

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

جامعة امحمد بوقرة بومرداس

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES



Faculté des Sciences

Département de Biologie

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Génétique

## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER

---

---

### Validation du test Phadebas pour la recherche des traces de salive en vue de l'établissement de profils génétiques dans le cadre des investigations criminelles

---

---

Réalisé par :

TALEB Chahinez

AMIRI Amel

Soutenu publiquement le 10 – 06 – 2024 devant le jury :

Dr. BENHABYLES .N	MCA	UMBB	Président
Dr. SADAOUI .N	MCA	UMBB	Examineur
Dr. AOUADI.N	MAB	UMBB	Promoteur
Mr. DJEBBAR.H	OPP	LPS (DGSN)	Co-promoteur

Année Universitaire : 2023/2024.

# Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu, **Allah**, pour nous avoir accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce projet de fin d'études.

Nous tenons également à exprimer notre profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à notre promotrice, **Dr. Aouadi N.**, pour la grande confiance et le soutien inestimable qu'elle nous a accordés tout au long de la réalisation de ce projet : son aide, son enseignement, ses conseils éclairés et sa disponibilité tout au long de cette aventure académique. Son expérience et ses encouragements ont été des moteurs essentiels pour la réalisation de ce travail.

Nous tenons à remercier tout particulièrement et à témoigner toute notre reconnaissance à Monsieur **Djebbar H.**, notre Co-promoteur, pour ses précieux conseils, son encadrement rigoureux et son soutien constant. Son expertise et son implication ont grandement enrichi ce projet.

Le projet de fin d'études a été réalisé au sein du laboratoire central de la Police scientifique et technique. Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude au **Sous-directeur de la Police scientifique et technique Monsieur Boutelilis, I** au , **Docteur Brahiti, Chef de service du laboratoire commissaire divisionnaire** , ainsi qu'au **Commissaire, Chef de Département d'identification génétique madame Belkhirat, S** , pour nous avoir permis de travailler dans des conditions optimales.

Nous remercions chaleureusement toute l'équipe du laboratoire de police scientifique et technique, en particulier **Madame Belebas S.** et **Monsieur Bechar M.**, pour leur précieuse coopération et leur soutien tout au long de ce projet. Leur professionnalisme et leur bienveillance ont grandement enrichi notre expérience.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude à **Mme Benhbyles N.** pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant le jury. Nos sincères remerciements vont également à **Mme Sadaoui N.** pour le temps qu'elle a consacré à l'examen et à l'évaluation de ce travail. Enfin, nous adressons nos sincères remerciements à **Monsieur Farid Ouchouche.**

À vous tous, nous exprimons notre profonde reconnaissance. Ce travail est le résultat de vos efforts conjugués.

**CHAHINEZ & AMEL**

## Dédicaces

*Je tiens à dédier ce travail à mes chers parents pour leur soutien indéfectible tout au long de ce parcours académique. Sans vous, je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui.*

***Papa**, tu es un père extraordinaire. Je ne te remercierai jamais assez pour m'avoir donné ce que j'ai aujourd'hui. Tu as des épaules solides, tu surmontes tout et tu ne te plains jamais. Que Dieu te récompense.*

***Maman**, tu es la lumière qui guide mes routes et m'emmène aux chemins de la réussite. Tu m'as appris le droit chemin. Je te remercie pour tout. Je suis fière de dire au monde entier que tu es la femme qui m'a mise au monde.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le Tout-Puissant, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

*À mes très chers frères **Redha** et **Samir**, mes précieuses sœurs **Sarah** et **Basma**, et à mes belles-sœurs **Meriem** et **Saloua**. Dont je sais combien ma réussite compte à leurs yeux. À ma petite **Talia**, ma nièce tant aimée, ainsi qu'à mes neveux **Ilyas-Hamza** et **Ayoub**.*

*À toutes mes amies, en particulier à ma très chère **Maroua**, dont le soutien et l'amitié ont été des piliers inestimables.*

*À mon binôme dévoué, **Amel**. Pour nos échanges précieux, nos rires partagés et nos défis surmontés ensemble. Ce projet porte ton empreinte autant que la mienne.*

*Pour finir, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment, je dédie ce mémoire.*

**Chahinez**

{وَأَخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنْ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ}

## اهداء

الحمد لله الذي يسر البدايات وأكمل النهايات وبلغنا الغايات.  
الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات.  
الحمد لله ما تم جهد ولا ختم سعي الا بفضلته و ما تخطى العبد من عقبات و صعوبات الا بتوفيقه و معونته بفضل  
من الله بعد الجد و الاجتهاد تم بحمد الله تخرجي من جامعة امحمد بوقرة بومرداس كلية العلوم.  
ما ضاع جهد الامس في يوم وسدى والله يجزي الحسنى بالإحسان.  
اهدي هذا النجاح لنفسى الطموحة اولا الى نفسى العظيمة القوية التي تحملت كل العثرات و اكملت رغم الصعوبات  
ابتدأت بطموح وانتهت بنجاح ثم الى كل من سعى معي لإتمام مسيرتي الجامعية.  
الى من كلله الله بالهيبة والوقار الى من زين اسمي بأجمل الالقاب الى الكتف التي اضع عليه اثقالي واليد التي تربت  
علي في كل حين الى عزيزي وحببي الذي انتمى اليه الى اغلام على قلبي و أقربهم الي الى (ابي الغالي)  
الى ملاكي في الحياة...الى معنى الحب والى معنى الحنان والتفاني...الى بسمه الحياة وسر الوجود الى رمز العطاء  
و التضحية الى من تستقبلني بابتسامه و تودعني بدعاء... الى من كان دعائها سر نجاحي و حنانها بلسم جراحي الى  
اغلى الحبايب (امي الحبيبة).  
الى من شد الله به عضدي فكان خير معين الى عزي في الحياة الى قوتي الى من زرع الثقة و الاصرار بداخلي و  
سلامي الى عيني الذي لا بديل لي غيره الى اخي ( عبد الرؤوف).  
الى اللواتي يفرحهم نجاحي و يحزنهم فشلي الى الاقرب قلبا و دما و وفاء الى من ساندوني بكل حب عند ضعفي  
الى من شهدوا معي متاعب الدراسة الى من راهنوا على نجاحي الى اختاي (مريم و رحيمة)  
لنلك الملائكة الذي رزقنا الله بهم لنعرف من خلالهم طعم الحياة الجميلة لأبناء اختي لحبايب قلبي (تولين  
, عائشة, غيث, اويس) ان شاء الله نشوفكم في اعلى المراتب.  
لكل من ساندوني عند ضعفي و ساقوني بالحب الى من رسموا لي المستقبل بخطوط من الثقة و الحب الى احباب  
القلب و الروح .  
الى من صارت اعز الاصدقاء الى من تقاسمنا المشوار و هذا المشروع معنا ,لنلك التي ضحكنا معا و تقاسمنا اجمل  
الحظات و تمسكنا بأيدي بعضنا وقت ضعفنا لنصل الى غايتنا , لحبيبة الروح شهيناز.  
و لا انسى رفقاء الروح اللذين شاركوني خطوات هذا الطريق الى رفقاء السنين ممتنة لكم جميعا.  
من قال لها "نالها" وانا لها ابت رغما عنها اتيت بها لم تكن الرحلة قصيرة و لا الطريق محفوف بالتسهيلات لكنني  
فعلتها ما كنت لأفعل دون توفيق من الله .

وَ آخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنِ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ

## Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	.....
<b>Dédicace</b> .....	.....
<b>Abréviations</b> .....	.....
<b>Liste des figures</b> .....	.....
<b>Liste des tableaux</b> .....	.....
<b>Glossaire</b> .....	.....
<b>Résumé</b> .....	.....
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	1
 <b>Chapitre I: Synthèse bibliographique</b>	
2 La Génétique Criminalistique .....	4
2.1 Historique et évolution .....	4
2.2 L'analyse génétique : un nouveau champ pour la génétique criminalistique .....	5
2.3 Le portrait-robot génétique : une utilisation nouvelle de l'ADN .....	6
2.3.1 "De l'ADN à la réalité : la technologie du portrait-robot" .....	6
2.4 Contributions de la génétique à la résolution d'affaires criminelles .....	7
3 Généralités sur l'ADN.....	8
3.1 La structure d'ADN .....	8
3.2 Fonction de l'ADN : "Un Aperçu Clair et Concis" .....	9
4 Empreinte génétique.....	10
4.1 Le polymorphisme.....	10
4.2 Le polymorphisme de restriction RFLP.....	11
4.3 Le polymorphisme de longueur (les séquences répétitives).....	11
4.3.1 Les minisatellites .....	11
4.3.2 Les microsatellites (STR).....	12
4.3.3 Localisation, structure, et nomenclature des STR .....	12
5 Les sources d'ADN en criminalistique.....	14

5.1	La salive.....	15
5.2	Le sang.....	15
5.3	Le sperme.....	15
5.4	L'urine .....	15
6	La salive comme source d'ADN .....	16
6.1	Composition chimique de la salive.....	16
6.2	Tests spécifiques pour la révélation de traces de salive.....	17
6.2.1	Le Phadebas Amylase test.....	17
6.2.2	Contenu du kit Phadebas et matériel offert .....	18
6.2.3	Phadebas comprimé .....	18
6.2.4	Limites du Tests Préliminaires Phadebas .....	19
6.2.5	Exploration Conceptuelle de la Validation du Test Phadebas.....	20
7	Exploration moléculaire des scènes de crime (Les étapes d'établissement d'empreinte génétique )	20
7.1	Extraction et purification d'ADN .....	20
7.2	Quantification de l'ADN par PCR en temps réel .....	21
7.3	Amplification des STR par PCR .....	22
7.4	Analyse des fragments par électrophorèse capillaire (post PCR).....	23
7.5	Validation des profils génétiques .....	23
7.6	Banques de données d'empreintes génétiques en criminalistique .....	24
7.7	Altérations Moléculaires en génétique criminologique .....	25
<b>Chapitre II: Matériels &amp; Méthodes</b>		
8	Matériel d'étude.....	27
8.1	Matériel biologique .....	27
8.2	Matériel non biologique .....	28
9	Méthodes .....	30
9.1	Désinfection et préparation de la paille.....	30

9.2	La validation de test phadebas .....	30
9.3	Plan de validation .....	31
	A. Étude de la répétabilité .....	31
	B. Étude de la reproductibilité .....	31
	D. Étude de la spécificité.....	32
	E. Étude de la Sensibilité de Phadebas : .....	32
9.4	Les processus opératoire de l'extraction d'ADN .....	32
	9.4.1 Préparation des tampons d'extraction (Buffers) .....	33
	9.4.2 Lyse.....	34
	9.4.3 Purification .....	34
9.5	Quantification de l'ADN par la PCR quantitative en temps réel .....	35
	9.5.1 Préparation de la plaque de la quantification.....	37
	9.5.2 Préparation du mix de quantification .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
9.6	Amplification de l'ADN par PCR multiplexe .....	38
	9.6.1 Principe de la PCR.....	38
9.7	La post- PCR.....	40
9.8	Electrophorèse capillaire.....	41
9.9	Validation et récupération des profils d'ADN .....	42
10	Etude d'une affaire réelle.....	43
<b>Chapitre III: Résultats &amp; Discussions</b>		
11	Les résultats de la validation.....	46
	11.1 Spécificité de test Phadebas aux traces salivaires.....	46
	11.2 Répétabilité .....	47
	11.3 Reproductibilité.....	48
	11.4 Cross-contamination .....	49
	11.5 Évaluation de la Sensibilité.....	50
12	L'estimation de la quantité d'ADN à partir des extractions réalisées à partir de salive .....	51

---

13	Amplification par PCR .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
14	Génotypage de l'ADN par STR's.....	53
15	Etude d'une affaire réelle.....	60
15.1	Première Affaire .....	60
15.2	Deuxième affaire .....	61
15.2.1	Résultat de phadebas.....	61
15.2.2	Les résultats des profils obtenus en échantillon des cas réel .....	65
<b>CONCLUSION.....</b>		<b>70</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		
<b>Annexes.....</b>		

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**ABI** : Applied Biosystems

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ADNmt** : Acide désoxyribonucléique mitochondrial.

**$\alpha$ -amylase** : alpha-amylase.

**ARN**: acide ribonucléique.

**ARNm**: ARN messenger

**ATL**: Buffer Tissue Lysis

**AW1**: Buffer Wash 1

**AW2**: Buffer Wash 2

**ATL: Adult** T-cell Leukemia/Lymphom

**CCD**: Charge-Coupled Device

**°C** : degré Celsius

**DSM**: Bio-Degradable Starch Microspheres.

**DTT**: dithiothréitol

**dNTPs** :désoxyribonucléoside triphosphate

**FAG**: Fluorescein Angiography

**FAM** : 6-Carboxyfluorocein

**IPC** : préconditionnement ischémique

**IPC-VIC** :Internal Positive Control/ Reporter Dye

**Mg** : Milligramme

**ml** : Millilitre

**Mg<sup>2+</sup>**:Magnésium

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**ng** : Nanogramme

**PAP:** Phosphatase Acide Prostatique

**Pb :** Paire de base

**PH:** Potentiel d'Hydrogène.

**PK:** Protéinase K.

**Pg :** Picogramme

**PCR :** Polymerase Chain Reaction.

**POP-1 :** performance optimizidepolymer1.

**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism.

**RT- qPCR:** RT-PCR quantitative.

**Rpm:** Rotation par minute.

**RFU:** Relative Fluorescence Unit.

**SNP:** Single Nucléotide Polymorphism.

**STR:** Short Tandem Repeat.

**SDS:** sodium dodecyl sulfate.

**STD:** Standard.

**Taq:** Thermus aquaticus.

**UV :** ultraviolet

**µl :** micro litre

**VNTR:** Variable Number of Tandem Repeat.

## Liste des figures

Figure 1.Création d'un portrait-robot à partir d'échantillons de salive prélevés sur un mégot de cigarette (www.science-et-vie.com) .....	7
Figure 2.Structure de l'ADN. (Schéma d'aprèswww.exobio.cnrs.fr) .....	9
Figure 3.La structure des trois locus STR les plus utilisés en génétique criminalistique.....	14
Figure 4."Modèle 3D de l'enzyme alpha-amylase salivaire.....	17
Figure 5.Photographie du test Phadebas Amylase .....	19
Figure 6.Principe de l'identification génétique par établissement d'un profil génétique STR à partir de l'ADN salivaire .....	24
Figure 7.Prélèvement buccal .....	27
Figure 8.Photographie des différents échantillons étudiés .....	28
Figure 9.Image récapitulative des étapes répétées au début de l'étude de chaque paramètre .....	31
Figure 10.Photographie des tampons utilisés dans l'extraction d'ADN .....	34
Figure 11.Image explicative de fonctionnement de la sonde Scorpion.....	37
Figure 12.Une image de l'écran d'un thermocycleur standard affichant les températures correspondant à chaque étape de la PCR. ....	39
Figure 13.Spectres d'émission des cinq colorants utilisés dans le kit MiniFiler (Minifiler Hadbook) ..	42
Figure 14.lettres anonymes reçues au laboratoire lié à des affaires criminelles réelles. ....	44
Figure 15.Les résultats d'étude des performances du test Phadebas amylase sur différents fluides corporels.....	46
Figure 16.Photographie des résultats de répétabilité .....	48
Figure 17.Photographie présentant les résultats de la reproductibilité.....	49
Figure 18.Photographie des résultats de cross contamination .....	49
Figure 19.Des photographies illustrant les réactions de Phadebas à différentes dilutions .....	51
Figure 20.Courbe standard tracée à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN dans les différentes dilutions.....	52
Figure 21.Tracé du logiciel Gene Mapper de Ladder allélique AmpFISTER MiniFiler. ....	54
Figure 22.Le profil obtenu avec le témoin négatif.....	55
Figure 23.Le profil obtenu avec le témoin positif.....	56
Figure 24.Profil génétique complet, résultant d'une dilution de 1/200 de la salive établi grâce au kit AmpFISTER MiniFiler. ....	57
Figure 25.Profil génétique complet, résultant d'une dilution de 1/700 de la salive établi grâce au kit AmpFISTER MiniFiler .....	58
Figure 26.Profil génétique complet, résultant d'une dilution de 1/1100 de la salive établi grâce au kit AmpFISTER MiniFiler. ....	59
Figure 27.Comparaison des RFU pour des taux de dilution de 200 et de 1100 utilisant le même marqueur. ....	60
Figure 28.Les résultats issus de l'analyse d'une affaire réelle utilisant le test Phadebas .....	61

## Glossaire

**DDNTP** (didésoxyribonucléotide) : Nucléotide dont les groupements 2'OH et 3'OH du ribose sont absents, utilisé dans différentes méthodes de séquençage de l'ADN.

**Electrophorèse capillaire** : Technique utilisée pour la séparation des acides nucléiques à l'aide de capillaires à base de silice. Elle est fondée sur le déplacement d'ions avec des vitesses de migration différentes selon leur taille sous l'effet d'un champ électrique.

**Fluorochrome** : Substance chimique capable d'émettre de la lumière fluorescente après excitation.

**Locus** : Emplacement précis d'un gène ou d'une séquence spécifique d'ADN sur un chromosome.

**Marqueur génétique, ou marqueur** : Emplacement défini sur un chromosome ayant des caractéristiques génétiques connues.

**Non codant** : l'ADN qui n'opère pas le codage, c'est-à-dire qui ne possède pas la capacité de produire une protéine.

**Noyau** : Organite des cellules eucaryotes, y compris les cellules humaines, dans laquelle se trouvent les chromosomes.

**Répétitions en tandem** : Unités récurrentes d'une séquence d'ADN identique placées en succession dans une région particulière d'un chromosome.

**Pb (paire de base)** : Plus petite unité pour décrire la longueur d'une molécule ou d'un fragment d'ADN qui comprend deux bases complémentaires.

**PCR**: Réaction d'amplification en chaîne. Méthode permettant le ciblage et l'amplification de courts segments d'ADN par l'utilisation de deux amorces flanquant la séquence d'intérêt ainsi que l'enzyme ADN polymérase.

**PCR-multiplex**: L'amplification simultanée de plusieurs STRs par polymérisation en chaîne.

**Protéinase K**: Enzyme qui hydrolyse et décompose les histones. Elle est utilisée lors de la procédure d'extraction d'ADN, car elle agit activement en présence de SDS et n'est pas négativement influencée par la présence de l'EDTA.

**Polymorphisme** : Présence d'allèles multiples d'un gène dans une population donnée.

**Sciences forensique**: Ensemble des principes scientifiques et des techniques appliqués à l'investigation criminelle, pour prouver l'existence d'un crime et aider la justice à déterminer l'identité de l'auteur.

**SDS**: Molécules favorisant la dissociation des parois des cellules. Elles séparent les histones des molécules d'ADN et elles dénaturent ces derniers, détruisant les composants secondaires des protéines, ce qui diminue leur capacité de solubilité et leur persistance dans le milieu aqueux.

**SNP** : Polymorphisme mononucléotidique. Polymorphisme de la séquence d'ADN défini par deux bases alternatives à une position donnée.

**Sonde :** Petite séquence d'ADN synthétique marquée, utilisée pour déceler un fragment ou une séquence spécifique d'ADN.

**Tube passoire:** Tube eppendorf Perforer avec une aiguille hypodermique stérile et qui est introduit après dans un nouveau tube eppendorf identifié (qui servira de réservoir de lysat).



## 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

La criminalistique est une branche scientifique sur laquelle sont fondées les techniques d'identification des individus à partir d'indices divers; de la caractérisation sur les scènes de crime, de traces biologiques ou chimiques, même les plus infimes. Chaque année, des milliers d'affaires criminelles dans le monde sont résolues grâce aux témoins biologiques silencieux sur les scènes de crime **(Butler, 2012)**.

L'exploration minutieuse du génome humain a ouvert une fenêtre sur l'analyse génétique d'une précision sans précédent en police scientifique. Au cœur de cette recherche se trouve l'identification des régions spécifiques d'ADN polymorphe qui permettent des distinctions entre les individus, en mettant l'accent sur les parties bien caractérisées du génome malgré les similitudes génétiques frappantes entre les humains.

L'objectif ultime est de créer des profils ADN uniques, une empreinte génétique précise de chaque personne, renforçant ainsi la capacité de la criminalistique à établir des correspondances indiscutables entre les preuves biologiques et les individus. Cette approche dépasse sa portée scientifique et apporte une forte dimension médico-légale au recours à l'analyse génétique dans les enquêtes criminelles.

Les preuves biologiques obtenues à partir de la salive peuvent être importantes dans les enquêtes criminelles ; la détection et l'identification de la salive sur une scène de crime ou une pièce à conviction sont essentielles pour déterminer la présence ou l'interaction réelle et pour suivre l'activité sur une scène de crime **(Maloney et Housman ,2014)**.

Peu importe comment la salive est déposée sur les scènes de crime ou les éléments de preuve, les experts en police scientifique sont confrontés au défi majeur de détecter sa présence. Pour ce faire, ils doivent d'abord identifier les traces de salive, s'assurer qu'il s'agit bien de salive, puis à les récupérer de la manière la plus efficace possible.

Les résidus de salive peuvent ne pas présenter de composants facilement détectables, les rendant ainsi difficiles à repérer à l'œil nu **(Gunn, 2009 ; Humphrey et Williamson., 2001)**.

La salive est incolore, inodore et constituée presque entièrement d'eau, avec peu d'ions et encore moins de protéines. C'est un défi pour ceux qui sont chargés de collecter des indices pour la distinguer de l'eau, et elle ne laisse presque aucune trace lorsqu'elle sèche (**Schom, 2019**).

Le test Phadebas amylase est un outil enzymatique biochimique qui permet de détecter et d'identifier la présence de l'alpha-amylase, facilitant ainsi la détection de la salive.

Le présent travail vise à confirmer la fiabilité du test Phadebas amylase pour détecter des traces de salive. Dans un second temps, il s'agit d'exploiter l'ADN récupéré à partir de ces échantillons afin d'établir des profils génétiques. Afin d'atteindre nos objectifs, ce manuscrit est structuré en trois chapitres principaux :

**Le chapitre I** présente une synthèse bibliographique sur la génétique criminalistique explore son historique, son évolution et ses avancées, mettant en lumière l'importance de l'ADN comme méthode d'identification humaine fiable. Les aspects généraux de l'ADN, des polymorphismes et des microsatellites sont examinés, soulignant leur rôle dans l'analyse génétique. La salive est également abordée en tant que source d'ADN, avec l'alpha-amylase comme indicateur de sa présence dans les preuves, et le test Phadebas amylase est présenté comme une méthode spécifique pour détecter les traces de salive. Enfin, les différentes étapes de l'établissement de l'empreinte génétique sont détaillées.

**Le chapitre II** est une présentation des divers matériels, équipements et techniques utilisés dans notre étude, ainsi que des réactifs et des kits nécessaires. Nous débutons par la validation du test Phadebas en examinant différents paramètres et en assurant la conformité aux normes de qualité nationales ISO/IEC 17025. Ensuite, nous suivons les étapes d'établissement des profils ADN, en commençant par l'extraction de l'ADN jusqu'à la récupération des profils d'ADN. Enfin, nous concluons par l'analyse d'un cas réel illustrant notre étude.

**Le chapitre III** aborde les résultats de validation du test Phadebas issus d'études portant sur différents paramètres nécessaires pour valider cette méthode, notamment sa spécificité et ses seuils de sensibilité. Nous avons également examiné l'estimation des quantités d'ADN à partir des échantillons de salive, l'amplification par PCR, le génotypage par STR, ainsi que l'analyse des profils génétiques obtenus. Enfin, nous avons conclu par les résultats de l'analyse d'une affaire réelle utilisant le test Phadebas.

Évidemment, ces trois chapitres sont suivis par une conclusion générale qui dresse un bilan de nos travaux : les limites de notre étude ainsi que les perspectives envisageables.  
Enfin, un complément d'informations est fourni en annexes de la présente étude.

# *Chapitre I*

---

---

## *Synthèse Bibliographique*

---

---

## 2 La Génétique Criminalistique

La génétique criminalistique, également connue sous le nom de génétique médico-légale (Forensic Genetics), est une branche de la science médicale qui utilise des techniques de génétique pour résoudre des enquêtes criminelles. Impliquant l'analyse de l'ADN prélevé sur les lieux d'un crime ou sur des éléments de preuve tels que des cheveux, des tissus, des fluides corporels, etc., elle s'inscrit dans le cadre plus large de la criminalistique. Cette dernière constitue la base des techniques d'identification des individus et de recherche des preuves matérielles utilisées par la police scientifique, profitant considérablement des progrès scientifiques et techniques, notamment en biologie. Ainsi, elle englobe des aspects tels que la recherche et l'identification des personnes à partir d'indices divers, ainsi que la détection minutieuse de traces biologiques ou chimiques, même les plus infimes, sur les scènes de crimes (**Sherlock et Dorozynki, 1996 ; Butler, 2010**).

Contenus dans les célèbres principes Locard formulés par Edmond Locard dans les années 1930, ils représentent les fondements historiques et originaux de la police scientifique.

Edmond Locard a souligné que toute action criminelle laisse des empreintes, que ce soit sur le corps de l'auteur ou sur ses vêtements, révélant ainsi des indices de son passage et de ses actions.

### 2.1 Historique et évolution

En 1910, à Lyon, Edmond Locard établit le premier laboratoire de police scientifique. Il met en pratique le principe selon lequel chaque individu, lors de ses actions criminelles, laisse involontairement des traces diverses telles que sueur, sang, poussière, fibres, sperme, salive, poils, squames, etc. Ces indices, qu'ils soient de nature physique, chimique ou biologique, sont minutieusement analysés par des examens de plus en plus sophistiqués, révélant ainsi le récit du crime et permettant à l'enquêteur de déchiffrer la signature de l'auteur coupable (**Durupt, 2000**).

En 1985, Sir Alec Jeffreys a montré que l'ADN contient des séquences répétitives et surtout que le nombre de répétitions varie d'une personne à l'autre. Cette découverte a été rapidement appliquée dès 1986 en utilisant des échantillons prélevés sur deux lieux de crime (**Jeffreys et al. 1985**).

En 1986, des échantillons ont été prélevés sur deux scènes de crime, et les résultats ont ensuite été comparés à ceux des suspects afin de les éliminer. Après avoir étudié des échantillons de tous les hommes de la zone, les mêmes caractéristiques que celles trouvées sur les scènes de crime ont été découvertes.

Cette utilisation de l'analyse de l'ADN, également appelée empreinte génétique, met en évidence l'importance cruciale de l'ADN en matière judiciaire, permettant d'exclure un suspect et d'incriminer une autre personne (**Jeffreys et al., 1985**).

La même année, K. Mullis fait une découverte majeure : la PCR (polymérase). Une réaction en chaîne a permis à cette analyse de se développer.

La PCR a la capacité d'augmenter significativement la quantité d'ADN analysée dans un échantillon, même lorsque celui-ci contient peu de matériel génétique, grâce aux propriétés des ADN polymérase thermostables (**Saiki et al., 1985**).

## **2.2 L'analyse génétique : un nouveau champ pour la génétique criminalistique**

Pierre-Henri Imbert, directeur adjoint des droits de l'homme au Conseil de l'Europe en 1991, considère que les tests d'identification génétique ne sont pas révolutionnaires dans leur objet et leur principe. Les empreintes digitales et les tests sanguins ont été utilisés depuis longtemps. Cependant, la nouveauté réside dans la rigueur et la finesse de l'analyse, jamais atteintes auparavant. Les tests génent une quasi-certitude qui se transforme rapidement en certitude absolue. Ces techniques se révèlent très puissantes et presque trop nombreuses.

Au cours des dernières années, des avancées notables et significatives ont été réalisées dans les méthodes d'analyse d'ADN en criminalistique. Les chercheurs ont réussi à diminuer le nombre de cellules requises, à perfectionner les techniques d'extraction et de purification, et à accélérer les étapes de génotypage. Grâce à ces progrès, il est désormais possible d'identifier rapidement des corps et des taches biologiques, comme le sang, la sperme ou les cellules épithéliales, en comparant ces données avec des données familiales, exclusivement dans le cadre d'enquêtes judiciaires (**Bull et al., 2012**).

L'orientation d'une enquête est souvent guidée par la génétique, surtout en l'absence d'indices, avec pour objectif de laisser l'ADN "parler". Ces méthodes, comme le portrait-robot génétique ou les études de parenté, permettent des applications prédictives en révélant des caractéristiques morphologiques distinctes ou en identifiant des suspects par

leurs liens génétiques, enregistrés dans les archives nationales automatisées d'empreintes génétiques (Riccardi et Richefeu, 2018).

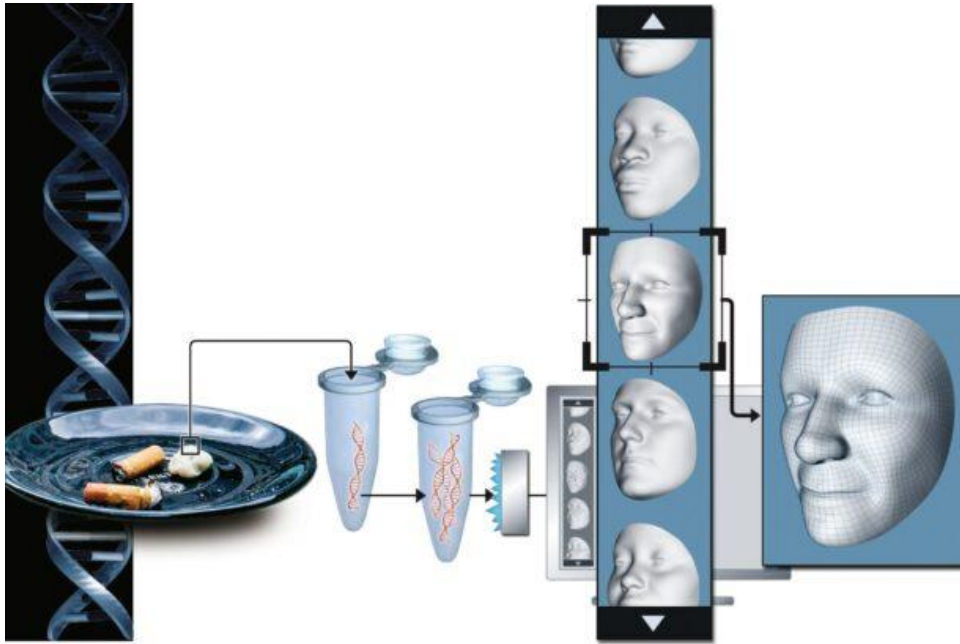
### **2.3 Le portrait-robot génétique : une utilisation nouvelle de l'ADN**

La technologie du portrait-robot génétique, également appelée phénotypage génétique, permet de prédire les caractéristiques physiques d'une personne à partir de son ADN. Cette méthode novatrice permet de reconstruire une image approximative de l'apparence physique d'un individu, même en l'absence de témoins ou de photos. La différence avec la technologie traditionnelle d'identification génétique réside dans l'utilisation prédictive de l'ADN, qui permet d'analyser les fragments codés de données génétiques trouvés sur les scènes de crime ou sur les corps des victimes. En utilisant cette approche, les enquêteurs peuvent créer un profil statistique des caractéristiques morphologiques du suspect, y compris la couleur des yeux et des cheveux. Ce type de profilage génétique peut grandement aider les enquêtes, en particulier lorsque les enquêteurs ne disposent d'aucune autre information (Riccardi et Richefeu, 2018).

