: 6- Carboxyfluorocein
IPC	: Internal PCR Control
Kpb	: Kilo paire de base
KM	: Kastle-Meyer
LIZ	: Internal lane size standard
NAOH	: sodium hydroxyde
Pb	: Paire de base
PCR	: Polymerase chain reaction
POP4	: Performance optimized polymer 4
QPCR	: Quantitative Polymerase Chain Reaction
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RFU	: Rrelative Fluorescence Units
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
STR	: Short Tandem Repeat
Taq	: Thermus aquaticus
VNTR	: Variable Number of Tandem Repeat
Zn	: Zinc

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Diagramme schématique des polymorphismes de répétitions STR.	6
02	Principe de la sonde Taqman.	14
03	Stutters.	17
04	Pics résultants des additions incomplètes d'Adénine (+A/-A).	17
05	Electrophorégramme hypothétique montrant certains artéfacts potentiels.	18
06	Résultats du test Kastel Meyer.	21
07	Résultat du test OBTI.	21
08	Extraction de l'ADN grâce au kit Qiagen (QIAamp DNA Investigator).	26
09	Evolution de la quantité d'amplicons en fonction du nombre de cycles.	29
10	Schéma explicatif du principe de la sonde Taq Man.	30
11	Protocole de travail du thermocycleur 9700ABI.	34
12	Répartition des échantillons.	37
13	Les cinq fluorochromes utilisés dans le kit d'amplification Identifier.	38
14	Déroulement de l'électrophorèse capillaire.	38
15	Protocole du thermocycleur 7500Fast Real-Time PCR system.	40
16	Courbe standard tracée à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN dans les différentes dilutions.	41
17	Représentation des échantillons sur la courbe standard.	41
18	Un electrophorégramme d'un profil ADN.	43
19	Profil du ladder Identifier Plus.	45
20	Control DNA 9947A.	46
21	Contrôle Négatif.	47
22	Diagramme représente les pourcentages des résultats des 29 profils obtenus.	54

Liste des tableaux

Tableau	Titres	Page
I	Principales dates de développement de l'analyse ADN en pratique judiciaire.	7
II	Liste des loci analysés sur l'ADN autosomal.	8
III	Liste des loci analysés sur le chromosome X.	9
IV	Liste des loci analysés sur le chromosome Y.	10
V	Les différentes sources biologiques.	12
VI	Préparation des échantillons.	23
VII	Composants du kit d'extraction.	27
VIII	Réactifs du Kit Quantifiler Human.	31
IX	La dilution des 08 standards de la quantification d'ADN.	31
X	Le plan de dépôt des échantillons dans la plaque de quantification.	32
XI	Calcul du volume total du Master Mix.	32
XII	Composants du kit Identifier plus.	34
XIII	Composants du kit pour la post PCR.	35
XVI	Résultats de quantification, dilution et profil obtenu pour chaque échantillon.	42
XV	Les profils obtenus de l'analyse des STR pour les individus des échantillons.	48

Résumé

Les progrès de la biologie moléculaire en matière d'empreinte génétique ont révolutionné les sciences médico-légales. Il s'agit d'une méthode d'identification quasi absolue des individus.

Le génotypage d'ADN, utilisé dans les sciences forensiques, a connu un grand développement, depuis sa découverte par Sir Jeffrey en 1985.

La réduction du nombre de cellules, l'efficacité des méthodes d'extraction et de purification et la rapidité du profilage, ont permis la progression de ces applications.

L'objectif de ce mémoire est l'établissement de profils génétiques à partir de traces de sang prélevées sur les lieux de crime, avec évaluation des deux différents supports « vêtements-armes de crimes ». Cette étude nous a permis de démontrer des facteurs clés qui peuvent influencer sur les résultats, tels que la qualité de l'ADN, la nature du support, et les conditions environnementales.

Dans cette étude, les traces de sang sur les 33 échantillons prélevés sur les différents types de supports comme des vêtements ou des armes de crime à savoir, des surfaces absorbantes et non absorbantes comme le Cotton, le bois, le plastique, cuir, métal, polyester ; colorés ou synthétiques, afin d'évaluer la relation entre la nature du support, la quantité d'ADN retenue, et le profil génétique obtenu.

Pour l'ensemble des échantillons prélevés, 29 profils ont été obtenus, 27 Complets interprétables, 1 partiel, et 1 nul ainsi que 4 échantillons ne présentant pas de quantité suffisante pour le profilage ADN.

D'après nos résultats, nous avons pu démontrer qu'il n'existe pas de corrélation directe entre la nature du support, la quantité d'ADN et le type de profil obtenu.

Les traces de sang sont les sources d'ADN les plus répandues dans le domaine criminalistique, en revanche d'autres sources sont également exploitables, telles les traces de contacts, sperme, urine, éléments pileux et cela pour de nombreuses analyses, identification d'individus, recherche de filiation parentale ...

Mots clés : séquences répétées en tandem, traces de sang, quantification, PCR multiplex, profil ADN.

Abstract

Advances in molecular biology in DNA fingerprinting have revolutionized forensic science. This is a method of almost absolute identification of individuals.

DNA genotyping, used in the forensic sciences, has developed greatly since its discovery by Sir Jeffrey in 1985.

The reduction in the number of cells, the efficiency of the extraction and purification methods and the rapidity of profiling have allowed these applications to progress.

The objective of this project is the establishment of genetic profiles from traces of blood taken at the crime scene, with evaluation of the two different "clothing-weapons of crime" supports. This study allowed us to demonstrate key factors, which can affect the results, such as the quality of the DNA, the nature of the support, and the environmental conditions.

In this study, the traces of blood on the 33 samples taken on different types of media such as clothing or weapons of crime, namely, absorbent and non-absorbent surfaces such as cotton, wood, plastic, leather, metal, polyester ; colored or synthetic, in order to evaluate the relationship between the nature of the support, the amount of DNA retained, and the genetic profile obtained.

For all the samples taken, 29 profiles were obtained, 27 8 partial, and 1 null and 4 samples not having sufficient amount for DNA profiling.

According to our results, we have been able to demonstrate that there is no direct correlation between the nature of the support, the amount of DNA and the type of profile obtained.

Blood traces are the most common sources of DNA in the forensic field, but other sources are also exploitable, such as traces of contact, sperm, urine, hair elements and this for many analyzes, identification of individuals, looking for parentage ...

Keywords: sequences tandem repeats, blood traces, quantification, PCR multiplex, DNA profile.

ملخص

التطورات في البيولوجيا الجزيئية في بصمة الحمض النووي قد أحدثت ثورة في علم الطب الشرعي. هذه طريقة لتحديد الأفراد تقريباً.

تطور التمييز الجيني للحمض النووي، الذي يستخدم في علوم الطب الشرعي، تطوراً كبيراً منذ اكتشافه من قبل السير جيفري في عام 1985

إن انخفاض عدد الخلايا، وكفاءة طرق الاستخراج والتنقية وسرعة التمييز قد سمحت لهذه التطبيقات بالتقدم.

في هذه الدراسة، أثار الدم على 33 عينة مأخوذة على أنواع مختلفة من الوسائط مثل الملابس أو أسلحة الجريمة، مثل الأسطح الماصة وغير الماصة مثل القطن والخشب والبلاستيك والجلود والمعادن، البوليمر. الملونة أو الاصطناعية، من أجل تقييم العلاقة بين طبيعة الحامل، وكمية الحمض النووي المحتجزة، والملف الوراثي الذي تم الحصول عليه.

بالنسبة لجميع العينات التي تم أخذها، تم الحصول على 20 ملفاً، 8 جزئية و1 خالية و4 عينات لا تحتوي على كمية كافية لتصنيف الحمض النووي.

الهدف من هذه الأطروحة هو إنشاء ملفات تعريف وراثية من آثار الدم المأخوذة في مسرح الجريمة، مع تقييم الحاملين المختلفين "أسلحة الجريمة - الملابس"، وقد سمحت لنا هذه الدراسة بإظهار العوامل الرئيسية. التي يمكن أن تؤثر على النتائج، مثل جودة الحمض النووي، وطبيعة الدعم، والظروف البيئية.

وفقاً لنتائجنا، تمكنا من إثبات عدم وجود علاقة مباشرة بين طبيعة الدعم وكمية الحمض النووي ونوع ملف التعريف الذي تم الحصول عليه.

آثار الدم هي أكثر مصادر الحمض النووي شيوعاً في مجال الطب الشرعي، لكن هناك مصادر أخرى يمكن استغلالها أيضاً، مثل آثار التلامس، والحيوانات المنوية، والبول، وعناصر الشعر، وهذا لكثير من التحليلات، وتحديد الأفراد، والبحث عن النسب.

الكلمات المفتاحية: تسلسل متكرر بالترادف، آثار الدم، تحديد الكمية، متعدد PCR، الملف الشخصي للحمض النووي.

Sommaire

Introduction.....	01
--------------------------	-----------

Chapitre I : Etude bibliographique

I- Historique.....	02
II- Utilisation de l'ADN en criminalistique.....	02
III- Le Génome humain.....	03
III-1 ADN nucléaire.....	03
III-2 ADN mitochondrial.....	04
IV- Polymorphisme génétique.....	04
IV-1 Polymorphisme de séquence.....	04
IV-1.1 Polymorphisme d'un seul nucléotide SNP.....	04
IV-2 Polymorphisme de longueur.....	04
IV-2.1 Polymorphisme de restriction « RFLP ».....	04
IV-2.2 Les minisatellites.....	05
IV-2.3 Les microsatellites.....	05
IV-2.3.1 Caractéristiques des loci (STR).....	06
IV-2.3.2 STR historique.....	07
IV-2.3.3 STR autosomique	07
IV-2.3.4 Les marqueurs haplotypiques.....	08
IV-2.3.4.1 Les marqueurs du chromosome X.....	09
IV-2.3.4.2 Les marqueurs du chromosome Y.....	10
IV-2.3.5 Marqueurs déterminant le sexe « Amélogénine ».....	11
V- Empreinte génétique.....	11
VI- La démarche à suivre en vue de l'obtention d'un profil génétique.....	11
VI-1 Sources biologiques.....	12
VI-2 Les facteurs externes contre l'ADN.....	12
VI-3 Collecte des échantillons biologiques.....	12
VI-4 Traces de sang.....	13
VI-4.1 Tests préliminaires : Identification du sang.....	13
VI-5 Extraction de l'ADN.....	13
VI-6 Quantification.....	14
VI-7 Amplification de l'ADN.....	15
VI-8 Post-Amplification.....	15
VI-9 Electrophorèse capillaires.....	15
VI-10 Validation des profils génétiques.....	16
VI-10.1 Quelques problèmes liés à la complexité d'interprétation.....	16

Chapitre II : Matériels et méthodes

I-	Matériel.....	19
I-1	Matériel Biologique.....	19
I-1.1	Echantillonnage.....	19
I-2	Matériels non biologiques.....	19
II-	Méthodes.....	19
II-1	Nettoyage et préparation de la surface de travail.....	19
II-2	Recherche des taches suspectes.....	19
II-2.1	Les tests préliminaires.....	20
II-2.1.1	Le test Kastel Meyer.....	20
II-2.1.1	Le test OBTI.....	21
II-3	Prélèvement et mise en tube.....	22
II-3.1	Préparation des échantillons.....	22
II-4	Extraction.....	25
II-4.1	Définition.....	25
II-4.2	Principe de la méthode.....	25
II-4.3	Composants du Kit d'extraction.....	27
II-4.4	Processus opératoire.....	27
III-	La quantification.....	29
III-1	Définition.....	29
III-2	La chimie TaqMan.....	30
III-3	Composants du Kit de quantification.....	31
III-4	Processus opératoire.....	31
III-4.1	Dilution des standards.....	31
III-4.2	Préparation du Mix.....	32
III-4.3	La dilution de la quantité d'ADN.....	33
IV-	Amplification de l'ADN par PCR.....	33
IV-1	Composants du Kit.....	33
IV-2	Processus opératoire.....	34
V-	Post Amplification.....	35
V-1	Composants du kit pour la post-PCR.....	35
V-2	Processus opératoire.....	36
VI-	Electrophorèse capillaire.....	37
VII-	Validation des profils génétiques.....	39

Chapitre III : Résultats

I-	Résultats de la quantification.....	40
I-1	Les conditions du processus de travail du thermocycleur 7500.....	40
I-2	Courbe standards.....	40
I-3	Résultats de quantification des échantillons.....	41
II-	Interprétation des profils génétiques (empreinte génétique).....	43

Chapitre IV : Discussion

I-	Les différents types de profils génétiques obtenus.....	50
II-	Les facteurs qui influencent sur l'établissement d'un profil ADN.....	51
II-1	Les types de surfaces.....	51
II-2	Facteurs environnementaux.....	53

Chapitre V : Conclusion

Chapitre VI : Références Bibliographiques

Chapitre VII : Annexes

Introduction

Introduction :

L'avènement de la biologie moléculaire et de ses applications en biologie médico-légale a permis d'élucider des cas criminalistiques difficiles à interpréter par les techniques classiques d'investigation criminelles ou autres (William, 2006).

En criminalistique, les traces biologiques exploitables correspondent à des substances issues des êtres vivants, échangées ou laissées, sur une scène de crime, qui seront analysées au laboratoire de génétique forensique (Police scientifique, 2012). Elles sont considérées comme des preuves clés dans une enquête criminelle (Coquoz, 2003).

L'établissement d'un profil génétique est basé sur l'analyse des régions d'ADN non codantes répétées en tandem qui sont les STR (Short Tandem Repeat), ils sont variables entre individus et permettent d'établir une identité génétique à partir des différentes traces biologiques. Les applications des empreintes génétiques sont diverses dans le domaine criminalistique, elles sont utilisées pour la recherche de paternité, les agressions sexuelles, les homicides, l'identification de cadavres et les vols (Edwards et al, 1991).

Pour obtenir des profils d'ADN à comparer, la première étape consiste à recueillir d'une part des échantillons provenant des traces relevées sur les lieux d'infractions, et d'autre part des échantillons de référence provenant des suspects, généralement des prélèvements de sang, de cheveux ou de fluides corporels. Les progrès qu'ont connus les techniques dans ce domaine permettent désormais d'obtenir des résultats avec des quantités d'ADN de plus en plus faibles. Par la mise en œuvre de méthodes scientifiques, l'échantillon est analysé, et un profil est établi qui peut être comparé avec d'autres enregistrés dans une base de données.

Pour le profilage génétique et l'identification des individus d'une scène de crime, la police scientifique recherche primordialement du sang sur tous les objets, et a toujours recours aux armes et spécifiquement aux vêtements ce qui justifie le choix de notre objectif.

L'étude présentée dans ce manuscrit a été réalisée au niveau de département d'identification Génétique, au sein de la sous-direction de la Police Scientifique et Technique Ben Aknoun. Elle consiste à l'établissement de profils génétiques à partir de taches de sang prélevées sur scène de crime déposées sur différents supports (vêtements et armes de crime), dans dix affaires criminelles différentes. Nous avons choisi ces supports car ils sont les plus répandus sur les scènes de crimes, donc notre but d'étude est dirigé vers une étude comparative entre les profils ADN obtenus à partir d'une tache de sang sur 33 échantillons.

Cela se traduit par la qualité des pics qui représentent les profils ADN issus des différents supports à partir d'une tache de sang humain.

La récupération de l'ADN à partir des taches de sang est fortement variable et elle dépend d'une large gamme de facteurs entre autres les types de surfaces et les facteurs environnementaux.

Etude bibliographique

I- Historique :

La naissance de la police scientifique a eu lieu en 1910, Edmond Locard crée à Lyon le premier laboratoire de police scientifique et y met en application le principe selon lequel « tout individu, à l'occasion de ses actions criminelles en un lieu donné, dépose et emporte à son insu des traces et des indices : sueur, sang, poussière, fibres, sperme, salive, poils, squames, terre, etc. Qu'ils soient de nature physique, chimique ou biologique, ces indices, une fois passés au crible d'examens de plus en plus sophistiqués, parlent et livrent le récit du crime avant de permettre au lecteur-enquêteur de déchiffrer la signature de l'auteur-coupable ». L'analyse ADN au service de la justice est en effet devenue un outil incontournable depuis son développement dans les années 80. Historiquement, elle trouve son origine dans l'évolution rapide des techniques de génétique moléculaire dont les applications les plus importantes se retrouvaient dans le monde médical (Butler, 2005).

L'empreinte génétique, une découverte brevetée par le Professeur Sir Alex Jeffreys, généticien britannique en 1985, est devenue une procédure mise au service de la justice, ainsi que les méthodes de profilage de l'ADN, consistant en une amélioration de la technique d'empreinte génétique. Le profilage de l'ADN est basé sur des "microsatellites" à forte variation du génome humain. Ces microsatellites sont des parties choisies du brin d'ADN normalement long et complexe, où se produisent la plupart des variations entre les individus (Butler, 2005).

Cette même année, une découverte majeure faite par K.Mullis, la PCR (Polymerase Chain Reaction), permet de développer cette analyse. La PCR permettait d'augmenter de façon considérable la quantité d'ADN analysé à partir de prélèvement contenant peu de matériel génétique grâce aux propriétés des DNA polymérase thermostables (Saiki et al, 1985).

II-Utilisation de l'ADN 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. Les résultats obtenus furent alors comparés à un suspect, et celui-ci fut exclu (Jeffreys et al, 1985). Après une étude sur des prélèvements effectués sur tous les hommes de la région, un profil identique à celui retrouvé sur la scène criminelle fut identifié (Doutremepuich, 2012).

L'analyse ADN est appelée alors DNA fingerprint ou Empreinte génétique (Jeffreys et al, 1985). Ce premier cas illustre bien l'intérêt de l'ADN en pratique judiciaire : exclusion d'un suspect, puis inclusion d'une autre personne (Doutremepuich, 2012).

Au cours de ces dernières années, les analyses ADN utilisées par la justice ont connu de nombreux développements : réduction du nombre de cellules nécessaires à l'analyse, méthodes d'extraction et de purification plus efficaces, méthodes de génotypage plus rapides. Ces analyses, effectuées uniquement dans le cadre d'une mission judiciaire, permettent alors d'identifier rapidement un corps, une tache de sang, de sperme, ou de cellules épithéliales par comparaison avec des résultats issus d'une famille (Doutremepuich, 2012). Ainsi que les méthodes de profilage de l'ADN, consistant en une amélioration de la technique d'empreinte génétique (Butler, 2005).

III-Le Génome humain :

Le génome est au cœur du fonctionnement des organismes vivants, assurant la pérennité et la propagation des propriétés des cellules et des organismes (Grange et al, 2010).

L'acide désoxyribonucléique, ou ADN, est indispensable à toutes les formes de vie. L'enchaînement successif de ses bases constitue le code génétique qui est transcrit grâce à la machinerie transcriptionnelle (Barthes et al, 2016).

L'ADN se compose d'environ trois milliards de nucléotides qui, en s'enchaînant les uns aux autres en deux brins complémentaires, constituent le chromosome. Les nucléotides sont de quatre types différents représentés par des lettres selon la base azotée qu'ils contiennent : A (adénine), T (thymine), C (cytosine) et G (guanine). Ces nucléotides se succèdent en nombre variable pour constituer des séquences spécifiques qui peuvent se répéter plusieurs millions de fois. Ces séquences, par leur taille, leur nombre et leur disposition, sont propres à chaque personne, et c'est leur "lecture" qui va permettre aux scientifiques de se prononcer sur une identification (Police scientifique, 2014).

L'ADN est une molécule présente au cœur de toutes nos cellules. Son séquençage a révélé que nous avons environ 20.000 gènes (alors qu'on en attendait plus de 100.000 !). La cartographie finale a été publiée en 2004. Ces gènes sont des morceaux de l'ADN qui détiennent le 'code' permettant de fabriquer des protéines. Cette partie du génome, appelé ADN codant, ne représente que 1 à 2% de la totalité de l'ADN (Dumas, 2012).

La deuxième partie qui contient des régions non codantes représente plus de 90% du génome, elle ne comporte pas d'information en rapport direct avec la synthèse de protéines. La même séquence est répétée à plusieurs reprises que ce soit en tandem ou dispersée dans le génome (Venter et al, 2001).

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

III-1 ADN nucléaire :

Le séquençage de la totalité du génome humain a révélé que la grande majorité des gènes étaient organisés sous la forme canonique « exon-intron-exon » et que ces introns (non codants) pouvaient couvrir jusqu'à des centaines de milliers de paires de bases (Lander et al 2001).

Par conséquent, le génome humain serait constitué en majorité de séquences non codantes réparties entre les gènes, représentant l'ADN extragénique qui est formé de répétitions variées et d'origines diverses, et couvrant deux tiers de la totalité du génome. Tandis que, sur le tiers restant, près de 95% de l'ADN est présent sous forme de séquences génique apparentées : pseudogènes, introns et UTR principalement (ADN non conservé ou hautement répétitif). Au final, le génome nucléaire humain, de par sa structure et son organisation complexe, fait que seul 1 à 2% d'ADN est codant (Venter et al 2001).

L'ADN nucléaire possède trois propriétés qui vont intéresser la police scientifique : il possède des régions variables d'individu à individu ; ces régions chez un individu sont

identiques quel que soit le tissu analysé ; et enfin, l'ADN est transmis par moitié de chacun des parents à ses enfants (Pascal, 1998).

La grande variabilité de ces régions est exploitée en criminalistique où l'analyse génétique doit répondre à certains standards (Schneider, 2006).

III-2 ADN mitochondrial :

L'ADN mitochondrial (ADN mt), présent dans le cytoplasme, permet d'établir une lignée maternelle, et peut également être utilisé pour l'expertise génétique, il s'agit d'une petite molécule circulaire et monocaténaire de 16569pb qui code pour des chaînes polypeptidiques nécessaires au fonctionnement de la mitochondrie (Loistron, 2009).

IV-Polymorphisme génétique :

Le polymorphisme est l'existence pour de nombreux loci chez l'homme, de deux allèles ou plus s'exprimant avec une fréquence non négligeable dans la même population. Plus d'un tiers des gènes sont polymorphes. En effet, environ 99,7% d'ADN est identique chez tous les êtres humains. Par contre, environ 0,3 % d'ADN (soit équivalent d'un million de nucléotides) est hétérogène et contribue à la caractérisation et la distinction de chaque individu (Butler, 2001).

IV-1 Polymorphisme de séquence :

IV-1.1 Polymorphisme d'un seul nucléotide SNP :

Les SNP pour (Single Nucleotide Polymorphisms) constituent les polymorphismes les plus répandus du génome humain. Ils s'agissent de variations de la séquence d'ADN portant sur un seul nucléotide. Ces marqueurs sont bi-alléliques et sont répartis sur l'ensemble du génome, toutes les 500 paires de bases en moyenne, aussi bien au niveau des régions codantes (gènes) que des régions non codantes. Les régions d'ADN ciblées pour l'analyse de SNP sont de petites tailles, ce qui permet l'étude 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 éthique d'une personne (Keyser et Petkovski, 2006).

Les SNP présentent un taux de mutation bien inférieur à celui des microsatellites (STR), pour cela ils sont considérés comme des marqueurs génétiques stables (Keyser et Petkovski, 2006).

IV-2 Polymorphisme de longueur :

L'analyse de l'ADN non codant a mis en évidence des régions variables, caractérisées par la répétition en tandem d'unités de base composées de deux ou plusieurs nucléotides ; la taille de ces fragments varie en fonction du nombre de répétition (Jarman et Wells, 1999).

IV-2.1 Polymorphisme de restriction « RFLP » :

Les RFLP pour (Restriction Fragment length Polymorphisms) proviennent de la digestion de l'ADN par un enzyme de restriction. C'est l'extrême spécificité de ces enzymes qui est exploitée pour la mise en évidence du polymorphisme : une présence-absence de site de restriction entraîne un polymorphisme de longueur de fragments. (Bostein et al, 1980).

Ce phénomène n'étant pas rare, la digestion de l'ADN de deux individus quelconques dans une espèce donnée produit de très nombreuses différences de longueur des fragments (Botstein et al, 1980).

Lorsque deux individus homozygotes sont comparés après digestion de leur ADN par une enzyme donnée et hybridation avec une sonde donnée, on observera donc des profils d'électrophorèse différents chaque fois que des sites de restriction différeront dans la région reconnue par la sonde (Botstein et al, 1980).

IV-2.2 Les minisatellites :

La découverte des minisatellites par Alec Jeffereys en 1985 a révolutionné l'utilisation de l'ADN en matière d'identification et de filiation. Le motif de base de ces marqueurs, également appelé VNTR, compte entre 9 et 100 pb. Il est réitéré entre deux et quelques centaines de fois à chaque locus (Tautz, 1993), générant ainsi des fragments de 500 pb à 20 kpb en taille. Les minisatellites se trouvent plus fréquemment dans les régions proches des télomères mais ils peuvent être aussi présents sur d'autres sites chromosomiques (Petkovski, 2006). Ils sont instables et le nombre d'exemplaires d'une séquence donnée change souvent d'une génération à l'autre suite à des recombinaisons méiotiques « crossing-over » inégales et des conversions génétiques (Petkovski, 2006).

Leur polymorphisme élevé qui signifie de grands écarts différents par rapport à la norme a permis une utilisation de plus en plus répandue de ces minisatellites pour l'empreinte génétique, ainsi que pour les marqueurs génétiques utilisés dans l'analyse de liaison et les études de population (Jeffreys, 1991).

IV-2.3 Les microsatellites (STR) :

Représentent des régions d'ADN constitué de courts segments répétés en tandem retrouvés tout au long du génome humain qui varient en longueur à travers l'insertion, la suppression ou mutation d'une unité de séquence d'ADN répétée (Butler et Hill, 2012). Leur variabilité semble principalement liée à des dérapages de réplication (Di Rienzo et al, 1994).

Ils sont constitués de motifs nucléotidiques de 2 à 6pb répétés de 2 à 100 fois les uns à la suite des autres, générant des allèles variant en taille entre 50 et 500pb. Ils sont localisés dans les régions non codantes de l'ADN nucléaire au niveau des chromosomes et présentent une distribution plutôt uniforme sur le génome avec la présence d'un locus toutes les 6 à 10kb (Weber et al, 1989).

Certaines séquences STRs ont été choisies pour être utilisés en criminalistique car elles comportent généralement une répétition en tandem de seulement trois ou quatre paires de bases, qui peuvent être répétées dans la molécule d'ADN plusieurs fois ou plusieurs dizaines de fois. Évidemment, une unité de trois ou quatre paires de bases seulement est extrêmement petite, ce qui constitue à la fois un problème et un avantage pour les fins escomptées. L'avantage est qu'une très petite quantité d'ADN, même très dégradé, peut être suffisante pour être utilisée en criminalistique (Butler et al, 2007). Le problème, est que pour pouvoir procéder efficacement à une analyse, il faut grandement augmenter le nombre des très courtes séquences d'ADN. On y parvient grâce à l'utilisation d'une technique appelée PCR. Les STRs peuvent être divisés en trois catégories : Simples : répétitions de la même séquence et de la même taille. Composés :

deux ou plus, simples répétitions. Complexes : ont plusieurs blocs de répétitions de différentes tailles et de séquences différentes (Goodwin et al, 2007).

D'un individu à l'autre, la séquence répétée d'un VNTR ou d'un STR est identique mais le nombre de répétitions, et donc la taille du VNTR ou du STR peut être très variable (Ameziane et al, 2005).

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

IV-2.3.1 Caractéristiques des loci STR :

Bien que le génome humain contienne environ 3% de séquences STR, constituant plus d'un million de loci dispersés à travers tout le génome seulement quelques loci ont été choisis comme marqueurs dans le domaine d'analyse d'ADN à des fins d'identification humaine. Les critères de sélection des loci STR incluent ces paramètres : (Butler, 2006).

- Un pouvoir discriminatoire élevé, habituellement supérieur à 0,9 soit (90%) avec un taux d'hétérozygotie supérieur à 70%.
- Une localisation sur différents chromosomes, ou ils doivent être largement espacés sur le même chromosome pour éviter le problème de corrélation de génotypes à ces loci.
- Une amplification simple et fiable qui traduit un taux réduit de mutation au niveau des séquences flanquantes.
- Une longueur d'allèle comprise entre 90 et 500 paires de base.

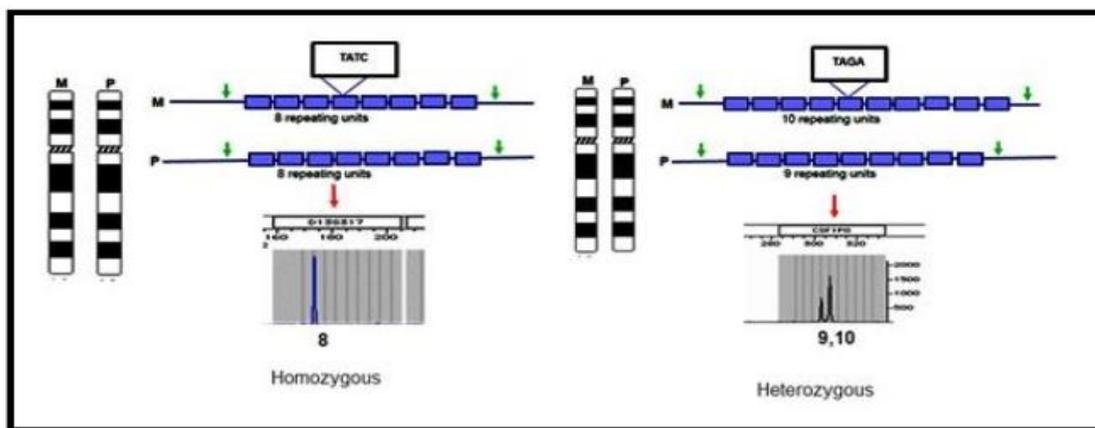


Figure 01 : Diagramme schématique des polymorphismes de répétitions STR
(Reid et al, 2013).

IV-2.3.2 STR historique :

L'utilisation des STR en vue de l'obtention de profils génétiques à des fins d'identification humaine a été proposée au début des années 90, suite à la mise en place de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Au cours de ces années le service britannique (FSS) « Forensic Science Service » a entamé la recherche de nouveaux loci en tant que marqueurs STR d'après l'étude de leurs variations au sein de la population (Kimpton et al, 1993). Dès lors, le succès qui a été observé au Royaume-Uni fut conforté par le laboratoire du bureau Fédéral d'investigation (FBI) qui a établi le système CODIS (Combined DNA Index System), pour la base de données des Etats-Unis. Par ailleurs, en avril 1995, la base de données ADN du Royaume-Uni a été lancée via l'utilisation de six loci STR et un locus non STR déterminant le sexe (Werret et al, 1997). En avril 1996, un projet nommé "Community-Wide STR Project" a été lancé. Ce projet, qui a duré environ 18 mois, a vu la contribution de 22 laboratoires pour une évolution de 17 loci STR. Puis, en novembre 1997, 13 loci STR ont été proposés comme les marqueurs requis et exigés pour la base de données nationale des Etats-Unis et constituant le système CODIS. D'autre part, L'achèvement des efforts du Projet Génome Humain a permis d'élargir les connaissances sur les loci STR et environ 150 000 loci informatifs ont été identifiés (Silva et al 2012). Bien que l'établissement de bases de données nationales à travers le monde constitue une nécessité pour le maintien de l'accès aux données fournis par les STR, l'emploi des loci considérés comme standard devrait être limité dans l'avenir (Butler et Hill, 2012).

