



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Option : Génétique

Thème

**Etude quantitative et qualitative de
l'influence du temps sur la
concentration des traces de sang**

Présenté par : M^{elle} GUENDOUZ Chaima

soutenu le : 06/07/2023

Devant le jury :

Nom	Grade /Lieu	Qualité
Mme ROUAKI F.	MCA /USDB1	Présidente
Mme AISSANI R.	MCB/USDB1	Examinatrice
Mme KHALDOUN H.	MCA/USDB1	Promotrice
Mme BELABES S.	IP/LPS(DGSN)	Co-Promotrice

Année universitaire : 2022/2023

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, Louange à DIEU le tout puissant, de m'avoir donné le courage, la force, la santé et l'opportunité de mener à bien ce modeste travail.

Ces considérations vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté des Sciences Biologique ,pour la richesse et la qualité de leur enseignement .

*Je adressé mes sincère remerciements à **Madame KHALDOUN.H** pour avoir dirigé ce Mémoire, ainsi que pour son aide et sa gentillesse, ses connaissances transmises, ses judicieux conseils, sa patience et ses encouragements.*

*J'exprime également mes gratitude à ma co-promotrice **Madame BELABES.S** pour le sérieux dans le suivi de mon travail dans tous ces détails et d'avoir partagé avec mois son expérience ainsi que ca disponibilité malgré ses obligations professionnelles et son aide très apprécié dans l'accomplissement de ce travail.*

Par la même volonté et la même chaleur , Je remercie grandement les membres de jury d'avoir accepté de faire partie de la commission d'examineurs:

***Madame ROUAKI. F** d'avoir accepté de présider le jury.*

***Madame AISSANI.R** qui a bien voulu participer à ce jury et examiner ce travail.*

*Mes remerciements les plus sincères à **Monsieur MOHAMED SAID**, notre chef d'option.*

*Le projet de fin d'études a été réalisé au niveau de la sous-direction de la police scientifique et technique. Je tiens à remercier vivement **Madame DENNI .N** ,le docteur **BRAHITI.H** , Commissaire Principal de La police, Mme **BELKHIRAT.S**, chef du département d'identification génétique.*

Merci a toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.



Dédicaces:

C'est avec profonde gratitude et sincères mots , que je dédie ce modeste travail de fin d'étude:

*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*

*A moi, à toi **mon père.***

*Je dédie aussi cet travail à ma chère sœur **Yassmin** et son mari **Hamza** .*

*A mes sœurs **Hadil, Sarah, Israa** puisse DIEU vous*

Donne santé , bonheur ,courage et surtout réussite.

*A mon adorable nièce , ma petites princesses **Amani** qui sait toujours comment procurer la
joie et le bonheur pour toute la famille.*

*A mon soutien moral et source de joie et de bonheur ,mon fiancé **Hamza** pour
l'encouragement et l'aide qu'il ma toujours s'accorde.*

*A mes chères amies **Khaoula , Malak , Nassima , Chahrazed***

*Enfin je le dédie a tous les membres de la famille **GUENDOUZ**, et a tout ceux qui ont*

Participé à l'élaboration de ce modeste travail et tous ceux qui nous sont chers.

Chaima

Résumé:

Le présent travail vise d'une part à mettre en évidence l'influence du temps sur la qualité et la quantité des traces de sang conservées sur deux supports différents, un tissu d'un effet vestimentaire et une trace de sang prélevée sur écouvillon Daltalab , et d'autre part de rechercher les modifications du profil génétique en fonction du temps.

Nous avons sélectionné 15 échantillons obtenus à partir des scènes de crimes datant de 2015 de natures et d'origines différentes, et conservés dans les mêmes conditions de température et d'humidité. Ces échantillons biologiques repris huit ans après (en 2023), ont été analysés, Une réextraction de l'ADN a fait remarquer que la même méthode d'extraction à savoir par le kit *Qiamp Investigator* qui a été utilisée en 2015 et 2023. Suivi d'une quantification réalisée par deux kits différents, respectivement, le kit *Quantifiler Human de thermofisher* en 2015, et le kit *Quantiplex Pro de Qiagen* en 2023 a fin d'estimer la quantité d'ADN humain. Cette analyse a été complétée par l'obtention du profil génétique, pour les deux années par une PCR multiplex avec le kit *Identifier Plus*.

Nos résultats montrent une diminution de la concentration de l'ADN des traces de sang conservées sur tissu (10 échantillons) , cependant, une même concentration a été obtenue pour celles conservées sur écouvillon stérile (5 échantillons) en 2015 et en 2023.

Par ailleurs nous avons établi un profil génétique exploitable ,interprétable et complet de la trace du sang conservée sur tissu. Bien qu'une nette diminution de la concentration de l'ADN de notre échantillon a été constaté, passée de 3.5ng/μl à 0,03 ng/μl, celui-ci n'a pas subi de dégradation.

En conclusion, les traces de sang sont des sources d'ADN importantes dans le domaine criminalistique permettant l'identification d'individus et la recherche de filiation parentale.

Mots clés : Sang, ADN, Extraction, quantification ,qualification, profil génétique ,PCR multiplex.

Abstract

The aim of this study is to highlight the influence of time on the quality and quantity of blood traces preserved on two different media, a fabric from a clothing effect and a blood trace taken from a Daltalab swab, and to investigate changes in the genetic profile as a function of time.

We selected 15 samples of different types and origins obtained from crime scenes in 2015, and stored under the same conditions of temperature and humidity. These biological samples, taken eight years later (in 2023), were analysed. DNA extraction was performed using the same extraction method, namely the Qiamp Investigator kit, that was used in 2015 and 2023. This was followed by quantification using two different kits, respectively, the Quantifiler Human kit from thermofisher in 2015, and the Quantiplex Pro kit from Qiagen in 2023, to estimate the quantity of human DNA. This analysis was completed by obtaining the genetic profile for both years using multiplex PCR with the Identifiler Plus kit.

Our results show a decrease in the concentration of DNA in blood traces preserved on tissue (10 samples), but the same concentration was obtained for those preserved on sterile swabs (5 samples) in 2015 and 2023.

In addition, we established a usable, interpretable and complete genetic profile of the blood trace preserved on tissue. Although there was a clear decrease in the concentration of DNA in our sample, from 3.5ng/ μ l to 0.03 ng/ μ l, there was no degradation.

In conclusion, blood traces are important sources of DNA for forensic identification of individuals and parental filiation.

Key words: Blood, DNA, Extraction, quantification, qualification, genetic profile, multiplex PCR.

ملخص

يهدف هذا العمل، من جهة، إلى تسليط الضوء على تأثير الوقت على نوعية وكمية آثار الدم المخزنة على دعمتان مختلفتان، قطعة قماش ملابس و آثار دم مأخوذة من مسحة دالتلاب ومن ناحية أخرى البحث عن التغييرات ملف الحمض النووي مع مرور الوقت.

اخترنا 15 عينة تم الحصول عليها من مسارح الجريمة التي يعود تاريخها إلى عام 2015 من طبيعة وأصول مختلفة، وتم الاحتفاظ بها في نفس ظروف درجة الحرارة والرطوبة. تم تحليل هذه العينات البيولوجية المأخوذة بعد ثماني سنوات (في عام 2023)، وأشار استخراج الحمض النووي إلى أن طريقة الاستخراج نفسها بالتحديد عن طريق مجموعة Qiamp Investigator التي تم استخدامها في 2015 و 2023. تبعها تقدير كمي نفذته مجموعتان مختلفتان، على التوالي، مجموعة Quantifiler Human Kit من Thermofisher في عام 2015، ومجموعة Quantiplex Pro من Qiagen في عام 2023 من أجل تقدير كمية الحمض النووي البشري. تم الانتهاء من هذا التحليل من خلال الحصول على ملف التعريف الجيني لمدة عامين عن طريق تعدد الإرسال PCR مع مجموعة Identifiler Plus.

تظهر نتائجنا انخفاضاً في تركيز الحمض النووي لآثار الدم المحفوظة على الأنسجة (10 عينات)، ومع ذلك، تم الحصول على نفس التركيز لتلك المحفوظة في مسحة معقمة (5 عينات) في عام 2015 و عام 2023. بالإضافة إلى ذلك، قمنا بإنشاء ملف جيني كامل وقابل للاستغلال وقابل للتفسير لتتبع الدم المحفوظ على الأنسجة. على الرغم من ملاحظة انخفاض واضح في تركيز الحمض النووي لعينتنا، من 3.5 نانوغرام / ميكرو لتر إلى 0.03 نانوغرام / ميكرو لتر، إلا أنه لم يخضع لأي تدهور.

في الختام، تعتبر آثار الدم مصادر مهمة للحمض النووي في مجال الطب الشرعي مما يسمح بتحديد هوية الأفراد والبحث عن البنية الأبوية.

الكلمات المفتاحية: الدم، الحمض النووي، الاستخراج، القياس الكمي، المؤهل، الملف الجيني، تعدد إرسال تفاعل البوليميراز المتسلسل.

Liste des figures

N° Figure	Titre	Page
1.	Structure et gènes portés par le génome mitochondrial.	5
2.	polymorphisme mononucléotidique	7
3.	Préparation de la paillasse	16
4.	Extraction de l'ADN par le kitQiagen	18
5.	Cinétique de la réaction de qPCR	21
6.	Applied biosystems7500fastrealtimePCRsystem	22
7.	Amorces scorpions et leur rôle	24
8.	Les étapes de cycle d'amplification	29
9.	Les Cinq fluorochromes utilisés dans le kit d'amplification de 04 fluorophores	31
10.	Processus de l'électrophorèse capillaire	32
11.	Séquenceur SeqStudio Geneti canalyser(appliedbiosystems)	32
12.	Résultat positif et négatif du test Katel Meyer	34
13.	Courbe standard tracée à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN dans les différents dilutions	35
14.	Elément constituant un profil génétique	38
15.	Profil génétique d'allelic ladder du kit Amp FISTR® Identifiler PLUS®	40
16.	Control DNA 9947A du kit Amp FISTR®Identifiler PLUS .	41
17.	contrôle Négatif du kit AmpFISTR®IdentifilerPLUS	42
18.	Profil génétique complet de sexe masculin obtenu à partir de l'échantillon961 B en 2015	43
19.	Profil génétique complet de sexe masculin obtenu à partir de l'échantillon961 B en 2023	44

Liste des tableaux

N	Titre	Page
I.	Principales dates du développement de l'analyses de l'ADN en pratique Judiciaire(Doutremepuich,2012)	3
II.	Liste des locis analysée sur l'ADN autosomal(Doutremepuich,2012)	9
III.	Matériel non biologique par salles	15
IV.	Les Cibles du kit QIAGEN Quantiplex pro	20
V.	Réactifs du kit QIAGEN Quantiplex pro	22
VI.	Préparation de la gamme de standards	25
VII.	Préparation du mélange Master Mix	26
VIII.	Indications des différents fluorochromes attaches aux STRanalyses	27
IX.	Composants du kitIDENTIFILERPLUS	27
X.	Composants pour la postePCR	29
XI.	Mode opératoire de la post PCR	30
XII.	Résultats obtenus du test Kastel Meyer	34
XIII.	Les résultats de la quantification des différents échantillons de2015	36

Liste des abréviations

<i>ADN</i>	Acide Désoxyribonucléique
<i>AL</i>	Tampon de lyse
<i>ATL</i>	Tampon de lyse tissulaire
<i>AW1</i>	Tampon de lavage 1
<i>AW2</i>	Tampon de lavage 2
<i>ATE</i>	Tampon d'éluion
<i>Ct</i>	Cycle threshold/Cycle seuil (cycle de quantification/qualification)
<i>CCD</i>	Charge Coupled Device
°C	Degré Celsius
<i>DTT</i>	Dithiothréitol
<i>HVR</i>	Régions Hyper Variables
<i>IPC</i>	Internal PCR Control/Internal Positive Control
<i>KM</i>	Kastle-Meyer
<i>ng</i>	Nanogramme
<i>PCR</i>	Réaction en chaine par Polymérase
<i>PK</i>	Protéinase Kinase
<i>Pb</i>	Paire de bases
<i>qPCR</i>	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<i>RELP</i>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<i>Rpm</i>	Rotation par Minute
<i>RFU</i>	Relative Fluorescence Unit/unité de fluorescence relative
<i>STR</i>	Short Tandem Repeat
<i>SNP</i>	Single Nucleotide Polymorphism
<i>SDS</i>	Sodium dodecyl sulfate solution
<i>VNTR</i>	Nombre variable de répétitions en tandem

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	----------

Chapitre 1 : Données bibliographiques

1.ADN & Criminalistique	2
1.1. Génétique en criminalistique	2
1.2. Génome humain	3
1.2.1. ADN nucléaire.....	4
1.2.2. ADN mitochondriale	4
1.3. Marqueurs utilisés dans l'identification génétique	5
1.3.1. Marqueurs génétiques en criminalistique.....	5
1.4. Polymorphismes génétiques.....	5
1.4.1. Polymorphisme de taille des fragments de restriction :«RFLP».....	6
1.4.2. Polymorphisme de répétition.....	6
1.4.3. Polymorphisme d'un seul nucléotide SNP.....	7
1.4.4. Marqueurs autosomaux.....	8
1.4.5. Marqueurs haplotypique	9
1.4.6. Marqueurs de chromosome X.....	10
1.4.7. Marqueurs de chromosome Y.....	10
1.5. ADN élément de preuve en police scientifique.....	11
1.5.1. Qualité et quantité des échantillons d'ADN.....	12
1.5.2. Facteurs de dégradation de l'ADN.....	12

1.5.3.	Sources biologique de l' ADN.....	12
1.6.	Substrats biologiques.....	13
1.6.1.	Sang.....	13
1.6.2.	Sperme.....	13
1.6.3.	Salive	13

Chapitre 2 : Matériel & Méthodes

1.	Matériel	15
1.1.	Matériel biologique	15
1.2.	Matériel non biologique	15
2.	Méthodes	16
2.1.	Nettoyage et préparation de la pailasse.....	16
2.2.	Tests préliminaires.....	16
2.2.1.	Test Kastel Meyer	17
2.3.	Extraction d'ADN	17
2.4.	Quantification par PCR en temps réel	20
2.4.1.	PCR en temps réel.....	21
2.5.	Amplification par PCR multiplexe	26
2.6.	Post-amplification(post-PCR)	29
2.7.	Electrophorèse capillaire	30
2.8.	Validation de profil génétique	33

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1. Résultats des tests préliminaires	34
1.1. Résultats et discussion de test Kastel Meyer	34
1.2. Résultats et discussions de la quantification	35
1.3. Analyse comparative entre les résultats de la quantification de 2015 et les résultats de 2023.....	37
1.4. Résultat de profilage ADN	37
Conclusion	et 46
perspectives.....	
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Introduction

L'analyse de l'ADN est fréquemment utilisée pour obtenir des informations à partir de matériel biologique (matrices biologiques) afin de faciliter les enquêtes liées aux infractions pénales, à l'identification des victimes de catastrophes et aux enquêtes sur les personnes disparues (**van et al., 2010**). Ces analyses d'ADN ont connu de nombreux développements : réduction du nombre des cellules nécessaires à l'analyse, méthodes d'extraction et de purification plus efficaces, méthodes de génotypage plus rapides (**Doutremepuich, 2012**).

A fin d'obtenir un profil ADN informatif à partir d'un échantillon prélevé sur une scène de crime ou en laboratoire (**comte, 2019**), 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 cheveux de fluides corporels ou de sang. Ce dernier étant l'une des traces biologiques les plus répandues sur les scènes de crimes, il peut être retrouvé en grandes quantités ou d'infimes traces, sur des objets de différentes natures et des vêtements de diverses matières.

