

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ DE M'HAMED BOUGARA BOUMERDES



Faculté Des Sciences

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Master : Génétique

Sujet :

Récupération et révélation des traces de sang à partir de supports lavés à différentes température pour un profilage STR en MiniFiler

Réalisé par

- Besmi Rania
- Elmir Hadjer
- Ammad Zahra

Le jury

- | | | | |
|----------------------|-----|-------|---------------|
| • Mme. Zekri Amel | CP | SLCPS | Promotrice |
| • Mme. Mizab Leila | MAA | UMBB | Co-Promotrice |
| • Mme. Chaabane Isma | MAA | UMBB | Présidente |
| • Mme. Remana Somia | MAA | UMBB | Examinatrice |

2023 /2024

Dédicaces

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profonde gratitude envers toutes les personnes tout au long de cette aventure académique. Ses encouragements ont été une source d'inspiration et nous ont guidés dans la bonne direction.

Nous sommes également reconnaissants envers nos familles et amis qui ont apporté leur soutien indéfectible et leur compréhension tout au long de ce projet. Leur patience et leur encouragement ont été essentiels pour surmonter les défis rencontrés.

Enfin, un grand merci à nos camarades de groupe, pour leur collaboration sans faille, leur travail d'équipe exemplaire et leur dévouement à la réussite de ce mémoire. Chacun de nous a apporté ses compétences uniques, enrichissant ainsi notre projet de différentes perspectives.

Nous sommes fiers du chemin parcouru et reconnaissants envers tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à cette réalisation. Merci infiniment pour votre soutien constant et votre confiance en notre travail.

Qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire. Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien précieux de plusieurs individus et institutions.

Nous remercions chaleureusement notre directrice de mémoire, madame Mizab Leila, pour ses conseils éclairés, son expertise et son accompagnement.

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire de fin d'études. Tout d'abord, je remercie chaleureusement mes parents, dont le soutien indéfectible, l'amour et les encouragements m'ont accompagné tout au long de ce parcours.

À ma mère et à mon père, vos sacrifices et vos conseils ont été une source inestimable de motivation et de persévérance. À mon frère Mehdi et ma sœur Fella, merci pour votre patience, vos encouragements et votre compréhension durant ces moments intenses de travail. Votre soutien m'a été d'une grande aide.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à ma Co-promotrice Mdm Mizab Leila et ma promotrice Mdm Zekri Amel, pour leurs précieux conseils, leur disponibilité et leur accompagnement tout au long de ce projet. Votre expertise et votre rigueur ont été déterminantes pour la qualité de ce travail.

Un remerciement particulier à Mdm Hacini Imen, qui a assuré la continuité de l'encadrement durant la soutenance et nous a apporté une aide précieuse pendant notre stage pratique. Merci pour vos informations, vos conseils avisés et votre soutien.

Je n'oublie pas de remercier mes amis, pour leur soutien moral, leur compréhension et leurs encouragements constants. Vos moments de convivialité ont été des bouffées d'oxygène tout au long de cette aventure académique.

Enfin, je tiens à remercier mes collègues de Projet de Fin d'Études (PFE), Elmir Hadjer et Ammad Zahra, avec qui nous avons formé un trinôme soudé et efficace. Ce projet n'aurait pas été le même sans votre collaboration, vos idées et votre esprit d'équipe. Merci à tous pour votre contribution et votre soutien.

Besmi Rania

Tout d'abord je tiens à remercier ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé, la volonté, le courage et la patience pour mener à terme ma formation et pourvoir réaliser ce travail de recherche.

J'adresse mes remerciements à mes parentes, mes amies et toute la famille pour leur soutien indéfectible, leurs encouragements et leur compréhension lors des moments de doute et de stress.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes collègues Elmir Hadjer et Besmi Rania qui ont contribué de manière significative à la réalisation de ce mémoire. Leur soutien constant et leurs précieux conseils ont enrichi ce travail et l'ont rendu possible.

En guise de reconnaissance, je tiens à remercier, très sincèrement Mm Zekri Amel ma promotrice, j'ai eu l'honneur et la chance de bénéficier de ses connaissances et compétences, de ses précieux conseils et de son suivi tout au long de notre parcours académique.

Mes remerciements s'adressent particulièrement au Mm Mizab Leila, pour son encadrement de qualité, sa motivation professionnelle, ses conseils et critiques constructives, ses corrections, sa gentillesse et sa patience ainsi pour le temps qu'il a consacré à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier les membres du jury pour leur présence et spécialement Mm Hacini Imen, pour leur lecture attentive de ce mémoire, ainsi que pour les remarques qu'ils m'adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer mon travail.

De peur d'en avoir oublié, je souhaite remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ce parcours universitaire.

Ammad Zahra

Je remercie Dieu le tout-puissant de m'avoir donné le courage, la bonne santé, la force et la patience durant ces longues années d'étude.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements :

A mes chers parents, mes piliers et mes guides a travers chaque étape de ma vie, je souhaite exprimer toute ma gratitude et mon amour. Je suis infiniment reconnaissante pour votre soutien inébranlable, pour m'avoir enseigné les valeurs qui guident ma vie aujourd'hui. Tout ce que j'ai accompli est le résultat de votre amour et de votre dévouement. Merci du fond du cœur pour avoir rendu possible tout ce que je suis aujourd'hui. Merci Papa, merci maman.

Je remercie mon frère, ma sœur et ma tante pour leur soutien inconditionnel et leur encouragement.

A ma promotrice Madame Zekri Amel pour m'avoir encadrée, orientée, aidée et conseillée durant la réalisation de ce travail.

Pour ma co-promotrice Madame Mizab Leila, je tiens a exprimer ma sincère gratitude pour son aide précieuse tout au long de l'élaboration de mon mémoire. Son soutien a été inestimable.

J'adresse mes sincères remerciements a Madame Hacini Imen, pour sa disponibilité, son aide précieuse, son soutien, son encouragement et sa motivation. Et a Madame Khocheinda Sihem pour son aide et son soutien.

A mes amis, Besmi Rania et Ammad Zahra, ceux avec qui j'ai partagé de merveilleux moments, cette jolie aventure restera gravée dans mon esprit.

A toutes les personnes qui, par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques, ont guidé mes réflexions et ont accepté de me rencontrer et de répondre a mes questions durant mes recherches.

Elmir Hadjer

Sommaire

Introduction et généralité01

Synthèse Bibliographique

I. Génome humain.....	02
I.1. Polymorphismes.....	02
I.1.1. Polymorphisme nucléaire.....	03
I.1.2. Polymorphisme de nucléotide unique ou les SNP (Single nucléotide polymorphisme)	05
I.1.3. Polymorphisme mitochondrial.....	06
I.2. ADN en criminalistique.....	07
I.2.1 Législation.....	07
I.2.2 Rôle de l'ADN dans les enquêtes judiciaire.....	08
I.2.3. Source d'ADN en criminalistique.....	08
I.2.4. Tests préliminaires de détection des traces de sang en criminalistique.....	09
I.2.4.1. Test d'orientation (Kastle- Meyer).....	10
I.2.4.2. Observation otique par la lumière Bleue et Blanche.....	10
I.2.4.3. Test de confirmation par Bleu Star.....	12
I.3. Empreinte génétique et étapes d'obtention d'un profil génétique.....	12
I.3.1. Étapes d'obtention d'un profil génétique.....	13
I.3.1.1. Extraction de l'ADN.....	13
I.3.1.2. Quantification par PCR en temps réel.....	14
I.3.1.3. Amplification par PCR.....	15
I.3.1.4. Electrophorèse capillaire.....	15
I.3.2. Validation de profil et rapport final selon la norme l'ISO/CEI 17027	15

Matériels et Méthodes

I. Matériels.....	16
I.1. Matériels biologiques.....	16
I.2. Matériels non biologiques.....	16
II. Méthodes.....	17
II.1. Préparation de l'espace de travail.....	17
II.2. Etude des traces de sang.....	17
II.2.1. Préparation des échantillons de tissus.....	18
II.2.2. Traitements de lavage et conservation des supports de tissus.....	18
a. Expérience 01.....	18
b. expérience 02.....	19
II.3. Révélation des traces de sang par les tests préliminaires.....	20

II.3.1. Observation optique.....	20
II.3.2. Test de Kastle – Meyer (KM).....	20
II.3.3. Test de Bleu Star.....	21
II.4. Profilage.....	21
II.4.1. Pocessus d'extraction de l'ADN.....	21
II.4.2. Quantification de l'ADN par PCR en temps réel	23
II.4.2.1. Principe de détection de l'ABI PRIM 7500 Fast System.....	24
II.4.2.2. Les condition du processus de Thermocycleur 7500 Fast System.....	24
II.4.2.3. Courbe standard.....	24
II.4.3. PCR Multixlexe.....	25
II.4.4. Protocole de Post-PCR.....	26
Résultats	
I. Résultats.....	28
I.1. Observation optique	28
I.2. Test Kastle-Meyer.....	30
I.3. Résultats d'observation par Bleu Star et son influence.....	31
I.4. Résultats de la quantification de l'ADN	33
I.5. Interprétation des profils génétiques	34
Discussion	
II. Discussion.....	37
II.1. Type de tissus	37
II.2. Type de détergent de lavage.....	39
II.3. Condition de conservation	40
Conclusion	42
Références	43

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
STR	Short Tandem Repeat
C	Cytosine
G	Guanine
A	Adenine
T	Tymine
ABO	Système Sanguin ABO
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
PCR	Polymerase Chain Reaction
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
ADN_{mt}	Acide Désoxyribo Nucléique mitochondrial
KM	Kastle Meyer
µl	Micro litre
Rt-PCR	Real time- PolymerasePolymérase chaîne réaction en temps réel
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
EC	Electrophorèse capillaire
SSC	Synthétique sans chlore
CJS	Coton javel + savon en poudre
CSC	Coton sans chlore
SJS	Synthétique javel + savon en poudre

Liste des figures

Figure 1 : Exemple de mini satellites VNTR (à gauche) et de microsatellite STR (à droite).....	04
Figure 2 : Exemple de polymorphisme de nucléotide SNP.....	06
Figure 3 : Réaction chimique de base du test Kastle-Meyer.....	10
Figure 4 : Préparation de la paillasse.....	17
Figure 5 : Dépôts du sang sur le tissu.....	18
Figure 6 : Observation optique par la lumière Bleue et Blanche.....	20
Figure 7 : Résultats positif et négatif du test KM dans un tube eppendorf.....	20
Figure 8 : Observation de la fluorescence après l'application du Bleu Star sur les traces du sang.....	21
Figure 9 : Courbe standard.....	25
Figure 10 : Profil génétique de la Ladder.....	36
Figure 11 : Profil génétique obtenu.....	11

Liste des tableaux

Tableau I : Comparaison entre VNTR et STR.	05
Tableau II : Matériels non biologique.	16
Tableau III : Types de tissus et répartition selon l'expérience	18
Tableau IV : Le gène cible du kit Human Quantifiler.....	23
Tableau V : Résultats de l'observation optique affecté sur le coton pour l'expérience 01.	28
Tableau VI : Résultats de l'observation optiques sur différents supports	29
Tableau VII : Résultats de test KM pour l'expérience 1 sur des supports lavés par la solution saline.....	30
Tableau IIX : Résultats du test KM pour différents support.	31
Tableau IX : Résultats du test Blue Star de l'expérience 1.	32
Tableau X : Résultats du test Blue Star selon l'expérience 02	32
Tableau XI : Les échantillons choisis pour faire le PCR de l'expérience 1 et 2.	33

Rappelles Bibliographique

Introduction générale

L'empreinte génétique est considérée comme l'une des découvertes médico-légales les plus importantes de notre siècle. Elle est actuellement, la technique la plus efficace dans l'identification des individus (COQUOZ. R. 2003). Cela est devenu possible essentiellement, depuis l'avènement des techniques de biologie moléculaire. Ces dernières se basent sur le fait que la séquence d'ADN de chaque être humain est unique. En effet, l'ADN possède des régions variables d'un individu à l'autre qui sont identiques dans toutes les cellules du même individu. Ces variations nommées polymorphismes existent en plusieurs types (Butler, J M. 2001). Les microsatellites ou Short Tandem Repeat (STR) sont parmi les plus utilisés dans le profilage génétique. Ce sont des séquences variables entre les individus permettant de poser une identité génétique à toute trace biologique. Le profil final obtenu est unique pour chaque individu, d'où leur grand intérêt, notamment en criminalistique.

L'empreinte génétique peut être établie, à partir de tout échantillon comportant des cellules nucléées et donc renfermant de l'ADN. Dans le contexte médico-légal, déterminer la nature de l'échantillon biologique portant l'information génétique est nécessaire pour établir le profil génétique d'un individu. Chaque échantillon biologique suscite des techniques ingénieuses d'analyse au laboratoire et des tests indicatifs particuliers pour faciliter sa détection avec une sensibilité et spécificité élevées. Les molécules cibles de ces tests peuvent être des métabolites intracellulaires ou protéines particulièrement concentrés, telles que l'hémoglobine pour le sang et la glycoprotéine P30 (PSA) pour le sperme.

En criminalistique, l'établissement de l'empreinte génétique d'un individu donné à partir de prélèvement d'ADN, indique qu'il était fort probablement présent dans la scène de crime. Cependant, le lavage de vêtements et d'outils pour éliminer toutes traces biologiques (sang, sperme, tissus, cellules, ADN) du crime, est devenu un problème majeur en court pénal. Malgré ce lavage (lavage à mains ou à la machine, type du détergeant, température, type du textile lavé ...), il a été montré que la quantité et qualité de l'ADN récupéré reste suffisante pour une analyse STR (Helmus et *al.*, 2019).

Dans ce contexte, notre travail réalisé au laboratoire de la Police Scientifique et Technique entre février et avril 2024, avait pour objectif essentiel : la révélation de traces de sang sur tissu lavé à différentes température, suivi de la récupération d'ADN et un profilage STR en Minifiler. Nous avons également tenté de valider deux tests préliminaires de détection de sang dans les scènes de crimes: les tests Blue Star révélant les traces de sang et Kastle-Meyer détectant l'hémoglobine du sang.

I. Génome humain

La cellule vivante stocke les informations du patrimoine génétique à transmettre aux générations futures. Ces informations sont véhiculées par l'ADN, molécule support du génome issu de la mère et du père. Ce génome humain inclut l'ADN nucléaire et mitochondrial. L'Acide Désoxyribonucléique est une molécule biologique formant les chromosomes et composée d'une double hélice à deux chaînes spiralées. L'ADN est le support de l'information génétique et l'ensemble des caractères héréditaires d'une cellule et d'un individu. Il se trouve dans toutes nos cellules, contient toutes les informations nécessaires au développement, reproduction et au fonctionnement du corps. Il est composé de quatre éléments complémentaires, appelés nucléobases : L'adénine (A), L'cytosine (C), La thymine (T) et la guanine (G) et sont l'agencement et les différentes combinaisons qui donnent les différences biologiques entre les êtres humains. Chaque nucléotide est constitué : d'un sucre, le désoxyribose, d'un acide phosphorique et d'une base azotée.

