

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة امحمد بوقرة بومرداس  
Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences  
Département de Biologie

**Master en sciences biologique spécialité Génétique**

**Mémoire**

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de master spécialité Génétique

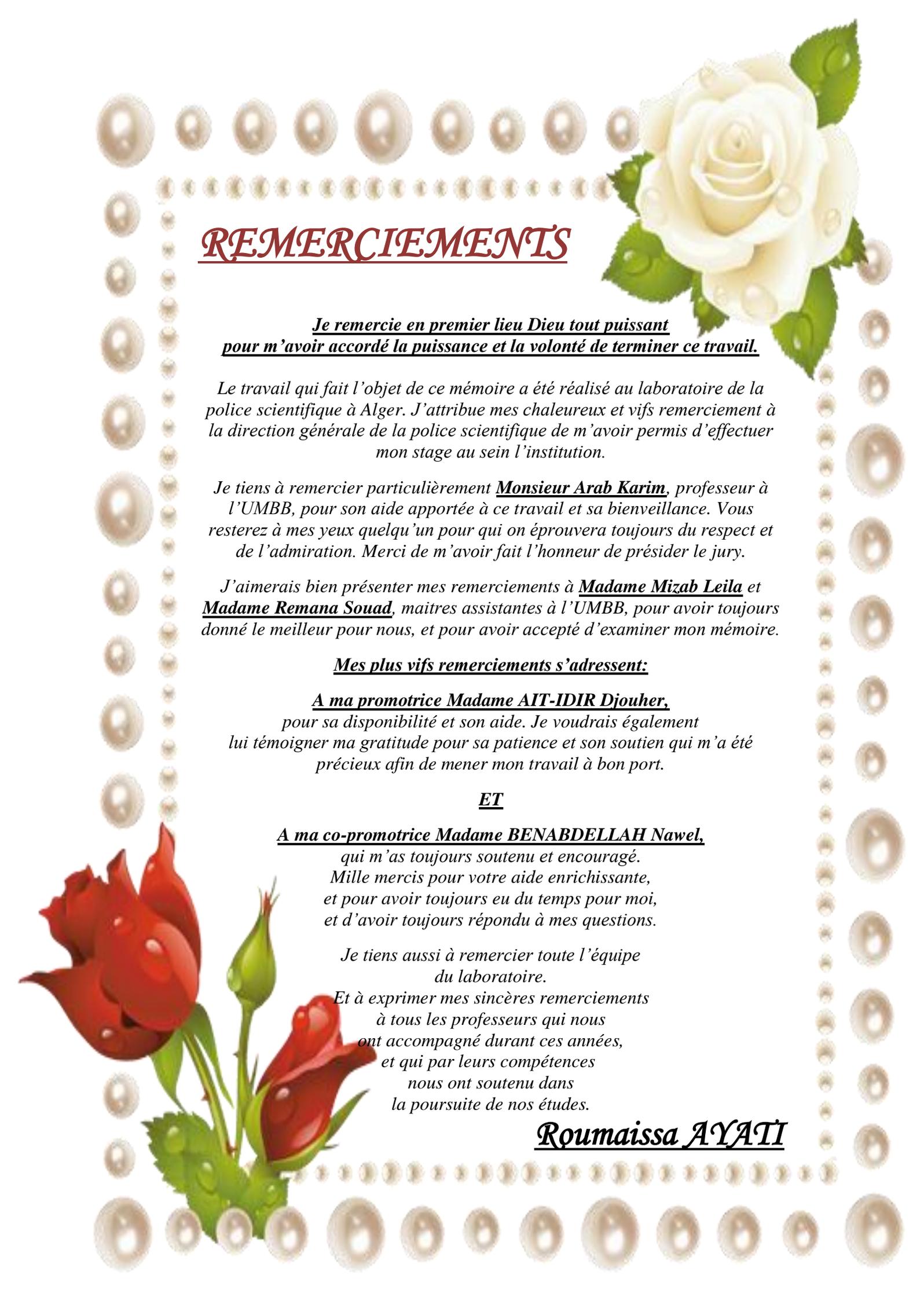
**Lavages répétés des traces de sperme-Impact sur le profilage lors  
d'une agression sexuelle**

Présenté par

**AYATI Roumaissa**

Président :	ARAB Karim	Professeur (UMBB)
Promotrice :	AIT-IDIR Djouher	MCA (UMBB)
Co-promotrice :	BENABDELLAH Nawel	Lieutenant (police scientifique)
Examinatrice :	MIZAB Leila	MAA (UMBB)
Examinatrice	REMANA Souad	MAA (UMBB)

Promotion 2018/2019



## REMERCIEMENTS

*Je remercie en premier lieu Dieu tout puissant pour m'avoir accordé la puissance et la volonté de terminer ce travail.*

*Le travail qui fait l'objet de ce mémoire a été réalisé au laboratoire de la police scientifique à Alger. J'attribue mes chaleureux et vifs remerciements à la direction générale de la police scientifique de m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein l'institution.*

*Je tiens à remercier particulièrement Monsieur Arab Karim, professeur à l'UMBB, pour son aide apportée à ce travail et sa bienveillance. Vous resterez à mes yeux quelqu'un pour qui on éprouvera toujours du respect et de l'admiration. Merci de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*J'aimerais bien présenter mes remerciements à Madame Mizab Leila et Madame Remana Souad, maitres assistantes à l'UMBB, pour avoir toujours donné le meilleur pour nous, et pour avoir accepté d'examiner mon mémoire.*

*Mes plus vifs remerciements s'adressent:*

*A ma promotrice Madame AIT-IDIR Djouher, pour sa disponibilité et son aide. Je voudrais également lui témoigner ma gratitude pour sa patience et son soutien qui m'a été précieux afin de mener mon travail à bon port.*

*ET*

*A ma co-promotrice Madame BENABDELLAH Nawel, qui m'as toujours soutenu et encouragé. Mille mercis pour votre aide enrichissante, et pour avoir toujours eu du temps pour moi, et d'avoir toujours répondu à mes questions.*

*Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du laboratoire.*

*Et à exprimer mes sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont accompagné durant ces années, et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.*

*Roumaïssa AYATI*



## DEDICACES

*A cœur vaillant rien d'impossible  
A conscience tranquille tout est accessible*

*Quand il y a la soif d'apprendre  
Tout vient à point à qui sait attendre*

*Malgré les obstacles qui s'opposent  
En dépit des difficultés qui s'interposent*

*Les études sont avant tout  
Notre unique et seul atout*

*Ils représentent la lumière de notre existence  
L'étoile brillante de notre réjouissance*

*Espérant des lendemains épiques  
Un avenir glorieux et magique*

*Souhaitant que le fruit de nos efforts fournis  
Jour et nuit, nous mènera vers le bonheur fleuri*

*Je dédie on modeste travail à:*



**A ma très chère mère**

*Tu représentes pour moi  
le symbole de la bonté par excellence,  
la source de tendresse et l'exemple du dévouement  
qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.  
Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.  
Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et  
bonheur.*

**A mon très cher père**

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime,  
le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous.  
Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour  
mon bien être.  
Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation  
et ma formation.*

**A ma très chère soeur Hanane, son mari et leurs enfants:**

**Bochra, Abdennour, Kaouther et Alaa.**

**A mon très cher frère Fouad, son épouse et leurs enfants:**

**Lina, Wissame, Feriel et Rachid.**

**A ma très chère sœur Wafa, son mari et leur petit Ali.**

**A mes très cher frères: Rafik et Nazih.**

*Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et  
l'affection que je porte pour vous.  
Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de  
réussite.*

**A la mémoire de mon oncle Abd El Kader**

*Je vais jamais oublier ton soutien moral et matériel,  
ta gentillesse sans égal, ton profond attachement  
qui m'ont permis de réussir mes études.  
Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements,  
ce travail n'aurait vu le jour.  
Que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance.*

**A tous les membres de ma famille,**

**petits et grands**

*Veillez trouver  
dans ce modeste travail  
l'expression de mon affection.*





*A ma chère promotrice*  
*AIT-IDIR Djouher*

*ET*

*A Madame BENABDELLAH Nawel*  
*Mon aimable co-promotrice.*

*Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis.  
Vous avez toujours été présentes.  
Que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect.*

*A Amel Haddad*

*Je ne peux trouver les mots justes et sincères  
pour t'exprimer mon affection et mes pensées,  
Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur,  
de santé et de réussite.*

*A Choumeissa*

*Tu es pour moi une sœur et une amie  
sur qui je peux compter.  
En témoignage des souvenirs de  
tous les moments que nous avons passé ensemble,  
je te dédie ce travail et je te souhaite  
une vie pleine de santé, de bonheur et de réussite.*



*Roumaïssa AYATI*

## Liste des abréviations

ADN:	Acide Désoxy-ribonucléique
ALS :	Altarnate Light Source
AP :	Acid Phosphatase
CCD:	Charge Coupled Device
dNTP:	Désoxy Nucléotide Tri-Phosphate
DTT :	Dithiothreitol
EDTA :	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
FAM :	6- Carboxyfluorocein
IPC :	Internal PCR Control
Kl:	kilobase
LIZ :	Internal lane size standard
Min:	Minute
ml :	Millilitre
pb:	paire de base
PCR:	Polymerase Chain Reaction
POP-4:	Performance Optimized Polymer 4
PSA :	Prostatic Specific Antigen
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
RFU:	Relative Fluoresence Unité
Rpm	Rotation par minute
RT-PCR :	Real Time-PCR
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfat
STR :	Short Tandem Repeats.
SNP :	Single Nucleotide Polymorphisms
VNTR:	Variable Number Tandem Repeats
Taq Polymerase:	<i>Thermophilus aquaticus</i> DNA-Polymerase
µl	Microlitre

## Liste des figures

Figure 1: L'organisation du génome humain (Kashyap et al., 2004).....	3
Figure 2 : Principe de l'identification génétique par établissement d'un profil génétique STR. ....	11
Figure 3 : Les détergents utilisés .....	12
Figure 4 : Les taches réalisées sur un drap .....	15
Figure 5 : Schéma des différentes étapes de macération .....	15
Figure 6 : Schéma du principe de la détection de la PSA par immunoelectrophorese (Hochmeister et al., 1999) .....	17
Figure 7: Principe schématisé de l'essai à la sonde TaqMan (Butler, 2012).....	19
Figure 8 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR quantitative (Tse and Capeau, 2003)...	19
Figure 9: Les marqueurs STR de kit AmpFISTR Identifier et leurs fluorochromes.....	21
Figure 10 : Schéma du principe d'une électrophorese capillaire pour l'analyse de l'ADN (Butler, 2012c).....	25
Figure 11 : Observation au microscope photonique d'un frottis de spermes (Gr : 10×40).....	27
Figure 12 : Résultats de l'examen chimique PA( le 1 <sup>er</sup> tube à gauche c'est avant lavage et les autres tubes sont pour les résultats de 1 <sup>er</sup> lavage.....	28
Figure 13 : Résultats de l'examen chimique PA de 2 <sup>ème</sup> lavage.....	28
Figure 14 Résultats du test de confirmation à la PSA, avant et après les 4 lavages avec les différents détergent .....	30
Figure 15: Concentration d'ADN (ng/µl) dans les taches de sperme en fonction des lavages.	32
Figure 16 : Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme sur le drap non lavé (A)..	34
Figure 17 : Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée une fois à l'eau de Javel.....	35
Figure 18: Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée une fois au savon Test (B1).....	36
Figure 19: Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée une seule fois au savon le Chat (C1) .....	37
Figure 20: Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée une seule fois au savon le Ariel (D1) .....	38
Figure 21: Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée 2 fois à l'eau de Javel (A2).....	39
Figure 22: Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée 2 fois au savon de Marseille (B2) .....	40
Figure 23: Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée 2 fois au savon le Chat (C2) .....	41
Figure 24 : Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée 2 fois au savon Ariel (D2).....	42

### Liste des tableaux

Tableau I: Types de polymorphisme d'ADN et leurs principales caractéristiques (Daniel and Walsh, 2006; Ku et al., 2010).....	4
Tableau II : Différents lieux pour la réalisation de l'analyse .....	13
Tableau III : Cible du kit Quantifiler.....	20
Tableau IV : Préparation des mélanges réactionnels.....	20
Tableau V : Préparation du mélange réactionnel de la PCR multiplexe .....	22
Tableau VI: Conditions d'amplification au cours de la PCR multiplexe .....	22
Tableau VII : Liste des marqueurs STR déterminés par le kit AmpFISTR Identifier .....	23
Tableau VIII: Résultats des test préliminaire sur le sperme utilisé .....	29
Tableau IX: Concentrations de l'ADN avant et après traitement des taches aux détergents ...	31
Tableau X : Profil ADN du donneur de sperme avant lavage .....	33

**Sommaire**

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux .....	iii
I.INTRODUCTION.....	1
II.1 Organisation du génome humain.....	2
II.2 Les polymorphismes et empreintes génétiques.....	2
II.2.1 Mini satellites (VNTR).....	2
II.2.1 Microsatellites (STR).....	4
II.2.2 Single Nucleotide Polymorphisme, SNP .....	5
II.3.Profils génétiques en criminalistique.....	6
II.3.1 Historique de l'analyse ADN en pratique judiciaire.....	6
II.3.2.Démarche analytique pour l'obtention d'un profil génétique en criminalistique.....	7
II.3.2.1 Sources biologiques de l'ADN dans le domaine médico-légal .....	7
II.3.2.2 Détection des traces.....	9
II.3.2.3 Prélèvement .....	9
II.3.2.4 Extraction et purification de l'ADN.....	9
II.3.2.5 Quantification.....	10
II.3.2.6 Génotypage.....	11
III.1 Matériel .....	12
III.1.1 Matériel biologique.....	12
III.1.2 Matériel non biologique.....	12
III.2 Méthodes.....	13
III.2.1 Processus analytique.....	13
III.2.1.1 Vérification du sperme recueilli.....	14
III.2.1.2 Obtention des taches de sperme.....	14
III.2.1.3 Tests préliminaires ou tests indicatifs.....	15

III.2.1.3.1 Examen optique.....	16
III.2.1.3.2 Examen chimique à la phosphatase acide .....	16
III.2.1.3.3 Test de confirmation à la PSA.....	16
III.2.1.4 Extraction d'ADN avec le kit Qiagen .....	18
III.2.1.5. Quantification de l'ADN par la PCR en temps réel.....	18
III.2.1.6 L'amplification des échantillons d'ADN .....	21
III.2.1.7 Amplification par PCR multiplexe .....	21
III.2.1.8 Post PCR.....	24
III.2.1.9 Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse capillaire.....	24
III.2.1.10 Validation des données brutes .....	26
IV.1 Résultats.....	27
IV.1.1 Qualité du sperme collecté .....	27
IV.1.2 Tests préliminaires.....	27
IV.1.2.1 Examen optique .....	27
IV.1.2.2 Examen chimique à la phosphatase acide (PA).....	28
IV.1.2.3 Test de confirmation à la PSA.....	29
IV.1.3 Quantification de l'ADN par q-PCR.....	31
IV.1.4 Génotypage.....	32
IV. Discussion .....	43
V. Conclusion .....	45
Références bibliographiques.....	46
Annexe	
Glossaire	

## **I. INTRODUCTION**

La criminalistique que l'on appelle aujourd'hui sciences forensiques (de l'anglais forensic, équivalent de médecine légale) est devenue incontournable, du début de l'enquête sur la scène de crime jusqu'au verdict ainsi que tout au long de l'instruction (Lafargue, 2007). Cependant, cette discipline ne se limite plus à la résolution des affaires criminelles, mais elle est largement sollicitée dans d'autres événements comme les catastrophes naturelles ou autres (crash d'avion par exemple) pour l'identification des individus (Thomsen, 2017). Parmi les délits et les crimes traités dans le domaine de la criminalistique, figurent les agressions sexuelles définies comme des gestes à caractère sexuel, avec ou sans contact physique, commis par un individu sans le consentement de la personne visée ou, dans certains cas, notamment dans celui des enfants, par une manipulation affective ou par chantage. En Algérie, dans une étude réalisée en 2014, il a été rapporté que la tranche d'âge la plus exposée aux agressions sexuelles est celle comprise entre 12 et 18 ans avec un pourcentage de 61,1%. Les victimes âgées de moins de 7-12 ans représentaient 25,9% des mineurs également (Djaghmoune, 2017). Ce type d'agressions nécessite l'intervention de la police scientifique dont le travail consiste à analyser les traces de sperme trouvées sur la scène du crime. En 1985, Sir Alec Jeffreys démontra que l'ADN contenait des séquences répétitives dont le nombre de répétitions est variable d'une personne à l'autre. Cette découverte fut appliquée dès 1986 sur des prélèvements effectués sur deux scènes de crimes. L'analyse ADN ou DNA fingerprint (empreinte génétique) revêt un intérêt en pratique judiciaire pour l'identification d'un suspect à partir d'une trace. Les analyses doivent s'attacher à retrouver des différences, au niveau, soit des unités répétitives ou STR (Short Tandem Repeat) présentes dans l'ADN nucléaire ou par séquençage (ADN mitochondrial).

Dans de nombreux cas d'agression sexuelle, la literie et les vêtements sont des éléments de preuve essentiels à la recherche de taches de sperme afin de recueillir l'ADN de l'agresseur. Dans un but de dissimuler les preuves, souvent, ces objets sont lavés avant d'être saisis et envoyés au laboratoire médico-légal (Brayley-Morris et al., 2015; Noel et al., 2019). Ainsi, notre étude s'est intéressée à l'impact des lavages répétés sur la quantité d'ADN à recueillir et sur la détermination du profil génétique. L'étude a été réalisée dans les locaux de la police scientifique d'Alger et organisée comme suit : préparation des échantillons (pièce de literie), extraction et quantification de l'ADN extrait à partir des échantillons du sperme, amplification par PCR, post-amplification (post-PCR) et enfin génotypage et validation des profils génétiques.

## **II.1 Organisation du génome humain**

Le génome humain est l'ensemble de l'information génétique contenue sous forme d'ADN dans les cellules. Le génome humain est constitué de deux génomes distincts : l'un situé dans le noyau de la cellule (génome nucléaire) réparti sur 23 paires de chromosomes et l'autre situé dans la mitochondrie (génome mitochondrial) constitué d'environ 16500 bases sur un seul chromosome circulaire (May-Panloup *et al.*, 2006). Chez l'homme, la taille du génome nucléaire a été estimée à environ 3.300.551.249 paires de bases (pb) (environ 3,3 giga-bases) et dans lequel on peut distinguer la partie codante constituée de gènes (20 à 25000), les pseudogènes (14427) et les séquences non codantes (introns et ADN intergénique) (Lamoril and Bogard, 2013). Chez l'homme, les séquences codantes représentent moins de 5% du génome (Lander *et al.*, 2001). Dans les 95% du génome non codant se trouve la majorité des polymorphismes (Figure 1) (Daniel and Walsh, 2006; Kashyap *et al.*, 2004; Longy, 2001) qui peuvent être classés comme suit:

- a) Les polymorphismes dans les régions codantes.
- b) Les polymorphismes dans les régions non codantes et qui comprennent :
  - Minisatellites (ou VNTR: Variable Number Tandem Repeats).
  - Microsatellites (ou STR: Short Tandem Repeats).
  - Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) ou polymorphismes bi-alléliques.

## **II.2 Les polymorphismes et l'empreinte génétique**

Ces polymorphismes ont été exploités dans l'identification par empreintes génétiques, en raison de leur grande variabilité interindividuelle. Le tableau I représente une comparaison entre les 3 principales classes de polymorphismes existant dans le génome: les minisatellites, les microsatellites et les polymorphismes à un seul nucléotide.

### **II.2.1 Mini satellites (VNTR)**

L'unité répétitive principale des VNTR comprend une séquence de 8 à 80-100 pb de long pouvant se répéter jusqu'à 100 fois de suite. Ceci fait des mini satellites des loci hautement polymorphes et de puissants marqueurs d'identification (Butler, 2012a; Daniel and Walsh, 2006; Kashyap *et al.*, 2004). Cependant, en raison de leur taille importante, des difficultés peuvent survenir lors de l'analyse médico-légale (Daniel and Walsh, 2006). En utilisant des enzymes de restriction spécifiques aux sites adjacents au VNTR, des fragments de longueurs variables chez différents individus peuvent être obtenus car le nombre de répétitions varie considérablement d'une personne à l'autre (Butler, 2012a; Kashyap *et al.*, 2004).