#### **2.3.1 "De l'ADN à la réalité : la technologie du portrait-robot"**

Tout commence par l'extraction de l'ADN à partir d'une trace biologique comme la salive, le sang ou les cheveux. Ensuite, cet ADN est amplifié et partiellement séquencé (Fig.1). Une première analyse permet de déterminer le sexe et l'origine ethnique, révélant ainsi un visage générique. En se basant sur ces données, un visage type est sélectionné dans une banque de visages. Une seconde analyse affine les traits en manipulant un réseau de 7 150 points (SNP) sur le visage type.

En Algérie, le portrait-robot génétique est en phase de concrétisation. Cette initiative représente une avancée majeure dans le domaine de la criminalistique et de la sécurité publique, offrant aux autorités de nouveaux outils pour l'identification des criminels.



**Figure 1.**Création d'un portrait-robot à partir d'échantillons de salive prélevés sur un mégot de cigarette (www.science-et-vie.com)

#### 2.4 Contributions de la génétique à la résolution d'affaires criminelles

Jusqu'où la génétique peut-elle contribuer à la résolution des affaires criminelles ? La génétique peut contribuer à la résolution des affaires criminelles en fournissant des informations précieuses aux enquêteurs et aux experts en sciences criminelles. Elle permet d'identifier les victimes, de détection de l'ADN des suspects, de profiler les criminels, de reconstituer des silhouettes, de détecter des liens familiaux, d'analyser des empreintes digitales et même de détecter l'ADN dans des échantillons anciens.

L'approche portrait-robot génétique implique la création d'un profil génétique spécifique à partir de matériaux biologiques tels que les spermatozoïdes, les cellules sanguines, cutanées et salivaires, collectés par les enquêteurs sur les scènes de crime.

Au cours des vingt dernières années, la comparaison de ces profils avec ceux des suspects identifiés a grandement facilité la mise en évidence des coupables, avec une probabilité d'erreur pratiquement nulle (Nau., 2008).

### 3 Généralités sur l'ADN

L'ADN est particulièrement intéressant en criminalistique car il résiste aux agressions extérieures et est une molécule très stable lorsqu'elle est conservée à l'abri de l'humidité. Les extraits réalisés sur un individu décédé peuvent être réutilisés même plusieurs années après la découverte du corps (**Briant, 2010 ; Coquoz et al., 2013**).

L'ADN est l'Acide Désoxyribose-Nucléique, cette molécule est la base génétique de chaque individu, elle est trouvée dans le noyau des cellules animale et en plus petites quantités dans la mitochondrie (**Briant., 2010 ; Coquoz et al., 2013**).

Chaque parent transfère une partie de son héritage génétique à son enfant par l'intermédiaire de cellules germinales et chaque cellule maternelle se divise pour donner des filles, transmettant une réplique d'ADN (**Coquoz., 2013**).

L'ADN humain est organisé en un ensemble de 23 paires de chromosomes, chacun étant une molécule d'ADN double brin composée de 5,5 à 250 millions de paires de bases. Le génome humain est constitué de 6 milliards de paires de bases et contient environ 35 000 gènes, mais près de 90 % du génome est non codant, ce qui signifie qu'il ne contrôle directement aucune synthèse protéique (**Jarman and Wells, 1989; Winter et al., 2000**).

Étant donné que l'ADN non codant, contrairement à l'ADN codant, n'est pas soumis à la pression de sélection, les mutations qui se produisent sont conservées et transmises aux générations futures (**Brown., 2004**).

La grande variabilité de ces régions est exploitée en médecine légale, où les analyses génétiques doivent répondre à certains critères (**Schneider, 2006**), tant en termes de technique que d'interprétation des résultats et d'utilisation de l'ADN mitochondrial. Plusieurs types de polymorphisme ont été utilisés, chacun révélant différents niveaux de variabilité (**Schneider., 2006**).

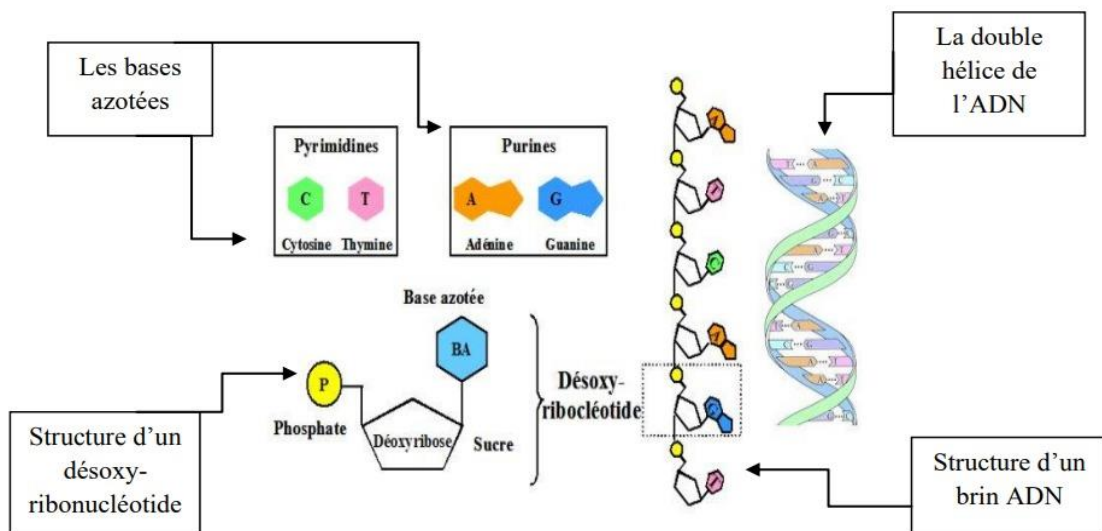
#### 3.1 La structure d'ADN

Depuis 1953, les recherches de Watson et Crick ont révélé la composition de l'ADN, qui est constitué de composants fondamentaux tels que les nucléotides.

Chaque nucléotide est formé par l'association :

- D'un sucre à 5 carbones (désoxyribose).
- D'un groupement phosphate.
- D'une des 4 bases azotées: adénine, thymine, guanine et cytosine.

L'assemblage des nucléotides entre eux est complexe et conduit à la synthèse d'une structure en double hélice formée de deux brins complémentaires (fig.2) (Bry.,2017).



**Figure 2.** Structure de l'ADN. (Schéma d'après [www.exobio.cnrs.fr](http://www.exobio.cnrs.fr))

### 3.2 Fonction de l'ADN : "Un Aperçu Clair et Concis"

Le corps humain est composé de milliards de cellules, chacune possédant un noyau et des mitochondries essentiels à son fonctionnement et contenant de l'ADN dans les cellules. Il existe donc deux types d'ADN : l'ADN génomique et l'ADN mitochondrial. Dans le cadre des empreintes génétiques, la première étape consiste à étudier l'ADN génomique présent dans le noyau cellulaire.

Les régions de l'ADN qui codent et régulent la synthèse des protéines sont appelées gènes ; elles sont composées de parties codantes et non codantes. Ces séquences non codantes varient d'une personne à l'autre et constituent ainsi la base d'une empreinte génétique. Deux types de variation existent : le polymorphisme de séquence (différences entre nucléotides) et le polymorphisme de taille (séquences de tailles différentes).

L'analyse génétique repose sur l'étude de séquences d'ADN répétitives appelées STR (short tandem répétitions) (**Sirpa Gendarmerie., 2023**).

#### **4 Empreinte génétique**

En 1985, la découverte de l'empreinte génétique par le généticien britannique Sir Alex Jeffrey a ouvert la voie à l'utilisation de microsatellites pour le profilage d'ADN au profit de la justice. La caractérisation par empreinte génétique peut exclure ou identifier une personne par comparaison personnelle (**Butler., 2005**).

Il existe deux méthodes de traitement de l'ADN en laboratoire : RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism.), PCR (réaction en chaîne polymérase) (**Rouger., 2000**).

Les parties non codantes de l'ADN nucléaire sont généralement identifiables par empreinte génétique. Par exemple, l'examen de l'ADN mitochondrial entièrement codant a été autorisé (**Supoit, 2017**). Les méthodes employées sont alors celles qui permettent l'analyse des caractéristiques génétiques. Cependant, l'étude de l'ADN mitochondrial (ADN mt) ne permet pas une identification complète à 100% d'une personne, mais seulement d'éliminer certaines hypothèses, car cet ADN ne présente pas une "variabilité suffisante au sein des populations". Il est évident qu'il est impossible de déterminer avec certitude à qui appartient un échantillon d'ADN mt, car plusieurs personnes peuvent présenter le même ADN mt. Il existe une probabilité d'environ 1 sur 2000 pour que le même ADN mt soit présent chez deux personnes non apparentées.

Les empreintes génétiques mettent généralement en évidence des séquences extrêmement précises qui sont présentes dans le patrimoine héréditaire d'une personne, ce qui la rend unique (**Supoit., 2017**).

##### **4.1 Le polymorphisme**

Le polymorphisme signifie qu'il existe plusieurs allèles du même gène ou d'un locus donné. En héritant de ses parents, chacun possède deux copies de chaque gène, une de sa mère et une de son père. Un individu est homozygote s'il possède deux copies identiques du même allèle, sinon il est dit hétérozygote. Ainsi, en identifiant les répétitions de séquences spécifiques à des locus spécifiques du génome, une carte génétique d'un individu peut être créée. (**Sirpa Gendarmerie., 2023**).

L'existence du polymorphisme ADN, une diversité génétique qui dépasse les séquences génétiques et qui est utile dans les génétiques de la population. Les polymorphismes de séquence d'ADN, tels que les différences de nucléotides simples, les insertions ou les suppressions, sont cruciaux pour l'établissement d'une empreinte d'ADN et la transmission des allèles de génération (**Rossignol., 2000 ; Margaret et al., 2006**).

#### **4.2 Le polymorphisme de restriction RFLP**

La méthode d'analyse génétique restriction (RFLP) a été introduite pour la première fois en 1980 par Botstein et al. Elle permet d'identifier le polymorphisme génétique entre et entre les espèces ainsi que dans les régions codantes et non codantes (**Rasmussen, 2012**).

On appelle polymorphismes de restriction des variations individuelles de la séquence d'ADN révélées par des modifications de la carte de restriction. Celles-ci sont mises en évidence par la méthode de Southern (Southern blot), qui montre des différences individuelles dans la taille des fragments de restriction obtenus avec une enzyme donnée et une sonde donnée (en 1975). D'où le nom anglais de restriction fragment length polymorphisme, ou RFLP (**Kaplan and Delpech., 1998**).

Une technique d'analyse génétique appelée RFLP est utilisée pour trouver des polymorphismes génétiques à l'intérieur ou à l'extérieur d'une espèce en se basant sur des variations nucléotides aux sites de restriction. Il est particulièrement utile pour les séquences non codées. (**Kahn., 1986**).

#### **4.3 Le polymorphisme de longueur (les séquences répétitives)**

Grâce à la découverte de séquences d'ADN répétitives, qui sont des zones non codantes où les séquences sont répétées, l'analyse de l'ADN a révolutionné le comportement criminel en 1985. (**Jeffreys, 1985 ; Coquoz et al., 2013**).

##### **4.3.1 Les minisatellites**

Les mini-satellites, également appelés VNTR, sont constitués de séquences de 6 à 100 nucléotides répétés en tandem et se trouvent principalement au niveau des régions subtélomériques des chromosomes. Certains allèles montrent des milliers de répétitions (**Forster et al., 2002**).

Pendant plusieurs années, les VNTR ont été les marqueurs génétiques les plus couramment utilisés dans le traitement des dossiers médico-légaux et ont connu un grand succès. Cependant, leur utilisation était limitée car ils nécessitaient de grandes quantités d'ADN de haute qualité. (Mansuet-Lupo et al., 2007).

#### 4.3.2 Les microsatellites (STR)

Les microsatellites, également connus sous le nom de séquences en tandem répétées courtes (STR) (Short Tandem Repeat), sont des séquences d'ADN composées de courtes répétitions de nucléotides. Ces répétitions peuvent varier en nombre d'un individu à l'autre en raison de mutations qui se produisent pendant la réplication de l'ADN, entraînant des insertions ou des suppressions de ces répétitions.

Les microsatellites sont particulièrement susceptibles de subir ces mutations en raison du phénomène de glissement de la réplication. Lorsque l'ADN contient des répétitions courtes telles que celles présentes dans les microsatellites, il peut se produire un décalage dans la copie de ces répétitions lors de la réplication de l'ADN. Cela conduit à de grandes variations dans les séquences de microsatellites entre les individus. (Brown., 2004).

Ces caractéristiques uniques des microsatellites ont conduit à leur utilisation croissante dans le domaine de la génétique médico-légale. Les variations observées dans les séquences de microsatellites peuvent être utilisées pour établir des profils génétiques uniques pour l'identification des individus, la résolution de cas criminels et les tests de paternité, entre autres applications médico-légales. (Goodwin et al., 2007).

#### 4.3.3 Localisation, structure, et nomenclature des STR

Les STR ou microsatellites sont des polymorphismes de répétition. Ce sont des motifs de nucléotides répétitifs de 2 à 6 pb, ils produisent des allèles variant entre 50 et 500 pb et sont situés dans des régions de l'ADN qui ne sont pas codantes (Weber et al. 1993 ; Tautz., 1989).

La variabilité du nombre de répétitions autosomiques chez les individus est principalement due à des variations génétiques, notamment des retards de réplication. Cette variation génétique entraîne une grande diversité dans les répétitions autosomiques observées chez les individus (Petkovski., 2006.). Leur pouvoir de discrimination élevé fait de ces

polymorphismes des marqueurs de choix pour l'identification individuelle des individus. Jusqu'au 2001, plus de 104 STR ont été découverts, mais seulement 20 environ sont couramment analysés dans le domaine médico-légal. **(Ruitberg et al., 2001)**.

En octobre 1993, la Société internationale d'hémogénétique médico-légale (ISFG) a créé une nomenclature pour les allèles STR. Deux facteurs déterminent le nom des locus STR : s'ils font partie d'un gène pour les protéines, le nom est abrégé, ou s'ils ne le font pas. Si le gène à fonction n'est pas identifié, son nom est basé sur la position et l'ordre du locus. **(Andrei ., 2007)**.

La structure STR diffère considérablement, avec des complexes qui ont une plus grande variabilité et une plus grande valeur informationnelle, tandis que les simples offrent une standardisation simple et des taux de mutation plus faibles.

Les microsatellites STR sont classés comme simples ou complexes en fonction de leurs modèles de répétition **(Bâret et al., 1997 ; Gill et al., 1997)**. **El Ossmani et al.,2007)** classifient les STRs en trois catégories selon leurs motifs de répétition : les répétitions « basiques », composées d'unités de même séquence et longueur ; les répétitions « composées », comprenant au moins deux unités « simples » connexes ; et les répétitions « complexes », constituées d'unités répétitives variées en longueur avec différentes séquences intercalées entre les blocs. (Fig.3).

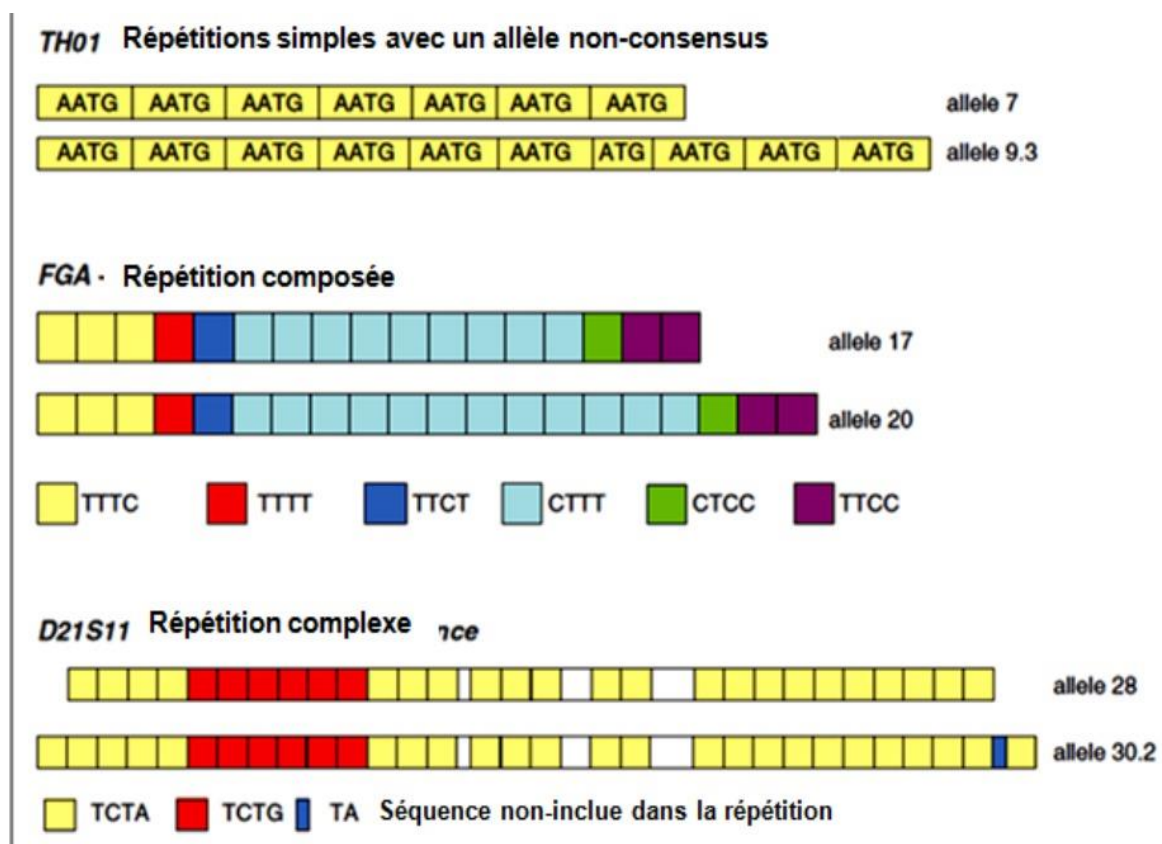
Les unités de répétition de longueur et de séquence identiques sont utilisées dans les locus « basiques ». Par exemple, le locus THO1, qui est composé de l'élément répétitif AATG, présente la séquence (AATG)<sup>7</sup> pour son allèle 7. **(Goodwin et al., 2011)**.

Il existe des STR simples qui présentent des répétitions non consensuelles. Par exemple, l'allèle 9.3 du locus STR THO1 contient une séquence composée de (AATG)<sup>6</sup>(ATG)<sup>1</sup>(AATG)<sup>3</sup>, où une variante raccourcie de l'élément répétitif (ATG) est présente.

Les STR composés contiennent des répétitions consécutives de deux ou plusieurs unités simples. Par exemple, l'allèle 17 du STR FGA présente cette structure. Il existe également des STR composés avec des répétitions non consensuelles. Par exemple, l'allèle 26.2 du STR FGA contient la séquence (TTTC)<sup>3</sup>(TTTT)<sup>1</sup>(TT)(CTTT)<sup>19</sup>(CTCC)<sup>1</sup>(TTCC)<sup>2</sup>, où

une variation dans la longueur de certaines répétitions est observée, remplaçant une répétition plus longue par une répétition simple (TT).

De plus, certaines unités répétées incomplètes peuvent être présentes dans certains allèles d'un locus STR, et ces allèles non consensuels sont désignés sous le nom de micro variants. L'allèle 9.3 du locus HUMTH01 est le cas le plus fréquent de micro variant, avec neuf répétitions tétranucléotidiques et une répétition incomplète de trois nucléotides, car la septième répétition présente un manque d'une seule adénine sur l'unité répétitive AATG normale (Butler., 2009).



**Figure 3.** La structure des trois locus STR les plus utilisés en génétique criminalistique (Goodwin et al., 2011)

## 5 Les sources d'ADN en criminalistique

Un échantillon d'ADN peut provenir de diverses sources biophysiques viables, telles que le sang, le sperme, l'urine, la salive, ou non, comme l'os, la dent et le cheveu. (Darryl., 2013).

### **5.1 La salive**

La salive est un liquide contenant une variété d'enzymes digestives, y compris les parois buccales ou les glandes salivaires, qui sont présentes dans une plus grande variété d'échantillons que le sang ou le sperme **(Coquoz.,2013)**

L'amylase est considérée comme l'enzyme la plus spécifique de la salive, offrant une présence vérifiable à travers des examens de biomédecine. Les tests Ecoline S de Merck et Phadebas de Pharmacia Diagnostics sont couramment utilisés pour détecter sa présence. Bien que le test Ecoline S soit un peu coûteux pour détecter des traces indésirables dans le sang, le test Phadebas offre une solution plus accessible pour obtenir les mêmes résultats **(Coquoz., 2013).**

### **5.2 Le sang**

Le sang comme trace biologique ne présente aucun problème, et les analyses par PCR ne peuvent pas être effectuées. Nos globules blancs sont la source de tout l'ADN de notre sang. Le test de Kastle-Meyer (KM) est l'un des tests les plus utilisés dans le monde. Le test à l'ortho-tolidine (o-tolidine) donne une intense coloration bleue en présence de sang. **(Coque.,2013).**

### **5.3 Le sperme**

Les orifices, les vêtements ou la peau des victimes contiennent généralement du sperme, une trace sexuelle. Bien que la détection puisse être retardée, sa durée de vie est estimée à 24 heures. **(Sibille., 2002).**

La glande prostatique (PAP) produit des enzymes appelées phosphatases acides. Elles contribuent à la décomposition des composés de phosphate. Cette fonctionnalité est utilisée pour identifier le liquide spermatique **(Coquoz :, 2013).**

### **5.4 L'urine**

L'ADN peut être trouvé dans l'urine, qui contient des substances et des cellules de la vessie et des canaux, mais il a déjà été analysé et peut authentifier les échantillons dans les tests antidopage **(Coquez ., 2013).**

## 6 La salive comme source d'ADN

La salive est souvent utilisée comme une source d'ADN dans les enquêtes de police scientifique, provenant de diverses formes de preuves telles que les taches de salive, les menaces et les prélèvements effectués avec des écouvillons issus de kits d'ADN standard. (Hedman et al., 2001). Les cellules de la salive contiennent de l'ADN génomique et de l'ADN mitochondrial (ADNmt), qui sont très utiles pour l'identification. (Saxena et Kumar., 2015).

### 6.1 Composition chimique de la salive

La salive est un liquide sécrété par les glandes salivaires pour humidifier les muqueuses de la bouche et initier la digestion des aliments. La sécrétion quotidienne varie d'une personne à l'autre, allant de 500 à 1 200 ml.

Son composant principal est l'eau (99 %), mais la salive contient également des ions (sodium, potassium, chlore, etc.) et des éléments organiques. Il contient donc de l'urée, du glucose, des hormones, de l'ARN et une quantité de protéines, notamment des enzymes digestives (amylase, lipase) (Pellat., 2010).

L'amylase est une enzyme qui existe sous des isoformes. Elle peut être divisée en trois catégories :  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -amylase. Ces trois types sont des glycosides hydrolases qui participent au processus d'amylolyse (processus de dégradation de l'amidon) en agissant sur les liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques pour produire des sucres à chaîne courte.

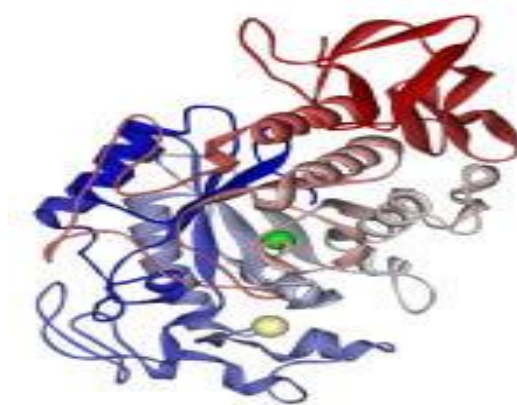
- **L'alpha-amylase**

L'alpha-amylase est une enzyme présente sous de nombreuses formes dans la nature. Elle est codée par une famille de gènes située sur le chromosome 1. La régulation de ces gènes fait que selon que l' $\alpha$ -amylase est produite par les glandes salivaires ou par le pancréas, différentes enzymes sont sécrétées. Il existe deux isomères chez l'homme : l'alpha-amylase salivaire et l'alpha-amylase pancréatique. Les deux variantes sont impliquées dans la digestion de l'amidon (Fig.4). Bien que ces deux isoenzymes partagent environ 97 % d'homologie, elles proviennent de tissus différents et ne partagent pas le même schéma de clivage de l'amidon (Minamiura., 1988).

Contrairement aux autres amylases, l'alpha-amylase peut hydrolyser les liaisons  $\alpha$ (1-4) à des positions aléatoires dans les chaînes polymères de l'amidon, ce qui en fait une enzyme

plus rapide que les autres amylases. Les produits finaux sont le maltose et le glucose issus de l'amylopectine et le maltose et le maltotriose issus de l'amylose.

La plupart des auteurs considèrent l'amylase comme un marqueur spécifique pour tester la présence de salive, le seul fluide corporel humain qui contient de grandes quantités d'enzyme étant sur la pancréatique (De Leo et al., 1985).



**Figure 4.** "Modèle 3D de l'enzyme alpha-amylase salivaire  
(www.phadebas.com).

## 6.2 Tests spécifiques pour la révélation de traces de salive

Les produits Phadebas s'appuient sur l'action de l'amylase, comprennent actuellement quatre types différents, avec PhadebasDLA2 (Détection de faible activité amylase), a été ajoutée en 2023. D'après le site officiel de l'entreprise, chacun de ces produits utilise des méthodes distinctes malgré leur fondement commun sur les tests d'amylase.

### 6.2.1 Le Phadebas Amylase test

Dans le test salivaire Phadebas, l'activité de l'alpha-amylase présente dans la tâche sert d'indicateur de la présence de salive. Les comprimés de test préliminaire mesurent précisément l'activité de l'alpha-amylase dans les liquides. L'amylase est également présente dans d'autres fluides corporels, bien que ses niveaux soient généralement beaucoup plus faibles que dans la salive, souvent insuffisante pour être détectés par la méthode Phadebas.

L'activité de l'amylase salivaire est plus importante dans la bouche et résiste très bien aux changements de température, mais son activité s'arrête dans l'estomac et est progressivement détruite (Schom, 2019).

En 1975, P.H. Whitehead et Kipps ont publié une liste dans le journal J. Forens. Sci. Soc., qui a depuis été utilisée comme référence pour les variations d'activité de l'amylase entre la salive et les autres fluides corporels car l'amylase montre une activité très variable d'un fluide à l'autre. Ci-dessous les valeurs d'activité de l'amylase exprimées en unités internationales par litre (UI/L) pour différents fluides corporels :

- Salive : 263 000 à 376 000 UI/L
- Urine : 263 à 940 UI/L
- Sang : 110 UI/L
- Sperme : 35 UI/L
- Sécrétion nasale : niveaux indétectables
- Sueur : niveaux indétectables

### **6.2.2 Contenu du kit Phadebas et matériel offert**

Le test Phadebas d'amylase (50) est disponible en flacon de 50 comprimés, tandis que le test Phadebas d'amylase (500) est proposé en cinq flacons de 100 comprimés chacun (Chaque comprimé contient 45 mg d'amidon bleu) et une fiche d'information sur le produit avec les normes de la courbe (Curve).

### **6.2.3 Phadebas comprimé**

Il est constitué de polymères d'amidon liés uniformément sous forme de microsphères de taille définie. Ces microsphères d'amidon biodégradables (DSM) sont insolubles dans l'eau (Fig.5).

Le bleu d'amidon est un colorant composé d'un mélange d'amidon et de bleu de Prusse, est lié de manière covalente au DSM. Lorsque le colorant se lie aux microsphères, il reste insoluble dans l'eau. Cependant, en présence d' $\alpha$ -amylase, le DSM se dégrade proportionnellement à l'activité de l' $\alpha$ -amylase et libère un colorant bleu. En raison de la réticulation et du grand colorant bleu, aucune autre enzyme ne peut agir sur le substrat. Par conséquent, Phadebas est spécifique de l' $\alpha$ -amylase.



**Figure 5.** Photographie du test Phadebas Amylase  
([www.phadebas.com](http://www.phadebas.com)).

#### **6.2.4 Limites du Tests Préliminaires Phadebas**

L'utilisation de l' $\alpha$ -amylase comme moyen de reconnaissance de la salive pose certains problèmes, elle est une enzyme omniprésente chez les plantes et les animaux (**Barni et al., 2006 ; Myers et Adkins, 2008**). Des recherches antérieures ont montré que le test Phadebas Forensic Press ne cible pas spécifiquement l' $\alpha$ -amylase humaine et qu'il réagit de manière croisée avec la salive des chiens et des chats, mais pas avec les plantes. (**Willott , 1974; Myers et Adkins , 2008; Watchman et al., 2011**).

Deuxièmement, la composition de la salive, y compris les taux d'amylase, fluctue dans le temps et entre les individus. En raison de cette variabilité inhérente, on peut s'attendre à ce que toutes les taches de salive ne soient pas détectées par le test Phadebas Forensic Press ou par d'autres méthodes couramment utilisées (**Ben-Aryeh et al, 1986 ; Aps et Martens, 2005 ; Willott et Griffiths, 1980 ; Casey et Price, 2010**).

L' $\alpha$ -amylase ne se trouve pas seulement dans la salive, mais également dans d'autres fluides corporels tels que le sperme, l'urine et les sécrétions vaginales (**Kipps et Whitehead, 1975 ; Auvdel, 1986 ; Tsutsumi et al., 1991**).