L'ADN est l'élément de preuve en police scientifique et son utilisation dans les enquêtes judiciaires est passée par plusieurs étapes. Il joue un rôle essentiel dans la médecine légale en fournissant des preuves d'identification, de parenté et de présence sur une scène de crime, contribuant ainsi à la justice et à la résolution des enquêtes criminelles (Butler, 2005). Après avoir établi que l'ADN contient des séquences répétitives variables d'un individu à un autre, on a commencé à utiliser le génome humain pour déterminer le profil génétique en tant que « empreinte génétique » révélatrice de l'identité du criminel (Jeffrey, *et al.*, 1985).

I.1. Polymorphismes

Le polymorphisme désigne les différentes formes que peut prendre un même gène, le cas des groupes sanguins (ABO). Il caractérise un locus d'une séquence d'ADN donnée, pour laquelle la composition nucléotidique varie parmi différents échantillons de la même séquence (Singleton, 2013). C'est une variation courante dans une population, et qui n'est pas une cause directe d'une quelconque pathologie (Torrades, 2002). Le polymorphisme est provoqué par des duplications et transpositions, mais, sa cause ultime est une mutation de l'ADN.

Bien que la limite distinctive entre mutation et polymorphisme ne soit pas très claire, la mutation est souvent attribuée à une variation de la séquence de DNA associée phénotypiquement à une pathologie (Torrades, 2002). Cette variation accidentelle ou provoquée de la séquence nucléotidique, est rare, spontanée et aléatoire. Elle dépend de certains facteurs (rayon ultraviolet, rayon X,...) et implique des mécanismes comme des délétions, substitutions (transition ou transversion) ou des additions d'un ou plusieurs

nucléotides. Le polymorphisme vient sous plusieurs formes, l'empreinte digitale, le polymorphisme du visage exploité en photographie judiciaire et les polymorphismes de l'ADN, en sont de bons exemples.

Le polymorphisme est essentiel dans l'empreinte génétique, car il permet de détecter les variations naturelles dans l'ADN entre les individus. Il est à la base de l'identification des êtres humains et de leurs spécificités (Loistron, 2009). Si l'ADN de deux personnes prises au hasard, est comparé, en moyenne une différence tous les 1200 nucléotides pourra être détectée (Sachidanandam, 2001). En utilisant des polymorphismes génétiques spécifiques, comme les marqueurs microsatellites SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), un profil génétique unique pour chaque individu, peut être créé. Ceci est crucial dans des domaines tels que la médecine légale, la généalogie génétique et la recherche en génétique des populations. Plusieurs formes de polymorphismes sont à distinguer :

I.1.1. Polymorphisme nucléaire

L'ADN nucléaire est formé de 5% de séquences codantes des gènes homologues entre les individus d'une même espèce « l'euchromatine » et de 95% de séquences répétitives qui ne commandent aucune synthèse protéique (Primrose, et *al.*, 2004). Il existe plusieurs types de polymorphisme nucléaires, variant selon la taille et la répétition du nombre d'unités de base.

a. Minisatellites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)

Ce sont des séquences d'ADN constituées de motifs de quelque dizaine de nucléotides en tandem, répétés un certain nombre de fois variable, allant de 15 à quelques centaines (figure 1). Ces séquences sont présentes dans différentes positions chromosomiques (Singleton, 2013). Ce sont des régions d'ADN hautement polymorphes, à l'origine de la grande variabilité génétique entre les individus. En raison de cette variabilité, l'ensemble des fragments qui apparaissent sur l'autoradiographie Southern blotting est hautement spécifique de chaque individu. On appelle ces Profils de bandes des empreintes d'ADN (Nakamura, 1987 ; Petkovski, 2006 ; Laurent, 2017).

Les minisatellites VNTR ont joué un rôle crucial dans l'identification des profils d'ADN avant l'avènement des microsatellites STR (Short Tandem Repeats). La probabilité que deux individus partagent exactement le même profil VNTR est très faible, ce qui rend les minisatellites VNTR extrêmement utiles pour l'identification précise individuelle (Butler, 2005).

b. Microsatellites ou STR (short repeat tandem)

Les STR sont des microsatellites ou des séquences en tandem de 1 pb répétés un nombre de fois variable, allant de 4 à 33 fois dans un locus particulier (figure 1). Il s'agit de séquences répétitives courtes dont le nombre de répétition varie d'un individu à un autre (Mansuet-Lupo et *al.*, 2007).

Les loci microsatellites peuvent être amplifiés par PCR permettant ainsi l'analyse d'ADN même partiellement dégradé (Schumm et *al.*, 1995). Ils sont abondants et bien distribués dans le génome ce qui offre une bonne source de marqueurs polymorphiques pour les études de liaison génétique et d'association de génotype avec des phénotypes (Edwards et *al.*, 1992). En médecine légale, les STR sont largement utilisées dans l'analyse de l'ADN pour plusieurs applications :

- **Identification des individus** : Les profils d'ADN basés sur les STR sont utilisés pour l'identification des individus dans les enquêtes criminelles, les cas de personnes disparues et les catastrophes de masse. En comparant les profils d'ADN des échantillons biologiques trouvés sur une scène de crime avec ceux des suspects ou des bases de données génétiques, les enquêteurs peuvent identifier les personnes impliquées dans un délit ou une affaire criminelle.
- **Tests de paternité** : Les STR sont utilisés dans les tests de paternité pour déterminer par comparaison des profils d'ADN de l'enfant, de la mère et du présumé père.
- **Identification de victimes** : En cas de catastrophes naturelles ou d'accidents, les STR peuvent être utilisés pour identifier les victimes à partir de restes humains. En comparant les profils d'ADN des restes avec ceux des membres de la famille des personnes disparues, les experts peuvent identifier les victimes (Jobling, 2004 ; Gill, 2004).

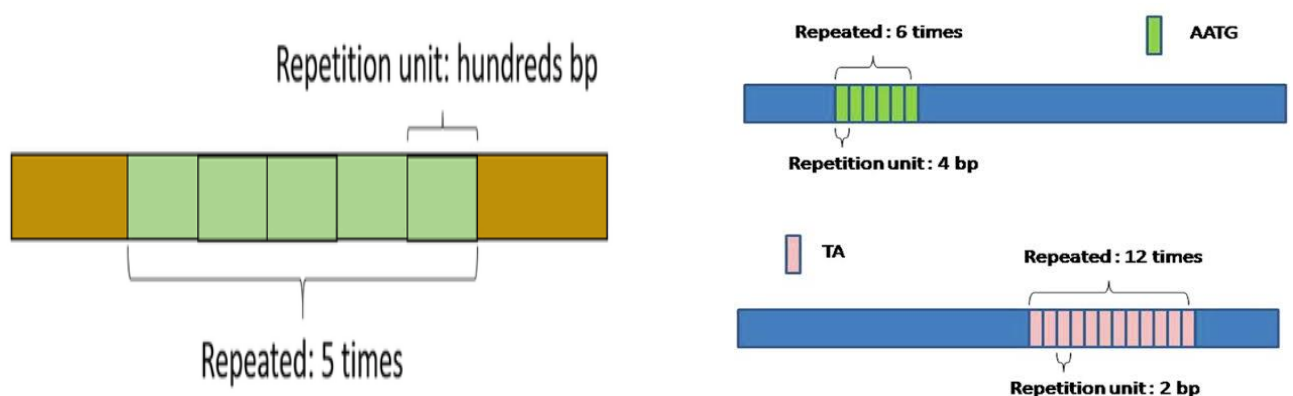


Figure 1 : Exemple de mini satellites VNTR (à gauche) et de microsatellite STR (à droite).

Le tableau I résume les caractéristiques et les différences majeures existant entre les deux types de polymorphismes VNTR et STR.

Tableau I: Comparaison entre VNTR et STR

	VNTR	STR
Points de ressemblance	<ul style="list-style-type: none"> - Responsables du polymorphisme génétique. - Type de répétition en tandem. - Représentent une structure du génome des eucaryotes. - Se situent dans la région non codante de l'ADN. - Utilisés comme marqueurs génétiques dans la génétique médico-légale. - Une mutation au niveau des deux types peut causer des maladies génétiques. 	
Points de divergence	C'est un type d'ADN minisatellite	C'est un type d'ADN microsatellite
	Type de répétition en tandem dont la séquence est de 1 à 5 Kb.	Type de répétition en tandem de 1 à 5 Pb.
	Le nombre de répétition est de 15 à 100 fois.	Le nombre de répétition est de 5 à 30 fois.
	Produit des séquences hétérogènes	Produit des séquences homogènes.

I.1.2. Polymorphisme de nucléotide unique ou les SNP (Single nucléotide polymorphisme)

Les SNPs apparissent comme de nouveaux marqueurs d'intérêt pour la communauté médico-légale, en raison de leur faible taux de mutation constituant un polymorphisme qui échappe aux systèmes de réparation de l'ADN au fil des divisions cellulaires (figure 2). Ils sont majoritairement localisés dans les régions non codantes du génome (Keyser, 2006). Au cours des dernières années, le polymorphisme mono-nucléotidique a remplacé les STR comme marqueur de choix pour la majorité des études sur l'organisme humain (Brenner et *al.*, 2003 ; Prinz et *al.*, 2003). Dans le domaine médico-légal, les SNP permettent de définir les haplo groupes du chromosome Y ou de l'ADNmt, analyser l'origine géographique des échantillons et de réaliser des tests de paternité grâce au faible taux de mutations et surtout

dans l'analyse des échantillons dégradés par l'utilisation d'amplicons courts (Gabriele et al., 2002). Ci-dessous quelques caractéristiques importantes des SNPs :

- **Fréquence** : Les SNP sont présents à des fréquences élevées dans les populations humaines, avec des centaines de milliers à des millions de SNP identifiés dans le génome humain.
- **Hérédité** : Les SNP sont hérités selon les lois de la génétique mendélienne et peuvent être transmis des parents aux descendants.
- **Effets fonctionnels** : Certains SNP peuvent avoir des effets fonctionnels sur la protéine codée ou sur la régulation de l'expression génique, tandis que d'autres peuvent être neutres.
- **Utilisation en génétique médicale** : Les SNP sont largement utilisés dans la recherche médicale pour étudier les facteurs de risque génétiques de maladies complexes telles que le cancer, les maladies cardiaques et les maladies neurologiques.
- **Applications pharmacogénomiques** : Les SNP peuvent influencer la réponse d'un individu à certains médicaments, ce qui est important pour la médecine personnalisée et la sélection de traitements efficaces (Murray, 2009).

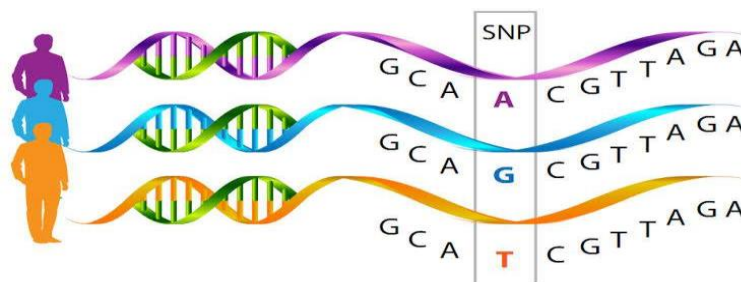


Figure 2 : Exemple de polymorphisme de nucléotide SNP.

I.1.3. Polymorphisme mitochondrial

Les mitochondries sont des organites cytoplasmiques composants les cellules. Elles contiennent un ADN spécifique appelé "ADN mitochondrial" présent en de multiples exemplaires dans chaque cellule. L'ADNmt est une petite molécule (16,6 Kb) d'ADN double brin circulaire qui ne contient que peu d'ADN non codant et pas de séquences répétitives. Le polymorphisme sur cet ADN est limité essentiellement à des variations de séquences (Keyser

et *al.*, 2013). En médecine légale, le polymorphisme mitochondrial peut être utilisé dans certains cas spécifiques où l'ADN nucléaire n'est pas disponible ou est insuffisant pour l'identification. Il est plus résistant à la dégradation que l'ADN nucléaire, ce qui le rend utile pour l'analyse d'échantillons anciens, dégradés ou contaminés. Dans les cas où l'ADN nucléaire est difficile à extraire ou à analyser en raison de la dégradation, l'ADN mitochondrial peut être utilisé comme alternative.

Leur analyse peut être utilisée pour identifier des personnes disparues en comparant les séquences d'ADN mitochondrial de restes humains non identifiés avec celles de parents ou d'autres membres de la famille (Butler, 2005).

I.2. ADN en criminalistique

La criminalisation a très rapidement adopté la génétique pour obtenir des preuves irréfutables. Le premier marqueur employé est celui des groupes sanguins à partir des années 1900. Ces marqueurs ont rapidement été remplacés par «l'empreinte génétique» en identifiant directement l'ADN. Ce développement est encore plus fulgurant avec le développement technologique qui a permis de mettre au point une technique rapide, fiable et très sensible : la PCR (Polymérase Chaîne Réaction).

I.2.1. Législation

De nombreux pays ont adopté des lois et des procédures spécifiques pour réglementer l'utilisation de l'ADN dans les enquêtes criminelles et les procédures judiciaires. Ces lois peuvent couvrir des aspects tels que la collecte, le stockage, l'analyse, et l'utilisation des échantillons d'ADN dans le cadre des enquêtes criminelles. Certaines des principales dispositions légales en criminalistique liées à l'ADN comprennent :

- **Autorisation légale pour la collecte d'échantillons d'ADN** : Les lois peuvent spécifier les circonstances dans lesquelles les échantillons d'ADN peuvent être prélevés sur des suspects, des témoins ou des scènes de crime, ainsi que les procédures à suivre pour garantir la légalité de la collecte.

- **Procédures d'analyse et de stockage** : Les lois peuvent établir des normes pour l'analyse des échantillons d'ADN, y compris les laboratoires autorisés à effectuer ces analyses, ainsi que les protocoles de stockage et de préservation des échantillons pour garantir leur intégrité et leur fiabilité.

- **Base de données génétiques** : Certains pays disposent de bases de données génétiques nationales, où les profils d'ADN des délinquants condamnés et parfois d'autres individus peuvent être stockés à des fins d'identification et de comparaison dans le cadre d'enquêtes criminelles ultérieures.

- **Protection des droits individuels** : Les lois peuvent également inclure des dispositions visant à protéger les droits individuels, telles que des garanties contre les abus potentiels de l'utilisation de l'ADN à des fins discriminatoires ou de violation de la vie privée.

Il est important de noter que les détails spécifiques de la législation en matière de criminalistique et d'utilisation de l'ADN varient d'un pays à l'autre.