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

1985	Développement par Sir Alex Jeffreys des premières analyses d'identification
1987	Création de laboratoires pour les analyses de routine en Angleterre (Laboratoire Cellmark) et aux États-Unis (Laboratoire Lifecode)
1988	Développement d'une nouvelle méthode d'analyse de l'ADN grâce à des sondes (mono-locus)
1991	Développement des analyses des STR
1993	Mise en place du premier kit commercial d'analyses des STR
1995	Développement du premier analyseur de STR en fluorescence : ABI 310
1996	Développement de l'analyse de l'ADN mitochondrial
2000	Développement de kits commerciaux permettant l'analyse de 16 STR en simultané
2001	Développement de l'analyse du Chromosome Y
2002	Développement de la recherche sur les SNP
2005	Développement de kits commerciaux sur l'analyse du Chromosome Y
2010	Développement de séquenceurs de seconde génération

IV-2.3.3 STR autosomiques :

Le génome des cellules humaines comporte des séquences répétées qui varient selon leur taille. Ces unités répétitives comportent aujourd'hui 4 ou 5 pb. Ce nombre définit l'allèle (Doutremepuch et al, 2003) et (Doutremepuch et Morling 2004). L'empreinte génétique est le résultat de l'étude de plusieurs loci. L'analyse de l'ADN autosomal repose sur l'étude de 15 loci (tableau n° II). Cette analyse permet d'établir un génotype propre à chaque individu (Doutremepuch, 2012).

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

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

Des analyses complémentaires peuvent être réalisées afin :

- D'augmenter le nombre de résultats sur des prélèvements d'ADN dégradé.
- D'établir une lignée paternelle dans l'identification de personne (découverte de cadavre, paternité).
- Identification de personnes de sexe féminin à partir de l'analyse de 12 loci localisés sur le chromosome sexuel X (tableau n° III).
- Identification d'individus masculins à partir de l'étude de 17 loci situés sur le chromosome sexuel Y (tableau n° IV) (Doutremepuch, 2012).

IV-2.3.4 Les marqueurs haplotypiques :

Les marqueurs autosomaux subissent un brassage génétique à chaque génération puisqu'ils sont transmis de manière biparentale. Ainsi, la moitié de l'information génétique d'un individu lui vient de son père et l'autre moitié de sa mère. Les marqueurs uniparentaux, c'est-à-dire ceux situés sur le chromosome Y et sur l'ADN mitochondrial, sont transmis d'une génération à l'autre sans changement sauf dans le cas de mutations. Les marqueurs de l'ADN mitochondrial, transmis de mère à enfants, permettent de retracer les lignées maternelles (Etienne et Clauser, 2001), et ceux du chromosome Y, transmis de père en fils, les lignées paternelles (Primorac et al, 2000).

IV-2.3.4.1 Marqueurs du chromosome X :

Des centaines de microsatellites STR ont été étudiés, répartis tout le long du génome humain, mais seuls quelques-uns ont été retenus pour les analyses génétiques médico-légales et pour l'étude génétique des populations, notamment ceux du chromosome X (X-STR) dont l'analyse des haplotypes est facile à déterminer chez les hommes hémizygotés. Plusieurs études ont donc été réalisées et rendent disponibles des kits X-STR commerciaux permettant l'analyse entièrement automatisée et simultanée de plus de 10 marqueurs (Hundertmark et al, 2008).

Ces dernières années, plus d'importance a été accordée à l'application des marqueurs STR du chromosome X dans le domaine de l'identification et de la génétique des populations. L'analyse des marqueurs STR du chromosome X peut être efficace dans des situations particulières, par exemple, dans le cas de tests de paternité de la progéniture féminine lorsque le père présumé n'est pas présent. Cependant, des résultats peuvent être obtenus en examinant ses parents. De plus, des analyses peuvent être réalisées dans le test de maternité, particulièrement le cas de fils, qui est vraiment rare, mais sont toujours effectués pour différents intérêts (Butler, 2007).

Tableau III : Liste des loci analysés sur le chromosome X (Doutremepuch, 2012).

Locus	Chr	Position	Taille des fragments	Motif répété	Échelle allélique
Amélogénine	X	Xp22.1 22.3			
DX S7132	X	Xq11.2	de 216 à 244 pb	(TCTA) _n	entre 10 et 17
DX S7423	X	Xq28	de 154 à 174 pb	(TCCA) _n TCTGTCCT (TCCA) _m .	entre 13 et 18
DX S8378	X	Xp22.31	de 158 à 182 pb	(CTAT) _n	entre 9 et 15
DX S10074	X	Xq12	de 104 à 172 pb	(AAGA) _n	entre 4 et 21
DX S10079	X	Xq12	de 290 à 333 pb	(AGAG) _n TGAAAGAG (AGAA) _m AGAG (AGAA) _p	entre 14 et 25
DX S10101	X	Xq26.2	de 216 à 261 pb	(AAAG) _n GAAAGAAG (GAAA) _m A (AAAG) _p AAGA (AAAG) _q AAAAAGAA (AAAG) _o AA	entre 24 et 35
DX S10103	X	Xq26.2	de 109 à 135 pb	(TAGA) _n CTGA (CAGA)(TAGA) _m (CAGA) _p (TAGA)	entre 15 et 21
DX S10134	X	Xq28	de 295 à 363 pb	(GAAA) _n GAGA (GAAA) AA (GAAA) GAGA (GAAA) _m GAGA (GACAGA) _p (GAAA) GTAA (GAAA) _q AAA (GAAA) _o AAA (GAAA) _r	entre 28 et 44.3
DX S10135	X	Xp22.31	de 273 à 375 pb	(AAGA) _n GAAAG (GAAA) _m	entre 13 et 39.2
DX S10146	X	Xq28	de 188 à 275 pb	(TTCC) _n T (TTCC) _m TTTC CTCCCTTC (TTCC) (TTCC) TTCTTCTTC (TTCC) _p TTTCTT (CTTT) _q CTC (CTTT) _o T (CTTT) _r	entre 24 et 46.2
DX S10148	X	Xp22.31	de 207 à 305 pb	(GGAA) _n (AAGA) _m (AAAG) _p N8 (AAGG) _q .	entre 13.3 et 38.1
HPRTB	X	Xq26.2	de 148 à 180 pb	(AGAT) _n	entre 9 et 17

IV-2.3.4.2 Marqueurs du chromosome Y :

L'étude du chromosome Y, présente deux avantages principaux : la spécificité de l'ADN masculin lors de l'analyse des mélanges d'ADN et la possibilité de suivre la lignée paternelle (Primorac et al, 2000), (Gill, 2001). Il contient des régions très polymorphes, il y a 219 STR connus, mais uniquement un ensemble de 9 à 11 loci est utilisé (Leat et al, 2004), (Jobling et Gill, 2004). Les STR Y ont le même mécanisme mutationnel que les STR autosomaux (Gusmao et al, 2006).

Ces marqueurs peuvent être utilisés pour de nombreuses applications :

- L'analyse criminalistique d'indices dans le cadre d'agressions sexuelles et permettent l'amplification spécifiques de l'ADN masculin, ceci peut éviter les extractions différentielles pour séparer les spermatozoïdes des cellules épithéliales ainsi que le masquage du profil masculin pour le profil féminin (Jouquand, 2008).
- La recherche de paternité dans les cas où l'enfant est de sexe masculin (Mansuet-Lupo et al, 2007), (Sanchez et al, 2008).
- La recherche de personnes disparues pour lesquels tous parents en lignée paternelle peut être utilisé comme échantillons de comparaison (Dettlaff-Kakol et al 2002), (Koyama et al 2002).
- Les recherches historiques ou généalogiques puisque dans la majorité des sociétés, le nom de famille se transmet de père en fils (Quintana-Murci et al, 1999).

En outre, l'analyse des loci STR du chromosome Y joue un rôle important lors des cas rares mais tout de même important comme les anomalies du gène de l'Amélogénine chez l'homme (Butler, 2014).

Tableau IV : Liste des loci analysés sur le chromosome Y (Doutremepuch, 2012).

Locus	Chr	Position	Taille des fragments	Motif répété	Échelle allélique
Amélogénine	Y	Yp11.2			
DY S393	Y		de 113 à 137 pb	(AGAT) _n	entre 11 et 17
DY S19	Y		de 182 à 201 pb	TAGA) _n	entre 12 et 17
DY S389 II	Y		de 294 à 320 pb	(TCTG et TCTA) _n	entre 27 et 33
DY S390	Y		de 179 à 199 pb	(TCTA et TCTG) _n	entre 20 et 25
DY S391	Y		de 245 à 257 pb	(TCTA) _n	entre 9 et 12
DY S385	Y		de 346 à 386 pb	(GAAA) _n	entre 8 et 19
DY S389 I	Y		de 243 à 259 pb	(TCTG et TCTA) _n	entre 11 et 15
DY S439	Y		de 238 à 254 bp	(GATA) _n	entre 10 et 14
DY S438	Y		de 131 à 158 bp	(TTTTC) _n	entre 8 et 13
DY S392	Y		de 247 à 262 pb	(TAT) _n	entre 10 et 15
DY S437	Y		de 183 à 199 pb.	(TCTA et TCTG) _n	entre 13 et 17
DY S456	Y		de 100 à 127 pb.	(AGAT) _n	entre 13 et 18
DY S458	Y		de 133 à 165 bp.	(GAAA) _n	entre 14 et 20
DY S4635	Y		de 242 à 274 bp.	(TCTA et TGTA) _n	entre 20 et 26
Y GATA H4	Y		de 114 à 150 pb.	(TAGA) _n	entre 8 et 13
DY S448	Y		de 274 à 332 pb.	(AGAGAT) _n	entre 17 et 24

IV.2.3.5 Marqueurs déterminant le sexe « Amélogénine » :

L'Amélogénine est la principale protéine constituant l'email des dents ; chez l'homme il y a deux gènes codant pour l'amélogénine, le premier porté sur le chromosome X (Xp22.3) et le second sur le chromosome Y (Yp11.1) ; près de 90% de l'amélogénine exprimée est issue du chromosome X (Ikawa et al, 2005).

Les deux séquences homologues de ce gène diffèrent par la présence de plusieurs délétions. En 1999, une délétion de 6 paires de bases, localisée dans le premier intron de ce gène, a été notamment découverte sur le chromosome X et utilisée pour la première fois pour la détermination génétique du sexe des individus, puis plus tard dans les investigations médico-légales. Ce marqueur est donc généralement inclus dans les kits commerciaux utilisés pour l'identification génétique des individus, un fragment de 106 paires de bases étant amplifié à partir du chromosome X, alors que ce fragment a 112 paires de bases à partir du chromosome Y (Sullivan et al, 1993).

Néanmoins chez certains hommes, l'amélogénine du chromosome Y n'est pas amplifiée suite à une délétion sur le bras court du chromosome, ce qui donne un profil ADN qui peut être faussement interprété comme profil féminin (Jobbling et al, 2007).

De même, des études récentes ont montré que certains sujets féminins peuvent porter les deux variantes du gène amélogénine, et donner ainsi un profil XY pour ce marqueur (Stapleton et al, 2008). Certaines mutations au niveau des sites de fixation des amorces peuvent interférer avec l'identification du sexe (Shadrach et al, 2004).

V -Empreinte génétique :

Lors des procédés d'investigations de la police judiciaire, l'identification individuelle est souhaitable dans certaines situations, y compris la détermination des auteurs de violences et de crimes tels que les assassinats et les viols ainsi que la résolution des conflits de paternité, et l'identification des personnes ou des victimes de catastrophes. Pour identifier un individu inconnu grâce à l'étude de sa filiation ou afin d'associer un suspect à une affaire criminelle, l'établissement du profil génétique est alors indispensable. Celui-ci est réalisé à partir des échantillons biologiques issus de traces ou prélevés sur des individus soupçonnés (Butler, 2005).

VI- La démarche à suivre en vue de l'obtention d'un profil génétique :

L'établissement des profils génétiques s'inscrit généralement dans le contexte de l'évaluation du taux de concordance entre les allèles des loci STR correspondant à deux échantillons biologiques d'ADN : l'un étant inconnu, généralement récupéré d'une scène de crime ou issu d'une victime, l'autre connu, servant d'échantillon de référence et provenant d'un individu soupçonné (Blandin, 2004).

Afin d'aboutir à l'établissement des profils génétiques considérés comme preuves solides dans les affaires d'investigation, une procédure méthodologique adaptée est proposée aux experts de la police scientifique afin d'assurer une bonne collecte des échantillons biologiques en termes de qualité ainsi qu'à faciliter les épreuves ultérieures de stockage, d'analyse et d'interprétation des données (Taupin, 2008).

VI-1 Sources biologiques :

Il est possible d'obtenir des profils d'ADN à partir de la plupart des substances biologiques, selon les auteurs, représentées dans le tableau V :

Tableau V : les différentes sources biologiques (original, 2019).

Source d'ADN	Auteurs
Le sang	(Ginestra et al, 2004).
Le sperme	(Petit et al, 2008).
Les cheveux	(Pfeiffer et al, 2004), (Anderson et al, 2006).
Les rabats d'enveloppes et timbres	(Lay-Keow et al, 2007).
Les restes des squelettes humains	(Prado et al, 1997), (Loreille et al, 2007).
Prélèvement par écouvillonnage sur la surface de la peau (strangulations) Et à partir de trace de contacts	(Von wumbSchwark et al, 2006). (Wickenheiser, 2002), (Phipps et petricevic, 2007).

On distingue deux types de traces. Il y a d'un côté les traces "riches", provenant du sang, du sperme ou de la salive. Ces traces sont exploitables dans plus de 70% des cas pour établir un profil génétique. D'un autre côté, on trouve les traces "pauvres", issues des cellules de la peau, déposées soit par frottement, soit par contact transitoire sur des objets ou des vêtements. Ces dernières permettent, dans 15 à 20% des cas, de définir un profil génétique (Frangéul, 2013).

VI-2 Les facteurs externes contre l'ADN :

L'ADN a trois ennemis principaux : l'humidité, la chaleur et la lumière. L'humidité met à disposition l'un des ingrédients, l'eau, nécessaires à la rupture des liaisons entre les nucléotides accrochés pour former la chaîne d'ADN. De plus la chaleur est un des éléments déterminant la vitesse de toute réaction chimique. La lumière (les rayons UV essentiellement) induit également des transformations chimiques de l'ADN (Coquoz et al, 2013).

VI-3 Collecte des échantillons biologiques :

L'étape primordiale consiste en la collecte des sources biologiques potentielles d'ADN. Celles-ci correspondent généralement aux traces omises par les auteurs de crimes ou sont prélevées sur des individus suspects ou encore en vue d'établissement de tests de paternité.

Toutefois ; la qualité et la quantité d'ADN récoltée sont des critères fondamentaux. En effet, pour parvenir à l'établissement d'un profil génétique valide à partir de certains types d'échantillons dégradés ou de très petites quantités, plusieurs facteurs sont essentiels :

- La quantité de l'échantillon biologique
- Le degré de dégradation de l'ADN : tels que l'exposition de quantité importante de sang pendant de longues durées dans des milieux dégradables due à une forte contamination bactérienne.
- La pureté de l'échantillon biologique ; dans certains cas la saleté, les graisses, la peinture, et d'autres inhibiteurs lors des étapes d'analyse de l'ADN peuvent affecter la qualité de l'ADN.
- Les méthodes d'analyse de l'ADN et particulièrement l'amplification par PCR (Butler, 2011), (Taupin, 2008) et (Primorac et Schanfield, 2014).

VI-4 Traces de sang :

Il constitue un tissu fluide composé essentiellement d'érythrocytes (globules rouges), leucocytes (globules blancs) et plaquettes (thrombocytes) immergées dans un liquide plasmatique (Taupin, 2008). Dans le cadre d'analyse génétique on se focalise sur les globules blancs contenant le noyau (Coquoz, 2003).

Il est la substance biologique, par excellence, retrouvée sur les scènes de crimes, Principalement en raison de la nature violente de nombreux crimes, mais également du fait qu'il soit facile à visualiser en comparaison aux autres liquides biologiques (Goodwin et al, 2007).

VI-4.1 tests préliminaires : Identification du sang :

Pour l'identification du sang humain, deux tests sont utilisés : Un test d'orientation tel le test de KASTEL MEYER, qui est basée sur l'activité peroxydasique de l'hémoglobine sur la phénolphtaléine, réduite par le Zinc en présence de (H₂O₂), s'oxyde pour donner une coloration rose.

Et un second test de confirmation qui est utilisé pour confirmer que c'est un sang humain ; le test d'hexagone OBTI basé sur une méthode immunochromatographique qui utilise des anticorps réagissant spécifiquement à l'hémoglobine humaine (Johnston et al, 2003).

VI-5 Extraction de l'ADN :

Un échantillon biologique obtenu à partir d'une scène de crime, sous la forme d'une trace de sang, d'un écouvillon buccal, de sperme ou de tissu provenant d'individu connu, contient un certain nombre de substances en plus de l'ADN. Les protéines cellulaires qui conditionnent et protègent l'ADN dans l'environnement de la cellule peuvent alors inhiber la capacité d'analyse de l'ADN. Par conséquent, les méthodes d'extraction ont été développées pour séparer les protéines et autres matériaux cellulaires des molécules d'ADN. Idéalement, le processus d'extraction d'ADN devrait éliminer les inhibiteurs qui réduisent ou empêchent l'amplification de la réaction de polymérisation (PCR). Le processus d'extraction devrait également produire une solution stable contenant un ADN de haute qualité qui ne se dégradera pas au fil du temps pendant le stockage de l'échantillon (Butler et Hill, 2012).

Les objectifs du processus d'extraction d'ADN sont :

- La lyse des cellules pour libérer les molécules d'ADN.
- La séparation des molécules d'ADN des autres matériaux cellulaires.
- L'isolation de l'ADN en un format compatible avec les applications en aval, y compris l'amplification par PCR.

VI-6 Quantification :

La détermination de la quantité d'ADN dans un échantillon est essentielle pour la plupart des analyses d'ADN basées sur l'amplification par PCR car il existe un intervalle de concentration optimale. Une quantité d'ADN supérieure peut entraîner la formation d'artéfacts lors de la révélation des résultats. Par contre une quantité insuffisante d'ADN matriciel entraîne un échec du processus d'amplification par PCR ce qui engendre une révélation partielle des résultats d'analyses des amplicons. Ce phénomène est parfois appelé « fluctuations stochastiques » (Butler, 2005).

Une des méthodes appliquées pour la quantification de l'ADN présent dans les extractums (ADN extrait) est basée sur la technologie de l'hydrolyse des sondes. La chimie utilisée dans l'expérimentation est la Taqman. Cette technologie repose sur l'activité 5' nucléase de l'ADN polymérase impliquée dans la réaction de PCR. En effet, en progressant, celle-ci va déplacer et cliver la sonde allèle spécifique hybridée à l'ADN cible. Cette sonde est dessinée de manière à permettre la capture de la fluorescence du fluorophore donneur (en 5' de la sonde) par le fluorophore receveur (en 3' de la sonde). Ainsi, lors du clivage de la sonde par l'ADN polymérase, le fluorophore donneur et receveur sont éloignés permettant la détection de la fluorescence (Linacre et Tobe, 2013).

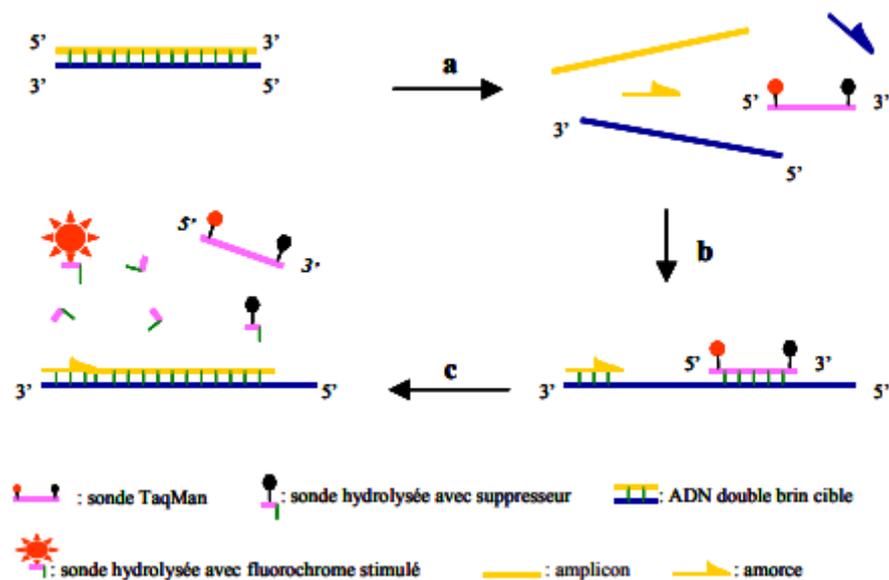


Figure 02 : principe de la sonde Taqman (Poitras et Houde, 2002)

(a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

VI-7 L'amplification de l'ADN :

La mise au point de la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) par K. Mullis et ses collaborateurs en 1985 a révolutionné la biologie moléculaire, devenant la technique de laboratoire la plus spécifique et la plus sensible pour la détection de l'ADN (Saiki et al, 1985).

Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase. Il s'agit d'une répllication in vitro de séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de générer des dizaines de milliards d'exemplaires d'un fragment d'ADN particulier (séquence d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel) (Iglesias, 2009).

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

Ce processus implique une alternance thermique entre le chauffage et refroidissement des échantillons pendant des cycles. Au cours de chaque cycle, une copie de la séquence d'ADN cible est générée. La séquence cible à amplifier est délimitée par le choix d'amorces oligonucléotidiques qui sont complémentaires aux extrémités 3' de la séquence d'intérêt, alors qu'une ADN polymérase Thermostable généralement « la Taq Polymérase » permet l'incorporation des quatre nucléotides dNTPs (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) reconstituant des amplicons à partir de la séquence d'ADN matriciel (Butler, 2005).

VI-8 Post amplification :

Avant de faire passer les amplicons des échantillons sur le séquenceur, l'ADN doit se présenter sous forme monocaténaire, à cet effet, la dénaturation de l'ADN est réalisée en utilisant le formamide (agent intercalant) et la chaleur, suivie par un choc thermique pour assurer et prolonger la dénaturation de l'ADN. Durant cette étape, un standard de taille est également ajouté fournissant 16 simples fragments classés selon leurs tailles, chacun des fragments étant marqué avec un fluorophore de couleur orange (Poitras et Houde, 2002).

VI-9 Electrophorèse capillaires :

L'électrophorèse est une technique physico-chimique qui sépare des constituants ionisés dans un champ électrique (Butler et al, 2001), permet l'étude de molécules très variées avec une excellente résolution et une grande rapidité (Trevin et Le Bricon, 2003).

Depuis une vingtaine d'années, le développement de nouveaux supports (gels de polyacrylamide, d'agarose et enfin capillaires de silice) comme champ migratoire a donné à l'électrophorèse un nouvel essor (Butler et al, 2001). Le support de migration est alors un gel

liquide POP4-ABI contenant le polymère de séparation, les sels nécessaires à la migration et l'urée (condition dénaturantes) (Butler et al, 2005), (McCord et al, 2007).

L'utilisation de l'électrophorèse capillaire sur gel s'est imposée comme un appareillage clé dans l'analyse d'ADN. Les capillaires utilisés sont de 50 à 100mm de diamètre permettant d'appliquer une différence de potentiel plus importante (12Kv), la migration des fragments se fait de façon plus rapide (Butler et al. 2005), (McCord et al, 2007).

L'électrophorèse capillaire a conquis rapidement les laboratoires de médecine légale grâce aux avantages qu'elle détient ; l'injection des échantillons, la séparation des fragments et leur détection automatisée, ce qui procure une facilité d'utilisation permettant d'éviter les contaminations. D'autres part, cette méthode permet de préserver les échantillons, puisque seule une quantité infime d'ADN est prélevée pour être analysée. De plus, le temps d'analyse est court et les résultats sont générés dans un format de données brutes, qu'il convient ensuite d'analyser grâce à des logiciels adaptés (Butler, 2005).

VI-10 Validation des profils génétiques :

Une fois les résultats d'ADN obtenus après séparation et détection des produits PCR, un profil génétique est généré grâce à des logiciels d'analyses génétiques, les données de l'électrophorogramme étant traduites en un profil exploitable.

L'objectif des laboratoires d'analyse de l'ADN est en effet de produire un profil d'ADN pour tous les types d'échantillons inconnus ou de référence en vue de comparaisons à des fins d'identification (Sozer, 2014).

VI-10.1 Quelques problèmes liés à la complexité d'interprétation :

Artefacts :

L'excès de pics observés sur l'électrophorogramme est le résultat d'apparition d'autres faux pics ou appelés également artefacts. Ils apparaissent en plus des pics réels auxquels on s'intéresse. Ces pics peuvent résulter d'un certain nombre de facteurs liés soit à la structure biologique des produits de la PCR ou bien aux outils technologiques employés pour l'amplification et la détection des fragments d'ADN ainsi qu'à l'analyse des données (Butler, 2010).

❖ Artefacts liés à la biologie des STRs :

- **Stutters :**

Ces produits apparaissent souvent sous forme de pics de taille réduite correspondant à un allèle ayant un motif de répétition de moins que l'allèle réel. Ces stutters se forment au cours de la réaction d'amplification de séquences répétitives via le phénomène de glissement de la polymérase (Butler, 2010).

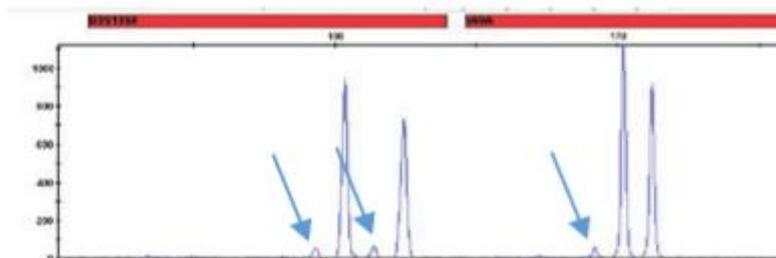


Figure 03 : Stutters (Jamieson, 2016)

- **Pics résultant des additions incomplètes d’adénine :**

Au cours des analyses des fragments amplifiés, il peut arriver que le profil génétique d’un échantillon révèle une addition d’adénine incomplète. Ceci se produit lorsque l’échantillon analysé contient beaucoup d’ADN et que le nombre des amplicons à la fin de la PCR est tel que l’ADN polymérase ne parvient pas aller au-delà de sa fonction. Ainsi des pics non conformes comme +/- A, ou N et N+1, et l’allèle d’intérêt, sera représenté par ces deux pics dont une paire de différente (Coquoz et Taroni, 2006).

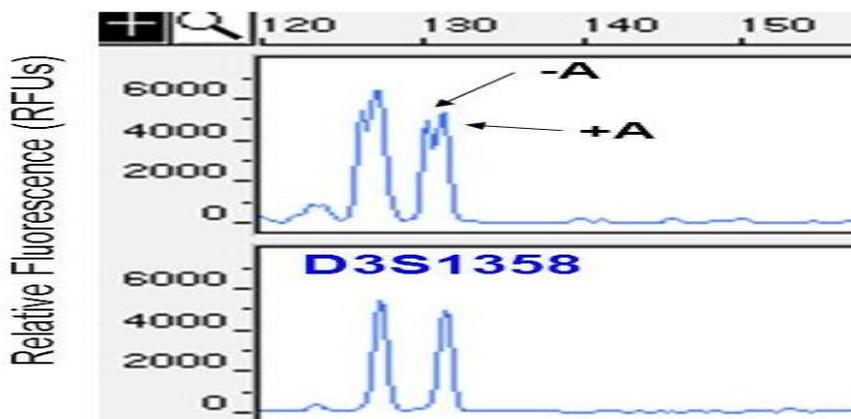


Figure 04 : Pics résultants des additions incomplètes d’Adénine (+A/-A) (Butler, 2005)

- ❖ **Artefacts liés à la technologie :**

- **Pull-up ou blees through:**

Cette forme, se rapporte aux pics qui ne sont pas de vrais allèles, mais plutôt, le résultat d’une mauvaise distinction des couleurs correspondants aux loci amplifié à partir des données brutes sur le GeneMapper (Powerplex, technical Manual, 2014).

- **Dye Blobs :**

Ils se produisent quand les colorants fluorescents se dégagent de leurs amorces respectives et migrent indépendamment par le capillaire. Ces pics sont assez larges et possèdent le spectre d’un des colorants utilisés pour le génotype (Butler, 2010).

- **Spikes :**

Ce sont des artefacts liés au processus d'électrophorèse capillaire, se produisant lors de petit changement dans le voltage du capillaire ou bien par le passage de bulles d'air ou de cristaux qui sont captés comme étant fluorescents, ce qui se traduit par l'apparition de spikes ou de pics inattendus (Powerplex, technical Manual 2014).

- **Alleles hors échelle (Off-Ladder):**

L'allèle hors échelle "Off-Ladder" est désigné par son diminutive "OL" sur un électrophérogramme. Toutefois, il peut représenter une variante peu commune qui ne s'accorde pas avec l'échelle allélique de référence (Taupin, 2008).

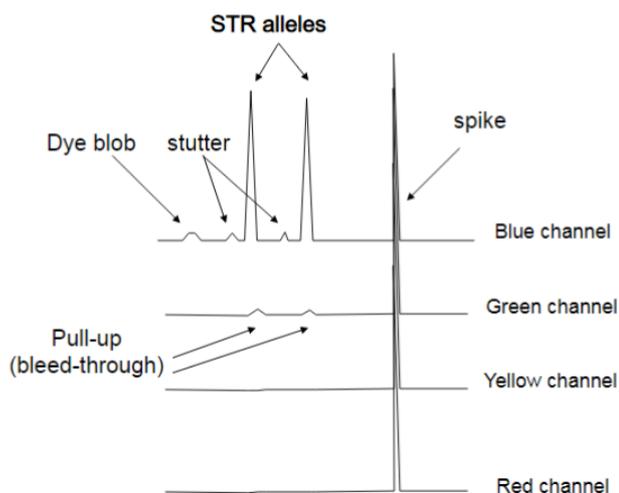


Figure 05 : Electrophérogramme hypothétique montrant certains artefacts potentiels (Butler, 2005).

Matériels et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau de département d'identification Génétique, au sein de la sous-direction de la Police Scientifique et Technique Ben Aknoun, pour une période de cinq mois, de Février à juin 2019.