La procédure en médecine-légale est alors exécutée dans l'ordre suivant : prélèvement d'échantillons, extraction et purification de l'ADN, quantification de l'ADN de l'échantillon humain, amplification par PCR, séparation des molécules par électrophorèse capillaire, interprétation des données et comparaison avec un ADN de référence.

A ce titre le présent projet de fin d'études consiste à mettre en lumière l'influence du temps sur la qualité et la quantité des traces de sang et de rechercher les modifications du profil génétique en fonction du temps.

Ce travail est réparti en trois chapitres :

- Le premier chapitre porte sur les données bibliographiques recueillies, à savoir un rappel succinct sur le domaine de la criminalistique et la génétique en criminalistique, notion du génome humain suivi par les sources biologiques de d'ADN en police scientifique, les différents marqueurs pouvant être utilisés dans l'identification génétique et les facteurs de leurs dégradations.
- Tout matériel et toutes les méthodes utilisées sont retenus dans le second chapitre expérimental.
- Enfin le dernier chapitre présente les résultats obtenus et leur discussion, suivis de conclusions et perspectives.

Chapitre 1

Données

Bibliographiques

CHAPITRE 1

1. ADN & Criminalistique

En 1910, Edmond Locard crée 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* » (Gallimard, 2000).

La notion d'empreinte génétique est née en 1985 par Alec Jeffreys, ayant permis l'amélioration des méthodes de profilage de l'ADN basé sur des "microsatellites" à forte variation du génome humain (Butler, 2005). La première application de l'identification génétique dans une enquête policière a lieu peu de temps après, en Angleterre en 1986. À la même époque, Kary Mullis invente la technique la plus utilisée de nos jours pour établir les profils ADN : la PCR «polymerase chain reaction» (Briant, 2010). 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).

1.1. Génétique en criminalistique

Sir Alec Jeffreys en 1985, démontra que l'ADN contenait des séquences qui se répétaient, et surtout, ce nombre de répétitions variait d'une personne à l'autre et transmis par voie mendélienne aux enfants. Cette découverte fut appliquée sur des prélèvements effectués sur deux scènes criminelles. Les résultats obtenus furent alors comparés à un suspect, et celui-ci fut exclu. 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. L'analyse de l'ADN est appelée alors DNA fingerprint ou empreinte génétique, 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)

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

Période	Evènement
1985	Développement par Sir Alex Jeffrey des premières analyses d'identification.
1987	Création de laboratoires pour les analyses de routine en Angleterre(laboratoire Cellmark) et aux États-Unis (laboratoire Lifécode)
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 :ABI310
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.

1.2. Génome humaine

Tout organisme vivant est constitué d'un assemblage des cellules, génétiquement identiques, dans les quelles se trouve l'intégralité des informations relatives à son fonctionnement. Ces informations sont contenues dans un biopolymère: l'acide désoxyribonucléique(ADN). Cette macro molécule, qui supporte l'information génétique, est spécifique à chaque individu (**Briant, 2010**).

Le séquençage de l'ADN a révélé environ 20.000 gènes, environ 5% du génome s'exprime et permet la synthèse des protéines ou les éléments de base constitutifs des cellules, des tissus des organes et donc des êtres vivants. Le reste de ADN est composé de séquences nucléotidiques non codantes présentant un intérêt particulier en criminalistique car il est le siège d'un polymorphismes considérable (**Briant, 2010**).

1.2.1. ADN nucléaire

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 quelque soit le tissu analysé ; et enfin, l'ADN est transmis par moitié de chacun des parents à ses enfants on voit là immédiatement les deux principales applications:

-la recherche en paternité.

-l'identification d'individus à partir de toute trace biologique (**Pascal, 1998**).

L'ADN nucléaire est formé de seulement 5% de séquences codant pour les protéines, appelées gènes et dont l'homologie entre les individus d'une même espèce est grande, le reste est constitué en grande partie de séquences répétitives, très polymorphes et dont la fonction précise n'est pas élucidée, ces séquences répétées en tandem se situent soit dans les introns des gènes soit entre les gènes (**Mansuet-Lupo et al., 2007**).

1.2.2. ADN mitochondrial

Les mitochondries sont des organites présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Ces mitochondries contiennent de l'ADN. Il est composé de 16569 pb, il est circulaire clos et il est bicaténaire. Une cellule contient facilement une centaine de mitochondries et chacune contient environ 10 ADN mitochondriaux circulaires, on estime donc qu'il y a au minimum un million d'ADN mitochondriaux par cellule.

La majorité de cet ADN est codant, mais cependant il existe une zone non codante appelée région de contrôle ou D-loop (Distorsion-loop). Cette région, longue de 1100pb, est variable d'un individu à l'autre : on estime qu'il y a 3% de variations entre deux individus sans relation pris au hasard (soit sur la totalité de la région environ trente bases sont différentes). Cette région de contrôle a été arbitrairement divisée en deux zones: les régions hypervariables 1 et 2 (HVR1 et HVR2). L'emplacement de ces deux régions est assez précis sur le génome de l'ADN mitochondrial: HVR1:16024-16440 HVR2:50-34 (**Bry, 2017**).

L'ADN mitochondrial humain a été découvert pour la première fois en 1963 (**Nadee Nissanka et al., 2020**), il représente 1 à 5% de l'ADN totale et permet d'établir une lignée maternelle (**Loiaston, 2009**).

Une molécule d'ADN mitochondriale contient une région codante, qui ne code que pour 37 gènes et une région non codante longue de 1122 paires de bases et contenant les éléments nécessaires à la régulation des gènes (**Budowle et al., 2003**).

Il est perçut que l'ADN mitochondriale pourrait être une solution des ecours dans le cas ou l'ADN nucléaire est en quantité insuffisante(**coquez et al., 2013**).

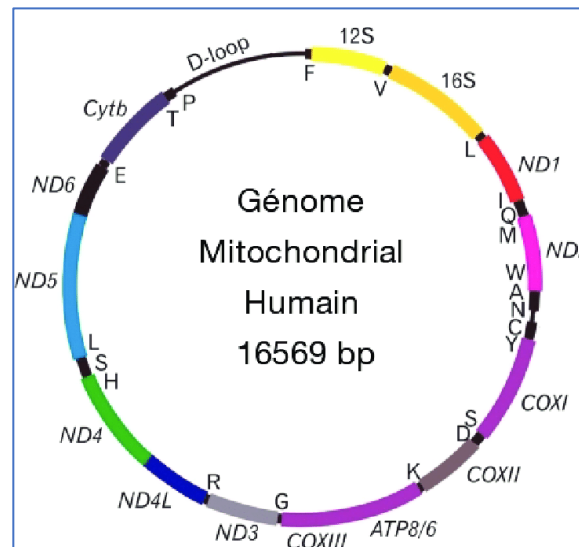


Figure 1 :Structure et gènes portés par le génome mitochondrial. Les gènes codant pour des protéines sont représentés en italique. Les gènes codant pour les ARNs de transfert mitochondriaux sont représentés par le symbole de l'acide aminé auquel ils correspondent. Les deux gènes ribosomiques MT-RNR1 et MT-RNR2 sont représentés par le nom de l'ARN ribosome qu'ils encodent, respectivement 12S et 16S (**Yoon et al.,2010**).

1.3. Marqueurs utiliser dans l'identification génétique

Les régions de l'ADN analysées par la police scientifique à des fins d'identification présente des polymorphismes appelés également marqueurs génétiques.

1.3.1. Marqueurs génétiques en criminalistique

L'analyse d'un marqueur génétique peut être effectuée sur la protéine codée par le gène ou sur l'ADN constituant le gène de cette protéine. Les marqueurs génétiques des années 1970 a 1990 étaient pour la plupart des protéines.

Au cours de son histoire, la police scientifique a développé l'analyse des marqueurs génétiques au fur et à mesure de leur découverte dans la recherche biomédicale, il y eut donc d'abord les groupes sanguins ABO, rhésus, puis au milieu des années 1980 d'autres marqueurs constituaient une intéressante palette de plusieurs dizaines de marqueurs génétiques (**coquoz et al.,2013**).

1.4. Polymorphismes génétiques

Le polymorphisme de l'ADN est à la base de l'identification des êtres humains par les empreintes génétiques car grâce à lui, chaque individu possède un génome unique

(Loistron,2009). Le polymorphisme désigne les différentes formes que peut prendre un même gène.

En effet ,Environ 99,3% d'ADN est similaire chez tous les individus et 0,3% de l'ADN est hétérogène ce qui fait la différence entre chaque individu, plus d'un tiers de nos gènes sont polymorphes (Butler,2001).

Le polymorphisme représenté par plusieurs marqueurs génétiques. Ce dernier est défini par plusieurs critères :

- Sa transmission mendélienne,
- Son caractère stable au cours de la vie d'un individu,
- Son grand polymorphisme, c'est à dire, la présence d'un grand nombre d'allèles et
- Son fort taux d'hétérozygotie (Mansuet-Lupoet al.,2007),

On distingue alors plusieurs formes de polymorphisme dans le génome

1.4.1. Polymorphismes de taille des fragments de restriction RFLP(*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Ces polymorphismes sont révélés par la méthode du southern blot (southern,1975) après une digestion enzymatique de l'ADN extrait afin d'observer grâce à leur reconnaissance par une sonde marquée, les fragments différents par leur longueur ont été utilisés comme outils d'analyse génétique en 1974 (Petkovski, 2006).

Les RFLP ont été largement utilisés dans les années 1980, mais ont depuis été remplacés par d'autres types de séquences variables tels que les microsatellites, qui sont plus hautement polymorphes. Les allèles des RFLP sont généralement déterminés par des méthodes basées sur la PCR, comme la PCR-RFLP (Grodzicker et al., 1975).

1.4.2. Polymorphismes de répétition

Le polymorphisme de répétition est créé par des séquences courtes non codantes répétées de manière juxtaposée, ces séquences représentent une très grande variabilité dans le nombre de répétitions dites en tandem et sont transmises selon les lois mendéliennes, selon la structure et le nombre de répétitions du motif de base qui forment le polymorphisme. On

distingue les minisatellites et les microsatellites (Petkovski,2006).

1.4.3. Polymorphisme d'un seul nucléotide SNP (*Signale Polymorphism Nucleotide*)

Les SNPs sont des marqueurs bi alléliques correspondant à la substitution d'un seul nucléotide à une position spécifique dans le génome, ce qui crée des allèles différents les SNPs et donc un polymorphisme de séquence, en moyenne on trouve un SNP tous les 500à1000paires de bases chez l'homme (Loistron, 2009).

Les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) sont la forme la plus répandue de variation de séquence dans le génome, représentant environ 90 % du polymorphisme de l'ADN humain (Brookes, 1999).

Ces dernières années, les SNP ont remplacé les microsatellites comme marqueurs de choix pour la plupart des études à grande échelle d'organismes modèles et en particulier pour l'homme (Miller,Phillips et al.,2005).

L'information fournie par les SNP peut porter sur des périodes plus longues que celles pouvant être étudiées par les STR ou les VNTR (Mountainetal.,2002;Brionetal., 2002). Leur faible taux de mutation et leur dispersion très fréquente dans le génome (International Humain Consortium,2001) font des SNP des outils attractifs pour la communauté médico-légale (Reich et al.,2002)

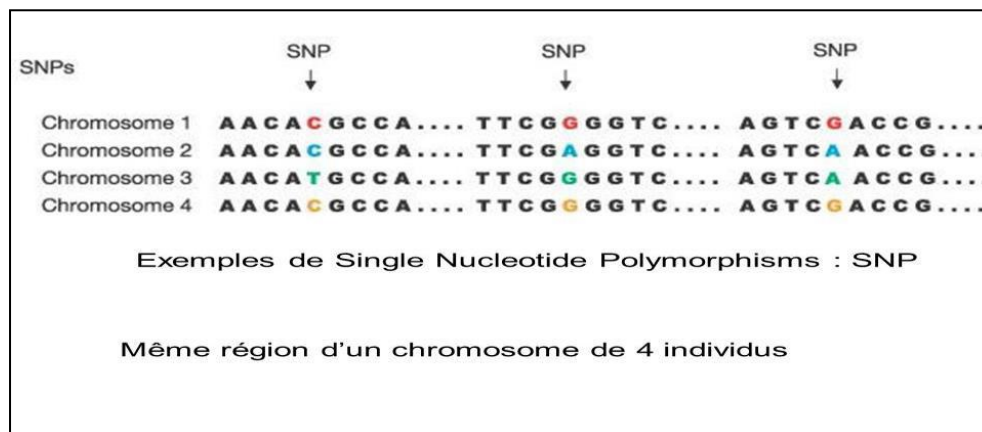


Figure 2 : polymorphisme mononucléotidique (police scientifique)

1.4.4. Marqueurs autosomaux

L'analyse de l'ADN par les laboratoires judiciaires porte sur les marqueurs autosomaux (situé sur les chromosomes non sexuels) puis qu'il sont un grand pouvoir d'individualisation (**Coquoz et al., 2013**).

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 (**Petkoviski, 2006**).

Toutefois, ce type de marqueurs performe moins bien dans des situations particulières, telles qu'avec les traces dégradées et les mélanges d'ADN homme/femme, pour lesquelles les marqueurs haploïdes situés sur l'ADN mitochondrial (ADNmt) et le chromosome Y (chrY) ont montré leur utilité particulière (**Butler, 2005**).

L'identification humaine s'effectue le plus souvent par l'analyse des STR autosomaux accompagnée de la détermination du sexe en utilisant un marqueur sur les chromosomes X et Y (**Houck et Siegel, 2015**).

Les STR autosomaux sont hérités par les deux parents, alors le génotype à un locus peut être homozygote (deux copies du même allèle) ou hétérozygote (deux allèles différents). En raison de l'indépendance de la transmission parentale des différents marqueurs (situés sur des chromosomes différents ou très loin les uns des autres sur un même chromosome), chacun fournit une information indépendante. Par conséquent, le pouvoir de discrimination s'accroît rapidement avec l'augmentation du nombre de marqueurs.

Le pouvoir de discrimination correspond à la probabilité de tirer au hasard deux individus dans la population ayant un génotype différent (**Coquoz et al., 2013**). Typiquement entre 12 et 20 STR autosomaux sont analysés pour établir un profil ADN (**Butler et Hill, 2012**). Des compagnies comme *Promega*, *Life Technologies* et *Qiagen* ont développé des kits commerciaux permettant l'analyse de plusieurs marqueurs STR dans une même réaction PCR offrant un très grand pouvoir discriminant pour l'identification humaine (**Doyon, 2018**).

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

Locus	Chr	Position	Taille des fragments	Motif répété	Echelle allélique
D8S1179	8	8q	128à168pb	(TCTR)n	8et19
D21S11	21	21q11-q21	189à243pb	(TCTA)n	24.2 et38
D7S820	7	7q11.21-q22	215à247pb	(AGAT)n	6et15
CSF1PO	5	q33.3-34 Située dans le gène du récepteur cfmsproto —oncogène pourleCSF1.	295à327pb	(AGAT)n	7et15
D3S1358	3	3p	114et142pb	(TCTA)n	9et19
THO1	11	11p15.5 situéedansl'intron1dugènedelaty rosinehydrolase	154pbà178pb	(TCAT)n	5et11
D13S317	13	13q22-q31	165à197pb	(AGAT)n	5et15
D16S539	16	16q24-qter	264à304pb	(AGAT)n	5et15
D2S1338	2	2q35-37.1	289à341pb	(TGCC)n	15et28
D19S433	19	19q12-13.1	106à140pb	(AAGG)n	9et18.2
Vwa	12	12p12pter Situéedansl'intron40dugènehum ainVWA	135à167pb	(TCTR)n	11et22
TPOX	2	2p13 Située dans le gène de lathyroïde-péroxidase	232 à 248pb	(AATG)n	8et12
D18S51	18	18q21.3	273à341pb	(AGAA)n	9et26
D5S818	5	5q21-31	135à171pb	(AGAT)n	7et16
FGA	4	4q28	219à267pb	(TTTC)n	102et30

1.4.5. Marqueurs haplotypiques

Les marqueurs haplotypiques sont 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 enfant, permettent de retracer les lignées maternelles et ceux du chromosome Y, transmis de père en fils, les lignées paternelles. Cette caractéristique rend les marqueurs moins informatifs pour l'identification individuelle. L'information génétique de chaque marqueurs uniparentellees t'appelée haplotype au lieu de génotype puisqu'un seul allèle est détecté par individu (**Petkoviski ,2006**)

1.4.6. Marqueurs de chromosome X

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 lors que 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**).