Le type d' $\alpha$ -amylase trouvé dans d'autres fluides corporels est principalement l' $\alpha$ -amylase pancréatique plutôt que l' $\alpha$ -amylase salivaire, mais le réactif Phadebas ne peut pas faire la différence entre les deux (**Casey and Price, 2010**).

### **5.2.5 Exploration Conceptuelle de la Validation du Test Phadebas**

La vérification de la méthode est le processus que nous effectuons. Démontré par des preuves expérimentales à l'appui. Les performances de cette méthode permettent de satisfaire aux exigences pour son utilisation prévue (**Bouteille, 2006**).

L'évaluation et la validation du produit impliquent généralement l'envoi du produit à un laboratoire pour déterminer ses caractéristiques selon une norme ou une spécification, elles garantissent qu'il peut être utilisé avec confiance dans des applications pratiques, notamment dans les enquêtes médico-légales, où la précision et la fiabilité des résultats peuvent être critiques pour la résolution des affaires et la justice.

Ce travail effectué doit être totalement en adéquation avec les exigences de la norme de qualité internationale ISO/IEC 17025, qui comprend toutes les exigences nécessaires pour que les laboratoires d'essais et/ou d'étalonnage puissent démontrer leur compétence technique et la validité des données et des résultats produits.

La priorité et l'importance de la conformité aux exigences ISO/IEC 17025 correspondent aux laboratoires qui s'appuient sur l'exactitude et la fiabilité des résultats. (**Hesham Tawfik et M. Abdel-Fatah, 2010**)

Le maintien de cette norme apporte une valeur ajoutée significative et améliore la crédibilité, la fiabilité des résultats de mesure.

## **7 Exploration moléculaire des scènes de crime (Les étapes d'établissement d'empreinte génétique )**

### **7.1 Extraction et purification d'ADN**

L'extraction et la purification de l'ADN sont essentielles pour garantir le succès des étapes suivantes. Elles doivent permettre de recueillir suffisamment d'ADN de qualité pour établir un profil génétique.

Toutes les techniques d'extraction comprennent une étape initiale de dénaturation pour lyser les cellules de l'échantillon afin de libérer l'ADN. Il est donc nécessaire de dissoudre l'ADN contenu à l'état de traces puis de le purifier pour éliminer les différentes molécules également dissoutes. Cette étape est particulièrement importante car nombre de ces molécules peuvent inhiber le processus d'amplification de l'ADN cible (**Pun et al, 2008**).

Cet objectif est généralement atteint en dégradant les protéines de la membrane cellulaire pendant l'incubation en présence de : SDS (sodium dodecyl sulfate) qui un détergent anionique qui perturbe les interactions non covalentes protéines, de DTT (dithiothréitol) son rôle est de rompre les liaisons disulfures, et la Protéinase K, l'enzyme qui dégrade les protéines.

## **7.2 Quantification de l'ADN par PCR en temps réel**

La PCR en temps réel a été introduite comme un outil important pour faciliter la quantification précise de l'ADN, en particulier pour les échantillons avec des quantités d'ADN limitées (**Nicklas et al., 2003**).

La technologie PCR en temps réel permet la quantification des produits d'amplification au fur et à mesure de la progression de la réaction. La réaction en chaîne par polymérase par transcription inverse quantitative en temps réel (RT-qPCR) est une méthode pratique et efficace pour détecter l'ARNm dans des échantillons de tissus ou de fluides corporels. Il présente les caractéristiques d'une utilisation facile, d'une sensibilité élevée et d'une forte spécificité. Avec la large application de la technologie RT-qPCR en médecine, en biologie et dans d'autres domaines, la technologie RT-qPCR a réalisé certains progrès dans le domaine de la recherche médico-légale.

La technologie repose sur la détection et la quantification d'émetteurs fluorescents lors de l'amplification. Il est basé sur la chimie Taqman et peut obtenir des signaux fluorescents à partir de sondes doublement marquées dont le signal d'émission de fluorescence augmente proportionnellement à la quantité d'ADN amplifié. (**Higuchi et al., 1993**)

La quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible après extraction peut être obtenue par PCR en temps réel. Dans chaque cycle d'amplification, le nombre L'ADN est mesuré à l'aide de marqueurs fluorescents. A la fin du PCR, le logiciel représente graphiquement augmentation de la fluorescence par puits au cours des cycles successifs (**Pun et al., 2008**).

L'appareil de PCR en temps réel est simplement un thermocycleur classique auquel est ajouté un détecteur de fluorescence. L'appareil mesure ensuite l'intensité de la fluorescence Cela dépend du nombre de cycles (**China et al.,2002 ; Poitras et al., 2002**)

### 7.3 Amplification des STR par PCR

L'amplification des séquences d'ADN courtes tandem répétées (STR) par PCR est une méthode essentielle utilisée en génétique criminalistique pour la réalisation des profils génétiques. Cette technique permet de copier de manière exponentielle les régions d'ADN contenant les STR, des séquences courtes et répétées qui varient en longueur d'un individu à l'autre.

#### ➤ Principe de la PCR

PCR est une méthode d'amplification de l'ADN in vitro. L'utilisation de la PCR en Criminalistique a accru les capacités analytiques, permettant d'obtenir des empreintes Génétiques à partir de traces contenant de petites quantités d'ADN ou d'ADN dégradé (Saiki et al., 1988).

L'amplification génique (PCR) amène les ADN polymérase à agir de manière similaire au phénomène de réplication de l'ADN in vivo lors de la division cellulaire pour multiplier les séquences d'ADN extraites de tâches biologiques ou d'échantillons biologiques.

#### • Les étapes de la PCR

L'amplification génique implique plusieurs étapes (tout comme la réplication naturelle de l'ADN). En PCR classique, environ trente cycles sont réalisés. Chaque cycle comprend trois étapes à des températures spécifiques :

- Dénaturation à 94°C : L'ADN matrice est chauffé, séparant ses brins.
- Hybridation à 50-65°C : Les amorces se lient à leur séquence cible sur l'ADN.
- Élongation à 72°C : La Taq polymérase synthétise les brins d'ADN complémentaires en ajoutant des dNTPs (Iglesias, 2009).

La région cible à amplifier est initialement identifiée sur la molécule d'ADN par de courtes séquences polynucléotidiques appelées amorces, qui synthétisent le premier brin d'ADN complémentaire de la région cible.

Les séquences d'ADN cibles utilisées en médecine légale sont sélectionnées en fonction de leur degré élevé de polymorphisme dans les populations. Ainsi, le pouvoir discriminant associé à ces séquences moléculaires (appelées aussi marqueurs) rend quasiment certaine l'identification d'un individu à partir de la source des traces biologiques (Ludes, 2021)

#### **7.4 Analyse des fragments par électrophorèse capillaire (post PCR)**

La PCR multiplex produit un mélange de fragments d'ADN qui doivent être séparés. Les STR peuvent être différenciés par électrophorèse capillaire. Ce dernier doit également avoir une résolution suffisamment importante parce que certains allèles peuvent différer les uns des autres par une seule paire de bases (**Sambrook et Russell, 2001**).

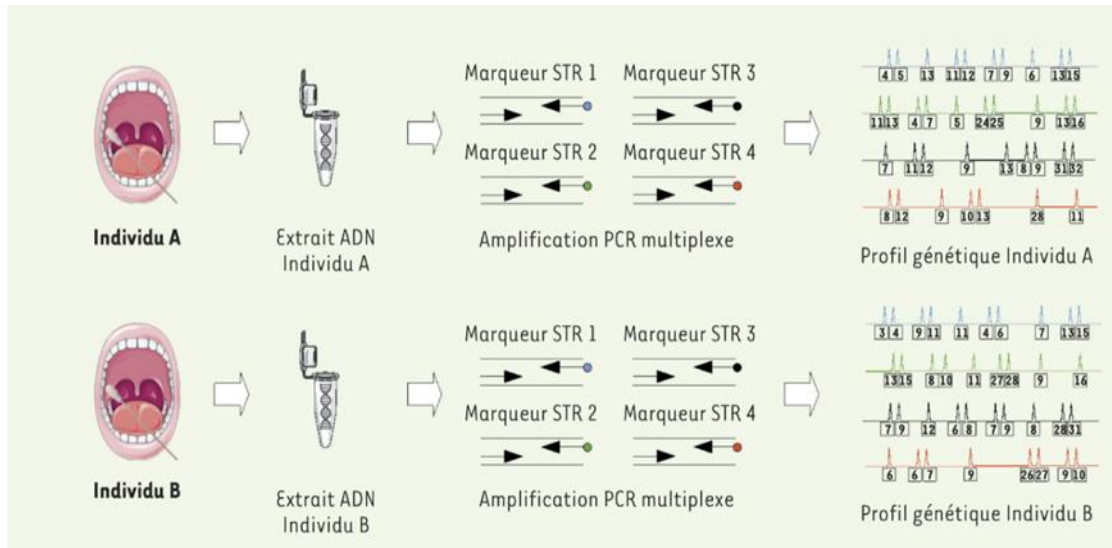
Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse en fonction de leur taille et de leur couleur, suivie d'une fluorescence induite par laser avec détection de plusieurs longueurs d'onde. Les étalons internes (les standards de taille) contiennent des fragments d'ADN de taille connue et sont marqués avec différentes couleurs de colorant et sont généralement soumis à une co-électrophorèse avec chaque échantillon, Calibrez les dimensions d'une série à l'autre (**Butler et al., 2004**).

L'électrophorèse capillaire offre de nombreux avantages précieux dans le domaine de la biologie moléculaire et de la génétique. Tout d'abord, cette technique permet une séparation extrêmement précise des fragments d'ADN grâce à l'utilisation d'un capillaire très fin et à des champs électriques contrôlés. De plus, elle offre une conservation efficace des échantillons, réduisant ainsi les risques de dégradation de l'ADN et assurant des résultats fiables sur le long terme. En outre, cette méthode permet la production de résultats en données brutes, offrant une transparence et une reproductibilité maximales dans l'analyse des échantillons. Enfin, l'électrophorèse capillaire minimise les risques de contamination grâce à la détection automatisée des échantillons, ce qui garantit l'intégrité des résultats et une plus grande fiabilité des analyses génétiques (**Butler, 2005**).

#### **7.5 Validation des profils génétiques**

Une fois les résultats de l'ADN obtenus par PCR, suivis de la séparation et de la détection des produits, des logiciels d'analyses génétiques sont utilisés pour traduire les données de l'électrophorégramme en profils exploitables (Fig.6). Les laboratoires d'analyse de l'ADN ont pour objectif de générer des profils d'ADN pour divers types d'échantillons, qu'ils soient inconnus ou de référence, en vue de comparaisons pour des fins d'identification (**Sozer, 2014**). Les données collectées sous forme d'électrophérogrammes multicolores ont été analysées par le logiciel (GeneMapper) qui déterminait automatiquement la taille des allèles STR sur la base d'une courbe standard générée par un étalon interne.

Le génotypage STR est effectué en comparant les tailles d'allèles de chaque échantillon à celles présentes dans une échelle allélique contenant des allèles communs précédemment séquencés. (Butler et al., 2004).



**Figure 6.** Principe de l'identification génétique par établissement d'un profil génétique STR à partir de l'ADN salivaire

(Laurent et al., 2017).

### 7.6 Banques de données d'empreintes génétiques en criminalistique

"Les banque de données" ou "base de données" sont les termes techniques habituellement employés pour décrire une collection organisée d'informations facilitant leur récupération (Coquoz, 2003).

Dès 1990, la technologie PCR a permis d'obtenir rapidement des profils génétiques, à partir de petites quantités d'ADN, et de présenter les résultats sous forme numérique. Cela non seulement convertit les mots en chiffres, mais rend également la « mesure » possible (Desrosières, 2008).

L'introduction de la technologie d'amplification liée à l'analyse de courtes répétitions en tandem a permis au Royaume-Uni de mettre en place une première base de données nationale ADN en 1995. Une législation complète a autorisé les médecins légistes à inclure à la fois les profils ADN personnels et les résultats des scènes de crime. En 1999, la base de données contenait plus de 700 000 profils, générant environ 700 correspondances chaque semaine, démontrant ainsi son efficacité dans la résolution des crimes (Martin et al., 2001).

Depuis lors, les conditions techniques ont été développées pour construire de grandes bases de données informatiques faciles à rechercher à partir de données personnelles ou de scènes de crime (**Vailly and Krikorian, 2018**).

En Algérie, le service central est responsable de créer, gérer et conserver une base nationale des empreintes génétiques obtenues à partir d'analyses de prélèvements biologiques, en accord avec la législation en vigueur. Les règles de fonctionnement de ce service sont définies par des réglementations spécifiques. Un fichier distinct est établi pour chaque catégorie de personnes concernées, ainsi qu'un fichier spécial pour les preuves pénales. Lors de l'enregistrement des données génétiques dans la base nationale, des détails tels que l'identité de la personne correspondante, la date, le lieu et la nature de l'infraction sont requis, tout comme les références aux affaires ou aux scellés contenant les échantillons ou traces biologiques. « Selon le Journal Officiel de la République Algérienne, numéro 37, le Service Central des Empreintes Génétiques ».

### **7.7 Altérations Moléculaires en génétique criminologique**

L'analyse médico-légale des séquences répétées en tandem (STR) est limitée par la qualité et la quantité d'ADN récupérées des échantillons biologiques. Des dommages à l'ADN peuvent provoquer un blocage de la polymérase, entravant ainsi l'amplification et rendant difficile l'analyse du locus cible (**Ambers et al., 2014**).

Dans les affaires de police scientifique, trois facteurs principaux ont un impact significatif sur le taux de réussite de la récupération d'un profil ADN à partir de preuves :

ADN endommagé/dégradé, Quantité limitée d'ADN et la présence d'inhibiteurs endogènes ou environnementaux. Cependant, la dégradation de l'ADN est inhérente aux échantillons de preuves lorsqu'ils arrivent au laboratoire.

Le degré et l'étendue des dommages à l'ADN dans un échantillon dépendent de l'environnement auquel l'échantillon est exposé et de la durée de l'exposition. Les mécanismes de dommages à l'ADN sont divers et peuvent être divisés en quatre grandes catégories : la dépurination, la réticulation, les changements de bases et les cassures de brins.

Dans l'environnement naturel, les rayons UV, l'acidité, la chaleur et l'humidité peuvent causer diverses formes de dommages à la structure moléculaire de l'ADN (**Ambers et al., 2014**). Outre l'environnement, les produits chimiques peuvent également être utilisés pour

endommager l'ADN. En fait, les criminels utilisent intentionnellement de l'eau de Javel pour nettoyer les scènes de crime et détruire les preuves ADN.

De plus, comprendre les effets nocifs de l'eau de Javel sur l'ADN est fondamental pour que les laboratoires médico-légaux utilisent l'eau de Javel pour nettoyer les paillasses et prévenir la contamination croisée des échantillons entre les cas. **(Tuccinardi, 2020).**

## *Chapitre II*

---

---

### *Matériels & Méthodes*

---

---

## II. Matériels et méthodes

Ce travail a été réalisé au Département d'Identification Génétique/ADN du Laboratoire Scientifique et Technique de la Sous-Direction de la Police Scientifique et Technique (SDPST) de la Direction Générale de la Sûreté Nationale (DGSN), sis à Châteauneuf. El-biar, Alger.

L'objectif principal de cette recherche est de vérifier et de valider l'efficacité des comprimés de test Phadebas Amylase pour détecter les traces de salive lors d'enquêtes criminelles, suivies de la réalisation d'un profilage génétique pour l'identification humaine.

### 8 Matériel d'étude

#### 8.1 Matériel biologique

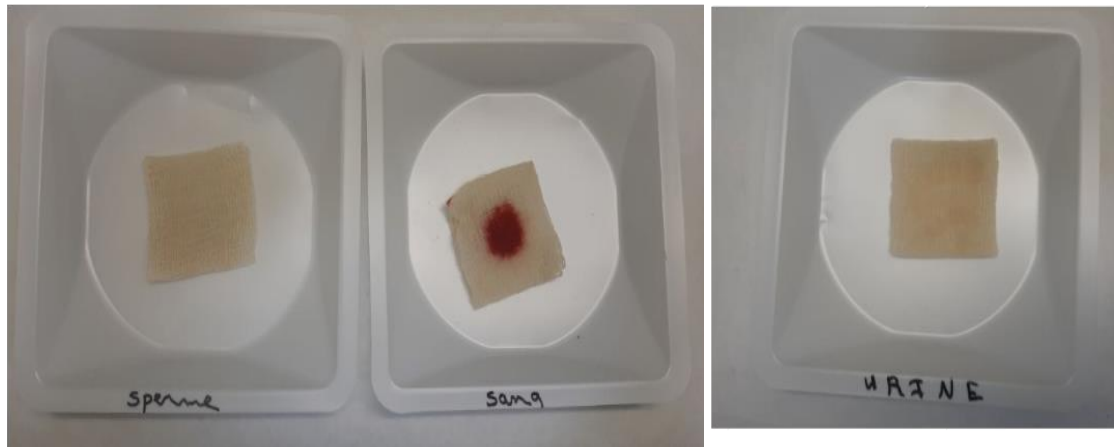
Il s'agit d'un fluide biologique humain d'une importance cruciale : la salive. Pour mener à bien nos analyses, nous avons prélevé des échantillons de diverses manières. Tout d'abord, des prélèvements buccaux ont été réalisés sur des volontaires au sein de laboratoire d'analyses.

Ce processus implique l'utilisation d'un écouvillon buccal, inséré dans la bouche afin de recueillir de manière exhaustive la salive en frottant les joues, la langue et les gencives avec des mouvements précis de haut en bas et circulaires (Fig.7). Une fois cette phase achevée, la salive est extraite de l'écouvillon par centrifugation, permettant ainsi sa séparation et son analyse ultérieure.



**Figure 7.**Prélèvement buccal

De plus, nous avons également étudié des traces d'autres fluides biologiques tels que le sang, l'urine, la sueur et le sperme (fig.8). Ces échantillons ont été acheminés au laboratoire d'analyse afin de confirmer la spécificité du test Phadebas vis-à-vis des traces salivaires.



**Figure 8.** Photographie des différents échantillons étudiés

## 7.2 Matériel non biologique

Au cœur du laboratoire d'analyse de la police scientifique réside une organisation méticuleuse, où chaque salle est attribuée à une tâche spécifique dans le processus d'investigation. Cette stratégie vise à assurer la fiabilité des résultats tout en minimisant les risques de contamination croisée.

Chaque salle est équipée de son propre appareillage de pointe et d'équipements spécialisés, rigoureusement entretenus pour maintenir des normes de qualité optimales (Tab.01). De plus, les kits et les réactifs nécessaires à chaque type d'analyse sont soigneusement sélectionnés et stockés dans des conditions contrôlées, garantissant ainsi leur efficacité et leur intégrité tout au long du processus. Cette approche méthodique et rigoureuse est essentielle pour soutenir les enquêtes criminelles et assurer la crédibilité des preuves scientifiques présentées devant les tribunaux.

**Tableau 1.** Les différentes salles et équipements de laboratoire.

Les salles	Les équipements	Les réactifs
<b>Salle examen de scellé</b>	Papiers paille - Gants latex - Marqueur - Tube flacons - Écouvillons stériles - Bistouris - tube Eppendorfs - Pince - Portoirs - Centrifugeuse - Vortex - Bain-marie - Agitateur- Ciseaux - Tips - Micro pipettes 10/100/200/1000 µl	Comprimés Phadebas - L'eau ultra-pure 18,2 - Hydroxyde de sodium (NaOH)
<b>Extraction et purification d'AND</b>	Centrifugeuses - Bloc chauffant - Vortex - Agitateur - Tube Eppendorfs - la hotte	Qiagen QIAamp DNA Investigator Kit- Ethanol absolu - L'eau ultra-pure 18, 2
<b>Quantification d'ADN</b>	Thermocycleur 7500 fast real time PCR - Centrifugeuse - Plaque real time PCR - vortex - support	Kit Quantiplex d'investigateur
<b>PCR</b>	Thermocycleur - Plaque PCR 96 puits - Support plaque PCR	Kit d'amplification PCR AmpFLSTR MiniFiler - dNTP, Mg <sup>2+</sup> - Primers - Taq Polymérase
<b>Post-PCR</b>	Thermobloc - cryobloque	Formamide - Standard de taille - LADDER
<b>Électrophorèse capillaire</b>	Séquenceur Seq-studio - ordinateur - Gene mapper	

Au cours de ce travail, les protocoles de manipulation des échantillons sont soumis à des normes strictes de sécurité et de qualité. Les tubes et les échantillons sont rigoureusement identifiés à chaque étape du processus pour éviter toute confusion ou erreur. De plus, chaque test est systématiquement accompagné de témoins positifs et négatifs, permettant ainsi de vérifier la fiabilité des résultats obtenus. Par ailleurs, le matériel utilisé est régulièrement stérilisé et autoclavé pour prévenir toute contamination croisée et garantir l'intégrité des échantillons analysés, Nous complétons cette mesure en utilisant des hottes équipées de rayonnement UV pour décontaminer nos manipulations.

Ces mesures de précaution et de contrôle de la qualité sont essentielles pour assurer la validité et la fiabilité des données générées dans le cadre de cette étude.

## 9 Méthodes

### 9.1 Désinfection et préparation de la paillasse

Suite au nettoyage de la paillasse avec une solution de SDS à 0,1% et l'utilisation d'un papier absorbant dédié, les échantillons prélevés ont été soigneusement disposés dans des tubes Eppendorf préalablement étiquetés, dans la salle dédiée à l'examen des traces. Le coton de l'écouvillon a été intégralement sectionné à l'aide d'un bistouri stérile et déposé dans le tube correspondant.

### 9.2 La validation de test phadebas

Ce test, en plus de révéler la présence de salive dans un échantillon spécifique, constitue également une méthode appropriée pour évaluer l'activité de l'alpha-amylase (**Da Vela et al., 2006**).

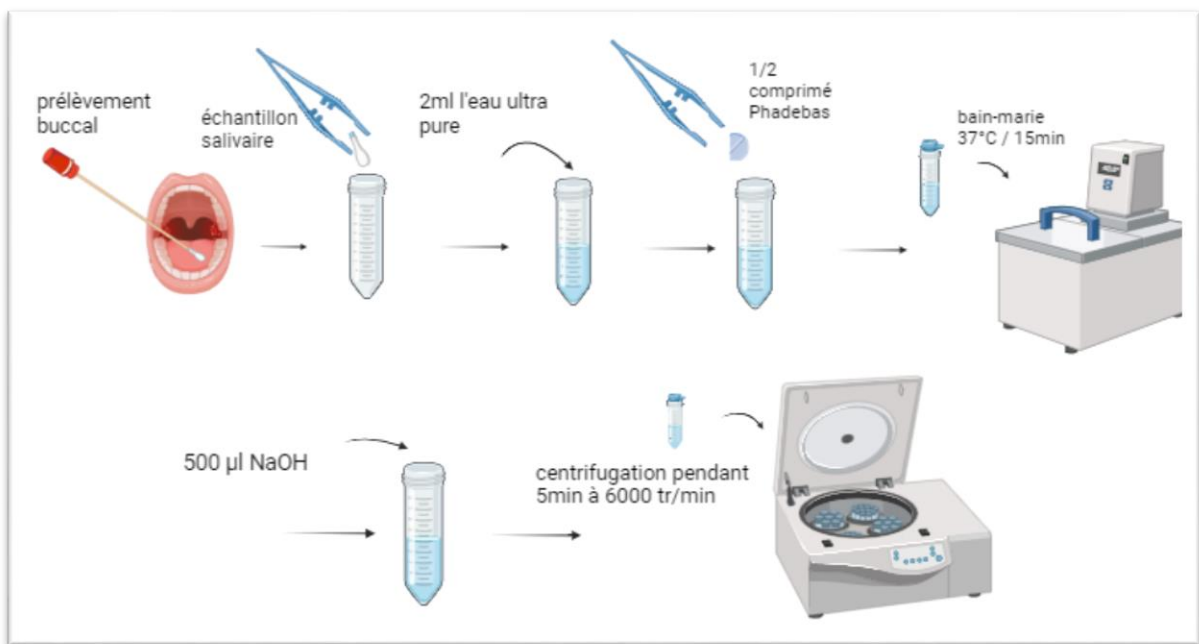
Le but principal de cette étude est de montrer que la méthode employée pour identifier la salive dans son milieu d'utilisation au Laboratoire de Police Scientifique (LPS) répond aux critères établis tels que les exigences de la norme ISO/IEC17025 publiée en 1999 par l'Organisation internationale de normalisation (ISO) et la commission électrotechnique internationale (CEI).

Cette norme englobe toutes les conditions requises afin que les laboratoires d'essai et/ou d'étalonnage puissent démontrer leur expertise technique et la validité des données et des résultats que ils génèrent.

Pour valider le test Phadebas, divers paramètres ont été étudiés, notamment la répétabilité, la sensibilité, la reproductibilité, la spécificité et la contamination croisée. Les étapes suivantes ont été répétées au début de l'étude de chaque paramètre (Fig.8):

- Identification de tube Falcon (15ml).
- Collecte d'échantillons : Prélèvement de salive à l'aide d'un écouvillon buccal pour l'échantillon et le témoin positif (+).
- Découpage avec bistouri et placement de l'échantillon dans un flacon stérile de 15 ml :
  - Flacon pour l'échantillon
  - Flacon pour le témoin positif (+)
  - Flacon pour le témoin négatif (-)

- Dilution dans 2 ml d'eau ultra pure.
- Ajout de la moitié du comprimé de test Phadebas amylyase dans chaque tube.
- Incubation au bain marie/agitateur à 37°C pendant 15 minutes.
- Ajout de 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH).
- Centrifugation pendant 5 minutes à 6000 tr/min pour obtenir un surnageant.
- Lecture



**Figure 9.** Image récapitulative des étapes répétées au début de l'étude de chaque paramètre

### 9.3 Plan de validation

**A. Étude de la répétabilité:** Il s'agit de procéder à l'analyse d'un même échantillon par un même opérateur, en utilisant le même lot de réactifs, le même échantillon, les mêmes instruments.

\*\*\*Le même mode opératoire est répété 3 fois pour le même opérateur (voir Annexe 1).

**B. Étude de la reproductibilité:** Cette étape consiste à appliquer la même procédure (Décrite précédemment) dans des conditions différents, un appareil et un jour différents.

\*\*\*La procédure est répétée trois fois par des opérateurs distincts.

**C. Étude de la cross-contamination :** cela signifie intégrer des tests de contrôle négatifs pour repérer d'éventuelles contaminations, valider régulièrement les protocoles de travail et fournir des formations continues au personnel pour maintenir des normes élevées en matière d'hygiène et de prévention de la contamination.

\*\*\*Le même processus est reproduit à chaque fois.

**D. Étude de la spécificité:** Cette procédure est mise en place pour évaluer la spécificité de la méthode de détection de Phadebas par rapport à d'autres fluides corporels. Pour ce faire, différents échantillons tels que le sang, les urines, le sperme et la sueur sont nécessaires. Chaque type d'échantillon suit une étape de préparation similaire, mentionnée précédemment, suivie de traitements spécifiques en fonction du fluide concerné (Annexe 2).

#### **E. Étude de la Sensibilité de Phadebas**

Cette étape implique la réalisation de dilutions progressives de salive afin d'évaluer la sensibilité de la Phadebas.

- D'abord, le coton est découpé et placé dans un tube passoire.
- Ensuite, une centrifugation de 3 minutes à 6000 tr/min est effectuée pour récupérer la solution mère.
- La salive est ensuite diluée dans des tubes Eppendorf selon des ratios progressifs : 1/100, 1/200, 1/300, 1/350, 1/500, 1/600, 1/700, 1/900, 1/1000, 1/1100, et 1/5000.

Ces dilutions croissantes sont utilisées pour évaluer la sensibilité de la Phadebas, en répétant le même processus à chaque étape.

#### **9.4 Les processus opératoire de l'extraction d'ADN**

L'extraction vise à briser la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire des cellules en présence de tampon ATL et de protéinase K, qui dégradent les protéines. Le support peut être retiré en utilisant des tubes passoires. La précipitation de l'ADN est provoquée par l'ajout d'éthanol absolu, un solvant neutre qui déshydrate la double hélice d'ADN.

L'adsorption de l'ADN est utilisée pour purifier l'ADN en utilisant une colonne QIAGEN standard compatible avec une micro-centrifugeuse. La résine de silice présente dans cette colonne a pour fonction de retenir sélectivement les molécules d'ADN chargées

négativement grâce à une interaction spécifique avec la résine de silice. La solution AW1 crée un milieu défavorable pour l'ADN et utilise deux tampons pour laver l'ADN, éliminant ainsi les agents contaminants tels que l'ARN et les résidus de protéines.

Les échantillons utilisés pour l'extraction sont les dilutions de sensibilité.

**Tableau 2.** Composants du KIT Qiagen (catalogue QIAamp DNA Investigator Kit)

<b>QIAampMinElute®Columns</b>	<b>50</b>
<b>Collection Tubes (2ml)</b>	<b>200</b>
<b>Buffer ATL</b>	
<b>Buffer ATL*</b>	33 ml
<b>BufferAW1*(concentrate)</b>	19 ml
<b>BufferAW2*(concentrate)</b>	13 ml
<b>Buffer ATE</b>	20ml
<b>Protéinase K</b>	1.25 ml

#### 9.4.1 Préparation des tampons d'extraction (Buffers)

Les tampons d'extraction AW1 et AW2 jouent un rôle crucial dans le processus d'extraction de l'ADN, fournissant les conditions optimales pour une récupération efficace des échantillons biologiques (Fig.10).

- **Préparation des tampons d'extraction AW1**

Pour préparer le tampon AW1, commencez par ajouter 25 ml d'éthanol (96 à 100%) à la bouteille contenant 19 ml de concentré de tampon AW1. Cochez ensuite la case à cocher sur l'étiquette de la bouteille pour indiquer l'ajout d'éthanol. Une fois le tampon reconstitué, il peut être conservé à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant jusqu'à un an.

- **Préparation des tampons d'extraction AW2**

Pour le tampon AW2, ajoutez 30 ml d'éthanol (96 à 100%) à la bouteille contenant 13 ml de concentré de tampon AW2. Une fois l'éthanol ajouté, le tampon reconstitué peut également être conservé à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant jusqu'à un an.

Remarque : Avant d'entamer la lyse, si l'ATL est composé de cristaux, chauffez-le à une température de 70°C et agitez-le doucement.