Notre travail a pour objectif d'obtenir des profils génétiques à partir de traces de sang prélevées sur scènes de crime, dans dix affaires criminelles différentes.

I- Matériel :

I-1 Matériel biologique :

Les traces de sang analysées ont été prélevées sur deux types de supports différents « 23 sortes de vêtements et 8 armes de crime », acheminés au laboratoire d'analyse.

I-1.1 Echantillonnage :

Il s'agit de traces de sang, prélevés à partir des différents supports cités précédemment.

Le prélèvement biologique de référence a été réalisé sur écouvillons stériles.

I-2. Matériels non biologiques :

Les différentes salles, équipements et Réactifs utilisés lors du protocole d'analyse ont été répertoriés dans le tableau I (Annexe 01)

II- Méthodes :

II-1 Nettoyage et préparation de la surface de travail :

Il s'agit d'une étape préparatoire obligatoire avant chaque examen de scellés, et elle consiste en :

- Nettoyage de la paillasse au SDS 0,1%
- Division de la surface de travail en 3 parties distinctes. Figure 01 (Annexe 02)
- Nettoyage du matériel et équipements à utiliser
- Préparation des échantillons sur un papier paillasse (identifier, codifier et photographier chaque échantillon individuellement).

II-2 Recherche des taches suspectes :

- Examen optique

Contrairement aux autres sources biologiques, les caractéristiques du sang par sa coloration rougeâtre et sa brillance sur support métallique est bien mise en évidence par une recherche optique. Cette simple observation convient souvent très bien, à l'exception des cas où le support est foncé.

II-2.1 les tests préliminaires :

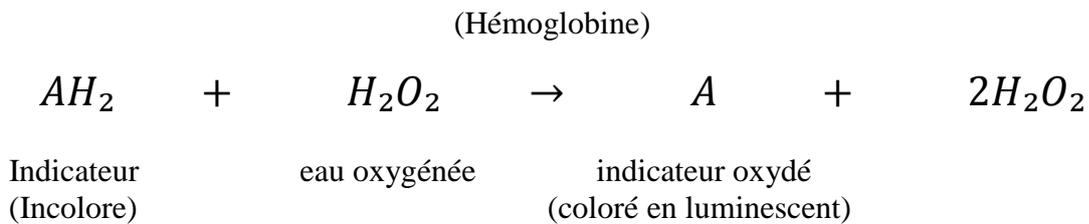
Avant toute étude moléculaire, l'échantillon prélevé sur la scène de crime est révélé par des tests préliminaires appelés « tests indicatifs » ; ce sont des tests de nature chimique permettant d'identifier la nature des traces. Les deux tests principaux utilisés dans cette étude sont le test sérologique Kastel Meyer et le test immunologique OBTI.

II-2.1.1 Le test Kastel Meyer:

Le test de Kastel-Meyer permet de détecter la présence d'hémoglobine. Ce type de test est donc intéressant dans le cadre médico-légal et il est utilisé par les laboratoires de police scientifique pour s'orienter que l'échantillon prélevé c'est du sang (Pillou, 2014).

C'est un test chimique basé sur la réaction d'oxydation avec l'hémoglobine du sang en présence d'un indicateur coloré (Coquoz, 2003).

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



Pour le réaliser il faut créer un réactif composé de :

- 20g de zinc en poudre (Zn)
- 20g de sodium (NaOH)
- 2g de phénolphtaléine
- 100ml d'eau autoclavée

Pour identifier si la tâche retrouvée sur la scène du crime est bien du sang, nous avons réalisé le test de Kastel-Meyer comme suit :

Mettre dans un tube eppendorf :

- L'échantillon à tester
- 2 gouttes KM
- 2 gouttes d'eau oxygénée

➤ Résultats du test Kastel Meyer :

Si le test est positif : Figure 06, (A), un changement de couleur est observé, notamment la couleur rose, due à la présence d'hémoglobine dans le sang, mais si aucun changement n'apparaît, cela signifie que le test est négatif, et qu'il n'existe pas d'hémoglobine dans l'échantillon : Figure 06 (B).



Positif (A)



Négatif (B)

Figure 06 : Résultats du test Kastel Meyer (Originale, 2019)

II-2.1.2 Le test OBTI :

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

Un prélèvement de la trace présumée de sang humain est transféré dans un flacon comprenant un liquide de transport. Ce mélange est ajouté goutte sur l'orifice de la barrette . Un échantillon positif se détecte généralement en 2-5 minutes.

Une ligne rouge unique signifie que le liquide de test fonctionne correctement, mais qu'il n'a pas été détecté de sang humain. Deux lignes rouges/roses signifient que le test a détecté du sang humain (Bluestar Forensic, 2004).

➤ Résultat du test OBTI :



Sang humain (positif) (A)



Sang non humain (négatif) (B)

Figure 07 : Résultat du test OBTI (Blue Forensic, 2004)

II-3 Prélèvement et mise en tube :

Pour une trace de sang, deux types de prélèvements sont utilisés selon la nature du support :

- Prélèvement par écouvillonnage :
Consiste en un frottement de la surface tachetée par un écouvillon humide.

- Prélèvement par découpage :
Découper un petit morceau de la tache de sang avec des ciseaux ou un bistouri, et les prélever à l'aide d'une pince.

Quel que soit le type de prélèvement réalisé, on découpe avec un bistouri stérile la totalité du coton de l'écouvillon ou du tissu prélevé des morceaux pour une mise en tube afin d'effectuer les tests préliminaires ainsi que pour la conservation dans des eppendorfs destinés à l'extraction qui se poursuit avec les autres étapes d'analyse.

Les gants, les bistouris, les coupelles et le papier paillassé sont changés après examen de chaque échantillon.

Tous les eppendorfs mis sur le portoir doivent être marqués et étiquetés (chaque eppendorf avec son échantillon correspondant) ainsi que des eppendorfs vides pour les témoins négatifs à la fin de chaque série d'échantillons qui serviront pour détecter toutes sources de contaminations qui suivront le même cheminement que les échantillons.

II-3.1 Préparation des échantillons :

Les traces de sang analysées ont été recueillies sur deux types de supports ; ceux-ci diffèrent selon la nature de l'affaire traitée par les services de la police scientifique.

Ces supports sont constitués d'une part par différents types de vêtements, et d'autre part, différents types d'armes de crimes. Ces derniers sont résumés dans le tableau suivant (Tableau VI), en fonction du type d'affaire traitée.

Tableau VI : Preparation des échantillons (Original, 2019).

		Prélèvements et mise en tube							
Affaires	Supports des échantillons								
01									
									
	Manteau	T-shirt	Tricot de peau	Chemise	Pantalon			Témoins -	
Code	<i>Ech1.1</i>	<i>Ech1.2</i>	<i>Ech1.3</i>	<i>Ech1.4</i>	<i>Ech1.5</i>				
02									
									
	Tricot de peau (moisi)	Pantalon en denim	Chemise	Veste (moisi et humide)	Training (synthétique)	Couteau			Témoins -
Code	<i>Ech2.1</i>	<i>Ech2.2</i>	<i>Ech2.3</i>	<i>Ech2.4</i>	<i>Ech2.5</i>	<i>Ech2.6</i>			
03									
									
	T-shirt		Couteau						Témoins -
Code	<i>Ech3.1</i>		<i>Ech3.2</i>						
04									
									
	Tricot de peau	Espadrilles en cuir	Body	Mortier	Robe d'intérieur	Tablier de cuisine	Echarpe	Témoins -	
Code	<i>Ech4.1</i>	<i>Ech4.2</i>	<i>Ech4.3</i>	<i>Ech4.4</i>	<i>Ech4.5</i>	<i>Ech4.6</i>	<i>Ech4.7</i>		
05									
									
	Lame de couteau		Manche de couteau				Témoins -		

Code	<i>Ech5.1</i> <i>Ech5.2</i>			
06				
				
	T-shirt	Crand'arret (lame)	Crand'arret (manche)	Témoignage -
Code	<i>Ech6.1</i>	<i>Ech6.2</i>	<i>Ech6.3</i>	
07				
				
	Lange (humide)	Pierre		Témoignage -
Code	<i>Ech7.1</i>	<i>Ech7.2</i>		
08				
				
	T-shirt	Tricot de peau		Témoignage -
Code	<i>Ech 8.1</i>	<i>Ech 8.2</i>		
09				
				
	Couteau	Jean (taché avec de la peinture)		Témoignage -
Code	<i>Ech9.1</i>	<i>Ech 9.2</i>		
10				
				
	Marteau	Veste (humide et moisi)		Témoignage -
Code	<i>Ech 10.1</i>	<i>Ech 10.2</i>		

II-4 Extraction :

La procédure d'extraction peut donc être considérée comme l'une des étapes les plus critiques des manipulations moléculaires auxquelles le matériel de preuve est exposé, car il est impératif que l'intégrité et l'identité de l'échantillon ne soient pas compromises (Xenophontos et al 2015).

II-4.1 Définition :

L'extraction consiste en un traitement chimique des échantillons qui permet de lyser les cellules et solubiliser l'ADN. La purification qui est (souvent) son corollaire permet d'isoler l'ADN solubilisé.

Dans de nombreux laboratoires, l'extraction d'ADN a longtemps reposé sur l'utilisation de méthodes organiques. Ces méthodes ont progressivement laissé place à des solutions commerciales diverses et optimisées pour chaque type d'échantillons (Van Oorschot, 2010).

II-4.2 Principe de la méthode :

L'extraction de l'ADN est réalisée grâce au kit Qiagen, est un système ayant recours à la technologie des membranes de silice pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons biologiques.

L'extraction par Qiagen comprend 4 étapes :

- La lyse des cellules dans l'échantillon de sang
- La fixation de l'ADN génomique du lysat cellulaire à la membrane d'une colonne de silice
- Le lavage de la membrane
- L'élution de l'ADN génomique à partir de la membrane.

L'objectif de l'extraction par Qiagen est de lyser les cellules sanguines par la rupture de la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire des cellules dans des conditions dénaturantes, à température élevée par le tampon ATL et la protéinase K qui dégrade les protéines, l'utilisation des tubes passoirs permet d'éliminer le support et de récupérer uniquement le lysat.

Chaque lysat cellulaire sera ensuite transféré sur une colonne de QIAamp MinElute Column, revêtues d'une matrice de silice qui est capable de fixer sélectivement l'ADN (silice chargée positivement et l'ADN chargé négativement) en condition de forces ioniques élevées. Du tampon AL est d'abord ajouté au lysat pour augmenter l'affinité de l'ADN à la membrane de silice et ensuite, de l'éthanol absolu, solvant neutre qui agit en déshydratants la double hélice d'ADN, entraînant alors sa précipitation. L'ADN génomique est alors adsorbé sur la membrane de silice alors que le lysat passe à travers la membrane sous l'effet d'une dépression ou de la force centrifuge.

Le kit utilisé emploie deux tampons qui permettent de laver l'ADN en éliminant les agents contaminants (ARN, reste de protéines), la solution AW1 rend le milieu défavorable pour l'ADN, forçant l'ADN à se réfugier dans la membrane, et la solution AW2 stabilise les liaisons. L'ADN est ensuite détaché de la colonne (élution) et entraîné par un tampon d'élution AE fourni dans le kit.

Ces différentes étapes sont résumées dans la figure 08 :

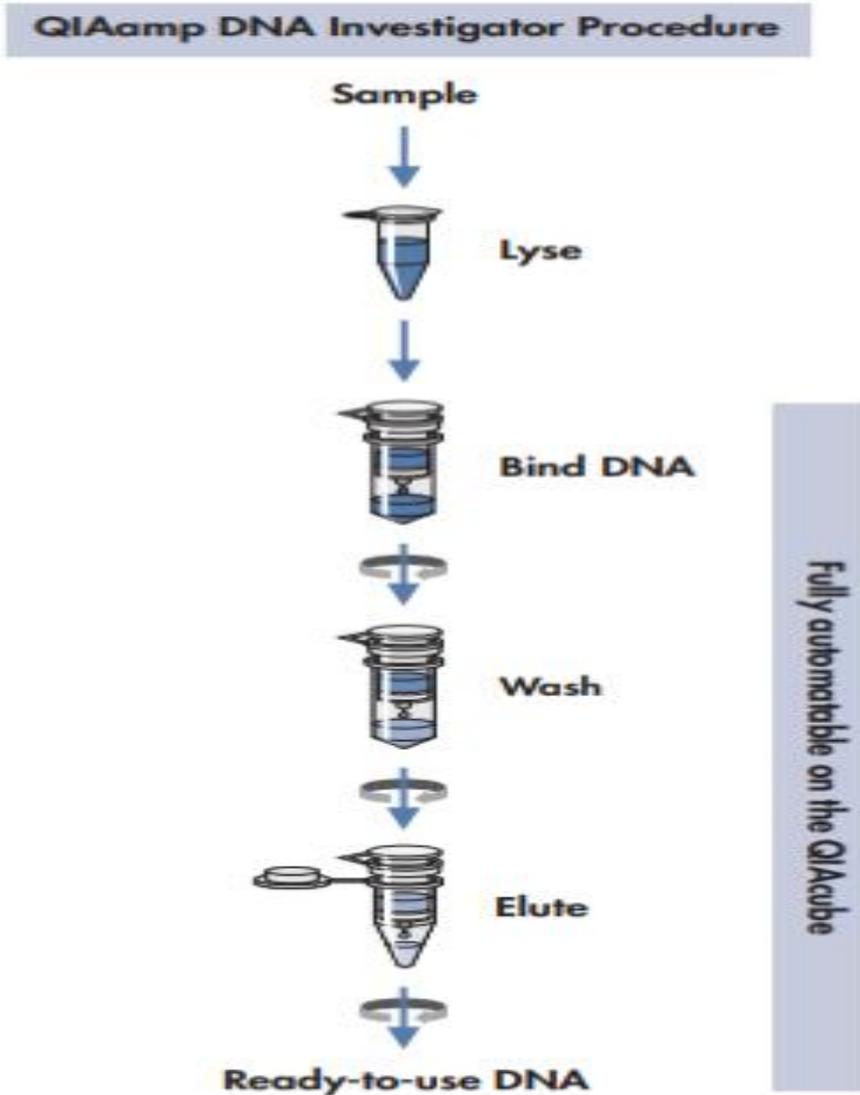


Figure 08 : Extraction de l'Adn grace au kit Qiagen
(QIAamp DNA Investigator Handbook, 2012)

L'interaction avec l'utilisateur est minimale, ce qui permet de manipuler les échantillons potentiellement infectieux en toute sécurité. Les procédures sont conçues pour limiter la contamination croisée d'un échantillon à l'autre. L'ADN purifié est prêt à l'emploi pour

l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou d'autres applications. Il peut également être conservé à une température comprise entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour une utilisation ultérieure.

II-4.3 Composants du Kit d'extraction :

Tableau VII : Composants du kit d'extraction

Buffer ATL (tissue lysis buffer)	1 flacon de 50ml
Buffer AL (lysis buffer)	1 flacon de 33ml
Buffer AW1 (wash buffer1)	1 flacon de 19ml
Buffer AW2 (wash buffer2)	1 flacon de 13ml
Buffer ATE (elution buffer)	1 flacon de 20 ml
Proteinase K solution	1 tube de 1.25ml
Carrier RNA	1 tube de 310 μg
QIAamp MinElute Column	50 colonnes
Collection tube	50 tube de 2ml

II-4.4 Processus opératoire :

Préparation de la solution de lyse :

Tampon ATL	300 μL de tampon ATL \times le nombre d'échantillons
AL	300 μL de tampon AL \times le nombre d'échantillons
PK	20 μL de PK du kit \times le nombre d'échantillons

1) La lyse cellulaire :

- Dans un tube de 2ml, immerger un échantillon de 0.5cm² dans 300 μl de tampon ATL et 20 μl de PK du Kit.
- Vortexer pendant 10 secondes et incuber pendant 1h à 56 $^{\circ}\text{C}$ avec une agitation de 900rpm, en absence de bloc chauffant avec agitateur, faire agiter les échantillons pendant 10 secondes chaque 10 minutes.
- Centrifuger quelques secondes pour faire tomber les gouttelettes accumulées dans le couvercle d'eppendorf
- Passer l'échantillon en tube passoire pour récupérer le lysat.
- Ajouter 300 μl de tampon AL et vortexer pour bien mixer pendant 10 secondes.
- Incuber pendant 10min à 70 $^{\circ}\text{C}$ sur le bloc chauffant avec agitateur de 900rpm, en absence de bloc chauffant avec agitateur, faire agiter les échantillons pendant 10 secondes chaque 3min.

2) La purification :

- Préparation de la solution de purification :

150µl d'éthanol absolu × le nombre d'échantillons

- Centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttelettes et ajouter 150µl d'éthanol absolu.
- Vortexer pendant 15 secondes, centrifuger brièvement et déposer le tout doucement au centre d'une colonne QIAamp MinElute column, préalablement identifiée sans toucher la membrane avec le cône de la pipette.
- Centrifuger pendant 1min à 8000rpm.

3) Lavages :

Préparation de la solution de lavage :

500µl de tampon AW1 × le nombre d'échantillons

700µl de tampon AW2 × le nombre d'échantillons

700µl d'éthanol absolu × le nombre d'échantillons

- Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 500µl de tampon AW1.
- Centrifuger pendant 1min à 8000rpm.
- Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAamp MinElute column dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 700µl de tampon AW2.
- Centrifuger 1min à 8000rpm.
- Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAamp MinElute column dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 700µl d'éthanol absolu.
- Centrifuger pendant 1min à 8000rpm.
- Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAamp MinElute column dans un nouveau tube de 2ml.
- Centrifuger pendant 3min à 14000rpm.
- Placer la colonne QIAamp MinElute column dans un nouveau tube de 1,5ml, stérile préalablement identifié, ouvrir le couvercle de la colonne et laisser sécher à température ambiante pendant 10min ou à 56°C pendant 3min.

4) Elution :

- Préparation du tampon d'éluion

~35µl de tampon ATE × le nombre d'échantillons

- Ajouter 20 à 50µl du tampon ATE, ou bien de l'eau distillée, fermer le capuchon de la colonne.
- Incuber pendant 1min à température ambiante, centrifuger pendant 1min à 14000rpm pour récupérer l'extractum. Jeter la colonne.
- Conserver les tubes d'ADN à -20°C.

III- La quantification :

III-1 Définition :

Après l'extraction de l'ADN une mesure précise de la quantité de l'ADN est nécessaire, car l'addition d'un surplus ou pas assez d'ADN à une réaction d'amplification peut affecter les résultats et fausser l'interprétation des profils génétiques obtenus. Elle nous permet 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.

La technologie PCR en temps réel (ou QPCR pour Quantitative PCR) a connu un essor considérable au cours de ces dernières années, 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, en observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle (Poitras et Houde, 2002).

Trois phases peuvent être identifiées sur la courbe :

- Une phase exponentielle : une fluorescence est détectée et son augmentation est proportionnelle à l'augmentation du produit PCR.
- Une seconde phase linéaire : certains composants ne se trouvent plus en quantité suffisante pour continuer la réaction.
- Une dernière phase plateau : le signal émis et la concentration d'amplicons restent constants (Pascal, 2007).

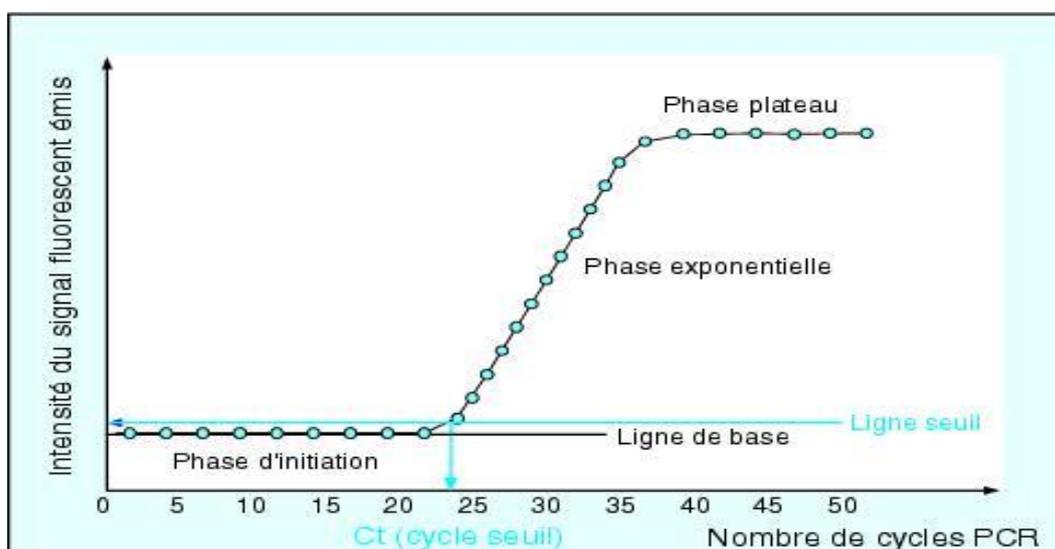


Figure 09 : Evolution de la quantité d'amplicons en fonction du nombre de cycles (Pun et al, 2008).

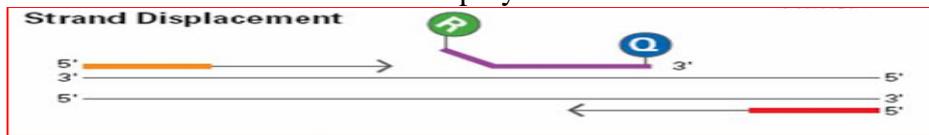
III-2 La chimie TaqMan :

Cette chimie permet d'obtenir un signal fluorescent à partir d'une sonde bi-marquée et dont l'augmentation de fluorescence est proportionnelle au produit de PCR. Elle est appelée chimie Taqman et la sonde est appelée « sonde Taqman ». Le principe de cette chimie repose sur la fonction exonucléase 5'—3' de la Taq polymérase. La sonde est un oligonucléotide spécifique d'un morceau interne à la séquence amplifiée. La sonde est marquée en 5' par un fluorophore appelé "reporter" et en 3' par un autre type de fluorophore appelé "quencher". L'émission du reporter est atténuée ou "quenchée" par la proximité du quencher. Si la sonde est dégradée par l'activité exonucléase de la Taq polymérase, les fluorophores ne seront plus reliés entre eux et l'émission du reporter sera augmentée. L'augmentation du signal correspondant à la composante du fluorophore reporter est proportionnel au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR (Généthon, 2001).



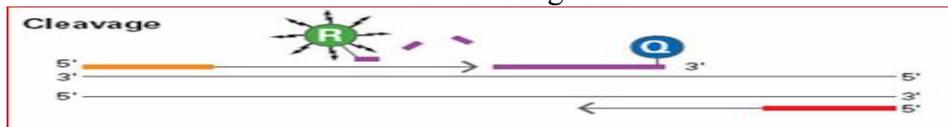
Durant la PCR la sonde TaqMan s'hybride spécifiquement à une séquence complémentaire. L'émission du reporter est atténuée par le quencher

A. La polymérisation



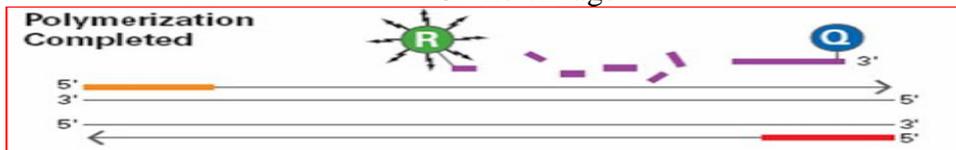
L'élongation par la Taq polymérase jusqu'à arriver à la sonde

B. L'élongation



Au cours de l'élongation catalysée par la taq polymérase l'activité 5' nucléase coupe la sonde. Le clivage sépare le colorant reporter du quencher. Ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence du reporter.

C. Le clivage



D. L'achèvement de la polymérisation

Figure 10 : Schéma explicatif du principe de la sonde Taq Man (Quantifiler Kit, Guide User Manual, 2012)

III-3 composants du kit de quantification :

Tableau VIII : Réactifs du Kit Quantifiler Human

	Primers	DNA standard	Reaction Mix
Composants	- Amorces - Sonde Taq Man - IPC	ADN purifié à 200ng/ml	-Taq poluymérase gold -dNTP -Tampon Mg2+
Quantité	03 tubes de 1.4 ml	01 tube de 120 µl	01 flacon Mg2+
Condition de stockage	-20°C	-20°C	+4°C

III-4 Processus opératoire :

III-4.1 Dilution des standards :

Avant de répartir les échantillons dans la plaque optique de 96 puits compatible avec le thermocycleur 7500 d'Applied Biosystems, une série de 8 dilutions doit être préparée à partir d'une solution mère d'ADN standard (200ng/µl). Ces dernières sont utilisées pour tracer la courbe d'étalonnage qui sert comme une référence pour le logiciel pour calculer la quantité des extraits des échantillons.

Le dernier puits de la plaque a été réservé pour le témoin négatif de la quantification (ne contenant que le master mix et l'eau ultra pure). Le témoin négatif a été traité de la même façon qu'un échantillon ADN.

Tableau IX : La dilution des 08 standards de la quantification d'ADN

Indice de dilution	Volume du standard	Quantité d'ADN
<u>1/4</u>	Tube 1 : Std 1 : 30µl eau pure + 10µl DNA standard	50,0 ng
<u>1/3</u>	Tube 2 : Std 2 : 10µl std1 + 20µl eau pure	16,7 ng
<u>1/3</u>	Tube 3 : Std 3 : 10µl std2 + 20µl eau pure	5,56 ng
<u>1/3</u>	Tube 4 : Std 4 : 10µl std3 + 20µl eau pure	1,85 ng
<u>1/3</u>	Tube 5 : Std 5 : 10µl std4 + 20µl eau pure	0,62 ng
<u>1/3</u>	Tube 6 : Std 6 : 10µl std5 + 20µl eau pure	0,21 ng
<u>1/3</u>	Tube 7 : Std 7 : 10µl std6 + 20µl eau pure	0,068 ng
<u>1/3</u>	Tube 8 : Std 8 : 10µl std7 + 20µl eau pure	0,023 ng

Après la dilution des 8 standards, ces derniers sont déposés dans la première colonne de la plaque, suivi par les extractums de nos échantillons.

Tableau X : Le plan de dépôt des échantillons dans la plaque de quantification

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 1	Ech1.1	Ech2.4	Ech4.4	Ech6.3	Ech10.2						
B	Std 2	Ech1.2	Ech2.5	Ech4.5	Ech7.1							
C	Std 3	Ech1.3	Ech2.6	Ech4.6	Ech7.2							
D	Std 4	Ech1.4	Ech3.1	Ech4.7	Ech8.1							
E	Std 5	Ech1.5	Ech3.2	Ech5.1	Ech8.2							
F	Std 6	Ech2.1	Ech 4.1	Ech5.2	Ech9.1							
G	Std 7	Ech2.2	Ech 4.2	Ech6.1	Ech9.2							
H	Std 8	Ech2.3	Ech4.3	Ech6.2	Ech10.1			T+				T-

III-4.2 Préparation du Mix :

Après avoir préparé la gamme des standards, 12.5µl du mélange réactionnel et 10.5µl du primer qui sont les deux composants du Master Mix pour chaque échantillon ont été ajoutés à un tube eppendorf de 2ml en prenant en considération tous les échantillons. Donc le volume total se calcule par 23µl du Mater Mix (×) (29) échantillons.

Tableau XI : Calcul du volume total du Mix

PCR Reaction Mix	Primer	Volume total
12.5µl	10.5µl	$(12.5\mu\text{l}) \times (n) + (10.5) \times (n)$ n : Nombre total des échantillons = ((29 échantillons) + (8 standards) + (1 témoin négatif) + (1 témoin positif)) $V \text{ total} = (12.5 \times 39) + (10.5 \times 39) = 897\mu\text{l}$

Volume total dans chaque puits : 23µl du Mix plus 02µl de chaque extractum (produit final de l'extraction contenant l'ADN) est égale à 25µl.

Après le dépôt du Mix et les échantillons nous scellons toute la plaque (A1-H12) par un film adhésif transparent, et nous centrifugeons pendant 30 secondes à 13000rpm pour faire descendre les gouttelettes en haut de tube et ajuster les volumes.

Finalement, nous mettons la plaque dans le Thermocycleur 7500 qui est allumé préalablement, à l'aide d'un support compatible avec cet instrument et nous lançons l'appareil.

III-4.3 La dilution de la quantité d'ADN :

Après la quantification, il faut normaliser la concentration de l'ADN contenu dans un volume bien déterminé (l'extractum) à une concentration recommandée par le kit de PCR en utilisant une dilution avec de l'eau ultra pure de façon à obtenir une concentration qui varie entre (0.1-0.125) ng/µl.

IV- Amplification de l'ADN par PCR :

Le principe de la PCR ou réaction de polymérisation en chaîne est l'amplification en grand nombre de l'ADN cible initialement extrait.

La PCR utilisée est une PCR multiplex permettant d'étudier plusieurs STR simultanément en utilisant plusieurs amorces spécifiques dans différentes régions d'intérêt (Mansuet-lupo et al, 2007).

La PCR effectuée au laboratoire est réalisée avec le Kit **AmpF Φ STR® Identifier® Plus** qui permet l'amplification simultanée et la détection de 15loci STR de tétranucléotides ainsi que l'amélogénine, marqueur déterminant le sexe. Il comprend une formulation de tampon améliorée et un protocole de cyclage PCR optimisé augmentant la sensibilité, il offre également une meilleure tolérance aux inhibiteurs de la PCR et améliore les performances des échantillons de mélange. Avec des séquences à partir d'extractums entre [0.01- 0.125ng/µl], par un thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 en une unique réaction de 28 cycles.

Les loci amplifiés, leurs emplacements chromosomiques et les colorants des marqueurs fluorescents correspondants sont répertoriés dans le tableau II de l'annexe 3.

IV-1 Composants du Kit :

Le kit Identifier plus (destiné pour 200 réactions) est composé de :

Pour la pré-amplification :

Tableau XII : Composants du kit Identifier plus

Contenus	Volumes	Composants
Master Mix	2 tubes, 1.0 ml/tube	Taq polymérase, Mg ²⁺ , dNTP, 0.04% d'azoture de sodium
Primer set	1 tube, 1.0 ml	Contient les amorces directes et inverses à amplifier, cibles d'ADN humain, des amorces marquées par fluorescence et des amorces non marquées.