I.2.2 Rôle de l'ADN dans les enquêtes judiciaire

L'ADN peut jouer un rôle crucial dans la condamnation ou la disculpation des personnes suspectées d'une infraction et permet également d'identifier des personnes disparues. Il sert donc de preuve pour aider à condamner une personne suspecter d'une infraction. Les échantillons prélevés sur les scènes de crime ou sur les suspects, habituellement à partir des sources d'ADN ; sont analysés par des tests d'orientation et d'identification. Ceci permet d'établir un profil d'ADN et de le comparer à d'autres profils génétiques enregistrés dans une base de données de profils d'ADN d'INTERPOL et qui contient actuellement plus de 280 000 profils communiqués par 87 pays membres (INTERPOL, 2002).

I.2.3. Source d'ADN en criminalistique

La nature des sources d'ADN est d'abord déterminée par des techniques simples et rapides. Les traces récupérées sont obtenues à partir de différentes sources (prélèvements biologiques sur individus, mégot, timbre, enveloppe, goulot de bouteille, chewing-gum, cagoule, masque, vêtements divers...). Les traces biologiques contiennent des cellules à partir desquelles est extrait l'ADN. Ils incluent ce qui suit :

- **Salive** : Sécrétion complexe contenant des cellules desquamées des muqueuses buccales ou des glandes salivaires. Elle constitue une bonne source d'ADN pour l'établissement de l'empreinte génétique.

- **Sperme** : Le liquide séminal est souvent retrouvé sur les scènes de crime. Il est analysé pour identifier l'agresseur en cas de viol. C'est une suspension de spermatozoïdes. Il est riche en ADN grâce aux spermatozoïdes mais aussi aux cellules épithéliales très utiles en cas d'oligospermie (concentration anormalement faible en spermatozoïdes) ou d'azoospermie

(absence totale de spermatozoïde), ce qui permet d'obtenir un profil génétique même quand aucun spermatozoïde n'est détecté.

- **Ossement, Dents et Muscle** : En première intention, les analyses ADN vont cibler les restes de muscle, mais la dégradation des tissus ne permet pas systématiquement une telle analyse. Dans ce cas, c'est l'os qui est ciblé. De nos jours, l'analyse ADN d'ossements est une activité de routine des laboratoires de police scientifique, grâce à une poudre d'os qui est ensuite lysée sous agitation, afin de casser les cellules pour en libérer l'ADN.

- **Ongles** : Les ongles ne contiennent pas d'ADN, mais sont recouverts de cellules épithéliales et kératinisées qui en sont pourvues.

- **Dents** : Sont les tissus les plus résistants de l'organisme et se révèlent caractéristiques de chaque individu, tant par leur disposition, structure, couleur que par l'ADN qu'elles contiennent au sein de leurs cellules. Elles font partie des identifiants primaires pour les empreintes digitales.

- **Cheveux** : Les cheveux sont très résistants et donc souvent retrouvés sur les lieux d'un crime. Ils constituent des indices intéressants pour l'enquête surtout, s'ils sont composés du bulbe du cheveu. A partir de là, il est facile de retrouver l'ADN qui s'y cache et d'identifier son propriétaire.

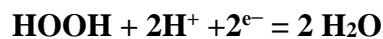
- **Sang** : C'est le substrat biologique par excellence. Souvent retrouvé sur les scènes de crimes sous forme de flaque, en goutte ou en projection, le sang appartenant au criminel ou à la victime est la meilleure source d'ADN. Il se compose d'hématies dépourvus d'ADN et contenant une protéine spécifique, l'hémoglobine. Cette composante est exploitée par une panoplie de tests chimiques dont le but est révéler les traces de sang. Ce dernier est un catalyseur de l'oxydation de toute sorte de substances oxydables par l'eau oxygéné. Il existe différentes substances oxydables qui composent différents tests indicatifs de sang. Ils se différencient par leur couleur, leur sensibilité et leur spécificité. Le sang est composé aussi de globules blancs, cellules nucléées qui représentent la source d'ADN (Pun et *al.*, 2008).

I.2.4. Tests préliminaires de détection des traces de sang en criminalistique

Il existe en criminalistique différents tests permettant d'identifier l'ADN extrait à partir des traces de sang retrouvées sur les scènes de crimes. Les plus utilisés sont :

I.2.4.1. Test d'orientation (Kastle- Meyer)

Le test Kastle-Meyer (KM) est l'un des tests sanguins présomptifs les plus employés par les laboratoires de police scientifique, et ce ; dans l'identification chimique de sang. Son principe se base sur l'utilisation de la phénolphtaléine comme indicateur chimique de la présence d'hémoglobine. L'activité peroxydase-like de l'hémoglobine due au fer et en présence du peroxyde d'hydrogène, catalyse l'oxydation de la phénolphtaléine, dont la couleur tourne vers le rose vif (voir réaction en figure 3). La phénolphtaléine ne participe pas directement à ce processus, mais agit comme une source externe d'électrons. Dans sa réaction avec l'eau oxygénée, l'hémoglobine se comporte comme une peroxydase, réduisant le peroxyde en eau. Cette activité épuise les électrons de l'hémoglobine qui sont, refournis par la phénolphtaléine. La donation d'électrons à l'hémoglobine convertit la phénolphtaléine incolore (réduite) en phénolphtaléine intensément colorée (oxydée).



La sensibilité du test de Kastle-Meyer est élevée, car permet de détecter du sang très dilué (1/100 000 à 1/1 000 000 de dilution). Cependant certaines limites ont été rapportées (Stuart H, et *al.*, 2002), notamment les faux positifs en présence de légumes (pomme de terre, le brocoli, le chou-fleur...etc), d'oxydants chimiques (cuivre et sels de nickel).

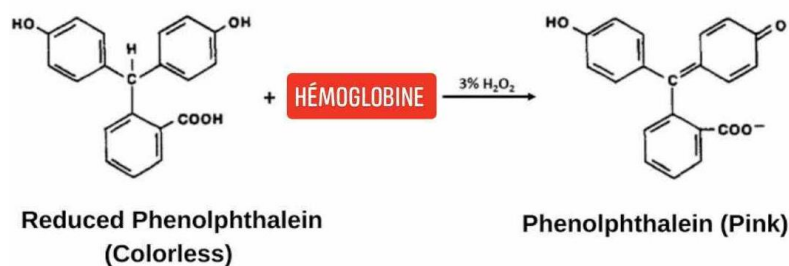


Figure 3 : Réaction chimique de base du test Kastle-Meyer.

I.2.4.2. Observation otique par la lumière Bleue et Blanche

La détection de sang sur différents tissus (coton, synthétique et jean) en criminalistique peut être effectuée en utilisant différentes techniques d'éclairage, notamment la lumière blanche et la lumière bleue, souvent en combinaison avec des filtres spécifiques. Voici un aperçu des méthodes et des principes impliqués :

a- Lumière Blanche (400-700 nm)

- **Principe :** La lumière blanche ordinaire peut révéler des taches de sang visibles à l'œil nu sur certaines surfaces, en fonction du contraste entre la couleur du sang et celle du tissu. C'est souvent la première méthode utilisée pour une inspection visuelle initiale (De Forest, P. R, et *al.*, 1983).

- Applications

- Tissus clairs : Sur des tissus de couleur claire, le sang apparaît généralement comme une tache foncée et peut être facilement visible.

- Tissus foncés : Sur des tissus foncés, les taches de sang peuvent être plus difficiles à discerner sans l'aide de techniques supplémentaires.

b- Lumière Bleue (420-470 nm) avec Filtre

- **Principe** : L'éclairage avec une lumière bleue peut provoquer la fluorescence de certaines substances, mais le sang ne fluoresce pas naturellement sous cette lumière. Toutefois, l'utilisation d'un filtre approprié permet de mieux voir les contrastes.

- **Le filtre à vitre bleue** : Permet de bloquer les longueurs d'onde non désirées et de mettre en évidence les différences de contraste.

- Applications

- Coton : Le sang peut apparaître plus sombre sur du coton sous lumière bleue, surtout sur du coton clair.

- Synthétique : Les fibres synthétiques peuvent montrer un contraste distinct avec le sang, souvent plus facilement que le coton.

- Jean : Le jean, étant un tissu texturé et souvent de couleur foncée, peut poser des défis. Cependant, le contraste entre le sang et le tissu peut être amélioré avec la lumière bleue et le filtre.

- **Le filtre à vitre violette** : Similaire à la vitre bleue, mais avec un spectre légèrement différent, cela peut améliorer la visualisation des taches de sang sur certains matériaux.

- Applications :

- Coton : Peut offrir un contraste différent et potentiellement meilleur que le filtre bleu sur certains types de coton.

- Synthétique : Efficace pour faire ressortir les taches sur certains tissus synthétiques.

- Jean : Peut aider à mieux distinguer les taches sur des jeans sombres. (Caine et Stockham, 2001).

La combinaison de différentes sources lumineuses et de filtres permet d'améliorer la détection de taches de sang sur divers tissus. En criminalistique, l'utilisation de la lumière bleue avec des filtres bleus ou violets, en conjonction avec des techniques chimiques, offre une méthode efficace pour révéler des traces de sang même sur des surfaces complexes comme le jean.

I.2.4.3. Test de confirmation par Bleu Star

Blue Star Forensic, est désormais disponible comme substitut au luminol. Bien que Blue Star Forensic soit à base de luminol et fonctionne de la même manière que le luminol, ses propriétés le rendent plus pratique pour les enquêtes sur les scènes de crime : il ne nécessite pas d'obscurité totale, il maintient la même chimiluminescence après chaque pulvérisation et peut être utilisé jusqu'à plusieurs jours après préparation du mélange. Le produit Blue Star est basé sur une réaction chimiluminescence, c'est-à-dire une réaction chimique qui produit de la lumière. La réaction du Blue Star avec les traces de sang implique plusieurs réactions en cascade qui commence avec l'hémoglobine et se termine par la formation de la lumière bleue.

1. **Hémoglobine** : l'hémoglobine, protéine présente dans les globules rouges, contient du fer dans sa structure, qui est essentiel à la réaction chimique avec le Blue Star.
2. **Oxydation du fer** : Lorsque le Blue Star est appliqué sur une surface contenant des traces de sang, il réagit avec le fer présent dans l'hémoglobine. Cette réaction provoque l'oxydation du fer (perd des électrons).
3. **Formation de peroxyde d'hydrogène** : Lorsque le fer de l'hémoglobine est oxydé, il réagit avec l'eau présente dans l'environnement pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).
4. **Réduction du peroxyde d'hydrogène** : Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé subit une réduction en présence de certains composants du Blue Star. Ce processus de réduction libère de l'énergie sous forme de lumière bleue.

L'émission de lumière bleue est le résultat de cette réaction chimiluminescente qui se produit spécifiquement en présence de sang. Cela permet aux enquêteurs d'identifier et de localiser les traces de sang, même si elles sont invisibles à l'œil nu. La luminescence produite par cette réaction est détectée à l'aide d'une lampe UV, ce qui rend les traces de sang visibles dans l'obscurité. Cette réaction chimique est spécifique au Blue star et est utilisée comme outil précieux dans les enquêtes criminelles pour la détection de traces de sang, même après un nettoyage minutieux de la scène du crime.

I.3. Empreinte génétique et étapes d'obtention d'un profil génétique

L'empreinte génétique provient de l'expression "Genetic Fingerprint" par analogie avec les empreintes digitales (propres à chaque individu), utilisées dans le cadre de l'identification des criminels. Une empreinte ou profil génétique est le résultat d'une analyse rendant possible l'identification d'une personne à partir d'une certaine quantité de ses tissus biologiques (bulbe de

cheveux, sang, salive, sperme). Elle repose sur le fait que bien que deux humains ont une large majorité de leur patrimoine génétique identique, un certain ensemble de séquences dans leur ADN reste spécifique à chaque individu (en raison du polymorphisme). L'analyse de cette empreinte permet de comparer des séquences spécifiques d'un individu. Un échantillon de cellule présentant la même empreinte génétique qu'un individu, confirme la provenance de ces cellules de cet individu ou de son éventuel jumeau monozygote.

I.3.1. Étapes d'obtention d'un profil génétique

Les échantillons biologiques récoltés sur la scène de crime subissent un processus complexe et bien établi afin d'en extraire l'ADN contenu et d'en identifier le profil génétique. Ce processus devant être respecté afin de garantir la réussite du profilage, inclut les étapes ordonnées suivantes :

I.3.1.1. Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN consiste en une digestion des membranes cellulaires et nucléaires des cellules pour libérer l'ADN et le solubiliser. Cette étape permet d'éliminer les protéines cellulaires qui protègent l'ADN et qui inhibent la capacité d'analyse de l'ADN et son amplification lors de la PCR. Elle permet de produire une solution stable d'ADN de haute qualité qui ne se dégrade pas durant le stockage (Butler et Hill, 2012). Il existe différentes méthodes d'extraction d'ADN :

- **Extraction organique** : Repose sur l'utilisation de solvants organiques ; un volume de phénol pour déprotéiniser l'ADN. L'ADN restant dans la phase aqueuse sera ensuite précipité à l'alcool, lavé puis séché et resuspendu dans un tampon approprié (Butler, 2005). Cette méthode permet de récolter de grandes quantités d'ADN, mais elle présente de nombreux inconvénients dont la longue durée de manipulation ainsi que l'utilisation de produits toxiques comme le phénol.

- **Extraction au Chelex** : Est basé sur l'utilisation d'une résine échangeuse d'ions Chelex-100 qui est composé de copolymères de styrène-divinyle-benzène contenant une paire d'ions iminodiacétates. Ils agissent comme des groupements chélateurs en liant les ions métalliques polyvalents comme le Fer ou le Magnésium qui protègent l'ADN des nucléases et peuvent agir comme des inhibiteurs de l'amplification (Siegel et Saukko, 2000). Rapide et peu coûteuse, elle n'élimine pas tous les inhibiteurs de la PCR et ne permet pas un long stockage de l'ADN.

- **Extraction à l'aide du kit DNA-Adem tech** : En utilisant des billes recouvertes d'un anticorps liant l'ADN ou d'un groupement fonctionnel qui interagit spécifiquement avec

l'ADN, il permet de créer des liens réversibles avec l'ADN. Les billes seront ensuite séparées des autres composants cellulaires à l'aide d'un portoir magnétique et l'ADN purifié sera élué par précipitation à l'éthanol (Dhaliwal, 2013).

- **Extraction par le kit Qiagen** : Permet de fixer l'ADN d'un échantillon préalablement lysé, sur des colonnes qui possèdent une membrane de gel-silice en présence d'une haute concentration ionique au cours d'une brève centrifugation. Les protéines et autres impuretés sont éliminées au cours de deux centrifugations en présence d'un tampon de lavage (Butler, 2012 ; Dhaliwal, 2013). Cette technique est celle employée par la police scientifique pour l'extraction d'ADN de tout type d'échantillon.