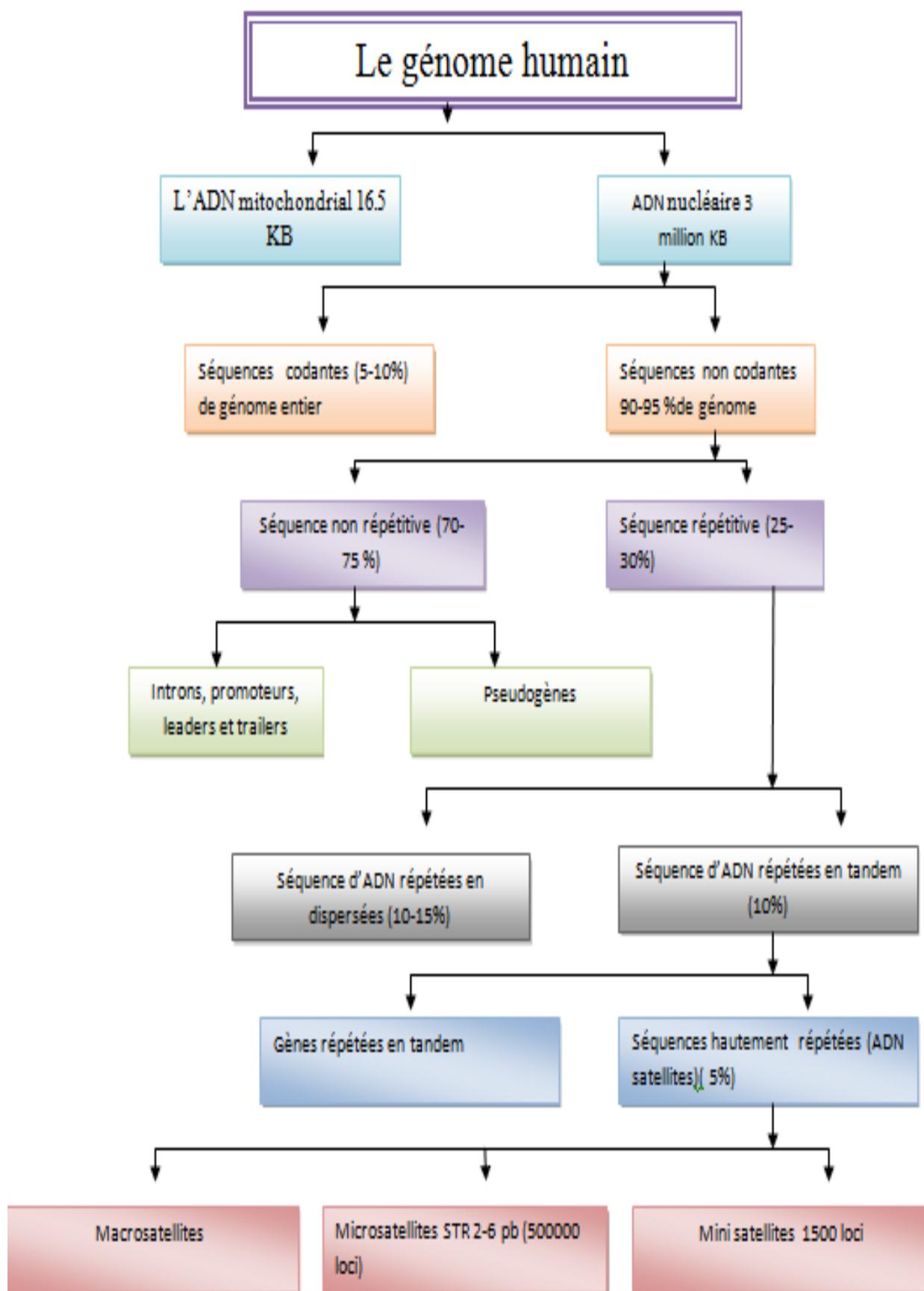


Figure 1: L'organisation du génome humain (Kashyap et al., 2004)

Tableau I: Types de polymorphisme d'ADN et leurs principales caractéristiques (Daniel and Walsh, 2006; Ku et al., 2010).

Type de polymorphisme	Taille du locus	Nombre d'allèles	Nombre de loci par génome	Taux de mutations par méiose	Exemple de séquences
Minisatellites (VNTR)	1- 20 kb	2 à 50	30000	Environ $10^{-3}$	CCG (TAGCAAGGA) <sub>n</sub> n = nombre de répétitions
Microsatellites (STR)	30 - 300pb	2 à 20	200000	Environ $10^{-3}$	CCG(TAG) <sub>n</sub> CAA GGA n = nombre de répétitions
Polymorphismes bi-alléliques (SNP)	1pb	2	10 millions	Environ $10^{-8}$	Substitution de G par A CCG TA(A) CAA GGA Autres substitutions possibles: A/G, C/T, A/T, C/G, T/G, A/C

## II.2.2 Microsatellites (STR)

Les microsatellites ou STR, comme leur nom l'indique, sont des versions plus petites des minisatellites. Les microsatellites forment les régions d'ADN avec des unités répétitives de 2 à 8 pb (Daniel and Walsh, 2006). Les STR sont des marqueurs très utilisés car ils sont facilement amplifiables par PCR (Polymerase Chain Reaction). Le nombre de répétitions des marqueurs STR peut présenter des variations interindividuelles importantes, ce qui fait des STR des marqueurs efficaces pour une identification des individus. Des milliers de microsatellites polymorphes ont été décrits dans l'ADN humain. Les microsatellites représentent environ 3% du génome humain total (Lander *et al.*, 2001) et sont dispersés dans le génome apparaissant en moyenne tous les 10000 nucléotides (Butler, 2012b). Les différentes catégories de STR sont désignées en fonction du nombre de nucléotides constituant le motif de base répété : les mono-nucléotides, les di-nucléotides (deux nucléotides répétés), les tri-nucléotides (trois nucléotides dans l'unité de répétition), les tétranucléotides (quatre nucléotides dans l'unité de répétition), les penta-nucléotides (cinq nucléotides dans l'unité de répétition) et les hexa-nucléotides (six nucléotides dans l'unité de répétition). Théoriquement, il existe 4, 16, 64, 256, 1024 et 4096 motifs possibles pour les répétitions mono-, di-, tri-, tétra-, penta- et hexa-nucléotidiques, respectivement. Cependant, les séquences répétées de 5 et 6 nucléotides sont moins fréquentes dans le génome humain

(Butler, 2012b). Les répétitions qui constituent le motif peuvent être uniques, il s'agit de microsatellites parfaits (Kashyap *et al.*, 2004).

Les répétitions di-nucléotidiques les plus fréquemment rencontrées sont de type AC et AT ; elles représentent respectivement 50 et 35% des séquences répétitives di-nucléotidiques. Les séquences répétées de type AG (15%) sont moins fréquentes, alors que les séquences GC ne représentent que 0,1%. Les séquences répétées tri-nucléotidiques les plus fréquentes sont de type AAT et AAC (33% et 21%, respectivement) ; les autres ACC (4%), AGC (2,2%), ACT (1,4%) et ACG (0,1%) sont relativement rares. Cependant, les séquences répétitives di-nucléotidiques sont plus fréquentes que les séquences tri-nucléotidiques (Lander *et al.*, 2001). D'autre part, selon la structure de répétition, les STR sont classés en microsatellites parfaits et microsatellites imparfaits (Fan and Chu, 2007).

La petite taille des allèles STR (environ 100 pb à 400 pb) par rapport aux allèles des VNTR (environ 400 pb à 1000 pb) fait des STR de meilleurs candidats pour une utilisation dans le domaine médico-légal dans le cas où l'ADN est dégradé (Butler, 2012b). Depuis près de 30 ans, les variations génétiques recherchées concernent les microsatellites. Le locus STR est nommé, par exemple, D3S1266, où D représente l'ADN, 3 le chromosome 3 sur lequel le locus STR est localisé, S représente STR et 1266 l'identifiant (Fan and Chu, 2007).

### **II.2.3 Single Nucleotide Polymorphisme. (SNP)**

Un SNP ou encore appelé polymorphisme bi-allélique, il s'agit de polymorphisme touchant un seul nucléotide, qui correspond à la substitution d'un nucléotide par un autre dans la séquence d'ADN. Pour distinguer ces polymorphismes d'une mutation ponctuelle, l'allèle minoritaire du SNP doit avoir une fréquence supérieure ou égale à 1% dans la population (Daniel and Walsh, 2006; Ku *et al.*, 2010).

Le SNP est le polymorphisme le plus abondant dans le génome humain en terme de nombre. Plus de 1,4 million de polymorphismes ponctuels (SNP) ont été identifiés dans le génome humain (Lander *et al.*, 2001). Ils représentent 90 % de l'ensemble des variants génétiques (Courivaud *et al.*, 2012; Daniel and Walsh, 2006). De ce fait, il a été identifié plus de neuf millions de SNP (Courivaud *et al.*, 2012). Chez un individu, il existe des millions de SNP et par conséquent, ils pourraient être utilisés pour différencier les individus les uns des autres, comme ils sont utilisés dans les études de liaison dans le cas des maladies génétiques (Butler, 2012d; Longy, 2001). Ils se produisent à un intervalle d'environ un SNP par kilo-base lorsque les séquences d'ADN de deux individus quelconques sont comparées (Ku *et al.*, 2010).

Les SNP peuvent être classés en différentes catégories, en fonction de la modification nucléotidique (Courivaud *et al.*, 2012):

- Les SNP non codants qui se situent dans les régions 5' ou 3' non transcrites, dans les régions 5' ou 3' non traduites, dans les introns ou dans les régions inter-géniques.
- Les SNP codants qui peuvent être des polymorphismes de substitution (qui aboutissent à une modification de l'acide aminé), ou des polymorphismes silencieux où l'acide aminé ne change pas.

Les SNP ont été considérés comme des marqueurs génétiques potentiels dans le domaine médico-légal. Ils peuvent servir dans la récupération d'informations à partir d'ADN dégradé, en raison de leurs produits d'amplification qui sont de courtes séquences (moins de 100pb) contrairement aux STR dont les amplicons peuvent aller de 300 à 400pb (Butler, 2012d). Comme ils peuvent servir à prédire l'origine ethnique et certains traits physiques ou phénotypes (Butler *et al.*, 2007).

Cependant, la grande majorité des SNP sont bi-alléliques (ils ont deux allèles possibles et donc trois génotypes possibles). Ainsi, un seul SNP bi-allélique fournit moins d'informations qu'un marqueur STR multi-allélique. Il est donc nécessaire d'analyser un plus grand nombre de SNP pour obtenir un pouvoir discriminant élevé que pour les loci STR possédant plusieurs allèles (Butler, 2012d; Laurent *et al.*, 2017).

Les polymorphismes de type RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*) étaient utilisés en criminologie et mis en évidence par la technique de Southern Blot en utilisant des enzymes de restriction et des sondes radioactives (Laperche *et al.*, 1991).

### **II.3 Profils génétiques en criminalistique**

Les grands domaines d'application des empreintes génétiques sont la criminalistique, la recherche de parenté, l'identification des victimes de catastrophes et les agressions sexuelles, en se basant sur les polymorphismes ou marqueurs génétiques. Un marqueur génétique est défini par plusieurs critères:

- Sa transmission mendélienne.
- Son caractère stable au cours de la vie d'un individu.
- Son grand polymorphisme, c'est-à-dire la présence d'un grand nombre d'allèles.
- Son fort taux d'hétérozygotie (Mansuet-Lupo *et al.*, 2008).

#### **II.3.1 Historique de l'analyse ADN en pratique judiciaire**

Les principales dates ayant marqué le développement de l'analyse ADN dans le domaine médico-légal sont les suivantes :

- 1985 : Développement par Sir Alec Jeffreys des premières analyses d'identification.
- 1987 : Création de laboratoires pour les analyses de routine (Angleterre, USA).

- 1988 : Développement d'une nouvelle méthode d'analyse de l'ADN grâce à des sondes (mono-locus).
- 1991 : Développement des analyses des STR.
- 1993 : Mise en place du premier kit commercial d'analyses des STR.
- 1995 : Développement du premier analyseur de STR en fluorescence : ABI 310.
- 1996 : Développement de l'analyse de l'ADN mitochondrial.
- 2000 : Développement de kits commerciaux analysant 16 STR en simultanée.
- 2001 : Développement de l'analyse du Chromosome Y.
- 2002 : Développement de la recherche sur les SNP.
- 2005 : Développement de kits commerciaux sur l'analyse du Chromosome Y.
- 2010 : Développement de séquenceurs de seconde génération (Doutremepuich, 2012).

### **II.3.2 Démarche analytique pour l'obtention d'un profil génétique en criminalistique**

Des profils d'ADN pouvaient être générés à partir d'objets touchés et ce depuis 1997 (Sankhla and Kumar, 2017). Cela a ouvert des possibilités et a conduit à la collecte d'ADN auprès d'un large éventail d'expositions (outils, couteaux , vêtements, véhicules, armes à feu, aliments, literie, préservatifs, cosmétiques pour les lèvres, portefeuilles, bijoux, verre, peau, papier, câbles, fenêtres, portes et pierres ) (van Oorschot *et al.*, 2010). Ainsi, les laboratoires de police scientifique réalisent l'extraction de l'ADN à partir de tout type de matrices biologiques, qu'elles soient des traces riches (sang, sperme, salive) ou pauvres en ADN (traces de contact contenant des cellules épithéliales, éléments pileux, os, pellicules capillaires, sueur, excréments, etc...) (Laurent *et al.*, 2017).

Plusieurs étapes sont suivies avant d'établir l'identification génétique d'un individu :

- La recherche de la trace et les prélèvements sont généralement effectués sur la scène d'infraction.
- La détermination de la nature de la trace jusqu'à l'obtention de profils génétiques se déroulent au laboratoire.

#### **II.3.2.1 Sources biologiques de l'ADN dans le domaine médico-légal**

##### **a) Le sang**

C'est un tissu liquide dans lequel baignent de nombreuses cellules. Tout l'ADN présent dans le sang provient de globules blancs. Le sang est la trace biologique traditionnelle par excellence et ne pose pas de problèmes. Avec les analyses par amplification d'ADN, toute trace de sang visible à l'œil nu peut être analysée (Coquoz and Taroni, 2006).

### b) Le sperme

Il s'agit d'un fluide ou plasma séminal contenant en suspension des spermatozoïdes. Hormis les cas d'azoospermie, la densité du sperme en spermatozoïdes est en moyenne de 100000 cellules/ $\mu\text{l}$ . Il est donc très riche en ADN. Une trace de sperme devrait en principe fournir un résultat à l'analyse. D'autres cellules comme les cellules épithéliales et les leucocytes sont également présentes dans le sperme, ce qui permet d'envisager l'obtention d'un profil ADN parmi ces cellules (Coquoz and Taroni, 2006).

### c) La salive

C'est un liquide contenant diverses enzymes capables de débiter la digestion des aliments. Ce liquide contient en outre quelque cellules buccales (quelques centaines de cellules par  $\mu\text{l}$ ). Les traces de salive contiennent toutefois très peu de matériel biologique. Elles font partie des traces biologiques modernes, qui n'ont commencé à être exploitées à large échelle que depuis l'arrivée des analyses d'ADN utilisant la PCR (Coquoz and Taroni, 2006).

### d) Les os et les dents

Ils ne sont en principe pas retrouvés comme trace, et servent à l'identification de cadavres. L'ADN des os et des dents se conserve longtemps même après le décès, et même si le cadavre a subi des dommages graves (Coquoz and Taroni, 2006).

### e) Les cheveux et les poils

Ils constituent une catégorie d'échantillons qui a été exploitée dès l'introduction de la microscopie en police scientifique. La microscopie permet des examens morphologiques étendus des cheveux. L'examen morphologique garde néanmoins une utilité indéniable pour trier les cheveux et donc économiser des analyses d'ADN sur des cheveux ne correspondant pas aux suspects ou pour sélectionner les cheveux ayant des chances raisonnables de fournir un profil ADN. L'ADN retrouvé dans les cheveux provient de leur racine. Les tiges des cheveux sont du matériel mort dans lequel on ne trouve au mieux que très peu d'ADN très fortement dégradé (Coquoz and Taroni, 2006).

### f) L'urine

C'est un liquide contenant toutes les substances dont le corps se débarrasse et contient également des cellules. L'urine n'est pas une très bonne source d'ADN, mais une analyse est toujours souhaitée (Coquoz and Taroni, 2006).

### g) Les ongles

Ils constituent une bonne source d'ADN et sont rarement retrouvés comme traces. Leur intérêt réside dans le fait qu'on peut retrouver des cellules de l'agresseur sous les ongles de la victime. Dans ces cas, il est souvent difficile d'extraire l'ADN étranger sans extraire en même temps l'ADN des ongles (Coquoz and Taroni, 2006).

#### II.3.2.2 Détection des traces

Avec les progrès réalisés dans les techniques de biologie moléculaire, il est devenu possible d'obtenir des résultats à partir de traces invisibles et présumées pauvres telles que les traces de contact. Afin d'améliorer le ciblage des zones à prélever, différents outils et différentes techniques ont donc été développés (source de lumière alternative (ALS) ou le test à la phosphatase acide (AP) (Khaldi *et al.*, 2004).

#### II.3.2.3 Prélèvement

Le prélèvement de la trace, consiste dans le transfert du matériel biologique sur un support directement exploitable au laboratoire (Pham-Hoai *et al.*, 2017; van Oorschot *et al.*, 2010). Il est courant d'utiliser une technique de double écouvillonnage pour une meilleure récupération de l'ADN (van Oorschot *et al.*, 2010). Au cours d'une agression sexuelle, généralement les traces de sperme forment des taches sur des surfaces à découper comme les draps faciles à transporter au laboratoire. Lorsque les taches de sperme sont détectées sur des surfaces solides, le prélèvement se fait à l'aide d'un écouvillon humidifié avec de l'eau stérile et que l'on frotte ensuite sur la trace (Hellerud *et al.*, 2011; Noel *et al.*, 2019).

#### II.3.2.4 Extraction et purification de l'ADN

Si un écouvillon est utilisé pour collecter du matériel biologique, la quantité d'ADN récupérée est faible à partir d'un écouvillon sec par rapport à un écouvillon humide. Dans certains laboratoires, il est maintenant courant de congeler les écouvillons immédiatement après la collecte (van Oorschot *et al.*, 2010). L'extraction consiste en un traitement chimique des échantillons qui permet de lyser les cellules et solubiliser l'ADN (Pham-Hoai *et al.*, 2017).

Dans le domaine légal, pendant plusieurs années, l'extraction d'ADN était basée sur des techniques utilisant des solvants organiques et la résine au Chelex 100. Cependant, ces techniques peuvent conduire à des pertes d'ADN pouvant atteindre 75%. Ainsi, ces techniques sont délaissées depuis les années 1990 au profit de kits disponibles dans le commerce, optimisés pour des types d'échantillons spécifiques (van Oorschot *et al.*, 2010).

### II.3.2.5 Quantification

Bien qu'il ne semble pas toujours nécessaire de quantifier l'ADN étant donné la faible concentration attendue, cette information peut être utile au moment d'interpréter les résultats. De plus les échantillons issus du prélèvement de traces de contact ne sont pas toujours pauvres en ADN (Pham-Hoai *et al.*, 2017; van Oorschot *et al.*, 2010). Selon la nature, la fréquence et la durée du contact, des dizaines ou des centaines de nanogrammes d'ADN peuvent être récupérées. Comme il a été rapporté que des concentrations nulles d'ADN ne devraient pas empêcher le traitement en aval des échantillons obtenus à partir de traces, puisque des profils STR partiels, voire complets, à 9 loci ont pu être obtenus avec ces échantillons (van Oorschot *et al.*, 2010).

### II.3.2.6 Génotypage

La dernière étape dite de génotypage consiste en une migration différentielle des amplicons dans des capillaires contenant une solution de polymère (électrophorèse capillaire). Ceux-ci sont de ce fait séparés en fonction de leur taille (Laurent *et al.*, 2017; Westen *et al.*, 2009). Les variations recherchées pour l'identification par empreinte génétique impliquent les STR. Ils sont amplifiés par PCR multiplexe à l'aide d'amorces spécifiques dont l'une est couplée à un fluorochrome. Les amplicons ainsi obtenus sont ensuite séparés et détectés par électrophorèse capillaire. Les résultats sont représentés par des pics de fluorescence dont la position sur l'axe des abscisses correspond à la taille du fragment amplifié, constitué du STR et des régions flanquantes (Laurent *et al.*, 2017).

Plusieurs types de profils peuvent être obtenus (Pham-Hoai *et al.*, 2017):

- Les profils simples.
- Les mélanges exploitables.
- Les mélanges non exploitables.
- Les profils partiels.

Une dernière étape consiste à interpréter les différents profils obtenus par un expert et à les comparer à une base de données intairne (Figure 2) (Laurent *et al.*, 2017).