**Figure 10.** Photographie des tampons utilisés dans l'extraction d'ADN

### 9.4.2 Lyse

La lyse cellulaire est une étape cruciale dans le processus d'extraction d'ADN utilisant les kits Qiagen. Elle permet la libération des composants cellulaires, y compris l'ADN, des échantillons biologiques, ouvrant ainsi la voie à une extraction efficace et de haute qualité.

- Pour garantir une extraction efficace de l'ADN avec le kit Qiagen, nous recommandons porter au tampon ATL 25, surtout pour purifier l'ADN à partir de très petites quantités d'échantillons.
- Instructions pour l'étape de lyse pour les échantillons contenant une plus grande quantité d'ADN :
  1. Dans un tube de 2 ml on met l'échantillon d'ADN, on ajoute 300  $\mu$ l de tampon ATL et 20  $\mu$ l de PK du kit. Vortexer pendant 10 secondes, puis incubé pendant 1 heure à 56°C avec une agitation de 900 rpm. Centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttelettes accumulées dans le couvercle d'ependorf.
  2. Ajoutez 300  $\mu$ l de tampon ATL et vortexer pour bien mélanger pendant 10 secondes.
  3. Incubez pendant 10 minutes à 70°C sur le bloc chauffant avec agitateur à 900 rpm.

### 9.4.3 Purification

Après l'étape de lyse, la purification de l'ADN est réalisée selon les étapes suivantes (annexe3) :

1. Centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttelettes et ajouter 150 $\mu$ l d'éthanol absolu,
2. Vortexer pendant 15 seconde, centrifuger brièvement et déposer le tout doucement au centre d'une colonne QIAamMinElutecolumn, préalablement identifiée sans toucher la membrane avec le cône de la pipette,

3. Centrifuger 1min à 8000 rpm,
4. Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 500µl de tampon AW1.
5. Centrifuger 1min à 8000 rpm,
6. Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAampMinElutecolumn dans un nouveau tube de 2 ml et ajouter 700µl de tampon AW2
7. Centrifuger 1min à 8000rpm,
8. Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAampMinElutecolumn dans un nouveau tube de 2 ml et ajouter 700µl d'éthanol absolu;
9. Centrifuger 1min à 8000rpm,
10. Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAampMinElutecolumn dans un nouveau tube de 2 ml;
11. Centrifuger 3min à 14000rpm
12. placer la colonne QIAampMinElutecolumn dans un nouveau tube de 1,5 ml, stérile préalablement identifié, ouvre le couvercle de la colonne et laisser sécher à température ambiante pendant 10 minute.
13. Ajouter 20 à 50 µl du tampon ATE, fermer le capuchon de la colonne
14. Incuber 1 min à TA, centrifuger 1 min à 14000 rpm pour récupérer l'extractum.  
Jeter la colonne
15. Conserver les tubes d'ADN à -20°C.

### 9.5 Quantification de l'ADN par la PCR quantitative

Cette méthode permet d'évaluer la concentration d'ADN dans un échantillon et fournit également des informations sur son état de dégradation ainsi que sur la présence éventuelle d'inhibiteurs de la PCR.

La teneur en ADN d'un extrait diffère considérablement selon la nature de l'échantillon et la méthode d'extraction. Ainsi, avant toute amplification, nous avons effectué la quantification de l'ADN dans les extraits de cellules épithéliales accumulées sur la salive, à l'aide de l'ABI Prism® 7500 Fast Sequence Detection System, en utilisant le kit Investigator Quantiplex et la Scorpions®.

En plus de l'estimation de la concentration de l'ADN présent dans l'extrait, la quantification par PCR quantitatif permet également d'évaluer la présence d'inhibiteurs en utilisant un témoin interne d'amplification pour valider l'amplification. Suite à l'obtention des résultats

de quantification, les extraits ont été divisés afin d'obtenir une concentration optimale d'ADN lors de l'amplification de (0,01 à 0,19 ng / $\mu$ l pour l'analyse STR). (Schulz et al., 2006).

- **Le kit Investigator® Quantiplex DNA**

Le kit Investigator® Quantiplex DNA est un outil avancé conçu pour quantifier de manière précise et fiable les échantillons d'ADN, facilitant ainsi les analyses génétiques complexes dans les domaines de la criminalistique et de la recherche biomédicale.

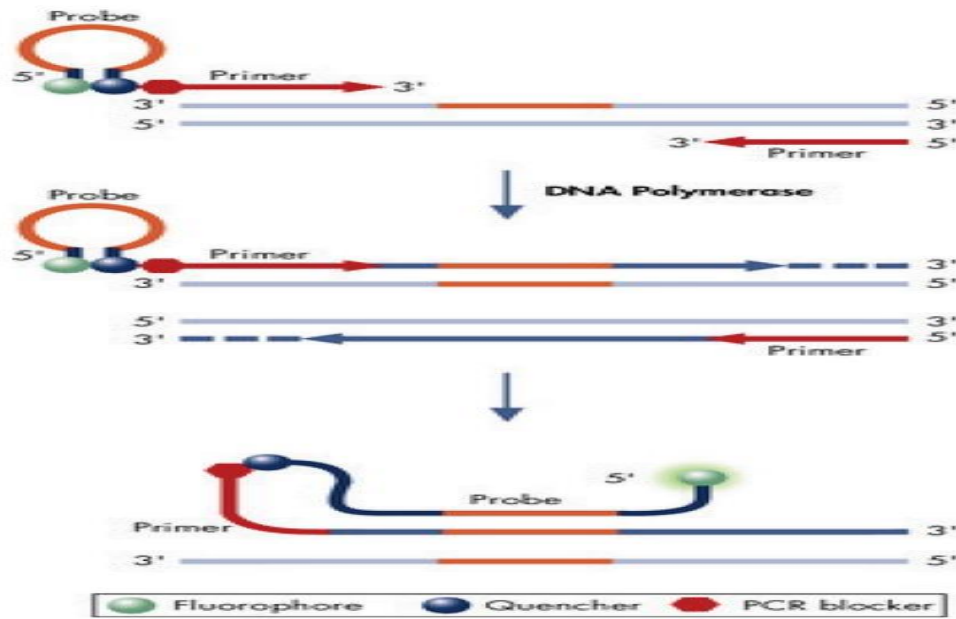
Le kit Investigator Quantiplex est un système prêt à l'emploi pour la détection de l'ADN humain par PCR. Le kit Investigator Quantiplex permet une quantification rapide et précise de l'ADN humain dans les bases de données médico-légales et les échantillons de cas. Le test est sensible jusqu'à <1 pg/ $\mu$ l, avec une quantification précise en dessous de 4,9 pg/ $\mu$ l, où la courbe standard montre une linéarité.

Ce kit contient des réactifs et une ADN polymérase pour l'amplification spécifique d'une région propriétaire de 146 pb présente sur plusieurs autosomes du génome humain (brevet en cours), et pour la détection des produits PCR spécifiques sur les systèmes PCR en temps réel Applied Biosystems® 7500. La région cible de quantification humaine a été sélectionnée pour offrir une sensibilité élevée et une grande fiabilité chez différents individus et populations. Cette région cible a été validée dans une étude externe par un certain nombre de laboratoires médico-légaux qui ont analysé la conservation de son nombre de copies dans la population humaine. Une PCR quantitative a été réalisée pour comparer un test à copie unique spécifique à l'homme et le test Investigator Quantiplex se séparent. Cela entraîne une augmentation de la fluorescence dans le tube de réaction.

Pour une utilisation efficace, ce kit doit être conservé entre 2 et 8°C, évitant absolument la congélation des réactifs. Toutefois, le tampon de dilution de l'acide nucléique QuantiTect peut être entreposé entre -30°C et -15°C si nécessaire, sans subir de cycles de congélation-décongélation. Il est crucial de protéger le Primer Mix IC FQ de la lumière. Par ailleurs, les échantillons d'ADN doivent être stockés séparément des réactifs PCR. Dans ces conditions, les composants demeurent stables jusqu'à la date d'expiration du kit. (Handbook Investigator® Quantiplex , June 2018).

- **Scorpions®**

La détection de l'amplification est réalisée à l'aide d'amorces Scorpions® et d'une nouvelle chimie PCR rapide. Les amorces Scorpions sont des molécules bifonctionnelles contenant une amorce PCR liée de manière covalente à une sonde (Fig.11). Le fluorophore de cette sonde interagit avec un quencher, également incorporé dans la sonde, qui réduit la fluorescence. Au cours de la PCR, lorsque la sonde se lie aux produits de la PCR, le fluorophore et le quencher se séparent. Cela entraîne une augmentation de la fluorescence. (Handbook Investigator® Quantiplex , June 2018)



**Figure 11.**Image explicative de fonctionnement de la sonde Scorpion .

(Handbook Investigator® Quantiplex , June 2018)

### 9.5.1 Préparation de la plaque de la quantification

La préparation de la plaque de quantification d'ADN est une étape cruciale dans le processus d'analyse, il est essentiel de sélectionner une plaque compatible avec le système de quantification utilisé en PCR.

La préparation du mix de quantification commence par la création du mélange réactionnel du Master Mix, composé de 10 µl de Reaction mix, auquel on ajoute 5 µl de Primer mix, pour un total de 15µl de Master Mix par échantillon. Ensuite, 2 µl de chaque échantillon et de l'ADN standard sont ajoutés à ce mélange dans les puits de la plaque PCR, puis la plaque est recouverte d'un film adhésif (Tab.3).

Après avoir centrifugé brièvement la plaque à 1600 rpm, elle est placée dans le récipient du thermocycleur 7500 Fast, et un programme spécifique est lancé. Suite à la quantification, il est parfois nécessaire d'ajuster la concentration d'ADN pour atteindre les valeurs recommandées par le kit Investigator® Quantiplex DNA. **(Handbook Investigator® Quantiplex , June 2018) .**

Cela implique des dilutions avec de l'eau extra pure pour obtenir une concentration finale entre 0,01 et 0,19ng/µl. Ces étapes garantissent une quantification précise de l'ADN dans chaque échantillon, essentielle pour des analyses fiables.

**Tableau 3.** Master Mix de la quantification ADN

Composant	Volume par réaction de 25µl
Reaction mix: (Taq gold AND polymerase, dNTPS, Passive reference-ROX-)	10 µl
Primers mix: (sonde SCORPION -FAM, amorces.	5 µl
Volume total du mix	15 µl

Après avoir démarré l'ordinateur, le thermocycleur (ABI 7500 SequenceDetection System®, AppliedBiosystems) a été activé. Les puits à analyser ont été sélectionnés une fois la plaque placée dans le thermocycleur, et les détecteurs des fluorochrome FAM.

## 9.6 Amplification de l'ADN par PCR multiplexe

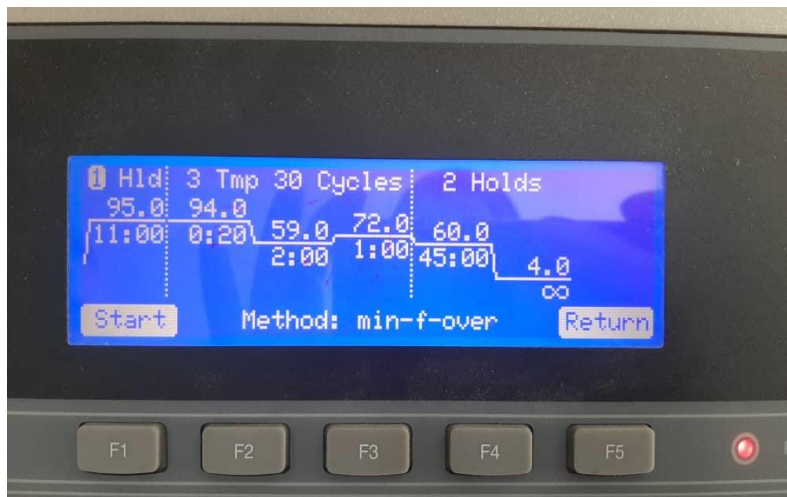
Le concept de "PCR multiplexe" représente une avancée majeure dans la technique de PCR, permettant l'amplification simultanée de plusieurs segments d'ADN distincts au sein d'une seule réaction. Cette méthode utilise plusieurs paires d'amorces pour cibler et amplifier simultanément plusieurs régions génétiques dans un seul tube réactionnel. Pour garantir le succès de cette technique, il est crucial que les longueurs des différents fragments amplifiés soient similaires, facilitant ainsi leur amplification dans les mêmes conditions, tout en présentant des différences suffisantes pour permettre leur distinction et leur détection ultérieure **(Vassias 2012).**

### 9.6.1 Principe de la PCR

La PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) est une technique essentielle en biologie moléculaire, permettant d'amplifier de petites quantités d'ADN pour une analyse ultérieure.

**Tableau 4.** Les étapes de la PCR c'est que la température et le temps nécessaire, (Reynolds et al, 1991)

Les étapes	Température	Temps
L'activation initiale de la PCR	95° C	11 minutes
Dénaturation	94° C	0,20 seconde
Hybridation	59° C	2 minutes
Elongation	72° C	1 minute
L'attaque polymérase	60° C	45 minutes
	4° C	à∞



**Figure 12.** Une image de l'écran d'un thermocycleur standard affichant les températures correspondant à chaque étape de la PCR. (Photo originale)

L'AmpFISTRMiniFiler™ peut être utilisé pour réaliser la PCR multiplexe (Annexe.4). Le protocole implique 30 cycles en une seule réaction, exécutés sur un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700. Ce kit utilise une chimie à 5 colorants fluorescents pour la détection de huit locus STR principaux ainsi que de l'amélogénine, avec des produits PCR de taille réduite par rapport à d'autres kits. Les caractéristiques de ce kit, les locus amplifiés, leurs emplacements chromosomiques et les colorants fluorescents correspondants sont répertoriés dans le tableau ci-dessous en plus les composants (Tab.5 ; Annexe 5). L'échelle allélique AmpFISTRMiniFiler™ est utilisée pour génotyper les échantillons analysés.

**Tableau .5.** Représente les STR utilisé dans le profilage

#### Les 8 loci de kit AmpFISTER MiniFiler

D21S11	D18S51	D13S317	D7S820	D16S539	D2S1338	CSF1PO	FGA	+ <b>Amelogenin multiplex ( lemarqueur déterminant le sexe )</b>
--------	--------	---------	--------	---------	---------	--------	-----	---

Ci-dessous un protocole opératoire simplifié pour la PCR :

1. Remplir le formulaire d'amplification.
2. Vortexer les tubes contenant l'ADN à amplifier ainsi que le "DNA control" du kit.
3. Vortexer doucement les différents réactifs de la PCR (Reaction mix, Primers), puis centrifuger brièvement pendant 3 à 5 secondes.
4. Calculer les volumes des différents réactifs nécessaires au mix en vous référant au tableau.
5. Préparer le mix dans un micro tube, vortexer et centrifuger.
6. Répartir 15 µl de ce mix dans chaque puits selon le plan de dépôt.
7. Ajouter dans chaque puits 10 µl de chaque échantillon, ainsi que le témoin positif "DNA control" du kit et le témoin négatif.
8. Recouvrir la plaque avec une feuille d'aluminium.
9. Placer la plaque dans le thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (AppliedBiosystems) et lancer le programme indiqué dans le tableau.

### 9.7 La post- PCR

Cette étape vise à dénaturer les deux brins d'ADN pour obtenir un brin simple en vue du séquençage par électrophorèse capillaire.

La formamide est ajoutée à chaque échantillon pour agir comme un agent intercalant entre les liaisons d'hydrogène, facilitant ainsi la séparation des brins. Cette technique est réalisée à l'aide du kit MiniFiler, qui comprend les éléments suivant :

LIZ (un standard de taille) : une molécule d'ADN de taille standard utilisée pour déterminer la taille de chaque fragment d'ADN en s'hybridant au brin d'ADN.

L'allèle Ladder : son rôle est d'attribuer les allèles pour obtenir un profil génétique.

- **Le protocole**
  - Calculer le volume nécessaire du Mix pour le nombre d'échantillons requis (Tab.6)
  - Préparer le Mix dans un tube Eppendorf.
  - Distribuez ensuite 9µl du mélange réactionnel dans les puits des échantillons et du Ladder.

- Ajouter 3µl de l'ADN amplifié.
- Placer 1,5µl du Ladder.
- Ajouter également 1,5µl de témoin positif et négatif collectés. Une fois ces étapes achevées, entourez la plaque d'un septa, puis placez-la dans le Thermobloc pendant 3 minutes à 95°C. Ensuite, pour stabiliser l'ADN en monobrin, soumettez-le à un choc thermique avant de le placer dans un cryobloc à une température de -20°C.

**Tableau 6.** les réactifs de la post-PCR

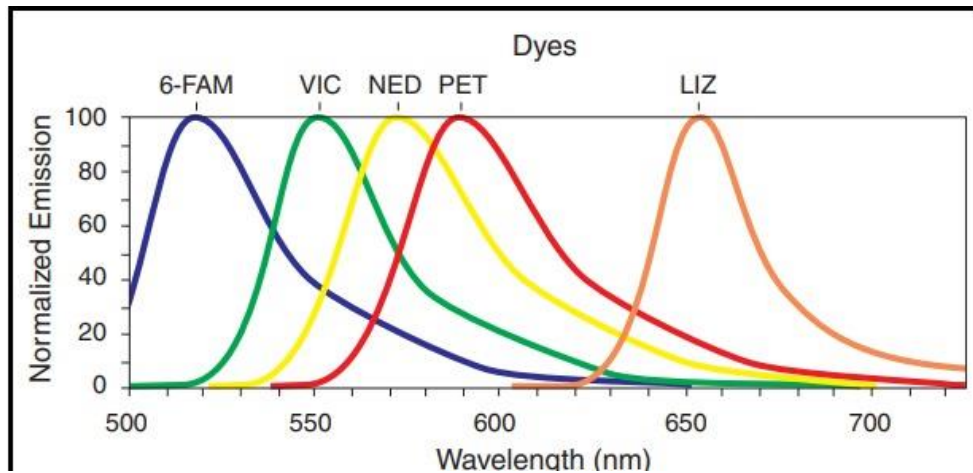
Réactif	Volume
Mélange réactionnel (formamide+ standard de taille liz600)	(8,5ul formamide+0,5ul ADN standard)=9ul
ADN amplifié	3ul
Ladder	1,5ul
Contrôles positifs et négatifs	1,5ul

### 9.8 Electrophorèse capillaire

Une fois l'ADN amplifié, les fragments sont examinés par électrophorèse capillaire.

**Principe de la méthode :** Durant l'électrophorèse capillaire, les produits d'amplification sont injectés dans un capillaire contenant le polymère POP1 (Performance optimizedpolymer 1). Sous l'influence d'un champ électrique, les fragments d'ADN se déplacent de la cathode vers l'anode. Les fluorochromes sont excités par un faisceau laser à argon qui émet une fluorescence particulière. (**Handbook AmpF!STR™ MiniFiler™**)

Les cinq fluorochromes présents dans le kit d'amplification sont les suivants : : le 6-FAM™, VIC™, NED™ et PET™, le cinquième est le LIZ™ pour le standard de taille (**Rao-Coticone et al., 2003**), Chaque marqueur fluorescent présente une émission maximale à une longueur d'onde précise. (Fig.13). Le colorant 6-FAM émet à la longueur d'onde la plus courte et est montré en bleu, suivi du colorant VIC (vert), NED (jaune), PET (rouge) et le LIZ (orange). Signaux fluorescents sont séparés par diffraction et projetés sur une camera CCD qui traduit la fluorescence en données numériques. Le logiciel effectuera l'analyse des données brutes.



**Figure 13.** Spectres d'émission des cinq colorants utilisés dans le kit MiniFiler .

(Handbook AmpF $\ell$ STR™ MiniFiler™)

### 9.9 Validation et récupération des profils d'ADN

Le profilage ADN, ou empreinte génétique, est une technique utilisée dans les enquêtes criminelles et les tests de paternité, permettant d'analyser la génétique individuelle. Il repose sur trois types de variations génétiques : les polymorphismes mononucléotidiques (SNP), les répétitions en tandem courtes (STR) et les variations de taille des fragments de restriction RFLP (Coquez.2013).

L'étude des indicateurs génétiques aboutit à un profil génétique distinctif, permettant ainsi d'identifier ou d'exclure un lien entre une trace biologique relevée sur une scène de crime et un suspect. Cependant, l'interprétation de ces profils peut être complexe pour les experts chargés des analyses génétiques, d'autant plus que plusieurs situations peuvent compliquer cette interprétation.

Les profils génétiques validés sont essentiels pour éliminer les artefacts d'analyse, ne conservant ainsi que les pics correspondant aux allèles présents dans la trace biologique. Une fois les impliquons marqués produits par PCR multiplex captés par la caméra et les données collectées par l'électrophorèse capillaire, le logiciel GeneMapper est utilisé pour lire les résultats. Ce logiciel effectue plusieurs étapes :

- L'assemblage des données,
- L'identification des pics,

- La détermination de la taille des molécules,
- La séparation par couleur (fluorochromes),
- La comparaison au ladder allélique
- L'assignation de la nomenclature de chaque allèle, validant ainsi les profils obtenus par l'analyste.

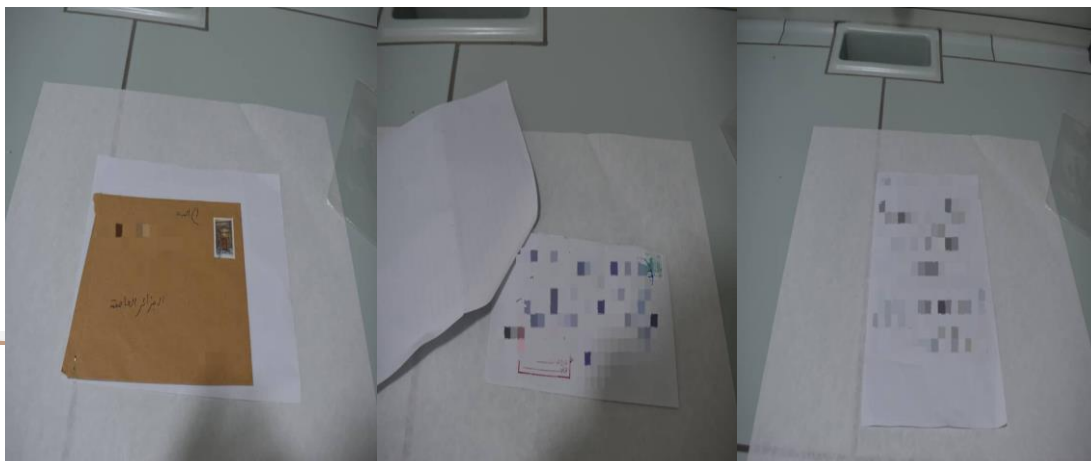
Après une électrophorèse capillaire, le profil d'ADN est analysé en examinant les données de fluorescence enregistrées par l'appareil. Ces données sont représentées sous forme de courbes ou de pics sur un graphique, indiquant l'intensité de la fluorescence en fonction du temps de migration ou de la taille des fragments d'ADN. Chaque pic correspond à un fragment d'ADN spécifique, avec sa propre longueur et son propre niveau de fluorescence. En comparant ces pics à des standards de taille d'ADN connus, il est possible de déterminer la taille des fragments d'ADN dans l'échantillon testé. De plus, en comparant les pics de fluorescence avec des données de référence, les différents allèles présents dans l'échantillon peuvent être identifiés, permettant ainsi de générer un profil génétique précis.

#### **10 Les timbres et les rabats d'enveloppes sont désormais des échantillons très prisés. S'ils ont été léchés, il est possible d'effectuer une analyse d'ADN, même plusieurs mois voire Etude des affaires réelles**

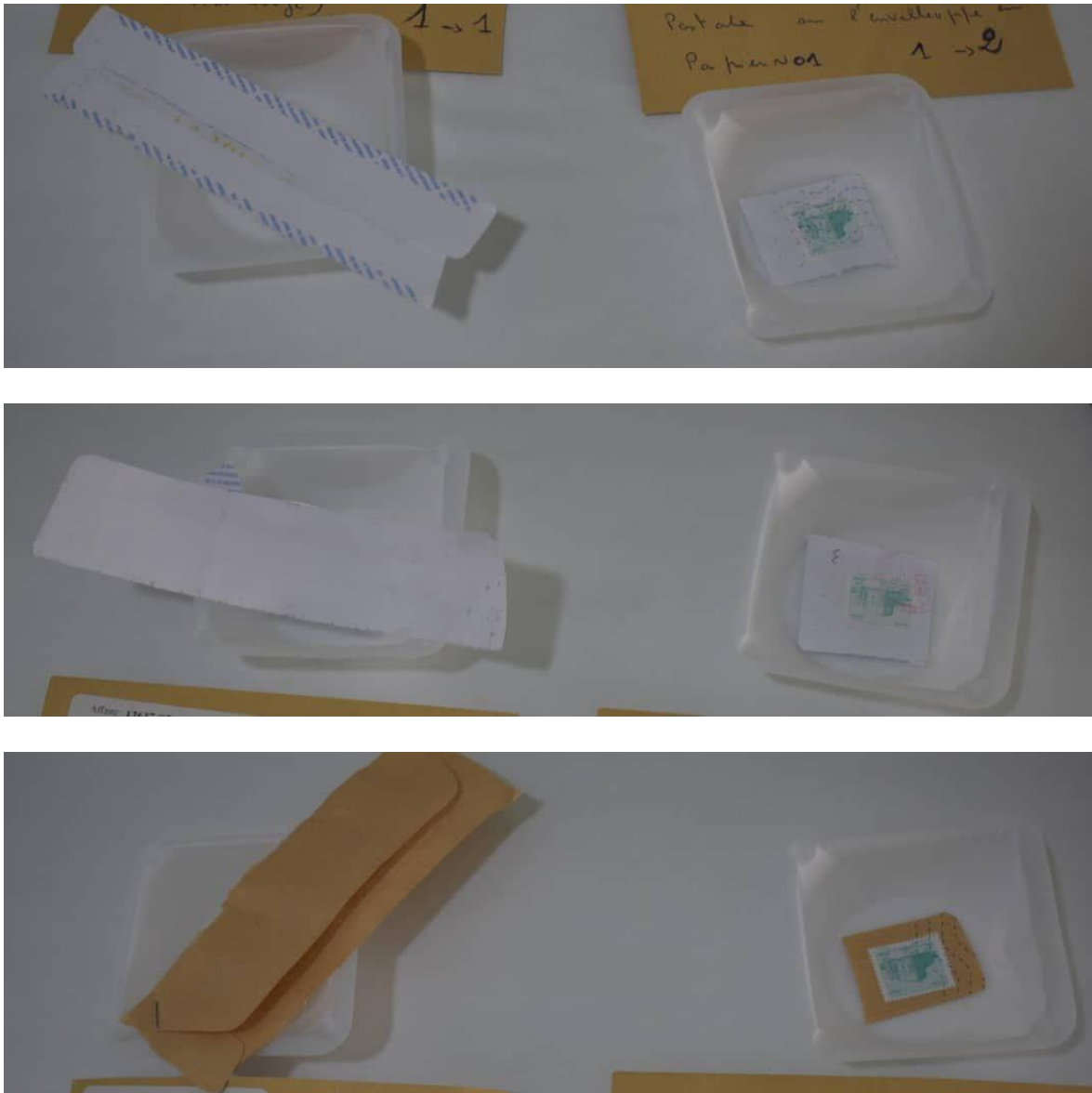
Nous avons suivi deux affaires réelles qui illustrent l'intérêt de la méthode de détection avec le test Phadebas amylase en criminalistique qui compose de 2 timbres et 2 rabats obtenus à partir des lettres de menaces anonymes (fig.14)., et la deuxième affaire contenant quatre enveloppes postales, quatre timbres-postes et une paire de gants en plastique blanc

années plus tard (**Ka-Man Pun et al.2008**).

#### **Affaire réelle 1 :**



## Affaire réelle 2 :



**Figure 14.** lettres anonymes reçues au laboratoire lié à des affaires criminelles réelles.

## *Chapitre III*

---

---

### *Résultats & Discussions*

---

---

## 11 Les résultats de la validation

La validation du test Phadebas pour la détection de l'alpha amylase est cruciale pour assurer la fiabilité et la précision des résultats. Divers paramètres tels que la répétabilité, la sensibilité, la reproductibilité, la spécificité et la cross-contamination ont été étudiés afin de valider cette méthode. Cette discussion analyse les résultats obtenus pour chacun de ces paramètres.

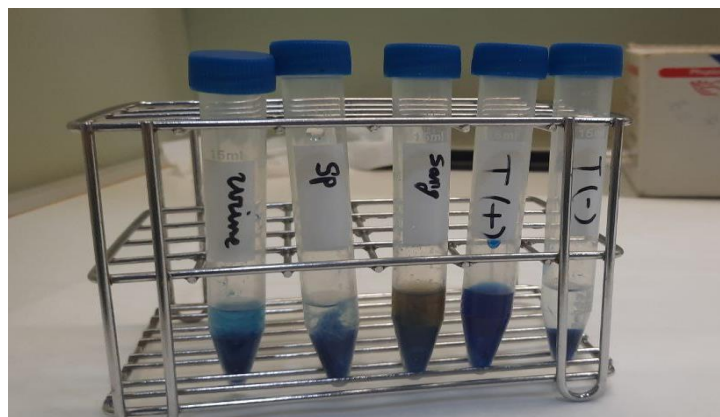
Les résultats des paramètres d'évaluation du test Phadebas, ainsi que leur interprétation, sont présentés comme suit :

### 11.1 Spécificité de test Phadebas aux traces salivaires

En comparant la spécificité du test Phadebas pour les traces salivaires avec d'autres fluides biologiques, on constate que le test est très positif pour la salive (couleur bleu), faiblement positif pour les urines (bleu clair), et négatif pour le sperme et la sueur (transparent) (Tab 7, Fig.15)

**Tableau 7.** Les résultats de spécificité

Échantillons	Réaction avec Phadebas /coloration de surnagent	Résultats
Salive	Bleu	Positive
Urine	Bleu Claire	Faiblement positive
Sperme	Transparent	Negative
Sueur	Transparent	Negative



**Figure 15.** Les résultats d'étude des performances du test Phadebas amylase sur différents fluides corporels

Le test Phadebas amylose, largement dépendant de l'activité de l'amylose salivaire, démontre une forte réaction positive dans la salive avec la formation d'un surnageant bleu. Le comprimé Phadebas, composé d'un polymère insoluble d'amidon associé à un chromophore bleu, agit comme substrat pour l'amylose. Lorsque ce substrat est hydrolysé par l'amylose, il libère des fragments solubles marqués par le colorant bleu qui se retrouvent dans le surnageant.