Il est à noter toutefois, que toutes ces techniques reposent sur le même principe : Lyse cellulaire pour libérer la molécule d'ADN.

Séparation des molécules d'ADN des autres matériaux cellulaires.

Isolement de l'ADN sous une forme compatible avec les applications en aval, dans l'amplification par PCR.

I.3.1.2. Quantification par PCR en temps réel

La quantification de l'ADN permet de déterminer si la quantité de l'ADN est suffisante à l'amplification et donc à l'établissement du profil génétique. En effet, la quantité d'ADN doit être comprise dans un intervalle optimal. Une quantité supérieure peut entraîner la formation d'artéfacts tandis qu'une quantité insuffisante d'ADN entraîne l'échec du processus d'amplification «fluctuation stochastique» (Butler, 2005).

La PCR en temps réel est une variante de la PCR basée sur une réaction enzymologique et sur la mesure continue des amplicons. A chaque cycle d'amplification, la quantité totale de l'ADN est mesurée via la sonde moléculaire TaqMan (figure 4). Cette sonde porte à son extrémité 5' un *reporter* (émetteur d'un signal de fluorescence après excitation au laser) et à son extrémité 3' un «*Quencher*» (suppresseur qui reçoit la fluorescence). En absence d'amplification, la sonde reste intacte, le *Quencher* absorbe une grande partie la fluorescence du *reporter* et seule une fluorescence résiduelle est émise en raison de la proximité des deux molécules (Coquoz, 2006). Par contre s'il y a amplification, la sonde TaqMan est hydrolysée par l'ADN polymérase grâce à son activité 5'nucléase lors de l'étape d'élongation de l'ADN. Le *reporter* est alors libéré et sa fluorescence n'est plus absorbée par celle *Quencher*. L'augmentation du signal de fluorescence détectée est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés (Butler, 2005).

I.3.1.3. Amplification par PCR

La PCR est une réaction enzymatique d'amplification d'ADN en chaîne, *in vitro* par l'utilisation de la Taq DNA Polymerase. Une seule molécule peut s'amplifier jusqu'à 1 Milliard de fois après 30 cycles d'amplification (Lakshmi et *al.*, 2021).

L'ADN récolté sur les scènes de crimes est souvent de faible quantité et de mauvaise qualité, de ce fait la technique de la PCR est la plus adaptée grâce à sa rapidité et sa sensibilité à l'analyse d'échantillons.

L'amplification de l'ADN passe par plusieurs cycles thermiques allant jusqu'à 40 cycles et chaque cycle se déroule en 3 étapes :

- **Dénaturation** : sous une température de 94°C, elle permet de séparer les deux brins d'ADN afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténaies.
- **Hybridation** : sous une température entre 50°C et 65°C, elle permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider.
- **Elongation** : sous une température de 72°C, elle permet de catalyser la réaction de polymérisation en aval des amorces en utilisant les dNTPs présents dans le mélange réactionnel.

I.3.1.4. Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une électrophorèse réalisée dans un tube capillaire presque aussi fin qu'un cheveu. C'est la technique la plus efficace pour la séparation et la détection de l'ADN amplifié selon la taille (nombre de répétions de la séquence STR) grâce à la migration d'espèces chargées dans un champ électrique. (Butler et *al.*, 2001). Dans une électrophorèse capillaire l'utilisation de capillaires permet d'appliquer une différence de potentiel plus importante (12k Volts) par rapport à une électrophorèse classique. La migration des fragments d'ADN se fait donc de façon plus rapide.

1.3.2. Validation de profil et rapport final selon la norme l'ISO/CEI 17027

La validation de la méthode est une exigence essentielle de l'ISO/CEI 17025, qui sert de système pour garantir la fiabilité des résultats. La validation des méthodes équivaut à l'application constante de méthodes. Cela signifie un meilleur accord entre les nations, les laboratoires et les analyst.

Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique

Nous avons utilisé du sang humain conservé à -20°C préalablement prélevé sur EDTA, à partir d'un individu connu de sexe masculin.

II. Matériel non biologique

Les étapes de l'expérimentation étaient réparties sur différentes salles (examen de scellés, extraction, quantification...). Les kits, réactifs ainsi que l'appareillage et équipement utilisés, sont présentés dans le tableau II, selon la salle de manipulation correspondante.

Tableau II: Matériels non biologique.

Salle	Appareillage et Equipements	Kits, réactifs et produits
Examen de scellés	Agitateur magnétique avec plaque chauffante- Coupelle avec différente dimension- Thermomètre- Hotte chimique- Papier de pailasse- Balance (SF-400 JAYA)- Charlottes - Bavette - Papier kraft- Hotte à température ambiante (Captair By ErLab) - Sachet de conservation.	Eau de javel avec chlore (Bref)- Eau de javel sans chlore.....- Savon en poudre (OMO)- Eau distillé - Sérum salé NaCl 1‰.
Extraction de l'ADN	Centrifugeuse Sigma 1-15- Bloc chauffant (avec température $56^{\circ}\text{C}/70^{\circ}\text{C}$ et Speed 900 Rpm)- Vortex- Hotte à flux laminaire- Agitateur magnétique.	Kit Qiagen : Protéinase K, tampons ATL, AL, AW1, AW2 et ATE, éthanol absolue.
Quantification de l'ADN	Thermocycleur 7500fast - Centrifugeuse - Plaque 96 puits pour Real Time PCR- Papier transparent.	Kit Human Quantifier: Eau ultra pure- ADN Standard- Primers- Reaction Mix.
PCR multiplexe	Thermocycleur 9700- Support Plaque PCR- Hotte à flux laminaire- centrifugeuse pour les microtubes - Vortex- Kimwipes- masques, charlottes, sur chaussures- Plaques d'amplification à 96 puits- Feuilles d'aluminium adhésive.	Kit Minifiler : dNTP - Mg^{2+} -Primers- Taq DNA Polymérase - Eau ultra pure - AmpFISTR Minifiler- Globalfiler PCR amplification kit.
POST – PCR	Thermo Bloc- Plaque post PCR- Septa retainer plate-Thermocycleur 9700 silver - Cryoblock (-20°C) - Cappillaire 36 cm	MIX- Formamide HiDi (-20°C)- LIZ600 Gene scan ($+4^{\circ}\text{C}$)- Ladder $+4^{\circ}$ (identifiler, NGM, Minifiler, Globalfiler- 20°C Yfiler) - Polymère Pop 4 ($+4^{\circ}\text{C}$) - Cathode buffer container seq studio - Cartridge (cartouche) seq studio- Cathode buffer container3500XL et anode- Buffer container3500XL ($+4^{\circ}\text{C}$) - BTO555 (-20°C)- Ladder- 20°C (24plex).
Electrophorèse capillaire	Séquenceur 3100 (ABI PRISM)-Ordinateur	Support de Plaque-Tampon POP-4- Tampon de Migration.

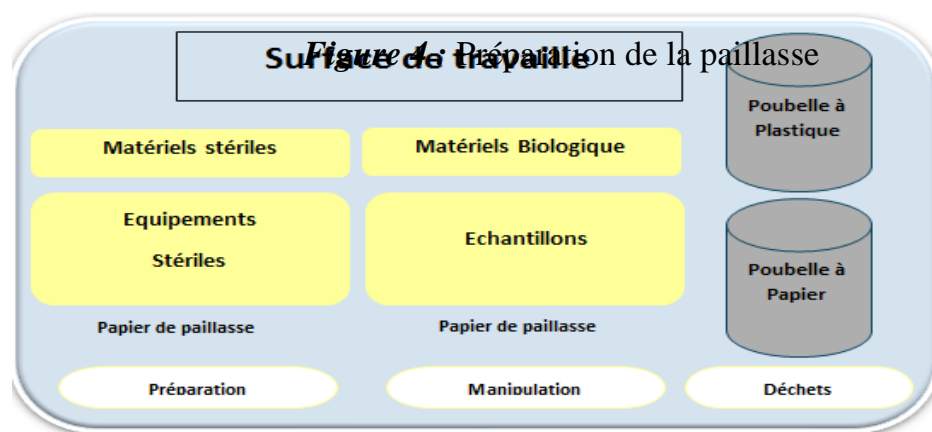
Nous avons mené notre étude au sein du Département d'Analyse d'ADN de la Police Scientifique et Technique situé à Châteauneuf (SDPST, Ben Aknoun), Alger ; pendant la période de février à avril 2024. Nous avons appliqué les tests préliminaires de Kastel-Meyer et Blue star dans la révélation, puis la récolte des traces de sang, préalablement répartis sur différents textiles ; recréant ainsi un prélèvement provenant d'une scène de crime. Ces échantillons de tissus ont été lavés à différentes températures et détergents et conservés dans diverses conditions; et ce, dans le but de valider les tests préliminaires cités en haut. Après récolte de traces de sangs, une purification d'ADN a été réalisée afin de le soumettre à un profilage STR en MiniFiler.

III. Préparation de l'espace de travail

Avant chaque examen de scellé et pour réaliser l'analyse génétique des échantillons collectés, des étapes nécessaires doivent être effectuées en plusieurs étapes comme suit :

- Nettoyage de la paillasse au SDS 0,1 %.
- Nettoyage du matériel et équipements à utiliser.
- Répartition de la surface de travail en 3 parties distinctes.
- Préparation des échantillons sur un papier paillasse (identification, codification et photographie de chaque échantillon).

IV.
traces
des
sang a
ce qui



Etude des traces de sang
L'étude des traces de sang implique :

- 1- Répartition du sang dans différents morceaux de tissus.
- 1- Application de différents traitements de lavage et de conservation.
- 2- Révélation des traces de sang par les tests préliminaires.

IV.1. Préparation des échantillons de tissus

Nous avons sélectionné trois types de tissus comme support de la trace biologique, à savoir le coton, le jean et le synthétique ; qui ont été découpé en petites morceaux. Ces derniers répartis selon le traitement en deux catégories d'expériences 1 et 2, ont reçu chacun, 500 μ l de sang déposés avec une micropipette (tableau III et figure 5).

Tableau III: Types de tissus et répartition selon l'expérience.

	EXPERIENCE 1	EXPERIENCE 2			Total
Support	Lavage avec le sérum salé	Sans lavage	Savon poudre + eau de javel	Eau de javel sans chlore	
Coton	4	1	3	3	11
Synthétique	0	1	3	3	7
Jean	0	1	3	3	7



Figure 5 : Dépôts du sang sur le tissu.

IV.2. Traitements de lavage et de conservations des supports de tissus

Nous avons procédé en premier temps à différents lavages en conditionnant deux paramètres : le choix du détergent (eau de javel, savon en poudre, eau de javel sans chlore) et la température (température ambiante, -20°C , 40°C , 60°C et 90°C) ; et ce, après avoir séché et/ou conservé les échantillons. Il faut noter, que pour chaque série de traitement, nous avons inclus un témoin positif et négatif.

a- Expérience 1

Quatre morceaux de tissus de type coton préalablement tachés avec 5 μ l sang, on subit un certain nombre de traitements. Après séchage sous hotte pendant 24 heures, ils subissent un lavage individuel dans une solution saline concentré à 0,26%, à température ambiante par agitation pendant 5 min.

L'essorage mécanique des échantillons permet leur séchage sur des coupelles stériles et identifiées. Deux des 4 morceaux de tissus ainsi traités, ont été conservés sous hotte à température ambiante pendant 3 semaines. Les deux restants ont été enveloppés dans du papier kraft (absorbe l'humidité à l'intérieur), puis emballés dans des sachets de Biohazard ; et conservés pendant 3 semaines à -20°C.

b- Expérience 2

Les traitements de l'expérience 2 ont concernés les trois types de tissus ayant reçu 500µl de Sang, puis séchés pendant 24h à température ambiante. Certains n'ont pas subi de lavage (un morceau) alors que d'autres (trois morceaux) ont été lavés selon deux modes différents (voir tableau III).

- ✓ Les échantillons non lavés : sont directement conservés sous hotte pendant 24h.
- ✓ Les échantillons lavés soit avec le savon en poudre + eau de javel avec chlore, soit directement avec l'eau de javel sans chlore ; ont été traités à des températures variables : 40°C, 60°C et 90°C.

b.1. Echantillon lavé à l'Eau de Javel + Savon en poudre

La solution de lavage est préparée en mélangeant 20gr de savon en poudre avec 3ml d'eau de javel avec chlore. Un volume de 300ml d'eau de robinet chauffé à 40°C, 60°C ou 90°C, est mélangé par agitation magnétique avec la solution de lavage. Au cours de cette agitation, le morceau de tissu est ajouté et laissé laver pendant 5min. Après essorage du morceau de tissu, il est mis dans une coupelle identifiée puis conservé sous la hotte à température ambiante. Il est à noter, que les instruments utilisés sont nettoyés après chaque utilisation.

b.2.2. Echantillon lavé à l'Eau de Javel Sans Chlore

Selon le même procédé cité en haut, 300 ml d'eau de robinet sont chauffée à 40°C, 60°C ou 90°C sur un agitateur magnétique chauffant. Cinq millilitres d'eau de javel sans chlore sont additionnés, suivi du lavage pendant 5min du morceau de tissus. Ce dernier essoré, mis dans une coupelle stérile et identifié, est séché pendant 24h sous hotte.

V. Révélation des traces de sang par les tests préliminaires

V.1. Observation optique

La recherche des traces de sang sur les tissus, préparés lors des deux expériences précédentes, commence par une simple observation à l'œil nu, puis à l'aide de deux types de

lumières blanche et bleue. Les échantillons sont d'abord déplacés sous hotte dans une chambre sombre, où toute source lumineuse est éteinte. Ils sont par la suite exposés à une lumière blanche (lampe blanche) à longueur d'onde 400-700 nm, puis à une lumière bleue (lampe bleue UV) à longueur d'onde 470 nm ; en portant des lunettes de protection à vitre. Les taches du sang observées sur les tissus sont découpées et mis dans des tubes eppendorfs identifiés (figure 6).