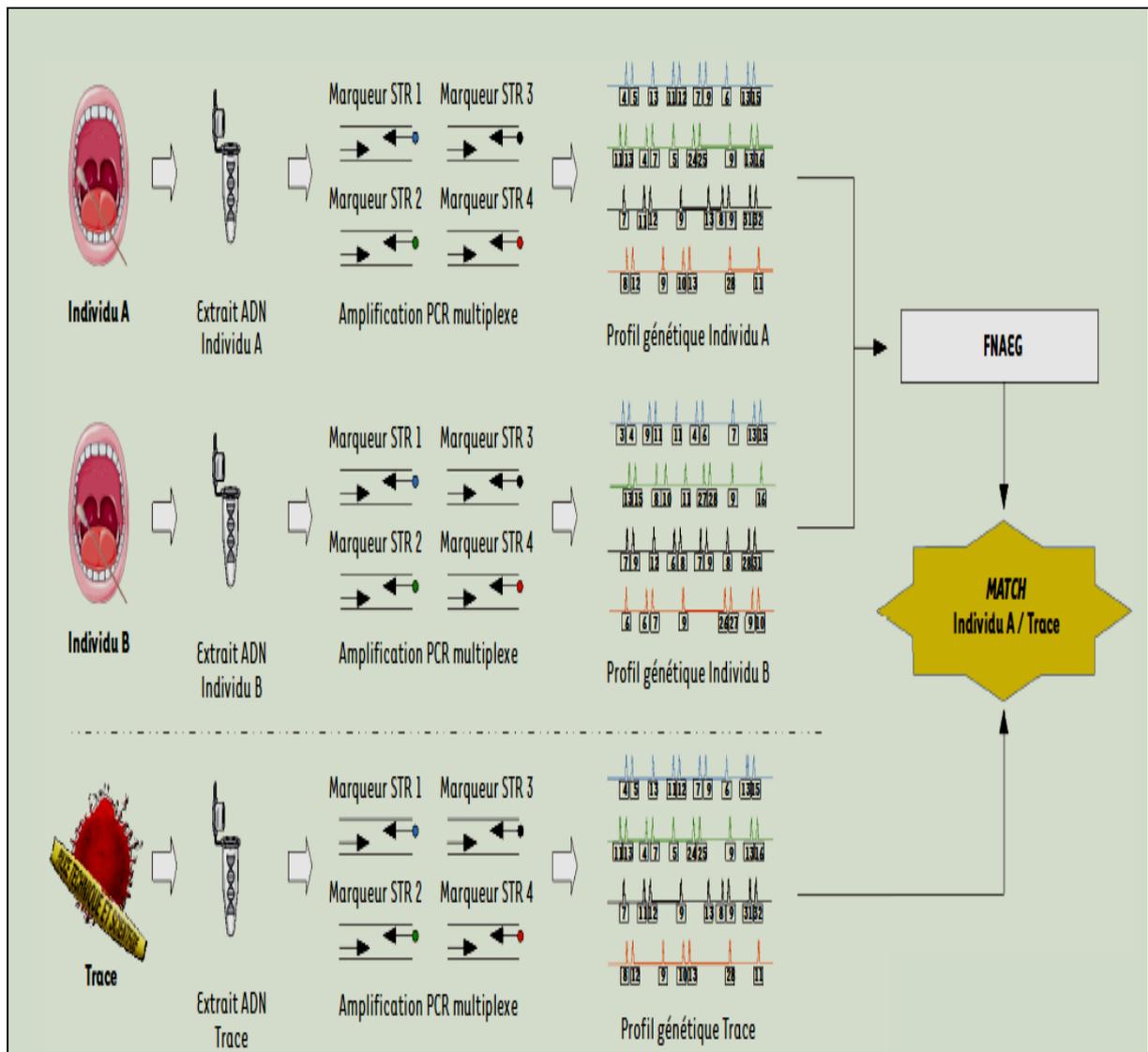


Figure 2 : Principe de l'identification génétique par établissement d'un profil génétique STR. (Laurent et al., 2017)

Dans une enquête criminelle, l'analyse de plusieurs marqueurs génétiques aboutit à l'établissement d'un profil génétique sur la base duquel le suspect sera retenu ou innocenté.

## III.1 Matériel

### III.1.1 Matériel biologique

Pour la réalisation de cette étude, le matériel biologique utilisé est le sperme provenant d'un seul donneur à partir d'un laboratoire médical, sous anonymat. La présence de spermatozoïdes dans le sperme a été vérifiée avant l'utilisation de celui-ci dans le reste des manipulations.

### III.1.2 Matériel non biologique

#### - Détergents

Quatre détergents différents ont été utilisés lors de cette étude. Il s'agit de détergents fabriqués localement et les plus utilisés au quotidien pour le lavage du linge (Figure 1):

- Un détergent liquide (Eau de Javel Bref à 15°).
- Un détergent solide (savon Test ou savon de Marseille pour le lavage manuel).
- Deux détergents en poudre (le Chat et Ariel pour lavage en machine à laver).



A : l'eau de javel

B : savon de Marseille



C : le chat

D : Ariel

Figure 3 : Les détergents utilisés

#### - Draps

Le drap utilisé est neuf de couleur blanche et fait de coton 100%.

## III.2 Méthodes

Pour le génotypage à partir du sperme recueilli, chaque étape a été réalisée dans une salle différente afin de limiter le risque des contaminations (tableau 1). Chaque salle contient les équipements nécessaires et spécifiques de chaque étape d'analyse qui sont résumés dans le tableau II

Tableau II : Différents lieux pour la réalisation de l'analyse

Salles	Etapés réalisées
Salle d'examen des scellés	Vérification de la qualité du sperme
	Obtention des taches de sperme.
	Tests préliminaires
Salle de préparation des solutions	Examen optique
Salles (deux) pour la manipulation de l'ADN	Extraction de l'ADN
	Quantification de l'ADN
Salles blanches (trois)	PCR
	Post-PCR
	Electrophorèse capillaire

### III.2.1 Processus analytique

Pour la détermination du profil génétique à partir des traces de sperme, avant et après lavages, plusieurs étapes ont été suivies :

1. Vérification de la qualité du sperme.
2. Obtention des taches de sperme.
3. Tests préliminaires :
  - Test optique.
  - Test chimique.
  - Test de confirmation.
4. Extraction de l'ADN à partir des taches de sperme.
5. Quantification de l'ADN extrait par PCR en temps réel.
6. Amplification de l'ADN extrait par PCR multiplexe.
7. Post-PCR.
8. Electrophorèse capillaire.
9. Validation des profils obtenus.

### III.2.1.1 Vérification du sperme recueilli

Le sperme obtenu à partir d'un laboratoire médical, sous anonymat a été d'abord vérifié pour la présence de spermatozoïdes et leur nombre.

La recherche des spermatozoïdes se fait par une observation au microscope photonique après la coloration de Christmas tree (P Allery *et al.*, 2001). Elle utilise deux colorants :

- Nuclear Fast Red Stain (colorant A) : colore les têtes des spermatozoïdes en rose.
- Picoindigocarmine Stain (colorant B) : colore les flagelles en vert.

Un frottis a été réalisé avec 6 µl de sperme. Après le séchage sur la plaque chauffante (56°C pendant 5 min), on ajoute 3 gouttes de Fast Red Stain et on laisse sécher (5 à 20 min à température ambiante). Les lames sont ensuite rincées à l'eau et séchées. Enfin, on dépose 3 gouttes du réactif Picoindigocarmine Stain qu'on laisse agir pendant 15 à 30 secondes avant de rincer à l'éthanol à 95%. Après séchage, l'observation se fait au microscope photonique (Wheeler and Wilson, 2013).

### III.2.1.2 Obtention des taches de sperme

Le sperme a été réparti sur un drap blanc. Pour cela, il a été d'abord rincé deux fois pour éliminer le traitement de surface du tissu et permettre au sperme d'être absorbé plus profondément dans le tissu (Noel *et al.*, 2019). Le drap est ensuite coupé en cinq carrés de 15 cm/15cm. Sur 4 carrés (A, B, C et D), le sperme (10µl) partage dans 4 endroits différents pour l'obtention de 4 taches (diamètre d'environ 1,5 mm). Sur un carré, une seule tache a été faite (figure 4).

Les morceaux de draps sont séchés pendant 24 heures, sous une hotte afin d'éviter toute contamination.

Le carré avec une seule tache sert de témoin positif et ne subit aucun lavage aux détergents.

Les autres carrés, A, B, C et D, ont été lavés manuellement avec l'eau courante avec les détergents cités précédemment (pour chaque carré un détergent).

Après chaque lavage, les carrés de drap sont séchés pendant 24 heures à température ambiante. Après séchage, un petit morceau contenant les taches est découpé pour réaliser les différents tests.

Le reste du carré subit un autre lavage. Cette procédure est répétée quatre fois.



Figure 4 : Les taches réalisées sur un drap

### III.2.1.3 Tests préliminaires ou tests indicatifs

Ce sont des tests qui permettent d'attester la présence de la trace biologique. Ils comportent :

- Un examen optique au crimescope.
- Un examen chimique à la phosphatase acide.
- Un test de confirmation à la PSA (Prostate-Specific Antigen).

Le premier test se fait directement sur les carrés de drap, alors que les autres tests se font sur un macérât obtenu à partir des taches de sperme.

### Préparation du macérât

Après lavage et séchage (1), la tache du tissu analysé est découpée puis placée dans un microtube auquel sont additionnés 400µl ultapure (2). La macération se fait à température ambiante pendant 2 heures afin de récupérer un maximum de spermatozoïdes. Le macérât est ensuite transféré dans un autre tube après centrifugation (16000 rpm pendant 6 min) (3) (Figure 5).

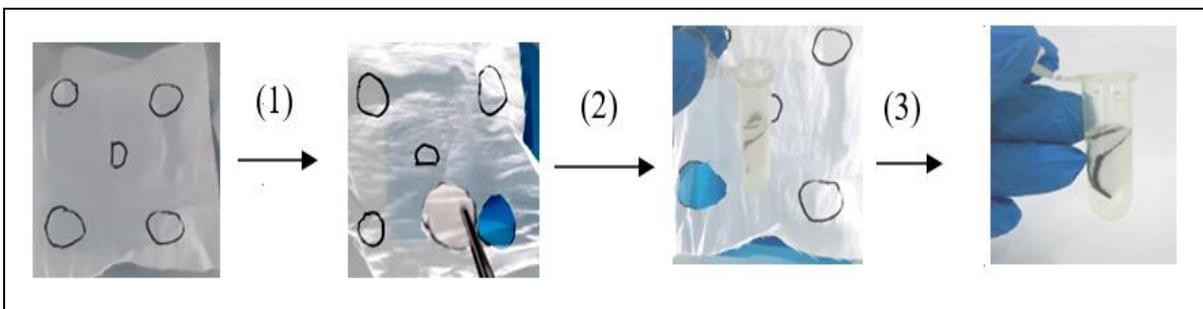


Figure 5 : Schéma des différentes étapes de macération

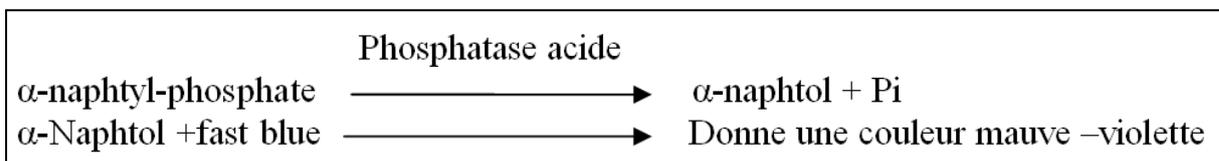
### III.2.1.3.1 Examen optique

C'est la première étape pour la détection de l'emplacement des taches de sperme sur le tissu par l'utilisation d'un crimescope, un appareil capable de produire une lumière bleue à 490 nm pour vérifier la présence des taches de sperme qui émet une fluorescence à cause des flavines. Ainsi, avant de procéder au découpage des taches, il est nécessaire de réaliser ce test. Cependant, la présence de la fluorescence n'indique pas toujours la présence de sperme. En effet, certaines bactéries, l'urée et la salive sont capables d'émettre la même fluorescence.

### III.2.1.3.2 Examen chimique à la phosphatase acide

#### a) Principe

Certaines substances ne se rencontrent quasiment que dans le sperme et peuvent être détectées par un teste colorimétrique. La phosphatase acide (AP) est une enzyme en concentration particulièrement élevée dans le sperme. Cette propriété est exploitée dans les tests indicatifs pour sa détection, en utilisant des composés du phosphate conduisant à la formation d'un produit coloré lors de la décomposition catalysée par l'enzyme. La méthode est basée sur l'hydrolyse de  $\alpha$ -Naphthyl phosphate au pH 5,0 par l'AP produisant le  $\alpha$ -naphthol et le phosphate inorganique selon la réaction suivante :



#### b) Mode opératoire

Pour la détection des traces de sperme, 50 $\mu$ l d'une solution  $\alpha$ -naphthyl-phosphate sont ajoutés à 50 $\mu$ l de macérât. Après agitation, l'incubation se fait à température ambiante pendant 15minutes. Ensuite, 50 $\mu$ l de la solution fast blue sont additionnés et l'observation se fait à l'œil nu. La présence de sperme se traduit par l'apparition d'une couleur mauve.

### III.2.1.3.3 Test de confirmation à la PSA

#### a) Principe

Dans le domaine forensique, la recherche de l'antigène prostatique spécifique (Prostate-Specific Antigen, PSA) ou protéine p30 est devenue la méthode de choix pour la détection du sperme, en particulier en absence du sperme lors des agressions sexuelles (Healy *et al.*, 2007). La détection de la protéine p30 se fait par le test sur membrane de PSA (PSA Membrane Test

Assays). Elle est sécrétée dans le sperme exclusivement par le tissu prostatique. Elle est présente dans le liquide séminal à une concentration allant de 0,5 à 3 mg/ml.

Le test est basé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-PSA conjugués à un colorant et avec affinité se fixer à la PSA humaine (Figure 6). Les complexes antigène-anticorps obtenus migrent à travers la membrane vers la zone de réaction où se trouvent des anticorps polyclonaux anti-PSA immobilisés. Le complexe antigène-anticorps avec les particules colorées entraînent la formation d'une ligne indiquant la présence de la PSA humaine.

Les anticorps monoclonaux mobiles non liés à la PSA humaine migrent sur la membrane vers une zone de contrôle dans laquelle résident les anticorps anti-Ig immobilisés (figure 6). Un complexe se forme et s'accompagne également de la formation d'une ligne. Le test est considéré comme valide quand une ligne dans la zone de contrôle est observée. Ainsi, la région du contrôle (C) et la région standard interne (i) sont indépendantes de la présence de PSA dans les échantillons biologiques.

Des kits commerciaux ont été développés et validés pour une utilisation médico-légale. La sensibilité de ces kits permet de détecter une valeur aussi faible que 2ng de PSA/ml.

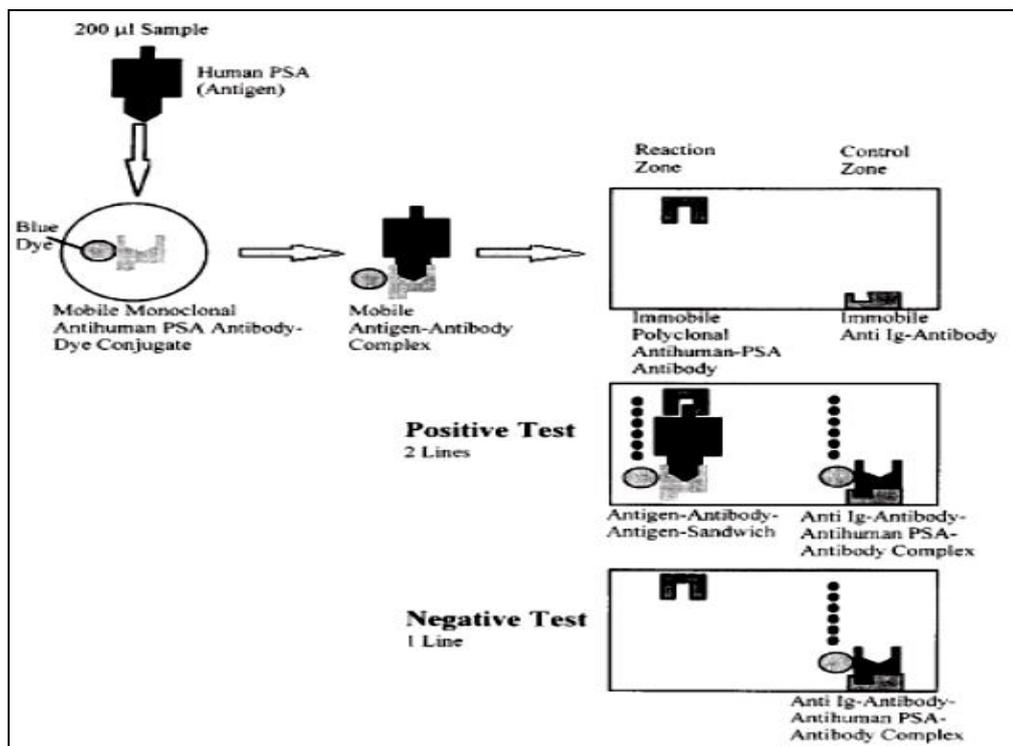


Figure 6 : Schéma du principe de la détection de la PSA (Hochmeister et al., 1999)

### b) Mode opératoire

Le test es réalisé avec 50µl de macérât déposé sur une plaque de test PSA. Après 10 min on observe le résultat.

#### III.2.1.4 Extraction d'ADN avec le kit Qiagen

Le kit Qiagen utilise la technologie des membranes de silice (QIAamp) pour l'extraction et la purification des acides nucléiques. La membrane de silice est chargée positivement et l'ADN est chargé négativement ce qui permet d'assurer une meilleure purification de l'ADN à partir de petits volumes d'échantillons. Les tampons, le pH, les conditions de salinité sont optimisés pour assurer une liaison de l'ADN à la membrane, tandis que les protéines et les contaminants qui peuvent inhiber la PCR sont éliminés par lavage. L'ADN est en suite récupéré par l'utilisation d'un tampon d'élution dans des conditions basiques.

Les étapes d'extraction de l'ADN à partir des taches de sperme ont été réalisées conformément aux instructions du Kit Qiagen (annexe 1). L'ADN récupéré est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

#### III.2.1.5 Quantification de l'ADN par la PCR en temps réel

La PCR en temps réel (real-time PCR, rt-PCR) est une technique qui repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent au cours de la réaction de PCR. Le signal fluorescent est proportionnel à la quantité des produits PCR générés.

##### **a) Principe**

La PCR en temps réel (rt-PCR, q-PCR) peut être réalisée en utilisant une sonde marquée spécifique de la cible dite sonde TaqMan ou un autre fluorochrome qui se lie à l'ADN, le SYBR® Green I. Les résultats sont analysés par un logiciel sous forme de graphes observés directement sur un écran d'ordinateur (Vassias, 2012).

La sonde TaqMan porte à son extrémité 5' un fluorochrome (Reporter) et à son extrémité 3' un Quencher. Le Reporter est une molécule qui émet un signal de fluorescence mesuré à la fin de chaque cycle de PCR à une longueur d'onde spécifique. En absence d'amplification, la sonde reste intacte, le Quencher (suppresseur) absorbe en grande partie la fluorescence du Reporter donc le reporter est réprimé. S'il y a amplification, la sonde TaqMan est hydrolysée lors de l'étape d'élongation de l'ADN par l'activité exonucléasique 5'-3' de l'ADN polymérase. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant l'émission de la fluorescence (Figure 7).

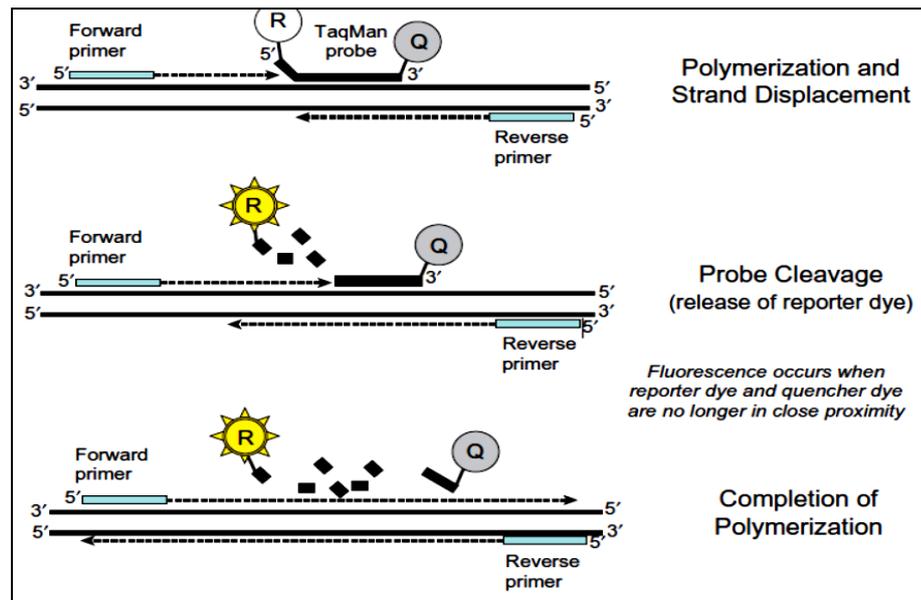


Figure 7: Principe schématisé de l'essai à la sonde TaqMan (Butler, 2012)

La cinétique de la réaction PCR met en jeu 3 phases : une phase d'initiation (amplification non détectable), une phase exponentielle et une phase plateau. La cinétique décrit une courbe sigmoïde (figure 8). En mesurant l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle, il est possible de suivre la formation des produits de PCR pendant la phase exponentielle (phase au cours de laquelle la quantité de produits amplifiés est en corrélation directe avec la quantité initiale de matrice) (Tse and Capeau, 2003; Vassias, 2012).