1.4.7. Marqueurs de chromosome Y

Le premier microsatellite polymorphique du chromosome Y, aujourd'hui nommé DYS19, a été décrit en 1992 (**RoeweretEpplen,1992**). Le chromosome Y (chrY),spécifique aux hommes, est le deuxième plus petit chromosome avec 60millions de nucléotides (**Kayser etBallantyne, 2014**)

Le chrY est transmis uniquement de père en fils. En l'absence de recombinaison, un fils hérite ainsi du même haplotype que son père (**Butler, 2012**). Tous les individus fais antpartie d'une même lignée paternelle partagent donc le même haplotype sauf en cas de mutation(**Coquozetal., 2013**)

Le chromosome Y se caractérise par une transmission uniparentale puisque seuls les pères transmettent ce chromosome à leur descendance masculine. À l'exception de deux petites régions dis tales homologues du chromosome X (appelées régions pseudo-autosomales), le chromosome Y est constitué en majorité de séquences d'ADN qui lui sont spécifiques.

De cet fait et contrairement aux autosomes (chromosomes non sexuels), il n'échange pas de segments d'ADN avec d'autres chromosomes au cours de la division cellulaire, autrement dit il ne se recombine pas ; il est par conséquent transmis sans modification d'une génération à la suivante (**Tracqui et al., 2003**)

Les marqueurs bialléliques tels que les polymorphismes d'un seul nucléotide (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP) ou les petites insertions ou délétions (indels) représentent une autre classe importante des marqueurs du chromosome Y (**Petkoviski, 2006**).

Les marqueurs du chromosome Y peuvent être utilisés pour de nombreuses applications telles que : l'analyse criminalistique d'indices dans le cadre d'agressions sexuelles) en permettant l'amplification spécifique de l'ADN masculin. Ce ci peut éviter les extractions différentielles pour séparer les spermatozoïdes des cellules épithéliales ainsi que le masquage du profil masculin par le profil féminin (**Jouquand, 2008**).

- ✚ La recherche de personnes disparues pour laquelle tout parent en lignée paternelle peut être utilisé comme échantillon de référence (**Dettlaff-Kakoletal., 2002**).
- ✚ Les tests de paternité déficiente pour relier les enfants masculins à une lignée paternelle (**Santos et al., 1993; Jobling et al., 1997; Rolf et al., 2001**).
- ✚ Les études d'évolution et de migrations humaines, car l'absence de recombinaisons (région non recombinante du chromosome Y, Non recombining region of the Y chromosome, NRY) permet la comparaison d'individus masculins séparés par de longues périodes de temps (**Underhill et al., 2001; Ke et al., 2001; Keyser-Tracqui et al., 2005**).
- ✚ Les recherches historiques ou généalogiques puisque dans la majorité des sociétés le nom de famille se transmet de père en fils (**Foster et al., 1998 ; Jobling, 2001, Sykes et Irven, 2000; Trumme et al., 2004**)

1.5. ADN élément de preuve en police scientifique

Dans les cellules vivantes, l'intégrité de l'ADN est continuellement maintenue par des processus de préparation enzymatique (**Lindahl, 1993**). Après la mort de l'organisme, les compartiments cellulaires qui normalement séquestrent les enzymes cataboliques éclatent, ce

qui engendre la dégradation rapide de l'ADN par des enzymes telles les nucléases. De plus, la molécule d'ADN est alors exposée aux attaques bactériennes, fongiques et à celle des animaux sa prophages qui se nourrissent en dégradant les molécules (**Eglinton et Logan,1991; Mitchelletal.,2005**)

La préservation de la molécule d'ADN varie on considérablement en fonction des conditions environnementales. Il n'existe pas de corrélation entre l'âge de l'échantillon et le degré de préservation de l'ADN (**Höss et al.,1996 ;Poinar et al.,1996**).

1.5.1. Qualité et quantité des échantillons d'ADN

Dans certains cas, il est possible de pallier la perte d'information induite par la dégradation de l'ADN, par l'amplification de multiples fragments courts chevauchants suivie de leur clonage puis séquençage ou encore par l'analyse de marqueurs ponctuel tels les SNP (**Pääbo et al.,2004**).

1.5.2. Facteurs de dégradation de l'ADN

L'identification par empreintes génétique repose sur l'étude de l'ADN qui est une molécule résistante aussi très fragile quand elle se trouve exposée à certains facteurs environnementaux tels que l'humidité, les bactéries, la chaleur, la lumière. Ces facteurs peuvent conduire à la dégradation de molécule d'ADN, et ce qui va compliquer l'obtention de profil génétique.

1.5.3. Sources biologiques de l'ADN

Il est possible d'obtenir des profils d'ADN à partir de la plupart de substances biologiques, par exemple :

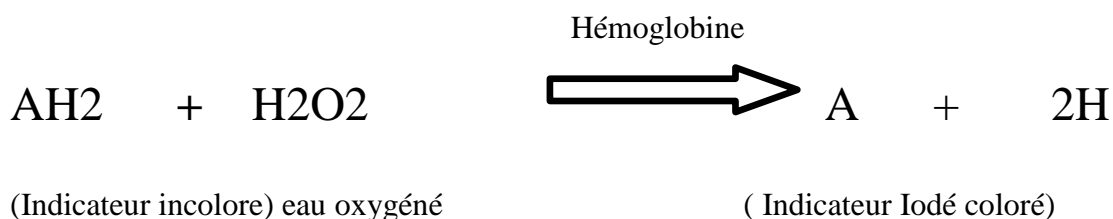
- ✚ Le sang, excepté les globules rouges (**Ginestra et al., 2004**)
- ✚ Le sperme, particulièrement en utilisant les nouvelles techniques de micromanipulation (**Petit et al., 2008**)
- ✚ Des restes de squelettes humains (**Prado et al., 1997 ; Loreille et al., 2007**) et
- ✚ Parfois des racines de cheveux (**Peter Gill,1985**).

Des profils ADN ont été obtenus à partir de taches de sang laissées entre 17 à 26 ans à température ambiante (**Tsukada et al., 2002**) à partir de prélèvements par écouvillonnage sur la surface de la peau ; cas des strangulations (**von Wurmb-Schwark et al., 2006**), ainsi qu'à partir de traces de contacts direct sur divers objets (**Wickenheiser, 2002 ; Phipps et**

Petricevic,2007)

1.6.Substrats biologiques

1.6.1. Sang : le sang est l'élément primordial sur une scène de crime, il permet d'établir un profil génétique en criminalistique. Le sang se compose de globules rouges dépourvus d'ADN, ils contiennent l'hémoglobine, protéine spécifique du sang. Cette composante est utilisée par la totalité des tests chimiques dont le but est d'identifier immédiatement la présence de sang. L'hémoglobine présente dans le sang catalyse des réactions d'oxydation en présence d'eau oxygénée selon la formule suivante :



L'ADN n'est pas extrait à partir des globules rouges qui sont des cellules anucléées mais à partir des globules blancs (ou leucocytes) présents en grande quantité dans le sang (5 à 10 milliards de leucocytes par litre) (**policescientifique**).

1.6.2. Sperme : Le sperme est une suspension de cellules, les spermatozoïdes, dans un liquide, le plasma séminal. Il est très riche en ADN et si elle est découverte une trace de sperme devrait fournir un résultat à l'analyse. D'autres cellules (cellules épithéliales et leucocytes) que les spermatozoïdes ont également présentes dans le sperme, ce qui permet d'envisager d'obtenir un profil ADN même d'un sperme azoospermique (**coquoz et al., 2013**).

1.6.3. Salive : La salive est un liquide biologique contenant divers protéines capables de débiter la digestion des aliments. Ce liquide contient en outre quelque cellules décrochées des parois des glandes salivaires ou des parois buccales. La salive est susceptible d'être retrouvée dans une bien plus grande variété d'échantillons que le sang ou le sperme. Les traces de salives contiennent toutefois très peu de matériel biologique. Elles font partie des traces biologiques modernes, qui n'ont commencé à être exploitées à large échelle que depuis l'arrivée des analyses d'ADN utilisant la PCR (**Coquoz et Taroni, 2013**).

Chapitre 2

Matériel et

Méthodes

CHAPITRE 2

Présentation du travail

Le présent travail a été réalisé au niveau du Département d'Identification Génétique au sein du laboratoire central de la police scientifique et technique de la sûreté nationale à Châteauneuf, Alger durant la période allant du mois de février au mois d'avril 2023.

L'objectif de ce travail est l'évaluation quantitative et qualitative de l'influence du temps sur la concentration d'ADN extrait à partir des traces de sang obtenues par des échantillons datant de, en recherchant l'effet du temps dans la modulation de la concentration et le degré de dégradation de l'ADN total.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Pour la réalisation de cette étude, nous avons tout d'abord sélectionné 15 échantillons de l'année 2015 de nature et d'origine différents, ces échantillons ont été prélevés à partir d'effets vestimentaires et sur écouvillons. Il est à noter que l'environnement, les conditions de collecte et de stockage sont les mêmes.

1.2. Matériel non biologique

Les kits, les réactifs ainsi que l'appareillage et l'équipement utilisés sont recensés et présentés selon les différentes salles (examen des scellés et tests préliminaires, extraction, quantification PCR, Post PCR et analyse des résultats) où nous avons réalisé les différentes étapes du processus de l'expertise Génétique ADN.

Tableau III : Matériel non biologique par salles

Salles	Appareillage et équipements	Kits /réactifs
Examen de scellés	Papier paille- Ecouvillons Stériles - Micro Pipettes 10/100/200/1000µl Étalonné -vortex-Eppendorf - Tips - Pince -Portoir -Masque-Blouses-Gants-Charlotte-poubelle de paille.	Réactifs kastel meyer -eau ultra pure - éthanol absolu-solution de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).
Extraction d'ADN	Centrifugeuse-vortex - bloc chauffant - micro pipettes 100/1000ul étalonné - portoir- vortex-hotte- Eppendorf- Tips-poubelle de paille pour les déchets à risque biologique.	Ethanol DTT 1xmolaire - EaumiliQ- kit Quiagen Investigatorcontient: ATL- AL PK - AW1 - AW2-ATE. Réactifs internes DTT 1molaire et Ethanol Absolu.
Quantification d'ADN	Thermocycleur ABIPrism7500fast Real Time PCR -Centrifugeuse Pour Plaque - vortex-Plaque Real Time PCR de 96 puits -film adhésif.	Kit QIAGEN Quantiplex Pro.
PCR	Thermocycleur 9700-Plaque PCR de 96puits- vortex - Papier Aluminium-Support Plaque PCR.	Kit PCRampFISTR Identifier Plus - Master mix primers et control positif 9947A
POST -PCR	Thermocycleur 9700- vortex -Plaque post PCR de 96puits - septa strip-centrifugeuse pour plaque et cryobloc	Formamide-Standard De Taille Liz 500- Allelic LADDER.
Electrophorèse capillaire	Séquenceur Seq Studio - ordinateur	Cartouche (Cartridge contenant l'anode,le POP1 et les quatre capillaires) et la Cathode Buffer.

2. Méthode

Nous avons suivi plusieurs étapes pour mettre en évidence les traces de sang et l'obtention d'un profil génétique, ces derniers sont représentés comme suit :

2.1. Nettoyage et préparation de la paillasse

La préparation de l'espace de travail est une étape obligatoire et nécessaire qui doit être effectuée avant chaque examen de scellé, elle se fait selon les étapes suivantes :

- ✚ Nettoyage de la paillasse avec l'eau de javel 10% ou SDS 0,1% (c'est un détergent ionique fort transactif).
- ✚ Nettoyage du matériel et les outils à utiliser avec la batterie de nettoyage qui composé de (eau de javel-eau distillée –éthanol).
- ✚ Répartition de la surface de travail en 3 parties.
- ✚ Préparer les échantillons sur un papier paillasse (identification, codification, photographie de chaque échantillon individuellement).

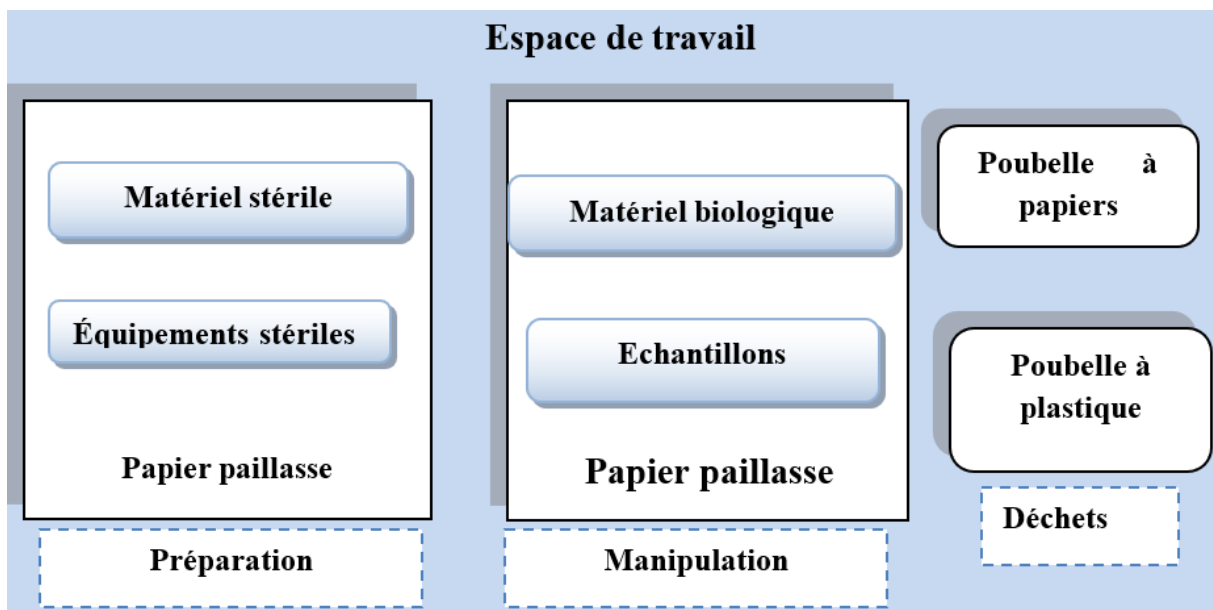


Figure 3 :Préparation de la paillasse.