IV-2 Processus opératoire :

- Les échantillons doivent être dilués de façon à avoir une concentration optimale pour les normes de la PCR.
- Remplir le formulaire de suivi amplification, vérifier la codification des portoirs, eppendorfs, et faire les calculs des volumes des réactifs nécessaires au nombre d'échantillons, témoin (positif et négatif), et les erreurs de pipetage.
- Les tubes des réactifs contenant Master Mix et les primers sont vortexés pendant 5 à 10 secondes en prenant la précaution de ne pas les centrifuger pour éviter leur concentration au fond du tube).
- Agitation des tubes d'ADN à amplifier ainsi que les témoins positifs et négatifs.
- Préparation du mix dans un eppendorf, agitation au vortex et centrifugation du tube.
- Répartition de 15ul de ce mix dans chaque puits en se référant au plan de dépôts.
- Addition de 10ul de chaque échantillon dans son puits en suivant l'ordre de dépôt.
- Même procédé pour les témoins positifs et négatifs, recouvrir fermement la plaque avec une feuille d'aluminium, placer la plaque dans le thermocycleur 9700ABI.

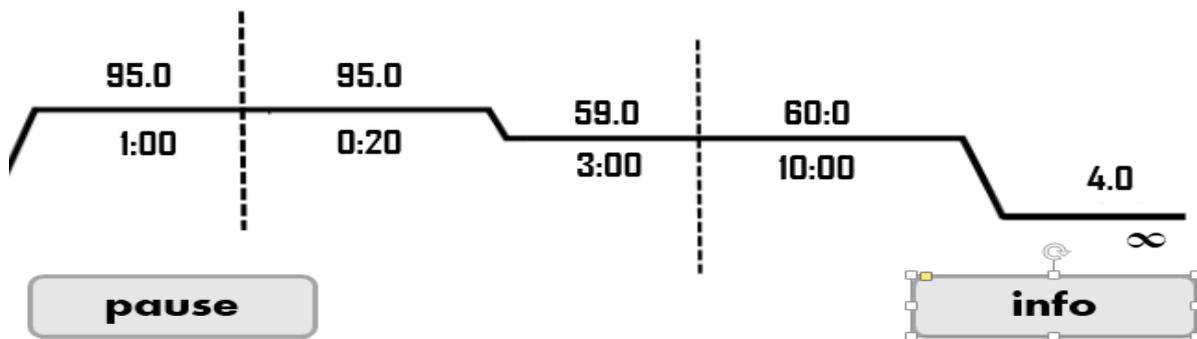


Figure 11 : Protocole de travail du thermocycleur 9700ABI

(Manuel du Thermocycleur9700ABI, 2010)

Le thermocycleur est programmé pour exécuter 28 cycles d'amplification selon 3 étapes :

- 1- Dénaturation à 95°C, durant 1min pour la séparation des deux brins d'ADN suite a hydrolyse des liaisons d'hydrogènes
- 2- L'élongation qui nécessite deux phases :
 - Phase 1 : s'effectue à une température de 94°C pendant 20 secondes
 - Phase 2 : s'effectue à 59°C pendant 03 minutes.
- 3- La terminaison, qui s'effectue à 60°C pendant 10 minutes suivant d'un refroidissement à 04°C

V- Post PCR :

Elle consiste en la dénaturation des fragments d'ADN amplifiés par PCR. Elle est essentielle pour la migration en électrophorèse capillaire, ainsi que la préparation du mélange réactionnel nécessaire pour l'analyse électrophorétique.

V-1 Composants du Kit pour la Post PCR :

Pour le kit Identifier™, le panel de standards requis pour l'amplification PCR, le dimensionnement du produit PCR et le génotypage est le suivant :

Tableau XIII : Composants du kit pour la post PCR

Contenus	Volumes	Composants
Control DNA 9947A	1 tube, 0.3 ml	Un contrôle positif correspondant à un profil connu permettant d'évaluer l'efficacité de l'étape d'amplification et le génotypage des STR à l'aide de l'échelle allélique AmpFISTR™ Identifier™
Standard de taille GeneScan 500 LIZ™	1 tube, 0.3 ml	Ces standards, qui ont été évalués en tant que standards de taille interne, donnent des résultats de dimensionnement précis. (nombre de répétitions du motif en paires de bases)
Identifier Plus Allelic Ladder	1 tube, 0.05 ml	La caractérisation précise des allèles amplifiés, contient la plupart des allèles rapportés pour les 16 marqueurs permettant l'identification des allèles

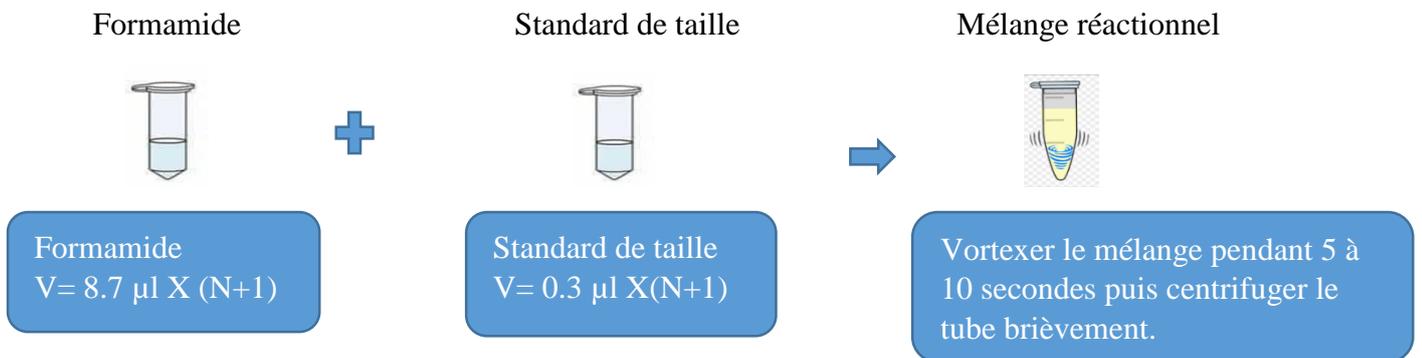
Composants supplémentaires pour la post PCR :

- Le formamide : agent dénaturant pour maintenir l'ADN dénaturé sous forme monobrin
- L'eau ultra pure : contrôle négatif pour témoigner en cas de contamination

V-2 Processus opératoire :

Le plan de dépôt post amplification est d'abord rempli en se référant au plan de dépôt de l'amplification, puis calculer les volumes des différents réactifs nécessaires au mélange en remplissant le formulaire de suivi post-amplification, ensuite récupérer la plaque du thermocycleur et préparation d'une autre plaque à puits.

-Préparation du mélange (standard de taille/Formamide) dans un tube selon les volumes préalablement calculés :



- Répartir 9 μl du mélange réactionnel dans les puits des échantillons et ladder.
- Déposer 3 μl d'échantillon
- Déposer 1.5 μl de ladder
- Déposer 1.5 μl des contrôles positifs
- Déposer 1.5 μl des contrôles négatifs

En suivant l'ordre de dépôt selon le schéma suivant

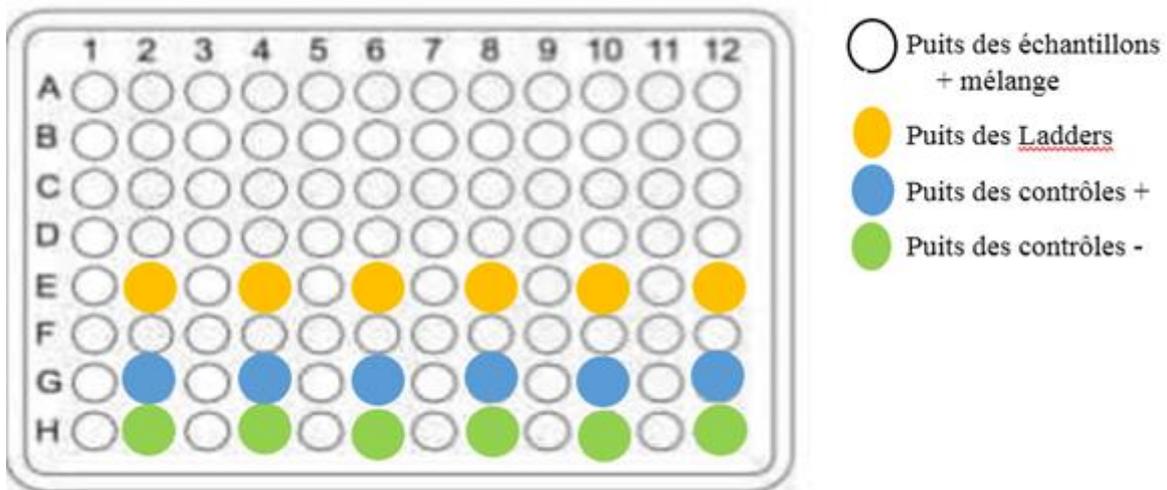


Figure 12 : Répartition des échantillons

- Bien fixer à plat un septa strip (propre et sec sur la plaque d'échantillons).
- Centrifugation de la plaque pour l'élimination des bulles d'air
- Déposer la plaque dans un thermocycleur réglé sur le programme de dénaturation 3 minutes à 95°C
- Placer immédiatement la plaque sur un cryobloque à glace à -20°C pendant 3 minutes
- Mettre la plaque sur son support
- Centrifuger la plaque pendant 3 minutes à 1000 tours/minute en vérifiant l'absence de bulles d'air
- Mettre la plaque sur son support et la placer la plaque sur le séquenceur 3130XL Genetic analyser.

VI. Electrophorèse capillaire :

Les produits de post-amplification sont soumis à une électrophorèse capillaire. Le séquenceur utilisé dans ce travail est le 3130XL Genetic analyser, comprenant 16 capillaires (36cm/50um), les capillaires sont recouverts d'un polyamide opaque sauf pour la région de détection et remplis d'un polymère POP4 (Performance optimized polymer 4), qui exerce un effet de tamisage moléculaire.

Les fragments d'ADN étant chargés négativement sous l'action d'un champ électrique appliqué à une haute tension (3000 volts), vont migrer de la cathode vers l'anode du circuit électrique. Il y'a une séparation électrophorétique des fragments d'ADN, les petites molécules d'ADN migrent en premier par rapport aux grosses molécules, en quelques minutes.

Au passage des fragments d'ADN devant la fenêtre de détection présente sur le capillaire, un laser à argon du séquenceur va exciter les fluorochromes en les bombardant, ceux-ci vont émettre une fluorescence spécifique caractérisant un panel de marqueurs (l'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la taille des fragments d'ADN séparés, les cinq fluorochromes utilisés dans le kit d'amplification sont : le 6-FAM™, VIC™, NED™ et PET™, le cinquième est le LIZ™ pour le standard de taille (Rao-Coticone et al., 2003),

chacun de ces marqueurs fluorescents a un maximum d'émission à une longueur d'onde spécifique, le colorant 6-FAM émet à la longueur d'onde la plus courte et est montré en bleu, suivi du colorant VIC (vert), NED (jaune), PET (rouge) et le LIZ (orange).

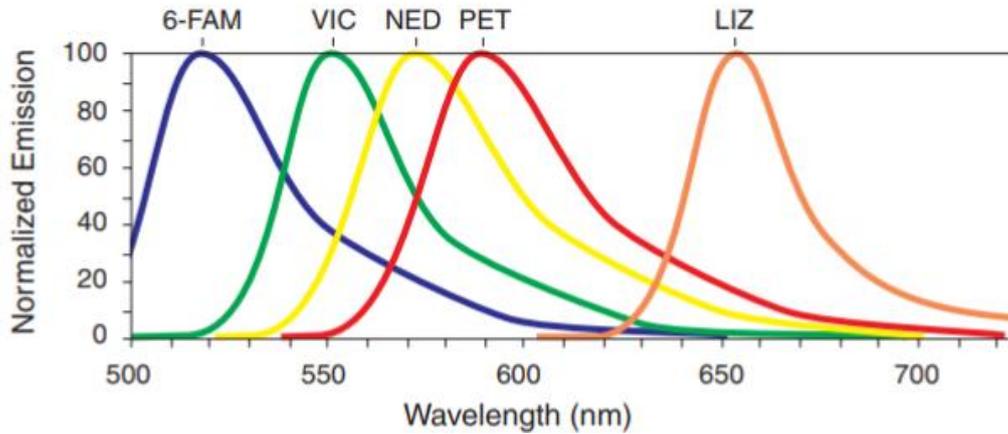


Figure 13 : les cinq fluorochromes utilisés dans le kit d'amplification (Coquoz, 2003)

Les signaux de fluorescences sont alors récupérés au niveau d'une cellule de détection (une lentille concave appelée spectrographe) située à distance variable (selon la taille des capillaires) de la zone de dépôt qui va décomposer pour chacun des capillaires la fluorescence entre 500 et 700 nm et diriger chaque faisceau en direction de la caméra CCD (Charge-Coupled Device) qui est une puce en silicium composée de milliers de cellules photoélectriques (pixels). Chacun de ces pixels va accumuler une charge électrique proportionnelle à l'intensité de la fluorescence émise. Pour être analysées, ces données sont collectées, traduites et validées par un logiciel performant Data collection ou gène mapper IDv3.2 pour l'obtention d'un profil génétique.

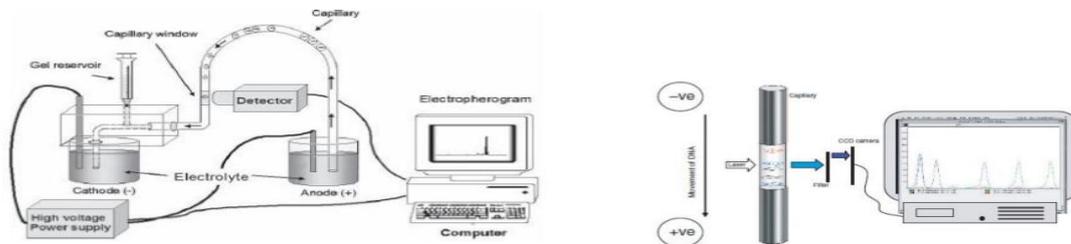


Figure 14 : Déroulement de l'électrophorèse capillaire (Walker et Rapley, 2008)

Les résultats obtenus, après analyse du polymorphisme des STR, et traitement par un logiciel (geneMapper ID v3.2), pour un individu sont constitués de deux chiffres correspondant aux deux allèles hérités des parents, et cela pour chaque système. Une empreinte génétique ou profil génétique est donc constituée d'une série de chiffres, qui seront ensuite reproduit sur un tableau.

VII. Validation des profils génétiques :

Les données collectées sont traitées par le logiciel « Gene Mapper I-DX », qui permet d'assigner une taille aux fragments identifiés en les comparant avec le standard de taille puis identifier chaque groupe d'allèles en le comparant avec le Ladder. Le résultat génère un électrophérogramme (profil génétique) comportant plusieurs pics correspondant aux allèles détectés.

La validation des résultats se fait selon les étapes suivantes :

1. Assemblage des données.
2. Identification des pics.
3. Détermination de la taille des molécules.
4. Séparation par couleurs (fluorochrome)
5. Comparaison au Ladder allélic.
6. Attribution de la nomenclature de chaque allèle.
7. Validation des profils obtenus par une analyse.

La validation d'un profil génétique est tributaire de la vérification d'un certain nombre de critères tels que : la migration du standard de taille et le Ladder, le profil des témoins positif et négatif, l'observation de l'allure générale des allèles (hauteur des pics, seuil d'acceptabilité).

Ce n'est qu'à l'issue de la validation de ces critères que le résultat peut être exploité.

Résultats

I- Résultats de la quantification :

I-1 Les conditions du processus de travail du thermocycleur 7500 Fast sont :

La PCR quantitative exige deux étapes qui sont précédées par une phase d'incubation initiale à 95°C pendant 10 minutes pour activer la polymérase.

- **Etape 1** : dénaturation des deux brins d'ADN a une température de 95°C durant 15secondes.
- **Etape 2** : hybridation et élongation à une température de 60°C durant une minute, Après 40 cycles s'effectue la collecte de la fluorescence

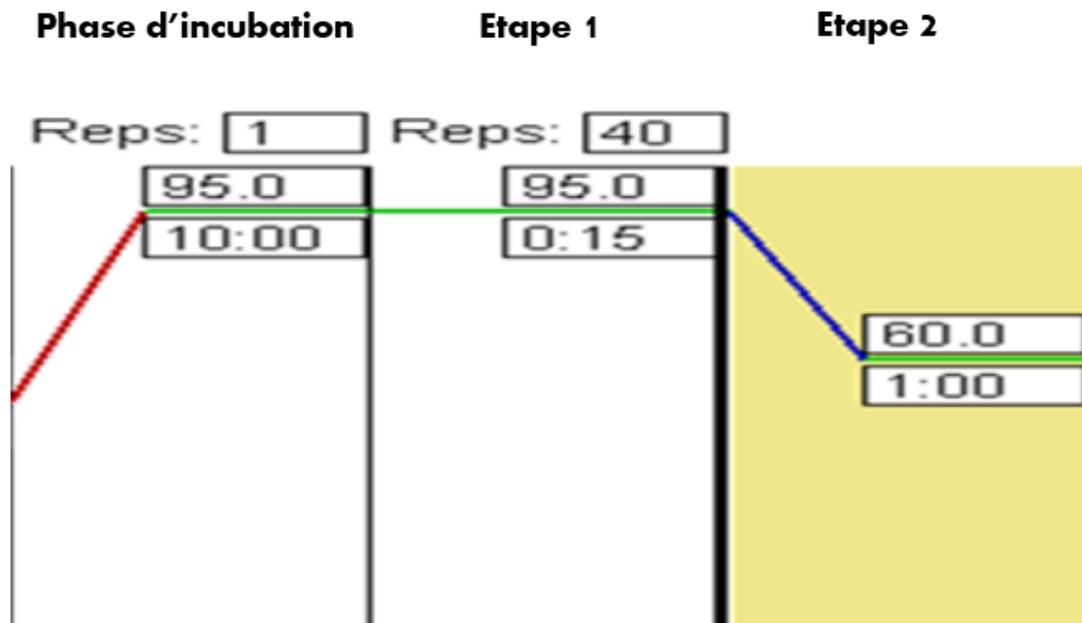


Figure 15: Protocol du thermocycleur 7500Fast Real-Time PCR system

I-2 Courbe standard :

Pour le suivi de l'amplification par la PCR en temps réel des échantillons d'ADN, il est nécessaire de tracer à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN dans les différentes dilutions et de mesurer ainsi la concentration en (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 absence ou présence d'inhibiteurs.

Une série de dilutions d'ADN standards à concentrations connues 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 décimal (log10) de la concentration en ADN après amplification de la série des dilutions standards.

Résultats

Cette droite est à la base de la quantification d'échantillons de concentrations inconnues : en reportant le Ct obtenu pour ces échantillons inconnus sur la droite standard, on obtiendra la concentration en molécules cibles correspondantes.

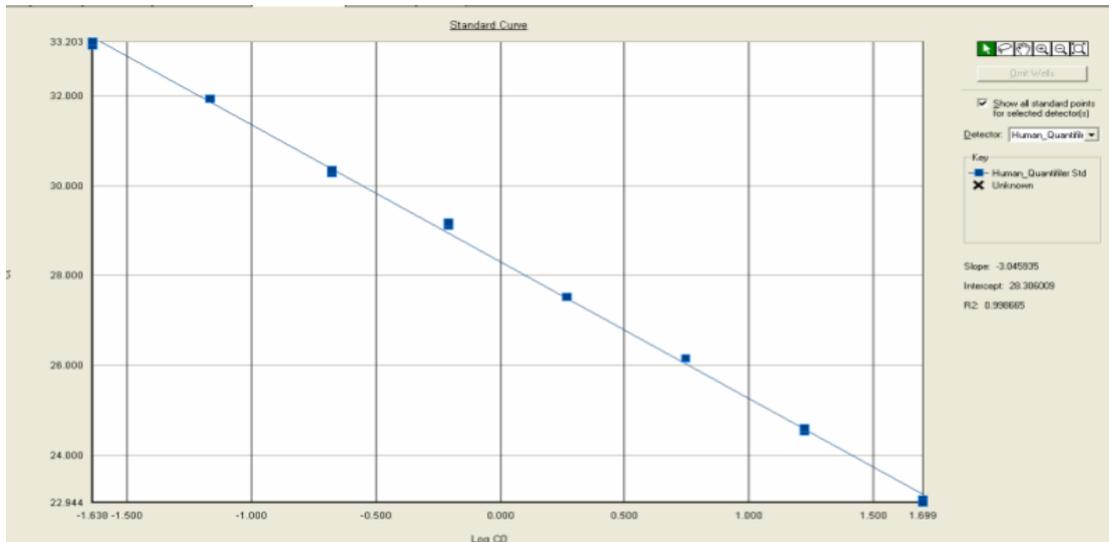


Figure 16: Courbe standard tracée à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN dans les différentes dilutions

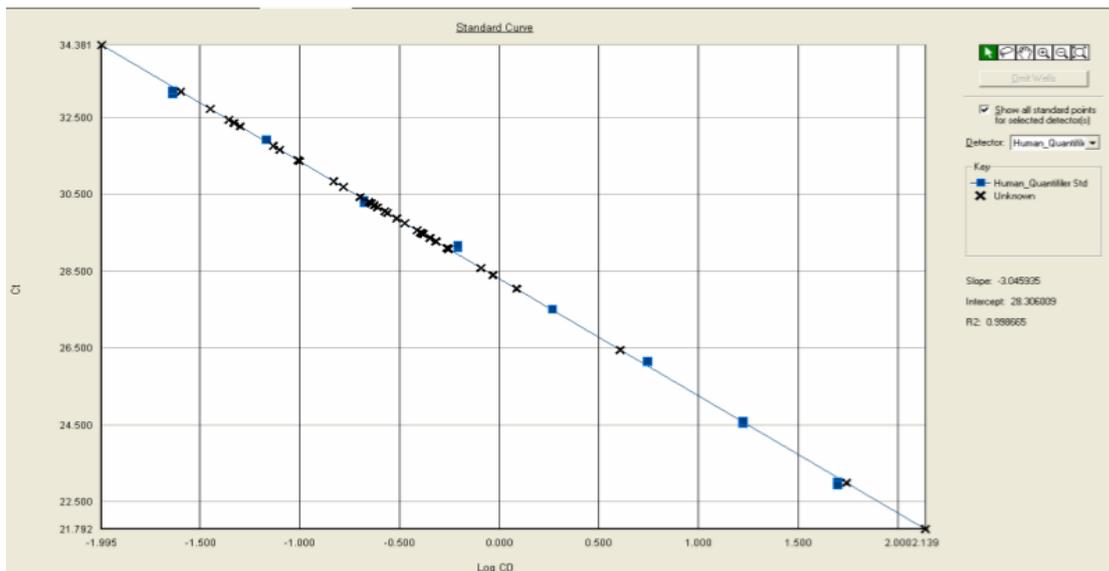


Figure 17 : Représentation des échantillons sur la courbe standard

La courbe standard (figure 16), est tracée à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN, conformément aux recommandations d'Applied Biosystem.

I-3 Résultats de quantification des échantillons :

La quantité des échantillons obtenus varient de 0,004 à 18,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Selon le fournisseur, la quantité optimale pour le kit AmpFISTR Identifier et le thermocycleur AmpPCR system 9700 d'Applied Biosystem est comprise entre (0,01-0,125) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Cependant les échantillons présentant une quantité d'ADN supérieure aux normes, ont procédé à des dilutions, alors que ceux présentant une quantité inférieure à 0.01µg/µl ne passe pas (Npp) pour un profilage d'ADN mentionnés en NPP dans le tableau lignes oranges (Tableau XV).

La quantité utilisée d'ADN peut aussi influencer sur le résultat d'amplification, une quantité insuffisante d'ADN ne permet pas d'obtenir d'amplification, alors qu'une quantité trop importante d'ADN peut inhiber la réaction (Vroh et al. 1997).

Tableau XVI : Résultats de quantification, dilution et profils obtenus pour chaque échantillon. (Original, 2019)

Numéros d'affaires	Numéros d'échantillons	Quantité d'ADN en µg/ul	Dilution : ADN en (µg) /eau pure en (µl)	Types de profils génétiques obtenus
01	Ech 1.1	18,9	1/189	Complet
	Ech 1.2	3	1/30	Complet
	Ech 1.3	4,41	1/44	Complet
	Ech 1.4	5	1/50	Mélange
	Ech 1.5	4,64	1/46	Complet
02	Ech 2.1	3,67	1/36	Complet
	Ech 2.2	3,03	1/30	Complet
	Ech 2.3	4,17	1/41	Mélange
	Ech 2.4	5,6	1/56	Mélange
	Ech 2.5	5	1/50	Complet
	Ech 2.6	3	1/30	Complet
03	Ech 3.1	18,2	1/182	Complet
	Ech 3.2	15	1/150	Complet
04	Ech 4.1	18,4	1/ 184	Complet
	Ech 4.2	3	1/30	Complet
	Ech 4.3	15	1/150	Complet
	Ech 4.4	4.6	1/46	Complet
	Ech 4.5	9,2	1/92	Complet
	Ech 4.6	12,99	1/130	Complet
	Ech 4.7	26,3	1/263	Complet
05	Ech 5.1	0,02 (pure)		Complet
	Ech 5.2	0,85	1/8	Null
06	Ech 6.1	5	1/50	Complet
	Ech 6.2	0.03 (pure)		Complet
	Ech 6.3	4	1/40	Complet
07	Ech 7.1	0,03 (pure)		Partiel
	Ech 7.2	0,02 (pure)		Mélange
08	Ech 8.1	1.5	1/15	Complet
	Ech 8.2	1.2	1/12	Complet
09	Ech 9.1	0.0018 (Npp)		
	Ech 9.2	0.004 (Npp)		
10	Ech 10.1	0.0020 (Npp)		
	Ech 10.2	0.0012 (Npp)		

Les quantités et le profilage d'ADN obtenus varient d'un échantillon à l'autre. La récupération de traces d'ADN dépend de nombreux facteurs, tels que : La nature du substrat sur lequel l'ADN a été récupéré (Meakin et Jamieson 2013), (Daly et al 2012).

II) Interprétation des profils génétiques (empreinte génétique) :

Afin de déterminer les allèles présents dans un échantillon, l'analyste utilise un graphique appelé électrophorègramme (epg), mesurant les réponses en unités de fluorescence relative (RFU). L'epg représente les amplicons d'ADN séparées qui sont produites après le processus d'amplification de l'échantillon d'origine (Cowell et al 2007). Le premier résultat de l'analyse qui apparaît sur l'écran de l'ordinateur ne donne pourtant pas directement le profil génétique proprement dit, mais des résultats bruts qui nécessitent un traitement et une analyse grâce à un logiciel informatique : Gene Mapper® ID X.

D'une manière générale, un profil génétique est représenté par un électrophorègramme sous forme d'une série de pics, chacun d'eux correspondant à un allèle d'un locus déterminé ces allèles sont désignés par rapport à une échelle allélique qui permet d'attribuer le nombre de motifs répétés pour chaque locus analysé. Une autre donnée est conférée à chaque allèle observé, correspondant à la hauteur du pic qui est mesuré en RFU (Relative Fluorescence Unit). Cette valeur est relative à l'intensité de fluorescence émise grâce au nombre de fragments générés par l'amplification de chaque locus (Butler, 2011), (Butler 2005).

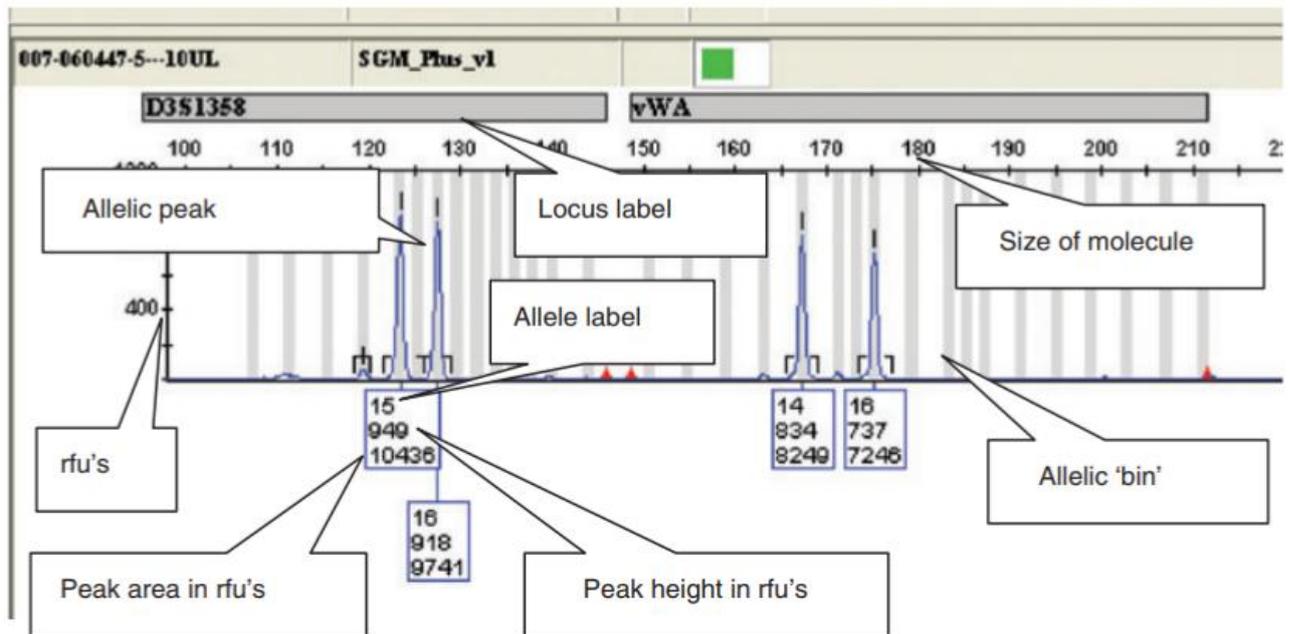


Figure 18: Un électrophorègramme d'un profil ADN (Jamieson, 2016)

Les loci sont identifiés par les cases grises, indiqués sur l'epg : étiquette du locus « locus label ». Les bandes verticales grises sont appelées "bin" et correspondent à l'échelle allélique qui permet d'attribuer à chaque STR un numéro allélique.

Dans l'epg, chaque graphique a deux axes :

-L'axe horizontal (axe des abscisses), qui indique la taille du fragment amplifié par PCR, qui apparaît. Les plus petites molécules d'ADN traversent d'abord la colonne et apparaissent donc à gauche du graphique par rapport aux molécules les plus lourdes à droite.

-L'axe vertical (axe des ordonnées) est une mesure de l'intensité du signal fluorescent, donc la quantité de fragments détectés en RFU.

Des étiquettes ou des noms les identifiant ont été attribuées aux loci et aux allèles qui nous permettent de voir les différences entre les profils individuels. Lorsqu'il y a présence de deux allèles à un locus, ce locus est dit hétérozygote et la personne est hétérozygote à ce locus. Lorsque les deux allèles sont identiques, la personne est homozygote à ce locus.

Les profils génétiques ne seraient finalement validés que si le ladder et les différents témoins (positifs et négatifs) utilisés avaient donné des résultats conformes. L'échelle allélique est analysée de la même manière et en même temps que les échantillons d'un lot, pour fournir une mesure de la position de chaque taille de molécule d'ADN allèle dans un lot d'échantillons.