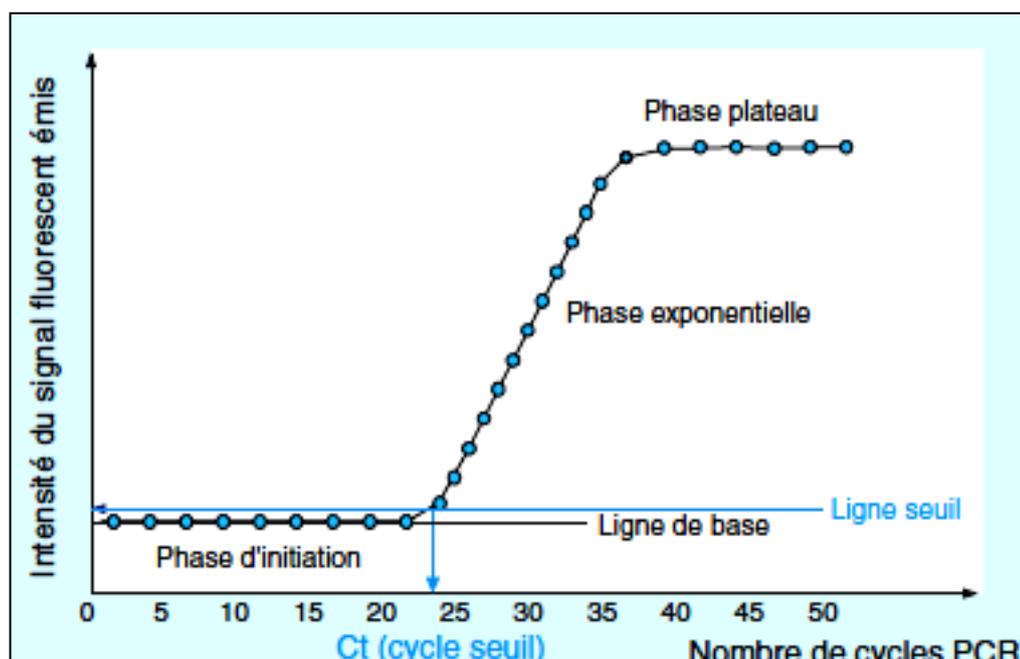


Figure 8 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR quantitative (Tse and Capeau, 2003)

### b) Mode opératoire

La quantification a été réalisée avec un kit (kit Quantifiler, Applied Biosystems™) dont le gène cible est donné dans le tableau ci-dessous. En même temps, une courbe étalon a été réalisée avec une gamme de standards dont les concentrations en ADN sont connues (Annexe 2).

Tableau III : Cible du kit Quantifiler

Kit	Gene cible	Localisation	Longueur d'amplicon	Région amplifiée
Human Quantifiler	Human telomerase reverse transcriptase (hTERT)	5p15.33	62 pb	Intron

Le volume du mix réactionnel est préparé en fonction du nombre des échantillons à analyser, les ADN standards et le témoin négatif (tableau IV).

Le mélange réactionnel est réparti à raison de 23µl par puits. Dans chaque puits, 2 µl de chaque échantillon d'ADN et standard sont ajoutés. La plaque est ensuite recouverte avec du papier adhésif et centrifugée pendant quelques secondes.

Tableau IV : Préparation des mélanges réactionnels

Mélange réactionnel	Volume par réaction de 25µl	Concentration Finale
Mix de: - <i>Taq</i> gold ADN-polymerase, - dNTPs	12,5µl	1N
Mix des primers : - Sonde TaqMan FAM - Amorces spécifiques du gène - Amorces de système IPC (Internal PCR control)	10,5µl	1N
Volume total du mix	23µl	

(N : Nombre de l'échantillon)

### III.2.1.6 L'amplification des échantillons d'ADN

Elle se fait en deux étapes. Après la dénaturation initiale, 40 cycles d'hybridation/extension sont réalisés dans un thermocycleur 7500 Fast, selon les conditions suivantes :

Étapes de la PCR	Température - Durée
Dénaturation initiale	95°C, 10 min incubation initiale
<b>Cycles à deux étapes : 40</b>	
Dénaturation	95°C, 15 secondes
Hybridation/élongation	60°C, 60 secondes

### III.2.1.7 Profilage par amplification par PCR multiplexe

La PCR multiplexe est une variante de la PCR qui permet d'étudier plusieurs STR simultanément en utilisant plusieurs amorces spécifiques des différentes régions d'intérêt. Chacune des amorces étant marquée par un fluorochrome différent permettant d'attribuer un allèle à un système de STR donné (Mansuet-Lupo, 2007).

#### a) Principe

L'amplification par la PCR multiplexe suit les mêmes étapes qu'une PCR basique:

- Une dénaturation initiale des deux brins de l'ADN.
- Plusieurs cycles de 3 étapes : dénaturation, hybridation des amorces et extension.
- Une élongation finale (Henegariu *et al.*, 1997).

Le kit utilisé dans cette PCR permet d'amplifier 15 STR non codant en plus de l'amélogénine pour la détermination du sexe d'un individu, et qui est située dans une région codante (tableau VII). Ce kit utilise un système de 4 colorants fluorescents sur les amorces dans le but de différencier entre les 16 STR en fonction de leur couleur (figure 6).

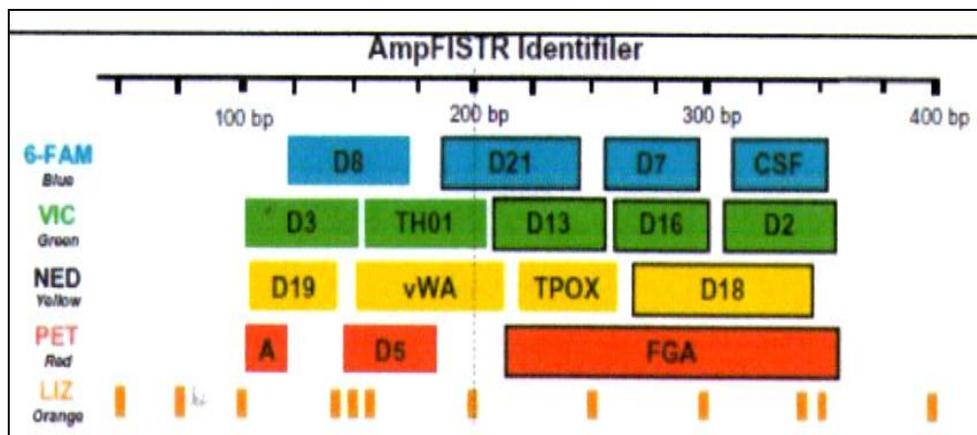


Figure 9: Les marqueurs STR de kit AmpFISTR Identifier et leurs fluorochromes

### b) Mode opératoire

Dans ce cas, la PCR multiplexe est appliquée pour amplifier 16 STR (tableau V). Les STR sont multialléliques et le nombre d'allèles est égal au nombre de répétitions existant au locus considéré.

Pour le bon déroulement de cette PCR, la concentration optimale d'ADN doit être comprise entre 0,05 et 0,1ng/μl. Pour des concentrations élevées, les échantillons doivent être dilués.

Le volume du mélange réactionnel a été calculé en fonction du nombre des échantillons à analyser (tableau VI). Tous les réactifs sont disponibles dans des kits commerciaux, prêts à l'emploi.

En plus des échantillons à analyser, sont également mis à amplifier :

- Un contrôle positif contenant de l'ADN connu (témoin) : c'est un ADN standard du kit qui permet de vérifier que les démarches ultérieures de reconnaissance des allèles fonctionnent, et que la méthode d'analyse permet d'atteindre la sensibilité voulue.
- Un contrôle négatif constitué par un échantillon sans ADN (blanc) afin de vérifier la pureté des réactifs (aucun profil ADN n'est attendu).

Tableau V : Préparation du mélange réactionnel de la PCR multiplexe

Réactifs	Volume
Master mix	$V(\mu\text{l}) = 10 \times N$
Amorces	$V(\mu\text{l}) = 5 \times N$

(N : Nombre d'échantillons)

Le mélange réactionnel est réparti à raison de 15μl par puits. 10μl de chaque échantillon sont ajoutés dans les puits des plaques et mis à amplifier selon les conditions dans le tableau VI.

Tableau VI: Conditions d'amplification au cours de la PCR multiplexe

Hot stat	28 cycles			Extension finale
	Dénaturation	Hybridation	Extension	
95°C	94°C	59°C	72°C	60°C
11 min	1 min	1min	1 min	60 min

Tableau VII : Liste des marqueurs STR déterminés par le kit AmpFISTR Identifier

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

### III.2.1.8 Post PCR

#### a) Principe

Cette étape correspond à la dénaturation des produits d'amplification issus de la PCR multiplexe. La dénaturation est réalisée par addition de formamide suivie d'un choc thermique pour obtenir un ADN monobrin. Cette dénaturation irréversible est nécessaire pour la migration des produits PCR par électrophorèse capillaire.

Au cours de l'étape post-PCR, deux marqueurs de taille doivent être introduits dans chaque échantillon :

- Liz : comporte des fragments d'ADN synthétiques de taille connue (en paires de bases) migrant avec chaque échantillon. Cette échelle permet ainsi de déterminer la taille des fragments par extrapolation.
- Ladder allélique est un mélange d'ADN pré-amplifiés comportant tous les allèles possibles de chaque marqueur génétique (STR).

#### b) Mode opératoire

Dans une première étape, un mélange contenant le formamide (8,7 µl) et le standard de taille (Liz) (0,3µl) a été préparé dans un tube. Après avoir vortexé ce mélange (5 à 10 seconde), il est réparti à raison de 9µl par puits d'une plaque post-amplification de 96 puits. Un volume de 4µl de chaque échantillon amplifié est déposé dans le puits de la plaque post-amplification suivant le plan de dépôt .

Les témoins positif et négatif (1,5µl chacun) ainsi que le ladder (1,5µl) sont déposés en dernier dans les puits correspondants.

La plaque recouverte est ensuite déposée dans un thermocycleur réglé sur le programme de dénaturation, 3 minutes à 95°C. Immédiatement après, la plaque est transférée sur un bac à glace (cryobloc) pendant 3 minutes puis centrifugée (1min, 3000 rpm).

Après ces étapes, les échantillons sont prêts à être analysés par une électrophorèse capillaire.

### III.2.1.9 Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse capillaire

Une dernière étape du génotypage consiste à séparer et à détecter les amplicons obtenus par PCR multiplexe par électrophorèse capillaire. Les résultats sont représentés par des pics de fluorescence dont la position sur l'axe des abscisses correspond à la taille du fragment amplifié, constitué du STR et des régions flanquantes (Laurent et al., 2017).

### a) Principe

La séparation en électrophorèse capillaire repose essentiellement sur la mobilité électrophorétique, le coefficient de partage entre les phases, les constantes d'ionisations et la taille des molécules (Labat L *et al.*, 2000). Les principaux éléments composant un appareil d'électrophorèse capillaire sont :

- Un capillaire en verre étroit, rempli d'une solution d'un polymère visqueux qui agit comme un gel.
- Deux flacons contenant les tampons.
- Deux électrodes connectées à une alimentation haute tension.

Les systèmes d'électrophorèse capillaire contiennent également un autosampler, une source d'excitation laser, un détecteur de fluorescence et un ordinateur pour contrôler l'injection et la détection de l'échantillon (Butler, 2012c).

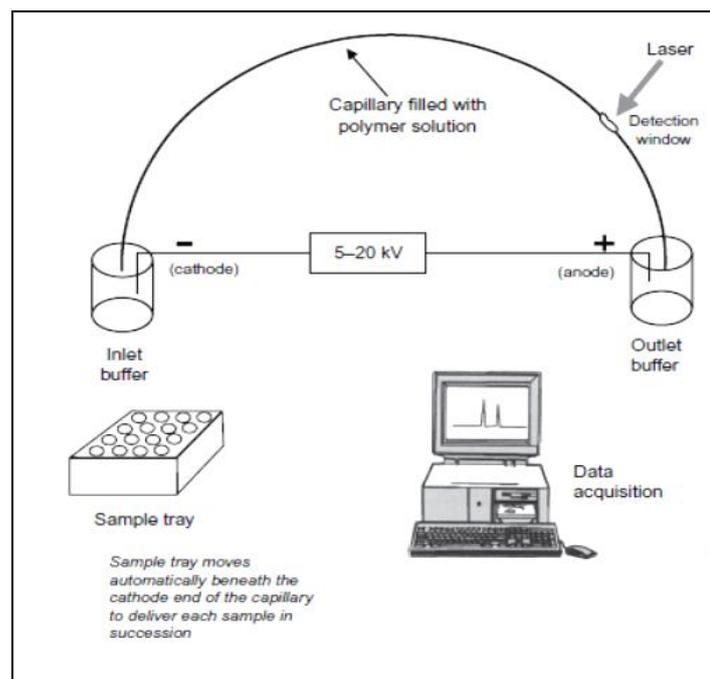


Figure 10 : Schéma du principe d'une électrophorèse capillaire pour l'analyse de l'ADN

(Butler, 2012c)

Les échantillons sont placés dans un plateau et injectés dans le capillaire en appliquant une tension élevée (par exemple 15000 volts) afin de séparer les fragments d'ADN en quelques minutes.

Les produits marqués par un colorant fluorescent sont analysés lorsqu'ils passent par la fenêtre de détection et sont excités par un faisceau laser. L'acquisition informatisée des données permet une analyse rapide et le stockage numérique des résultats de séparation.

### **b) Mode opératoire**

L'électrophorèse capillaire a été réalisée sur un séquenceur ABI Prism 3130XI comprenant 16 capillaires de longueur adaptée au séquençage des fragments (36 cm de longueur et 20µm de diamètre) contenant le polymère POP4 (Performance optimized polymer 4) comme un support de migration. Lors de l'électrophorèse, les monobrinns d'ADN vont migrer sous l'effet d'un champ électrique le long du capillaire de la cathode vers l'anode, selon leurs tailles.

Vers la fin de la migration, les échantillons passent devant une cellule de détection et sont excités par un faisceau laser. Cette excitation provoque la libération de photons (fluorescence) qui sont captés par une caméra CCD (Charge Couple Device). Cet appareil est lié à un ordinateur qui commande le remplissage des capillaires, l'injection des échantillons, la détection et l'analyse de chaque run.

#### III.2.1.10 Validation des données brutes

L'appareil de l'électrophorèse est lié à un ordinateur qui présente les résultats sous forme par d'un profil génétique qui se traduit par des pics caractérisés par leurs position, leur couleurs et aussi par l'intensité de la fluorescence exprimée en RFU (unité fluorescence relative). L'analyse et la validation se ces résultats se fait par un logiciel (Gene Mapper) afin de vérifier certain nombre de critères notamment :

- La vérification de la migration du standard de tailles et en le comparant avec les fragments identifiés (testés).
- La vérification de la migration du ladder en le comparant avec chaque groupe d'allèles identifié.
- La vérification des profils des témoins positif et négatif.

Cette étude a porté sur la recherche de l'impact de plusieurs lavages sur la quantité d'ADN à extraire à partir de taches de sperme et sur la détermination du profil génétique.

### **IV.1 Résultats**

#### **IV.1.1 Qualité du sperme collecté**

L'observation au microscope optique d'un frottis coloré du sperme recueilli à partir d'un donneur a montré la présence de spermatozoïdes. Ainsi, ce sperme a été utilisé pour la réalisation des autres étapes de cette étude.

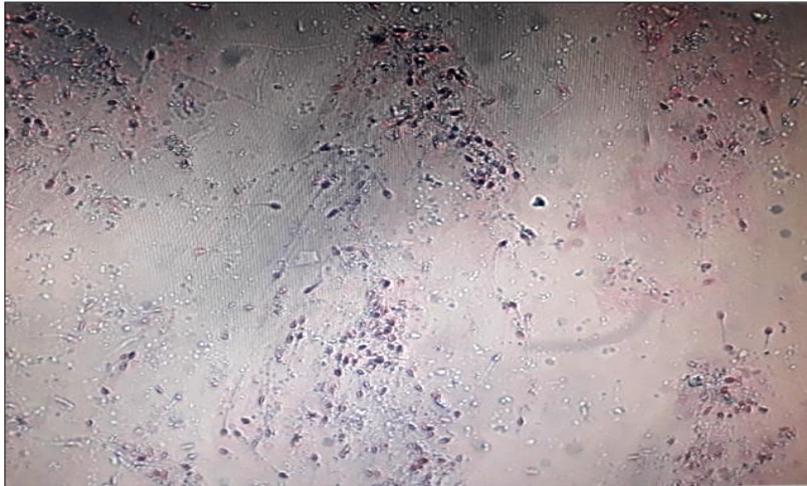


Figure 11 : Observation au microscope photonique d'un frottis de spermes (Gr : 10×40)

#### **IV.1.2 Tests préliminaires**

Ces tests ont été réalisés avant le lavage et après chaque lavage avec les différents détergents testés : eau de javel (A), savon de Marseille (B), savon le Chat (C) et le savon Ariel (D). Quatre lavages ont été effectués (tableau VIII).

##### IV.1.2.1 Examen optique

La fluorescence émise par les taches de sperme est très intense avant le lavage et après le 1<sup>er</sup> lavage avec les différents détergents testés.

La fluorescence diminue avec le nombre de lavages, à l'exception des taches traitées avec le savon de Marseille qui émettent une fluorescence supérieure à celles des autres taches.

Au bout du 4<sup>ème</sup> lavage, aucune fluorescence n'a été détectée sur les taches traitées par l'eau de Javel.

### IV.1.2.2 Examen chimique à la phosphatase acide (PA):

Avant le lavage, la réaction à la phosphatase acide est positive : une forte coloration a été obtenue (tube à gauche, figure 12).

La réaction reste positive après le 1<sup>er</sup> lavage et le 2<sup>ème</sup> lavage avec tous les détergents testés (Figures 12 et 13).

La réaction est négative après le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> lavage, sauf pour les taches traitées au savon de Marseille qui ont donné une réaction positive après le 3<sup>ème</sup> lavage (tableau VIII).

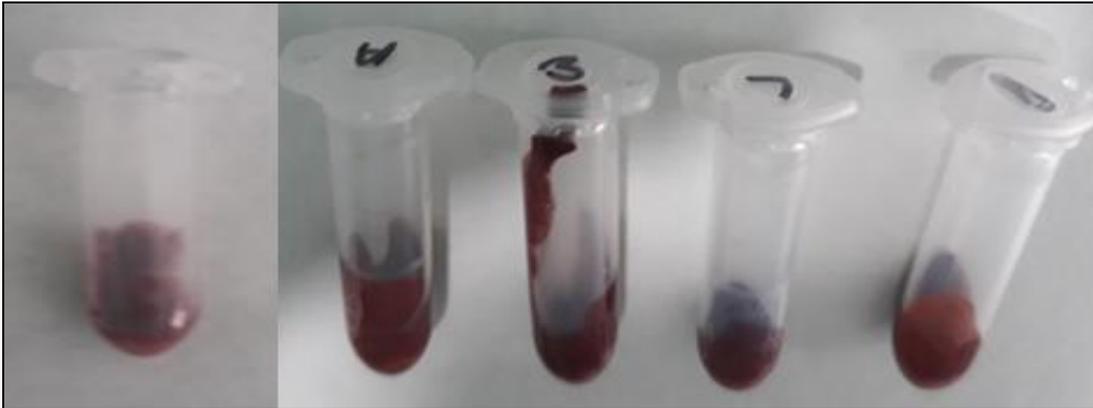


Figure 12 : Résultats de l'examen chimique PA( le 1<sup>er</sup> tube à gauche c'est avant lavage et les autres tubes sont pour les résultats de 1<sup>er</sup> lavage

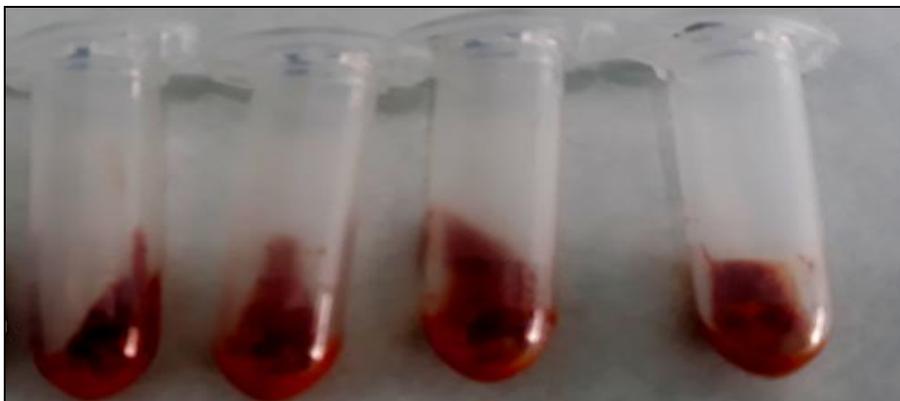


Figure 13 : Résultats de l'examen chimique PA de 2<sup>ème</sup> lavage

Tableau VIII: Résultats des tests préliminaires sur le sperme utilisé

		Crimescope	PA	PAS
<b>Avant lavage</b>	<b>A</b>	+++	+++	+++
<b>1<sup>er</sup> lavage</b>	A1	+++	+	+++
	B1	+++	+	+++
	C1	+++	+	+++
	D1	+++	+	+++
<b>2<sup>ème</sup> lavage</b>	A2	++	+	-
	B2	+++	+	+++
	C2	++	+	+++
	D2	++	+	+
<b>3<sup>ème</sup> lavage</b>	A3	+	-	-
	B3	++	+	+
	C3	+	-	-
	D3	+	-	-
<b>4<sup>ème</sup> lavage</b>	A4	-	-	-
	B4	++	-	-
	C4	+	-	-
	D4	+	-	-

#### IV.1.2.3 Test de confirmation à la PSA :

La lecture se fait directement sur le dispositif de détection de la PSA. Un test positif se traduit par la présence de 3 lignes, alors qu'un test négatif se traduit par la présence de 2 lignes uniquement (une ligne au niveau du contrôle C et une ligne intermédiaire) (Figure 16).