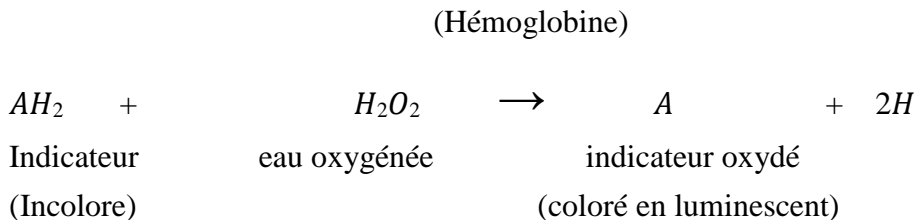
2.2. Tests préliminaires

Les tests préliminaires appelés « tests indicatifs », sont des tests de nature chimique permettant d'identifier la nature des traces. Le test utilisé dans cette étude c'est le test sérologique *Kastel Meyer*.

2.2.1. Test *Kastel Meyer*

Le test *Kastel Meyer* est un test rapide utilisé pour analyser les preuves sur une scène de crime pour détecter la présence de sang. 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 :



✚ Préparation des échantillons pour le test *Kastel Meyer*

Les traces de sang étudiées est un matériel biologique prélevées sur les scènes de crime. Nous avons découpé des morceaux de chaque support (vêtements) et dilacéré le coton de l'écouvillon un présentant des traces rougeâtres suspectes dans des tubes Eppendorf.

✚ Mode Opérateur

Pour identifier si la tâche est du sang, nous avons réalisé le test de *Kastel-Meyer* comme suit :

Dans un Eppendorf contenant l'échantillonnage à tester, nous rajoutons :

- Trois gouttes du réactif de *KastelMeyer*
- trois gouttes de H₂O₂
- Effectuer un petit vortex

NB : des témoins positifs et négatif sont été effectués pour la série des échantillons.

2.3. Extraction de l'ADN

Pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons de sang, plusieurs types d'extraction sont effectués au sein du département, soit à base de membrane de silice, soit à base de billes magnétiques.

Dans notre étude nous avons utilisé la méthode d'extraction par le **kit Qiagen Investigator**, à base de membrane de silice, dont le principe est de déposer notre échantillon contenant l'ADN est d'ajouté à une colonne contenant un gel de silice ou des billes de silice et des sels chaotropes. Les sels chaotropes perturbent la liaison hydrogène entre les brins et facilitent la liaison de l'ADN à la silice en rendant les acides nucléiques hydrophobes.

Principe de la méthode

L'extraction de l'ADN grâce au kit Qiagen Investigator basée sur l'utilisation de colonne de silice, 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 :

- Lyse des cellules dans l'échantillon de sang.
- 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.

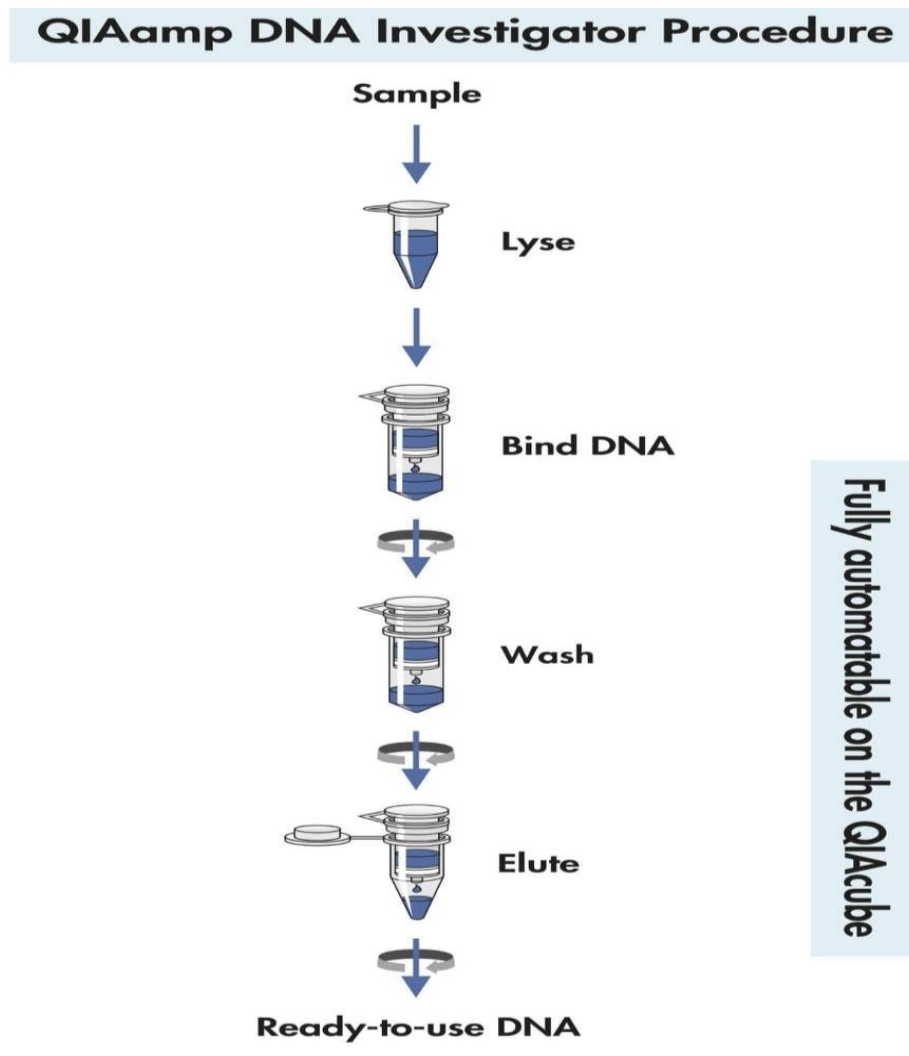


Figure 4 : Extraction de l'ADN par le kit Qiagen (QIAamp DNA Investigator Handbook, 2012)

Processus opératoire

- **Lyse cellulaire**

Dans un tube de 2 ml, immerger un échantillon de 0,5 cm² dans 300µl de tampons ATL 20µl protéinase K du kit et 03ul du DTT 1Molaire, puis :

- Vortexer pendant dix secondes et incubé pendant 01 heure à 56°C sous agitation à 900 rpm.
- Centrifuger quelque secondes pour faire tomber les gouttelettes accumuler dans le Couvercle du tube.
- Passer l'échantillon en tube passoir pour récupérer le lysat.
- Ajouter 300 µl du tampon AL et vortexer pendant 10 secondes.
- Incuber pendant 10 minutes à 70°C sous agitation à 900rpm.

- **Purification**

Centrifuger brièvement le microtube pour faire tomber les gouttelettes et ensuite ajouter 150µl d'éthanol ; Vortexer pendant quelques secondes, puis centrifuger brièvement et déposer le tout au centre d'une colonne QIAampMinElutecolumn préalablement identifié sans toucher la membrane avec le cône de la pipette ; Centrifuger pendant 1 minute à 8000 rpm.

- **1er Lavage**

⌘ Eliminer le micro tube contenant l'éluons, transférer la colonne dans un nouveau tube de 2ml puis ajouter 500µl du tampon AW1.

⌘ Centrifuger une minute à 8000 rpm.

- **2éme Lavage**

⌘ Eliminer le tube contenant l'éluon puis transférer la colonne dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 500µl du tampon AW2.

⌘ Centrifuger 1 minute a 8000 rpm.

⌘ Eliminer le tube contenant l'éluon, transférer la colonne dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 700 µl d'éthanol absolu.

⌘ Centrifuger pendant 1minutes à 8000rpm.

⌘ Eliminer le tube contenant l'éluon, transférer la colonne dansun nouveau tube de 2ml.

⌘ Centrifuger pendant 3 minutes à 14000 rpm .

⌘ Placer la colonne dans un nouveau tube de 1.5 ml puis ouvrir le couvercle de la colonne et laisser sécher à température ambiante pendant 10 minutes.

- **Elution**

- ⌘ Ajouter 50µl du tampon ATE, fermer le capuchon de la colonne et incubé pendant une minute à température ambiante
- ⌘ Centrifuger une minute à 14000 rpm pour récupérer l'extractum puis jeter la colonne.
- ⌘ Conserver les tubes d'ADN à -20°C.

2.4. Quantification par PCR en temps réel

La quantification est basée sur une réaction de polymérisation ,la PCR, qui nous permet de déterminer la concentration de l'ADN contenu dans l'échantillon ADN extrait .

La quantification est effectuée par deux kits différent, respectivement, le Kit Quantifiler Human de thermofisher en 2015 et le kit Quantiplex Pro de Qiagen en 2023.

L'analyse se fait par l'appareil ABI PRISM R 7500 Fast (AppliedBiosystems).Le kit Investigator Quantiplex Pro® ce kit permet la quantification simultanée de l'ADN humain, l'ADN Mâle, la détection des inhibiteurs de la PCR par l'ADN synthétique IPC (Internal Pcr Control) en temps réel ainsi que la détection de l'indice de dégradation.et basé sur la PCR quantitative en temps réel et est prêt à l'emploi pour les tests d'identité humaine, tests de paternité, pour l'identification des sinistrés et le travail anthropologique, ainsi que pour d'autres applications médico-légales. Il a été développé pour une sensibilité et une vitesse de réaction supérieures, conçu pour déterminer la quantité d'ADN intact afin de réaliser une analyse d'empreintes génétiques (telles que l'analyse STR, SNP ou DIP) ainsi que pour identifier la présence d'inhibiteurs (**Vraneset *al.*, 2017**).

Tableau IV : les cibles du Kit QIAGEN Quantiplex Pro.

Kit	Gene cible	Longueur d'amplicon
QIAGEN Quantiplex Pro	Cible humaine, petit autosome	91 pb
	Cible humaine, autosome large.	353pb
	Cible ADN masculin	81pb
	Contrôle PCR interne (IPC)	434pb

2.4.1. PCR en temps réel

Le développement de la PCR quantitative en temps réel a éliminé les variabilités traditionnelles et permet la quantification du produit de la PCR de façon fiable et routinière. La cinétique de la réaction PCR met en jeu en trois phases :

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

La courbe est construite à partir de plusieurs points d'amplification, Un point d'amplification est un point présentant pour coordonnées le nombre de cycles PCR par rapport à l'intensité de fluorescence émise (vassias 2012).

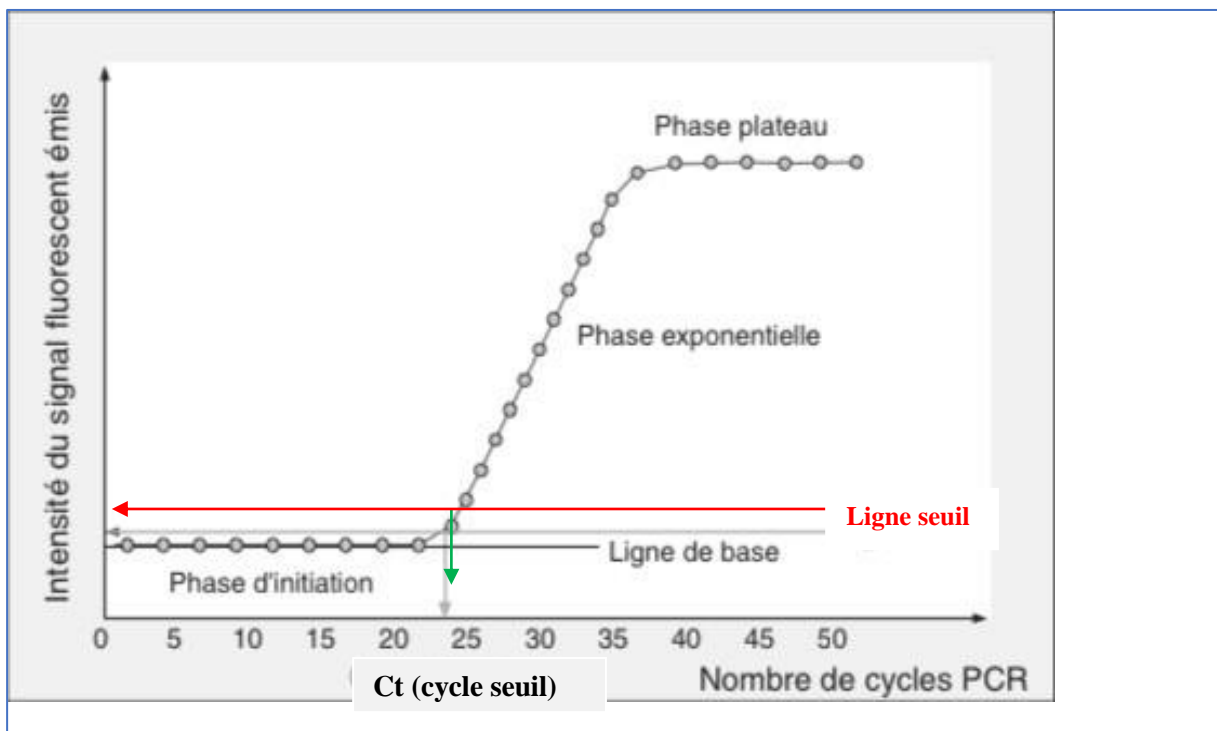


Figure 5 : Cinétique de la réaction de qPCR

- **Composants du kit de quantification**

Tableau V : Réactifs du t Kit QIAGEN Quantiplex Pro .

Composants	Quantité	Condition de stockage
Reaction Mix	02 tubes de 1,15 ml	Entre 2 et 8°C
Primer Mix	02 tubes de 1,15 ml	
ADN standard	0,2 ml	-20°C
QuantiTactNucleic Acid Dilution buffer (tompon de dilution des acides nucléiques QuantiTect)	1 flacon	-20°C

- **Principe de la méthode**

Le kit contient des réactifs et de l'ADN polymérase pour l'amplification spécifique d'une région exclusive de 146 pb présente sur plusieurs autosomes du génome humain et la détection de produits de PCR spécifiques sur le cycleur thermique en temps réel Appliedbiosystems7500 .



Figure 6 :Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR Systeme(original, 2023).

La région cible quantification de l'ADN humain a été sélectionnée pour fournir une sensibilité et une grande fiabilité de résultats parmi différents individus et différentes populations. L'amplification est détectée à l'aide d'amorces scorpions et d'une réaction chimique de PCR rapide innovante.

Les amorces scorpions sont des molécules bifonctionnelles qui contiennent une amorce PCR liée par liaison covalente à une sonde (**Figure 7**) le fluorophore de cette sonde réagit avec un désactivateur, également présent sur la sonde qui réduit la fluorescence.