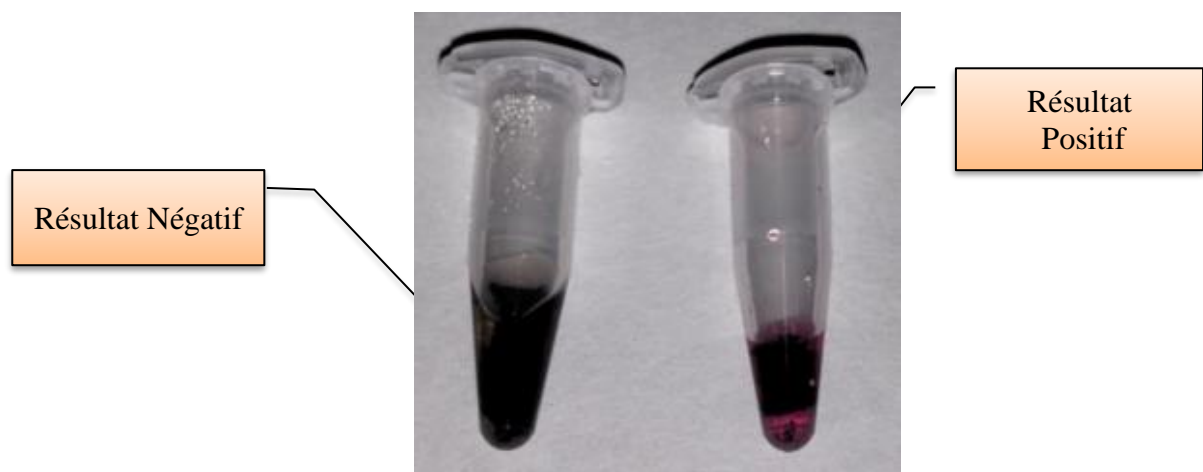


Figure 6 : Observation optique par la lumière Bleue et Blanche

V.2. Test de Kastle Meyer

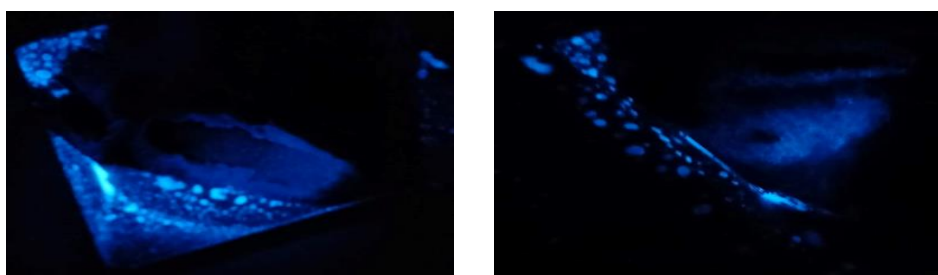
Le réactif Kastle Meyer est préparé en dissolvant dans 100ml d'eau déminéralisée, 2g de phénolphtaléine, 20g de potasse KOH et 20g de poudre de zinc. On chauffe pendant 45min à 100°C - 150°C avec un agitateur (la couleur rose foncé indique un état oxydé). La solution est conservée dans un flacon à 4°C à l'abri de la lumière (recouvrir d'aluminium et de para film).

Le protocole consiste à verser 3 gouttes du réactif de Kastle Meyer dans le tube eppendorf qui contient le petit morceau du tissu contenant la tache du sang observé à l'œil nu. Après addition de 3 gouttes de H₂O₂ et agitation, une couleur rose instantanée apparaît (figure 7).



V.3. Test de Blue Star

Pour détecter et observer les résultats positifs et négatifs du test KM, nous avons réalisé plusieurs expériences.



précédentes, le réactif Blue Star est d'abord préparé pour l'appliquer. Cela se fait en dissolvant deux comprimés de Blue Star de couleur bleu (hydroxyde de sodium+ Blue star) dans 125ml d'eau distillée. L'agitation du mélange se fait par mouvements circulaires doux pendant 5 minutes, jusqu'à dissolution complète des comprimés. Le réactif est conservé dans un vaporisateur et appliqué sur les 5 séries de tissus qui ont été séchés sous la hotte ou conservés dans le congélateur (pour les deux expériences), à savoir : témoin positif (Coton, Jean, Synthétique), tissus non lavés (Coton, Jean, Synthétique), tissus lavés par l'eau de javel sans chlore à 40°C, 60°C et 90°C (Coton, Jean, Synthétique), tissus lavés par l'eau de javel avec chlore et le savon en poudre à 40°C, 60°C et 90°C (Coton, Jean, Synthétique) et tissu (coton) lavée par la solution saline. Dans une chambre sombre, le réactif Blue Star est vaporisé sur le tissu. Les endroits montrant une fluorescence en 40sec, sont rapidement découpés avec les ciseaux et mis dans un eppendorf (figure 8).

Figure 8 : Observation de la fluorescence après l'application du Bleu Star sur les traces du sang.

VI. Profilage

L'élaboration d'un profil génétique passe par un processus complexe dont nous présentons les étapes comme suit :

VI.1. Processus d'extraction et de l'ADN

L'extraction et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons de sang, peut être effectuée par plusieurs méthodes. Dans notre étude nous avons utilisé la méthode d'extraction par le Kit Qiagen.

Il s'agit d'un système ayant recours à la technologie des membranes de silice chargée positivement.

Il faut noter qu'avant de commencer la manipulation, si le tampon ATL contient des cristaux, il faut le faire chauffer à 70°C en appliquant une agitation douce.

➤ **Lyse cellulaire :** se fait selon les étapes suivantes :

- Dans un tube de 2ml, immerger un échantillon de 0.5cm³ dans 300µl de tampon ATL et 20µl de PK du kit.
- Vortex pendant 10 second et incubé 1h à 56°C Avec une agitation de 900rpm.
- Centrifuger quelque secondes pour faire tomber les gouttelettes accumulées dans le couvercle de l'eppendorf.

- Passer l'échantillon en tube passoire pour récupérer le lysat (Perforer le tube avec une aiguille hypodermique stérile après l'avoir nettoyé avec un kimwips imbibé d'éthanol 70C° et l'introduire sur un nouveau eppendorf identifié : ce dernier aura le rôle de réservoir du lysat).
- Centrifuger pendant 3min à 13000rpm, si l'échantillon est sale ou présente une quelconque coloration, passer le lysat sur une colonne qiashredder et centrifuger pendant 3min à 13000rpm.
- Ajouter 300 µl de tampon AL et vortex pour bien mixer pendant 10sec.
- Incuber 10min à 70C° sur bloc chauffant avec agitateur 900rpm, en absence de bloc chauffant avec agitateur, faire agiter les échantillons chaque 3min pendant 10seconds.

➤ **Purification**

- Centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttelettes et ajouter 150µl d'éthanol absolu.
- Vortexer pendant 15 seconde, centrifuger brièvement et déposer le tout doucement au centre d'une colonne QIAamp MinElute Colum, préalablement identifiée sans toucher la membrane avec le cône de la pipette.
- Centrifuger 1min à 800 rpm.
- Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 500µl de tampon AW1.
- Centrifuger 1min à 8000rpm.
- Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAampMinElute dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 700µl de tampon d'AW2.
- Centrifuger 1min à 8000rpm.
- Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAampMinElute dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 700µl d'éthanol absolu.
- Centrifuger 1min à 8000rpm.
- Eliminer le tube contant l'éluant, transférer la Colum QIAamp Min Elue dans un tube de 2ml.
- Centrifuger 3 min à 14000rpm.
- Placer la colonne QIAamp Min Elute dans un nouveau tube de 1,5 ml, stérile préalablement identifié. - ouvrir le couvercle de la colonne et laisser sécher à température ambiante pendant 3min.

- Ajouter 20 à 50µl du tampon ATE, ou bien de l'eau distillée, puis fermer le capuchon de la colonne.
- Incuber 1min à température ambiante, centrifuger 1min à 14000rpm pour récupérer l'extractum et jeter la colonne.
- Conserver les tubes d'ADN à -20°C.
- Préparer des aliquotes de 08µl pour l'étape suivante.

VI.2. Quantification de l'ADN par PCR en Temps Réel

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

Tableau IV : Le gène cible du kit Human Quantifiler.

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

Avant de répartir les échantillons dans la plaque de 96 puits compatible avec la thermocycleur 7500, une série de 07 dilutions a été préparée à partir de la solution mère d'ADN standard (50 ng/µl) en accord avec la recommandation du fournisseur pour établir une courbe d'étalonnage (gamme standard en annexe), qui permettra au logiciel SDS de calculer la concentration d'ADN dans chaque échantillon.

Le mode opératoire se déroule selon les étapes ci-après :

- 1- Vortexer les tubes d'ADN à quantifier, le témoin négatif et les standards.
- 2- Mélanger doucement par retournement la réaction mix.
- 3- Vortexer les primers (ne pas centrifuger).
- 4- Calculer les volumes des différents réactifs nécessaires au mix (se référer au formulaire de suivi quantification real time PCR).
- 5- Préparer le mix dans un tube eppendorf.
- 6- Répartir 18µl de ce mix dans chaque puits.

- 7- Ajouter dans chaque puits 2 µl de chaque échantillon et standard (se référer au plan de dépôt). Ne pas oublier le témoin négatif.
- 8- Recouvrir la plaque avec du papier adhésif.
- 9- Placer la plaque dans le thermocycleur 7500 FAST et lancer le programme 9600 Emulation.

VI.2.1. Principe de détection de l'ABI PRIM 7500 Fast system

La lampe halogentungsten dirige la lumière dans chaque puits à travers l'Optical adhésive en excitant les fluorochromes. Un système composé de lentilles, filtres et miroir dichroïque focalise l'émission de fluorescences camera CCD (Camera Coupled Device). Basés sur des longueurs d'ondes, les filtres séparent la lumière en traversant la camera CCD. Durant le run, la camera CCD détecte la fluorescence émise entre 500 et 600 nm de chaque puits. Le Software SDS (Sequene Detection System) collecte les données de la fluorescence émise de la camera CCD et applique l'analyse logarithmique des données suivant l'équation suivant :

$$N_c = N (1+E)^c$$

VI.2.2. Les conditions du processus de travail du Thermocycleur 7500 Fast

La PCR quantitative exige deux étapes qui sont précédées par une phase d'incubation initiale à 95°C pendant 03 minutes pour activer la polymérase

- Etape 1 : dénaturation des deux brins d'ADN à une température de 95°C durant 05 secondes.
- Etape 2 : hybridation et élongation à une température de 60°C durant 35 secondes, Après 40 cycles s'effectue la collecte de la fluorescence (voir la courbe d'amplification en annexe).

VI.2.3. Courbe standard

Pour le suivi de l'amplification par PCR en temps réel des échantillons d'ADN, il est nécessaire de tracer à partir du Ct (Cycle Seuil) en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN dans les différentes dilutions et de mesurer ainsi la concentration en (ng/µl) d'amplicons générés.

Nous commençons par vérifier les courbes d'amplification des différents échantillons afin de voir s'il y a amplification ou non de l'IPC (Internal PCR Control), qui nous renseigne sur l'absence ou la présence d'inhibiteurs d'ADN. 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 en fonction du logarithme décimal (log₁₀) de la concentration en ADN après amplification de la série des dilutions standard. 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. La courbe standard (figure 9), est tracée à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN, conformément aux recommandations d'AppliedBiosystem.

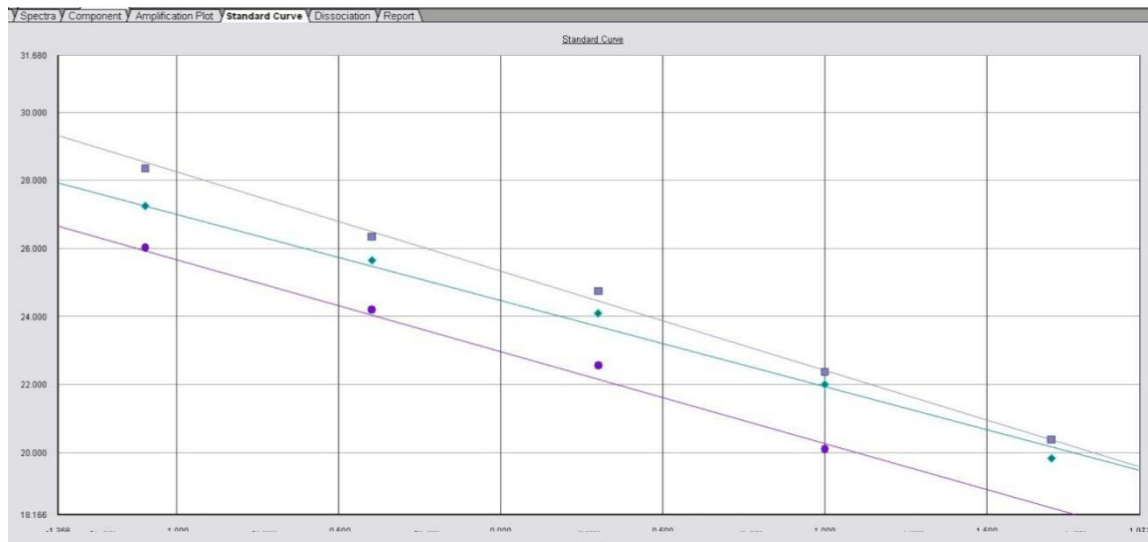


Figure 9 : courbe standard.

VI.3. PCR Multiplexe

Etant donné que nous n'avons pas manipulé la suite des étapes, nous nous concentrons à présenter dans cette partie la méthodologie telle qu'observée et présentée par les techniciens du département d'ADN de la police scientifique.

➤ **Principe de la méthode :** La PCR est une technique qui permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'ADN en imposant des cycles thermiques à un mélange réactionnel contenant une ADN polymérase thermostable, une matrice d'ADN et un couple d'amorces sélectionné. Chaque brin d'ADN est répliqué puis chaque copie est utilisée comme une nouvelle matrice lors des cycles suivants. Le cycle est répété (n) fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence cible.

Une fois le mix est préparé, déposé dans la plaque et placée dans le thermocycleur, il subit un certain nombre de cycles suivant des variations de température et des durées de réaction bien précises.

➤ **Méthodologie :** Commence par remplir le plan de dépôt de l'amplification sur STACS ou manuel puis identifier une plaque PCR (numéro amplification). Il faut vérifier la compatibilité des numéros d'ADN porté sur les tubes à amplifier et le plan de dépôt. On suit les étapes suivantes :

1- Calculer les volumes des différents réactifs nécessaire au mix (remplir le formulaire de suivi amplification selon le kit utilisé).

- 2- Vortex doucement pendant 5 à 10 sec les différents réactifs de la PCR (master mix, primer set) ne pas centrifuger les primers (amorces) pour éviter leur concentration au fond du tube.
- 3- Vortex les tubes d'ADN à amplifier ainsi que le contrôle positif et négatif.
- 4- Préparer les mix dans un tube eppendorf.
- 5- Vortex et centrifuger le tube.
- 6- Répartir un volume en μl selon le kit utilisé dans chaque puits (voir le protocole de chaque kit en annexe).
- 7- Ajouter un volume en μl de chaque échantillon d'ADN dans chaque puits (voir les tableaux de chaque kit en bas) en suivant l'ordre de dépôt ne pas oublier les témoins positif et négatif.
- 8- Recouvrir la plaque avec une feuille d'aluminium.
- 9- Placer la plaque dans le thermocycleur et lancer le programme selon le kit utilisé (voir les tableaux de chaque kit en annexe). Le volume final est de $25\mu\text{l}$.