Le logiciel connaît la position de chaque composant de l'échelle et peut donc créer une mesure par rapport à laquelle il peut positionner les allèles inconnus à partir d'échantillons. Habituellement, le logiciel nécessite l'identification de l'échantillon de l'échelle allélique afin qu'il sache quel échantillon utiliser comme référence de taille d'allèle.

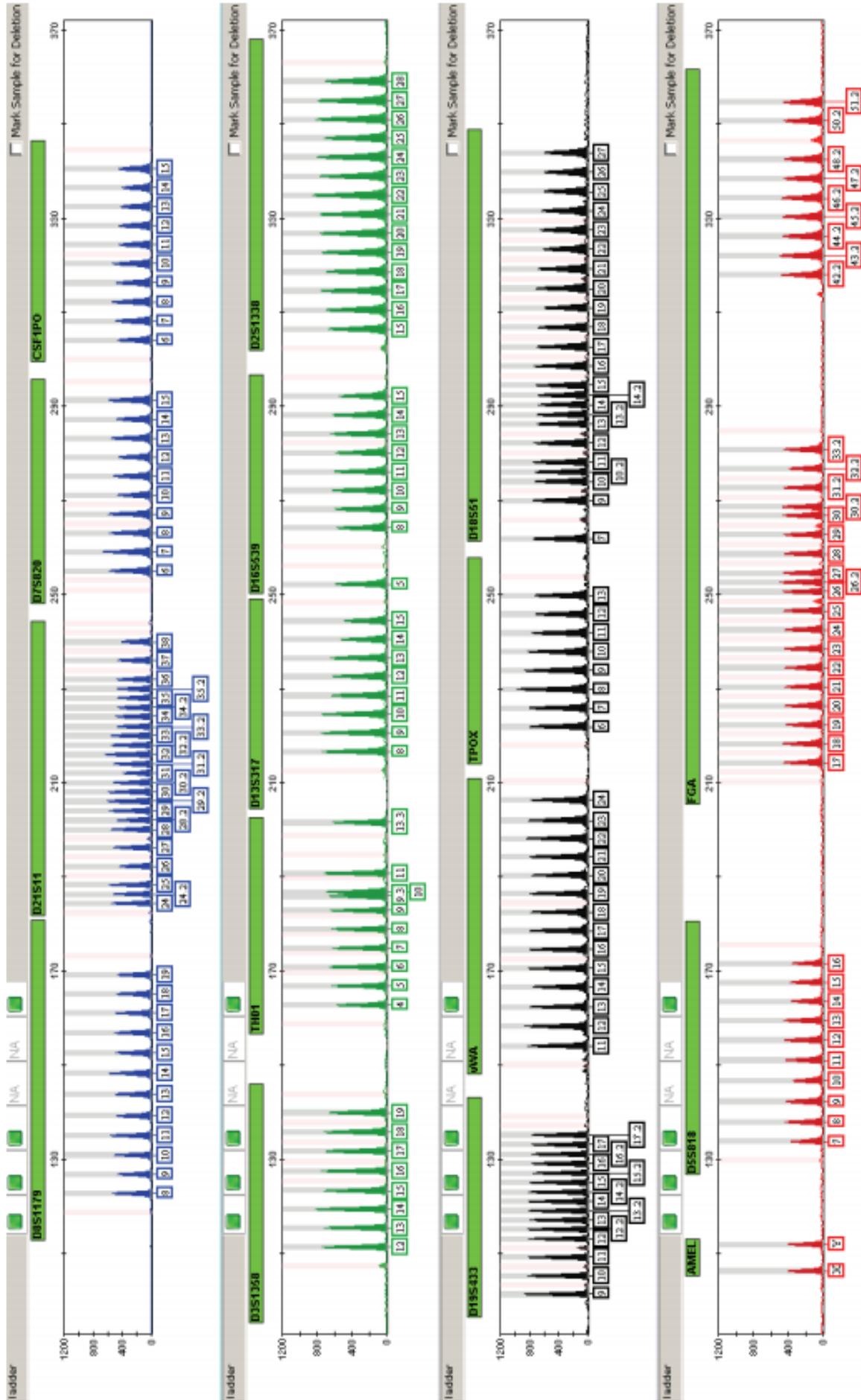


Figure 19 : Profil du ladder Identifier Plus AmpFISTR .
 (Identifier® Plus PCR Amplification Kit User Guide, 2015).

Résultats

Le logiciel, ayant établi la « règle » de taille à l'aide de l'échelle allélique, peut maintenant vérifier que chaque échantillon a été analysé de la même manière que le ladder. Tous les STR analysés figurant sur le profil obtenu avec le témoin positif de la PCR contenant l'ADN contrôle 9947A (figure 19) sont correctement amplifiés et correspondent exactement au profil de cet ADN. Ceci témoigne du bon déroulement de la réaction de polymérisation en chaîne :

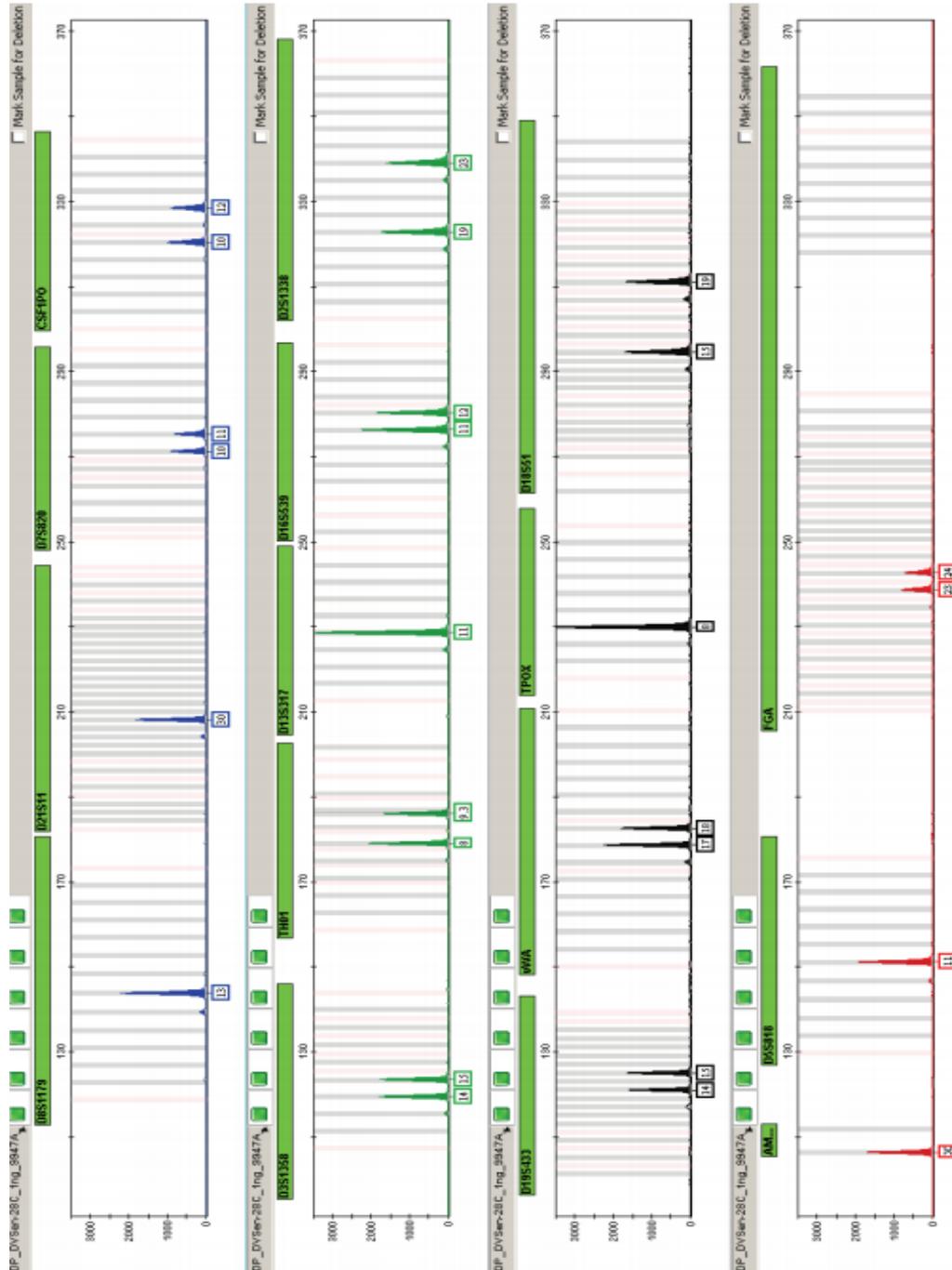


Figure 20: Control DNA 9947A.

(Identifiler® Plus PCR Amplification Kit User Guide, 2015)



Figure 21 : contrôle Négatif.
(Identifiler® Plus PCR Amplification Kit User Guide, 2015).

Les résultats obtenus pour l'ensemble des échantillons testés sont représentés dans le tableau XV définis à l'aide d'un code couleur comme suit :

Tableau XV : Les profils obtenus de l'analyse des STR pour les individus des échantillons. (Original, 2019)

Échantillons	loci															
	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	AMELOG ENINE
Ech1.1	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech1.2	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech1.3	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech1.4	5 pics	2pics	2pics	2pics	4 pics	3 pics	4 pics	2pics	4 pics	4 pics	4 pics	4 pics	2pics	4 pics	2pics	profil masculin
Ech1.5	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech2.1	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech2.2	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech2.3	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech2.4	4 pics	3 pics	3 pics	3 pics	3 pics	3 pics	3 pics	3 pics	4 pics	3 pics	3 pics	3 pics	3 pics	3 pics	2pics	profil masculin
Ech2.5	4 pics	4 pics	4 pics	3 pics	3 pics	3 pics	3 pics	3 pics	4 pics	4 pics	4 pics	3 pics	3 pics	3 pics	2pics	profil masculin
Ech2.6	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech3.1	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil féminin
Ech3.2	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil féminin
Ech4.1	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech4.2	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech4.3	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech4.4	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech4.5	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil féminin
Ech4.6	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil féminin
Ech4.7	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil féminin
Ech5.1	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil féminin
Ech5.2	Null	Null	Null	Null	Null	Null	Null	Null	Null	Null	Null	Null	Null	Null	Null	profil masculin
Ech6.1	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech6.2	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech6.3	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech7.1	3 pics	2pics	2pics	2pics	2pics	3 pics	2pics	2pics	4 pics	3 pics	2pics	2pics	3 pics	2pics	2pics	profil féminin
Ech7.2	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil féminin
Ech8.1	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin
Ech8.2	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	2pics	profil masculin



D'après le tableau XV :

- Les échantillons présentant deux pics pour un STR analysé (représenté en bleu foncé) se verront donc attribuer deux formes alléliques, autrement dit l'individu est porteur de deux allèles avec un nombre différent de répétitions hérités de ses deux parents, l'une d'origine paternelle et l'autre d'origine maternelle ; la présence de deux pics révèle une hétérozygotie pour le locus, contrairement à ceux représentant un seul pic représenté en bleu clair, indique alors qu'on est en présence d'un sujet homozygote pour ce marqueur, c'est-à-dire que cet individu a hérité le même allèle avec le même nombre de répétitions du STR étudié de ses deux parents.
- Le sexe étant également déterminé au cours du processus d'analyse (locus Amélogénine) celui-ci est utilisé pour pouvoir confirmer que l'échantillon analysé appartient à l'individu du sexe attendu.
- Un profil simple correspond à un profil d'un seul individu présentant pour chaque marqueur 1 ou 2 pics, tandis qu'un profil mélange correspond aux contributeurs présentant, le profil mélange est détecté par une présence allélique ≥ 2 pics.
- Pour des cas exceptionnels la présence de 2 ou 3 uniquement pour un seul marqueur peut être due à la trisomie.

Discussion

I- Les différents types de profils génétiques obtenus

Profil nul :

L'échantillon Ech5.2 prélevé à partir d'un manche de couteau (en bois) présente un profil nul malgré une quantité adéquate en ADN, ce profil génétique pourrait résulter d'une dégradation de l'ADN, de contamination dont les origines sont diverses, des inhibiteurs contenus dans le support non éliminé lors de purification d'ADN. Comme elles peuvent provenir d'un mauvais prélèvement de l'échantillon (Butler et Hill, 2012). Cela nous permettrait éventuellement de conclure que la qualité du profil génétique ne dépend pas forcément de la qualité d'ADN.

Profils Partiel :

Un profil partiel est un profil où au minimum un marqueur est non détecté. L'obtention d'un profil partiel à partir de scellé humide 7.1, due à l'absence de deux Marqueurs (CSF1PO – D16S539) mentionnés sur le Tableau XV.

Ceci 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, 2013).

Profils complets :

L'obtention de profils complets pour les échantillons mentionnés dans le tableau (XV), avec des quantités d'ADN et des longueurs de RFU variantes et avec présence de tous les marqueurs.

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).

Profils mélanges :

Un profil mélange est caractérisé par la présence de plus de deux bandes alléliques pour un marqueur, les produits artefacts sont également souvent rencontrés dans les mélanges ce qui augmente la difficulté de l'interprétation, les résultats de profilage des échantillons (Ech1.4 – Ech 2.4 - Ech 2.5 - Ech 7.1) a généré des profils mélanges, représentés par une couleur orange dans le tableau XV.

Ces derniers nous renseignent sur le nombre et la proportion des contributeurs aux crimes ainsi que les combinaisons génotypiques des individus impliqués, le plus souvent on exclut le profil de la victime (déjà connu) pour déterminer le contributeur majeur et autres suspects identifiés.

La présence de plus de 2 bandes alléliques par locus peut être utilisée pour déduire un mélange, bien que des bandes supplémentaires puissent également être présentes à la suite de stutters (Biedermann et al, 2012). Les stutters affecte l'interprétation des profils ADN, particulièrement dans le cas des mélanges, parce qu'il est très difficile de déterminer si ce petit pic est celui d'un contributeur minoritaire ou un produit stutter de l'allèle adjacent (Butler, 2010).

Pour le logiciel d'analyse de mélange GeneMapper[®] ID-X (GeneMapper Corporation), des facteurs incertains tels que les bandes de bégaiement, la perte allélique, les allèles partagés, les ADN à faible nombre de copies et la contamination par l'ADN peuvent toujours affecter la fiabilité des résultats de l'analyse d'ADN mixte utilisant cet outil (Biedermann et al, 2012).

Dans le cas d'un mélange de profils de deux individus dont l'un est connu, le deuxième profil est déterminé après élimination du profil connu du mélange. Sauf dans le cas où l'intensité des pics est similaire, ce qui ne permet pas la distinction d'un profil majoritaire et d'un profil minoritaire (Tomsey et al, 2001). Un pouvoir discriminant est satisfaisant pour l'examen des mélanges d'ADN lorsqu'au moins un profil d'ADN (profil de victime) est connu (Chung et Fung, 2012).

II- Les facteurs qui influencent l'établissement d'un profil ADN :

Malgré la grande différence en quantité d'ADN récupérée, Des profils ont été obtenus, même dans celles où l'ADN est faible, ce qui montre qu'il n'existe pas de corrélation forte entre un profil complet ou partiel et la quantité d'ADN et que la qualité d'un profil ADN dépend non seulement de la quantité d'ADN, Mais aussi de facteurs tels que la dégradation de l'ADN et l'inhibition du processus de profilage de l'ADN (Meakin et Jamieson , 2013).

Différents substrats peuvent avoir un effet majeur sur le transfert d'ADN en raison de leurs propriétés différentes, et nous suggérons que des éléments de la composition chimique des fibres, des tissages et de l'épaisseur des matériaux jouent probablement un rôle dans ces différences. Ainsi que les effets environnementaux tels que l'humidité relative et l'effet de la quantité de dépôt initial (Verdon and et al, 2013).

Les principaux facteurs ayant un impact sur l'optimisation d'un profil génétique sont les types de surfaces sur les quelles est récolté l'ADN ainsi que certains facteurs environnementaux :

II-1 Les types de surfaces :

Sur les 7 échantillons (Ech 3.2 – Ech 4.4 – Ech 5.1 – Ech 6.2 – Ech 7.2 – Ech 9.1 – Ech 10.1) qui sont de surface non poreuse, lisse ou polie, on a collecté une faible quantité d'ADN. Contrairement à cela, les échantillons (Ech 2.6 Ech 3.2-Ech 4.4) présentant une bonne quantité d'ADN, correspondent aux conclusions de Pesaresi et al qui ont indiqué que les surfaces lisses et non poreuses ont plus de chances de retenir plus d'ADN que les surfaces rugueuses et poreuses telles que le bois non traité (Pesaresi et al, 2003).

Tous les échantillons restants se caractérisant par une surface absorbante, rugueuse et poreuses ont collecté une quantité d'ADN suffisante à l'exclusion des échantillons (Ech 2.4 – Ech 7.1- Ech 9.2- Ech 10.2) exceptionnellement et cela concorde avec les résultats de Goray et al et Wickenheiser qui démontrent que les surfaces absorbantes (tissu en coton), rugueuses et poreuse (le bois) sont connues pour collecter plus d'ADN que les surfaces plutôt lisses ou polies et non poreuse (le plastique) (Goray et al, 2010 a),(Goray and al ,2010 b) et (Wickenheiser 2002). Cela peut être attribué à la nature abrasive d'une surface rugueuse susceptible de déloger les cellules et donc d'augmenter les chances de rétention de l'ADN (Wickenheiser, 2002).

Vêtements présentant une coloration :

Pour l'échantillon Ech09.2 présentant un denim bleu avec des taches de peinture, la quantité d'ADN est infime et insignifiante due probablement à la présence du colorant considéré comme un inhibiteur de la PCR, en revanche concernant les scellés suivants (Ech 1.1 – Ech 1.4 – Ech 2.2 – Ech 3.1 – Ech 8.1) on a obtenus des profils et des quantités d'ADN adéquats même avec présence de différentes colorations foncées connues comme des inhibiteurs de la PCR, contrairement à Jung et al et Del Rio et al, par contre ces résultats sont conformes à ceux de Larkin et Harbison.

La co-extraction du colorant de denim bleu foncé et noir et T-shirt noir en coton inhibait la réaction PCR, et ont toujours du mal à obtenir les profils ADN (Larkin et Harbison, 1999). La présence de colorant indigo ou de ses dérivés dans la solution d'extraction de l'ADN est susceptible d'inhiber la PCR et, souvent, on n'obtient pas de profil (Jung et al, 1991), (Del Rio et al 1996). Dans certains cas, un denim taché de sang non traité pourrait être amplifié et typé correctement, bien qu'un résultat de typage de l'amélogénine ait été souvent obtenu. Ceci est évident dans le denim bleu clair non traité (Larkin et Harbison, 1999).

- **Chaussures :**

Malgré la saleté, la coloration et le type de support pour les chaussures des échantillons (Ech 2.5– Ech 4.2), la quantité d'ADN, et le profilage obtenus sont significatifs, par contre la quantité d'ADN de (Ech 2.5) de support synthétique est supérieure à celle du cuir (Ech 4.2) et cela est apparemment dû à la force d'absorption du synthétique et la présence d'inhibiteurs pour le cuir.

Pour les chaussures : les échantillons sont souvent sales et peuvent ne pas être propices à obtenir des résultats de profilage d'ADN en raison de la présence d'Inhibiteurs de la PCR, Il semble que la récupération de l'ADN soit plus viable à partir de chaussures de sport en matériau synthétique que de chaussures en cuir, car le cuir contient un inhibiteur de la réaction PCR censé être introduit au cours du processus de bronzage du cuir, cependant, il est possible d'obtenir des résultats de profilage d'ADN significatifs (Bright et Petricevic, 2004).

- **Métal :**

Absence totale de quantité d'ADN pour les échantillons du support métalliques suivants (Ech 9.1-Ech 10.1), cela est peut-être dû aux interactions du métal, avec l'ADN selon Leszczynski, Ono et al, Kambra et Tucker.ou probablement pourrait être du a l'absence de traces de sang et presence de la rouille sachant que le test d'orientation préliminaire (Test Kastel meyer se révèle parfois positif avec la rouille) ou ça peut etre lié aux conditions environnementales que la trace de sang a subi.

La difficulté de récupérer l'ADN du métal peut être due à l'affinité de l'ADN avec le métal. L'ADN est associé à des cations métalliques dans la structure du phosphate : principal support structurel et contribuant à la structure de la double hélice. Les cations métalliques font également partie intégrante du contrôle de l'expression des gènes avec l'ADN chromosomique (Leszczynski, 2002). Des études ont montré que les paires de bases de nucléotides de l'ADN sont capables de former une liaison ionique avec certains ions métalliques (Ono et al 2011). L'interaction connue des paires de bases d'ADN avec des cations métalliques donne un aperçu des raisons pour lesquelles il peut être difficile de libérer de l'ADN d'une surface métallique (Kambra et Tucker 2011).

II-2 facteurs environnementaux :

La cause de l'humidité et de la moisissure des scellés (Ech 2.4- Ech 7.1 – Ech 9.2 Ech 10.2) est sûrement due à l'impact des conditions météorologiques et environnementales qu'ont subi ces derniers durant une longue période avant le recueil et le prélèvement. La baisse de quantité pour les échantillons (Ech 2.4- Ech 7.1) et l'absence totale d'ADN pour l'échantillon (Ech 9.2 - Ech 10.9) même avec présence de traces de sang est probablement provoquée suite à l'humidité et une contamination bactérienne.

Un échantillon d'ADN dans un environnement humide est sensible au clivage hydrolytique et aux dommages causés par la base d'oxydation. La principale cible du clivage hydrolytique est la liaison sucre de base, qui entraîne une perte de la base par dépurination et entaille de l'ADN entier. L'augmentation de la chaleur entraîne une augmentation du taux de clivage hydrolytique. Par conséquent, ceci entraîne un clivage direct des brins d'ADN dû au séchage (Poinar 2003).

De même, l'oxydation endommage l'ADN en oxydant les liaisons carbonées dans les cycles pyrimidines et imidazole dans les purines conduisant à la fragmentation du cycle. De plus, l'irradiation UV de l'ADN (par exemple, par la lumière du soleil) conduit à la réticulation des nucléotides thymine adjacents, ce qui entrave le passage de l'ADN polymérase lors de la PCR (Lindahl, 1993). Raymond et al ont montré des traces réduites de matériel biologique dans des échantillons exposés à l'environnement humide au fil du temps en raison d'attritions environnementales réduites (Raymond et al 2008).

Dans le même esprit, Li et Harris, ont fait valoir que la possibilité de contamination d'un échantillon d'ADN était moindre sur un intervalle de temps court. Ces études ont conclu que la réduction du temps nécessaire à la collecte de l'ADN est un facteur crucial pour garantir des rendements en ADN plus élevés (Li et Harris, 2003).

La baisse de quantité est plus probablement due au processus de décomposition microbienne (Bright et Petricevic 2004), l'ADN bactérien interfère souvent avec la spécificité pendant la quantification mais n'a aucun effet sur les concentrations d'ADN calculées par Quantifiler qui sont spécifiques à l'ADN humain (Ricci and al 2006), (Johns et al 2005).

Les contrôles négatifs obtenus représentent effectivement des profils nuls soulignant qu'il ne y'a pas eu de contamination. Tous les contrôles négatifs issus de chaque élément ont réaccordé les profils vierges. (Belinda et al, 2018)

Bien qu'aucune étude d'inhibition n'ait été réalisée, certains échantillons d'ADN inclus dans cette étude ont été extraits de taches de sang contaminées par le sol, de sang sur un jean foncé et de sang sur un cuir noir, tous reconnus comme porteurs d'inhibiteurs de la PCR. D'autres échantillons ont été exposés à différentes substances chimiques, notamment de l'eau de javel et du SDS, qui sont connues pour causer des difficultés lors de l'amplification par PCR des échantillons d'ADN (Fre'geau et al, 1999).

Identifiler Plus a la capacité de surmonter l'inhibition de la PCR et amplifier les échantillons dégradés permettant ainsi l'établissement de profils ADN dans des échantillons médico-légaux difficiles (Romanini et al, 2009).

Afin d'évaluer notre expérience qui repose sur l'établissement de profils génétiques obtenus à partir de trace de sang prélevé sur vêtements et armes de crime, nous avons répertorié 29 profils génétiques sur les 33 échantillons prélevés.

En considérant que seul le profil « Complet » est valide et en tenant compte des résultats répertoriés dans le tableau XV, le pourcentage des profils résultants est représenté dans le diagramme suivant :

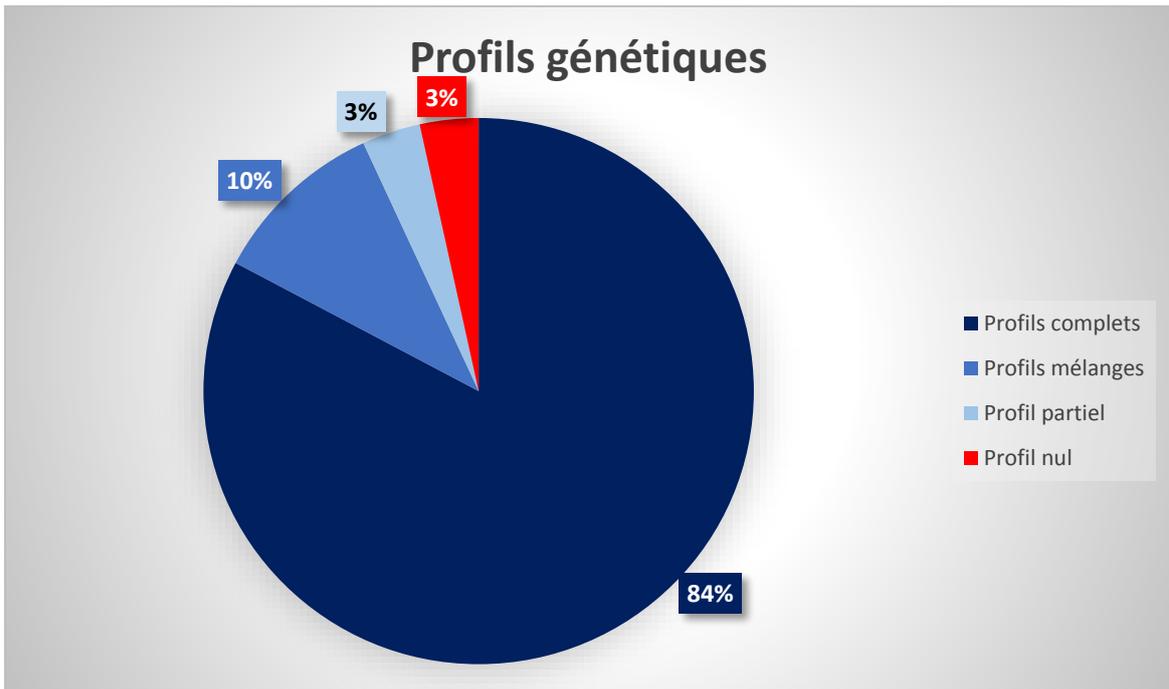


Figure 22 : Diagramme représente les pourcentages des résultats des 29 profils obtenus

Conclusion

La technique de l’empreinte génétique, se basant sur l’étude des STR à des fins d’identification des personnes est particulièrement discriminante et offre une grande fiabilité. Elle fournit aujourd’hui, à la police scientifique, le moyen d’élucider de nombreuses enquêtes criminelles car, sur quasiment toutes les scènes de crime, des indices sont retrouvés et celle-ci dispose suffisamment de moyens techniques et scientifiques pour pouvoir les exploiter. La précision et la fiabilité de l’expertise en fait l’un des meilleurs outils pour découvrir la vérité.

Pour les 33 différents échantillons analysés au cours de notre travail, répartis sur 10 affaires de crime différentes, se distinguant par l’état de chaque scellé, nature du support, la qualité et la quantité d’ADN de chaque échantillon, nous avons eu l’opportunité d’avoir 53% de profils interprétables. Ceci fait valoir la crédibilité de la démarche ainsi que la fiabilité et la rentabilité des tests et réactifs avec l’amélioration du matériel utilisés afin d’obtenir un profil génétique interprétable.

En revanche les résultats obtenus ne permettent pas d’établir une corrélation entre l’exploitabilité du profil, la quantité d’ADN et la nature du support.

Enfin, il serait souhaitable de perfectionner la technique du profilage génétique par l’augmentation de l’efficacité des différents Kits et par l’optimisation du matériel afin d’avoir de bons résultats à partir d’échantillons dégradés ou en très faible quantité, ainsi que de réduire la nocivité et la durée de ces derniers.