Au cours de la PCR, lorsque la sonde se lie aux produits de PCR, le fluorophore et le désactivateur sont séparés, on observe alors une augmentation de la fluorescence dans le tube de réaction. Les amorces scorpions sont connues pour leur hybridation rapide avec la séquence cible par une réaction intramoléculaire (**Whitcombe, 1999**)

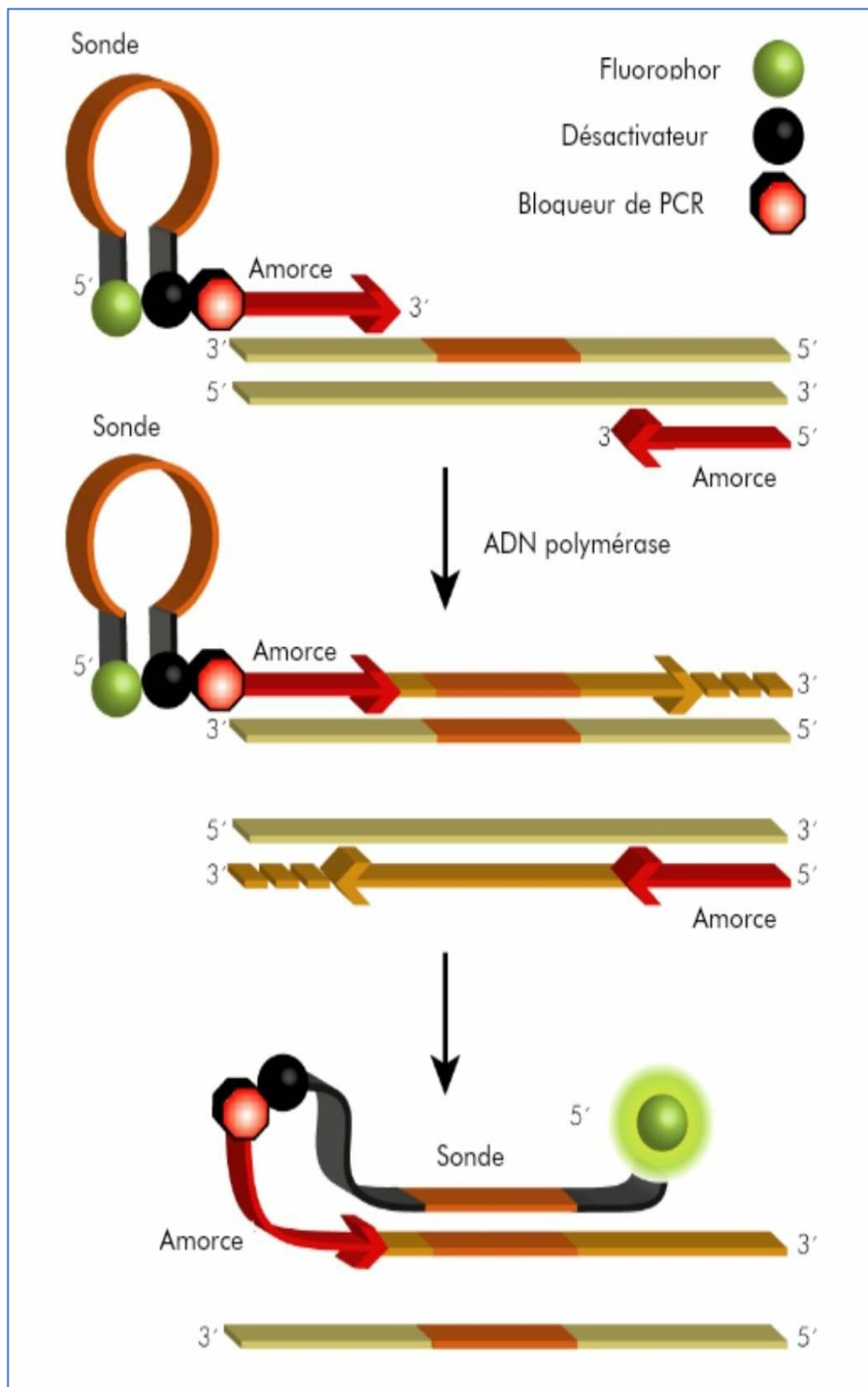


Figure 7 : Amorces scorpions et leur rôle.

- Mode opératoire

Le protocole de la quantification comprend les étapes suivantes :

- Commencer par remplir le plan de dépôt quantification Real Time PCR .
- **Préparation de la gamme de standards :**

A partir de l'ADN mère de (200ng/ul) et on à dilué avec l'eau pure, la première dilution de ¼ et sept autre de 1/3.

Tableau VI: Préparation de la gamme de standards.

Gamme standard	Concentration de l'ADN de contrôle	Volume de l'ADN De contrôle	Volume de tampon de dilution d'acide nucléique
Std 1	50ng/µl	Non dilué	-
Std2	10ng/µl	10 µl	40 µl
Std3	2ng/µl	10 µl	40 µl
Std4	0,4ng/µl	10 µl	40 µl
Std5	0,08ng/µl	10 µl	40 µl
Std6	0,016ng/µl	10 µl	40 µl
Std7	0,0032ng/µl	10 µl	40 µl

Après préparation de la gamme de standards, vortexer l'ADN à quantifier pendant 10 secondes.

Mettre à chaque analyse le témoin négatif et le control positif qui est l'ADN standard.

- Préparation de la plaque de quantification

Après avoir préparé les dilutions des standards, nous suivons la feuille de route ci –dessous

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	std1	Ech1	Ech9									
B	Std2	Ech2	Ech10									
C	Std3	Ech3	Ech11									
D	Std4	Ech4	Ech12									
E	Std5	Ech5	Ech13									
F	Std6	Ech6	Ech14									
G	Std7	Ech7	Ech15									
H	T+	Ech8	T-									

- Préparation du Mix

Un mélange mère ("Master Mix") a été réalisé contenant ainsi 9 µl du Réaction Mix et 9 µl du Primer Mix.

Le volume du réaction Mix est préparé dans un eppendorf en fonction du nombre des échantillons à analyser, les ADN standards et le témoin négatif.

Tableau VII : Préparation du mélange Master Mix.

Composant	Volume par réaction
Reaction Mix	9 µl
Primer Mix	9 µl
Volume total de Master Mix	18µl

- Vortexer les tubes d'ADN quantifier, le témoin négatif, les standards et les primers .
- Distribuer 18 µl de ce mix dans chaque puits de la plaque PCR, nous avons rajouté les aliquots d'ADN selon un plan de plaque déterminé
- 2 µl de la courbe standard dans les puits de la colonne 1.
- 2 µl d'ADN de contrôle dans le puit H3.
- 2 µl des aliquots dans les puits restants individuellement en changeant de tips à chaque fois.
- Recouvrir la plaque avec du papier adhésif transparent afin d'éviter les contaminations et laisser passer les lumières fluorescentes, puis la placer dans le thermocycleur 7500 Fast et lancer le programme 7500 Fast.

2.5. Amplification par PCR multiplexe

La technique PCR ou réaction de polymérisation en chaîne permet l'amplification en une seule réaction, plusieurs segments d'ADN distincts (vassias 2012)

Le principe de la PCR est l'amplification de plusieurs ADN cibles simultanément dans le même tube en utilisant plusieurs couples d'amorces spécifiques dans différentes régions d'intérêt.

La PCR multiplexe est assurée par le kit IDENTIFILER PLUS, comprend un protocole de 28 cycles en une réaction réalisée sur le thermocycleur GeneAmp PCR system 9700.

Ce kit permet d'amplifier 15 STR non codants ainsi que le marqueur du sexe nommé l'amélogénine

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

Tableau VIII: indications des différents fluorochromes attaches aux STR analyses

Les 16 loci AmpFISTR Identifier plus															
D8	D2	D7	CS	D3	TH	D1	D16	D2	D1	VW	TPO	D	AM	D5	FG
S	1S	S	F	S1	O1	3S	S	S1	9S	A	X	18	EL	S	A
11	820	82	1P	358		317	539	33	433			S5		81	
79		0	O					8				1		8	
<i>Fluorochrome correspondant aux marqueurs</i>															
FAM				VIC				NED				PET			

- Composants du kit de l'amplification

Composants	Volume	Description	Stockage
Reaction Mix	2 tubes, 1.0 ml/tube	Contient du MgCl ₂ , dNTPS ,et de l'albumine bovine dans un tompon avec 0.05% d'azoture de Sodium.- Taq polymerase .	-15 à -25°C à réception 2à8 °C après la première utilisation .
Primer set	1 tube, 1.0 ml	Contient - des amorces marquées par fluorescence et des amorces non marquées . -les amorces directes et inverses à amplifier, cibles d'ADN humain	
Allelic Ladder		Contient des allèles amplifiés	-15 à -25°C à réception 2à8 °C après la première utilisation . Conserver à l'abri de la lumière
Control 9974A	Positif 1 tube 200ul		-15 à -25°C à réception 2à8 °C après la première utilisation .

Tableau IX : Composants du kit Identifier plus

Mode opératoire

Préparer la hotte en lançant les uv pour décontaminer les champs de travail et les consommables utilisés.

Remplir le formulaire de suivi amplification. ; Commencer par préparer la plaque PCR ,vérifier la codification des portoirs, Eppendorf, et faire les calculs des volumes des réactifs nécessaires au nombre d'échantillons, témoin (positif et négatif), et les erreurs de pipetage.

A l'aide d'un vortex,homogénéiserpendant 5 à 10 secondes Les tubes des réactifs contenant Master Mix et les primers, 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 eppendorfs ,on prenons (5 µl de réaction mix *le nombre d'échantillons + 2,5 µl de primer*le nombre d'échantillons), agitation au vortex et centrifugation du tube.

Répartition de 7,5 ul de ce mix dans chaque puits en se référant au plan de dépôts, nous mettons 5µl de chaque échantillon à amplifier Dans chaque puits, et on termine par l'ADN contrôle et le témoin négatif.

Aprèsavoir vérifié tous les puits,recouvrir fermement la plaque avec une feuille d'aluminium, placer la plaque dans le thermocycleur 9700I.

Le thermocycleur est programmé pour exécuter 28 cycles d'amplification selon 4 étapes :

1. Dénaturation à 95°C, durant 11min pour la séparation des deux brins d'ADN suite ahydrolyse 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'unrefroidissement à 04°C.



Figure 08 :les étapes de cycle d'amplification (original ,2023).

2.6. Post-amplification (Post -PCR)

C'est une étape très importante pour l'analyse des fragments car elle nous permet la dénaturation des produits d'amplification issus de la PCR multiplex, pour obtenir les amplicons sous forme monobrin. Cette dénaturation irréversible est nécessaire pour la migration des produits PCR en électrophorèse capillaire, du fait que le séquenceur utilisé ne prend en charge que de l'ADN mono-brin.

a) Composants pour la Post PCR

Ce processus de dénaturation nécessite de la formamide ,le standard de taille Liz 500 et le ladder..

Tableau X :Composants pour la Post PCR

Contenus	Composants
Standard de taille GeneScan 500 LIZ™.	Ces standards, qui ont été évalués en tant que Standardsde taille interne, donnent des résultats de dimensionnement précis(nombre de répétitions du motif en paires de bases)
Identifiler Plus Allelic Ladder	La caractérisation précise des allèles amplifiés,contient la plupart des allèles rapportés pour les 16 marqueurs permettant l'identification des allèles.
Laformamide	Agent dénaturant pour maintenir l'ADN dénaturé sous forme monobrin.

b) Processus opératoire :

- Remplir Le plan de dépôt post amplification.
- Calculer les volumes des différents réactifs nécessaires au mélange, Le mélange doit contenir du « formamide » et du « standard de taille LIZ .

Tableau XI:Mode opératoire de la post PCR.

Réactif	Volume
Mélange réactionnel (formamide + standard de taille LIZ)	(8,7 µl formamide + 0,3 µl standard de taille)= 9 µl
ADN amplifié	4 µl
Ladder	1,5 µl
Contrôles positifs et contrôle négatif	1,5 µl pour chaque contrôle

- ⌘ Vortexer le mélange pendant 10 à 15 secondes.
- ⌘ Répartir 9 µl du mélange réactionnel dans chaque puits de la plaque.
- ⌘ Déposer 4µl d'échantillon.
- ⌘ Déposer 1.5 µl de ladder
- ⌘ Déposer 1.5 µl des contrôles positifs
- ⌘ Déposer 1.5 µl des contrôles négatifs.
- ⌘ Bien fixer à plat une septastrip (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 3minutes à 95°C.
- ⌘ Déposer la plaque dans un cryobloc à -20 ° C pendant 3min pour provoquer un choc thermique.
- ⌘ Centrifuger la plaque pendant quelques secondes à 1600 tours/minute en vérifiant l'absence de bulles d'air.
- ⌘ Mettre la plaque sur son support et la placer la plaque dans le séquenceur Seq Studio.

2.7. Electrophorèse capillaire

Après l'étape d'amplification, les produits de post-amplification sont prêts à être analysés par une séparation d'électrophorèse capillaire. Le séquenceur utilisé dans ce travail est le **SeqStudioGenetic analyser**(*Applied biosystems*), comprenant 04 capillaires, les capillaires sont intégrés dans une cartouche et remplis d'un polymère POP1 (*Performance*

optimized polymer I), comme un support de migration qui exerce un effet de tamisage moléculaire ce support contient aussi les sels nécessaires à la migration et l'urée (conditions dénaturantes).

Les fragments d'ADN étant chargés négativement sous l'action d'un champ électrique appliqué à une haute tension (3000 volts), lors de l'électrophorèse vont migrer le long du capillaire du pôle négatif (la cathode) vers le pôle positif (anode) du circuit électrique.

Il y'a une séparation électrophorétique des fragments d'ADN selon leur taille, les petites molécules d'ADN migrent en premier par rapport aux grosses molécules, en quelques minutes.

Vers la fin de la migration, les fragments d'ADN passent devant une fenêtre de détection présente sur le capillaire, ou elles sont bombardées par un faisceau laser du séquenceur, 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).

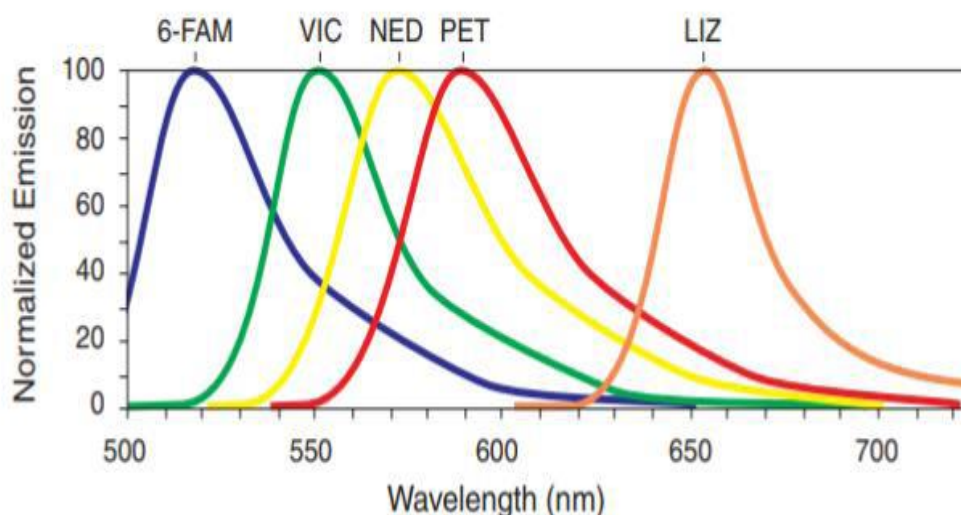


Figure 09: les cinq fluorochromes utilisés dans le kit d'amplification de 04 Fluorophores (Coquoz, 2003)

Les signaux de fluorescence est ensuite récupérés au niveau d'une cellule de détection (une lentille concave appelée spectrographe) localisée à une distance variable de la zone de dépôt (selon la taille des capillaires), qui résout la fluorescence de chaque capillaire entre 500 et 700 nm et dirige chaque faisceau vers une puce caméra CCD (Charge-Coupled Device) en silicone composée de milliers de cellules photoélectriques (pixels). Chacun de ces pixels accumule 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 Gene Mapper ID Xv1.6 pour l'obtention d'un profil génétique

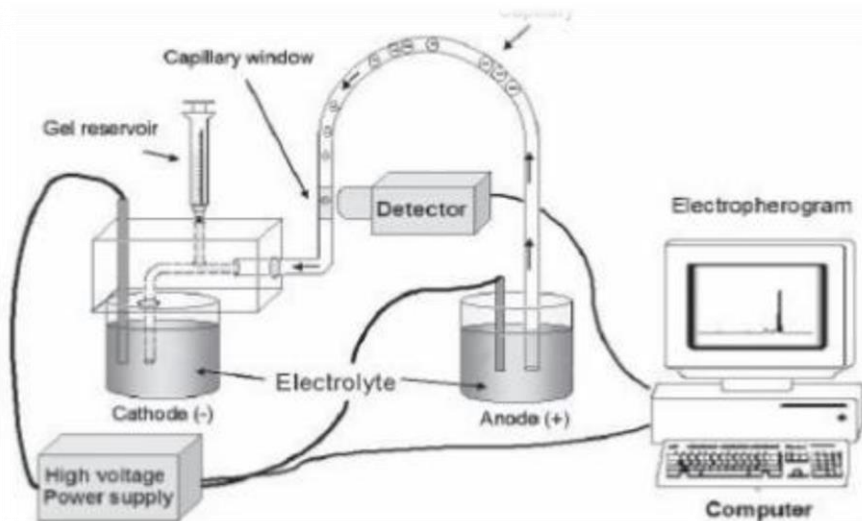


Figure 10 :Processus de l'électrophorèse capillaire (Walker et Rapley, 2008)



Figure 11 :Séquenceur SeqStudio Genetic analyser (Applied biosystems) (original, 2023)

2.8. Validation des profils génétiques :

Une fois l'électrophorèse capillaire terminée Les données collectées 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, les résultats sont présentés sous forme d'un électrophérogramme (profil génétique) qui se traduit par plusieurs pics correspondant aux allèles détectés, caractérisés par leur position, leur couleur et aussi par l'intensité de la fluorescence exprimée.