VI.4. Protocole de post-PCR

➤ Principe de la méthode

La post-PCR est une technique qui permet de dénaturer les produits PCR (copie d'ADN) pour obtenir une copie monobrin par un traitement thermique. Ce brin est maintenu sous cette forme grâce à l'incorporation de la formamide entre les deux brins séparés par la chaleur ce qui empêche la renaturation de l'ADN, le milieu contient aussi deux standards interne et externe ce qu'on appelle LADDER et LIZ, l'ADN est alors prêt pour l'électrophorèse et le profilage.

➤ Méthodologie

Remplir le plan de dépôt post-amplification dans le STACS en se référant au plan de dépôt de l'amplification, la position de témoin positif et négatif prendra de nouveaux puits dans le plan de dépôt de la post-PCR.

a- Préparation du mix

- 1- Vortex doucement pendant 10 à 15 SEC.
- 2- Répartir $9\mu\text{l}$ de ce mix dans chaque puits (su référez au plan de dépôt).
- 3- Ajouter $3\mu\text{l}$ de chaque échantillon dans son puits en suivant l'ordre de dépôt. Ne pas oublier le Ladder ($1,5\mu\text{l}$).

- 4- Recouvrir la plaque avec les septa strip.
- 5- Centrifuger brièvement la plaque si nécessaire (pour éliminer les bulles d'air).
- 6- Placer la plaque dans le thermocycleur et lancer le programme dénaturation (95C° pendant 3 min).
- 7- Placer ensuite la plaque dans le cryobloc pendant 3min.
- 8- Vérifier encore une fois s'il n'y a pas des bulles d'air sinon centrifuger brièvement.
- 9- Placer les clips et transférer la plaque sur l'analyse génétique applied Biosystems Seq studio

Résultats et Discussions

I. Résultats

L'étude que nous avons menée, dans le cadre de notre stage au sein du département d'identification par empreinte génétique / ADN, avait pour but de récupérer et révéler les traces de sang sur des supports lavés à différentes températures ; pour un profilage STR avec le kit MiniFiler à partir de sang et prenant en compte différentes conditions variables.

I.1. Observation optique

L'observation à la lumière blanche et bleue a fourni des résultats positifs à partir des traces de sang sur différents supports lavés par différents détergents et à différentes températures, affichant ainsi une sensibilité plus accrue par rapport aux autres échantillons non lavés (témoins positifs) ; et ce, pour les deux expériences.

I.1.1. Expérience 1

Les résultats de l'observation optique sont regroupés sur le tableau V.

Tableau V : Résultats de l'observation optique affecté sur le coton pour l'expérience 01.

lumière échantillons	A l'œil nu	A la lumière blanche	A la lumière bleue
Echantillon Conservé à température ambiante	-	+	+
Echantillon Conservé à une température de -20°C	-	+	+

Nous remarquons qu'après le lavage des tissus en coton avec une solution saline, les résultats étaient identiques pour tous les échantillons des deux types de conservation. À l'œil nu rien n'était visible, cependant à la lumière blanche et bleue les résultats étaient positifs. Cela permet de déduire que le coton conserve bien les traces de sang, que ce soit à température ambiante ou bien à -20°C et cela facilite la conservation des pièces à convictions surtout dans les cas des affaires de crime de sang (homicide).

1.1.2. Expérience 2

Les résultats sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI : Résultats de l'observation optiques sur différents supports.

Type de détergent	température	Les échantillons	A la lumière Blanche	A la lumière Bleue
Lavage à l'eau de javel sans chlore	A température 40°C	Coton	-	-
		Synthétique	+	+
		Jean	+	+
	A température 60°C	Coton	+	+
		Synthétique	+	+
		Jean	+	+
	A température 90°C	Coton	+	+
		Synthétique	+	+
		Jean	+	+
Lavage à de l'eau de javel avec chlore + savon en poudre	A température 40°C	Coton	-	-
		Synthétique	-	+
		Jean	-	+
	A température 60°C	Coton	+	+
		Synthétique	+	+
		Jean	+	+
	A température 90°C	Coton	+	+
		Synthétique	+	+
		Jean	+	+
Témoin positive sans lavage	Témoin positive sans lavage	Coton	+	+
		Synthétique	+	+
		Jean	+	+

La lumière blanche est souvent utilisée comme source de lumière générale dans les laboratoires de criminalistiques. Elle offre des résultats positifs pour les traces du sang présentes sur les tissus coton, synthétique et jean, lavés à 60°C et 90°C avec de l'eau de javel sans chlore et même avec de l'eau de javel avec chlore + savon en poudre. Cependant le coton lavé à 40°C avec l'eau de javel sans chlore et le coton, synthétique et le jean lavé à 40°C avec l'eau de javel avec chlore + savon en poudre, ont donné un résultat négatif.

D'un autre côté, la lumière bleue est particulièrement efficace pour détecter les traces de sang qui sont invisibles à l'œil nu ou sous la lumière blanche. Nous avons obtenu des résultats positifs pour tous les tissus (coton, synthétique, jeans) lavés à toutes les températures avec de l'eau de javel sans chlore et même lavés avec de l'eau de javel avec chlore plus le savon en poudre, sauf pour le tissu en coton lorsqu'il est lavé à 40°C avec les détergents précédents. On conclut que le coton est le seul tissu qui ne garde pas les traces après lavage à 40°C même avec différents détergents. Les autres tissus donnent des résultats plus ou moins positifs à 40°C, affecté avec différents détergents. Selon nos observations, le sang n'interagirait pas avec le coton à 40°C, d'où le résultat négatif. Cette interaction nécessite une température plus élevée.

I.2. Test de Kastle-Meyer

I.2.1. Expérience 1

Les résultats sont présentés dans le tableau 9. Le coton lavé par la solution saline et conservé soit à température ambiante ou à -20°C, garde les traces de sang en donnant des résultats positifs par le test Kastle Meyer. Les traces de sang restent donc à l'état intègre sur le tissu coton, expliquant ainsi résultats positif à différentes températures de conservation.

Tableau VII : Résultats de test KM pour l'expérience 1 sur des supports lavés par la solution saline.

Test Conservation		Durée de conservation	Test Kastle Meyer
Type de tissu : Coton	Conservé à température ambiante	03 Semaines	+
	Conservé à -20°C		+

I.2.2. Expérience 2

Les résultats obtenus après différents lavages sont représentés dans le tableau 10. La révélation des traces de sang par le test KM était positive pour tous les tissus non lavés ou lavés aux diverses températures et en utilisant les détergents testés. Cependant, les tissus lavés

à 40°C avec de l'eau de javel avec chlore plus le savon en poudre, ont donné un résultat négatif.

Tableau VIII : Résultats du test KM pour différents supports.

Tissus		Coton	Synthétique	Jeans
Les lavages				
Non lavés		+	+	+
Lavés avec l'eau de javel sans chlore	A 40°C	+	+	+
	A 60°C	+	+	+
	A 90°C	+	+	+
Lavés avec l'eau de javel avec chlore + savon en poudre	A 40°C	-	-	-
	A 60°C	+	+	+
	A 90°C	+	+	+
Témoins positifs		+	+	+

I.3. Résultats de l'observation par Blue Star et son influence

Les résultats obtenus sont présentés selon les différents lavages dans les tableaux 11 et 12.

I.3.1. Expérience 1

Le test Blue Star n'a pas pu révéler la tache de sang sur les deux morceaux de tissus conservés différemment (tableau IX). Cela s'expliquerait par la présence du réactif luminol, qui se trouve dans le bleu star et qui agit sur le sang à un pH entre 11,5 et 14. en-deçà de cet intervalle, il n'y a pas de réaction avec le sang. La solution saline de lavage étant à pH 7, par conséquent, quel que soit la température de conservation, le test bleu star en solution saline est toujours négatif.

Tableau IX : Résultats du test Blue Star de l'expérience 1.

Test		Durée de conservation	Test Bleu Star
Conservation			
Type de tissu : Coton	Conserver à température ambiante	03 Semaines	-
	Conserver à -20°C		-

I.3.2. Expérience 2

Tous les tissus (coton, synthétique, jean) lavés avec l'eau de javel avec chlore plus le savon en poudre à 40°C et le synthétique lavé à 60°C, donnent des résultats négatifs lors de l'analyse avec le Blue Star (tableau 15). Le reste des tissus lavés avec le même détergent à 60°C et 90°C donnent des résultats positifs (tableau 15).

D'un autre côté, les morceaux de tissus coton, synthétique et jeans qui ont été lavés avec de l'eau de javel sans chlore à 40°C, 60°C et 90°C réagissent tous avec le Blue Star et donnent des résultats positifs, donc les traces de sang sont préservées même après le lavage.

Tableau X: Résultats du test Blue Star selon l'expérience 02.

Tissus		Coton	Synthétique	Jeans
Les lavages				
Non lavés		+	+	+
Lavés avec de l'eau javel sans chlore	A 40°C	+	+	+
	A 60°C	+	+	+
	A 90°C	+	+	+
Lavés avec l'eau de javel avec chlore + savon en poudre	A 40°C	-	-	-
	A 60°C	+	-	+
	A 90°C	+	+	+
Témoins positifs		+	+	+

I.4. Résultats de la quantification de l'ADN

Après avoir détecté la présence de sang par le biais des tests préliminaires, nous avons procédé à l'extraction de l'ADN à partir du morceau de tissu, par le biais du kit Qiagen et préparé des aliquotes pour la quantification.

La quantité des échantillons obtenus varient de 0 .0002 à 0 .8 µg/µl. Selon le fournisseur, la quantité optimale pour le kit MiniFiler et le thermocycleur AmpPCR system 9700 d'AppliedBiosystem est comprise entre (0.00-0/1) µg/µl. Cependant nos échantillons présentant une quantité d'ADN supérieure aux normes, on subit des dilutions, alors que ceux présentant une quantité inférieure à 001 µg/µl ne passent pas pour un profilage d'ADN (tableau XI).

Tableau XI: Les échantillons choisis pour faire le PCR de l'expérience 1 et 2.

L'expérience	Echantillon choisi	Quantité d'ADN	Indice de dégradation
Expérience 02	SSC 60C°	0 ,05	0,01
	SSC 60C°	0,5	0,09
	CJS 60C°	0,1	0,09
	CSC90C°	0,1	0,07
	SJS 90C°	0,1	0,04
	SSC 90C°	0,1	0,06
	SJS 90C°	0,6	0,1
	DSC 40C°	0,3	0 ,1
	CSC 40C°	0,001	0,001
	DJS 40C°	0,004	0,002
	CJS 40C°	0,007	0,0004
	CSC 40C°	0,02	0,004
Expérience 01	TA 1	0,06	0,03
	Congelé 1	0,5	0,3
	TA 2	0,01	0,005
	Congelé 2	0,01	0,006

La quantité d'ADN utilisée peut influencer sur le résultat d'amplification. Une quantité insuffisante ne permet pas d'obtenir d'amplification, alors qu'une quantité trop importante peut inhiber la réaction (Vroh et *al.*, 1997). 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 2015 ; Daly et *al.*, 2012)

I.5. Interprétation des profils génétiques (empreinte génétique)

Afin de déterminer les allèles présents dans un échantillon, l'analyste utilise un graphique appelé électrophorégramme (epg), mesurant les réponses en unités de fluorescence relative (RFU). L'epg représente les amplicons d'ADN séparés 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 électrophorégramme 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). Les loci sont identifiés par les cases grises, indiquées 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) indique la taille du fragment amplifié par PCR. 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, qui se trouvent 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, il 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.

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.

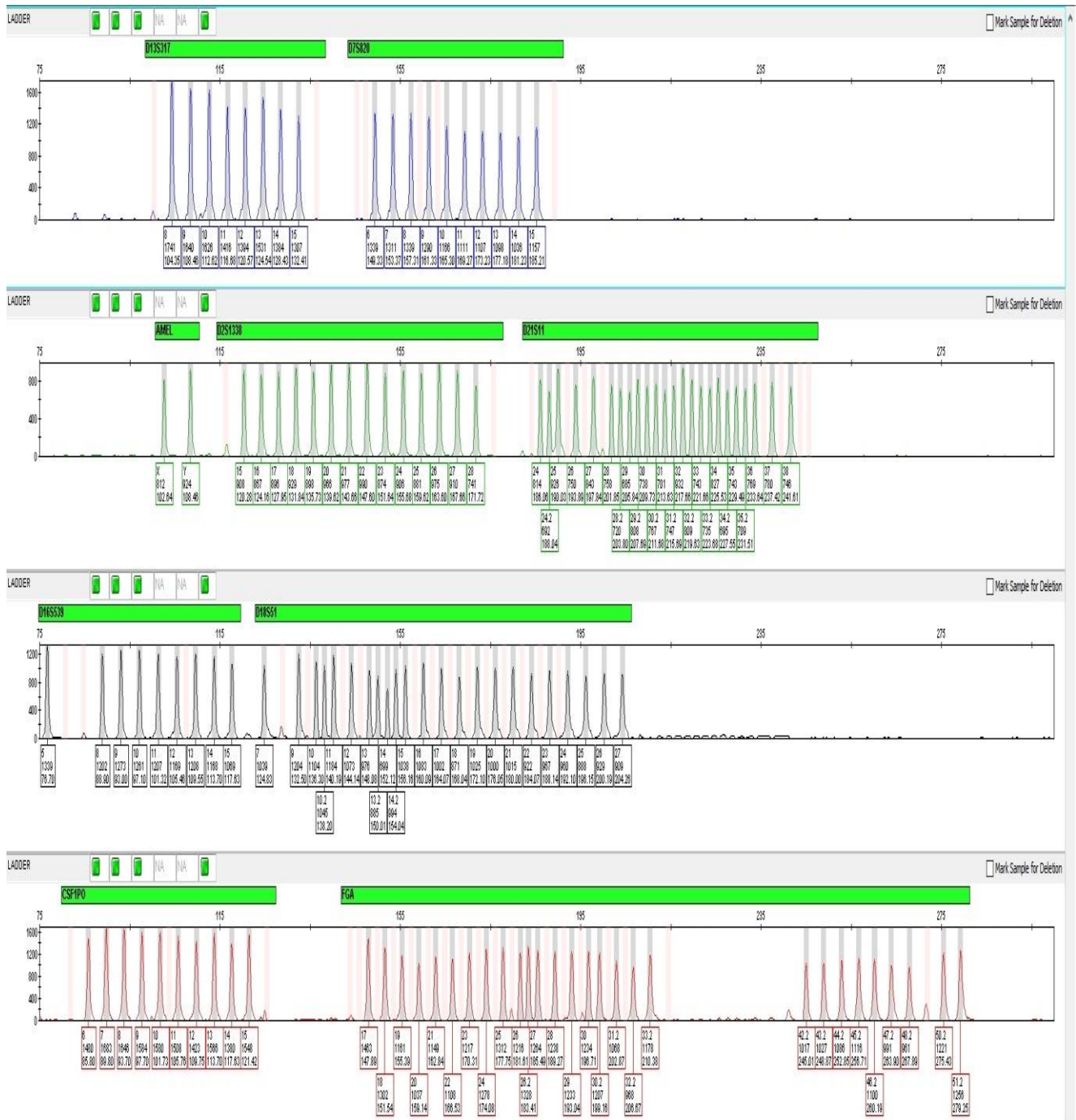


Figure 10: Profil génétique de la Ladder.