Les résultats de ce test sont résumés dans le tableau VIII Avant le lavage, une réaction positive a été obtenue. Le même résultat a été obtenu avec les autres taches après le 1<sup>er</sup> lavage. Pour les taches lavées avec l'eau de Javel, le test à la PSA était négatif à partir du 2<sup>ème</sup> lavage. La réaction à la PSA devient négative à partir du 3<sup>ème</sup> lavage pour les autres taches traitées avec les autres détergents, à l'exception des taches traitées par le savon de Marseille qui maintiennent une réaction faiblement positive après le 3<sup>ème</sup> lavage qui se traduit par une ligne de faible intensité au niveau de la ligne T (B3 et B4) (Figure 16).



Figure 14 Résultats du test de confirmation à la PSA, avant et après les 4 lavages avec les différents détergent

### IV.1.3 Quantification de l'ADN par q-PCR

Une courbe étalon a été préparée à partir d'une gamme de standards pour la quantification de l'ADN par la PCR en temps réel (Annexe 2).

L'ADN a été dosé à partir des taches de spermes avant et après lavages par les différents détergents (tableau IX).

Tableau IX: Concentrations de l'ADN avant et après traitement des taches aux détergents

ADN	[ADN] : ng/ $\mu$ l	Dilution	Inhibiteur
<b>A</b>	2,2	1/22	-
<b>A1</b>	0,03	P	-
<b>B1</b>	0,3	1/3	-
<b>C1</b>	0,4	1/4	-
<b>D1</b>	1	1/10	-
<b>A2</b>	0,01	P	-
<b>B2</b>	0,11	P	-
<b>C2</b>	0,17	P	-
<b>D2</b>	0,13	P	-
<b>A3</b>	0	NPP	-
<b>B3</b>	0,08	P	-
<b>C3</b>	0,13	P	-
<b>D3</b>	0,11	P	-
<b>A4</b>	0	NPP	-
<b>B4</b>	0,1	P	-
<b>C4</b>	0,05	P	-
<b>D4</b>	0,02	P	-

(P: pur; NPP: Non passé)

La représentation graphique des résultats (Figure 15) montre que la concentration d'ADN diminue avec le nombre de lavages par rapport à la tache de sperme non lavée (2,2 ng/ $\mu$ l). De plus, les résultats ont montré que la concentration d'ADN diminue fortement suite au traitement des taches par l'eau de Javel, jusqu'à s'annuler après le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> lavage.

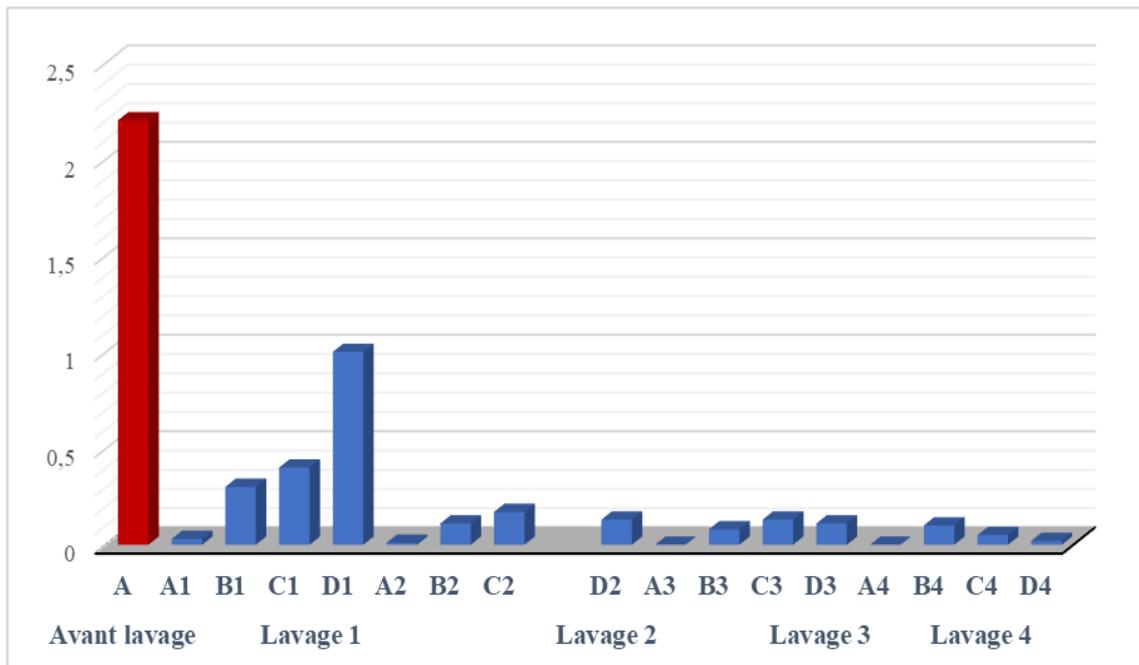


Figure 15: Concentration d'ADN (ng/μl) dans les taches de sperme en fonction des lavages.

### IV.1.4 Génotypage

Le profil génétique d'un individu est représenté sous forme d'un électrophorégramme ou pics de fluorescence dont la position sur l'axe des abscisses correspond à la taille du fragment amplifié, constitué du STR et des régions flanquantes.

Les marqueurs génétiques sont répartis sur 4 lignes correspondant aux 4 fluorophores qui sont excités par le laser et émettent chacun dans des domaines différents du visible (bleu, vert, jaune et rouge).

Les pics de fluorescence correspondent aux allèles. Dans chaque rectangle, le premier chiffre correspond à l'allèle, le deuxième au niveau de fluorescence (RUF) et le troisième à la taille du fragment en nombre de bases) (Laurent *et al.*, 2017).

L'électrophorégramme d'un profil simple présente pour chaque marqueur examiné des allèles distincts à l'intensité forte et équilibrée dans le cas des individus hétérozygotes ; pour les individus homozygotes, les allèles examinés se confondront en un seul signal dont l'intensité sera double de celle des hétérozygotes.

Profil du témoin négatif :

Les résultats ont montré l'absence de profil électrophorétique du témoin négatif, ce qui indique l'absence de contamination par l'ADN.

En plus du profil du témoin négatif, 17 profils ont été obtenus, à partir d'un seul donneur volontaire. Ainsi on retrouve les mêmes allèles dans tous les profils génétiques obtenus (tableau X).

Tableau X : Profil ADN du donneur de sperme avant lavage

Locus	Allèles
D8S1179	11
D21S11	30, 33.2
D7S820	10, 11
CSF1PO	9, 11
D3S1358	16
TH01	6, 7
D13S317	8, 14
D16S539	9, 11
D2S1338	17, 24
D19S433	13, 14
VWA	17, 18
TPOX	9,11
D18S51	13, 14
AMEL	X, Y
D5S818	10, 13
FGA	19, 26

## a) Profil génétique avant lavage

Il s'agit d'un profil obtenu à partir d'une tache de sperme non lavée (Figure 1). Ce profil génétique a été obtenu avec une concentration en ADN de 2,2ng/μl. Il va servir comme référence pour comparer avec les autres profils après les traitements aux détergents.

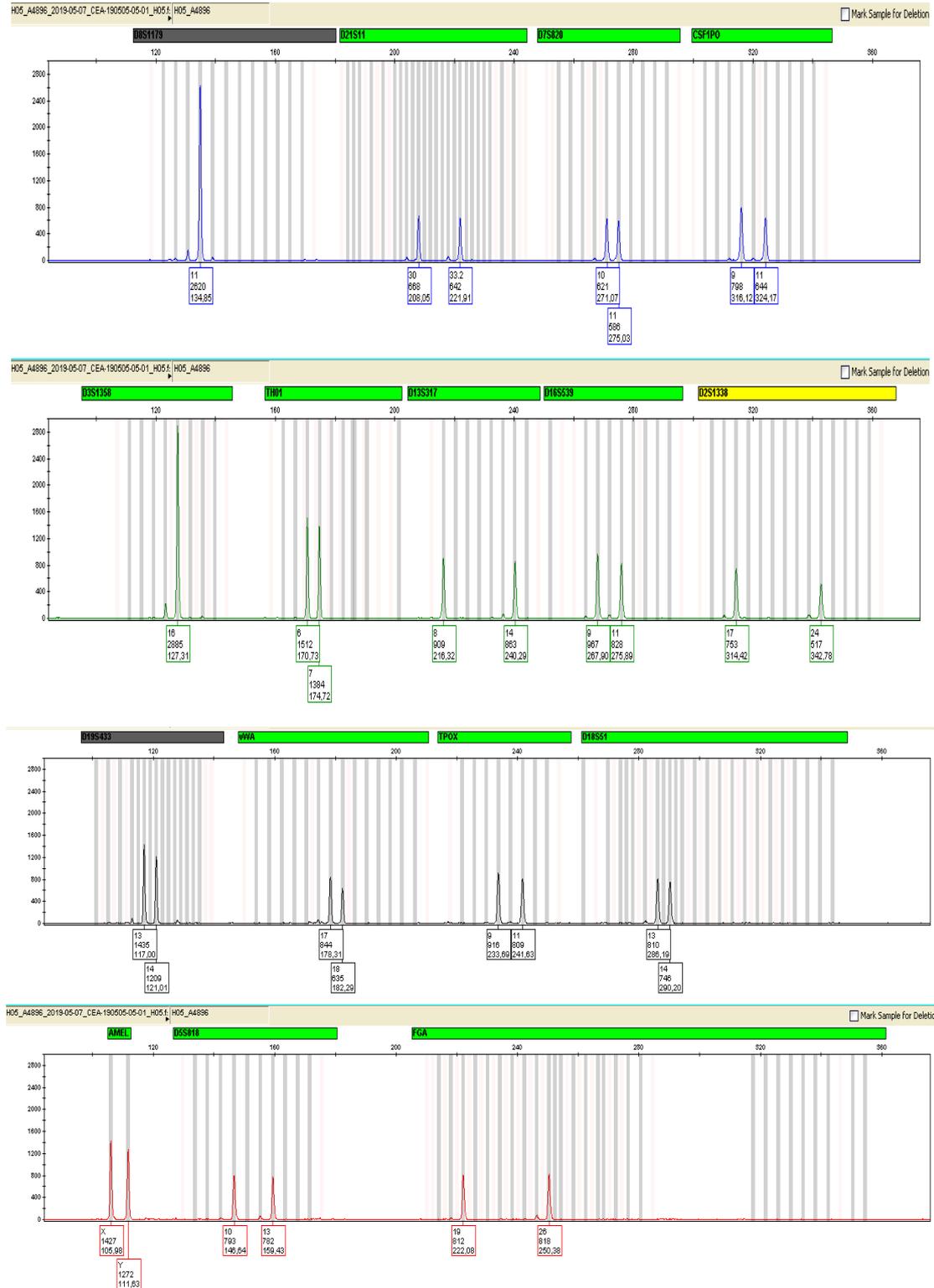


Figure 16 : Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme sur le drap non lavé (A)

b) Profils génétiques obtenus après un premier lavage (A1, B1, C1, D1)

- **Eau de Javel** : malgré ce lavage, un profil génétique interprétable a été obtenu. Cependant l'intensité des pics a diminué par rapport au profil (A).

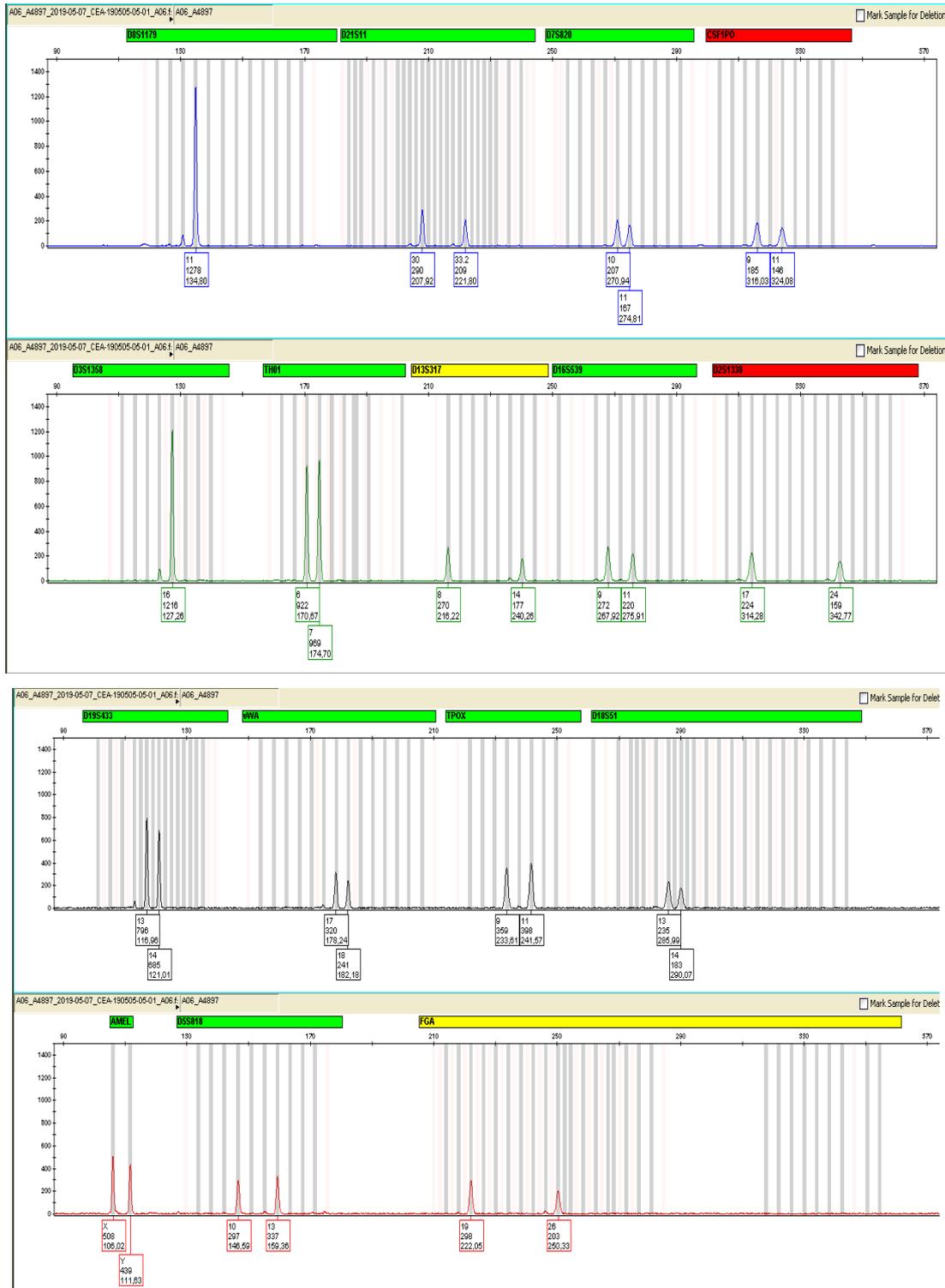


Figure 17 : Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée une fois à l'eau de

Javel

- **Savon de Marseille** : un profil génétique interprétable a été obtenu et dont l'intensité des pics est comparable au 1<sup>er</sup> cas (A).

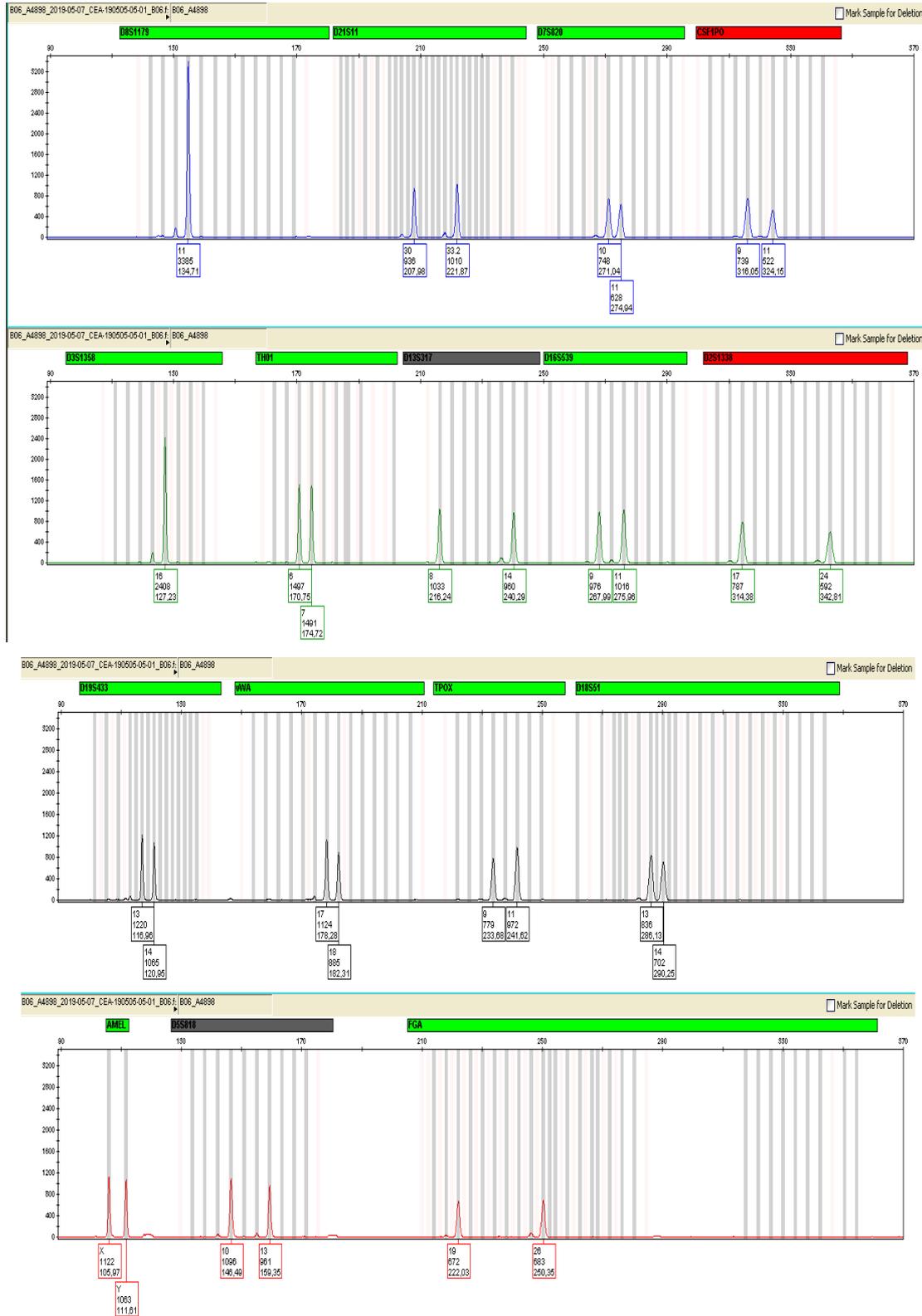


Figure 18: Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée une fois au savon Test

(B1)

- *Savons le Chat (C1) et Ariel (D1)* : dans les deux cas, des profils interprétables ont été obtenus.