L'urine présente une activité amylose modérée mais comparable à celle de la salive diluée avec un surnageant bleu pâle. Cette observation s'explique par la présence de deux types d'alpha-amylose pancréatique et salivaire **(Nater et al., 2009)**.

L'alpha-amylose a longtemps été considérée comme un composant normal de l'urine humaine, mais l'amylose salivaire est 2,5 fois plus active sur le plan catalytique que les enzymes pancréatiques. **(Lorentz, 1982)**.

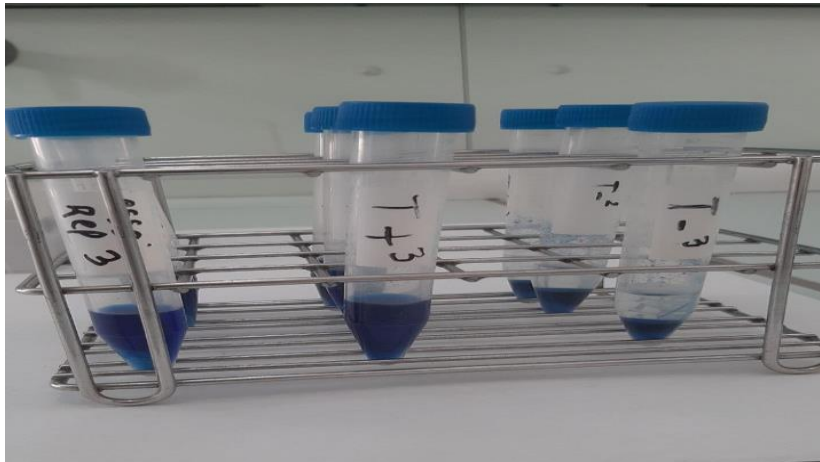
La présence d'activité amylosique est courante dans divers fluides corporels humains, souvent constituée d'un mélange d'amylose pancréatique et salivaire. Notamment, la salive humaine affiche une activité amylosique particulièrement élevée. **(Kipps et Whitehead, 1975) (Merritt et Karn, 1977)**.

Cependant la négativité du test envers d'autres fluides (sang, sperme, sueur) s'explique par l'absence de l'enzyme dans ces derniers. L'enzyme alpha amylose se trouve dans des liquides biologiques autres que la salive, mais rarement à des concentrations aussi élevées. **(Willott, 1974)**. Par ailleurs, il faut signaler que le test Phadebas amylose ne se limite pas à la salive car tout fluide ou support démontrant une activité d'hydrolyse de l'amidon produit un résultat positif.

La méthode du colorant à l'amidon ne réagit que lorsque l'amidon est hydrolysé, libérant un colorant bleu dans le surnageant, évitant ainsi les faux positifs. La densité optique du liquide est un indicateur de l'activité alpha-amylose **(Willott et al., 1980)**.

### 11.2 Répétabilité

Après trois répétitions réalisées par le même opérateur sous des conditions expérimentales constantes, comprenant les mêmes réactifs, échantillons, instruments et dilutions, les résultats obtenus ont démontré une cohérence conforme à nos attentes (fig.16).



**Figure 16.** Photographie des résultats de répétabilité

- L'échantillon a montré un résultat positif avec un surnageant bleu, indiquant la présence de salive.
- Le témoin positif a également produit un surnageant bleu, signe de la présence de salive.
- Le témoin négatif a donné un résultat négatif avec un surnageant transparent, expliqué par l'absence de salive.

Les analyses répétées d'un même échantillon par le même opérateur n'ont montré aucune variation des résultats, indiquant une bonne répétabilité. Les écarts types des mesures étaient faibles, ce qui atteste de la précision de la méthode lorsqu'elle est réalisée sous des conditions contrôlées et répétées.

Ces ainsi résultats confirment visuellement la précision des mesures effectuées. La faible variation observée confirme que le test Phadebas est fiable et précis pour des analyses répétées dans des conditions identiques. Cela suggère que le test peut être utilisé de manière consistante par le même opérateur.

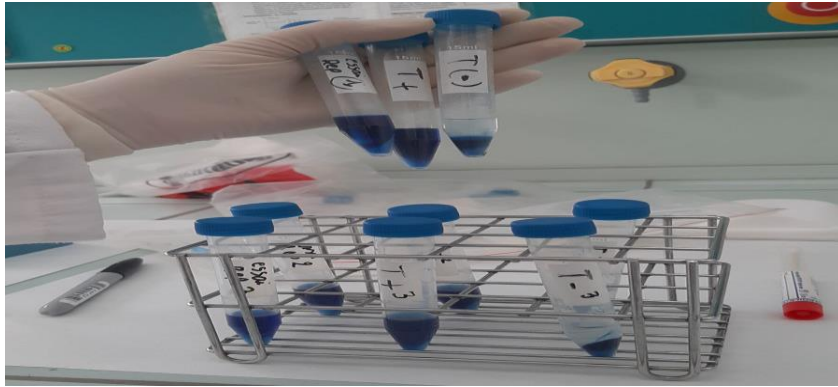
### 11.3 Reproductibilité

L'objectif était d'évaluer les variations des résultats obtenus dans des conditions expérimentales différentes, impliquant divers opérateurs, appareils et jours. Après avoir répété cette étape trois fois avec des opérateurs différents, Les résultats obtenus étaient en accord avec nos prévisions (fig.17):

- Les échantillons et les témoins positifs ont tous présenté un surnageant bleu, indiquant la présence de salive.

- En revanche, les témoins négatifs a donné un résultat négatif avec un surnageant transparent, signifiant l'absence de salive.

La bonne reproductibilité des résultats suggère que le test Phadebas est robuste et peut être utilisé de manière fiable dans différents laboratoires et par différents utilisateurs.

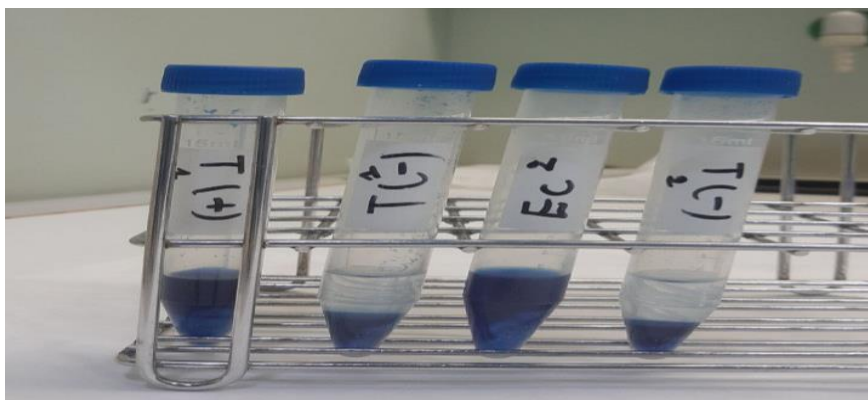


**Figure 17.** Photographie présentant les résultats de la reproductibilité.

#### 11.4 Cross-contamination

Pour évaluer le risque de contamination croisée lors des analyses et assurer des conditions de travail sans contamination, nous effectuons des tests de contrôle négatifs pour chaque échantillon et témoin positif analysé. Ces contrôles excluent tout échantillon de salive et permettent de confirmer que les analyses sont réalisées dans des conditions optimales.

Les échantillons et témoins positifs contenant de la salive produisent un surnageant bleu intense, tandis que les témoins négatifs donnent un surnageant transparent, indiquant un résultat négatif (Fig.18).



**Figure 18.** Photographie des résultats de cross contamination

Les tests de contrôles négatifs n'ont montré aucune contamination, et les protocoles de travail ont été validés. Aucune contamination croisée n'a été détectée, ce qui assure l'intégrité des échantillons et des résultats.

Les résultats valident l'absence de contamination croisée. L'absence de contamination croisée confirme que les pratiques de laboratoire sont adéquates pour prévenir les contaminations, assurant ainsi la fiabilité des résultats. Des mesures strictes de contrôle de contamination sont essentielles pour maintenir des standards élevés de qualité dans les analyses.

### 11.5 Évaluation de la Sensibilité

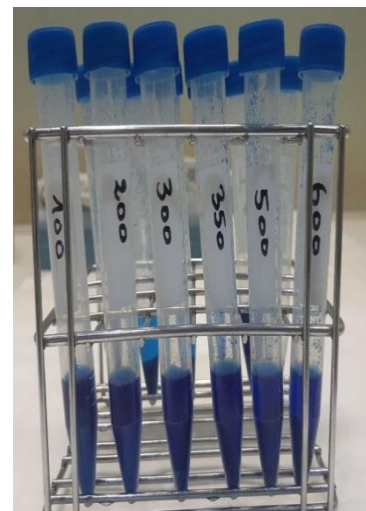
Dans cette phase, nous avons procédé à l'évaluation et à la détermination des " seuils de sensibilité" du test Phadebas en manipulant les dilutions.

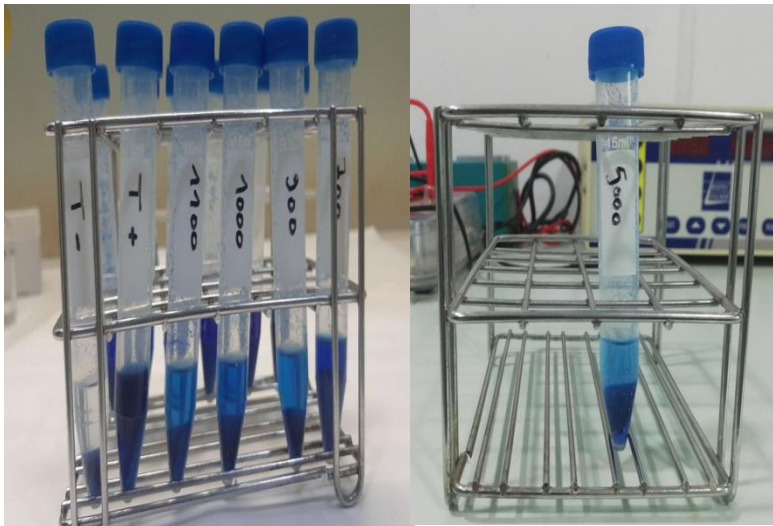
Les résultats indiquent que le test conserve sa sensibilité avec les dilutions suivantes :

1/100, 1/200, 1/300, 1/350, 1/500, 1/600, 1/700, 1/900, 1/1000, 1/1100, et 1/5000.

Toutes les dilutions présentant des variations dans l'intensité de la coloration bleue positive en fonction du degré de dilution (Fig.19 ; Tab.8).

- Les sept premières dilutions affichent une coloration bleue intense, attribuable à une forte concentration d'alpha-amylase et à une faible dilution.
- En revanche, les trois dernières montrent une coloration bleue plus claire, due à une faible concentration d'alpha-amylase et à une dilution plus importante.
- Le témoin négatif est toujours inclus afin de garantir l'efficacité et le bon fonctionnement du test, ainsi que le bon déroulement du processus d'analyse, fournissant systématiquement un résultat négatif.





**Figure 19.** Des photographies illustrant les réactions de Phadebas à différentes dilutions

**Tableau 8.** Résultats de paramètre de sensibilité avec les dilutions

Dilutions	1/100	1/200	1/300	1/350	1/500	1/600	1/700	1/900	1/1000	1/1100	1/5000
Résultats	P	P	P	P	P	P	P	FP	FP	FP	FP

\*P : Positif

\*FP : Faiblement Positif

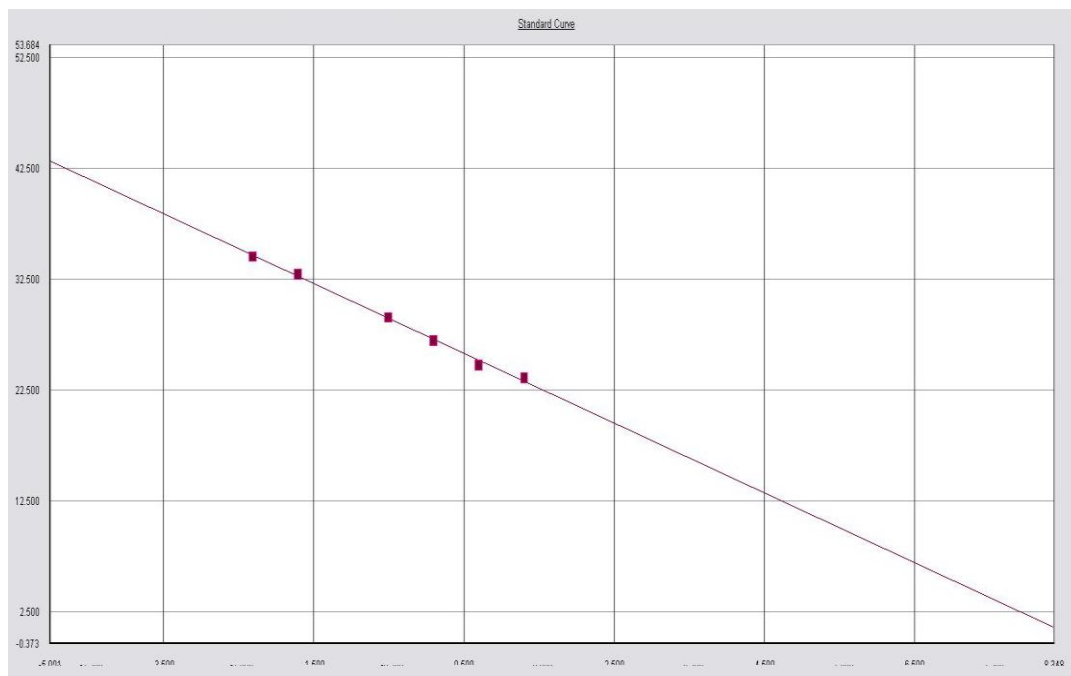
Il est observé que la sensibilité de l'alpha-amylase Phadebas varie en fonction des variations du taux de dilution, en lien avec l'activité de l'alpha-amylase dans l'échantillon dilué. L'étude menée par **Idris et Goodwin (2022)** a démontré que le test Phadebas était le plus sensible à une dilution de 1/900. Cependant, les résultats étaient légèrement positifs avec une dilution de 1/1000.

## 12 L'estimation de la quantité d'ADN à partir des extractions réalisées à partir de salive

Après avoir analysé les échantillons, nous avons détecté la présence d'alpha-amylase et par conséquent la salive. Ensuite, l'ADN a été quantifié pour évaluer son rendement, afin de déterminer les conditions idéales d'amplification (nombre de cycles PCR et volume d'extrait à amplifier) pour obtenir un profil génétique optimal.

En effet, une quantité d'extrait amplifiée trop importante pourrait saturer le signal de l'électrophorèse, rendant la lecture du profil difficile, tandis qu'une quantité d'ADN insuffisante pourrait empêcher l'obtention d'un profil complet.

La figure 20 représente la courbe standard tracée en utilisant le Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN. Dans notre recherche, la ligne obtenue affiche une pente (P) de -3,148624, une valeur valide puisqu'elle se situe dans l'intervalle recommandé [-2,9, -3,33], avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,98 ( $R^2 = 0,996447$ ) et une ordonnée à l'origine de 27,400944, conforme aux directives d'Applied Biosystem .



**Figure 20.** Courbe standard tracée à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN dans les différentes dilutions

### 13 Quantification d'ADN

Les quantités d'ADN présentes dans chaque échantillon ont été déterminées afin d'évaluer les dilutions requises pour l'amplification par PCR. Le tableau 9 affiche les résultats de la quantification par le qPCR.

**Tableau 9.** Les données de quantification issues de l'analyse des courbes de qPCR

Taux de dilution	Quantité d'ADN ng / $\mu$ L
Solution mere	7.73245

1/100	0.359411
1/200	0.172549
1/300	0.030794
1/350	0.105227
1/500	0.0535891
1/600	0.097079
1/700	0.0620523
1/900	0.0238669
1/1000	0.0166634
1/1100	0.023946
1/5000	Indétectable
T+	50
T-	0

#### 14 Génotypage de l'ADN par STR's

Après avoir analysé le polymorphisme des STR nous avons procédé au profilage STRs en utilisant le kit AmpFISTERMiniFiler. Ce kit est équipé de huit marqueurs autosomiques ainsi que de marqueurs pour l'amélogénine, ce qui lui confère une efficacité accrue dans l'analyse des échantillons d'ADN.

Les données issues de l'électrophorèse capillaire sont transférées au logiciel de lecture de résultats "GeneMapper™", qui a été utilisé pour traiter les données générées. Les résultats se présentent sous forme de profils, chacun contenant plusieurs pics correspondant aux allèles détectés, identifiés par leur spectre de longueur d'onde.

Chaque pic représente un marqueur STR avec une hauteur de pic associée à une unité de fluorescence relative (RFU) et une taille exprimée en paires de bases par rapport à un standard de taille dépendant de la vitesse de migration.

Une échelle allélique regroupe tous les allèles connus ou du moins les plus fréquents pour chaque STR, co-migre avec les échantillons et permet de caractériser ces fragments en termes de nombre de répétitions du motif STR.

La position des pics colorés correspond à la taille des fragments d'ADN mentionnée au-dessus de chaque série de pics en paires de bases.

Les traits gris, appelés "Bins", ont pour but d'attribuer à chaque fragment d'ADN d'intérêt ou STR un numéro allélique, Chaque marqueur symbolise une forme allélique dans le cas d'un sujet homozygote héritant le même allèle avec un nombre identique de STR, ou deux

formes alléliques indiquant la présence d'une personne hétérozygote avec un nombre variable de répétitions héritées de ses parents .

Le profilage génétique commence par déterminer l'homozygotie ou l'hétérozygotie d'allèles individuels en observant des pics sur l'électrophérogramme. En effet, un seul pic correspond à un individu homozygote, c'est-à-dire qu'il possède le même allèle que le gène marqueur. En revanche, deux pics signifient que l'individu est hétérozygote.

Le ladder offre la possibilité d'étalonner chaque série. L'ajout de l'étalon à chaque série est nécessaire, car chaque nouvelle analyse peut avoir un comportement électrophorétique différent. Le profil obtenu par le ladder est complet, indiquant la présence de tous les marqueurs (Fig.21).

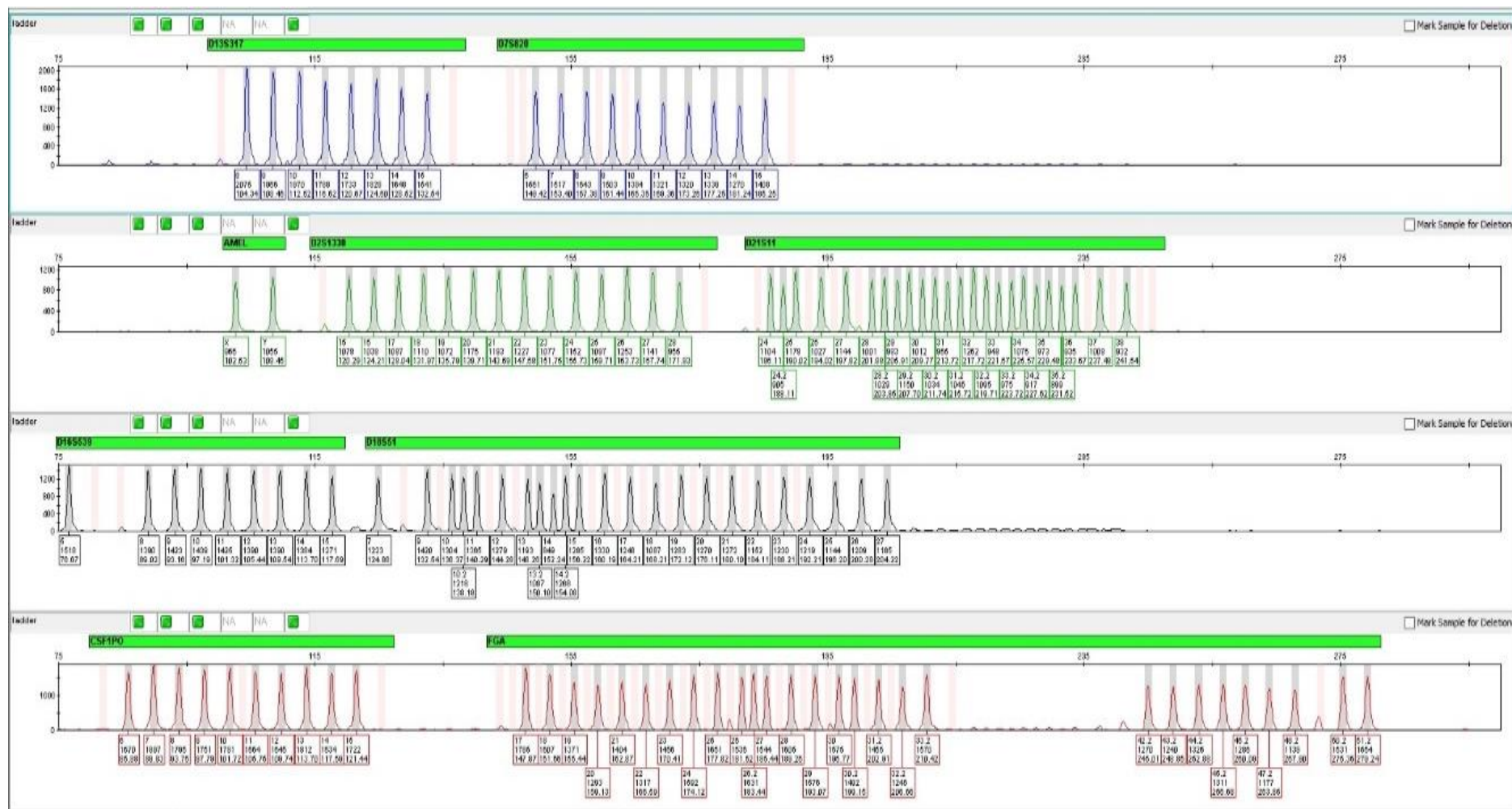
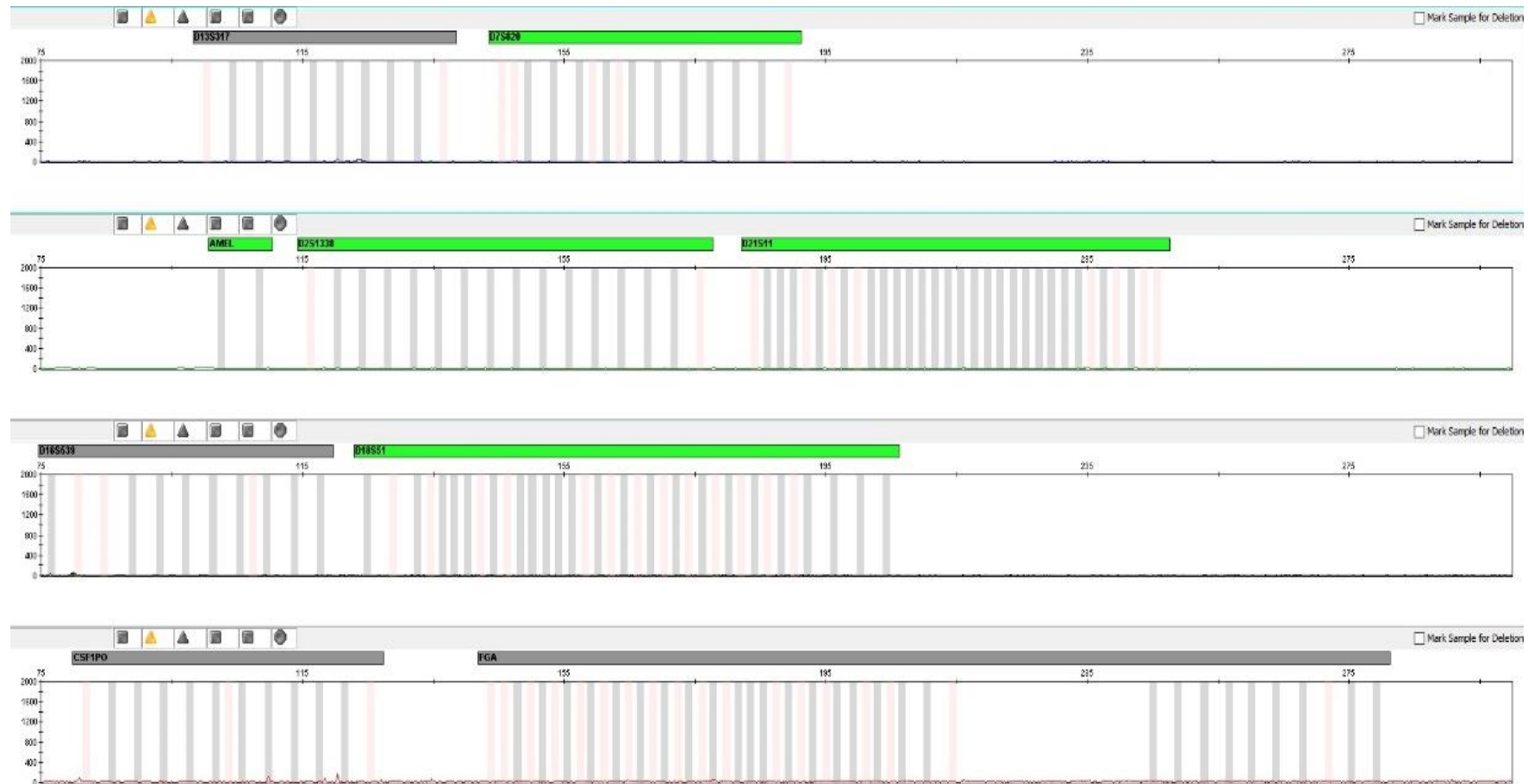


Figure 21. Tracé du logiciel Gene Mapper de Ladder allélique AmpFISTER MiniFiler.



**Figure 22.** Le profil obtenu avec le témoin négatif

Un contrôle positif assure le bon fonctionnement du processus d'analyse. Il vérifie également que les procédures de reconnaissance des allèles sont efficaces et que les allèles détectés dans un profil ADN sont correctement nommés. Par conséquent, le profil du contrôle positif doit être connu (Fig.23)

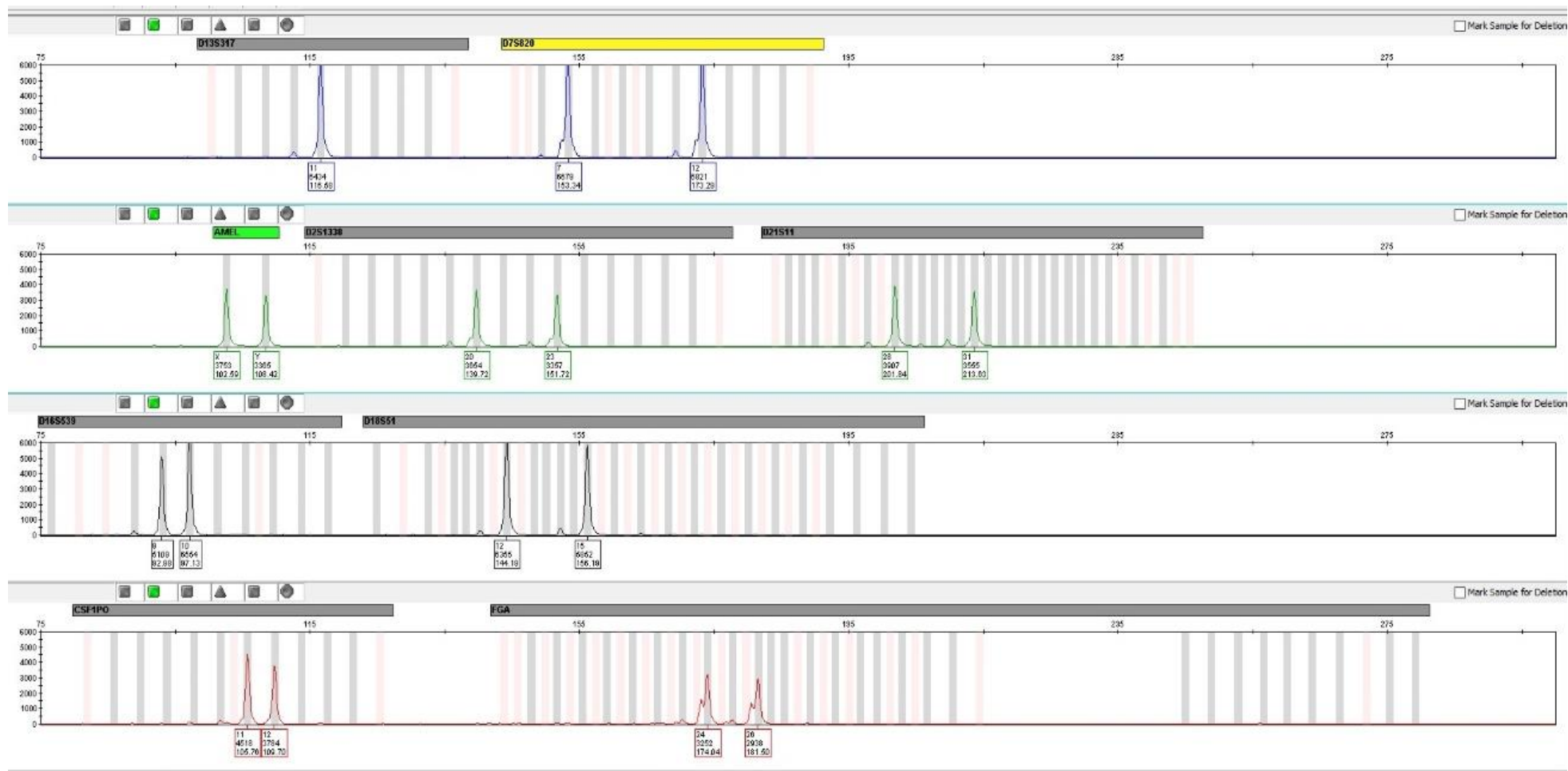


Figure 23. Le profil obtenu avec le témoin positif

Nous avons réussi à obtenir des profils génétiques complets et interprétables à partir des dilutions (1/200, 1/700, 1/1100) avec 8 marqueurs.