Explication de la figure 10

Le ladder (ou échelle ou standard internet) dans un kit de typage ADN comme l'indentifier minifiler ou autre kit d'amplification est une série d'allèles connus pour un marqueur D8 qui contient par exemple de 8 répétition jusqu'a 18 répétitions, lorsque on assigné l'électrophoregramme d'un échantillon avec le ladder les différents allèles leur taille a été déterminer par le standard de taille interne comme GS 500 ou bien le liz pour promega le nombre des répétitions pour le marque comme le D8 va être déterminer exemple 8 et 12. cad utilisés comme référence , il permet de comparer et de déterminer les tailles des fragments d'ADN amplifiés pendant l'analyse. On résume, le ladder sert de standard pour interpréter les résultats électrophorétiques.

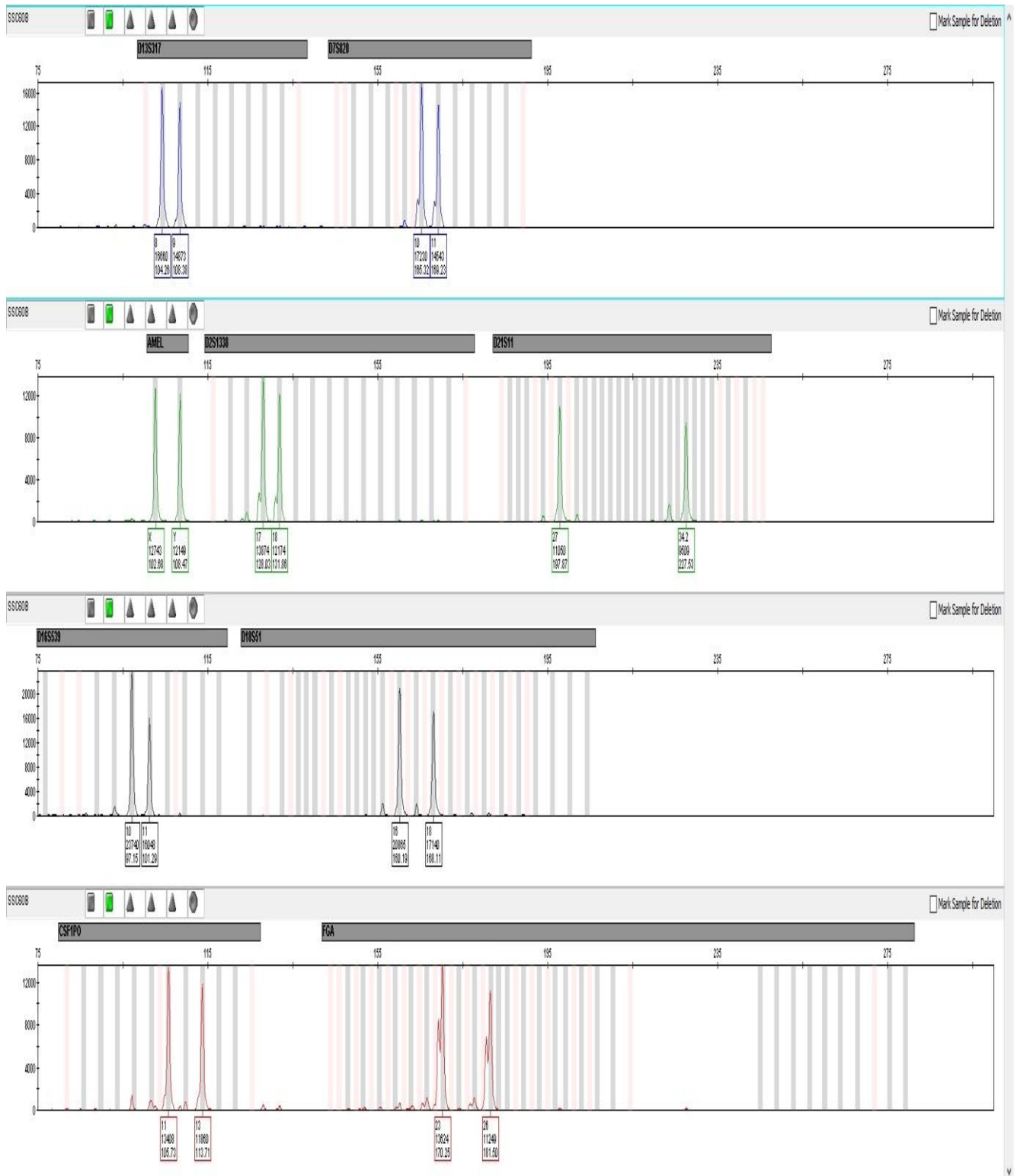


Figure 11 : Profil génétique obtenu.

Explication de la figure 11

Le liz (Liz Sise Standard)ou bien GS 500 pour identifier dans la taille et connus et contient un fluorescent de couleur orange utilisé dans les kits de typage ADN, comme ceux de promega ou identifier .Il est ajouté aux échantillons avant l'électrophorèse capillaire pour permettre une mesure précise des tailles des fragments d'ADN. Le LIZ ou bien GS500 contiennent des fragments d'ADN de tailles connues et émet une fluorescence à une longueur d'onde spécifique, permettant de calibrer l'électrophorèse et d'assurer la précision des résultats.

II. Discussion

Différents substrats peuvent avoir un effet majeur sur le transfert d'ADN en raison de leurs propriétés différentes, et nous suggérons que les différentes températures de lavage (40°C, 60°C, 90°C), des tissus (coton, synthétique, denim) et les détergents de lavage jouent un rôle sur les résultats. Les principaux facteurs ayant un impact sur l'optimisation d'un profil génétique sont les types de surfaces sur lesquelles est récolté l'ADN ainsi que certains facteurs de lavages :

II.1. Types de tissus (surface de récupération)

L'influence du type de tissu (comme le coton, le denim et les matériaux synthétiques) sur la récupération de l'ADN est un sujet pertinent, notamment en médecine légale et en sciences forensiques, où la qualité et la quantité de l'ADN récupéré peuvent être essentielles pour les enquêtes. Voici comment différents types de tissus peuvent affecter la récupération de l'ADN :

❖ Absorption et rétention de l'ADN

-Coton : Le coton, étant une fibre naturelle, possède une capacité d'absorption élevée. Cela signifie qu'il peut facilement le retenir. Cela en fait un bon matériau pour la récupération de l'ADN (Gaudette et *al.*, 2002).

-Denim : Le denim, une autre fibre naturelle généralement en coton, a une texture plus rugueuse et épaisse. Il peut également absorber et retenir le sang, mais la récupération de l'ADN peut être plus difficile en raison de sa structure dense (Raymond et *al.*, 1997).

-Synthétique : Les matériaux synthétiques, tels que le polyester ou le nylon, ont généralement une faible capacité d'absorption par rapport aux fibres naturelles, ce qui peut rendre plus difficile la récupération de l'ADN (Goray et *al.*, 2010).

❖ Interaction avec les Réactifs d'Extraction

Les fibres naturelles comme le coton et le denim peuvent interagir différemment avec les réactifs chimiques utilisés pour l'extraction de l'ADN (Graham et *al.*, 2008). Les matériaux synthétiques peuvent parfois libérer des produits chimiques lorsqu'ils sont traités, ce qui peut inhiber les réactions enzymatiques nécessaires pour extraire et amplifier l'ADN (Van Oorschot et *al.*, 1997).

❖ Effet des Contaminants et de la Dégradation

Les tissus naturels peuvent se détériorer plus rapidement en présence de contaminants biologiques et environnementaux, ce qui peut affecter la qualité de l'ADN récupéré (Cotton et *al.*, 2000).

Les tissus synthétiques sont souvent plus résistants à la dégradation environnementale, ce qui pourrait préserver l'ADN plus longtemps (Harbison et *al.*, 2016).

❖ Techniques de récupération

-**Coton et Denim** : Les techniques de récupération de l'ADN à partir de tissus comme le coton et le denim peuvent inclure des lavages successifs pour libérer l'ADN des fibres, suivis de procédés de concentration et de purification (Gansner et *al.*, 2015).

-**Synthétique** : Pour les matériaux synthétiques, des méthodes spécifiques d'extraction peuvent être nécessaires pour maximiser la récupération de l'ADN (Verdon et *al.*, 2014).

II.2. Types de détergents de lavages

L'influence des différents détergents de lavage sur la récupération de l'ADN à partir de tissus peut varier considérablement en fonction des détergents utilisés. Voici un aperçu de l'effet des détergents comme l'eau de javel avec et sans chlore, le savon et un sérum salin sur la récupération de l'ADN :

- a. **Eau de Javel avec Chlore** : L'eau de javel contenant du chlore est un oxydant puissant qui peut endommager gravement l'ADN. Elle peut briser les brins d'ADN et

créer des sites de dommage, rendant l'amplification par PCR difficile ou impossible (Rådström et *al.*, 2004).

- b. Eau de Javel sans Chlore :** L'eau de javel sans chlore, souvent basé sur des peroxydes, est moins agressive envers l'ADN que celles contenant du chlore. Cependant, peut encore endommager l'ADN, bien que de manière moins sévère. Peut dégrader les composants cellulaires et réduire la quantité du matériel génétique (Daly et *al.*, 2005).
- c. Savon en poudre :** Le savon et détergents classiques, utilisés pour le lavage des vêtements, peuvent enlever efficacement les cellules de la surface des tissus. Cependant, ils ne dégradent généralement pas l'ADN de manière significative, à moins qu'ils contiennent des agents chimiques agressifs. Le lavage avec du savon peut réduire la quantité d'ADN récupérable en éliminant les cellules, mais il laisse souvent des traces d'ADN intactes qui peuvent encore être amplifiée (Sweet et *al.*, 1999).
- d. Sérum Salé :** Le lavage avec le sérum salé est généralement utilisé pour récupérer les échantillons biologiques car il peut aider à préserver l'intégrité de l'ADN. Le sérum salé n'a pas de propriétés oxydantes, donc elle n'endommage pas l'ADN de manière notable. Ce type de lavage peut être utilisé pour récupérer des échantillons d'ADN de tissus sans causer de dommages importants (Loreille et *al.*, 2007).

e. Comparaison de l'impact

- Eau de javel avec chlore à l'effet le plus destructeur sur l'ADN, suivi par l'eau de javel sans chlore, puis par les savons standard.
- Le sérum salé est le moins destructeur et peut même aider à préserver l'ADN pendant le processus de lavage.

En résumé, l'utilisation de différentes substances pour laver les tissus peut avoir des impacts variés sur la récupération de l'ADN. Les eaux de javel avec et sans chlore tendent à endommager l'ADN, tandis que le savon et la solution saline sont moins destructeurs, avec le sérum salé étant le plus conservateur.

II.3. Conditions de conservations

Ci-après, les informations détaillées sur l'effet des différentes conditions de conservation (à température ambiante et congelé à -20°C) sur la récupération de l'ADN à partir de tissus de coton lavés avec une solution saline :

❖ **Conservation à température ambiante**

a) Effet sur l'ADN

À température ambiante, l'ADN peut être sujet à la dégradation en raison des activités enzymatiques (DNases), de l'humidité et des variations de température. Les contaminants environnementaux peuvent également affecter l'intégrité de l'ADN. Les cellules et l'ADN peuvent se dégrader progressivement, ce qui peut réduire la quantité et la qualité de l'ADN récupéré après trois semaines (Alaeddini, 2012).

b) Identification Génétique

La qualité de l'ADN récupéré après trois semaines de conservation à température ambiante peut être compromise. Cependant, si les conditions de stockage sont relativement stables (faible humidité, peu de lumière), une certaine quantité d'ADN intacte peut encore être récupérée. Les techniques de PCR peuvent encore être utilisées pour amplifier l'ADN, mais il peut y avoir une baisse de l'efficacité en raison de la dégradation (Alaeddini et *al.*, 2012).

❖ Conservation Congelée à -20°C

a) Effet sur l'ADN

La congélation à -20°C est une méthode efficace pour préserver l'ADN. À cette température, les activités enzymatiques et les réactions chimiques qui conduisent à la dégradation de l'ADN sont considérablement réduites. Les cellules et l'ADN restent intacts pendant une longue période, ce qui permet une meilleure récupération de l'ADN pour des analyses ultérieures (Kobayashi et *al.*, 1999).

b) Identification Génétique

La qualité de l'ADN conservé à -20°C reste bonne, permettant une récupération optimale pour l'identification génétique. Les techniques de PCR peuvent être utilisées avec une efficacité élevée, car l'ADN est moins dégradé (Kobayashi et *al.*, 1999).

❖ Comparaison et Conclusion

• Température Ambiante

Une Conservation pendant trois semaines à température ambiante peut entraîner une dégradation progressive de l'ADN, bien que certaines quantités d'ADN puissent encore être récupérées pour l'identification génétique. La stabilité de l'environnement de stockage est cruciale pour minimiser les dommages (Alaeddini et *al.*, 2012).

• Congélation à -20°C

La congélation à -20°C est nettement plus favorable pour la préservation de l'ADN. Cette méthode ralentit ou arrête les processus de dégradation, permettant de ce fait, une récupération optimale de l'ADN après trois semaines. L'ADN récupéré est de meilleure qualité, facilitant l'amplification et d'analyse génétique (Kobayashi et *al.*, 1999).

En conclusion, la conservation des tissus de coton lavés avec une solution saline à une température de -20°C offre une préservation supérieure de l'ADN par rapport à une conservation à température ambiante, permettant une identification génétique plus fiable et efficace.

Conclusion

III. Conclusion et perspectives

Ce mémoire a exploré la complexité de la récupération et de la révélation des traces de sang sur des supports textiles ayant subi divers lavages à différentes températures, dans le cadre d'une analyse génétique par la méthode STR avec le kit MiniFiler. Les résultats obtenus ont mis en évidence plusieurs points cruciaux pour les enquêtes criminelles et la criminalistique.

Premièrement, il a été démontré que la température de lavage a un impact significatif sur la capacité à détecter et à analyser les traces de sang. Les températures plus basses (30°C) ont permis une meilleure conservation des résidus de sang, alors que des températures plus élevées (60°C et 90°C) ont considérablement réduit la présence et l'intégrité de l'ADN.

Deuxièmement, l'efficacité du kit MiniFiler a été confirmée pour l'amplification des STR à partir d'échantillons d'ADN dégradés. Malgré les conditions de lavage sévères, le MiniFiler a permis de récupérer des profils génétiques exploitables, soulignant sa robustesse et son utilité dans des situations où l'ADN est partiellement dégradé.