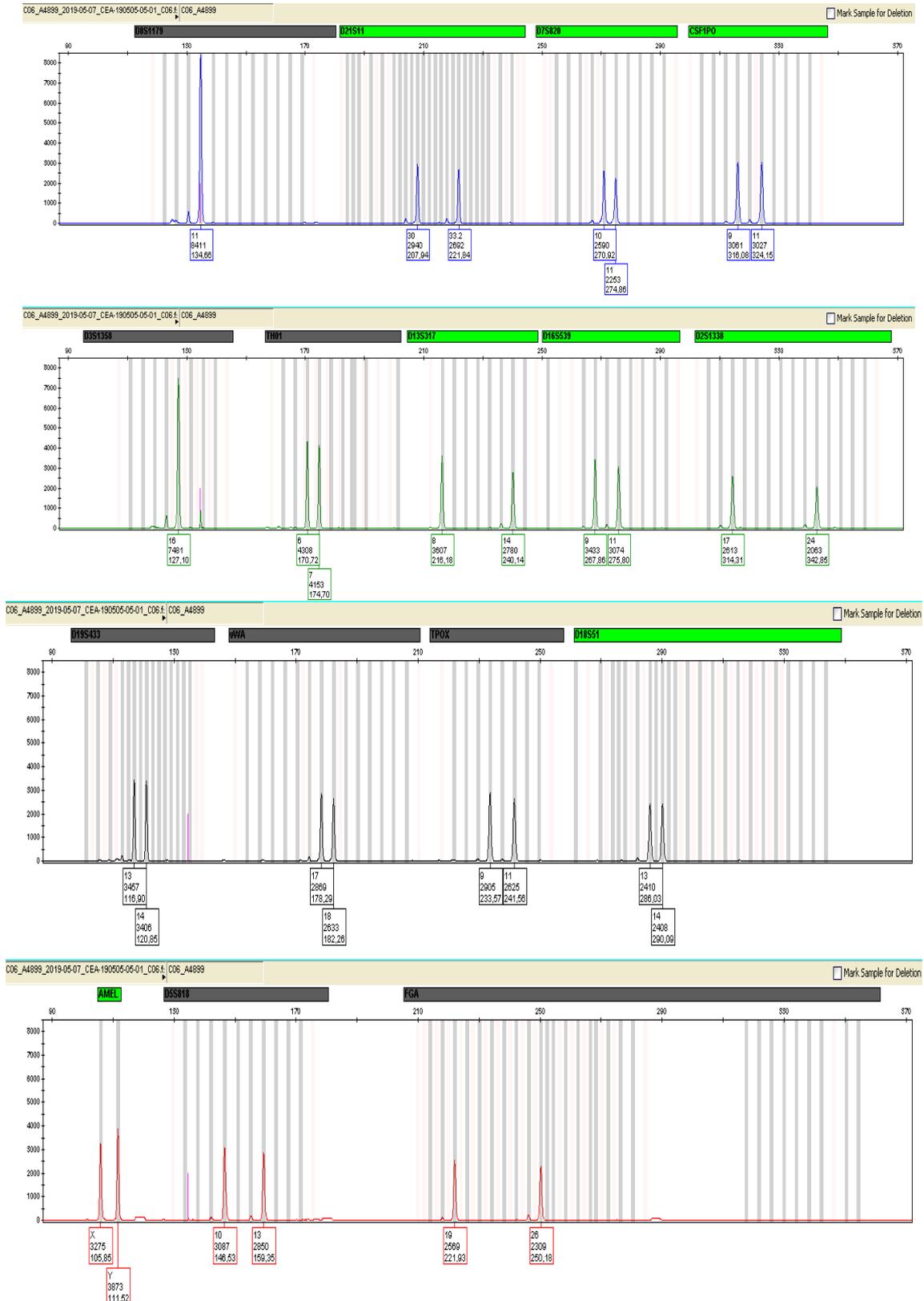


Figure 19: Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée une seule fois au savon le Chat (C1)

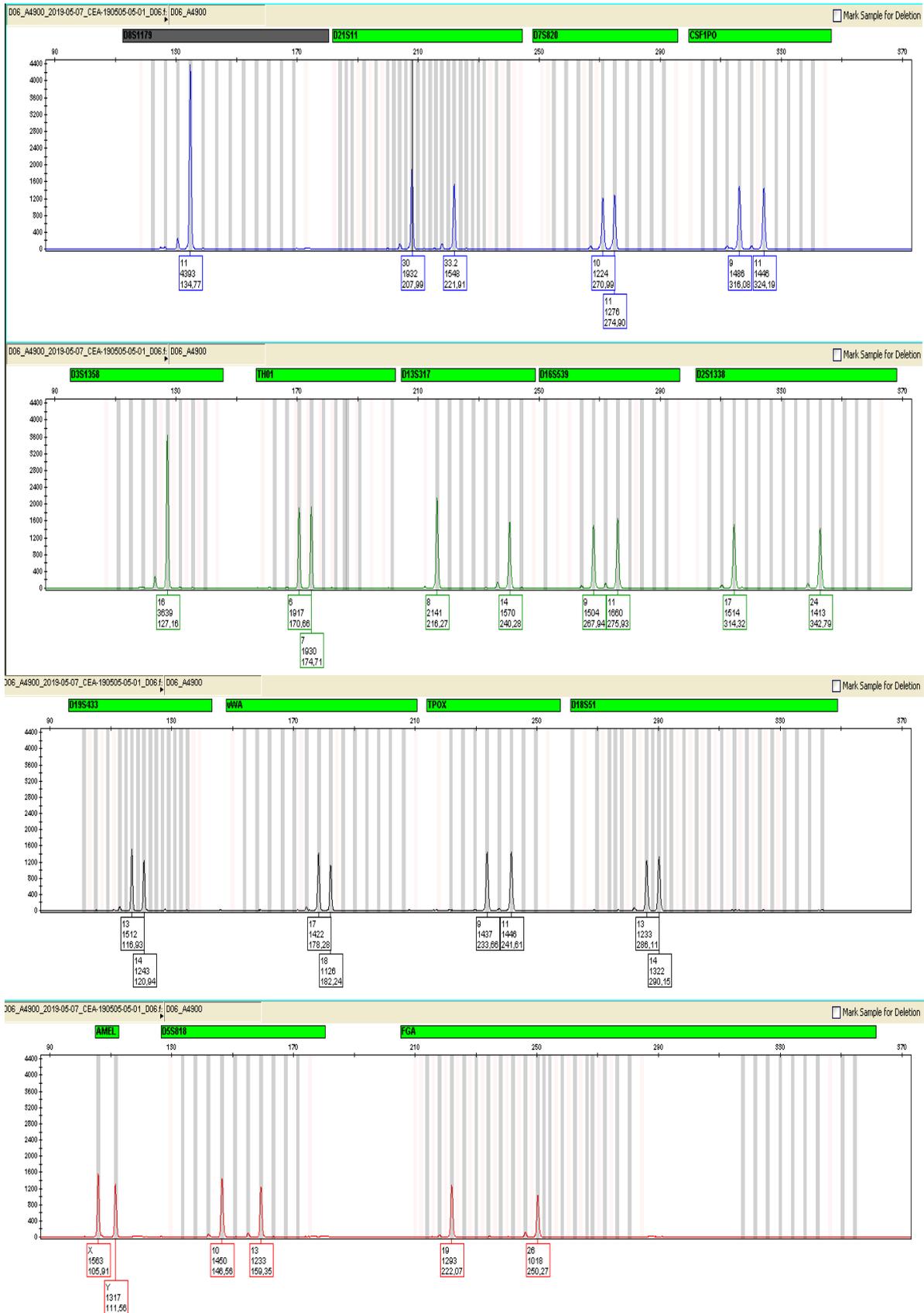


Figure 20: Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée une seule fois au savon le Ariel (D1)

c) Profils obtenus après un 2<sup>ème</sup> lavage (A2, B2, C2, D2)

- **Eau de Javel** : il s'agit d'un profil partiel qui a été obtenu ; seuls quelques pics correspondant aux allèles ont été obtenus et dont l'intensité est très faible, comparé au profil (A1). Les données de ce profil sont très insuffisantes pour être interprétables.

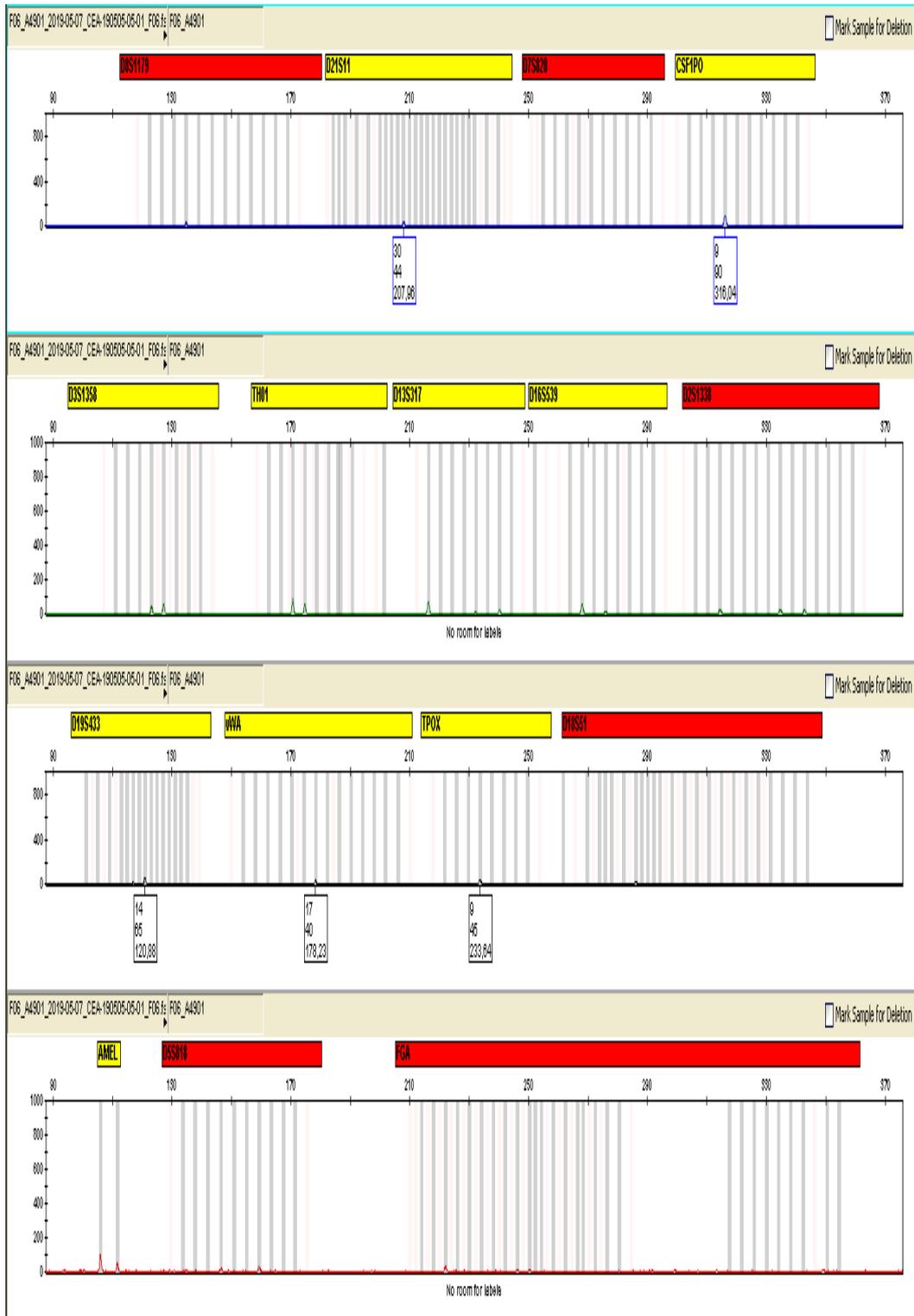


Figure 21: Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée 2 fois à l'eau de Javel

(A2)

- *Savon de Marseille (B2), le Chat (C2) et Ariel (D2)* : dans tous les cas, des profils interprétables ont été obtenus par rapport au cas précédent.

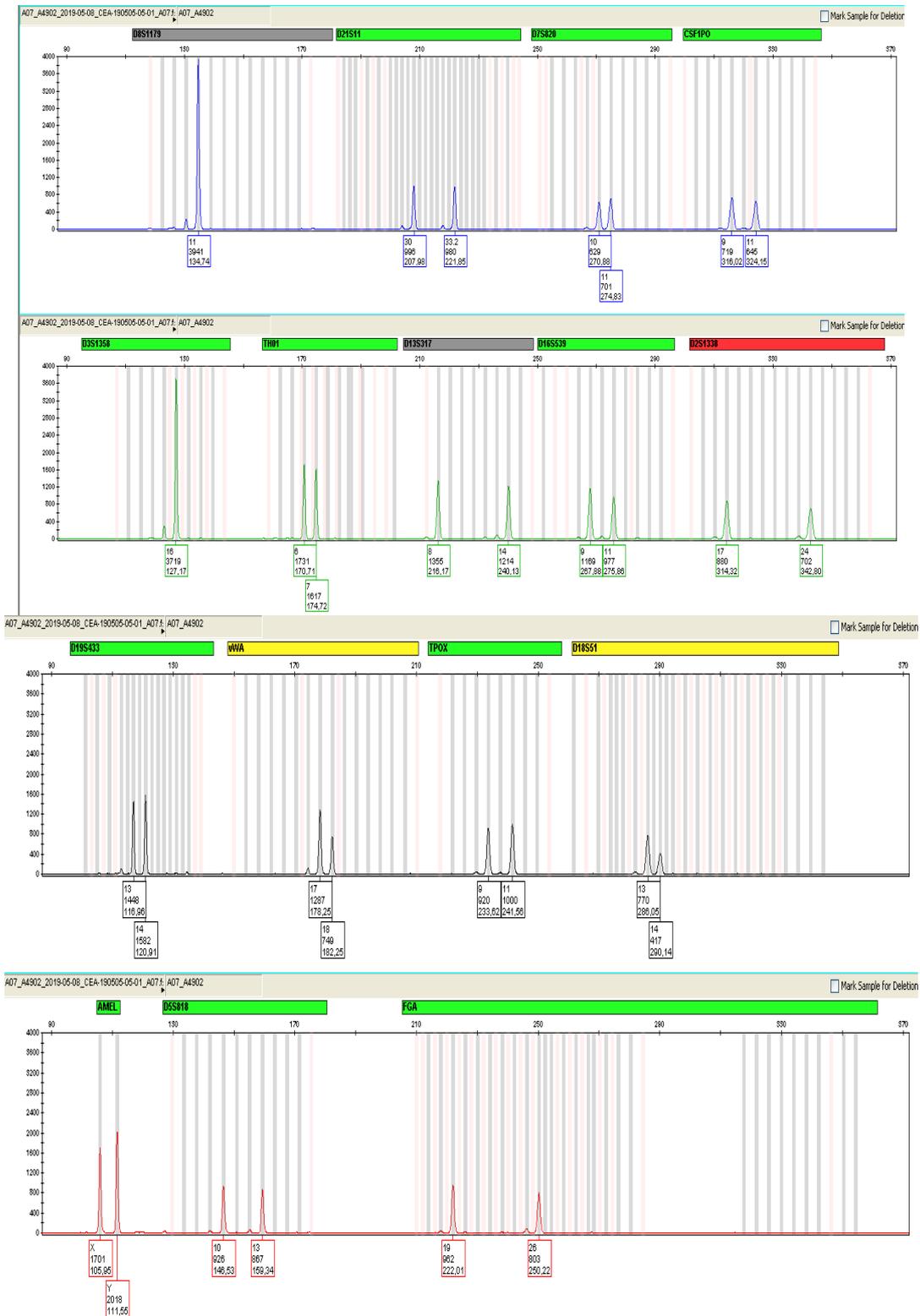


Figure 22: Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée 2 fois au savon de Marseille (B2)



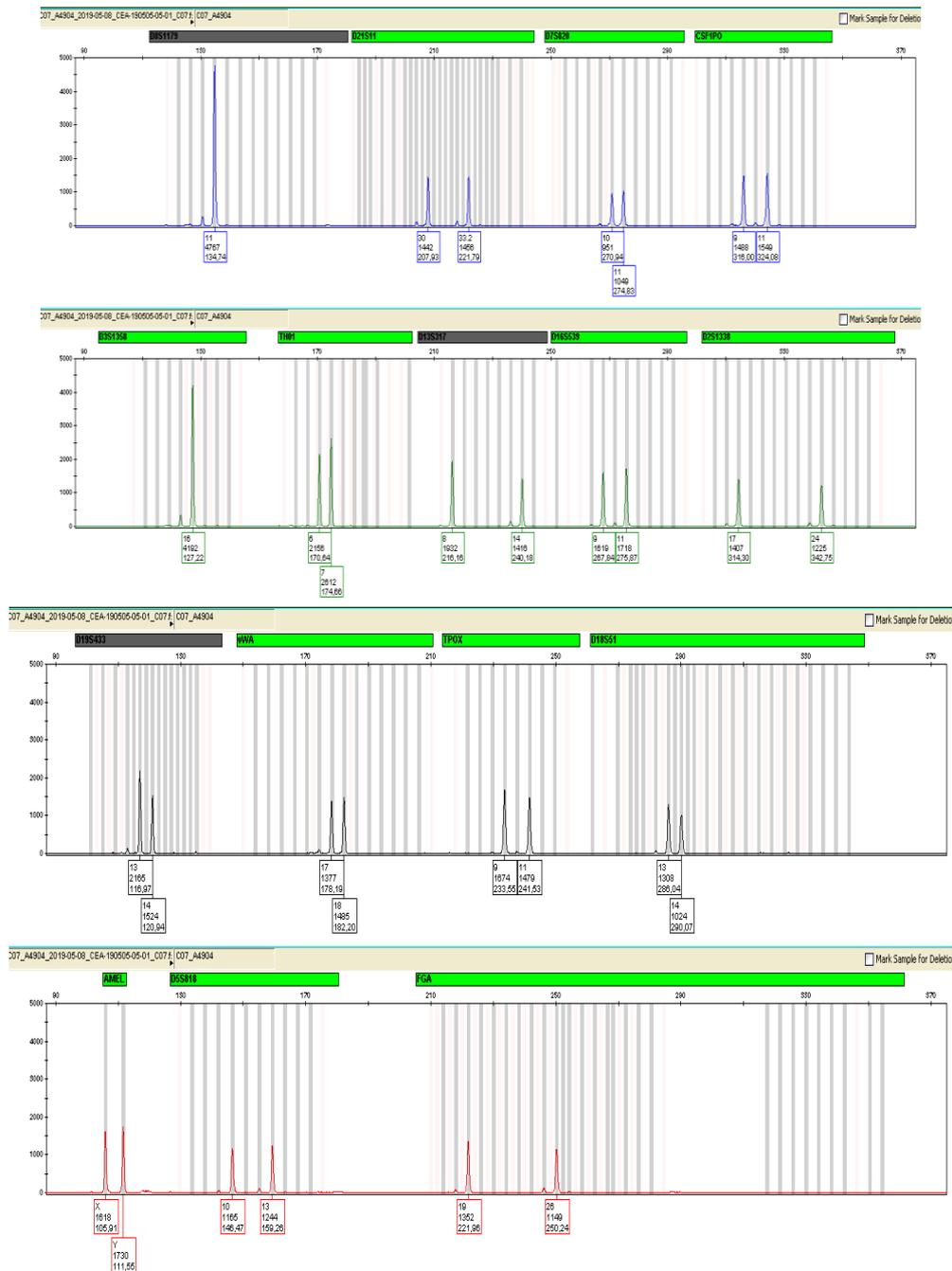


Figure 24 : Profil génétique obtenu à partir d'une tache de sperme lavée 2 fois au savon Ariel (D2)

d) Profils obtenus après un 3<sup>ème</sup> et un 4<sup>ème</sup> lavage

Suite à un 3<sup>ème</sup> et à 4<sup>ème</sup> lavage des taches de sperme à l'eau de Javel, aucun profil génétique n'a été obtenu. Pour les autres détergents testés, des profils interprétables ont été obtenus après les 3<sup>èmes</sup> et 4<sup>èmes</sup> lavages (annexes 3).

### IV.2 Discussion

Dès 1986, la comparaison des profils d'ADN a été appliquée dans le domaine judiciaire. L'analyse ADN est appelée empreinte génétique qui est le résultat de l'étude simultanée de plusieurs loci, afin d'établir un génotype propre à chaque individu.

Dans de nombreux cas d'agressions sexuelles, la literie et les vêtements (sous-vêtements) sont des éléments de preuve essentiels à la recherche de taches de sperme pour recueillir l'ADN de l'agresseur. Afin de dissimuler toute trace d'agression sexuelle, souvent, ces objets sont lavés avant d'être saisis et envoyés au laboratoire médico-légal (Noel *et al.*, 2019). Notre étude est la première en Algérie à s'intéresser à l'effet de plusieurs lavages sur la quantité d'ADN extraite à partir de taches de sperme et sur la détermination d'un profil génétique.

Dans les différents laboratoires, la visualisation et la détection des taches de sperme se fait couramment par un moyen optique (P Allery *et al.*, 2001) et par des tests sérologiques (Khaldi *et al.*, 2004). Différentes études ont montré que la détection des taches de sperme peut être influencée par la nature du détergent utilisé, le mode de lavage à la machine, le nombre de lavages et la nature du textile.

Pour la détection des traces séminales, nos résultats ont montré l'efficacité de la lumière alternative (crimescope) dans la détection des traces de sperme sur les pièces de drap, bien que l'intensité de la fluorescence diminue avec le nombre de lavages et disparaît suite au traitement à l'eau de Javel au dernier lavage. Plus récemment, il a été montré que l'intensité de la fluorescence diminuait également après chaque lavage, et ce indépendamment des détergents testés ; en effet après 6 lavages, les taches de sperme présentaient une faible fluorescence, mais détectables au crimescope, même dans le cas des taches traitées à l'eau de Javel, contrairement à nos résultats (Noel *et al.*, 2019).