Références bibliographiques

Articles :

1. **Andréasson, H., M. Nilsson, B. Budowle, H. Lundberg, et Allen, M.** (2006). *Quantification de l'ADN nucléaire et mitochondrial de divers matériaux médico-légaux*. Forensic Science International, 164 (1), 56–64. doi: 10.1016 / j.forsciint.2005.11.024.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427750>
2. **Barthes, N.P.F., Michel, B.Y., Shaya, J., Martinet, N., Burger, A.** (2016). *Génétique et épigénétique : un code au-dessus du code !* Journal de L'Actualité chimique n°412, p20.
Disponible sur : <https://www.lactualitechimique.org/Genetique-et-epigenetique-Un-code-au-dessus-du-code>
3. **Belinda, M., Renee, B., Duncan, T., Adrian, L.** (2018). *Profils ADN générés à partir d'une gamme de types d'échantillons touchés*. Forensic Science International: Genetics, 36, 13-19. doi: 10.1016 / j.fsigen.2018.06.002.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29886388>
4. **Biedermann, A., S. Bozza, K. Konis et F. Taroni.** (2012). *Inférence sur le nombre de contributeurs à un mélange d'ADN: analyses comparatives d'une approche de réseau bayésien et de la méthode de dénombrement maximal d'allèles*. Forensic Science International: Genetics, 6 (6), 689–696. doi: 10.1016 / j.fsigen.2012.03.006
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22534257>
5. **Blandin, Rev, FR, Histotechnol.** (2004). *RECHERCHE D'ADN ET PROFILS GENETIQUES. INSTITUTE DE MEDECINE LEGALE*, 7, n° 1, p. 75 à 78 :, STRASBOURG.
6. **Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W.** (1980). *Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms*, Am J Hum Genet 32:314-331.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6247908>
7. **Bright J-A, Petricevic SF.** (2004). *Recovery of trace DNA and its application to DNA profiling of shoe insoles*. Forensic Sci Int.;145(1):7-12. [doi: 001: 10.1016/j.forsciint.2004.03.016].
Disponible sur : http://www.forensic.sc.mahidol.ac.th/proceeding/52_kittisak.pdf
8. **Butler, JM** (2006). *Génétique et génomique des loci à répétition tandem courte de base utilisés dans les tests d'identité humaine*. Journal of Forensic Sciences, 51 (2), 253–265. doi: 10.1111 / j.1556-4029.2006.00046.x.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16566758>
9. **Butler, JM** (2007). *Technologies de typage à répétition en tandem courtes utilisées dans les tests d'identité humaine*. BioTechniques, 43 (4), Sii – Sv. doi: 10.2144 / 000112582
Disponible sur : <https://www.future-science.com/doi/full/10.2144/000112582>

10. **Butler, J.M., Hill, C.R.** (2012). *Biology and Genetics of few Autosomal STR Loci Useful for Forensic DNA Analysis*. Forensic Sci Rev 24 :15.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26231356>
11. **Caragine, T., R. Mikulasovich, J. Tamariz, E. Bajda, J. Sebestyen, H. Baum et M. Prinz** (2009). *Validation des protocoles de test et d'interprétation pour les échantillons d'ADN de modèle bas à l'aide de AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Identifier $\text{\textcircled{R}}$* . Croatian Medical Journal, 50 (3), 250-267. doi: 10.3325 / cmj.2009.50.250.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2702740/>
12. **Chung, Y.-K., Fung, WK** (2012). *Identification des contributeurs de mélanges d'ADN à deux personnes par recherche dans la base de données familiale*. Revue internationale de médecine légale, 127 (1), 25–33. doi: 10.1007 / s00414-012-0666-x
Disponible sur : <http://sci-hub.tw/10.1007/s00414-012-0666-x>
13. **Cowell, RG, Lauritzen, SL et Mortera, J.** (2007). *Identification et séparation des mélanges d'ADN à l'aide des informations de surface de pic*. Forensic Science International, 166 (1), 28–34. doi: 10.1016 / j.forsciint.2006.03.021
Disponible sur : <http://sci-hub.tw/10.1016/j.forsciint.2006.03.021>
14. **Daly DJ, Murphy C, McDermott SD.** (2012). *Le transfert de l'ADN tactile des mains au verre, au tissu et au bois*. Forensic Sci Int Genet.6: 41-46. Doi: 10.1016 / j.fsigen.2010.12.016.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21330229>
15. **Dettlaff- Kakol, A., Pawlowski, R.**(2002). *First Polish DNA "manhunt" -an application of Y chromosome STRs*. Int. J. Legal Med; 116(5):289-91. DOI 10.1007/s00414-002-0320-0
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12376840>
16. **Del Rio S A, Marino M A, Belgrader P.** (1996) *PCR- based human leukocyte antigen (HLA) DQ α typing of bloodstained light and dark denim fabric*. J Forensic Sci 41 :490–492.
17. **Di Rienzo A., Peterson C., Garza, J. C., Valdes A. M., Slatkin M., Freimer N. B.** (1994). *Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA ;91: 3166-3170
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8159720>
18. **Doutremepuich C.** (2012) *Les empreintes génétique en pratique judiciaire Bulletin de l'Académie National de Médecine.*, 196, no 6, 1117-1130.
Disponible sur : <https://doi.org/10.1520/JFS13941J>

19. **Doutremepuich F., Doutremepuich C., Beaufils M., Morales V.** (2003). *Les Empreintes génétiques en pratique judiciaire*. Journal de la Société de Biologie, 197, 329-332.
Disponible sur : <http://www.academie-medecine.fr/wp-content/uploads/2013/07/tap-1117-1130.pdf>
20. **Fre'geau, C.J., Bowen, K.L., Fourney, R.M.** (1999). *Validation of highly polymorphic fluorescent multiplex short tandem repeat systems using two generations of DNA sequencers*, J. Forensic Sci. 44 133–166
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987881>
21. **Grange, T., Boiteux, S., Bonneaud, N., Cammace, F., Carpousis, A., Duret, L., Ermel, G., Eychene, A., et al.**(2010). *Organisation, expression et évolution des génomes*. Rapport de conjoncture. Disponible sur : http://www.cnrs.fr/comitenational/doc/rapport/2010/22_conj_2010.pdf
22. **Gill P.** (2001). *Biological evidence (including hair)*. 13th Interpol forensic symposium, Lyon, France, October 16-19.
23. **Ginestra E., Trapani C., Di Martino D. and Saravo L.** (2004). *DNA extraction from blood determination membrane card test*. Forensic Science International, 146S : S145-S146.doi: 10.1016/j.forsciint.2004.09.044. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15639562>
24. **Goray, M., Eken, E., Mitchell, R.J., van Oorschot, R.A.H.** (2010) A. *Secondary DNA transfer of biological substances under varying test conditions*. Forensic Sci. Int. Genet. ; 4: 62–67. Doi: 10.1016/j.fsigen.2009.05.001
Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20129462>
25. **Goray, M., Mitchell, R.J., van Oorschot, R.A.H.** (2010) B. *Investigation of secondary DNA transfer of skin cells under controlled test conditions*. Leg. Med; 12: 117–120. Doi: 10.1016/j.legalmed.2010.01.003
Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206575>
26. **Gusmão, L., Butler, JM, Carracedo, A., Gill, P., Kayser, M., Mayr, WR,... Schneider, PM** (2006). *Une mise à jour des recommandations sur l'utilisation des Y-STR dans l'analyse médico-légale*. Commission ADN de la Société internationale de génétique médico-légale (ISFG): Forensic Science International, 157 (2-3), 187-197. doi: 10.1016/j.forsciint.2005.04.002
Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998969>

27. **Hundertmark ,T. , Hering,S., Edelmann ,J ., Augustin,C ., Plate, I., Szibor,R** (2008). *The STR cluster DXS10148-DXS8378-DXS10135 provides a powerful tool for X-chromosomal haplotyping at Xp99*. International Journal of Legal Medicine , 122(6),489-92. DOI: [10.1007 / s00414-008-0277-8](https://doi.org/10.1007/s00414-008-0277-8)
Disponible sur : <https://europepmc.org/abstract/med/18688634>
28. **Ikawa T., Kakegawa A., Nagano T., Ando H., YamakoshiY., Tanabe T., Simmer J.P., Hu C.C., Fukae M. and Oida S.** (2005). *Porcine Amelogenin is Expressed from the X and Y Chromosomes*. Journal of Dentist Research, 84(2):144-148. doi: 10.1177 / 154405910508400207 Disponible sur :
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/154405910508400207?journalCode=jdrb>
29. **Jamieson, A.** (2016). *Introduction au profilage médico-légal de l'ADN - L'électrophérogramme (epg)*. Wiley Encyclopedia of Forensic Science, 1–13. doi: 10.1002 / 9780470061589.fsa1139
Disponible sur : <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1002/9780470061589.fsa1139>
30. **Jarman A.P., Wells R.A.** (1999). *Hyper variable minisatellite recombinators*. Trends genetics, 5 (11): 367-71. Disponible sur :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2692244>
31. **Jeffreys A.J., MacLeod A., Tamaki., Neil D.L.N., et Monckton D.G.** (1991). *Minisatellites Repeat coding as a digital approach to DNA typing*. Nature 354: 204-209. Doi: 10.1038 / 354204a0 disponible sur :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1961248>
32. **Jobling M.A. Gill P.** (2004). *Encoded evidence: DNA in forensic analysis*. Genetics, 5: 739-751. Doi : 10.1038 / nr1455.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15510165>
33. **Jobling M.A., Lo I.C.C., Turner D. J., Bowden G.R., Lee A.C., Xue Y., Carvalho-Silva D., Hurles M.E., and al.** (2007). *Structural variation on the short arm of the human Y chromosome: recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y*. Human Molecular Genetics, 16 (3): 307–316. Doi : 10.1093 / hmg / ddl465
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2590852/>

34. **Johns LM, Thakor A, Ioannou P, Kerai J, Thomson JA.** (2006). *Validation of Quantifiler(TM) Human Quantification Kit for forensic casework*. International Congress Series. [doi: 001: 10.1016~.ics.2005.09.083]. 2006;1288:762-4.
Disponible sur : https://www.researchgate.net/publication/248214220_Validation_of_Quantifiler_Human_Quantification_Kit_for_forensic_casework
35. **Johnston S., Newman J., Frappier R.** (2003). *Etude de validation du test Abacus Diagnostics sur membrane ABACard® HemaTrace® pour l'identification médico-légale du sang humain*. Revue de la société canadienne de criminalistique, 36 (3), 173-183. Doi : 10.1080 / 00085030.2003.10757560
Disponible sur : https://scihub.tw/https://www.researchgate.net/publication/271933827_Validation_Study_of_the_Abacus_Diagnostics_ABACardR_HemaTraceR_Membrane_Test_for_the_Forensic_Identification_of_Human_Blood
36. **Jung JM, Comey CT, Baer DB, Budowle B** (1991) .*Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQA gene*. Int J Legal Med 104 : 145–148.
37. **Keyser, Ch., Petkovski, E.,** (2006). *Utilisation des SNP pour l'identification des SNP pour l'identification Humaine*. Spectra Analyse, 249 24-29. Disponible sur : http://www.spectraanalyse.fr/wp-content/uploads/2012/05/SA249_24-29.pdf
38. **Koyama, H., Iwasa, M., Tsuchimochi, T., Maeno, Y., Isobe., Matsumoto, T., Nagao, M.** (2002). *Utility of Y- STR haplotype and mtDNA sequence in personal identification of human remains*. Am. J . Forensic Med, Pathol; 23(2): 181-5.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040265>
39. **Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C. et al.** (2001), 'Initial sequencing and analysis of the human genome', Nature Vol. 409, pp. 860–921. Doi: [10.1038 / 35057062](https://doi.org/10.1038/35057062)
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237011>
40. **Larkin, A., Harbison, S.** (1999). *Une méthode améliorée pour l'analyse STR du denim taché de sang*. Revue internationale de médecine légale, 112 (6), 388–390. doi: 10.1007 / s004140050020
41. **Lay-Keow Ng , Andy N.g., Cholette F. Davis C.** (2007). *Optimization of recovery of human DNA from envelope flaps using DNA IQTM System for STR genotyping*. Forensic Science International: Genetics, 1 : 283 – 286. Doi: 10.1016 / j.fsigen.2007.05.004.
Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19083775>

42. **Leat N., Ehrenreich L., Benjeddou M. Davison S.** (2004). *Developments in the use of Y-chromosome markers in forensic genetics*. African Journal of Biotechnology, 3 (12): 637-642.
43. **Leszczynski, J.** (2002). *From molecules to supermolecules: a theoretical approach*. In: Domenicano A, Hargittai I, eds. Strength from Weakness: Structural Consequences of Weak Interactions in Molecules, Supermolecules and Crystals. Vol 68. Norwell, MA: Kluwer Academic Publisher; 2002:300-301 DOI: [10.1007 / 978-94-010-0546-3_16](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0546-3_16)
44. **Lindahl, T.** (1993). *Victoriens éminents et la science à la base*. Nature 362: 700.
45. **Li RC et Harris HA.** (2003) *Utilisation d'un ruban adhésif hydrophile pour la collecte d'éléments de preuve pour l'analyse ADN médico-légale*. J Forensic Sci. 48: 1318-1321.
46. **Loreille, O.M., Diegoli T.M., Irwin J.A., Coble M.D. Parsons T.J.** (2007). *High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization*. Forensic Science International: Genetics, 1 : 191–195. Doi: 10.1016 / j.fsigen.2007.02.006
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19083754>
47. **Mansuet-Lupo A., Van Huffel V. et Rouger P.** (2007). *Les empreintes génétiques: nouvel outil en médecine légale*. Immuno-analyse et biologie spécialisée, 22: 209–214.
48. **McCord B., Hartzell-Baguley B., King S.** (2007). *Separation of DNA by capillary electrophoresis*. Methods Mol. Biol. 384 : 415-429. doi: 10.1007 / 978-1-59745-376-9_15. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18392577>
49. **Meakin, G. et Jamieson, A.** (2013). *Transfert d'ADN: bilan et implications pour le traitement des dossiers*. Forensic Science International: Genetics, 7 (4), 434–443. doi: 10.1016 / j.fsigen.2013.03.013. Disponible sur : <https://www.journals.elsevier.com/forensic-science-international-genetics>
50. **Mulligan, C.M., Kaufman, S.R., and Quarino, L.** *The utility of polyester and cotton as swabbing substrates for the removal of cellular material from surfaces*. J. Forensic Sci. 2011; 56: 485–490. Doi : 10.1111 / j.1556-4029.2010.01659.X
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21342191>
51. **Ono A, Torigoe H, Tanaka Y.** (2011). Binding of metal ions by pyrimidine base pairs in DNA duplexes. Chem Soc Rev.40(12):5855-5866.5855. doi : 10.1039 / c1cs15149e
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21826352>
52. **Pascal, M.** (2007). *La PCR en temps réel. Choix d'amorces et analyse des résultats*. Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie,INRA,Toulouse.

53. **Pascal, O.** (1998). *Empreintes génétiques : pourquoi et pour qui ?*. Médecine et Droit, 32: 1-6.
54. **Pesaresi M, L Buscemi, F Alessandrini, M Cecati, Tagliabracci A** (2003). *Analyse qualitative et quantitative de l'ADN récupéré à partir d'empreintes digitales*. Int Cong Ser. 1239: 947-951
55. **Petit C., Martel-Petit V., Hienne R. and Frackowiak S.** (2008). *Single sperm cell isolation by micromanipulation for human identification in sexual assault*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 1: 60–62. doi: 10.1016 / j.fsigss.2007.10.186. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1875176808002187>
56. **Pfeiffer I., Volkel I., Taubert H. Brenig B.** (2004). *Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification*. Forensic Science International, 141: 149– 151.
57. **Phipps M. Petricevic S.** (2007). *The tendency of individuals to transfer DNA to handled items*. Forensic Science International, 168 : 162–168. Doi : 10.1016 / j.forsciint.2006.07.010
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930898>
58. **Poinar HN.** (2003). *Le top 10 des critères d'authenticité pour l'ADN provenant d'échantillons antiques et médico-légaux*. Int Cong Ser. 1239: 575-579.
59. **Poitras E. et Houde A.** (2002). *La PCR en temps réel: principes et application*. Reviews in Biology and Biotechnology, 2: 2-11. Disponible sur : <https://biochimie.umontreal.ca/wpcontent/uploads/sites/37/2015/07/qPCR.pdf>
60. **Prado V.F., Castro A.K.F., Oliviera C.L., Souza K.T., Pena S.D.J.** (1997). *Extraction in forensic sciences. Genetic analysis : biomolecular engineering*, 14 : 41-44.
61. **Primorac, D., Schanfield, M.** (2014). *Applications de l'ADN médico-légal: une perspective interdisciplinaire - un nouveau livre sur la science médico-légale*. Croatian Medical Journal, 55 (4), 434–436. doi: 10.3325 / cmj.2014.55.434
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4157380/>
62. **Primorac D., Schanfield M.S. and Prmorac D.** (2000). *Application of forensic DNA testing in the legal system*. Croatian medical journal, (41)1: 32-46.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810166>
63. **Pun, K.M, Comte ,J, Albrecht, C., Milon, M.P.,** (2008) *AIDE – MEMOIRE IDENTIFICATION PAR GENETIQUE FORENSIQUE*.

64. **Quintana-Murci L., Veitia R., Santachiara-Benercetti S., Mc Elreavey K., Fellous M. et Burgeron T.** (1999). *L'ADN mitochondrial, le chromosome y et l'histoire des populations humaines*. Médecine/sciences, 15: 974-82.
65. **Raymond,J.J., Walsh, S.J.,van Oorschot, R.A.,Gunn, P.R.,, Evans L et al.** (2008). *Évaluation de traces d'ADN provenant d'un cambriolage résidentiel: abondance, transfert et persistance*. Forensic Sci Int Genet.1: 442-443
66. **Reid E.L., Weynberg K.D., Love J., Isupov M., Littlechild J.A., Wilson W.H., Kelly S.L., Lamb D.C., Allen M.J.** (2013) .*Functional and structural characterization of a viral cytochrome b5*. FEBS Lett. 587 (22): 9-3633. Doi : 10.1016 / j.febslet.2013.09.035. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579313007308>
67. **Ricci U, Marchi C, Prevldere C, Fattorini P.** *Quantification of human DNA by real-time PCR in forensic casework*. International Congress Series. [doi: 001: 10.1016/j.ics.2005.11.135]. 2006;1288:750-2.
68. **Romanini, C., Ferrer, MR, Catelli, ML et Vullo, C.** (2011). *Une comparaison du kit AmpFlSTR Identifiler™ et du kit AmpFlSTR Identifiler Plus™ dans des échantillons osseux difficiles en utilisant un nombre de cycles de PCR normal et accru*. Forensic Science International: Série de suppléments de génétique, 3 (1), e514 – e515. doi: 10.1016 / j.fsigss.2011.10.004 . Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27914554>
69. **Ruitberg C. M, Reeder D. J, Butler J. M.** (2001).*STRBase: A short tandem repeat DNA database for the human identity testing community*. Nucleic Acids Res ;29: 320-322.doi: [10.1093 / nar / 29.1.320](https://doi.org/10.1093/nar/29.1.320)
Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11125125>
70. **Saiki R.R., Sharft S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.** *Enzymatic amplification of β globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis*. Science, 1985, 230, 1351-1354. Doi: 10.1126 / science.2999980
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999980>
71. **Sanchez D., Gonzalez-Andrade F., Bolea M. Martýnez Jarreta B.** (2008). *False inclusion in a deficient paternity case with two alleged fathers*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 1: 525–527.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2007.10.105>
Disponible sur : [https://www.fsigeneticssup.com/article/S1875-1768\(08\)00144-3/abstract](https://www.fsigeneticssup.com/article/S1875-1768(08)00144-3/abstract)
72. **Schneider P. M.** (2006). *Scientific standards for studies in forensic genetics*. Forensic Science International, 165: 238–243.doi: 10.1016 / j.forsciint.2006.06.067
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16875790>

73. **Shadrach B., Commame M., Hren C. and Warshawsky I.** (2004). *Consultations in Molecular Diagnostics: A Rare Mutation in the Primer Binding Region of the Amelogenin Gene Can Interfere with Gender Identification.* Journal of Molecular Diagnostics, 6 (4): 401- 405. Doi: 10.1016 / s1525-1578 (10) 60538-7.
Disponible sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525157810605387>
74. **Silva, N.M., Pereira, L., Poloni, E.S., et Currat, M.** (2012). *Variation génétique neutre humaine et données médico-légales STR.* PloS ONE, 7 (11), 49496. Doi : 10.1371 / journal.pone.0049666.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3504113/>
75. **Stapleton P.M., Lai D., Millar C.D., Wua E., Andres M. and Love D.R.** (2008). *Discovery of three related females who type XY at the amelogenin locus.* Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 1: 577–579.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2007.08.017>
76. **Stouder SL, Reubush KJ, Hobson DL, Smith JL.** (2001) *Trace evidence scrapings: a valuable source of DNA? Forensic Sci Commun*
77. **Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, et Gill P .** (1993) *A rapid and quantitative DNA sex test : fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin.* Biotechnique 15 :636-8,640-1 Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8251166>
78. **Tautz, D.,** (1993). *Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences,* 67: 21- 28. Doi: 10.1007 / 978-3-0348-8583-6_2. Disponible sur : https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-8583-6_2
79. **Tomsey C. S., Kurtz M., Flowers B., Fumea J., Giles B. Kucherer S.** (2001). *Case Work Guidelines and Interpretation of Short Tandem Repeat Complex Mixture Analysis.* Croatian medical journal, 42(3): 276-280. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11387638>
80. **Trevin, F. Le Bricon T.** (2003). *Nouvelles techniques d'électrophorèse : application aux protéines et à l'ADN. Immuno-analyse et biologie spécialisée,* 18 : 11-22. doi : [10.1016/S0923-2532\(02\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2532(02)00004-2) Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923253202000042>
81. **Van Oorschot, RA, Ballantyne, KN., Mitchell, RJ .**(2010). *ADN trace médico-légal: une revue.* Investigative Genetics, 1 (1), 14. doi: 10.1186 / 2041-2223-1-14.
82. **Venter J.C, Adams M. D., Myers E. W, Li P. W., Mural R. J, Sutton G. G.** (2001). *The sequence of the human genome.* Science ;291:1304-1351

83. **Verdon, T.J, Mitchell, R.J.,van Oorschot, RAH** .(2013). *L'influence du substrat sur le transfert de l'ADN et l'efficacité de l'extraction*. Forensic Science International: Genetics, 7 (1), 167–175. doi: 10.1016 / j.fsigen.2012.09.004
84. **Von Wurmb-Schwark N., Malyusz V., Fremdt H.; Koch C., Simeoni E. Schwark T.** (2006). *Fast and simple DNA extraction from saliva and sperm cells obtained from the skin or isolated from swabs*. Legal Medicine, 8: 177–181. Doi : 10.1016 / i.legalmed.2005.11.004
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16516526>
85. **Vroh Bi, I., Du Jardin, P., Mergei, G., Boudoin, J.P.** (1997). *Optimisation et application de la RAPD (random amplified polymorphic DNA) dans un programme de selection recurrente chez le cotonnier (Gossypium spp.)*.Périodiques scientifiques.
Disponible sur : <http://hdl.handle.net/2268/124290>
86. **Weber, J.L., May, P.E.** (1989) *Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction*. Am. J. Hun. Genet.44 : 388-396.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1715443/>
87. **Werrett, D.J** (1997). *The national DNA database*. Forensic Sci Int; 88:33-42. Doi: 10.1016 / s0379-0738 (97) 00081-9
Disponible sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073897000819>
88. **Wickenheiser R.A.** (2002). *Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact*. Journal of Forensic Science, 47(3): 442–450.
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12051321>
89. **Xenophontos, S., V. Christofi, G. Iosif, P. Polycarpou, P. Manoli, N. Demetriou, MA Cariolou** (2015). *Validation interne du kit QIAamp DNA Investigator, du kit QIAamp 96 DNA Swab BioRobot et du système BioRobot Universal pour l'extraction de l'ADN à partir d'échantillons de référence et de scènes de crime*. Forensic Science International: Genetics, 14, e8 – e10. doi: 10.1016 / j.fsigen.2014.10.020
Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25465763>

Livres :

1. **Ameziane, N., Bogard, M., Lamoril, J.** (2005). *Principe de biologie moleculaire en biologie clinique*, Paris : Elsevier Masson.705p.
2. **Butler, J.M.** (2001). *Forensic DNA Typing: Biology and Technology behind STR Markers*.1st edition.nature Academique Press, Londres.322p.
3. **Butler, J.M.** (2005). *Forensic DNA typing : Biology, technology, and genetics of STR markers*. 2nd ed New York : Elsevier.688p.
4. **Butler, J.M.**(2010). *Fundamentals of forensic DNA typing*.1st Edition. Elsevier Académique Press, San Diego, USA.519p.
5. **Butler J. M.** (2011). *Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology*. 1st edition. Elsevier Academic Press, San Diego.704p.
6. **Butler, J.M.** (2014). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*, Elsevier Science, Oxford, UK.
7. **Coquoz R.** (2003). *Preuve par l'ADN. La génétique au service de la justice*. Presse polytechniques et universitaires romandes, Lausanne
8. **Coquoz,R., Compte, J.,Hall, D.,Hicks, T., Taroni,F.,** (2013). *Preuve par l'ADN : la génétique au service de la justice*. 3eme Edition, Presse polytechniques et universitaire romandes.Lausanne.458p.
9. **Coquoz R.,Taroni F.** (2006). *Preuve par l'ADN: La génétique au service de la justice*.2ème édition. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne.
10. **Doutremepuich C.** (2001). *10 ans D'empreintes Génétiques*, collection dirigée par JEANS6CLAUCE Karensenty. Edition La Documentation Française.228p
11. **Doutremepuich C., Morling N.**(2004). *Progress in Forensic Genetic*. tome 10, Elsevier.652p.
12. **Etienne J. et Clauser E.** (2001). *Biochimie génétique – Biologie moléculaire*. Masson édition, p16.
13. **Généthon** (2001). *La PCR quantitative en temps réel ou la 'TAQMAN'*. Centre de recherche et d'application sur les thérapies géniques. (<http://www.genethon.fr>).9p.
14. **Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S.** (2007) *An introduction to forensic genetics*. 2nd edition. John Wiley and Sons Ltd, USA.162p.
15. **Linacre A et Tobs S.S.** (2013). *Wildlife DNA analysis. Application in forensic science*. 1st edition. John Willey et Sons Ltd, England.350p.
16. **Sozer,A.C.**(2014) *DNA analysis for missing person identification in mass fatalities*. CRC Press,Taylor &Francis Group,London,312p..
17. **Taupin, J.M.** *Introduction to forensic DNA evidence for criminal justice professionals*, (2008).192p.
18. **Walker J. M., Rapley R.** (2008). *Molecular biomethods handbook*.2nd Edition. Humana Press, Springer Science.1103p.

Manuels :

1. **Applied Biosystems.**(2001). Département d'identification humaine. Manuel de l'utilisateur du kit d'amplification PCR AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Identifier TM . Foster City (CA): Biosystèmes appliqués. Disponible sur : http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_076395.pdf
2. **Identifier $\text{\textcircled{R}}$ Plus PCR Amplification Kit User Guide** (2015).
Disponible sur : http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_076395.pdf
3. **Manuel du Thermocycleur9700ABI, 2010**
4. **PowerPlex $\text{\textcircled{R}}$** (2014). ESI 16 System Technical Manual (Promega Corporation). Instructions for use of Products DC6770 and DC6771. Revised 6/14 TMD027.
5. **QIAamp DNA Investigator Handbook.** (2012).
6. **Quantifiler Kits, Guide, User Manual,** (2012).

Sites visités:

1. **Cécile Dumas.** (2012). *Génome : pour en finir avec l'ADN "poubelle"*. Science et avenir. Disponible sur : https://www.sciencesetavenir.fr/fondamental/genome-pour-en-finir-avec-l-adn-poubelle_22979
2. **Frédéric Frangeul,**(2013). *Ces traces biologiques nous "trahissent"*.
Disponible sur : http://auvergne.udppc.asso.fr/IMG/pdf/IRCGN_-_Laboratoire_de_criminalistique_-3_3-.pdf
3. **Jouquand S.** (2008). *Homicides : En l'absence de liquide biologique permettant d'avoir de l'ADN en grande quantité, les traces de contact peuvent suffire à confondre un agresseur*. La lettre de l'Institut Génétique Nantes Atlantique. Ressources génétiques n° 05.
4. **Pillou, J.F.**(2014). *Test de Kastle-Meyer*. Le journal des femmes santé.
5. www.bluestar-forensic.com
6. Police scientifique 2014.

Thèses:

7. **Iglesias, M.** (2009) : *Ajout d'un contrôle d'inhibition dans des Kits STR MULTIPLEX*, Travail de diplôme, Laboratoire AURIGEN, Lausanne.p79
Disponible sur : <https://docplayer.fr/10502163-Ajout-d-un-controle-d-inhibition-dans-des-kits-str-multiplex.html>
1. **Loistron Soléna,** (2009). *Les empreintes génétiques en médecine légale : réalisation, législation*. Thèse de doctorat Unité de formation et de recherche d'odontologie, Université de Nantes, France.
2. **Petkovski, E.**(2006). *Polymorphisme ponctuels de séquence et identification génétique : étude par spectrométrie de masse MALDI-TOF*. Thèse de doctorat Université Louis Pasteur Strasbourg, France.
3. **Tucker, K.,** (2010). *A COMPARATIVE STUDY OF TOUCH DNA RECOVERY FROM METALS*. Oklahoma State University. Disponible sur : https://shareok.org/bitstream/handle/11244/45322/Tucker_okstate_0664M_14159.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Annexes

Tableau I : Les différentes salles, équipements et réactifs utilisés lors du protocole d'analyse (Original, 2019) Annexe 01

Salles	Examen de scellés	Extraction	Quantification	PCR	Post-PCR	Electrophorèse capillaires
Equipements	-Ciseaux -Bistouri - pinces -Coupelles écouvillon -tubes	Centrifugeuse, Bloc chauffant, pipettes, micropipettes, Tips, eppendorf avec tube, Colonne QIAamp MinElute Column	Thermocycleur 7500 Fast Real Time PCR -Centrifugeuse pour plaque, plaque 96 puits, un film adhésif transparent,	Thermocycleur 9700 ABI Vortex, portoires, Tubes, Pipettes, Tips, plaque PCR à 96 puits, feuille d'aluminium	Thermocycleur 9700 ABI, plaque à 96 puits, septa strip, centrifugeuse pour plaque, cryobloque à glace	Support de plaque à 96 puits, séquenceur 3130XL Genetic analyser. Tampon PoP-4
Réactifs	Test Kastel Meyer, Test OBTI	QIAamp DNA Investigator Kit (50) de QIAGEN	Quantifiler™ Human DNA Quantification Kits	PCR AmpFℓSTR (®) Identifiler (®) plus	PCR AmpFℓSTR (®) Identifiler (®) plus Et AmpFISTR® Identifiler® Plus Allelic Ladder Formamide	Tampon De migration, l'eau ultra pure,

Les solution nettoyante (SDS et DNA Away), le Papier Paillasse, les portoires, le vortex, les tube eppendorfs, les pipettes, les micropipette et les Tips sont utilisables pour chaque étape sauf pour l'électrophorèse et présent dans chaque salle.