Ces découvertes sont particulièrement pertinentes pour les praticiens de la criminalistique, car elles fournissent des recommandations pratiques sur la meilleure façon de traiter les preuves biologiques susceptibles d'avoir été lavées. En optimisant les techniques de révélation et en utilisant des outils appropriés comme le kit MiniFiler, il est possible d'améliorer la récupération de preuves ADN cruciales, même dans des scénarios de dissimulation.

En conclusion, cette étude contribue à l'amélioration des méthodes de détection et d'analyse des traces de sang dans des conditions de lavage variées, renforçant ainsi la fiabilité des enquêtes criminelles et la justice. Les recommandations formulées ici devraient être prises en compte dans les procédures standards de traitement des preuves pour garantir la précision et l'efficacité des analyses génétiques.

Références

Références bibliographiques

- Butler, J.M. (2001). Forensic DNA typing: Biology and technology behind STR markers 1st edition Nature Academic Press, Lenders. 322p.
- Butler J.M., (2005). Forensic DNA Typing, Biology, Technology, and Genetics of STR Markers 2 edition, USA Elsevier.
- Butler, M., Hill, C.R. (2010). Scientific Issues with Analysis of Low Amounts of DNA National Institute of Standards and Technology, Biochemical Science Division, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Butler, J.M., ET Hill CR. (2012). Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis, Forensic Sci Rev 24:15.
- COQUOZ, R. (2003). Preuve par L'ADN La génétique au service de la justice. Presse Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne.
- COQUOZ Raphaël et TARONI Franco (2013). Preuve par l'ADN la génétique au service de la recherche(2003).
- COQUOZ Raphael, Jennifer Comte, Diana Hall, Tacha Hicks, Franco Taroni, (2013). Preuve par l'ADN la génétique au service de la justice. Ed. Presse polytechniques et universitaire romandes 457p.
- Dhaliwal, A (2013). DNA extraction and purification Rutgers University, New Jersey, United States.
- Edwards, A., Hammond, H.A. Jin, T. Caskey C.T, Chakraborty, R (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups Genomics 12:241.
- Jeffreys, AJ, Wilson, V. and Thein, S.L. et al. (1985). Individual specific fringer prints of human DNA, Nature 316 76-79.
- Keyser C. Petrovski, E (2006). Utilisation des SNP pour l'identification humaine Spectra (2004). 12 20161119.p24-25.
- Loistron S.(2009). Les empreintes génétiques en médecine légale, réalisation, législation. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en chirurgie dentaire 22.25p.
- Mansuet-Larpo, A. (2007). Revue Immuno-analyse & Biologie Spécialisée Volume 22, Numéro 4, pp 209-214.
- Primrose SB, Twyman R.M, Old R.W. (2004). Principe de génie génétique. De boeck et Larcier pp : 279-280.
- Pun, K., Comte, J., Albrecht, C., et Milon, M.P. (2008). Identification par génétique forensic.
- Siegel, J.A,et Saukko, P.J. (2000). Encyclopedia of forensic science. Academic Press, New York, USA.
- Singleton P, (2013). Dictionary of DNA and genome. Edition WILEY-BLACKWELL.
- Gaudette, B. D., & Baker, S. A. (2002). The Recovery of DNA from Cotton Fabrics. Journal of Forensic Sciences, 47(4), 902-905.
- Raymond, J. J, van Oorschot, R. A. H., Gunn, P. R., & Walsh, S. J. (1997). The Retrieval of DNA from Adhesive Tape Used in the Forensic Setting. Journal of Forensic Sciences, 42(5), 870-873.
- Goray, M., Eken, E., Mitchell, R. J, & van Oorschot, R. A. H. (2010). Secondary DNA Transfer of Biological Substances under Varying Test Conditions. Forensic Science International : Genetics, 4(2), 62-67.
- Graham, E. A. M., Turk, E. E., & Ruty, G. N. (2008). Room Temperature DNA Preservation of Soft Tissue for Rapid DNA Extraction: An Addition to the Disaster Victim Identification Investigative Toolkit? Forensic Science International : Genetics, 2(4), 243-247.

- Van Oorschot, R. A. H., & Jones, M. K. (1997). DNA Fingerprints from Fingerprints. *Nature*, 387, 767.
- Cotton, E. A., Allsop, R. F., Guest, J. L., Frazier, R. R., Koumi, P., Callow, I., & Seager, A. (2000). The Recovery of DNA from Forensic Textiles. *International Journal of Legal Medicine*, 114(4-5), 133-136.
- Harbison, S. A., & Fleming, R. I. (2016). Forensic Body Fluid Identification: State of the Art. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, 6, 11-23.
- Gansner, M., & Hoogstraten, A. (2015). The Persistence of DNA on Fabric after Exposure to Water. *Journal of Forensic Sciences*, 60(2), 399-403.
- Verdon, T. J., Mitchell, R. J., & van Oorschot, R. A. H. (2014). Swabs as DNA Collection Devices for Sampling Different Biological Materials from Different Substrates. *Journal of Forensic Sciences*, 59(4), 1080-1089.
- Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Dahlenborg, M., & Lövenklev, M. (2004). Pre-PCR Processing: Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Molecular Biotechnology*, 26(2), 133-146.
- Daly, D. J., & Higginbotham, J. L. (2005). The Effect of Various Bleaching Agents on the Recovery of DNA from Bloodstained Fabrics. *Journal of Forensic Sciences*, 50(4), 1006-1013.
- Sweet, D., & Shutler, G. G. (1999). Analysis of Salivary DNA Evidence from a Bite Mark on a Body Submerged in Water. *Journal of Forensic Sciences*, 44(5), 1069-1072.
- Loreille, O., Diegoli, T. M., Irwin, J. A., Coble, M. D., & Parsons, T. J. (2007). High Efficiency DNA Extraction from Bone by Total Decalcification. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), 191-195.
- Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 297-305.
- Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Science International : Genetics*, 6(3), 297-305.
- Kobayashi, E., Hoshino, K., & Matsuoka, T. (1999). Effect of storage temperature on the stability of DNA stored on FTA cards. *Forensic Science International*, 101(2), 139-144.
- Kobayashi, E., Hoshino, K., & Matsuoka, T. (1999). Effect of storage temperature on the stability of DNA stored on FTA cards. *Forensic Science International*, 101(2), 139-144.
- Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Science International : Genetics*, 6(3), 297-305.
- Kobayashi, E., Hoshino, K., & Matsuoka, T. (1999). Effect of storage temperature on the stability of DNA stored on FTA cards. *Forensic Science International*, 101(2), 139-144.
- Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Science International : Genetics*, 6(3), 297-305.
- Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Science International : Genetics*, 6(3), 297-305.
- Kobayashi, E., Hoshino, K., & Matsuoka, T. (1999). Effect of storage temperature on the stability of DNA stored on FTA cards. *Forensic Science International*, 101(2), 139-144.

Annexes

Tableau I : Une série de 07 dilutions pour établir une courbe d'étalonnage (gamme standard) de la quantification

Std	Concentration en ng/ μ l	Dilution	Eau pure
Std A	50	/	/
Std B	10	1.3	40
Std C	2	1.3	40
Std D	0.4	1.3	40
Std E	0.08	1.3	40
Std F	0.016	1.3	40
Std G	0.0032		40

Tableau II: les valeurs des réactifs utilisé dans la quantification

Kits	valeurs
Master mix	09 μ l
Primer	09 μ l
Totale	18 μ l
18 \times (n) = nombre d'enchancements	

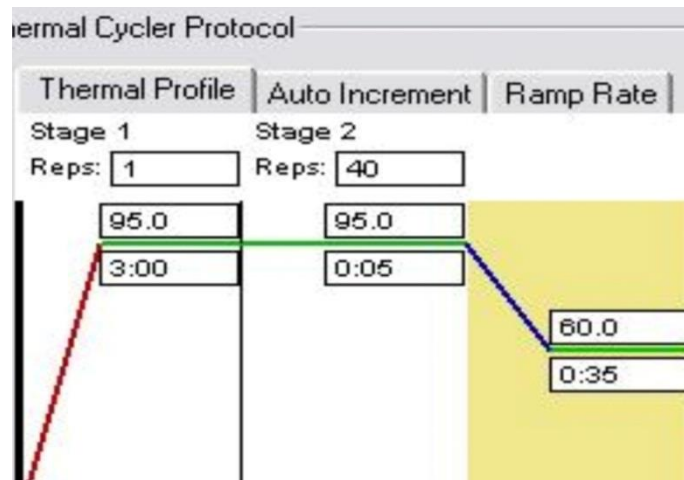


Figure 1 : Courbe de l'amplification

Tableau III:Kit MiniFiler

Composants	Volume par réaction en μl (n+2)	Conditions de conservation
Minifiler PCR réaction mix	10 μl	Une fois reçu le kit est conservé entre -15 à -25°C, puis entre 2 à 8°C
Minifiler primer set	5 μl	
Volume total	15 μl	
AmpFISTR control DNA 007		2 à 8°C

Tableau IV:Programme PCR de Kit MiniFiler

Température	Temps	Nombre de cycle
95C°	11min	-
94C°	20s	30 cycles
59C°	2min	30 cycles
72C°	1min	

Tableau V: Les volumes des réactifs utilisé pour le kit Minifiler dans la post-PCR.

Composant	volume x nombre d'échantillons
Hi-Di Formamide	8.5µl x nombre d'échantillons
DNA size standards Gene scan Liz 600	0.5µl x nombre d'échantillons

Résumé

Les enquêtes criminelles rencontrent souvent des défis sur les scènes de crimes, où des preuves cruciales peuvent être compromises par des tentatives de nettoyage. L'objectif de ce travail est de révéler et récupérer des traces de sang se trouvant sur divers textiles, ayant subi différents traitements de lavages ; et ce, pour un profilage génétique par la méthode STR (Short Tandem Repeats) en utilisant le kit MiniFiler. Nous tentons de simuler la scène de crime où des échantillons de sang ont été déposés sur différents types de textiles (coton, synthétique et jean) et soumis à des cycles de lavage à des températures variables (froid, tiède, chaud) avec différents détergents (eau de javel avec et sans chlore, savon en poudre et solution saline). Les échantillons ainsi traités ont ensuite été analysés par des tests préliminaires de révélation de sang (observation sous lumière blanche et bleue, test Kastle-Meyer et test Bleu Star), puis soumis à des analyses de profilage STR en utilisant le kit MiniFiler, conçu pour amplifier les ADN dégradés ou en faible quantité. Nous avons montré que la température de lavage a un impact significatif sur la détection et l'intégrité des traces de sang. Celles-ci étaient mieux conservées sur des supports lavés à basse température (30-40°C) comparativement à celles lavées à des températures élevées (60-90°C). De plus, l'amplification des STR à partir d'échantillons d'ADN dégradé a permis de récupérer des profils génétiques exploitables, ce qui confirme l'efficacité du kit MiniFiler. Cette étude souligne l'importance des conditions de récupération des preuves biologiques et fournit des recommandations pratiques pour les investigations forensic et montre la valeur du kit MiniFiler avec l'ADN dégradé, et ainsi une identification génétique précise malgré les tentatives de dissimulation des preuves.

Mots clés : ADN, STR, criminalistique, profil génétique, Bleu Star, MiniFiler

ملخص

غالبًا ما تواجه التحقيقات الجنائية تحديات في مسرح الجريمة، حيث يمكن أن تتعرض الأدلة المهمة للخطر من خلال محاولات التنظيف. الهدف من هذا العمل هو الكشف عن آثار الدم الموجودة على مختلف المنسوجات واستعادتها، بعد أن خضعت لعمليات غسل مختلفة؛ وذلك من أجل التمييز الجيني بطريقة STR (التكرارات المترددة القصيرة) باستخدام مجموعة MiniFiler. نحاول محاكاة مسرح الجريمة حيث تم وضع عينات الدم على أنواع مختلفة من المنسوجات (القطن، الصناعي، الدنيم) وإخضاعها لدورات غسل بدرجات حرارة متفاوتة (بارد، دافئ، حار) مع المنظفات المختلفة (المبيضات مع وبدون الكلور، مسحوق الصابون والمحلول الملحي). تم بعد ذلك تحليل العينات المعالجة من خلال اختبارات الكشف عن الدم الأولية (الملاحظة تحت الضوء الأبيض والأزرق، واختبار Kastle-Meyer واختبار Bleu Star)، ثم إخضاعها لتحليلات ملفات تعريف STR باستخدام مجموعة MiniFiler، المصممة لتضخيم الحمض النووي المتدهور أو المنخفض الكمية. لقد أظهرنا أن درجة حرارة الغسيل لها تأثير كبير على الكشف عن بقع الدم وسلامتها. تم الحفاظ عليها بشكل أفضل على الدعائم المغسولة عند درجات حرارة منخفضة (30-40 درجة مئوية) مقارنة بتلك المغسولة عند درجات حرارة عالية (60-90 درجة مئوية). بالإضافة إلى ذلك، فإن تضخيم تقارير المعاملات المشبوهة من عينات الحمض النووي المتدهورة جعل من الممكن استعادة الملامح الجينية القابلة للاستخدام، مما يؤكد فعالية مجموعة MiniFiler. تسلط هذه الدراسة الضوء على أهمية ظروف استعادة الأدلة البيولوجية وتقديم توصيات عملية لتحقيقات الطب الشرعي وتظهر قيمة مجموعة MiniFiler مع الحمض النووي المتحلل، وبالتالي تحديد الجينات بدقة على الرغم من محاولات إخفاء الأدلة.

الكلمات الدالة : DNA، STR، الطب الشرعي، الملف الجيني، Bleu Star، MiniFiler

Summary

Criminal investigations often encounter challenges at crime scenes, where crucial evidence can be compromised by cleanup attempts. The objective of this work is to reveal and recover traces of blood found on various textiles, having undergone different washing treatments; and this, for genetic profiling by the STR (Short Tandem Repeats) method using the MiniFiler kit. We attempt to simulate the crime scene where blood samples were placed on different types of textiles (cotton, synthetic and denim) and subjected to washing cycles at varying temperatures (cold, warm, hot) with different detergents (bleach with and without chlorine, powdered soap and saline solution). The samples thus treated were then analyzed by preliminary blood detection tests (observation under white and blue light, Kastle-Meyer test and Bleu Star test), then subjected to STR profiling analyzes using the MiniFiler kit, designed to amplify degraded or low quantity DNA. We showed that the washing temperature has a significant impact on the detection and integrity of bloodstains. These were better preserved on supports washed at low temperatures (30-40°C) compared to those washed at high temperatures (60-90°C). In addition, the amplification of STRs from degraded DNA samples made it possible to recover usable genetic profiles, which confirms the effectiveness of the MiniFiler kit. This study highlights the importance of biological evidence recovery conditions and provides practical recommendations for forensic investigations and shows the value of the MiniFiler kit with degraded DNA, and thus accurate genetic identification despite attempts to conceal evidence.

Keywords: DNA, STR, forensics, genetic profile, Bleu Star, MiniFiler