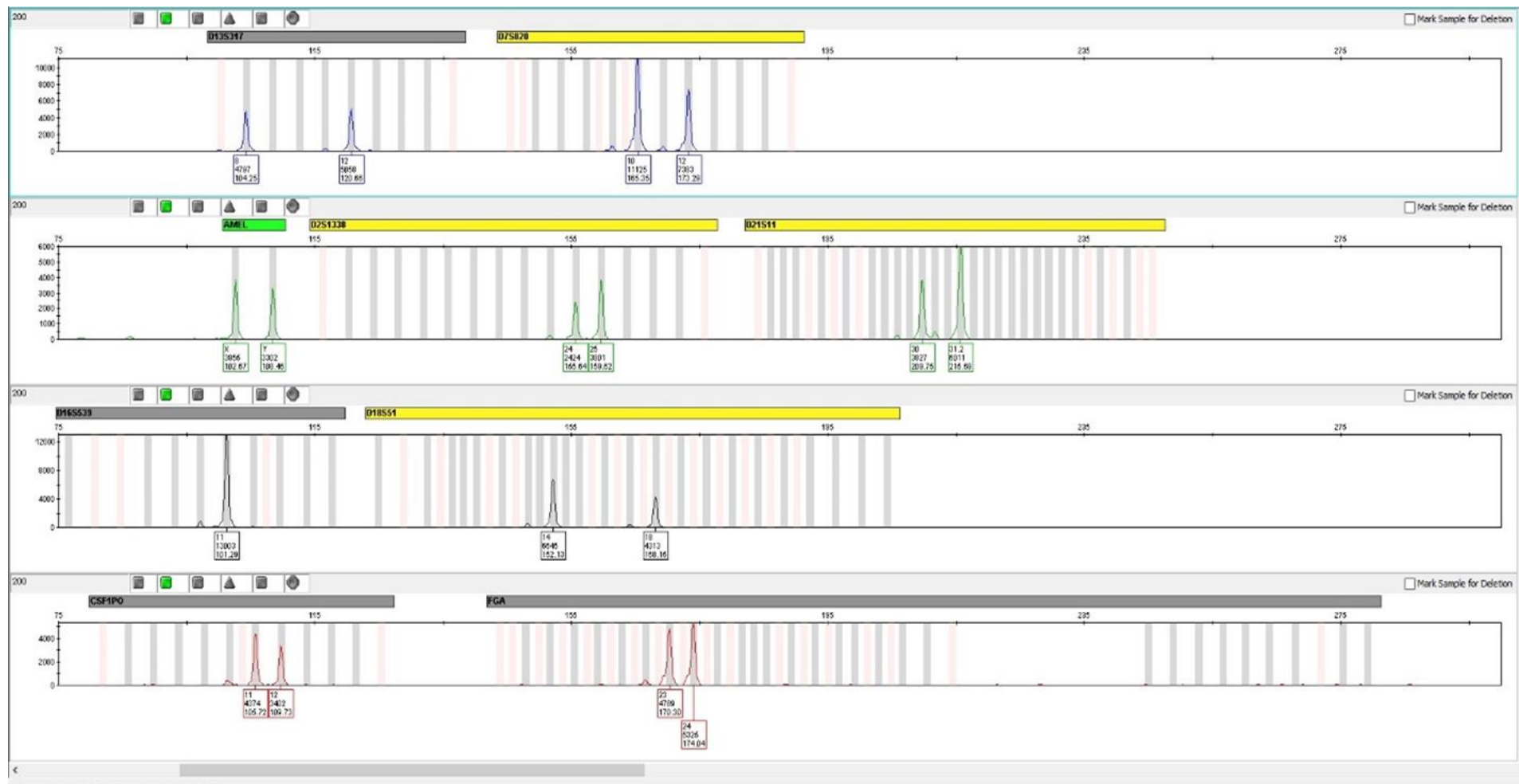


Figure 24. Profil génétique complet, résultant d'une dilution de 1/200 de la salive établi grâce au kit AmpFISTER MiniFiler.



Figure 25. Profil génétique complet, résultant d'une dilution de 1/700 de la salive établi grâce au kit AmpFISTER MiniFiler

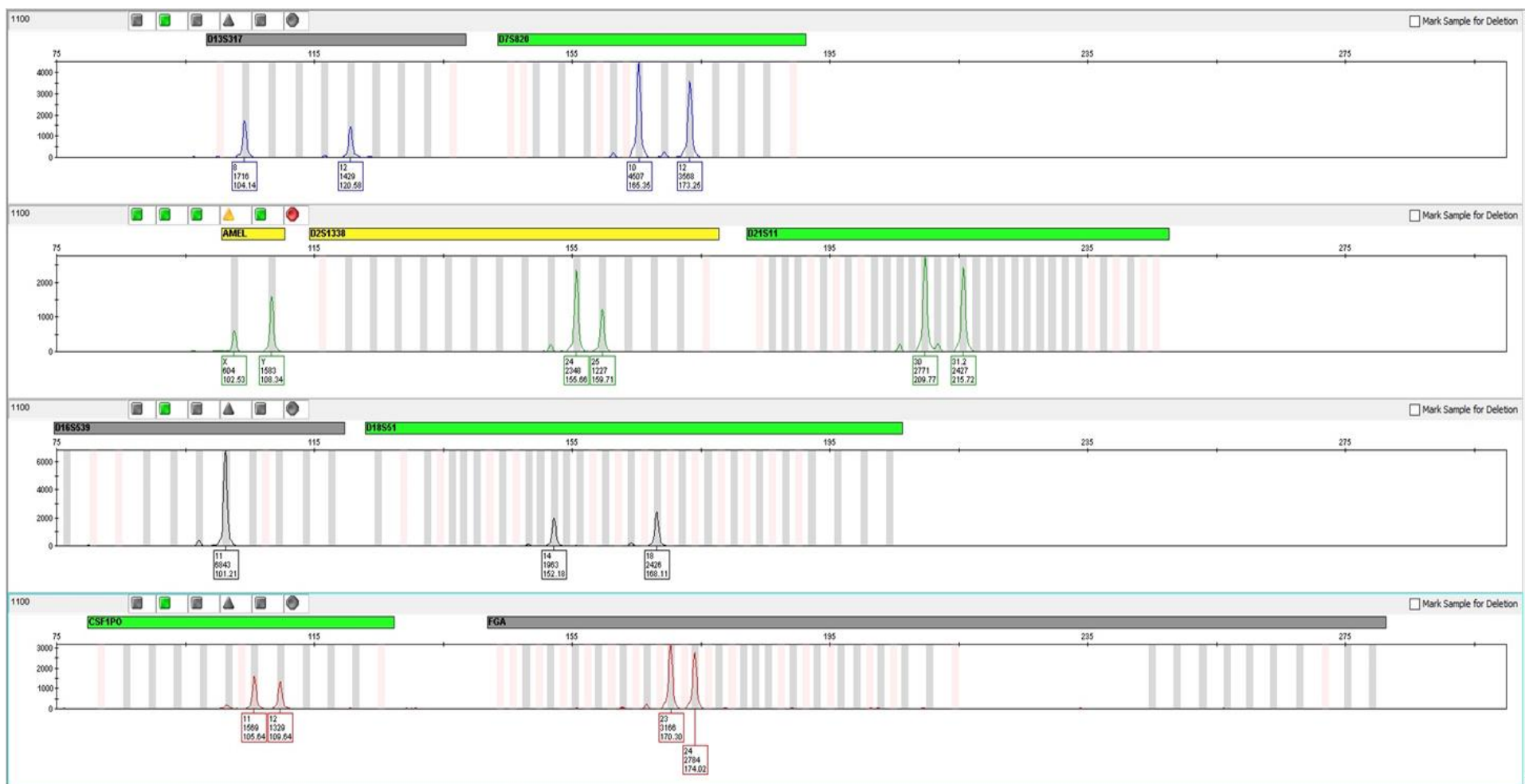
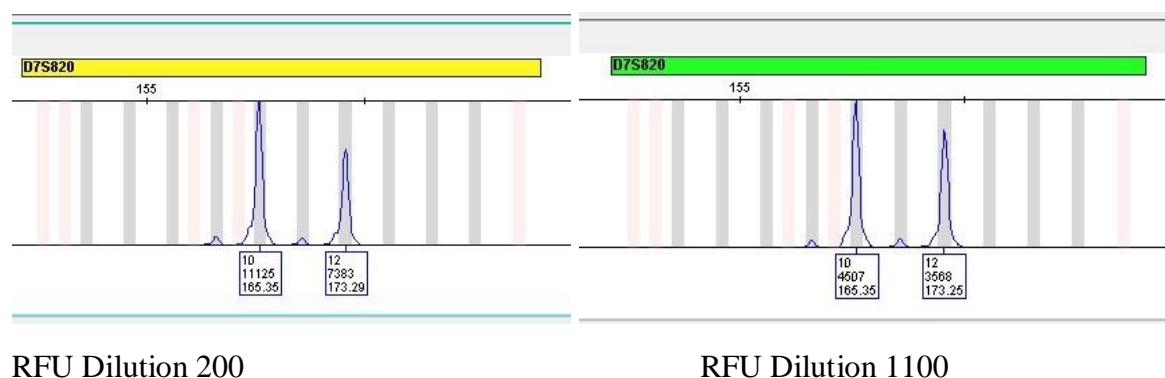


Figure 26. Profil génétique complet, résultant d'une dilution de 1/1100 de la salive établi grâce au kit AmpFISTER MiniFiler.

La concentration en ADN du contrôle positif étant connue, il permet de confirmer que les méthodes d'analyse atteignent la sensibilité requise. La présence de tous les STR analysés dans le profil obtenu avec le témoin positif de la PCR confirme le bon déroulement de la réaction de polymérisation en chaîne (fig.23).

Le témoin positif du test indique l'absence des pics orange correspondant au standard de taille LIZ, ainsi que l'absence de toute trace de contamination.



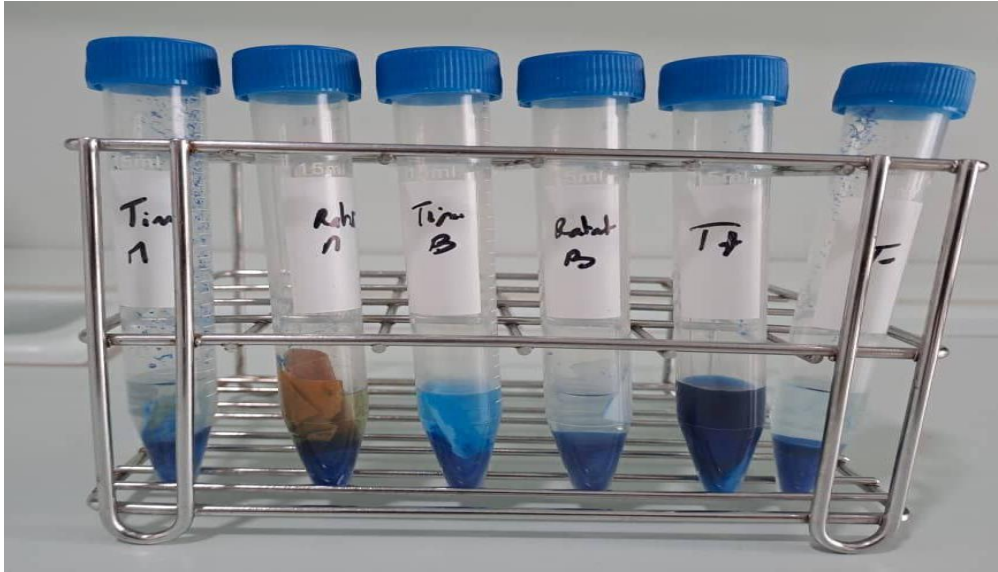
**Figure 27.** Comparaison des RFU pour des taux de dilution de 200 et de 1100 utilisant le même marqueur.

En comparant les RFU du marqueur D7S820 pour des taux de dilution de 200 et 1100, les résultats obtenus montrent que pour une dilution de 200, les RFU étaient de 11 125 et 7 383, tandis que pour une dilution de 1100, ils étaient de 4 507 et 3 568. À chaque augmentation du taux de dilution, une diminution significative des RFU a été observée, indiquant une corrélation inverse entre le taux de dilution et l'intensité des signaux détectés.

## 15 Etude d'une affaire réelle

### 15.1 Première Affaire

Après avoir analysé l'échantillon de scellé reçu au laboratoire (composé de 2 timbres et 2 rabats), qui s'est avéré faiblement positif au test Phadebas pour la recherche d'alpha-amylase avec le timbre B, démontrant ainsi que ce timbre a été léché et donc qu'il y a présence de salive, il est désormais possible de procéder à l'analyse de l'ADN et à l'établissement du profil génétique (Fig.28).



**Figure 28.** Les résultats issus de l'analyse d'une affaire réelle utilisant le test Phadebas

La quantité d'ADN présente dans le timbre B, ayant donné un résultat positif avec Phadebas, était trop faible pour permettre la poursuite des techniques moléculaires d'établissement d'empreintes génétiques, rendant impossible la continuation de l'analyse de l'ADN.

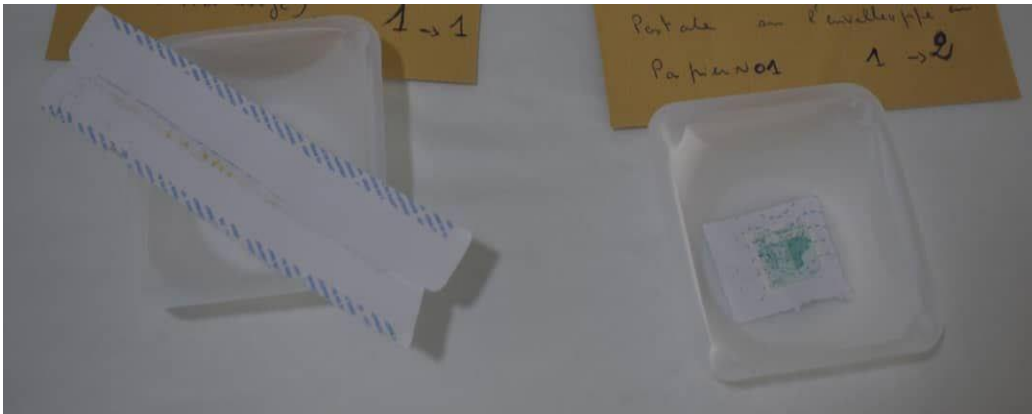
L'échantillon B ne contient pas suffisamment d'ADN pour poursuivre les techniques moléculaires d'établissement d'empreintes génétiques. Par conséquent, une analyse STR n'est pas possible car la quantité nécessaire pour la PCR doit être entre 0,01 et 0,19 ng/ $\mu$ L, ce qui ne peut pas être obtenu.

## 15.2 Deuxième affaire

Un autre cas réel a été examiné à l'aide de la méthode Phadebas, L'échantillon scellé reçu au laboratoire comprenait quatre morceaux de quatre enveloppes postales, quatre timbres-poste et une paire de gants en plastique blanc, Une analyse ADN a été réalisée pour extraire une empreinte génétique.

### 15.2.1 Résultat de phadebas

Les échantillons scellés reçus au laboratoire et les résultats de test Phadebas sont comme suit :

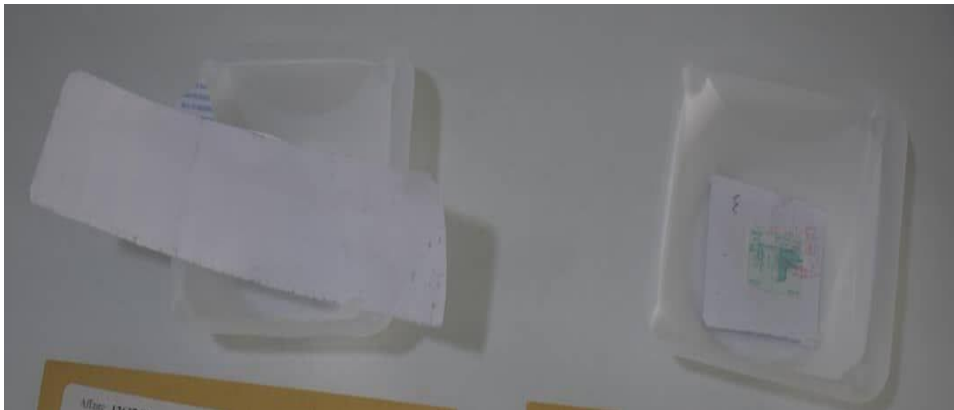
**Scellé 1 :**

**01-01 :** Prélèvement d'un morceau sur l'enveloppe en papier scellé n°01 (la partie adhésive).

- Phadebas donne un résultat négatif (surnageant transparent) indiquant **l'absence de salive.**

**01-02 :** Prélèvement d'un timbre postal sur l'enveloppe en papier scellé n°01.

- Le test Phadebas montre une détection de salive avec un **résultat positif** (le timbre a été léché)

**Scellé 2 :**

**02-01 :** Prélèvement d'un morceau sur l'enveloppe en papier scellé n°02 (la partie adhésive)

**02-02 :** Prélèvement d'un timbre postal sur l'enveloppe en papier scellé n°02

- **Les deux échantillons testés avec Phadebas montrent une absence de salive.**

**Scellé 3 :**

03-01 : Prélèvement d'un morceau sur l'enveloppe en papier scellé n°03 (la partie adhésive).

- Phadebas donne un résultat négatif (surnageant transparent) indiquant **l'absence de salive**.

03-02 : Prélèvement d'un timbre postal sur l'enveloppe en papier scellé n°03.

- Le test Phadebas montre une détection de salive avec un **résultat positif** (le timbre a été léché).

**Scellé 4 :**

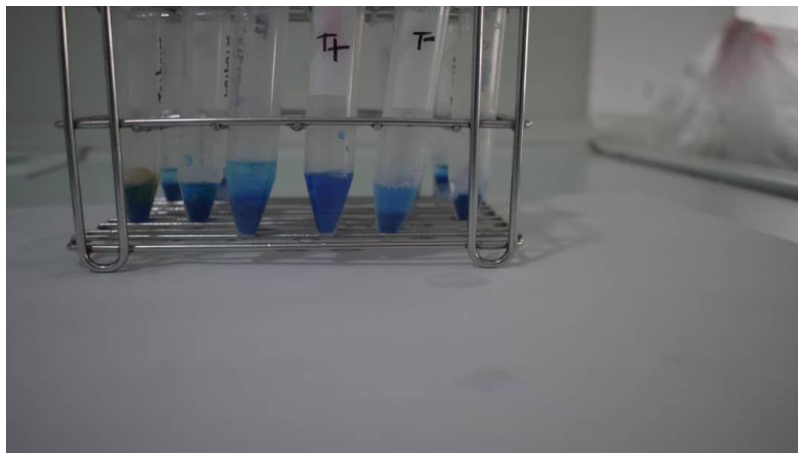
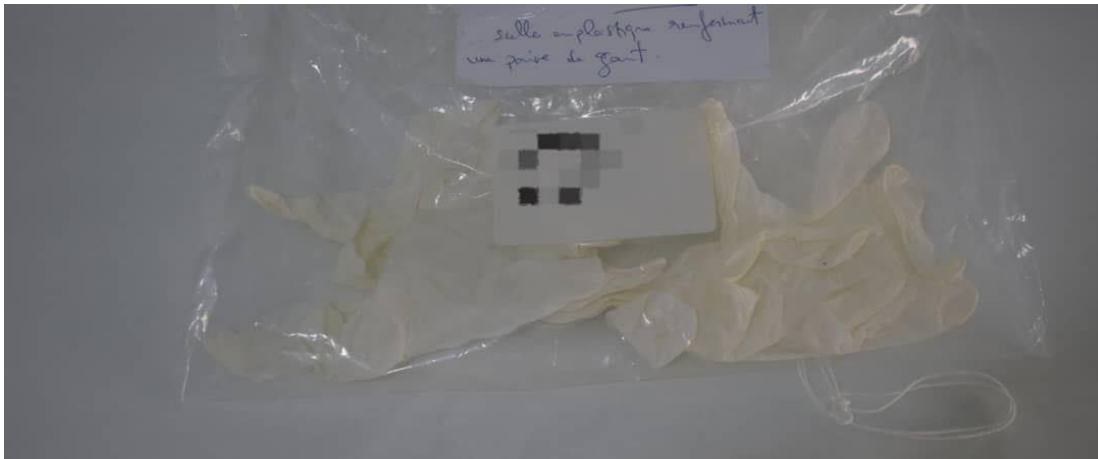
04-01 : Prélèvement d'un morceau sur l'enveloppe en papier scellé n°04 (la partie adhésive).

- Le résultat du test Phadebas est **positif** lorsque le rabat de l'enveloppe présente des traces de salive.

04-02 : Prélèvement d'un timbre postal sur l'enveloppe en papier scellé n°04

- Le test Phadebas montre une détection de salive avec un **résultat positif** (le timbre a été léché).

**Scellé 5 :** Un scellé en plastique contenant une paire de gants



**Figure 28.** Les résultats issus de l'analyse de la deuxième affaire réelle utilisant le test Phadebas.

**Tableau 10.** La quantité d'ADN obtenu avec le cas réel 2.

Scellés n°	Quantité d'ADN humain obtenu en ng/µl	Résultats
Scellé 1	0,07	Une quantité optimale d'ADN, il est possible de déterminer le profil génétique du suspect.
Scellé 2	0,05	Une quantité optimale d'ADN, il est possible de déterminer le profil génétique du suspect.
Scellé 3	0,04	Une quantité optimale d'ADN, il est possible de déterminer le profil génétique du suspect.

<b>Scellé 4</b>	0,1	Une quantité optimale d'ADN, il est possible de déterminer le profil génétique du suspect.
<b>Scellé 5</b>	0,0001	La quantité d'ADN est tellement faible qu'elle atteint la limite inférieure des valeurs recommandées, rendant l'établissement du profil impossible.

### 15.2.2 Les résultats des profils obtenus de 2<sup>ème</sup> affaire

Après avoir analysé le polymorphisme des STR nous avons procédé au profilage STRs en utilisant le kit AmpFISTERMiniFiler, Étant donné qu'il s'agit d'une affaire en cours et que nous n'avons pas le droit de divulguer le profil génétique des personnes impliquées, nous avons présenté le profil génétique sous forme de tableau. Il est important de respecter la confidentialité des données génétiques pour protéger la vie privée des individus concernés.

Les loci ont montré :

#### ➤ Echantillon 01-02.

D13S317	D7S820	AMEL	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF11PO	FGA
,	,	,	,	,	,	,	,	,

Aucun profil génétique n'a été obtenu à partir de cette empreinte scellée.

#### ➤ Echantillon03-02.

Un profil clair, complet et interprétable d'un individu de sexe masculin (XY) a été établi.

D13S31	D7S82	AME	D2S133	D21S1	D16S53	D18S5	CSF11P	FG
7	0	L	8	1	9	1	O	A
9,10	9,11	X,Y	19,23	29	12,13	12,16	10,12	23,24

#### ➤ Echantillon 04-01.

Un profil partiel inexploitable a été obtenu à partir de cette empreinte scellée.

D13S317	D7S820	AMEL	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF11PO	FGA
,	,	X y	,	,	,	,	,	,

#### ➤ Echantillon 04-02.

Un profil partiel inexploitable a été obtenu à partir de cette empreinte scellée.

D13S317	D7S820	AMEL	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF11PO	FGA
,	,	,	,	,	8,56	,	,	,

Les profils génétiques qui n'ont pas été obtenus ou qui se sont révélés partiels et inexploitable peuvent être le résultat de la dégradation de l'ADN. Même en présence d'une quantité suffisante d'ADN, cette dégradation peut rendre les échantillons moins stables et plus difficiles à analyser, ce qui compromet l'obtention de résultats précis. La dégradation de l'ADN altère la qualité des échantillons, affectant ainsi la fiabilité et la précision des analyses génétiques.

### Discussion générale

Il est souvent crucial de repérer et d'identifier la salive sur une scène de crime ou sur une pièce à conviction afin de déterminer une présence physique ou une interaction, ainsi que de déduire des actions spécifiques. Le test Phadebas est particulièrement recommandé pour la détection des traces de salive. Cette étude propose une analyse détaillée des résultats de la validation de cet outil. En examinant de près les performances du test Phadebas, cette recherche met en lumière sa fiabilité, sa sensibilité et sa spécificité dans différentes conditions expérimentales.

Nos résultats de validation de ce test démontre une forte spécificité de test phadebas avec les échantillons de salive ce qui va dans le même sens avec les conclusions de l'étude de **Johannes Hedman et al. (2011)** sur l'évaluation du test à l'amylase en tant qu'outil de dépistage des traces de salive sur les scènes de crime. Cette étude a utilisé le papier Phadebas Forensic Press et a obtenu des résultats positifs pour toutes les taches de salive testées.

Une autre étude, menée par **Wornesa** et ses collègues en **2018** portait sur l'évaluation et la validation du papier Phadebas en tant qu'outil présumé pour détecter la salive sur les pièces à conviction criminelles. Ils ont analysé plusieurs aspects, dont la sensibilité, la spécificité, les effets de la température sur la sensibilité, la détection de la salive dans des échantillons de liquides corporels mixtes, et l'influence de la porosité du substrat. Leurs résultats ont montré que le papier Phadebas est sensible à l'activité de l'alpha-amylase mais moins spécifique pour la salive, ce qui a été confirmé dans notre étude comparant la spécificité du test Phadebas à d'autres fluides corporels.

L'utilisation d'une température de 37 °C n'a pas affecté la sensibilité mais a augmenté la réactivité croisée avec d'autres fluides corporels. En médecine légale, le sang, l'urine et les sécrétions vaginales peuvent inhiber la détection de l'activité alpha-amylase avec le papier Phadebas. En résumé, cette étude a montré que le test Phadebas présente des limites en tant qu'outil présumé pour identifier précisément la salive. Le test Phadebas Forensic Press a également été validé pour détecter les taches de salive sur les scènes de crime en vue d'une analyse ADN, au Laboratoire national suédois de police scientifique (**Hedman et al, 2007**). Le test Phadebas a identifié toutes les taches de salive pure et celles diluées au rapport de 1:5. Une analyse ADN a été effectuée sur les taches détectées ainsi que sur les taches correspondantes sur le papier Phadebas, produisant des profils d'ADN complets pour les taches de salive pure et les dilutions à 1:5.

Nous avons découvert de façon imprévue lors de notre étude une variabilité et une asymétrie dans la distribution des valeurs de l'alpha-amylase salivaire, malgré l'origine commune des échantillons salivaires provenant d'un seul individu. Ceci suggère l'influence de divers facteurs à considérer. En fait, il s'agit d'un échantillon prélevé sur une personne à jeun qui a donné un résultat modérément à faiblement positif, Mais une fois qu'elle a rompu son jeûne et est retournée à un état normal le résultat était fortement positif, avec une dilution jusqu'à 1/5000.

L'amylase salivaire présente des variations notables d'une personne à l'autre, comme souligné par **Whitehead et Kipps (1975)**, **Clem et al. (2001)**, ainsi que **Tsutsumi et al. (1991)**. De plus, cette activité peut également fluctuer chez un même individu au fil du temps, comme rapporté par Whitehead et Kipps (1975) et Gutowski et Henthorn (1983). Afin de tenir compte de ces variations, Pour cela **Wolf et al (2008)** recommandent que d'autres échantillons soient prélevés à des heures spécifiques ou un certain nombre d'heures après le réveil afin de couvrir le reste de la journée. Ils conseillent également d'évaluer l'amylase sur au moins deux jours consécutifs.

Une autre explication possible de cette observation est que les concentrations salivaires d'alpha-amylase réagissent rapidement aux changements biologiques. Cela signifie que divers facteurs, tels que le stress, l'alimentation, l'exercice ou même l'heure de la journée, peuvent rapidement stimuler ou inhiber la production d'amylase (**Scannapieco et al. 1993 ;Hervé et al., 2001**). En conséquence, les niveaux d'alpha-amylase dans la salive peuvent fluctuer en réponse à ces influences, ce qui explique les variations observées.

Afin de réaliser un profil génétique, nous avons utilisé le kit d'amplification AmpFLSTR Minifiler, reconnu pour son extrême sensibilité avec des échantillons de faible quantité ou d'ADN dégradé. Ce kit amplifie 8 loci STR, ce qui le rend particulièrement efficace pour analyser des échantillons compromis (**Butler, 2012**).

D'autres kits, tels que le GlobalFiler et l'AmpFLSTR Identifiler, sont également utilisés pour réaliser des profils génétiques. Le kit GlobalFiler amplifie 24 loci STR, offrant une couverture plus large et une discrimination plus fine entre les profils génétiques, avantageux pour des cas complexes nécessitant une précision maximale (**Thermo Fisher Scientific, 2020**). De son côté, l'AmpFLSTR Identifiler amplifie 15 loci STR, offrant un bon équilibre entre la quantité de loci analysés et la sensibilité nécessaire pour des échantillons de qualité variable (**Butler, 2015**).

Le AmpFLSTR Minifiler se distingue par sa capacité à analyser efficacement des échantillons d'ADN dégradé, tandis que le GlobalFiler et l'AmpFLSTR Identifiler offrent un plus grand nombre de loci amplifiés, augmentant ainsi la précision et la fiabilité des analyses. En effet, il existe une corrélation entre le nombre de STR et la précision des profils (**Gill et al., 2014**). Les résultats détaillés de cette comparaison sont présentés en annexe.

Nous avons réussi à récupérer des profils génétiques avec seulement 8 loci à partir des échantillons d'ADN de salive, démontrant l'efficacité du kit AmpFLSTR Minifiler dans des conditions difficiles.

Les loci STR (Short Tandem Repeats) utilisés dans le kit AmpFLSTR MiniFiler sont choisis pour leur efficacité et leur utilité dans les analyses génétiques médico-légales. Chaque locus présente des caractéristiques spécifiques qui augmentent la précision et la fiabilité des profils génétiques. Par exemple, D13S317 et D2S1338 offrent une grande variabilité allélique, augmentant la puissance discriminatoire des profils (**Butler, 2021**). D7S820 et D16S539 sont connus pour leur stabilité génétique, ce qui les rend essentiels pour des analyses fiables (**Gill et al., 2018**). D21S11 et D18S51, situés sur les chromosomes 21 et 18 respectivement, sont choisis pour leur diversité allélique élevée, utile dans les études de parenté et les cas de paternité (**Schneider et al., 2019**). CSF1PO et FGA, situés sur les chromosomes 5 et 4, sont utilisés pour leur stabilité et leur capacité à fournir des informations génétiques détaillées (**Butler, 2020**).