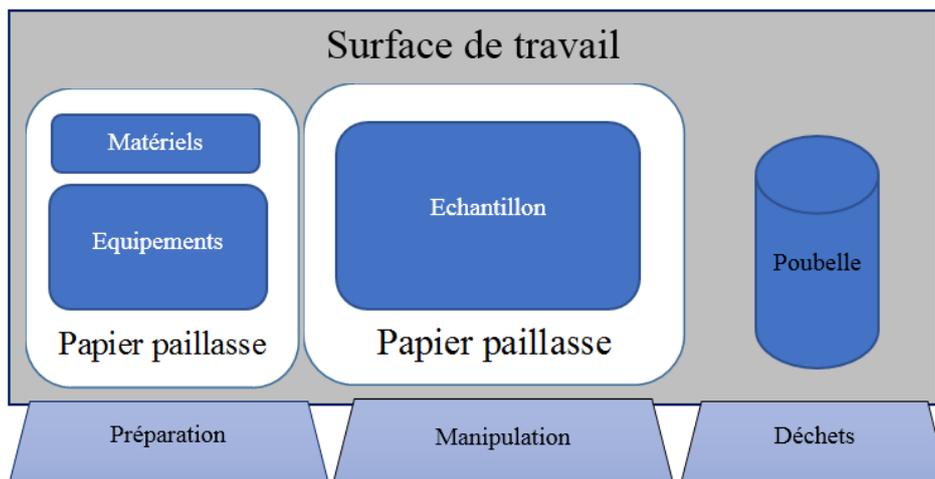
**Figure 01 : La surface de travail**

Tableau II : Identifiler™ Kit loci et allèles (annexe 3)
(AmpFlSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit User Guide, 2015)

Locus designation	Chromosome location	Alleles included in Identifiler® Plus Allelic Ladder	Dye label	Control DNA 9947A
D8S1179	8	8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™	13 [‡]
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		30 [§]
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 11
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 12
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19		VIC®
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	8, 9.3	
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	11 [#]	
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	11, 12	
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	19, 23	
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED™	14, 15
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		17, 18
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13		8 ^{††}
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		15, 19
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y		PET®
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	11 ^{§§}	
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	23, 24	

Tests préliminaires

Composition de la solution de Kastel Meyer : (annexe 4)



Poudre de Phénolphthaléine
(Original)



Poudre de zinc
(Original)



Poudre de potassium
(Original)

Réactifs du test Kastel Meyer : (Annexe 5)



(Original)

Pour le prélèvement par écouvillonnage :

Kastel Meyer

Kastel Meyer

Positif

Négatif



(Original)



(Original)

Pour le prélèvement par découpage :

Kastel Meyer

Kastel Meyer

Positif

Négatif



Reactif du test OBTI (Annexe 6)



(Original)

OBTI

Positif

Négatif



(Original)



(Original)

(Original)

(Original)

Les échantillons prélevés (annexe 7)

Affaire 01



Ech 1.1 (Original)



Ech 1.2 (Original)



Ech1.3 (Original)



Ech 1.5 (Original)



Ech 1.6 (Original)

Affaire 02



Ech 2.1 (Original)



Ech 2.2 (Original)



Ech2.3 (Original)



Ech 2.4 (Original)

Ech 2.5 (Original)

Ech2.6 (Original)

Affaire 03



Ech 3.1 (Original)



Ech 3.2 (Original)

Affaire 04



Ech 4.1 (Original)



Ech 4.2 (Original)



Ech 4.3 (Original)



Ech 4.4 (Original)



Ech 4.5 (Original)



Ech 4.6 (Original)



Ech 4.7 (Original)

Affaire 05



Ech 5.1 "Lame" (Original)

Ech 5.2 "Manche" (Original)

Affaire 06



Ech 6.1 (Original)



Ech 6.2 "Lame" (Original) Ech 6.3 "Manche" (Original)

Affaire 07



Ech 7.1 (Original)



Ech 7.2 (Original)

Affaire 08



Ech 8.1 (Original)



Ech 8.2 (Original)

Affaire 09



Ech 9.1 (Original)



Ech 9.2 (Original)

Affaire 10



Ech 10.1 (Original)



Ech 10.2 (Original)

Extraction (Annexe 8)



**Réactifs d'extraction
Qiagen (Original)**



**Colonne de silice de QIAmp
MinElute Column (Original)**



**Tube de (2ml)
Qiagen (Original)**



Vortex (Original)



**Agitateur avec Plaque
chauffante (Original)**



**Centrifugeuse
(Original)**

Post-Amplification (Annexe 11)



Identifier® Plus Allelic Control DNA Ladder (Original)



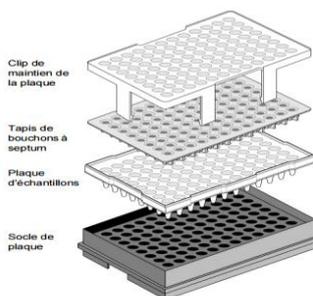
9947A (Original)



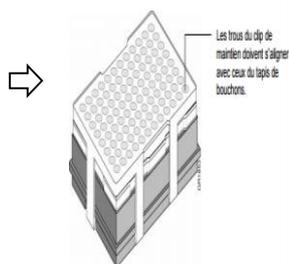
Formamide (Original)



Thermocycleur 9700 ABI (Original)



Septa Strip



Cryobloc (Original)



Post-Amplification (Annexe 12)



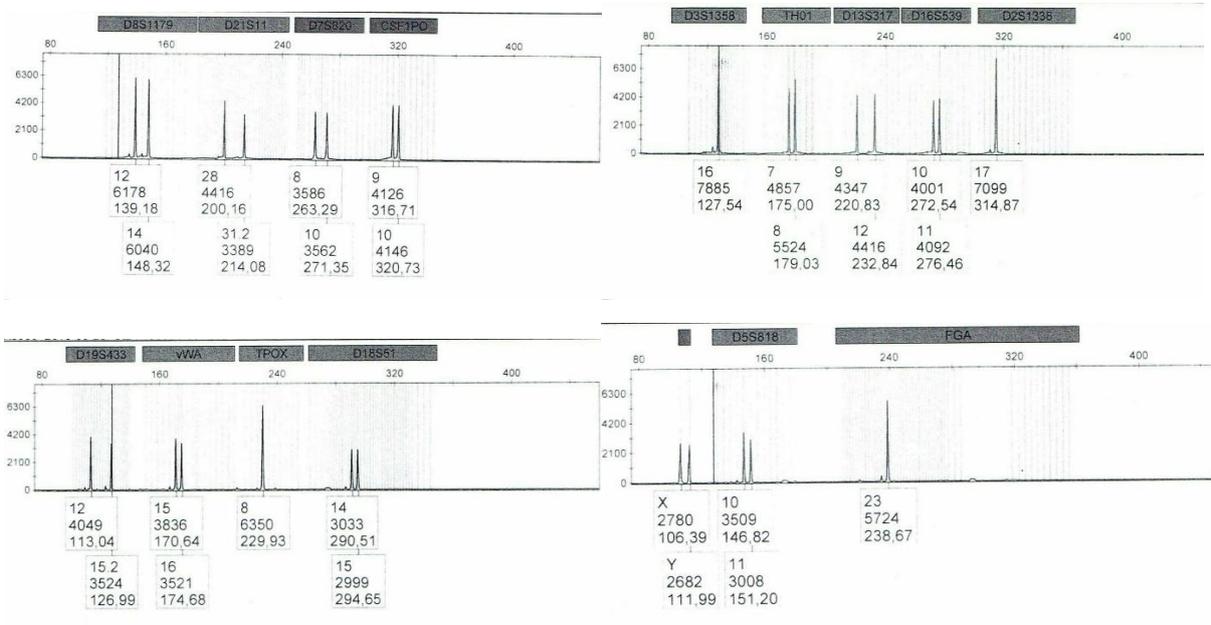
Tampon de Migration PoP-4



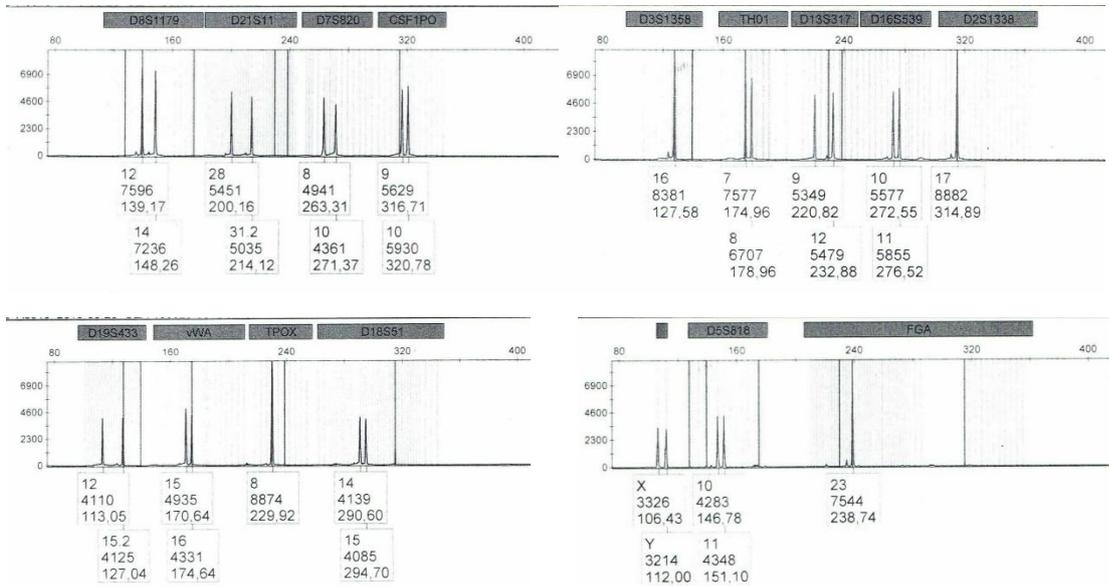
3130xl Genetic Analyzer (Original)

Les profils (Annexes 13)