La validation des résultats se fait selon les étapes suivantes :

Assemblage des données.

- Identification des pics.
- Détermination de la taille des molécules.
- Séparation par couleurs (fluorochrome)
- Comparaison au Ladder allélique.
- Assignation de la nomenclature de chaque allèle.
- Validation des profils obtenus par un analyse.
- Le profil génétique obtenus est validé après 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).

Chapitre 3

Résultats

Et

discussion

CHAPITRE 3

1. Résultats des tests préliminaires

1.1. Résultat et discussion de test *Kastel Meyer*

Sachant que le résultat positif du test Kastel Meyer repose sur l'apparition d'une coloration rose pour la détection du sang, les résultats suivants ont été observés (**figure 12**)



Figure 12: résultat positif (+) et négatif (-) du test Kastel Meyer

En ce qui concerne les différents échantillons de l'année 2015 testés, les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XII: résultats obtenus du test Kastel Meyer (original ,2023)

Numéro de l'Affaire et l'échantillonnage	Support	Année de l'Affaire	Résultats
789 01	Tissu	2015	+
789 02	Tissu		+
961 A	Tissu	2015	+
961 B	Tissu		+
961 C	Tissu		+
989 01	Tissu	2015	+
1101 A	Écouvillon	2015	+
1101 B	Écouvillon		+
1101 C	Écouvillon		+
1101 D	Écouvillon		+
1101 ^E	Écouvillon		+
1101 F	Tissu		+
1101 G	Tissu		+
1101 H	Tissu		+
1101 I	Tissu		+

+

résultat

positif

Le teste *Kastel Meyer* nous a permis de révéler la présence de traces de sang sur l'ensemble de tout l'échantillonnage, nous avons testé un total de 15 échantillons datés de l'Année 2015,présentant toujours des traces rougeâtres.

Quelque soit le support et l'ancienneté de la trace, le résultat du test d'orientation KM (Kastel Meyer) est toujours positif. Après avoir détecté la présence de sang, nous avons procédé à l'extraction de l'ADN à partir du kit Qiagen Investigator.

1.2.Résultats et discussion de la quantification

- La Courbe standard

La courbe standard est une droite générée par le logiciel donnant le Ct(cycle seuil) en fonction du logarithme décimale (Log 10) de la concentration en ADN après amplification de la série des dilutions de l'ADN standard.

De cette courbe standard,il sera possible d'extrapoler les concentrations de l'ADN testé, générées par le logiciel SDS.

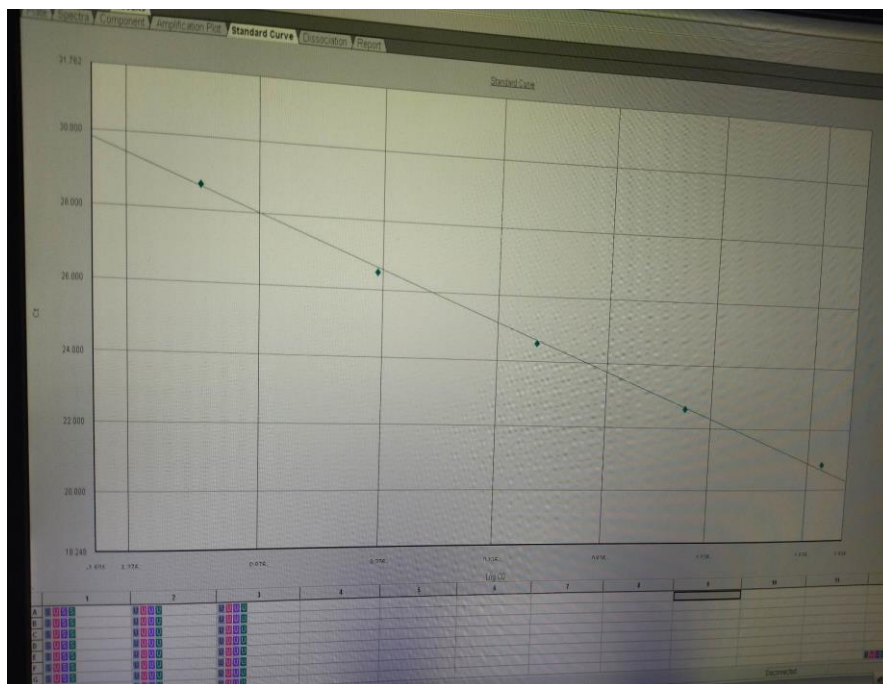


Figure 13 : Courbe standard tracée à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN dans les différentes dilutions. (Original,2023)

Les concentrations d'ADN correspondant aux échantillons testés des deux années 2015 et 2023, respectivement quantifiés par le kit Quantifier Human en 2015 et le kit Quantiplex pro en 2023 , répertoriées dans le tableau **XIII**.

Tableau XIII : les résultats de la quantification des différents échantillons de 2015 (original,2023)

Echantillonnage	Quantité d'ADN (ng/μl) en 2015	Quantité d'ADN (ng/μl) en 2023	Différence
789 01 tissu	0,02	6×10^{-5}	-0,01
789 02 tissu	0,06	0.001	-0,05
961 A tissu	0,1	0,03	-0,07
961 B tissu	3,5	0,03	-3,47
961 C tissu	1,5	0,01	-1,49
989 01 tissu	10,7	0,4	-10,3
1101 Aécouvillon	1,9	1,9	0
1101Bécouvillon	8,7	8,4	-0,3
1101Cécouvillon	2,5	2,4	-0,1
1101Découvillon	3	3	0
1101^Eécouvillon	0,09	0,13	0,04
1101F tissu	0,5	0,001	-0,049
1101G tissu	0,3	0,01	-0,29
1101 H tissu	-	$5,35 \times 10^{-4}$	-
1101 I tissu	-	0,001	-

Selon le tableau ci-dessus, les résultats permettaient de répartir les échantillons en trois catégories groupes :

- Un groupe majoritaire, montrant une diminution de la quantité d'ADN,
- Undeuxième groupe minoritaire représente une concentration d'ADN stable,
- Concernant les échantillonnages 1101H et 1101 I, nous avons enregistré une concentration d'ADN en 2023,

Cependant, ces mêmes échantillonnages, les concentrations d'ADN étaient indétectables, nous pourrions expliquer ce résultat par le fait est que ces échantillons soient quantifiés par deux kits différents par leur chimie, leur cible et le nombre de paire de base de l'ADN.

1.3. Analyse comparative entre les résultats de la quantification de 2015 et les résultats de 2023 :

Les concentrations d'ADN reportées dans le tableau 02 selon les échantillons, en prenant en considération différentes variables (le support et ancienneté de l'échantillon), sont différentes.

- Échantillons avec diminution de la quantité d'ADN

Pour les différents types d'échantillons 78901,78902,961A,961B,961C,98901,,1101F,1101G, nous notons une diminution de la concentration d'ADN par rapport aux concentrations initiales de 2015.

Nous pourrions expliquer cette diminution de la concentration de l'ADN, par le fait que les traces de sang conservées sur un tissu entraînent une perte des cellules sanguines contenant l'ADN à savoir les globules blancs, malgré la présence d'une tache rougeâtre d'une morphologie rétrécie par rapport à 2015, représentée par le globule rouge, cellules anucléées. Par conséquent, il n'est pas recommandé de conserver une trace de sang autant de temps sur un tissu.

- Echantillons avec quantité stable d'ADN

Pour les échantillons 1101A, ,1101B, 1101C,1101D et 1101E (dont le support est un écouvillon) représentant le groupe dont les concentrations d'ADN stables, n'ayant pas changées depuis 2015.

Nous pourrions expliquer cette stabilité de la concentration de l'ADN, par le fait que les traces de sang soient conservées sur écouvillons, effectivement, il est recommandé de prélever et conserver en criminalistique une trace de sang sur ce support à long terme.

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

1.4. Résultat de profil génétique

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).

Lors de cette étape nous exposons le profil de la trace 961B analysées a l'aide du séquenceur **SeqStudioGeneticAnalyser**(Appliedbiosystems), comprenant 04 capillaires et son logiciel *Gène Mapper* ID Xv1.6, en utilisant le kit IDENTIFILER PLUS qui permet d'amplifier 15 STR non codants ainsi que le marqueur du sexe , l'amélogénine.

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

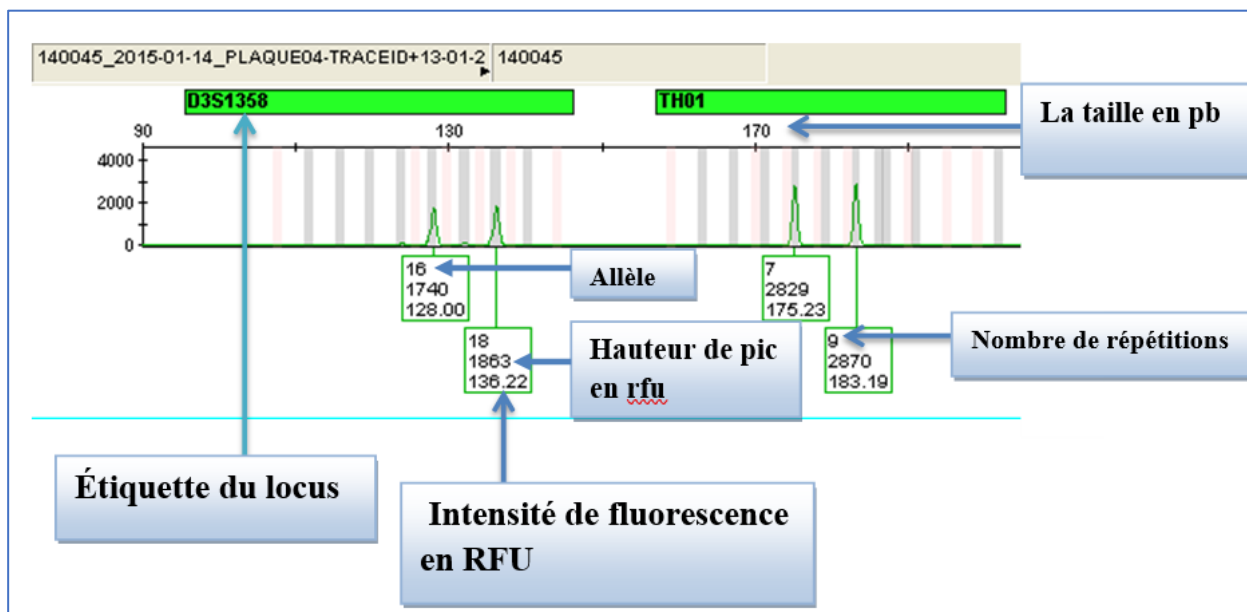


Figure 14 : Elément constituant un profil génétique (original, 2023)

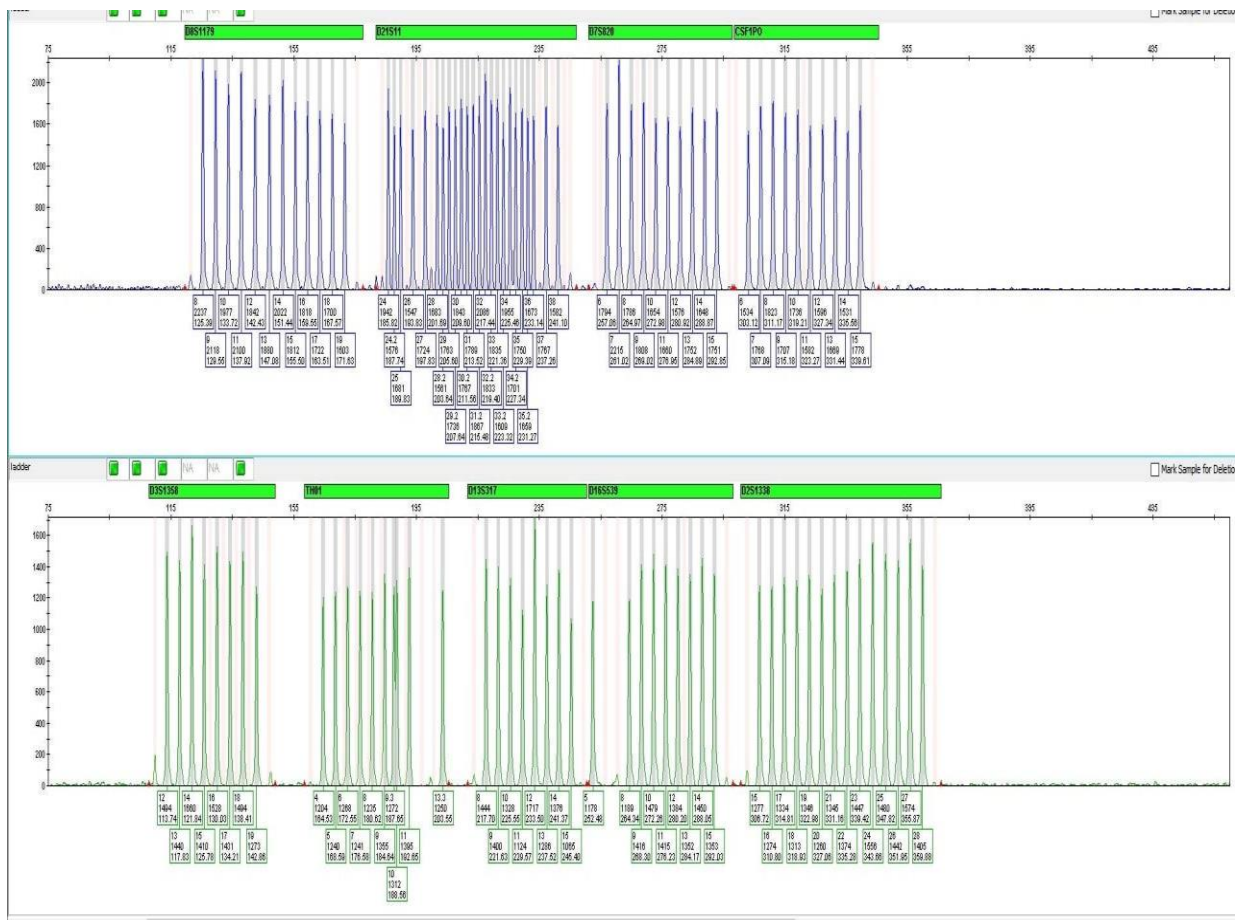
Les graphes affichent des traces correspondantes aux produits de PCR analysés par électrophorèse capillaire sous forme d'électrophorogramme où une série de pics est observée, représentant les différents allèles, de tailles et de hauteurs proportionnelles à la quantité du produit de la PCR détecté pour les échantillons analysés. Le sexe étant également déterminé au cours du processus d'analyse (locus amélogénine), celui-ci est utilisé pour pouvoir confirmer le sexe : Homme XY, Femme XX. Ces profils génétiques ne sont validés que si l'allelic Ladder présente des résultats conformes, soit donner tous les allèles connus chez l'homme. Tous les marqueurs doivent être amplifiés puis détectés ainsi apparaissent sur le graphique sous forme de pics (Figure 14) 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.