En plus de ces loci, le kit comprend également un marqueur STR déterminant le sexe, comme l'amelogenin, qui permet de distinguer les profils génétiques masculins et féminins (**Gusmão et al., 2020**). L'utilisation combinée de ces loci permet de générer des profils génétiques précis et fiables, même à partir d'échantillons dégradés ou de faible quantité d'ADN, rendant le kit AmpFlSTR MiniFiler particulièrement utile dans les enquêtes médico-légales et les analyses de parenté.

Nous avons réussi à récupérer des profils génétiques avec seulement 8 loci à partir des échantillons d'ADN de salive, mais il existe une corrélation entre le nombre de STR et la précision des profils. **Butler (2012)** a démontré que l'ajout de loci STR améliore considérablement la précision et la robustesse des profils génétiques, permettant une meilleure distinction entre les individus. Cette observation est appuyée par **Gill et al. (2014)**, qui ont souligné l'importance d'utiliser un plus grand nombre de loci STR pour augmenter la précision des analyses, en particulier dans les cas de mélanges d'échantillons. De même, **Budowle et al. (2011)** ont montré que l'utilisation de multiples loci STR dans les données de population augmente la précision des correspondances génétiques, renforçant ainsi la fiabilité des analyses.

Par ailleurs, **Jobling et Gill (2004)** ont expliqué que l'augmentation du nombre de STR analysés améliore la discrimination entre les profils génétiques, rendant les analyses plus fiables. **Schneider et al. (1998)** ont également démontré que l'augmentation du nombre de loci STR étudiés, notamment ceux du chromosome Y, améliore la précision des profils génétiques dans les analyses légales. Enfin, **Vacca et al. (2016)** ont confirmé que l'augmentation du nombre de marqueurs STR améliore la précision des profils génétiques, en particulier dans les profils d'ADN mixtes complexes, ce qui renforce encore la validité de cette approche dans les analyses médico-légales.

La relation entre la dilution de l'ADN et l'augmentation des RFU est bien établie dans le domaine de la médecine légale. **Butler (2012)** explique que l'intensité du signal dans le profilage des STR est directement proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans l'échantillon. Ainsi, lorsque la concentration d'ADN diminue, les valeurs de RFU diminuent en conséquence, reflétant un nombre moindre de fragments d'ADN amplifiés. **Gill et al. (2014)** ajoutent que la dilution des échantillons d'ADN entraîne une diminution linéaire des valeurs de RFU, ce qui peut être crucial pour détecter des échantillons à faible nombre de copies où le signal peut tomber en dessous du seuil de détection. **Schneider et**

**al. (2006)** soulignent l'importance de cette relation quantitative entre la concentration d'ADN et les valeurs de RFU, notamment dans les analyses médico-légales où la quantité d'échantillons peut être limitée ou dégradée, nécessitant une interprétation minutieuse des valeurs de RFU plus faibles.

Concernant le premier cas réel étudié, malgré un résultat positif au test Phadebas, la quantité d'ADN était insuffisante pour poursuivre l'analyse génétique. Dans le deuxième cas, une quantité d'ADN optimale a permis d'obtenir des profils génétiques clairs et complets, bien que certains profils partiels soient inexploitable, probablement en raison de la dégradation de l'ADN. L'analyse médico-légale des séquences répétées en tandem (STR) est limitée par la qualité et la quantité d'ADN extrait des échantillons biologiques. Les dommages importants ou les altérations de la structure moléculaire primaire de l'ADN sont problématiques, car les polymérase se bloquent sur les sites endommagés ou altérés, empêchant l'amplification (et donc l'analyse) des loci cibles (**Ambers et al., 2014**).

Dans d'autres cas, si la manipulation de l'ADN est effectuée dans des conditions idéales mais qu'aucun profil n'est obtenu, cela peut être dû à la présence de niveaux élevés d'inhibiteurs nécessitant une purification. Lors de la quantification de l'ADN, on peut révéler la présence de ces inhibiteurs, aidant ainsi à comprendre pourquoi aucun profil n'a été obtenu (**Butler, 2015**). En d'autres termes, les inhibiteurs peuvent perturber le processus de l'analyse de l'ADN, entraînant des résultats indéterminés malgré des conditions initiales optimales (**Gill et al., 2014**).

---

---

## *Conclusion générale*

---

---

## CONCLUSION GENERALE

L'objectif ultime est de créer des profils ADN uniques, une empreinte génétique précise de chaque personne, renforçant ainsi la capacité de la criminalistique à établir des correspondances indiscutables entre les preuves biologiques et les individus.

Cette approche dépasse sa portée scientifique et apporte une forte dimension médico-légale au recours à l'analyse génétique dans les enquêtes criminelles.

Dans cette étude, nous avons confirmé la fiabilité du test Phadebas amylase pour détecter des traces de salive en utilisant l'activité  $\alpha$ -amylase comme indicateur, le test Phadebas nous indique la présence ou l'absence de la salive, Nous avons collecté des échantillons buccaux de volontaires en laboratoire à l'aide d'écouvillons buccaux , Nous avons aussi examiné la sensibilité, la spécificité, la reproductibilité et la contamination croisée, critères essentiels pour valider cette méthode.

Dans le même temps, notre objectif était d'exploiter l'ADN récupéré à partir des traces salivaires sur les scènes de crime comme l'une des méthodes d'identification humaine les plus fiables.

Le matériel génétique salivaire a été extrait en utilisant le Kit Qiagen, suivi de la quantification de l'ADN récupéré via PCR quantitative en temps réel avec le kit Quantiplex d'Investigateur. Ensuite, nous avons procédé au génotypage à l'aide du kit d'amplification PCR AmpFLSTR MiniFiler.

Les résultats ont établi les limites de la méthode, y compris les seuils de sensibilité par le biais des taux de dilution et la spécificité par rapport à d'autres fluides corporels.

A la fin nous avons examiné deux cas réels qui démontrent l'utilité de cette méthode en criminalistique, utilisant deux timbres et deux rabats provenant des lettres de menace.

Dans notre recherche, nous avons employé des demi-comprimés de test Phadebas amylase, obtenant des résultats positifs fiable.

Approfondir l'analyse des limites des comprimés Phadebas serait avantageux. Il est également nécessaire d'explorer l'impact des facteurs externes, tels que les conditions environnementales, sur la détection de l' $\alpha$ -amylase par le comprimé Phadebas et sa durée d'efficacité.

En Algérie, depuis l'adoption de la loi en 2016, l'utilisation de l'identification génétique en matière de criminalistique est strictement réglementée. Les analyses génétiques, effectuées par des laboratoires et des experts agréés, se concentrent sur les parties non codantes de l'ADN.

Les prélèvements biologiques peuvent être autorisés par les autorités judiciaires pour les personnes soupçonnées de crimes ou délits, les personnes décédées non identifiées, les personnes disparues, ainsi que leurs ascendants et descendants. Les données génétiques sont conservées dans une base nationale, tandis que les échantillons biologiques sont détruits lorsqu'ils ne sont plus nécessaires. L'effacement des empreintes génétiques de la base de données est effectué sur décision du magistrat compétent, soit d'initiative, soit sur demande, une fois qu'elles ne sont plus pertinentes.

Il est important de généraliser les tests génétiques dans tous les laboratoires de la police scientifique algérienne. Actuellement, seule la direction d'Alger est équipée pour réaliser ces tests, L'extension de ces capacités à l'ensemble du territoire algérien renforcerait l'efficacité des enquêtes criminelles et améliorerait la justice en fournissant des preuves génétiques plus rapidement et de manière plus accessible.

## Résumé

La preuve scientifique la plus irréfutable et la plus solide qui existe aujourd'hui est la preuve génétique, car elle utilise l'analyse de l'ADN et une technologie avancée d'empreintes génétiques pour identifier avec précision les individus en comparant leurs empreintes génétiques à des échantillons inconnus découverts sur les scènes de crime. Cette méthode révolutionnaire garantit un niveau de précision inégalé dans l'identification des criminels et l'exonération des innocents.

Différents types d'échantillons, notamment des cheveux, du sang, des tissus et des fluides biologiques, peuvent révéler de l'ADN sur une scène de crime. La salive, en particulier, est couramment utilisée dans les enquêtes médico-légales, car elle peut être trouvée dans diverses sources de preuves, telles que des taches de salive, des lettres de menaces, des timbres, des enveloppes et des masques. L'identification de ce fluide corporel apparemment ordinaire joue un rôle essentiel dans la résolution des cas et occupe une position cruciale dans les enquêtes et les procédures judiciaires contre les contrevenants.

La recherche de traces de salive s'effectue à l'aide d'un test biochimique enzymatique qui détecte une enzyme salivaire spécifique (alpha-amylase), quel que soit le type de tissu ou de matériaux dans lequel elle se trouve. Le plus couramment utilisé est le test Phadebas.

Dans le cadre de notre étude, l'objectif était de vérifier et d'évaluer l'efficacité de l'utilisation du test Phadebas amylase dans le laboratoire de la police scientifique et technique en Algérie pour détecter les traces salivaires sur des écouvillons. Nous avons poursuivi cette étude en réalisant un profilage génétique en vue de l'identification des individus, afin de démontrer la valeur de cette méthode pour résoudre les cas criminels.

Nous avons étayé notre étude en examinant des cas concrets de timbres et de rabats provenant de lettres de menaces, pour mettre en lumière l'importance de cette technique dans les enquêtes criminelles menées au sein de ce laboratoire.

Mots clés : ADN, traces biologiques, alpha-amylase, test Phadebas, profilage génétique

## Abstract

The strongest, most irrefutable scientific evidence available today is DNA evidence, which uses DNA analysis and advanced DNA fingerprinting technology to accurately identify individuals by comparing their DNA fingerprints with unknown samples found at crime scenes. This revolutionary method guarantees an unrivaled level of accuracy in identifying criminals and exonerating the innocent.

Multiple types of evidence, including hair, blood, tissue, and biological fluids, can yield DNA at a crime scene. Notably, saliva is a frequently employed tool in forensic investigations, as it can be discovered in various forms of evidence, such as saliva stains, threatening letters, stamps, envelopes, and masks. The identification of this seemingly ordinary bodily fluid assumes a paramount importance in solving cases, and occupies a critical position in the investigative process and judicial proceedings against offenders.

The search for traces of saliva is carried out using an enzymatic biochemical test which detects a specific salivary enzyme (alpha-amylase), regardless of the type of tissue or material in which it is found. The most commonly used test is the Phadebas.

In our study, the aim was to verify and evaluate the effectiveness of using the Phadebas amylase test in the Algerian scientific and technical police laboratory to detect salivary traces on swabs. We continued this study by carrying out genetic profiling to identify individuals, in order to demonstrate the value of this method for solving criminal cases.

We have reinforced our study by analyzing concrete cases of threatening letters, including stamps and envelopes, to demonstrate the crucial role of this technique in criminal investigations conducted within this laboratory.

Key words: DNA, biological traces, alpha-amylase, Phadebas test, genetic profiling

## المخلص

أكثر الأدلة العلمية المتاحة اليوم دحضاً وصلابة هي ادلة الحمض النووي التي تستخدم تحليل الحمض النووي وتقنية البصمة الوراثية المتقدمة لتحديد هوية الافراد بدقة من خلال مقارنة بصمات الحمض النووي الخاصة بهم مع عينات مجهولة موجودة في مسرح الجريمة. وتضمن هذه الطريقة الثورية مستوى لا مثيل له من الدقة في تحديد هوية المجرمين وتبرئة الأبرياء

أنواع متعددة من الأدلة، بما في ذلك الشعر، الدم، الأنسجة، والسوائل البيولوجية، يمكن أن تنتج الحمض النووي في مسرح الجريمة. الجدير بالذكر ان اللعاب يعد أداة تستخدم بشكل متكرر في التحقيقات الجنائية، حيث يمكن اكتشافه في أشكال متنوعة من الأدلة مثل بقع اللعاب، الرسائل التهديدية، الطوابع، الأظرف، الأفتحة. يعتبر التعرف على هذا السائل الجسدي العادي ظاهرياً ذو أهمية قصوى في حل القضايا، ويشغل مكاناً حاسماً في عملية التحقيق والإجراءات القضائية ضد الجناة

يتم إجراء البحث عن آثار اللعاب باستخدام اختبار كيميائي حيوي إنزيمي يكشف عن إنزيم لعابي محدد (ألفا-أميلاز)، بغض النظر عن نوع النسيج أو المادة التي توجد فيها. والاختبار الأكثر استخداماً هو اختبار فاديباس

كان الهدف من دراستنا هو التحقق من فعالية استخدام اختبار فاديباس أميليز في مختبر الشرطة العلمية الجزائري الكشف عن آثار اللعاب على المسحات وتقييمها. وواصلنا هذه الدراسة من خلال إجراء التتميط الجيني بهدف تحديد من أجل اثبات قيمة هذه الطريقة في حل القضايا الجنائية هوية الافراد

وقد دعمنا دراستنا من خلال فحص حالات محددة من الطوابع واللوحات من رسائل التهديد، لإبراز أهمية هذه التقنية في التحقيقات الجنائية التي أجريت في هذا المختبر

الكلمات المفتاحية: الحمض النووي، الآثار البيولوجية، الفا-أميلاز، اختبار فاديباس، التتميط الجيني

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

### Références bibliographiques

1. Abdel Fatah, HeshamTawfik M. 2010. « ISO/IEC 17025 Accreditation: Between the Desired Gains and the Reality ». *The Quality Assurance Journal* 13 (12): 21-27.
2. Ambers, A., Turnbough, M., Benjamin, R., King, J., Budowle, B., 2014. Assessment of the role of DNA repair in damagedforensicsamples. *Int J Legal Med* 128, 913–921.
3. Ambroise-Castérot, C., 2019. Le FNAEG, un outil de fichage au service des enquêtes. *Cahiers Droit, Sciences & Technologies* 23–32.
4. A review of saliva: normal composition, flow, and function - PubMed ». s. d. Consulté le 21 mai 2024.
5. Aps, J.K.M., Martens, L.C., 2005. Review: The physiology of saliva and transfer of drugsinto saliva. *ForensicSci Int* 150, 119–131.
6. Auvdel, M.J., 1986. Amylase levels in semen and saliva stains. *J ForensicSci* 31, 426–431.
7. Bär, W., Brinkmann, B., Budowle, B., Carracedo, A., Gill, P., Lincoln, P., Mayr, W., Olaisen, B., 1997. DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeatsystems. *Int J Legal Med* 110, 175–176.
8. Barni, F., Berti, A., Rapone, C., Lago, G., 2006. Alpha-amylase kinetic test in bodily single and mixed stains. *J ForensicSci* 51, 1389–1396.
9. Ben-Aryeh, H., Shalev, A., Szargel, R., Laor, A., Laufer, D., Gutman, D., 1986. The salivary flow rate and composition of whole and parotidresting and stimulated saliva in young and oldhealthysubjects. *Biochem Med MetabBiol* 36, 260–265.
10. BOOK-Fundamentals of Forensic DNA Typing by John Butler.pdf ». s. d. Google Docs. Consulté le 23 février 2024.
11. Breathnach, Michelle, et Elizabeth Moore. 2013. « Oral Intercourse or Secondary Transfer? A BayesianApproach of Salivary Amylase and Foreign DNA Findings ». *Forensic Science International* 229 (1-3): 52-59.
12. Briant, Emmanuelle. s. d. « La chimie dans les empreintes génétiques ».

13. Bry, Céline. s. d. « Les empreintes génétiques en médecine légale ».
14. Brobeck J.R., 1979. "Pancreaticsecretion" dans Best & Taylor's Physiological basis of medical practice - JO<sup>th</sup> edition (Brobeck J.R., Ed.), p. 2•56-2•66, Baltimore, The Williams & Wilkins company.
15. Budowle, B., Moretti, T.R., Baumstark, A.L., Defenbaugh, D.A., & Keys, K.M. (1999). Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat loci in African Americans, U.S. Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. *Journal of Forensic Sciences*, 44(6), 1277-1286.
16. Budowle, B., Eisenberg, A.J., & Van Daal, A. (2011). Validating population data used for forensic DNA analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 5(3), 194-197
17. Butler JM, Buel E, Crivellente F et McCord BR (2004) Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis* 25: 1397–1412.
18. Butler, J.M. (2005). *Forensic DNA typing: Biology, technology, and genetics of STR markers*. 2nd ed New York : Elsevier. 688p
19. Butler, J.M. (2006). *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers* (2nd ed.). Elsevier Academic Press.
20. Butler, J.M. (2012). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press.
21. Butler, J.M. (2015). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. Academic Press.
22. Butler, J.M. (2021). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press.
23. BOOK-Fundamentals of Forensic DNA Typing by John Butler.pdf. s. d. Google Docs. Consulté le 23 février 2024.
24. Butler, John M., Yin Shen, et Bruce R. McCord. 2003. « The Development of Reduced Size STR Amplicons as Tools for Analysis of Degraded DNA ». *Journal of Forensic Sciences* 48 (5): 1054-64.
25. Casey, D.G., Price, J., 2010. The sensitivity and specificity of the RSID-saliva kit for the detection of human salivary amylase in the Forensic Science Laboratory, Dublin, Ireland. *Forensic Sci Int* 194, 67–71.
26. China B, Ghafir Y et Daube G (2002). Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann Méd Vét* 147: 99-109.

27. Clem J. Maidment, D., et Jo M. Ringham. 2001. « A study into the measurement of  $\alpha$ -amylase activity using phadebas, iodine and gel-diffusion procedures ». *Nutrition & Food Science* 31 (3): 141-46.
28. Comparison of modern techniques for saliva screening - PubMed ». s. d. Consulté le 23 février 2024.
29. Considerations from the European DNA profiling group (EDNAP) concerning STR nomenclature - PubMed ». s. d. Consulté le 28 février 2024.
30. Coquoz, R., Comte, J., Hall, D., Hicks, T., Taroni, F., 2013. *Preuve par l'ADN: La génétique au service de la justice*. PPUR Presses polytechniques.
31. Crispino, F., Ribaux, O., Houck, M., & Margot, P. (2011). Forensic science – A true science? *Australian Journal of Forensic Sciences*, 43(2-3), 157-176.
32. De Leo, D., Tagliaro, F., Maschio, S., Marigo, M., 1985. A sensitive and simple assay of saliva on stamps. *Z Rechtsmed* 95, 27–33.
33. Dealing with DNA Evidence | A Legal Guide | Andrei Semikhodskii | Tayl ». s. d. Consulté le 28 février 2024.
34. DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *International Society for Forensic Haemogenetics - PubMed* ». s. d. Consulté le 28 février 2024.
35. Doutremepuich, Christian. 2012a. « Les empreintes génétiques en pratique judiciaire ». *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 196 (6): 1117-30.
36. Génétique: gènes et génomes cours et questions de révision (Coll. Sciences Sup) ROSSIGNOL Jean-Luc ». s. d. Librairie Lavoisier. Consulté le 28 février 2024.
37. Génomes - Taylor/Brown - Lavoisier Medecine Sciences - Grand format - Librairie Galignani PARIS. s. d. Consulté le 28 février 2024.
38. Gill, P., Fereday, L., Morling, N., & Schneider, P.M. (2014). The evolution of DNA databases—Recommendations for new European STR loci. *Forensic Science International: Genetics*, 7(2), 45-52.
39. Gill, P., Fereday, L., Morling, N., & Schneider, P.M. (2018). The evolution of DNA databases—Recommendations for new European STR loci. *Forensic Science International: Genetics*, 34, 45-52
40. Goodwin, William, Adrian Linacre, et Sibte Hadi. 2007. « An Introduction to Forensic Genetics ». s. d.
41. Gunn, *Essential Forensic Biology*, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, 2009, pp. 45–83.
42. Gusmão, L., Butler, J.M., Carracedo, A., Gill, P., Kayser, M., Mayr, W.R., Morling, N., Prinz, M., Roewer, L., & Tyler-Smith, C. (2020). DNA Commission of the International

- Society for Forensic Genetics (ISFG): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 50, 102304.
43. Gutowski, S. J., et Pauline L. Henthorn. 1983. « The Preliminary Evaluation of a Commercial Test Kit in the Identification of Saliva ». *Journal of the Forensic Science Society* 23 (2): 135-37.
  44. Hedman, J., Dalin, E., Rasmusson, B., Ansell, R., 2011. Evaluation of amylase testing as a tool for saliva screening of crime scene trace swabs. *Forensic Science International: Genetics* 5, 194–198.
  45. Humphrey, S. P., et R. T. Williamson. 2001. « A Review of Saliva: Normal Composition, Flow, and Function ». *The Journal of Prosthetic Dentistry* 85 (2): 162-69.
  46. Individual-specific “fingerprints” of human DNA - PubMed, n.d. (accessed 2.28.24).
  47. Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., 1985. Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. *Nature* 316, 76–79.
  48. John M., Butler. s. d. « Introduction à la génétique criminalistique ».
  49. Juusola, J., Ballantyne, J., 2003. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Science International* 135, 85–96.
  50. Jobling, M.A., & Gill, P. (2004). Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics*, 5(10), 739-751.
  51. Kipps, A.E., Whitehead, P.H., 1975. The significance of amylase in forensic investigations of body fluids. *Forensic Science* 6, 137–144.
  52. La technique des empreintes génétiques s’invite de plus en plus dans les enquêtes policières, 2008. . Article .Le Monde.fr.
  53. La PCR en temps réel: principes et applications ». s. d.-à
  54. Ludes, B. 2021. « L’amplification génique : une révolution en médecine légale et en criminalistique ». *Bulletin de l’Académie Nationale de Médecine* 205 (4): 396-401.
  55. Laurent, F.-X., Vibrac, G., Rubio, A., Thévenot, M.-T., Pène, L., 2017. Les nouvelles technologies d’analyses ADN au service des enquêtes judiciaires. *Med Sci (Paris)* 33, 971–978.
  56. Lebreton, Annie. s. d. « Caractéristiques génomiques du genre fongique *Mucor* et évolution adaptative liée à différents modes et conditions de vie au sein du genre ».
  57. Le-procès-pénal-à-lépreuve-de-la-génétique ». s. d. Google Docs. Consulté le 28 février 2024.

58. Les empreintes génétiques - Bibliothèques spécialisées et patrimoniales de la Ville de Paris, n.d. (accessed 2.28.24).
59. Les empreintes génétiques en pratique judiciaire ». Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine 196 (6): 1117-30. 2012b.
60. L'Essentiel en Génétique. par P.-C. Winter, G.-I. Hickey, H.-L. Fletcher,; (2000) | Books+, n.d. (accessed 2.28.24).
61. Iglesias M (2009) Ajout d'un contrôle d'inhibition dans les kits STR multiplex. Laboratoire Aurigen, Lausanne, p.14.
62. Ludes, B., Crubézy, E., 1998. Applications des techniques de biologie moléculaire à la criminalistique et à la paléoanthropologie. Revue Française des Laboratoires 1998, 39–45.
63. Ludes, B., 2021. L'amplification génique : une révolution en médecine légale et en criminalistique. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine 205, 396–401.
64. Lorentz, Klaus. 1982. « Properties of Human Alpha-Amylases from Urine, Pancreas, and Saliva ». Enzyme 28 (4): 233-41.
65. Mansuet-Lupo, A., Rouger, P., Van Huffel, V., 2007. Les empreintes génétiques : des affaires d'interprétation difficile. Transfusion Clinique et Biologique 14, 343–347.
66. Martin, P.D., Schmitter, H., Schneider, P.M., 2001. A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe. Forensic Science International 119, 225–231.
67. Masson, E., n.d. Salives et milieu buccal. EM-Consulte. (accessed 2.22.24).
68. M.S. Maloney, D.G. Housman, Crime Scene Investigation Procedural Guide, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2014.
69. Merritt AD and Karn RC. Advances in Human Genetics 1977; 8: 135-234.
70. Médecine légale - Médecine du travail Réussir son DFASM - Connaissances clés - broché - Collectif - Achat Livre ou ebook | fnac, n.d. (accessed 2.28.24).
71. Mutation of human short tandem repeats – PubMed, n.d./ (accessed 2.28.24).
72. Minamiura N., 1988. "Human salivary and pancreatic  $\alpha$ -amylase" dans Handbook of amylases and related enzymes (Yamamoto T.K. S., Ed.), p. 18-22, Tokyo, Pergamon Press.

73. nationale, S.G., Gendarmerie, n.d. L'ADN, comment ça marche?/l-expertise-decodee/identification/l-adn-comment-ca-marche (accessed 2.23.24).
74. Natural radioactivity and human mitochondrial DNA mutations - PubMed, n.d. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12370437/> (accessed 2.28.24).
75. Nater, U. M., et N. Rohleder. 2009. « Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research ». *Psychoneuroendocrinology* 34 (4): 486-96.
76. Ossmani, H El, B Bouchrif, J Talbi, H El Amri, et A Chafik. s. d. « La diversité génétique de 15 STR chez la population arabophone de Rabat-Salé-Zemmour-Zaer ».
77. Pajtler, David. s. d. « La recherche de paternité: aspects biologiques et médico-légaux ».
78. Parson, W., 2018. Age Estimation with DNA: From Forensic DNA Fingerprinting to Forensic (Epi) Genomics: A Mini-Review. *Gerontology* 64, 326–332.
79. Petkovski, E., 2006. Polymorphismes ponctuels de séquence et identification génétique : Etude par spectrométrie de masse MALDI-TOF (These de doctorat). Université Louis Pasteur (Strasbourg) (1971-2008).
80. Phadebas Amylase Test – Accurately determine Amylase activity [WWW Document], n.d. URL <https://www.phadebas.com/> (accessed 2.22.24).
81. Preuve par l'ADN - La génétique au service de la justice - Raphaël Coquoz, Jennifer Comte, Diana Hall, Tacha Hicks, Franco Taroni (EAN13 : 9782889150069), n.d. EPFL Press. URL <https://www.epflpress.org/produit/571/9782889150069/preuve-par-l-adn> (accessed 2.28.24a).
82. Preuve par l'ADN - La génétique au service de la justice - Raphaël Coquoz, Jennifer Comte, Diana Hall, Tacha Hicks, Franco Taroni (EAN13 : 9782889150069), n.d. EPFL Press. (accessed 2.28.24b).
83. Preuve par l'ADN - La génétique au service de la justice - Raphaël Coquoz, Jennifer Comte, Diana Hall, Tacha Hicks, Franco Taroni (EAN13 : 9782889150069) ». s. d. EPFL Press. Consulté le 26 mai 2024.
84. Principes de génie génétique - S.B Primrose , R.M Twyman , R.W Old - Librairie Eyrolles ». s. d. Consulté le 26 mai 2024.
85. Portrait-robot : l'ADN connaît votre visage ». s. d.-a. Science et vie (blog). Consulté le 8 mai 2024.

86. Py, Bruno. s. d. « L'utilisation des caractéristiques génétiques dans les procédures judiciaires ».
87. Rao-Coticone, S, P Collins, P Dimsoski, C Ganong, L Hennessy, C Leibel, F Shadravan, et D Reeder. 2003. « Applications of 5-Dye Technology in Forensic DNA Typing and Analysis ». International CongressSeries 1239 (janvier):3-4.
88. Riccardi, C., Richefeu, L., 2018. Les nouvelles utilisations de la génétique dans le cadre de la procédure pénale. Revue de science criminelle et de droit pénal comparé 2, 331–342.
89. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directedenzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487–491.
90. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of bêta-globingenomicsequences and restriction site analysis for diagnosis of sicklecellanemia. Science 230, 1350–1354.
91. Saxena, S., Kumar, S., 2015. Saliva in forensicodontology: A comprehensive update. J Oral MaxillofacPathol 19, 263–265.
92. Scientific standards for studies in forensic genetics – PubMed, n.d. (accessed 2.28.24).
93. Scannapieco, Frank A., Guillermo Torres, et Michael J. Levine. 1993. « Salivary  $\alpha$ -Amylase: Role in Dental Plaque and Caries Formation ». CriticalReviews in Oral Biology&Medicine 4 (3): 301-7.
94. ». s. d.-b. Consulté le 14 mai 2024. <https://www.science-et-vie.com/article-magazine/portrait-robot-ladn-connait-votre-visage>.
95. Spitaleri, S., D. Piscitello, D. Di Martino, et L. Saravo. 2004. « ExperimentalProceduresComparing the Activity of Different Taq Polymerases ». Forensic Science International 146 Suppl (décembre):S167-169.
96. Silvester, Reshma, Deborah Alexander, Ally C. Antony, et Mohamed Hatha. 2017. « GroEL PCR- RFLP - An Efficient TooltoDiscriminateCloselyRelatedPathogenicVibrioSpecies ». MicrobialPathogenesis 105 (avril): 196-200.
97. Spitaleri, S., D. Piscitello, D. Di Martino, et L. Saravo. 2004. « ExperimentalProceduresComparing the Activity of Different Taq Polymerases ». Forensic Science International 146 Suppl (décembre):S167-169.

98. Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *NucleicAcidsRes* 17, 6463–6471.
99. Technical Info – Phadebas Amylase Test – Accuratelydetermine Amylase activity, n.d. URL <https://www.phadebas.com/technical-info/> (accessed 2.22.24).
100. Thermo Fisher Scientific. (2020). GlobalFiler PCR Amplification Kit. Retrieved from Thermo Fisher Scientific
101. Tsutsumi, H., Higashide, K., Mizuno, Y., Tamaki, K., Katsumata, Y., 1991. Identification of saliva stains by determination of the specificactivity of amylase. *ForensicSci Int* 50, 37–42.
102. Tuccinardi, Alyssa. 2020. « Investigating the Efficacy of DNA Damage withBleach in ForensicLaboratories and at Crime Scenes ». HonorsTheses, mai.
103. Vailly, Joëlle, et Gaëlle Krikorian. 2018. « Durabilité et extension du soupçon. Catégorisations et usages policiers du fichier d’empreintes génétiques en France ». *Revue française de sociologie* 59.
104. Vacca, G.M., Vergani, F., Grignani, P., & Silvestro, G. (2016). Complex DNA mixtures analysis in forensic genetics: Use of a 23 loci STR kit. *International Journal of Legal Medicine*, 130(6), 1483-1490.
105. Vial, Jérôme. 2006. « Définition de la validation de méthode et outils associés ».
106. Whitehead, P. H., et A. E. Kipps. 1975. « The Significance of Amylase in Forensic Investigations of Body Fluids ». *Forensic Science* 6 (3): 137-44
107. Willott, G.M., 1974. An Improved Test for the Detection of Salivary Amylase in Stains. *Journal of the Forensic Science Society* 14, 341–344.
108. Willott, G.M., Griffiths, M., 1980. A new method for locating saliva stains — spottypaper for spottingspit. *Forensic Science International* 15, 79–83.