Concernant le test à la phosphatase acide, une réaction positive modérée a été obtenue après le 1<sup>er</sup> lavage, comparé à l'échantillon non lavé. La réaction devient négative après le lavage 3, à l'exception des taches traitées au savon de Marseille. Des études antérieures ont rapporté que le test à la phosphatase acide était négatif sur des taches de spermes soumises à un lavage à la machine sur des sous-vêtements en coton (Jobin and De Gouffe, 2003), de même que 85% des pièces de draps après un seul lavage et devient négatif pour tous les échantillons après un 3<sup>ème</sup> lavage, et ce quelque soit le détergent utilisé (Noel *et al.*, 2019). Pour cette même étude, le test à la PSA serait plus sensible puisque des réactions positives ont été obtenues même après 6 lavages avec certains détergents, à l'exception de l'eau de

Javel où la réaction devient négative après le 1<sup>er</sup> lavage pour la moitié des échantillons testés et s'annule complètement au bout du 4<sup>ème</sup> lavage. Dans notre étude, la réaction de la PSA devient négative dès le 2<sup>ème</sup> lavage à l'eau de Javel. Avec les autres détergents testés, l'intensité de la réaction est variable avec le type de détergent mais devient complètement négative au dernier lavage. De plus, la conservation des traces de sperme dépend de la nature du textile. En effet, des réactions positives de la PSA ont été obtenues à partir de taches de sperme sur coton, mais pas sur des textiles en nylon (Jobin and De Gouffe, 2003). De plus, la réaction à la PSA est influencée par les températures de lavages ; positive à une température de 40°C, mais négative à 60°C (Farmen *et al.*, 2008).

La quantification de l'ADN a montré que la concentration de l'ADN a diminué de manière importante juste après le lavage (1) comparé à l'échantillon non lavé. La diminution semble plus importante pour les pièces de drap traitées à l'eau de Javel pour s'annuler après le 3ème lavage expliquant ainsi l'absence de profils génétiques après les lavages (3) et (4). En effet, pour les taches de sperme lavées à l'eau de Javel, seul un profil génétique interprétable a pu être obtenu après le lavage (1). Au second lavage, un profil partiel a été obtenu et donc non interprétable. Ces résultats indiquent un effet plus agressif de l'eau de Javel sur la molécule d'ADN comparé aux détergents testés dans ce cas. Des travaux ont démontré la dénaturation irréversible de la molécule d'ADN par l'eau de Javel ou l'acide Hypochloreux (HOCl) par une réaction de chloration des bases de l'ADN empêchant ainsi leur appariement. Ceci a été démontré par l'incapacité de la molécule d'ADN à former un complexe avec l'agent intercalent, le bromure d'éthidium (Prütz, 1996).

Dans le cas des autres détergents, bien que les tests sérologiques soient négatifs au bout du 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> lavage, des profils génétiques interprétables ont pu être obtenus. Ainsi, ces résultats montrent qu'il faut réaliser un génotypage de l'ADN devant la négativité de ces tests. La réalisation du génotypage est rendue possible même en présence de faibles quantités d'ADN grâce à la technique de la PCR. Une étude a montré qu'il était possible de récupérer un profil génétique complet à partir d'anciennes traces de spermes, lavées 8 mois après une agression sexuelle. Ces données soulignent la nécessité de récupérer et d'examiner les vêtements des victimes à la recherche de preuves de sperme et d'ADN, même si les vêtements ont été entreposés pendant plusieurs mois ou lavés à plusieurs reprises depuis le début de l'agression sexuelle (Brayley-Morris *et al.*, 2015). En plus, la quantité d'ADN recueillie à partir de ces anciennes taches était de l'ordre du µg/ml. Dans notre étude, la concentration obtenue avant et après lavages étaient de l'ordre du ng/µl, ce qui est compatible avec les résultats déjà rapportés (Farmen *et al.*, 2008).

### V. Conclusion

Dans notre expérience, nous avons montré que les taches de sperme lavées à plusieurs reprises peuvent encore être détectées visuellement au crimescope. De plus, nos résultats ont montré que les quantités d'ADN obtenues étaient suffisantes pour l'analyse génétique bien que les tests de PSA et de phosphatase acide étaient négatifs.

En effet, nos résultats montrent que les lavages quelle que soit la nature de détergeant utilisée influencent sur le génotypage mais la probabilité de détecter une tache de sperme et d'obtenir un profil génétique interprétable est assez élevée, même si l'article a été lavé jusqu'à quatre fois.

Notre étude constitue une première étape qui devra être complétée en testant d'autres détergents, comme les savons liquides pour machines à laver le linge. Comme il serait intéressant de tester :

- L'effet de plusieurs programmes de lavages à la machine et donc tester plusieurs températures différentes.
- Différents types de textiles (synthétiques, colorés).
- Types d'échantillonnage (écouvillonnage ou des morceaux de linge découpés).

### Références bibliographiques

- Brayley-Morris, H., Sorrell, A., Revoir, A.P., Meakin, G.E., Court, D.S., Morgan, R.M., 2015. Persistence of DNA from laundered semen stains: Implications for child sex trafficking cases. *Forensic Sci Int Genet* 19, 165-171.
- Butler, J.M., 2012a. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*.
- Butler, J.M., 2012b. Chapter 5 - Short Tandem Repeat (STR) Loci and Kits, in: Butler, J.M. (Ed.), *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press, San Diego, pp. 99-139.
- Butler, J.M., 2012c. Chapter 6 - Capillary Electrophoresis: Principles and Instrumentation, in: Butler, J.M. (Ed.), *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press, San Diego, pp. 141-165.
- Butler, J.M., 2012d. Chapter 12 - Single Nucleotide Polymorphisms and Applications, in: Butler, J.M. (Ed.), *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press, San Diego, pp. 347-369.
- Butler, J.M., Coble, M.D., Vallone, P.M., 2007. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Sci Med Pathol* 3, 200-205.
- Coquoz, R., Taroni, F., 2006. *Preuve par l'ADN: la génétique au service de la justice*. Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Courivaud, C., Saas, P., Ducloux, D., 2012. Polymorphismes génétiques : comment interpréter les études ? *Néphrologie & Thérapeutique* 8, 141-145.
- Daniel, R., Walsh, S.J., 2006. The Continuing Evolution of Forensic DNA Profiling - From STRS to SNPS. *Australian Journal of Forensic Sciences* 38, 59-74.
- Djaghmoune, A., 2017. Les violences sexuelles sur les enfants en Algérie. *Revue de l'enfance et de l'adolescence* 95, 203-211.
- Doutremepuich, C., 2012. Les empreintes génétique en pratique judiciaire. *Bull. Acad. Natle Méd* 196, 117-1130.
- Fan, H., Chu, J.Y., 2007. A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 5, 7-14.
- Farnen, R.K., Cortez, P., Frøyland, E.S., 2008. Spermatozoa recovered on laundered clothing. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1, 418-420.
- Healy, D.A., Hayes, C.J., Leonard, P., McKenna, L., O'Kennedy, R., 2007. Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. *Trends Biotechnol* 25, 125-131.
- Hellerud, B.B., Bouzga, M., Hoff-Olsen, P., Mevåg, B., 2011. Semen detection: A retrospective overview from 2010. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 3, e391-e392.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H., 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques* 23, 504-511.
- Hochmeister, M.N., Budowle, B., Rudin, O., Gehrig, C., Borer, U., Thali, M., Dirnhofer, R., 1999. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. *J Forensic Sci* 44, 1057-1060.

- Jobin, R.M., De Gouffe, M., 2003. The Persistence of Seminal Constituents on Panties After Laundering. Significance to Investigations of Sexual Assault. *Canadian Society of Forensic Science Journal* 36, 1-10.
- Kashyap, V.K., Sitalaximi, T., Chattopadhyay, P., Trivedi, R., 2004. DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis. *International Journal of Human Genetics* 4, 11-30.
- Khaldi, N., Miras, A., Botti, K., Benali, L., Gromb, S., 2004. Evaluation of three rapid detection methods for the forensic identification of seminal fluid in rape cases. *J Forensic Sci* 49, 749-753.
- Ku, C.S., Loy, E.Y., Salim, A., Pawitan, Y., Chia, K.S., 2010. The discovery of human genetic variations and their use as disease markers: past, present and future. *J Hum Genet* 55, 403-415.
- Labat L, Deveaux M, JP, D., 2000. Applications de l'électrophorèse capillaire en toxicologie clinique et médico-légale. *Ann Toxicol Anal* 12, 179-195.
- Lafargue, P., 2007. Médecine légale, criminalistique et biologie. *Revue Francophone des Laboratoires* 2007, 21-22.
- Lamoril, J., Bogard, M., 2013. La médecine génomique, une réalité en pleine évolution. Première partie.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Szustakowki, J., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Laperche, S., Van Huffel, V., Rouger, P., Salmon, C., 1991. Etude par les fragments de restriction (RFLP) du polymorphisme de l'ADN en criminologie : analyses quantitative et qualitative à partir de sang et de sperme séchés sur différents supports. *Revue Française de Transfusion et d'Hémodiologie* 34, 139-150.
- 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.
- Longy, M., 2001. Bases moléculaires du diagnostic génétique. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 25, 14- 17.
- Mansuet-Lupo, A., Van Huffel, V., Rouger, P., 2008. Les empreintes génétiques : nouvel outil en médecine légale. *Médecine & Droit* 2008, 24-28.
- May-Panloup, P., Chrétien, M.F., Malthiery, Y., Reynier, P., 2006. ADN mitochondrial du spermatozoïde. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 34, 847-854.
- Noel, S., Lagace, K., Raymond, S., Granger, D., Loyer, M., Bourgoin, S., Jolicoeur, C., Seguin, D., 2019. Repeatedly washed semen stains: Optimal screening and sampling strategies for DNA analysis. *Forensic Sci Int Genet* 38, 9-14.
- P Allery, J., No, T., Miesusset, R., Blanc, A., Rougé, D., 2001. Cytological Detection of Spermatozoa: Comparison of Three Staining Methods.
- Pham-Hoai, E., Pussiau, A., Curci, J.-Y., 2017. ADN, une perpétuelle avancée. *Revue Francophone des Laboratoires* 2017, 67-76.
- Prütz, W.A., 1996. Hypochlorous Acid Interactions with Thiols, Nucleotides, DNA, and Other Biological Substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 332, 110-120.

- Sankhla, M.S., Kumar, R., 2017. Identification of Criminal by using Touch DNA: A new Tool for Investigation in Forensic Science. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR)* 3, 877-882.
- Thomsen, J.L., 2017. Ethical considerations for forensic scientists participating in humanitarian action: A personal reflection. *Forensic Science International* 278, 379-380.
- Tse, C., Capeau, J., 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann Biol Clin* 61, 279-293.
- van Oorschot, R.A., Ballantyne, K.N., Mitchell, R.J., 2010. Forensic trace DNA: a review. *Investigative genetics* 1, 14-14.
- Vassias, I., 2012. Principe de l'amplification en chaîne par polymérase. *EMC Biologie médicale* 7, 1-5.
- Westen, A.A., Nagel, J.H., Benschop, C.C., Weiler, N.E., de Jong, B.J., Sijen, T., 2009. Higher capillary electrophoresis injection settings as an efficient approach to increase the sensitivity of STR typing. *J Forensic Sci* 54, 591-598.
- Wheeler, B., Wilson, L.J., 2013. *Practical forensic microscopy : a laboratory manual*. Wiley, Hoboken, N.J.

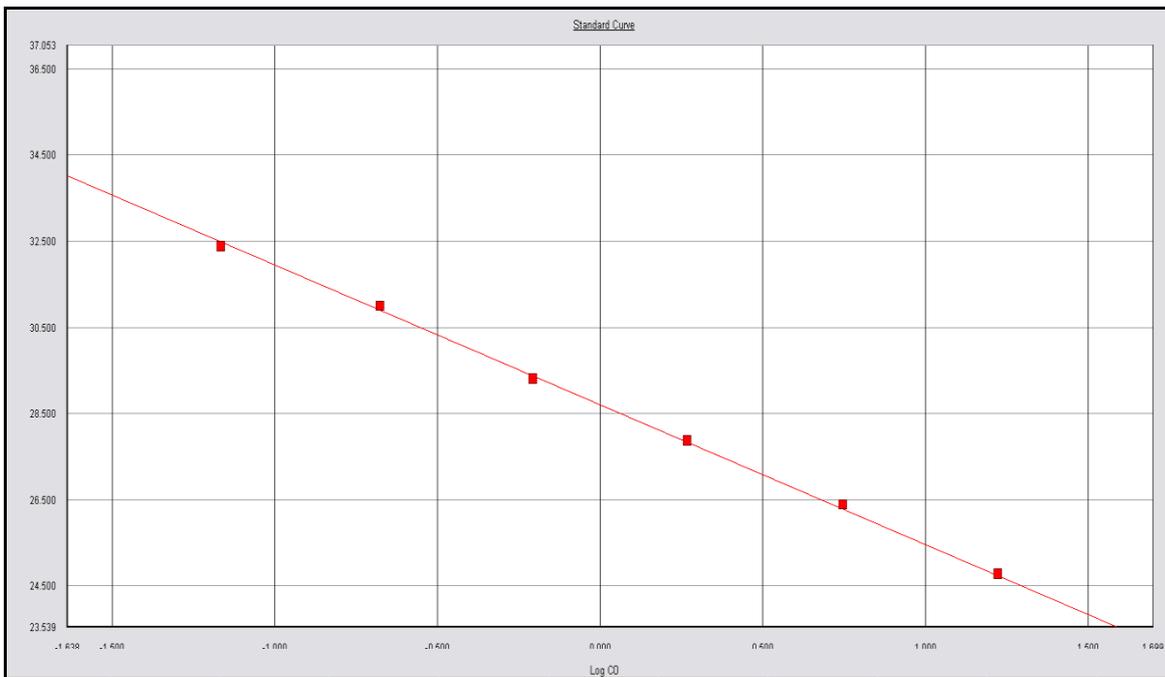
### **Annexe 1 : protocole d'extraction de l'ADN avec le kit Qiagen**

- Mettre dans un tube de 2 ml l'échantillon, 300µl d'une solution ATL (Tissue Lysis Buffer tampon de lyse tissulaire), 20µl de protéinase K du kit et 20µl de DTT.
- Vortexer pendant 10 secondes et incuber 1h à 56°C avec une agitation de 900 rpm.
- Centrifuger quelques secondes.
- Ajouter 300µl de tampon de lyse AL (Lysis Buffer) et vortexer pour bien mixer pendant 10 secondes.
- Incubation pendant 10 minutes à 70°C sur le bloc chauffant avec agitation de 900 rpm.
- Centrifugation brève et ajouter 150µl d'éthanol absolu.
- Vortexer pendant 15 secondes, centrifuger brièvement et déposer le tout au centre d'une colonne QIAamp MinElute sans toucher la membrane.
- Centrifuger 1min à 8000 rpm.
- Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAamp MinElute dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 700µl de tampon AW.
- Centrifuger 1min à 8000 rpm.
- Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAamp MinElute dans un nouveau tube de 2ml et ajouter 700µl d'éthanol absolu.
- Centrifuger 1min à 8000 rpm.
- Eliminer le tube contenant l'éluant, transférer la colonne QIAamp MinElute dans un nouveau tube de 2ml.
- Centrifuger 3min à 14000 rpm.
- Placer la colonne QIAamp MinElute dans un nouveau tube de 1.5ml laissant le couvercle ouvert pour laisser sécher à température ambiante pendant 10 min.
- Ajouter 20 à 50µl de tampon d'éluant ATE (Elution Buffer).
- Incubation 1min à température ambiante et centrifugation 1min à 14000rpm pour récupérer l'ADN extrait.
- Conserver les tubes d'ADN à -20°C.

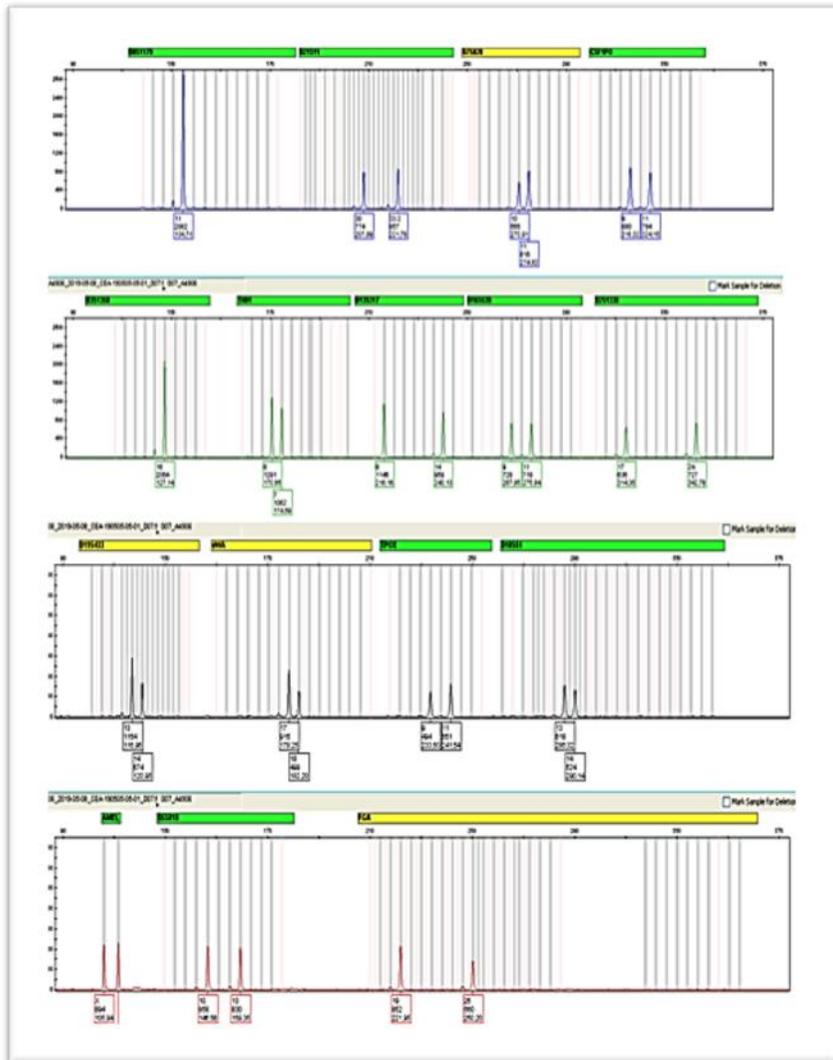
**Annexe 2 : Préparation de la courbe étalon.**

Préparation des dilutions

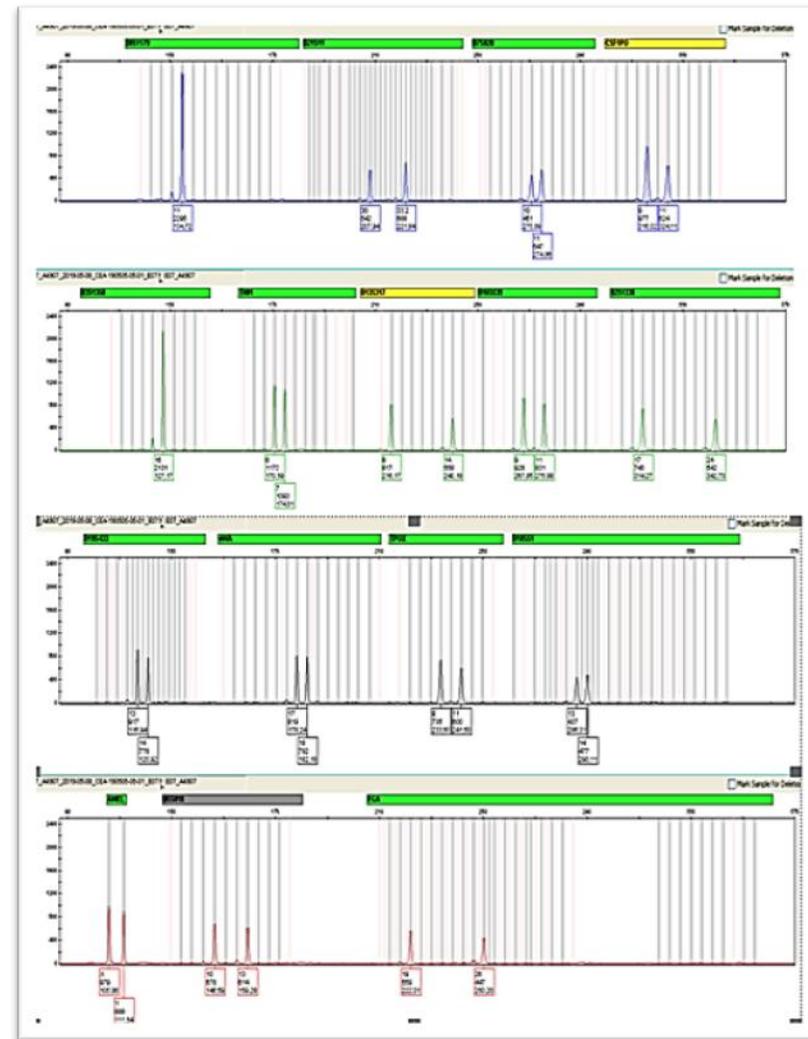
Gamme standard	Volume de l'ADN témoin	Concentration	Dilution
Gamme standard 1	10µl	50 ng/µl	¼
Gamme standard 2	10µl	16,7 ng/µl	1/3
Gamme standard 3	10µl	5,56 ng/µl	1/3
Gamme standard 4	10µl	1,85 ng/µl	1/3
Gamme standard 5	10µl	0,62 ng/µl	1/3
Gamme standard 6	10µl	0,21 ng/µl	1/3
Gamme standard 7	10µl	0,068 ng/µl	1/3
Gamme standard 8	10µl	0,023ng/µl	1/3