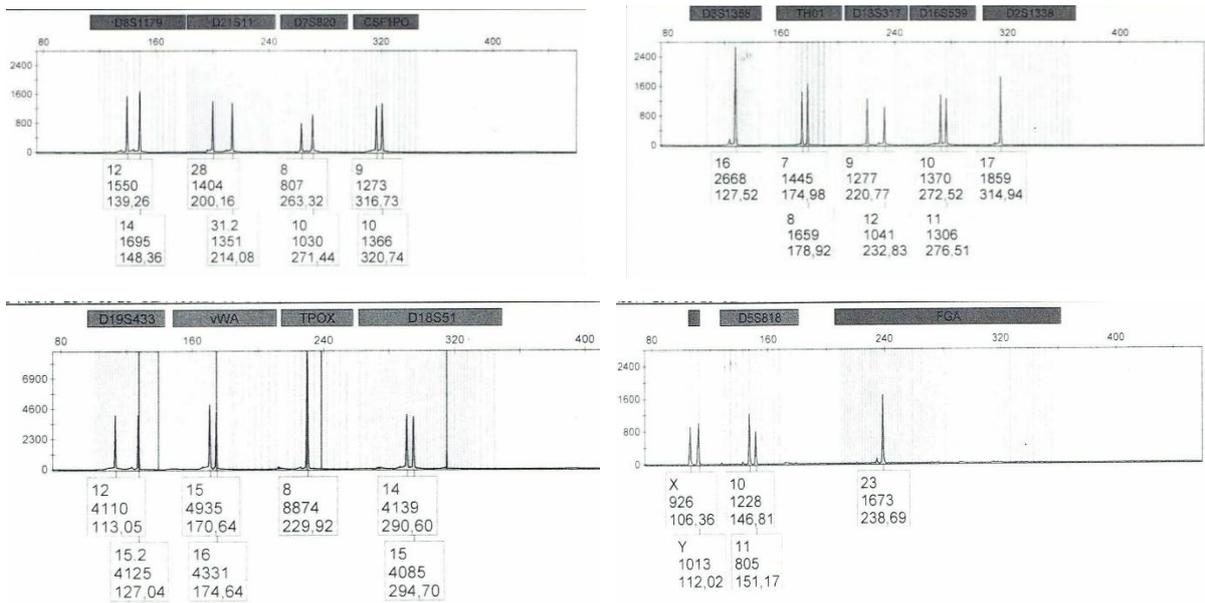
Ech 1.1



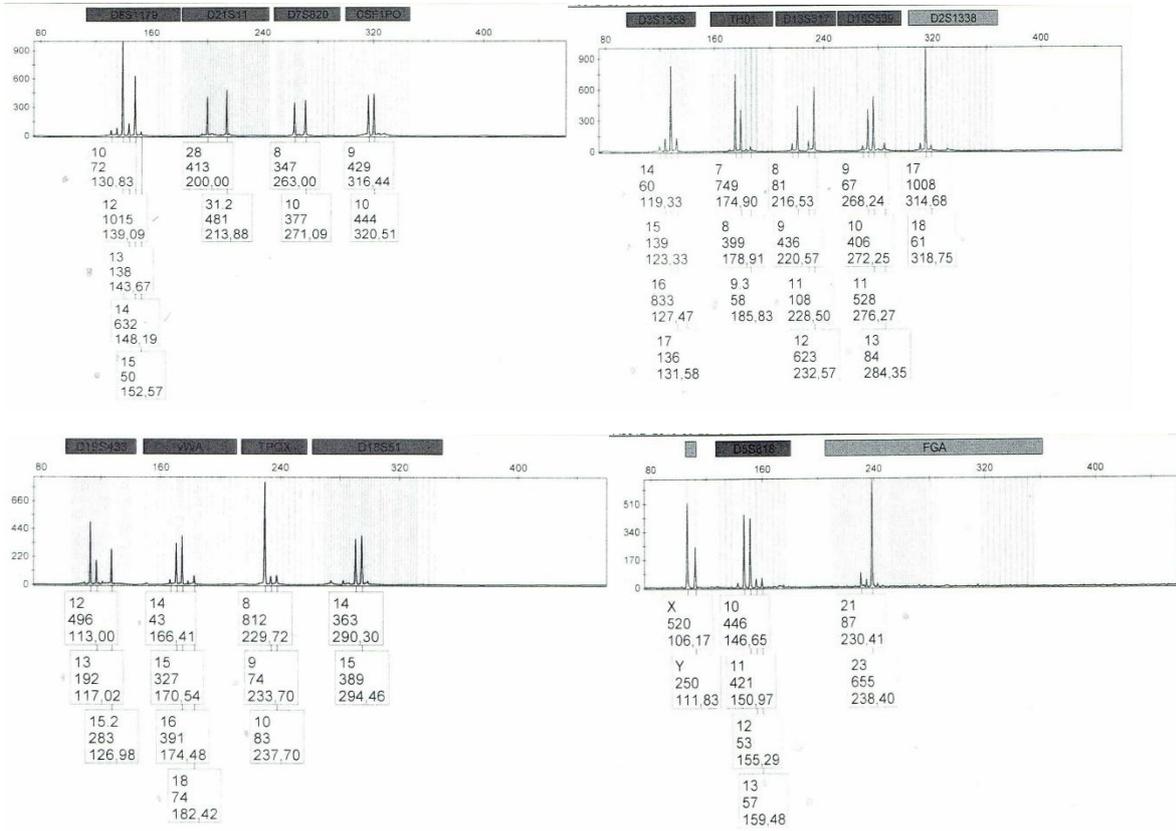
Ech 1.2



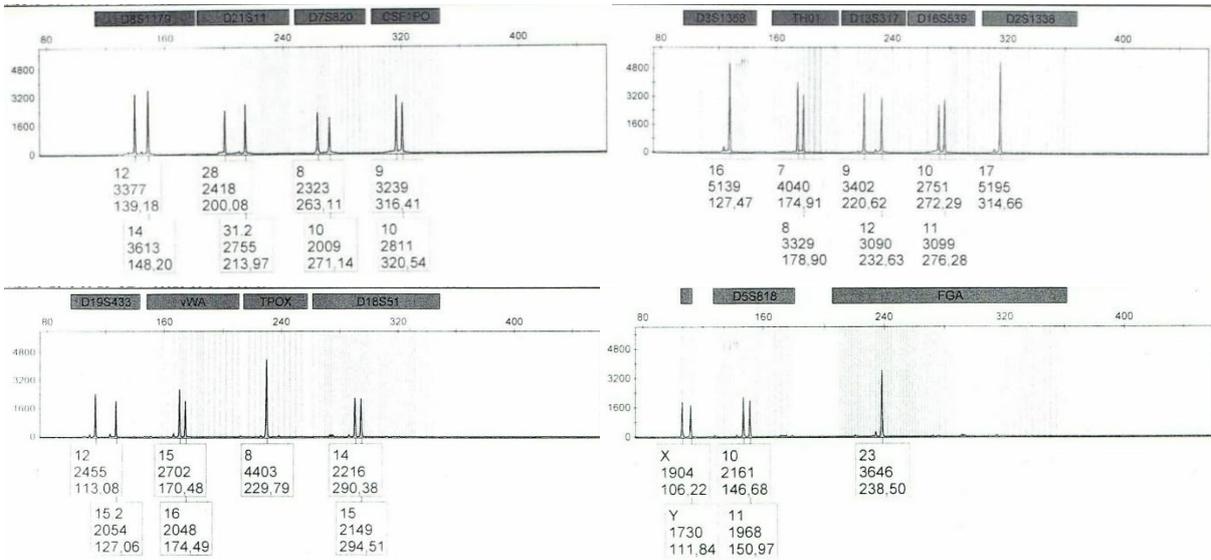
Ech 1.3



Ech 1.4



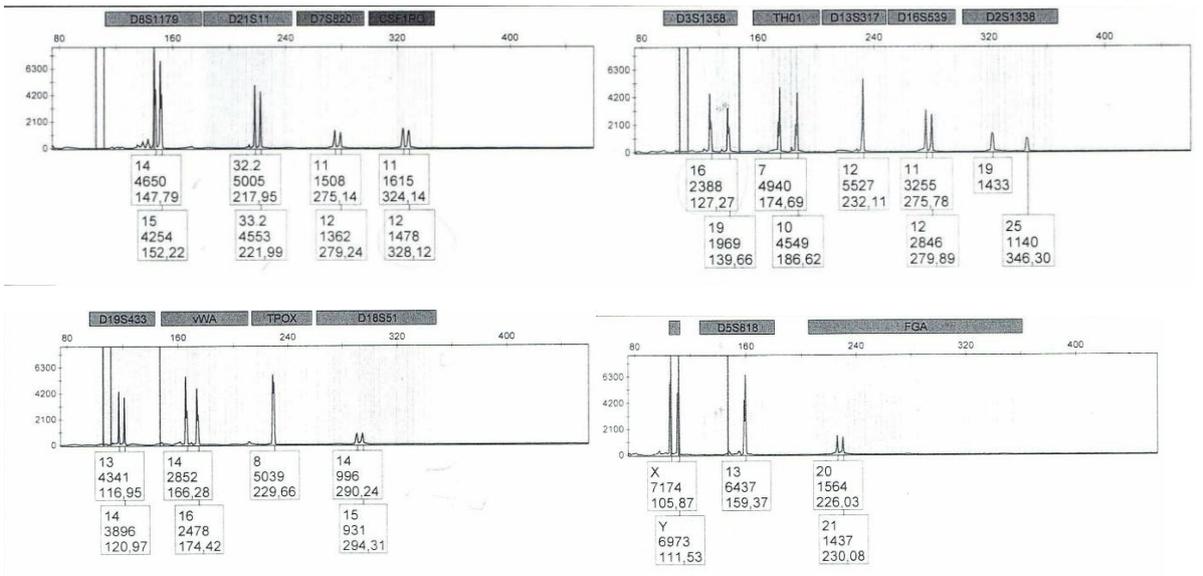
Ech 1.5



Ech 2.1



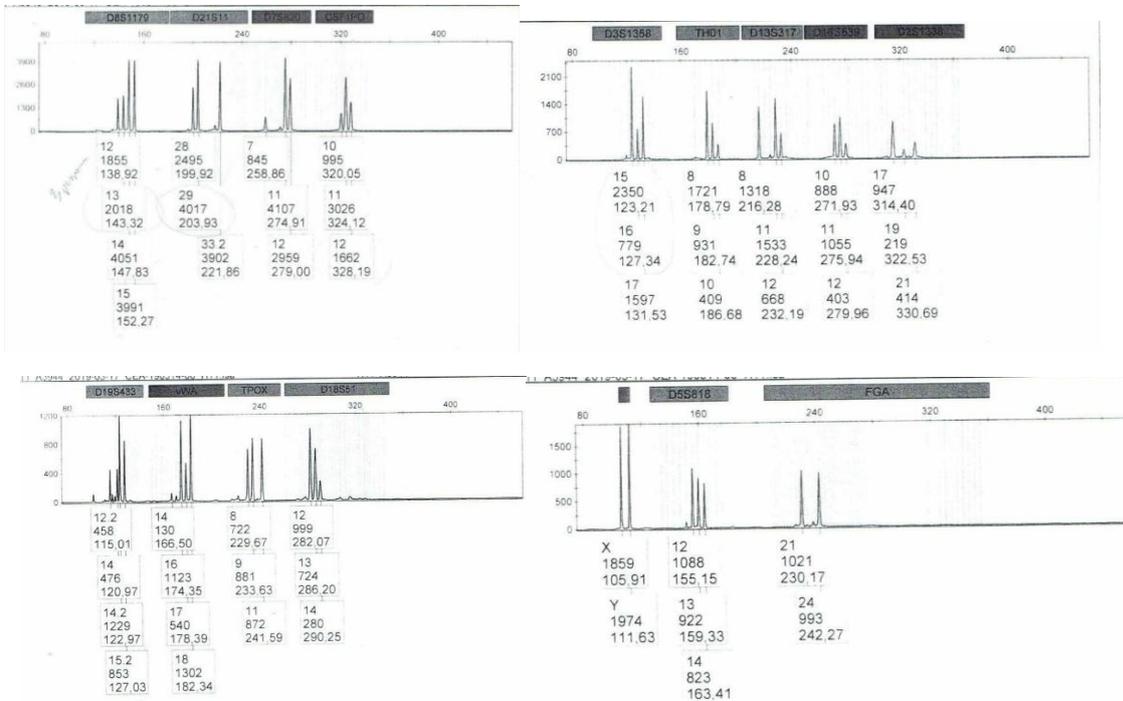
Ech 2.2



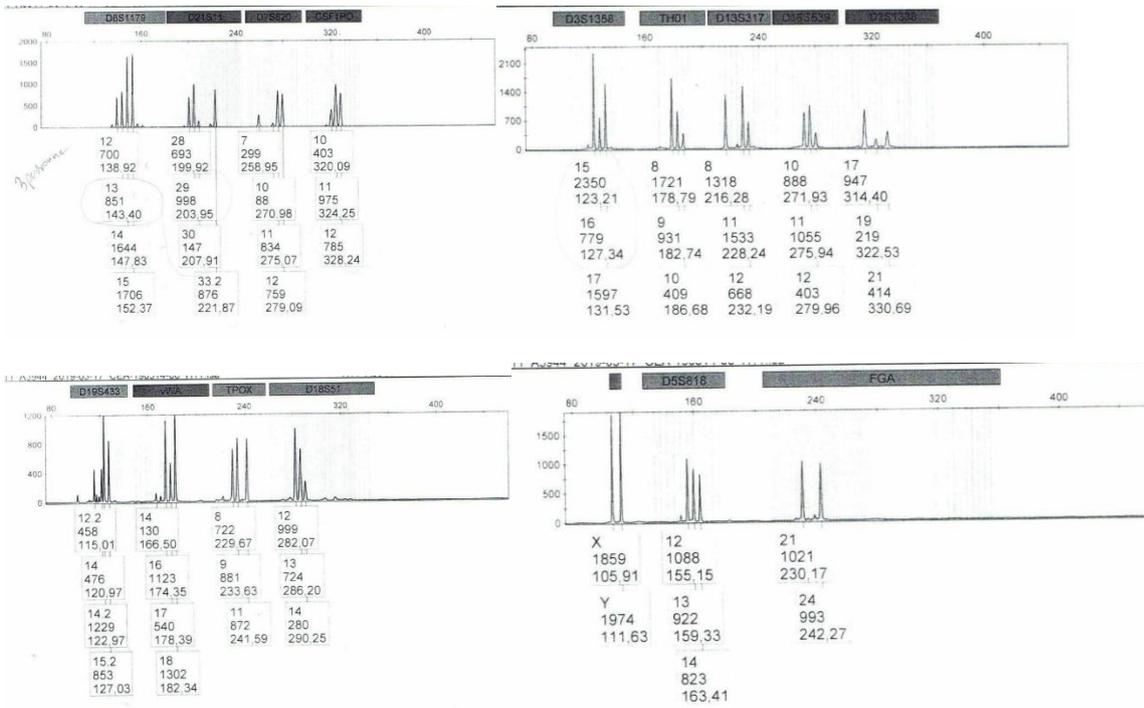
Ech 2.3



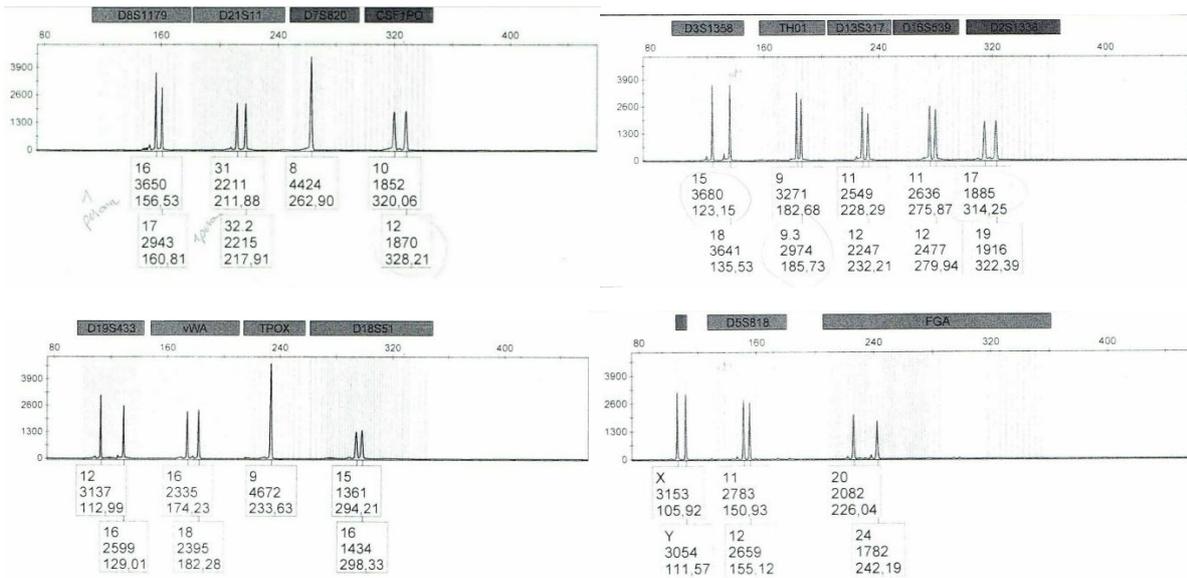
Ech 2.4



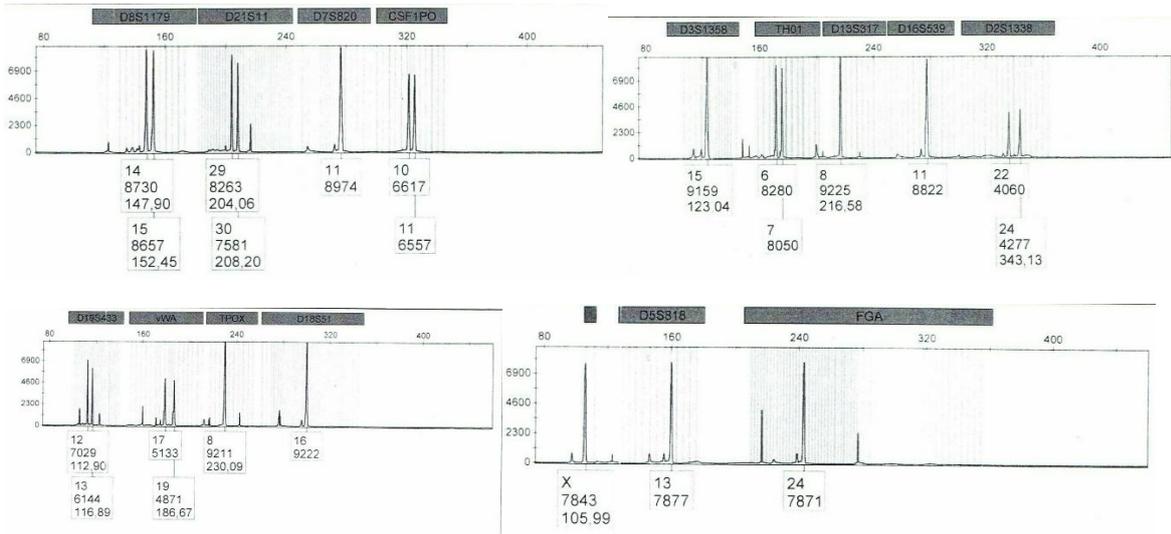
Ech 2.5



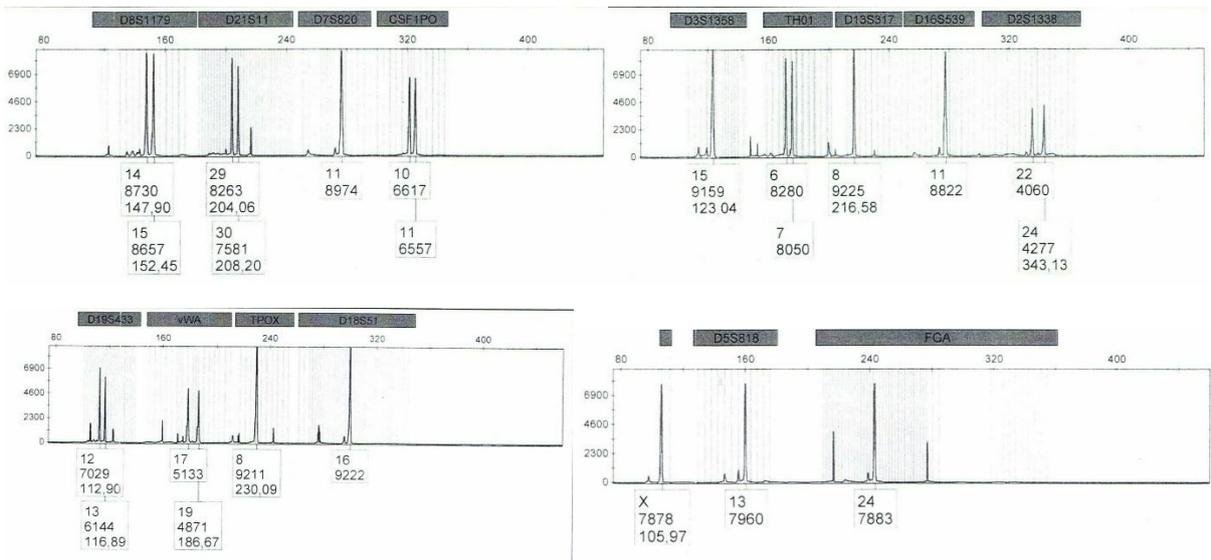
Ech 2.6



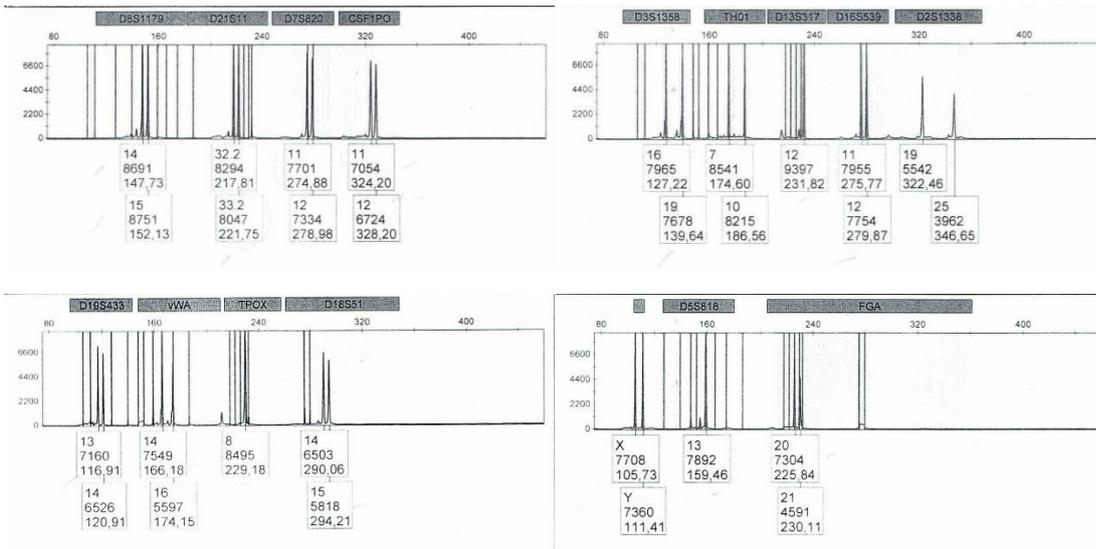
Ech 3.1



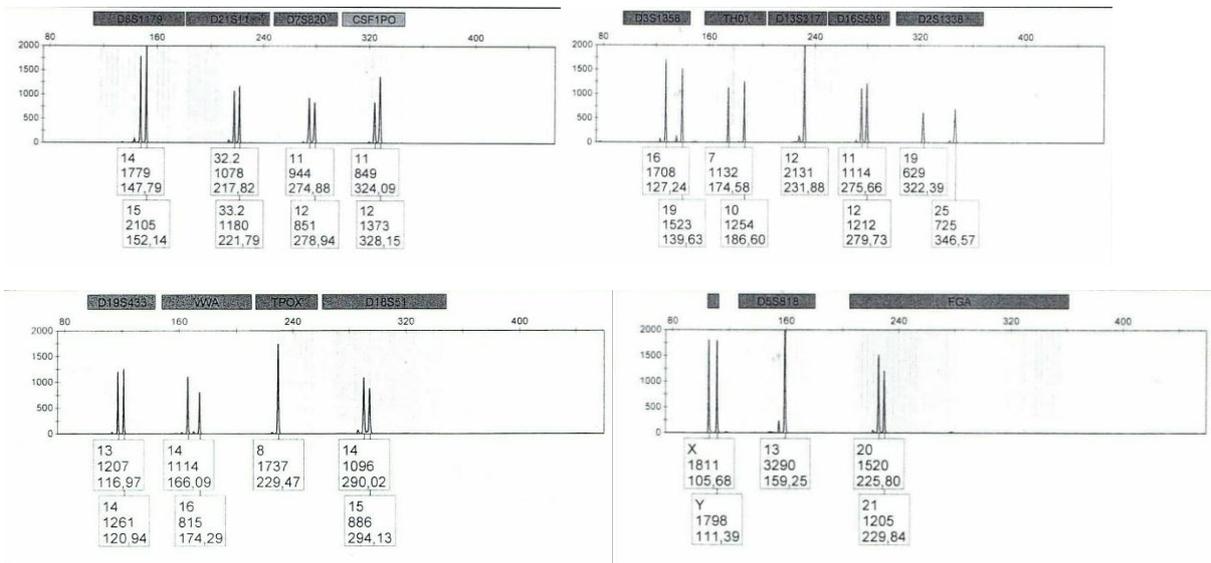
Ech 3.2



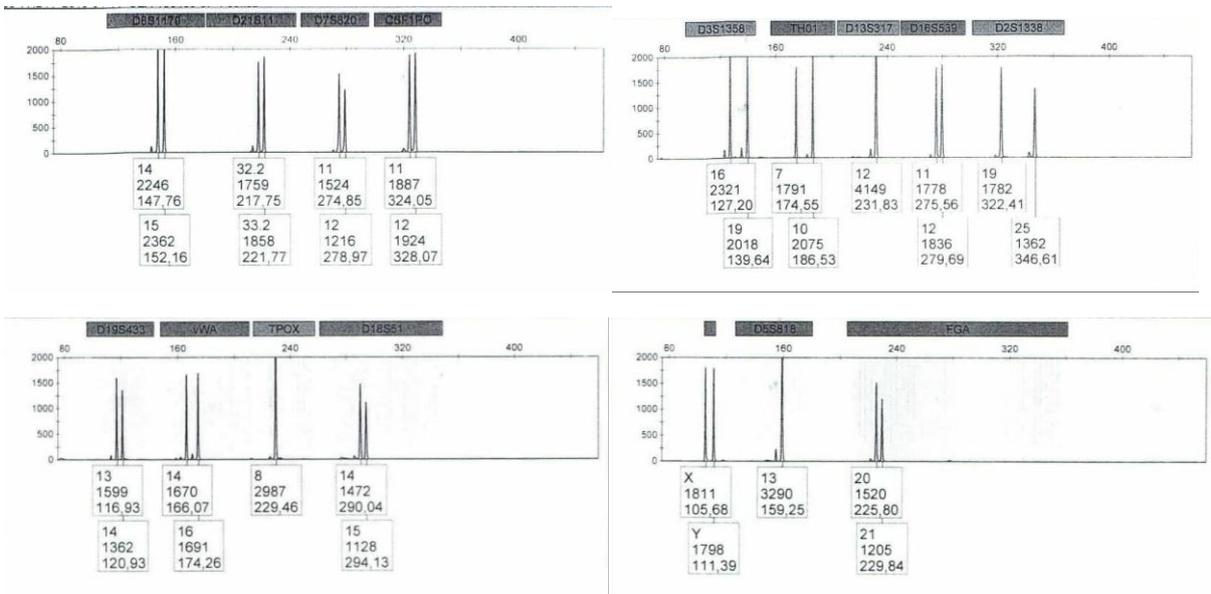
Ech 4.1



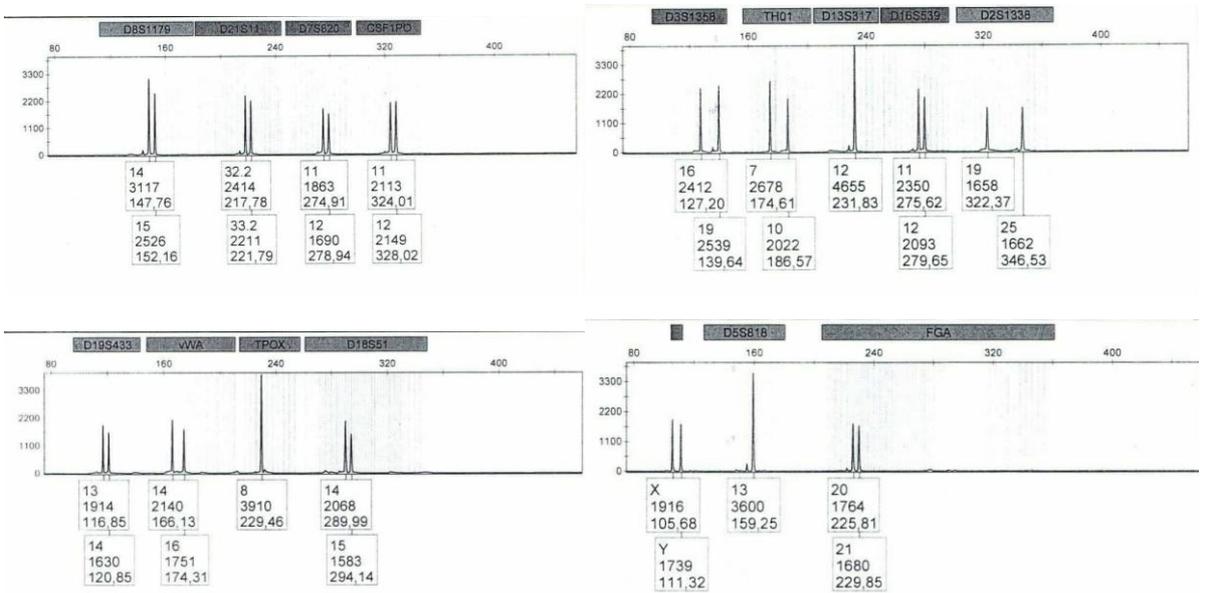
Ech 4.2



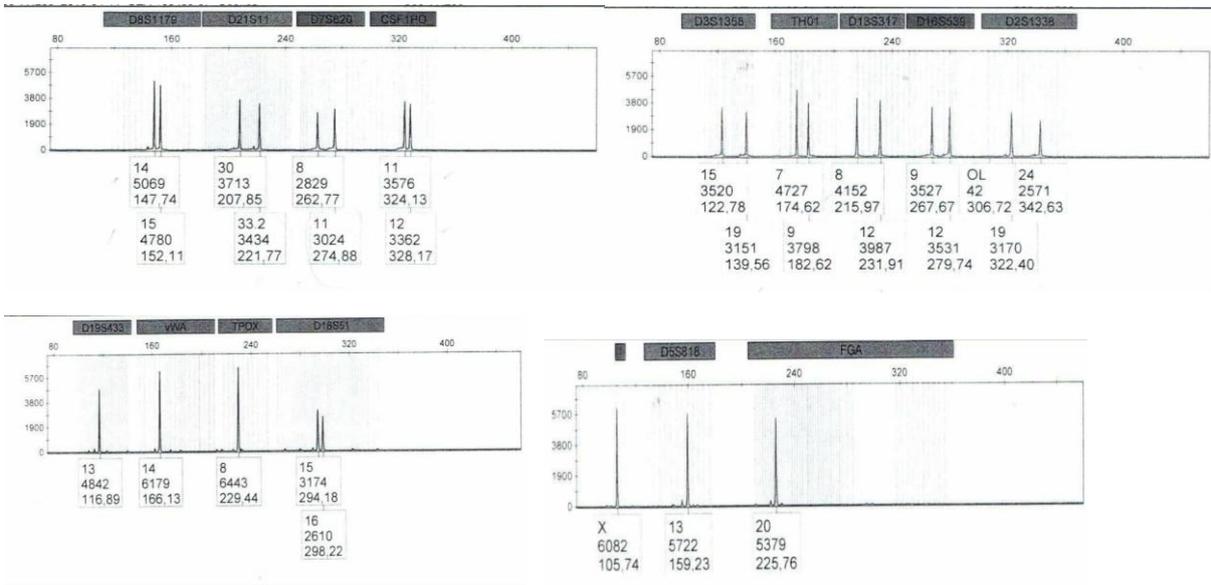
Ech 4.3



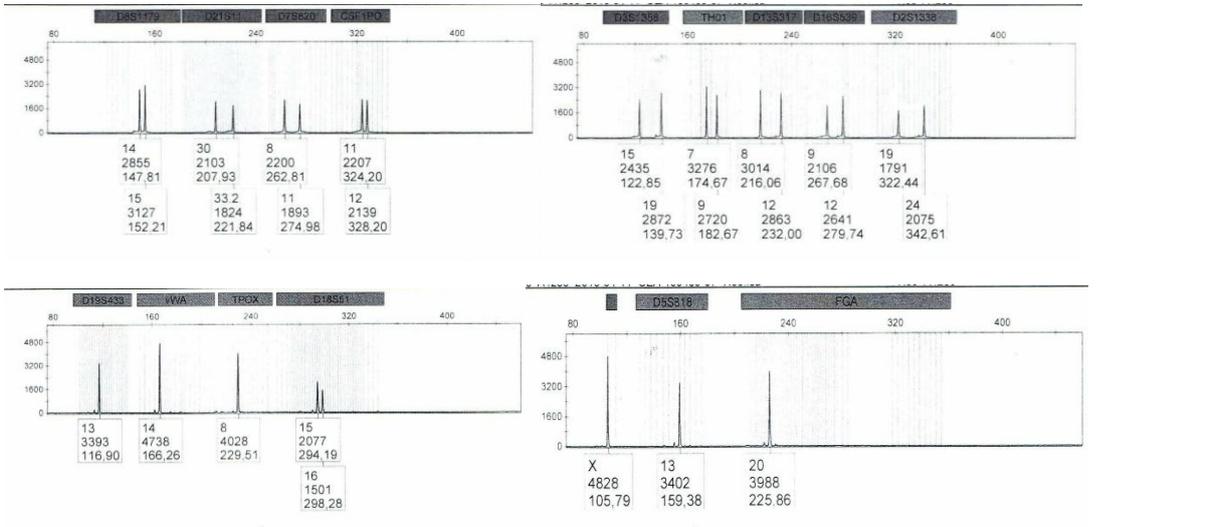
Ech 4.4



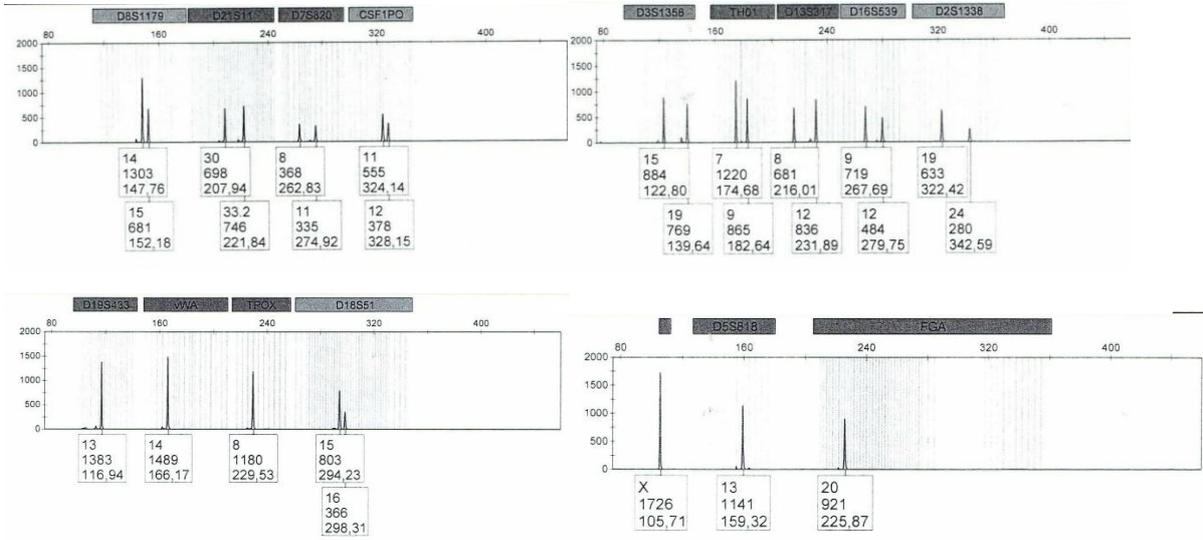
Ech 4.5



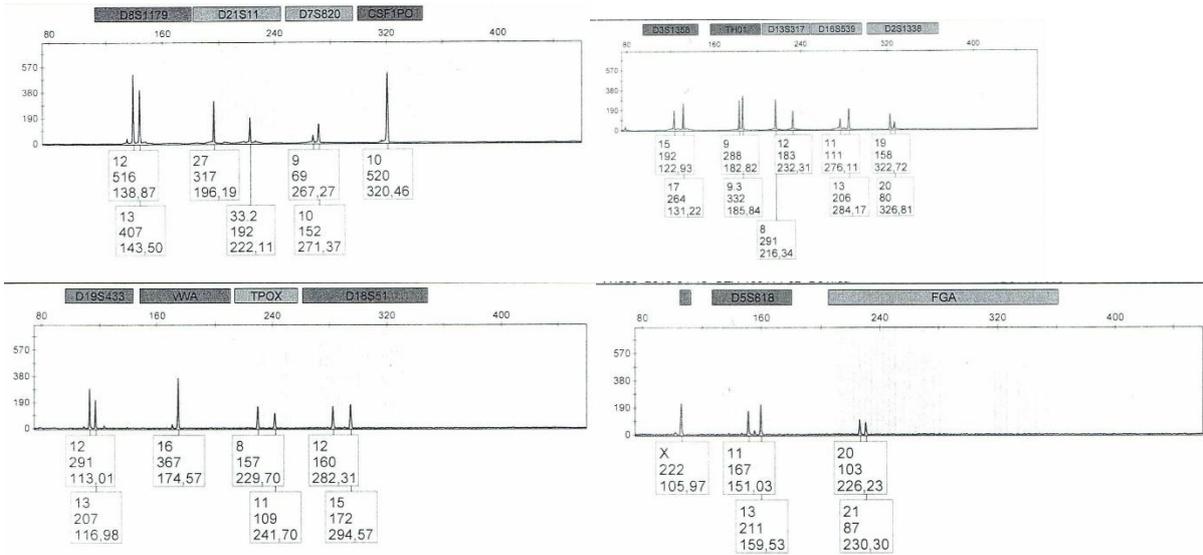
Ech 4.6



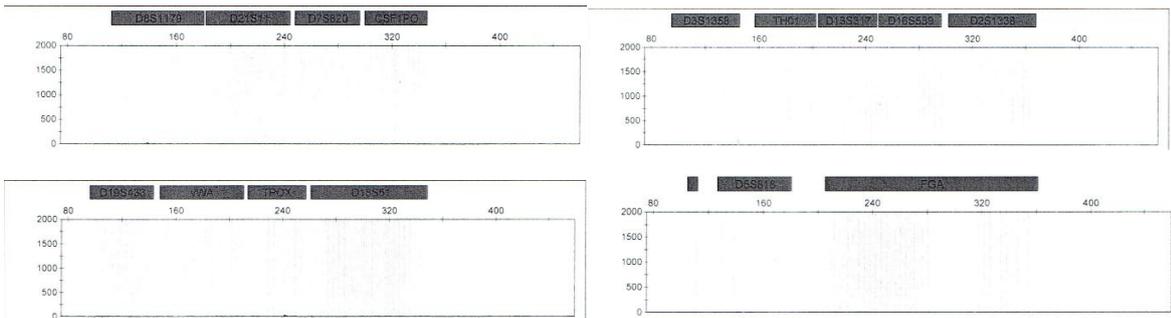
Ech 4.7



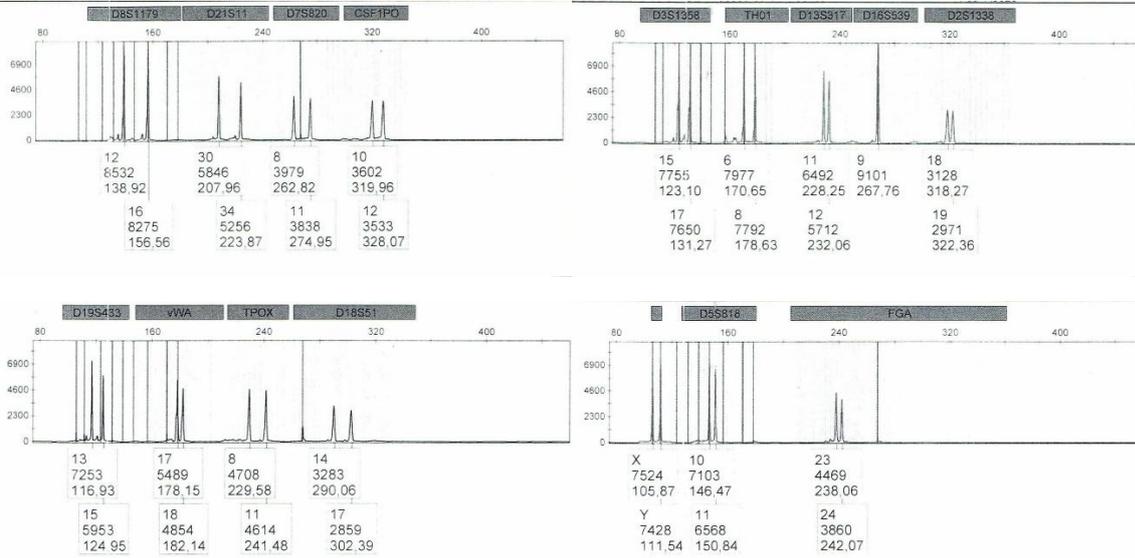
Ech 5.1



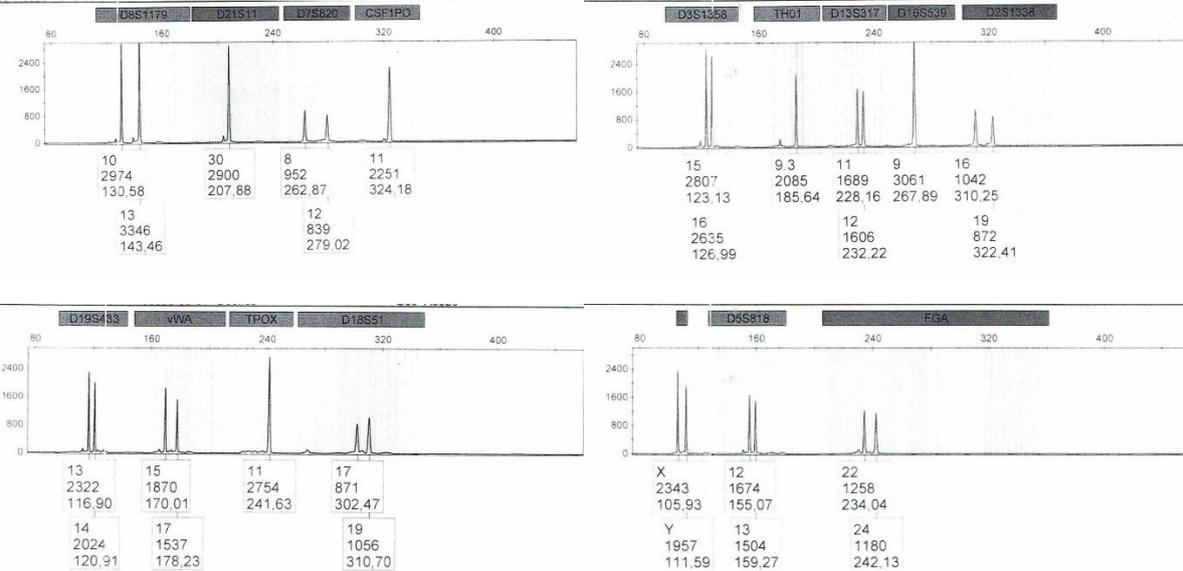
Ech 5.2



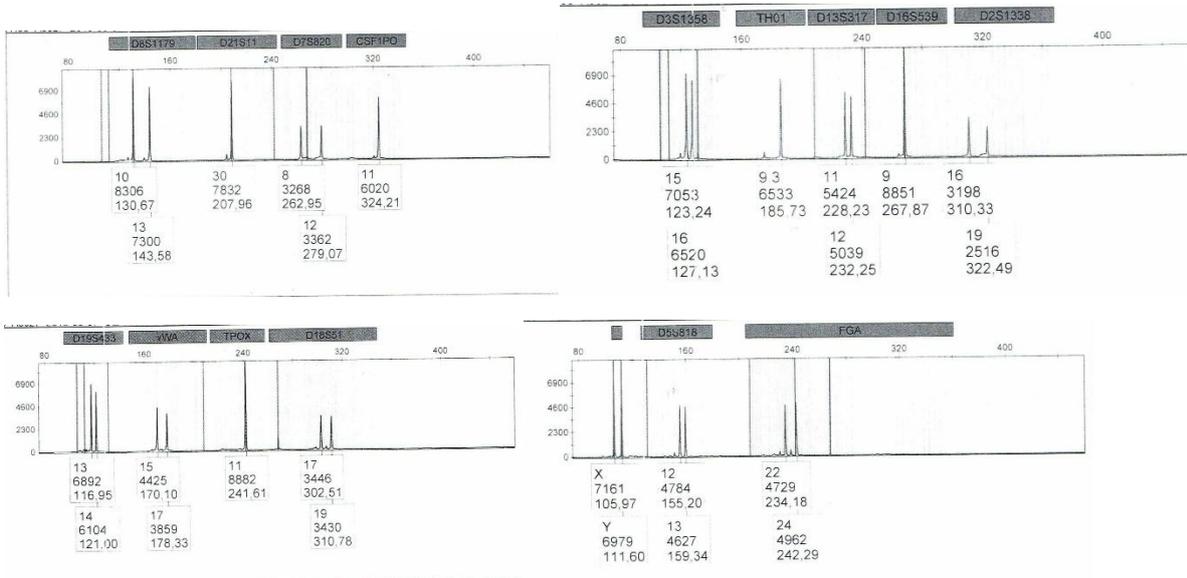
Ech 6.1



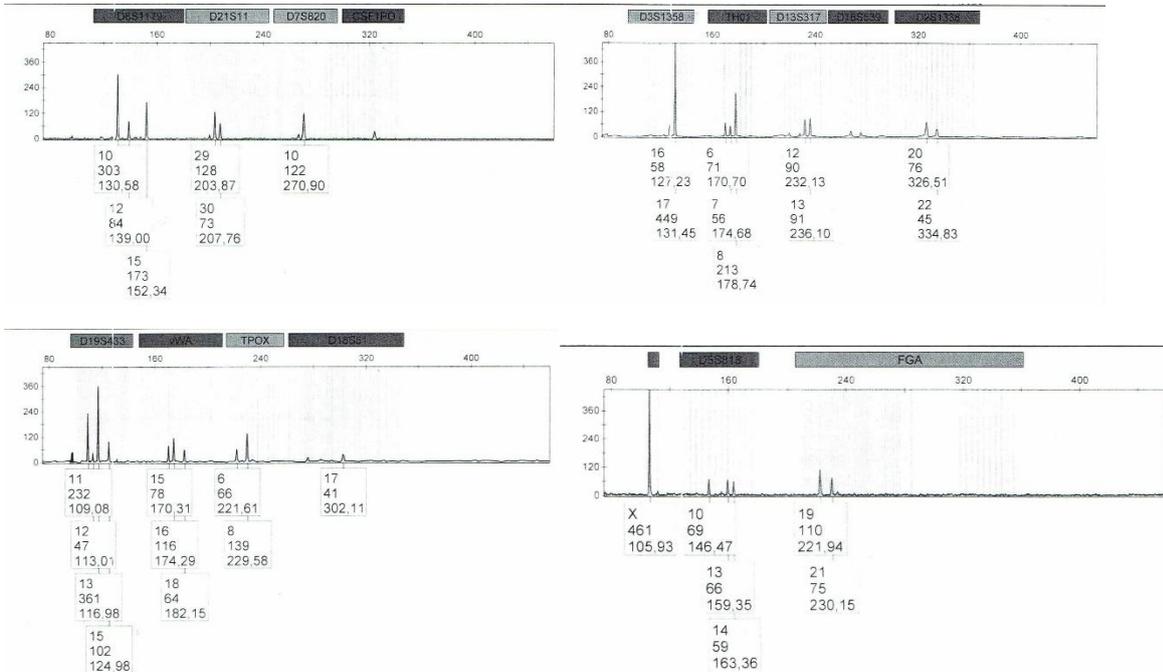
Ech 6.2



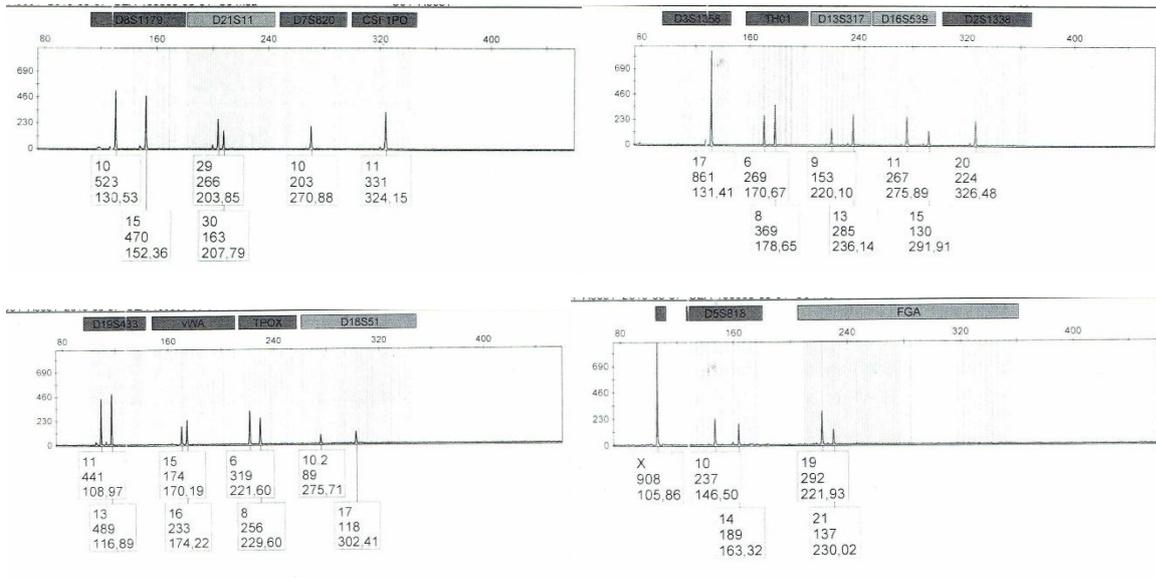
Ech 6.3



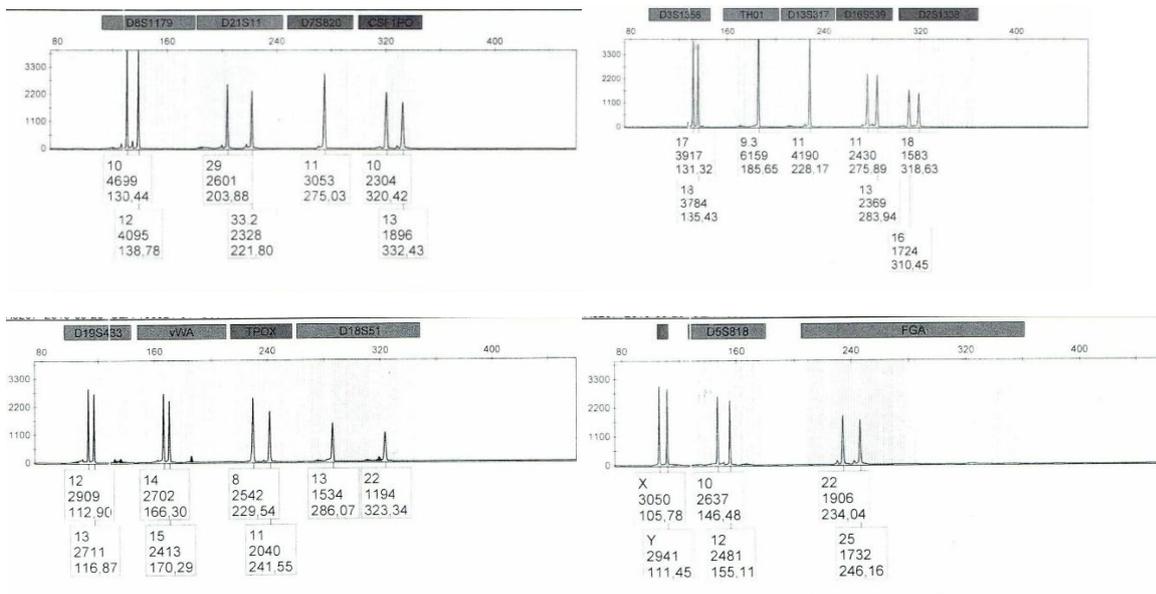
Ech 7.1



Ech 7.2



Ech 8.1



Ech 8.2