---

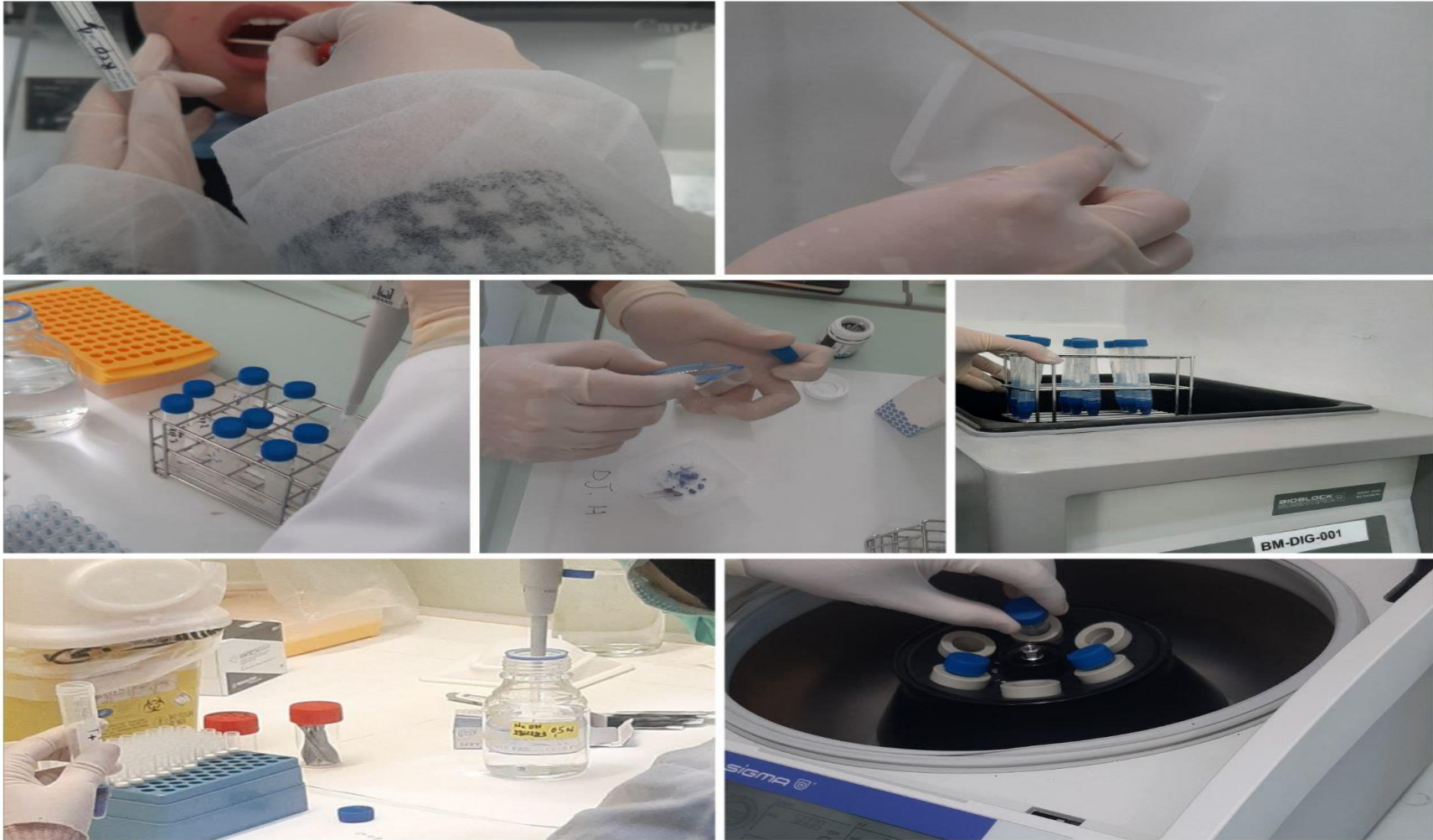
---

# *Annexes*

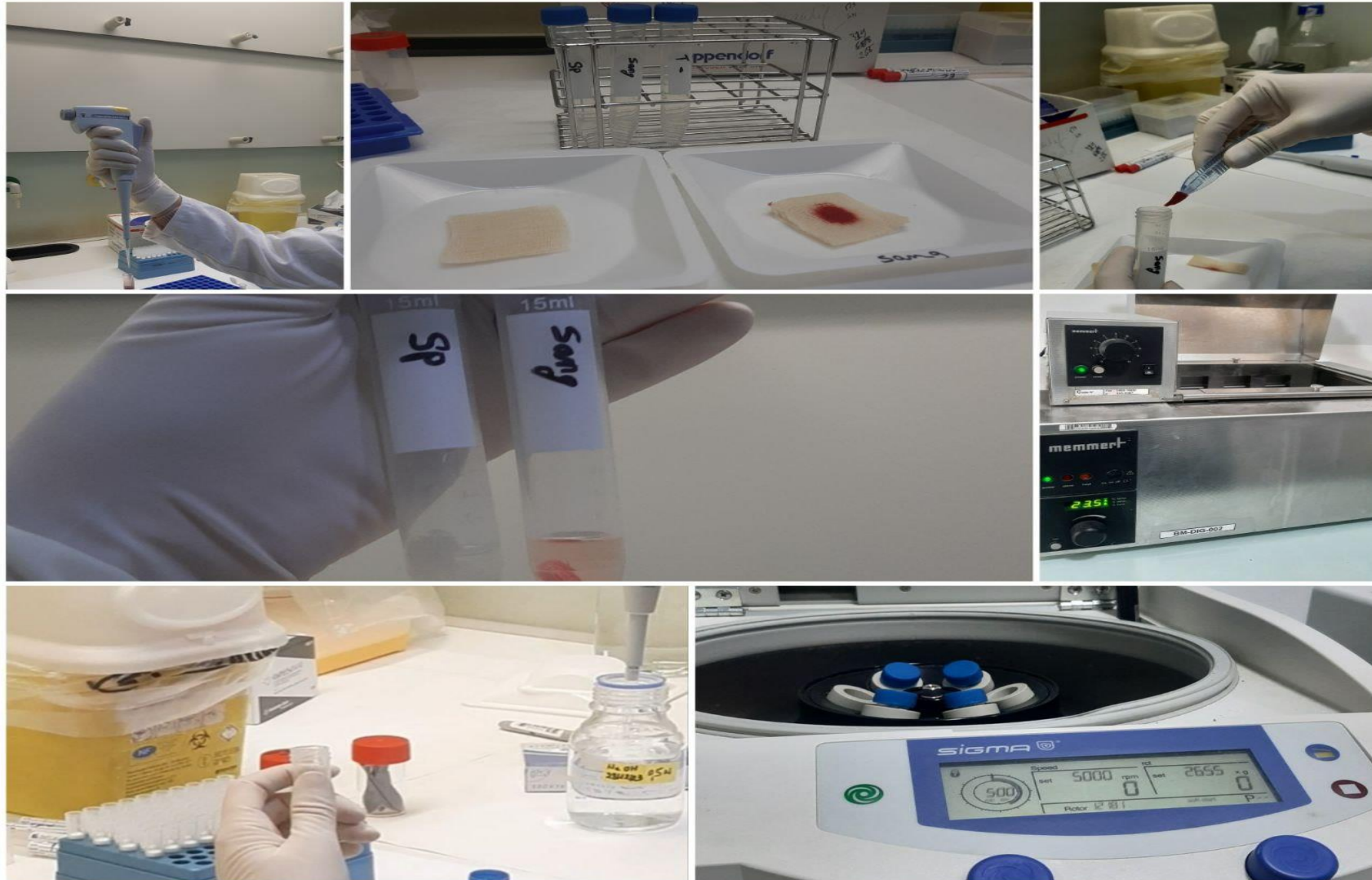
---

---

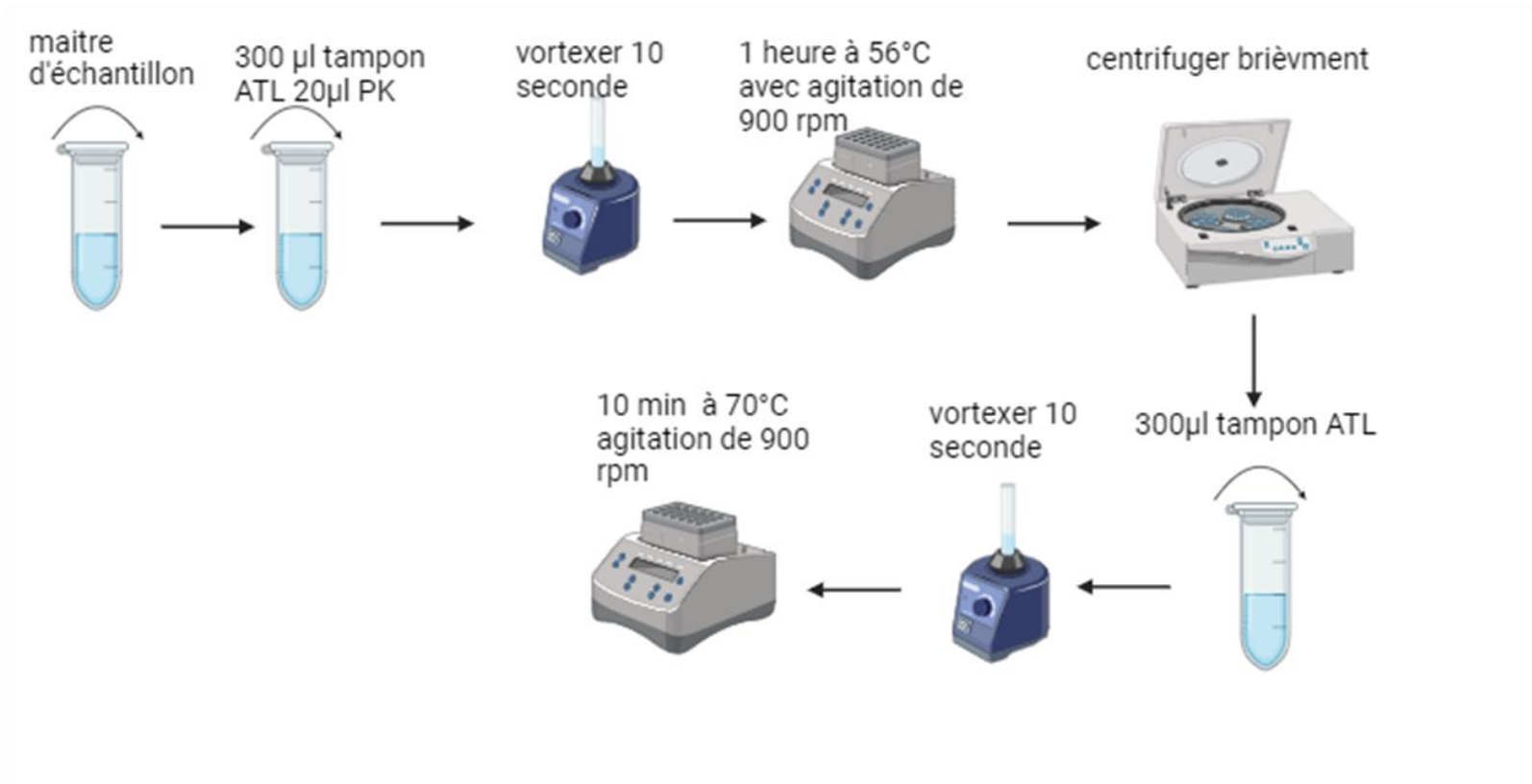
**ANNEXE 1:** Les manipulations effectuées pour chaque paramètre pendant l'étude de validation.



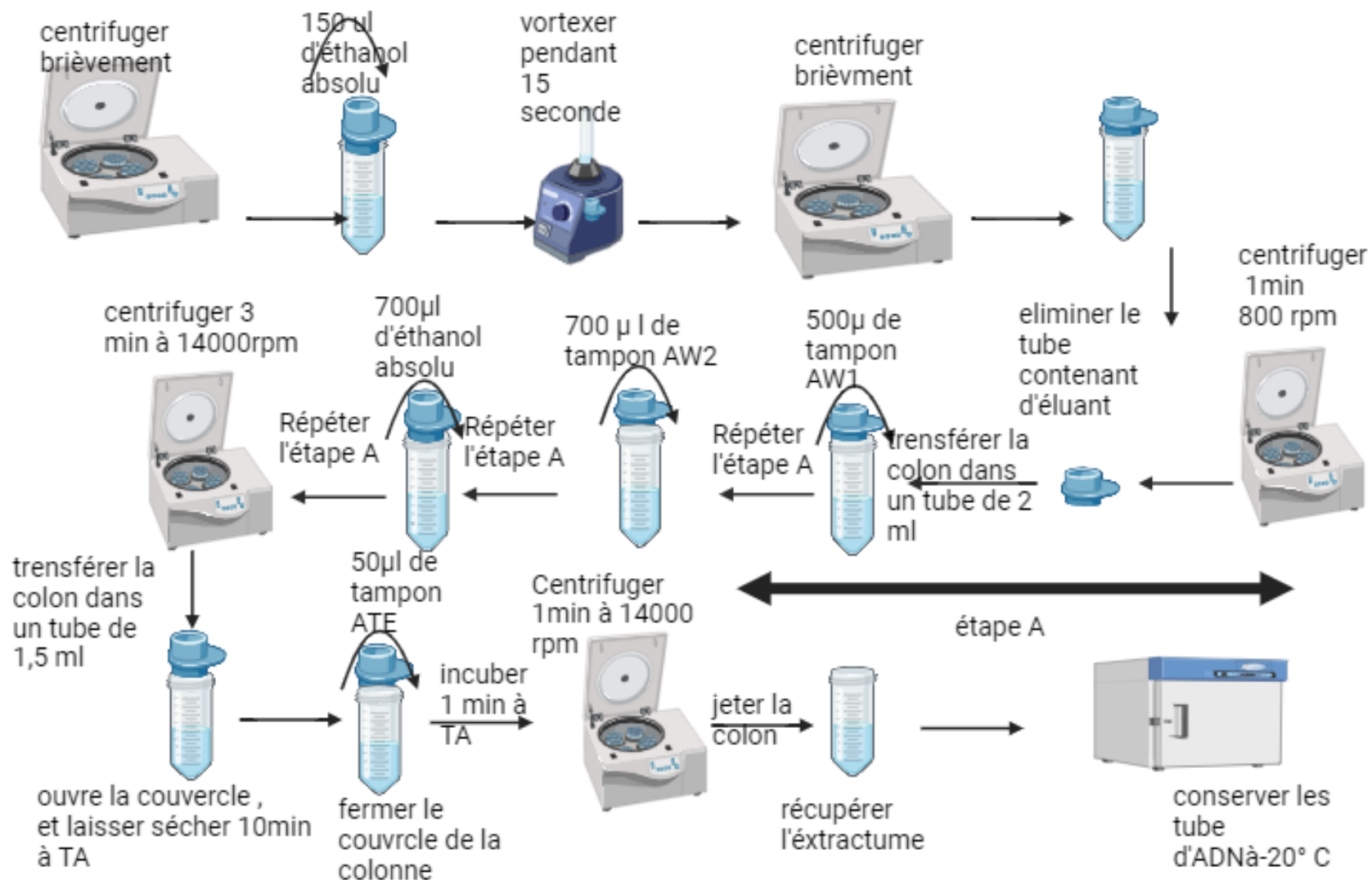
**ANNEXE 2 : Les étapes de l'étude de la spécificité du test Phadebas pour divers fluides corporels**



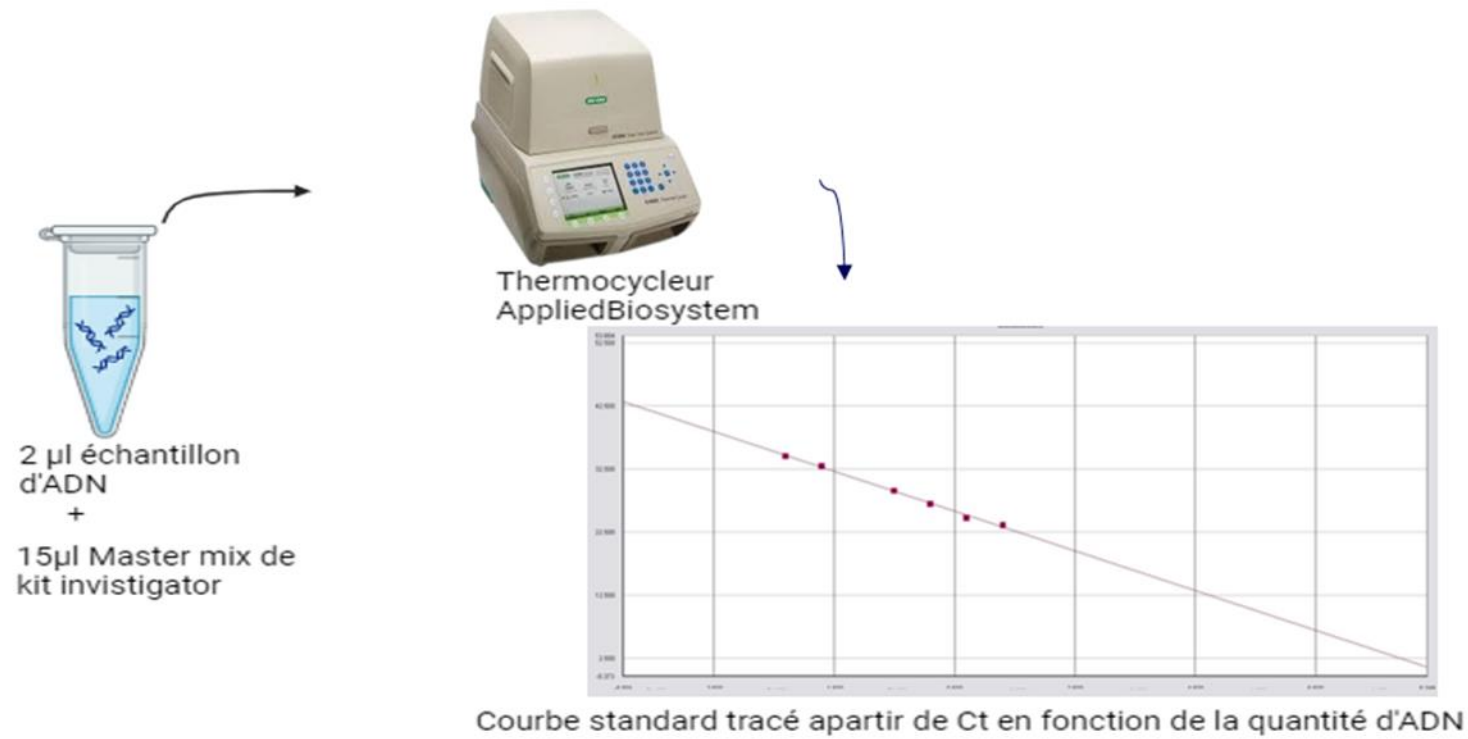
ANNEXE 3 :Les étapes de la lyse



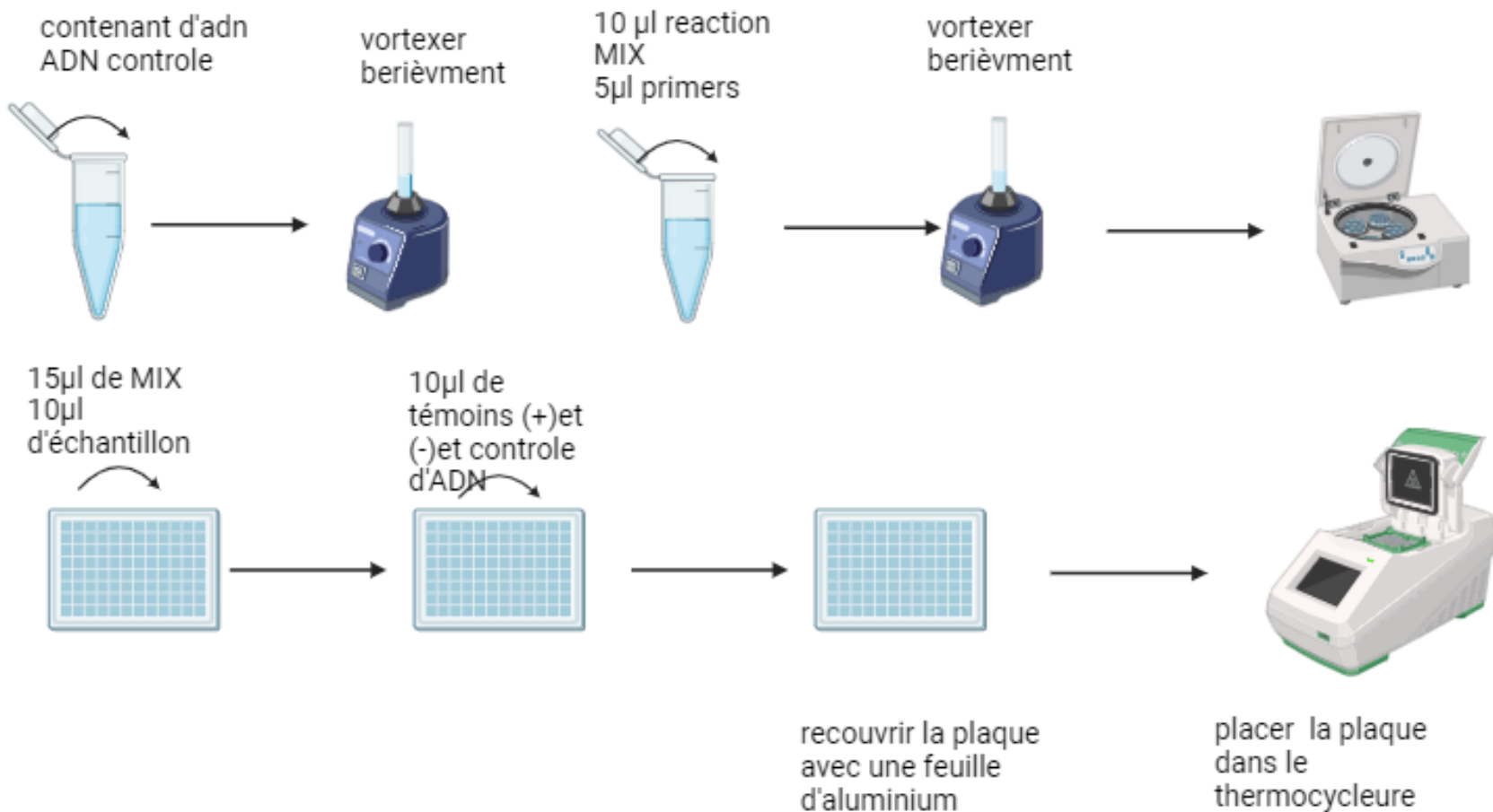
#### ANNEXE 4 :Les étapes de purification d'ADN



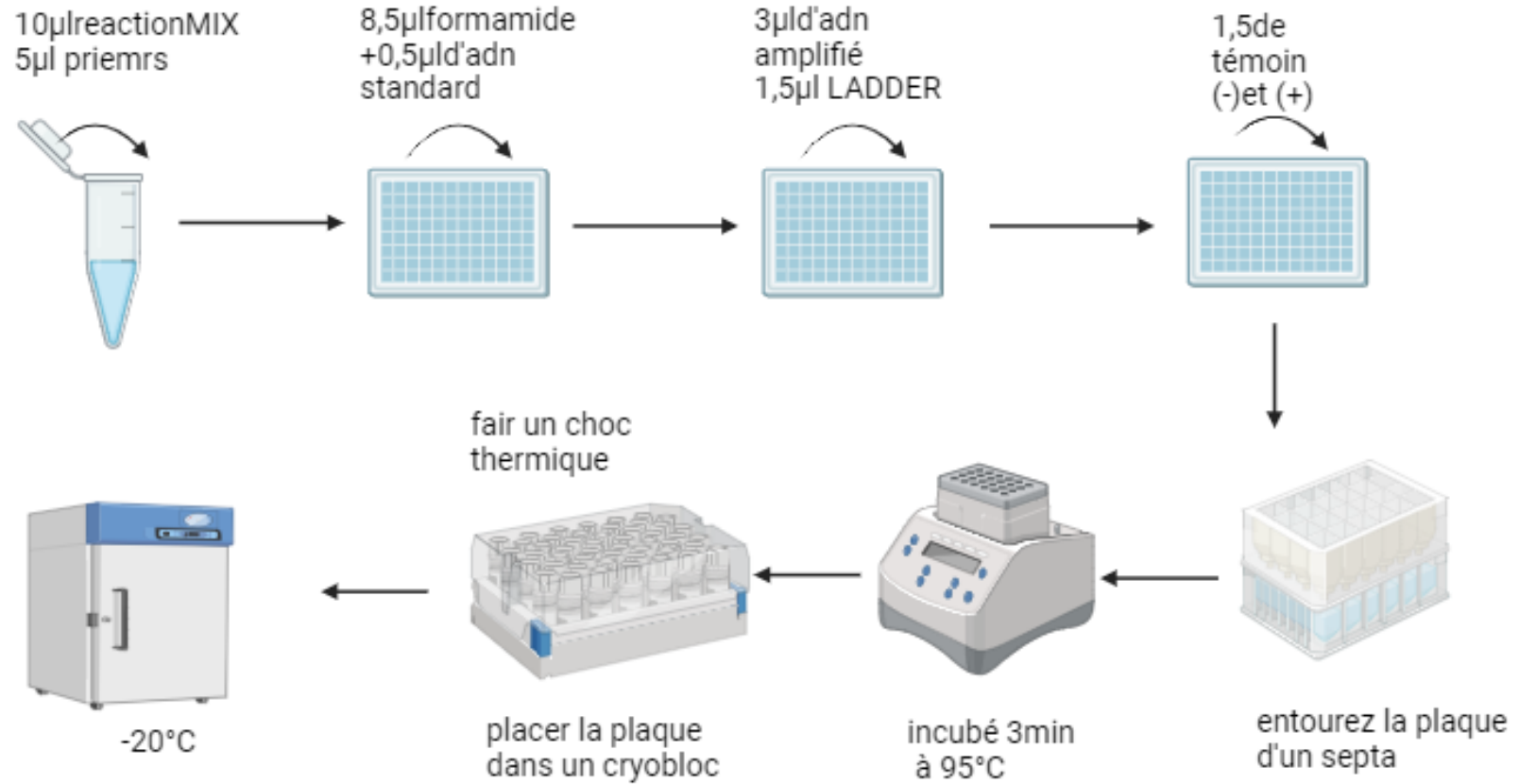
## ANNEXE 5 :Quantification par qpcr



ANNEXE 6 :Quantification par qpcr



ANNEXE 7 : Protocole de la post-pcr



**ANNEXE 8 : Les composants du Kit AmpFISTR® MiniFiler ET Contenus de le kitInvestigator® Quantiplex DNA**

<b>Composants</b>	<b>Description</b>	<b>Stockage</b>
AmpFISTR® MiniFiler™ Master Mix	Contient une enzyme, des dNTP, une protéine porteuse et 0,05% d'azide de sodium	-15 à -25°C à Réception,
AmpFISTR® Control DNA007	Contient 0,10 ng/ul d'ADN Génomique masculin humain dans de l'azoture de sodium à 0,05% et un tampon	2 à 8°C Après première Utilisation
AmpFISTR® MiniFiler™ Primer Set	Contient des amorces directes et inverses pour les cibles d'ADN humain	-15 à -25°C à Réception 2 à 8°C Après première Utilisation
AmpFISTR® MiniFiler™ AllelicLadder	Contient des allèles amplifiés Ladder alléliques	Conserver à l'abri de la lumière

Investigator Quantiplex HYres Kit	(200)
Référence	387116
Nombre de réaction de 20µl	200
Réaction Mix FQ (mélange réactionnel FQ)	2× 1,15ml
Primer Mix IC YQ (Mélange d'amorce IC YQ)	1× 1,8ml
Control DNA Z1 (ADN témoin Z1) (20ng/µl)	0,2ml
Quantitect® NucleicAcid Dilution Buffer (Tampon de dilution d'acide nucléiques Quantitect®)	1 flacon
Quick-start Protocole Quick-start)	1

**ANNEXE 9 : Liste des loci analysés sur l'ADN autosomal. (Doutremepuich, Christian. 2012.)**

<b>Locus</b>	<b>Chromosome</b>	<b>Position</b>	<b>Taille de fragements</b>	<b>Motif répété</b>	<b>Echelle Allélique</b>
<b>D13S317</b>	13	13q22-q31	de 165 à 197 pb	(AGAT) n	entre 5 et 15
<b>D7S820</b>	7	7q11.21-q22	de 215 à 247 pb	(AGAT) n	entre 6 et 15
<b>D2S1338</b>	2	2q35-37.1	de 289 à 341 pb	(TGCC) n	entre 15 et 28
<b>D21S11</b>	21	21q11-q21	de 189 à 243 pb	(TCTA) n	entre 24.2 et 38
<b>D16S539</b>	16	16q24-qter	de 264 à 304 pb	(AGAT) n	entre 5 et 15
<b>D18S51</b>	18	18q21.3	de 273 à 341 pb	(AGAA) n	entre 9 et 26
<b>CSFIPO</b>	5	q33.3-34 située dans le gène du récepteurcfms proto — oncogène pour leCSF1.	de 295 à 327 pb	(AGAT) n	entre 7 et 15
<b>FGA</b>	4	4q28	de 219 à 267 pb	(TTTC) n	entre 16.2 et 30

**ANNEXE 10.** Comparaison du Kit AmpFLSTR MiniFiler avec les Kits Identifiler et GlobalFiler .

<b>Critères</b>	<b>AmpFLSTR MiniFiler</b>	<b>GlobalFiler</b>	<b>AmpFLSTR Identifiler</b>
<b>Sensibilité</b>	Très élevée pour ADN dégradé	Très élevée	Elevée
<b>Nombre de loci STR amplifiés</b>	8	24	15 + locus de l'amélogénine
<b>Type d'échantillon</b>	Faible quantité ou ADN dégradé	Grande diversité, haute qualité	Bonne à moyenne qualité
<b>Applications typiques</b>	ADN ancien, dégradé, restes humains	Enquêtes criminelles complexes, bases de données nationales	Identification génétique, tests de paternité
<b>Discrimination génétique</b>	Modérée	Très élevée	Élevée
<b>Compatibilité avec bases de données</b>	Modérée	Très élevée	Élevée
<b>Performance avec ADN de bonne qualité</b>	Bonne	Excellente	Très bonne