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.



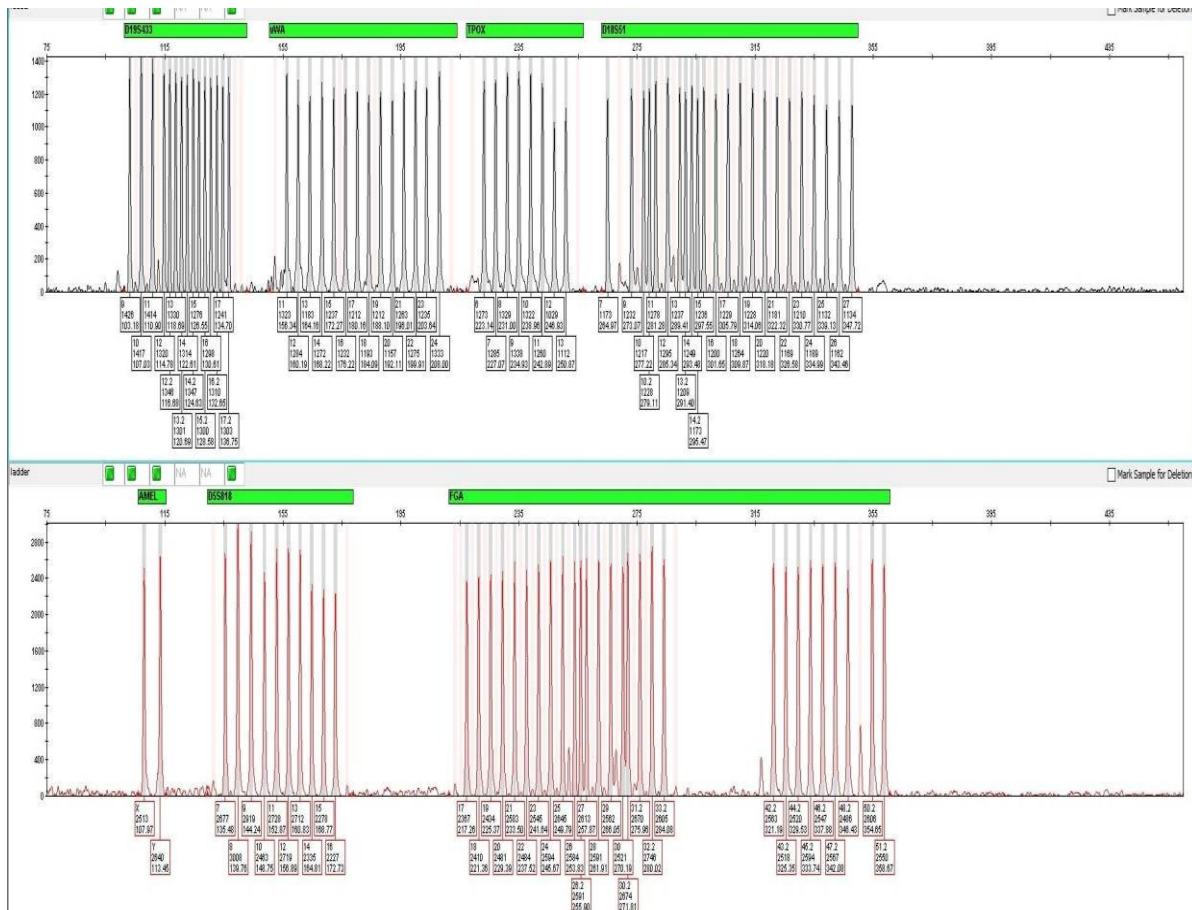


Figure 15 :Profil génétique d'allelic ladder du kit Amp FISTR® Identifiler PLUS®(original, 2023)

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 contrôle9947A (figure) sont correctement amplifiés et correspondent exactement au profil de cet ADN. Ceci témoigne du bon déroulement de la réaction de polymérisation en chaîne :

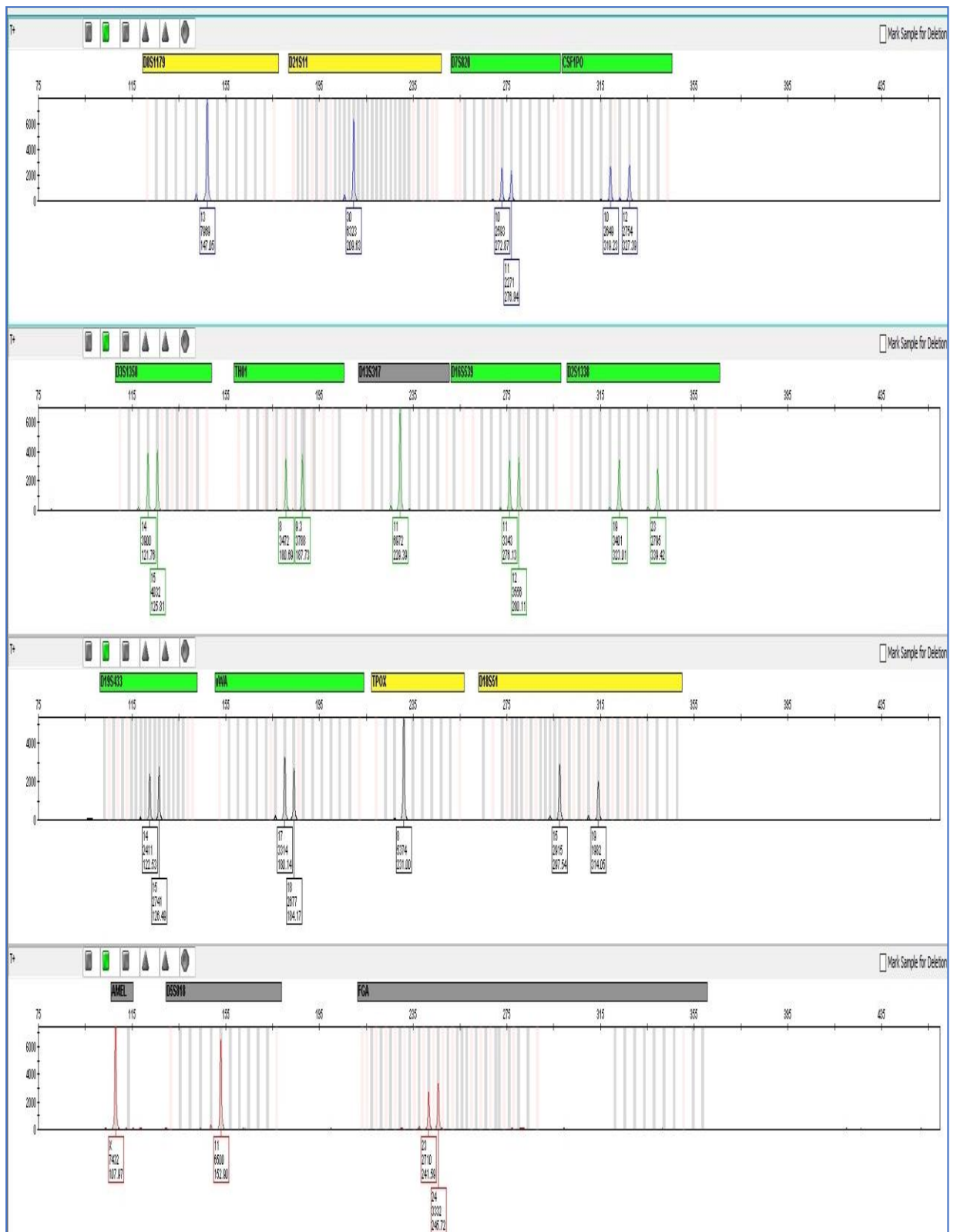


Figure 16 : Control DNA 9947A dukitAmpFISTR®IdentifilerPLUS (original, 2023).

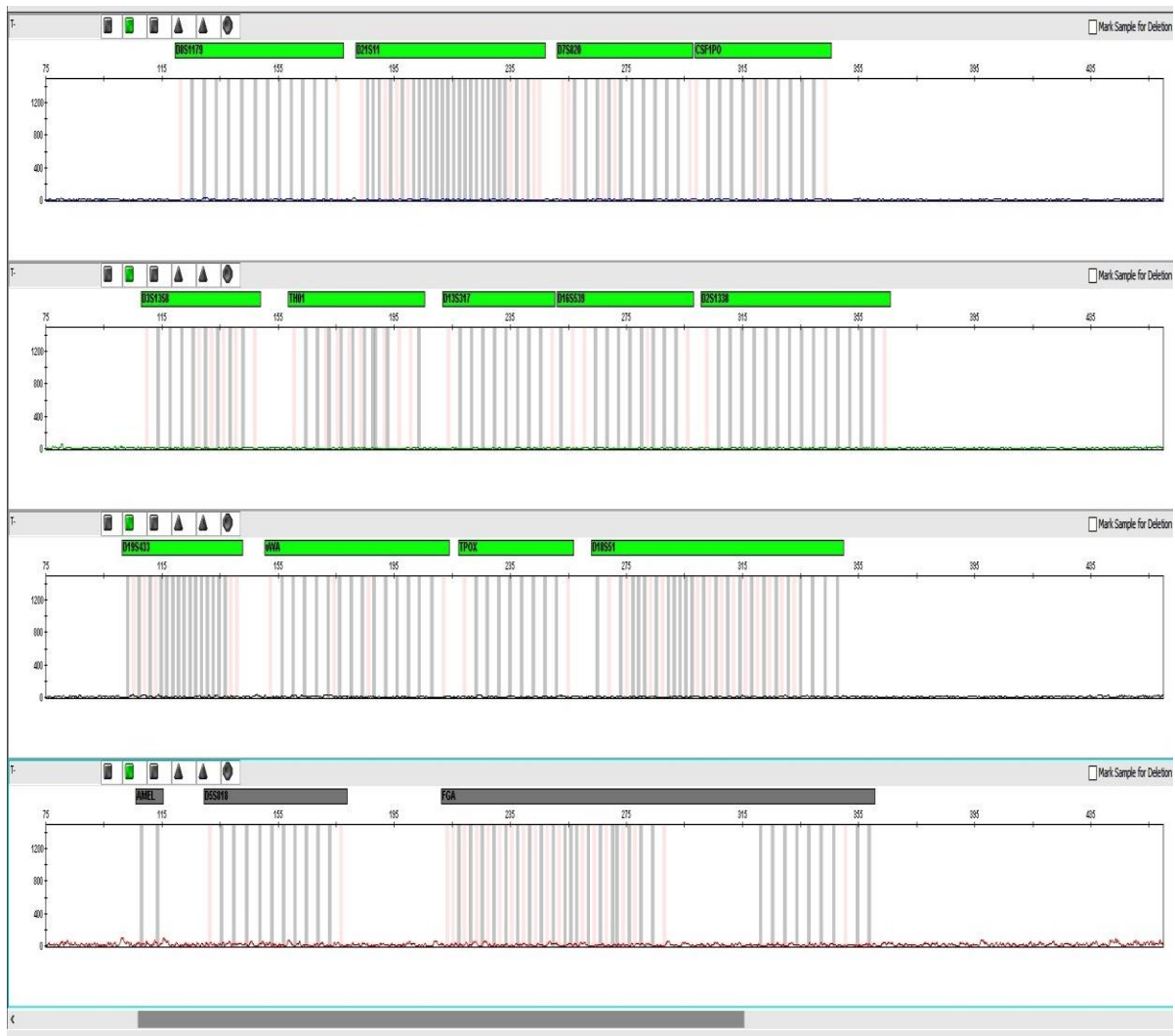


Figure17 : contrôle Négatif du kit AmpFISTR®IdentifilerPLUS(Original ,2023).

Parmi les 15 échantillons testés, nous avons analysé à titre d'exemple un échantillon (961B), représentatif présentant un profil génétique masculin complet à partir d'une trace de sang ancienne, réextraite et requantifiée en 2023, figurant dans le premier groupe, c'est-à-dire la concentration d'ADN est passée de 3,5 à 0,03, le but est de vérifier la qualité de l'ADN, quand bien même, nous notons une diminution nette de la concentration de l'ADN.

Notre ADN, malgré cette variation de la concentration d'ADN, n'a pas subi de dégradation .Nous avons obtenu un profil génétique complet, la présence de tous les marqueurs génétiques, y compris le marqueur sexuel, dont les pics ont une allure constante et des hauteurs supérieures à 100 RFU.

Le profil génétique complets et caractérise par une représentation complètesdes16système (loci) et la fluorescence des répétitions des allèles se traduit par des pics dont la hauteur est exprimée en RFU(RelativeFluorescenceUnit).Les allèles ayant un

RFU inférieur à 100 ne sont pas pris en considération, car ils pourraient s'agir de fluorescence non spécifique.

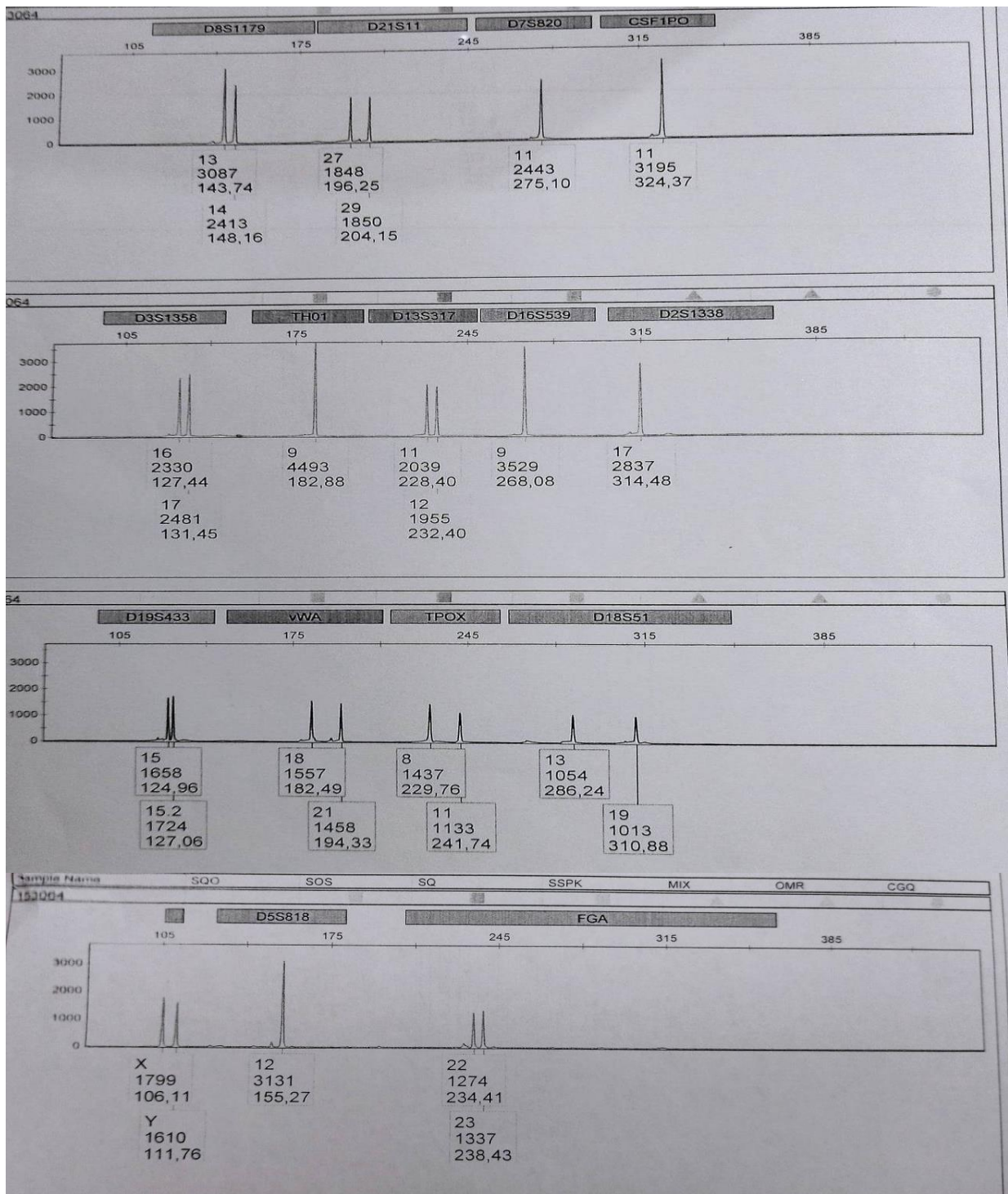


Figure 18 : Profil génétique complet de sexe masculin obtenu à partir de l'échantillon 961 B en 2015 (prélevé à partir d'une tache de sang) après la Co-amplification des 15 STRs, ainsi que du locus amélogénine, inclus dans le kit AmpFISTR® Identifier PLUS® (Original, 2023)

STRs,ainsiquedulocusamélogénine,inclusdanslekitAmpFISTR®IdentifilerPLUS®
(Original,2023).