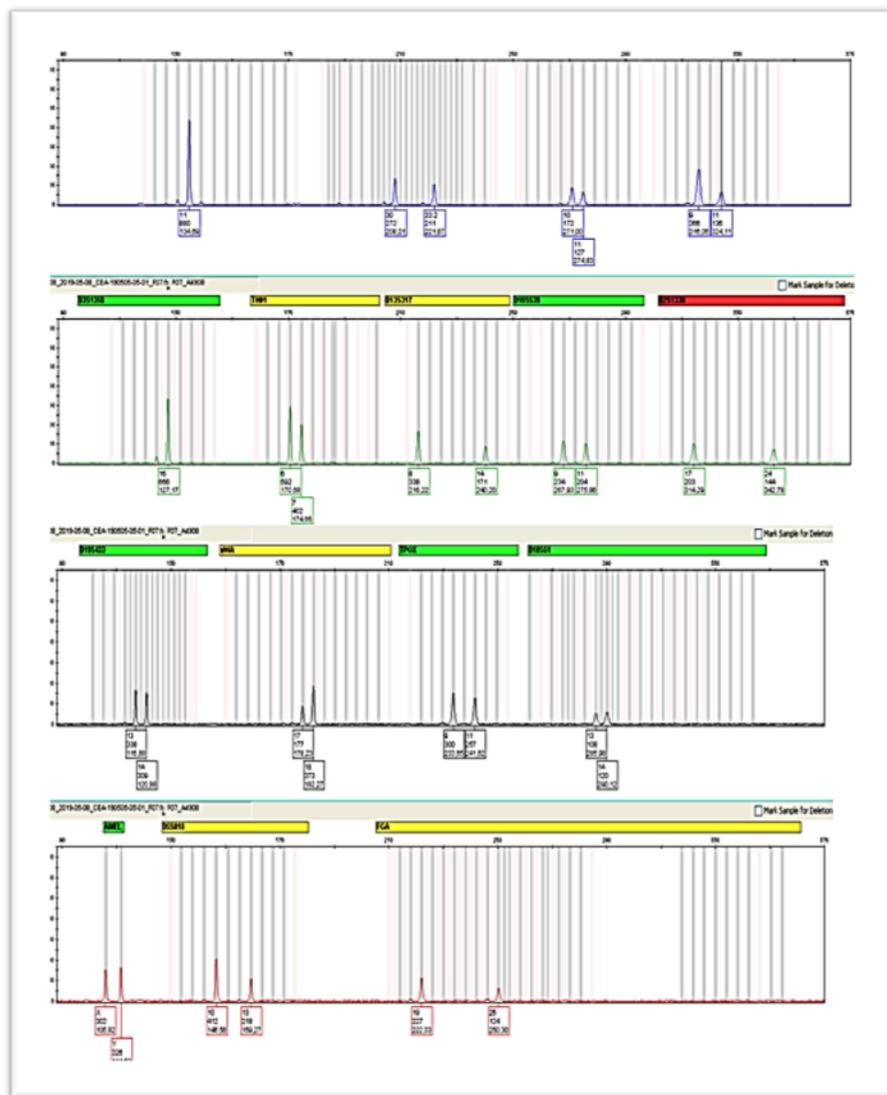
Courbe d'étalon



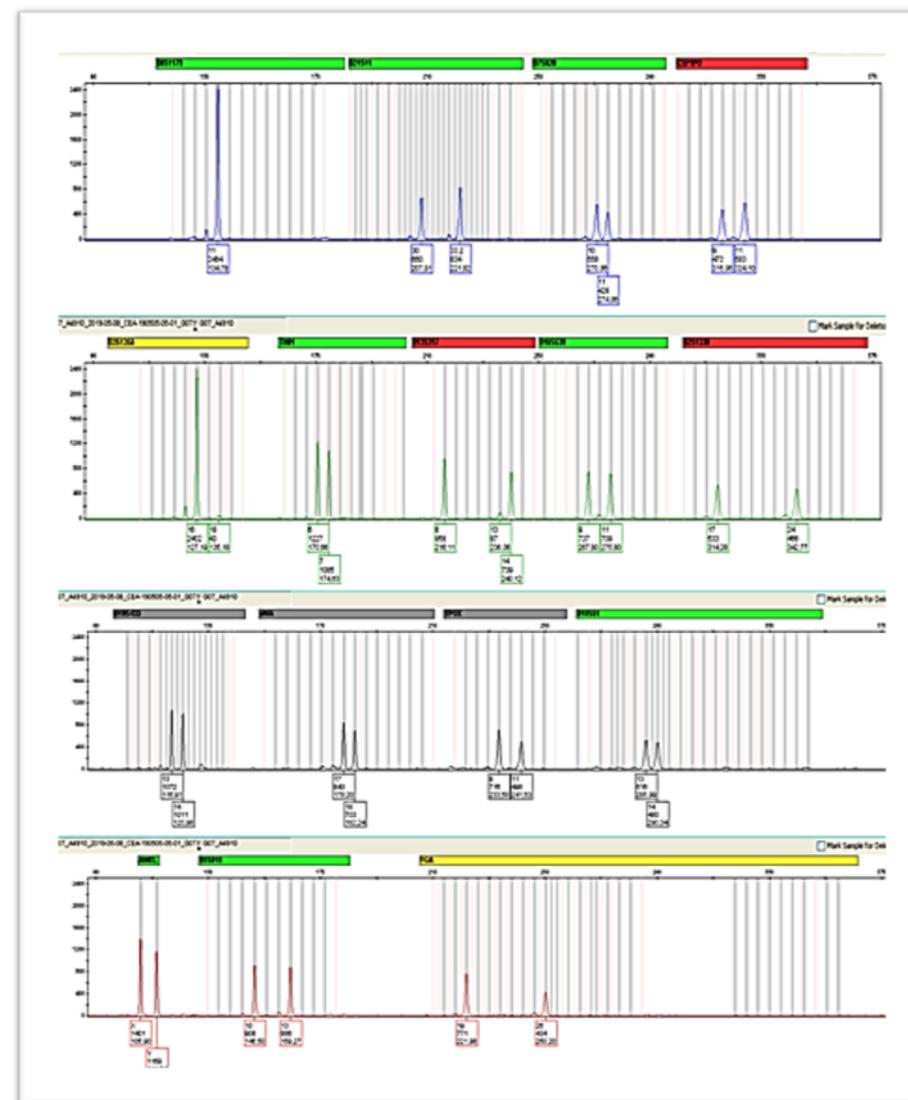
Profil génétique obtenu après un 3<sup>ème</sup> lavage au savon le Test



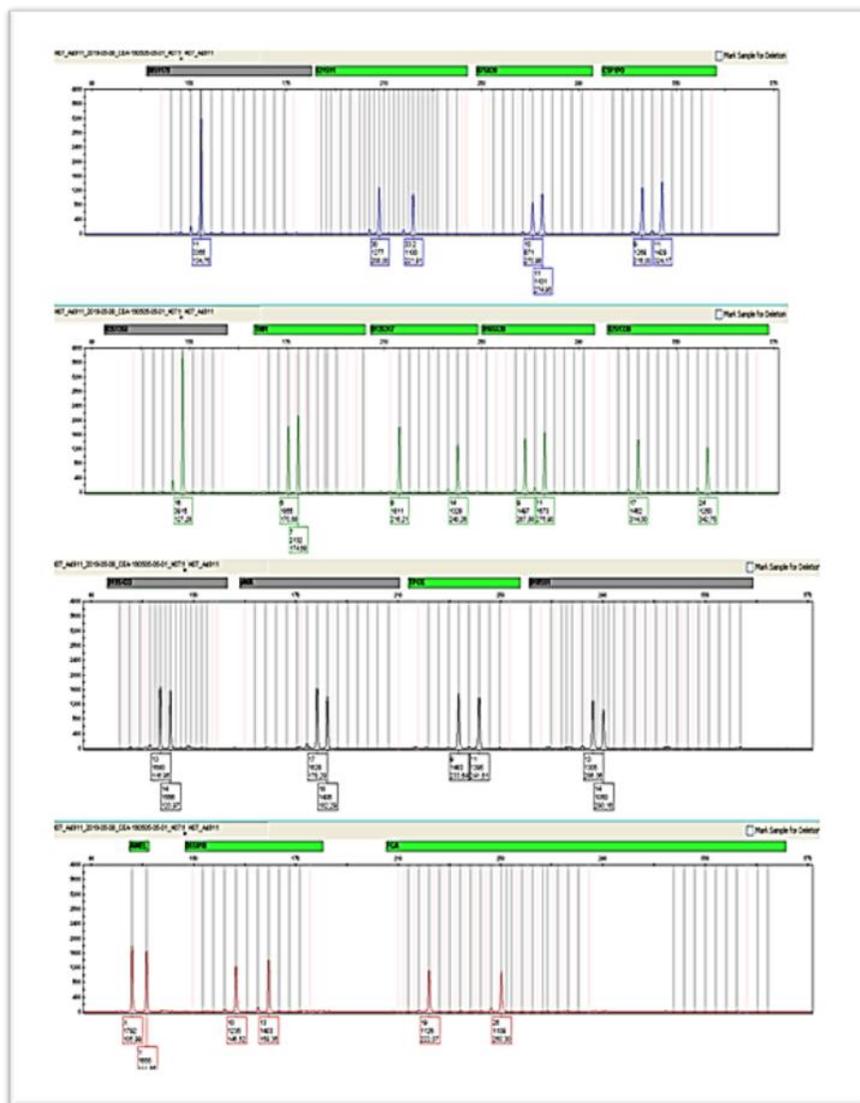
Profil génétique obtenu après un 3<sup>ème</sup> lavage au savon le Chat



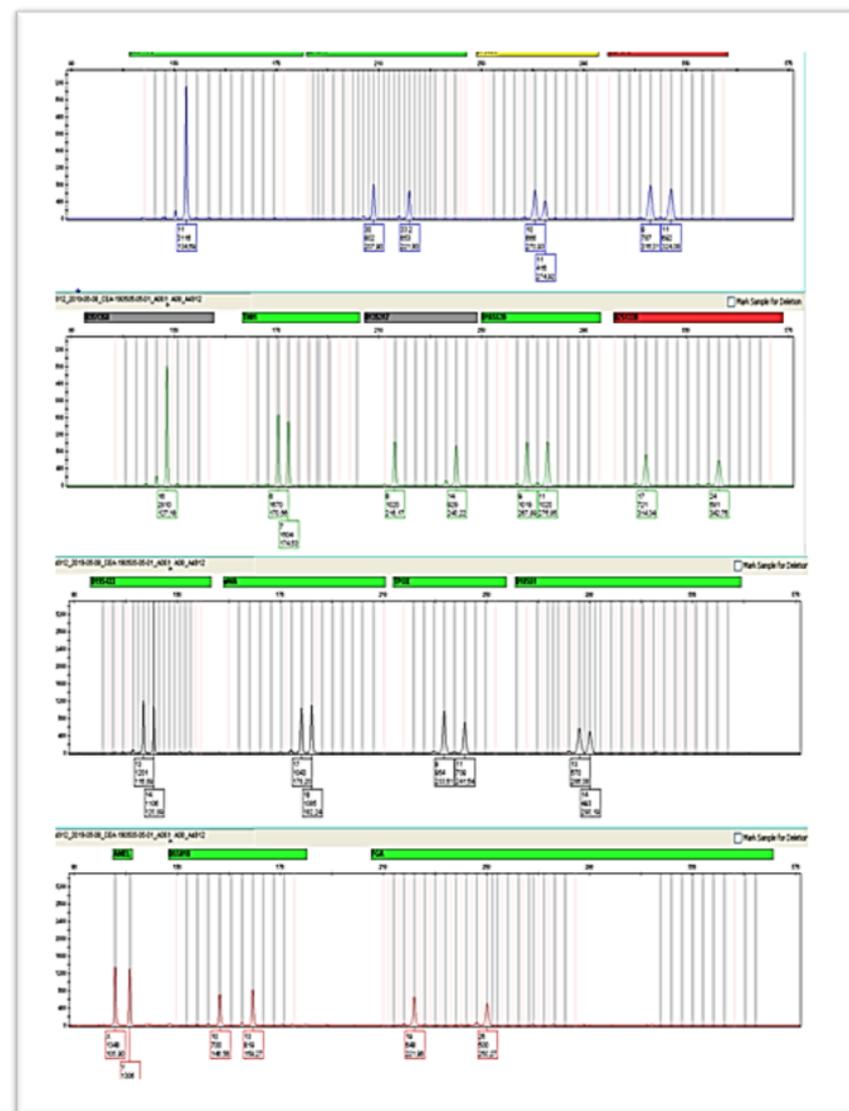
Profil génétique obtenu après un 3<sup>ème</sup> lavage au savon Ariel



Profil génétique obtenu après un 4<sup>ème</sup> lavage au savon Test

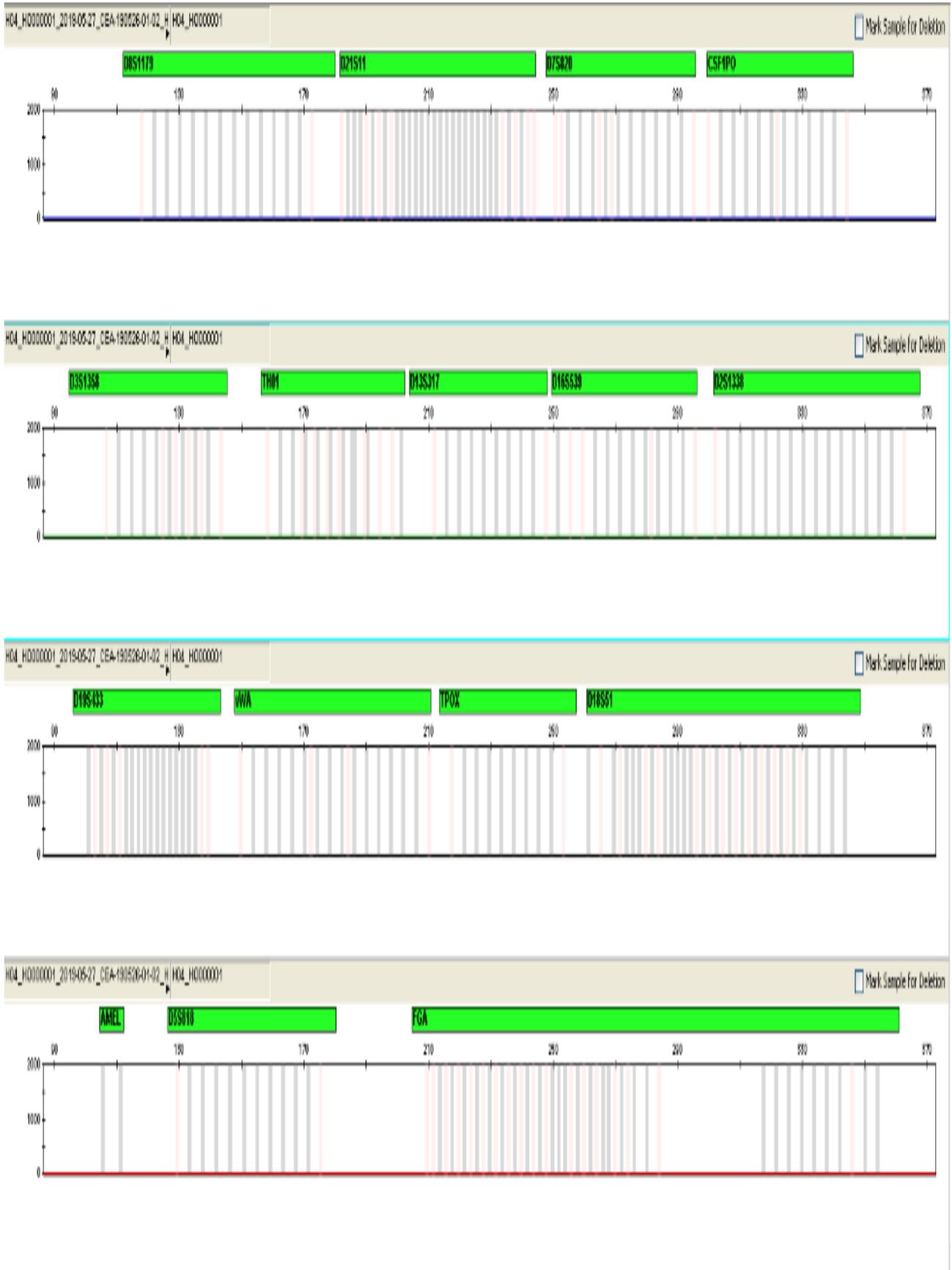


Profil génétique obtenu après un 4<sup>ème</sup> lavage au savon le Chat



Profil génétique obtenu après un 4<sup>ème</sup> lavage au savon Ariel

Annexe 4 : profil de témoin négatif



## Glossaire

**ADN :** macromolécule qui consiste généralement en deux chaînes de polynucléotides maintenues associées par des liaisons hydrogène, dans lesquelles les sucres sont des désoxyriboses. Le principal porteur d'information génétique.

**Amorce :** ADN simple brin, également appelée oligonucléotide, utilisé comme molécule «starter» ou « primer » pour la PCR.

**Amplicon :** C'est un fragment d'ADN amplifié par PCR.

**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.

**Marqueur génétique :** un gène ou région chromosomique utilisée pour l'identification.

**Pb :** c'est la 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.

**Sciences forensiques :** 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.

**Sonde :** oligonucléotide comme un ADN ou un ARN qui a été marquée et peut être détectée par un test (autoradiographie ou observation en microscope à fluorescence). Les sondes sont utilisées pour identifier des molécules, gènes ou produits de gènes choisis.

## RESUME

L'introduction des empreintes génétiques en pratique judiciaire dans les années 80, a eu des retombées positives pour l'identification des individus par leur ADN, matériel génétique qui peut être isolé à partir de sources biologiques variées. Les empreintes génétiques ou profils ADN sont établis par l'analyse de plusieurs loci d'ADN, principalement des STR (short Tandem repeats) hautement polymorphes. Cette propriété fait d'eux des marqueurs génétiques de choix pour établir un profil génétique de chaque individu. Dans le cas des agressions sexuelles, l'obtention d'un profil génétique n'est pas toujours facile. En effet, dans la plupart des cas, l'agresseur essaie de dissimuler toutes les traces. Ainsi, notre étude s'est intéressée à l'impact des lavages répétés sur la quantité d'ADN à recueillir et sur la détermination du profil génétique à partir des traces de sperme lavées avec 4 détergents différents jusqu'à quatre fois. Les résultats ont montré que les méthodes de détection du sperme et l'obtention de profils génétiques interprétables dépendraient de la nature du détergent utilisé et du nombre de lavages.

**Les mots clés:** Agression sexuelle, ADN, Détergents, Profil génétique, Sperme, STR.

## ملخص

منذ الثمانينات بدأ العمل ببصمات الحمض النووي في المحاكم كدليل لإثبات الجرم وهو عبر عن مادة وراثية تستخلص من عدة مصادر بيولوجية يحتوي هذا الأخير على سلاسل صغيرة جد متغيرة من شخص إلى آخر تسمح بحصول على بيانات وراثية شخصية، لكن في أغلب القضايا مثل قضايا الاعتداء الجنسي يحاول المعتصب إخفاء الأدلة بغسلها لتضليل وعرقلة العدالة. في هذا العمل استخدمنا واحدة من هذه المصادر البيولوجية (بقع الحيوانات المنوية الذكرية) مغسول أربع مرات متتالية لتقييم لاستخلاص الحمض النووي لتحديد البيانات الوراثية للأفراد ذات الصلة بالاعتداءات الجنسي. أظهرت النتائج أن طرق لاكتشاف عن الحيوانات المنوية والحصول على ملفات وراثية قابلة للتفسير تعتمد على طبيعة المنظف المستخدم وعدد الغسلات.

الكلمات المفتاحية: الحمض النووي، الحيوانات المنوية، الاعتداء الجنسي، STR، الملف الوراثي.

## ABSTRACT

The introduction of genetic fingerprints in legal practice in the 1980s had a positive impact on the identification of individuals by their DNA, a genetic material that can be isolated from a variety of biological sources. DNA fingerprints or profiles are established by the analysis of several DNA loci, mainly highly polymorphic STR (short Tandem repeats). This property makes them the genetic markers of choice for establishing a genetic profile of each individual. In the case of sexual assaults, obtaining a genetic profile is not always easy. Indeed, in most cases the aggressor tries to hide all the traces. Thus, our study focused on the impact of repeated washes on the amount of DNA to be collected and on the determination of the genetic profile from traces of semen washed with 4 different detergents up to four times. The results showed that the methods for detecting sperm and obtaining interpretable genetic profiles would depend on the nature of the detergent used and the number of washes

**Keywords:** Detergents, DNA, Genetic profile, Sexual assault, Sperm, STR.