Les médecins légistes et les acteurs de la justice pénale souhaitent atteindre les meilleures performances en matière de profilage ADN(**comte, 2019**)

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion :

Travailler avec le fluide sanguin en criminalistique nécessite de comprendre sa composition et son comportement lorsqu'il se retrouve en dehors des conditions physiologiques, c'est-à-dire en dehors de l'organisme. Peu de recherches sont effectuées dans ces domaines, car les recherches entreprises en biologie et en médecine se concentrent sur le sang *in vivo*.

Cette étude regroupe l'influence du temps sur la quantité et la qualité des traces de sang conservées sur deux supports, un tissu d'un effet vestimentaire, un élément considéré comme un scellé trouvé sur une scène de crime et une trace de sang prélevée sur écouvillon Deltalab, utilisé au Département d'Identification Génétique, et voir si avec le temps des modifications structurelles des traces de sang en fonction du séchage pourraient éventuellement arriver et quel impact celles-ci c'est-à-dire ces modifications, pourraient affecter l'analyse des fragments d'ADN, la technique utilisée dans le Département d'Identification Génétique de la Police scientifique d'Alger ;

Les résultats ont effectivement montrés que les traces de sang d'investigation utilisés en 2015, que nous avons repris en 2023 (08 ans après), après les tests préliminaires de détection des traces de sang via le test Kastel Meyer, sont toujours positives.

Cependant, après l'extraction de l'ADN, à noter que la même méthode d'extraction à savoir par le kit Qiamp Investigator qui a été utilisée en 2015 et 2023, la quantification a été réalisée par deux kits différents, respectivement, le Kit Quantifiler Human de thermofisher en 2015 et le kit Quantiplex Pro de Qiagen en 2023 et l'obtention d'un profil génétique pour les deux années via une PCR multiplex avec le kit Identifier Plus, nous avons remarqué une diminution de la concentration de l'ADN traces de sang conservées sur un tissu, une même concentration a été obtenue pour celles conservées sur écouvillon stérile, sachant que les deux supports ont été conservés dans les mêmes conditions de température et d'humidité. Enfin, pour les traces de sang, dont nous avons noté une concentration d'ADN combien même insuffisante pour obtenir un profil génétique, en 2023, indétectables en 2015, nous avons expliqué, ceci par le kit de quantification qui était différent, qui est le quantiplex pro, connu pour être plus sensible et dont la cible le nombre de Paire de base aussi sont différents.

Quant à la qualité du profil génétique obtenu avec la même trace de sang de 2015, avec une concentration d'ADN nettement inférieure à celle de 2015 est relativement bonne. En effet, nous avons obtenu un profil STR exploitable, interprétable et complet avec des RFU au dessus du seuil stochastique similaire à celui de 2015.

Nous pouvons conclure que pour la détection des traces de sang par le test Kastel Meyer, via l'hémoglobine portée par les érythrocytes qui sont des cellules anucléées n'ont pas été altéré, cependant, l'écart important des concentrations d'ADN porté par les leucocytes qui sont des cellules nucléées, pourrait être dû par l'altération de ces dernières avec le temps.

Reste le support de conservation des traces de sang, il est clair qu'il est recommandé en criminalistique de conserver ces dernières sur écouvillon stérile Deltalab que de les conserver sur un support quelconque à savoir celui acheminé au laboratoire.

Comme perspectives, il est intéressant de compléter cette étude de conservation des traces de sang en dehors de la biologie moléculaire par la spectrométrie de masse et /ou l'épigénétique (la méthylation) (Sélection des traces de sang sur les lieux d'Investigation – Valentin Carlier-Septembre 2020).

Références
bibliographiques

- Bakhtiari, M., Shleizer-Burko, S., Gymrek, M., Bansal, V., & Bafna, V. (2018). Targeted genotyping of variable number tandem repeats with adVNTR. *Genome research*, 28(11), 1709–1719. <https://doi.org/10.1101/gr.235119.118>
- Briant, E. (2010). La chimie dans les empreintes génétiques. *l'actualité chimique*, (342-343), 45.
- Butler J.M., (2005), *Forensic DNA Typing, Biology, Technology, and Genetics of STR Markers* 2nd edition, USA Elsevier.
- Butler, J. M (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.futurescience.com/doi/full/10.2144/000112582>.
- Budowle, B., Allard, M. W., Wilson, M. R., & Chakraborty, R. (2003). Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annual review of genomics and human genetics*, 4, 119–141. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.4.070802.110352>.
- Butler, J. M. (2001). *Forensic DNA typing: biology & technology behind STR markers*. Academic Press.
- Butler, J. M., & Hill, C. R. (2012). Biology and Genetics of New Autosomal STR Loci Useful for Forensic DNA Analysis. *Forensic science review*, 24(1), 15–26.
- Butler, J.M; (2011). *Advanced topics in Forensic DNA typing: Methodology*. USA (p:49-69).
- Coquoz, R., Comte, J., Hall, D., Hicks, T., & Taroni, F. (2013). *Preuve par l'ADN: la génétique au service de la justice*. PPUR Presses polytechniques.
- Comte, J., Baechler, S., Gervais, J., Lock, E., Milon, M. P., Delémont, O., & Castella, V. (2019). Touch DNA collection - Performance of four different swabs. *Forensic science international. Genetics*, 43, 102113. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.06.014>
- Doyon, A. 2018 *Dynamique des Marqueurs Génétiques Liés au sexe dans la population canadienne-française pour l'interprétation des traces d'adn en génétique forensique*. Mémoire Trois-Rivières, université du Québec à Trois-Rivières, 232p. <http://depote.uqtr.ca/id/eprint/8544>.

Dettlaff-Kakol, A., Pawlowski,R. First Polish DNA "manhunt"-an application of Ychromosome STRs. *Int. J. Legal Med.* 2002;116(5):289-91.

Doutremepuich C. (2012). Les empreintes génétique en pratique judiciaire [Legal implication of DNA profiling]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*, 196(6), 1117–1130.

Eglinton ,G., Logan ,G.A. Molecular preservation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser B* 1991;333 (1268) 315-27.

Foster EA, Jobling MA, Taylor PG, Donnelly P, de Knijff P, Mieremet R et al. Jefferson fathered slave's last child. *Nature* 1998;396(6706):27-8.

Ginestra, E., Trapani, C., Di Martino, D., & Saravo, L. (2004). DNA extraction from blood determination membrane card test. *Forensic science international*, 146, S145-S146.

Gill, P.et al ; (1985) Forensic application of DNA fingerprints.*Nature*318, 577–579.13.

Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2010). *An introduction to forensic genetics*. John Wiley & Sons.

Grodzicker, T., Williams, J., Sharp, P., & Sambrook, J. (1975). Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 39 Pt 1, 439–446. <https://doi.org/10.1101/sqb.1974.039.01.056>

Hoss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Paabo S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(7):1304-7.

Iglesias Miriam sous la supervision du Dr Raphael Coquoz,(2009).Ajout d'un contrôle d'inhibition dans des kits STR multiplex . Laboratoire AURIGEN , Lausanne.

Jasinska, A., & Krzyzosiak, W. J. (2004). Repetitive sequences that shape the human transcriptome. *FEBS letters*, 567(1), 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.109>

Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314(6006), 67–73. <https://doi.org/10.1038/314067a0>

Kayser, M., & Ballantyne, KN (2014). Chromosome Y en médecine légale. Dans *Applications médico-légales de l'ADN: une perspective interdisciplinaire*. Boca Raton (FL) : CRC Press Taylor & Francis Group.

Keyser-Tracqui, C., & Ludes, B. (2003). L'analyse du chromosome Y. *Journal de la Société de Biologie*, 197(4), 333-336.

Kayser, M., & Ballantyne, KN (2014). Chromosome Y en médecine légale. Dans *Applications médico-légales de l'ADN: une perspective interdisciplinaire*. Boca Raton (FL) : CRC Press Taylor & Francis Group.

Loistron Soléna,(2009).Les empreintes génétique en médecine légale :réalisation,législation.thèse de doctorat unité formation et de recherche d'odontologie, Université de Nantes,France.

Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993;362(6422):709-15.

Laurent, F. X., Vibrac, G., Rubio, A., Thévenot, M. T., & Pène, L. (2017). Les nouvelles technologies d'analyses ADN au service des enquêtes judiciaires. *médecine/sciences*, 33(11), 971-978.

Müller, H., Imhasly, P., & Leuthold, M. (2005, August). Empreinte génétique et test de paternité. In *Swiss Medical Forum* (Vol. 5, No. 35, pp. 880-880). EMH Media.

Mansuet-Lupo, A., Rouger, P., et Van Huffel, V. (2007) Les empreintes génétiques : état de l'art en 2007, techniques. *Transf. Clin. Biol.* 14: 334-342.

Max M. Houck, Jay A. Siegel.(2015).Chapter 11 - DNA Analysis, *Fundamentals of Forensic Science* (Third Edition),Academic Press, Pages 261-290,ISBN 9780128000373, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800037-3.00011-X>.

Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., & Kumlin, E. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4796), 1616–1622. <https://doi.org/10.1126/science.3029872>

Petkovski, E. (2006). *Polymorphismes ponctuels de sequence et identification genetique* (Doctoral dissertation, These presentee pour obtenir le grade de Docteur de l'Universite Louis Pasteur).

Paabo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N et al. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* 2004;38:645-79.

Saad,R.,Chey,W.D(2005) un guide clinique pour gérer l'infection par Helicobacterpylori. Centre médical de l'Université du Michigan,72 (2) :109-10,112-3,117-8.

Sloots, J. , Lalonde ,W. , Reid ,B., Millman ,J. (2017).Kastel- Meyer blood test reagents are deleterious to DNA. *Forensic Science International.*

Sfar, S., & Chouchane, L. (2008). Le projet génome humain: programme fédérateur de la médecine génomique [Human genome project: a federator program of genomic medicine]. *Pathologie-biologie*, 56(3), 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2007.12.001>

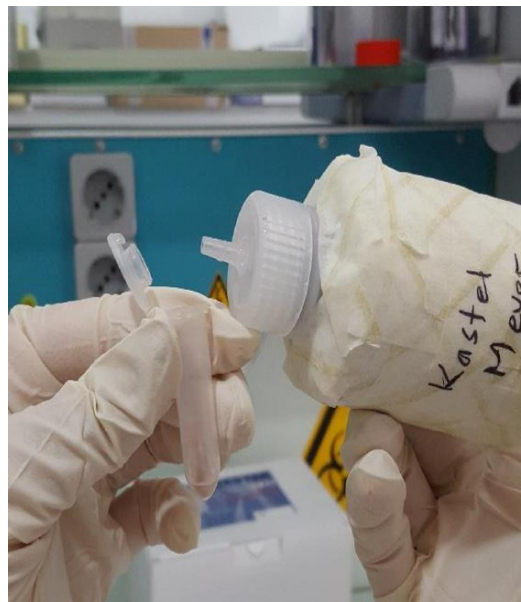
Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4732), 1350–1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>

Annexes

Test Kastel Meyer



Annexe 1 : réactifs du test kastelMeyer



Annexe 2 : Trois goutte du réactif de kastel Meyer



Annexe 3 : trois goutte de peroxyded'hydrogène

Kit d'extraction :



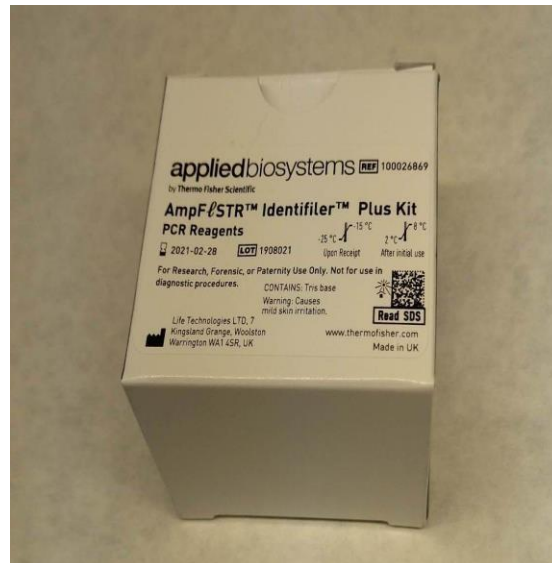
Annexe 4 : Kit d'extraction Qiagen Investigator

Kit de quantification :

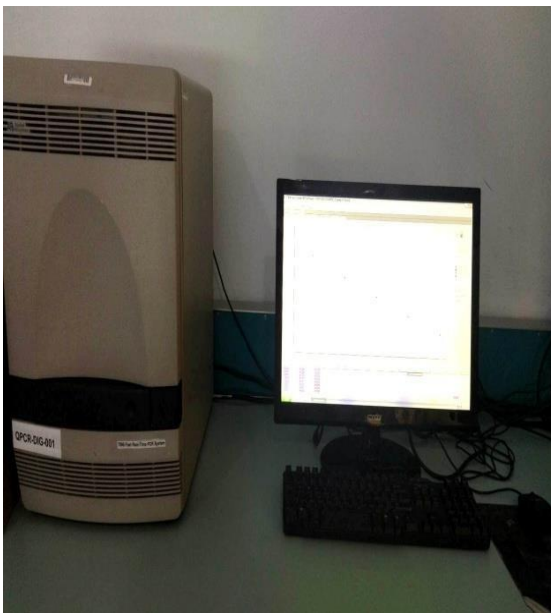


Annexe 5 : Kit QIAGEN QuantiplexPro

Kit de l'amplification :



Annexe 6 : Kit PCR ampFISTR Identifier Plus



Annexe 7 : Thermocycleur 7500 fast real Reaction mix Time Pcr



Annexe 8 : Thermocycleur 9700 .



Annexe 9 : SeqStudioGenetic analyser(Appliedbiosystems)