

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement supérieur

Et de la recherche scientifique

Université Abderrahmane Mira de Bejaia

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie physico-chimique

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Biologie

Option : Biologie moléculaire

Thème

**Utilisation des techniques de
manipulation de l'ADN en
criminalistique**

Préparé par Mr AMIR Nadir

Membres de jury :

- | | | |
|--------------|------------------|------------------------------|
| - Président | Mr IGUEROUADA M. | Maître de Conférences UAMB) |
| - Promoteur | Mr ATMANI D. | Maître de Conférences (UAMB) |
| - Examineurs | Mr TOUATI A. | Maître de Conférences (UAMB) |
| | Mme BEDJOU F. | Maître de conférences (UAMB) |

Promotion 2008-2009

REMERCIEMENTS

C'est avec un grand émoi, que je m'incline pour remercier tous ceux et celles qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Mes sincères remerciements vont d'abord à mon promoteur le Docteur ATMANI D., pour son encadrement, sa disponibilité, sa rigueur dans le travail et surtout pour m'avoir inculquer l'esprit de la recherche scientifique. Il a été et restera un modèle de l'enseignement.

Mes remerciements vont également à Mr IGUEROUADA M., qui m'a fait l'honneur de présider le jury.

Mes sincères considérations vont à Mr TOUATI A. et Mme BEDJOU F. qui ont consacré de leurs temps pour examiner et évaluer ce travail.

Un grand respect à Monsieur le sous-directeur de la police scientifique et technique qui m'a ouvert les portes du laboratoire, ainsi qu'à tous mes collègues du département ADN, chacun par son nom.

Merci

Dédicaces

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

La mémoire de mes grands parents

Mes parents toujours présents pour nous et pour tout

Pour ma femme Hassiba et ma fille ASMA, moteur de mon avancée

Pour ma soeur Akila

Pour mon frère Abdelgnani, sa femme Lynda et leur fils Elias

Pour mon frère Farouk

Pour toute ma famille et belle famille

Pour tous mes amis

Nadir

Sommaire

Sommaire

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

I- *Synthèse bibliographique*

I- Synthèse bibliographique	
I-1- Généralités sur l'ADN.....	02
I-2- Empreintes génétiques.....	02
I-2-1- Polymorphisme de longueur des fragments de restriction.....	02
I-2-2- Polymorphisme de répétitions... ..	02
I-2-2-1- Les minisatellites	03
I-2-2-2- Les microsatellites.....	04
I-2-3- Les marqueurs haplotypiques.....	09
I-2-3-1- Les marqueurs du chromosome Y.....	09
I-2-3-2- L'ADN mitochondrial.....	10
I-2-4- Détermination du sexe.....	11
I-2-5- Domaines d'application.....	11
I-2-6- Sources d'ADN en criminalistique.....	12
I-3- Prélèvements pour Analyse ADN.....	12
I-4- Techniques utilisées au laboratoire	
I-4-1- Tests préliminaires	12
I-4-1-1- Le sang.....	13
I-4-1-2- La salive.....	13
I-4-1-3- Le sperme	13
I-4-2- Extraction de l'ADN.....	13
I-4-3- Quantification de l'ADN.....	15
I-4-3-1- Sonde Taqman.....	16
I-4-4- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	17
I-4-5- L'analyse capillaire.....	20
I-5- Interprétation d'une analyse STR :	21

II- *Matériels et méthodes*

II- Matériels et méthodes

II-1-Matériels.....	23
II-1-1 - Appareillage	23
II-1-2- Matériel biologique.....	23
II-2- Méthode	23
II-2-1- Echantillonnage.....	23
II-2-1-1- Affaire n°01.....	24
II-2-1-2- Affaire n° 02.....	24
II-2-1-3- Affaire n° 03.....	24
II-2-1-4- Affaire n° 04.....	25
II-2-1-5- Expérience.....	25
II-2-2- Test préliminaire.....	27
II-2-2-1- Le sang	27
II-2-2-1-1-Test Kastle Meyer (KM).....	28
II-2-2-1-2 Test Hexagon OBTI	28
II-2-2-2 -Examen de cheveux	39
II-2-2-3- La salive	30
II-2-2-3-1- Test Phadebas	30
II-2-3- Extraction de l'ADN.....	31
II-2-4 -Quantification de l'ADN par la PCR	
quantitative en temps réel	33
II-2-5- Amplification de l'ADN par PCR.....	36
II-2-6- Electrophorèse capillaire.....	40

III- *Résultats et discussions*

III- Résultats et discussions	
III-1- tests préliminaires	41
III-1-1- Sang	41
III-1-1-1- Test Kastle-Meyer	41
III-1-1-2- Test Hexagon OBTI	41
III-1-2- Examen des cheveux	42
III-1-3- La salive.....	42
III-1-3-1- Test Phadebas.....	42
III-2- Quantification de l'ADN par la PCR	
quantitative en temps réel	43
III-3- Amplification par PCR.....	52
III-4- Electrophorèse capillaire	52
III-4-1- Affaire n° 01 (recherche de paternité).....	54
III-4-2- Affaire n° 02 (vol qualifié).....	57
III-4-3- Affaire n° 03 (homicide volontaire)	59
III-4-4- Affaire n° 04 (agression).....	60
III-4-5- Identification des propriétaires et chauffeurs par les traces	
de contacts sur différentes parties des véhicules.....	62
III-4-5-1- Véhicule A	63
III-4-5-2- Véhicule B.....	65
III-4-5-3- Véhicule C.....	70
IV- Conclusion et perspectives.....	76
V- Références bibliographiques.....	78
- Annexes.	

Liste des abréviations

CCD	Charge Coupled Device
CODIS	Combined DNA Index System
DTT	Dithiothréitol
FAM	6- Carboxyfluorocein
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
IPC	Internal PCR Control
KM	Kastle-Meyer
KV	Kilo Volt
LIZ	Internal lane size standard
POP-4	Performance Optimized Polymer 4
PSA	Prostatic Specific Antigen
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RFU	Rrelative Fluorescence Units
ROX	6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine
STR	Short Tandem Repeat
SWDGDM	Scientific Working Group on DNA analysis Methods
TAMRA	6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat

Liste des figures

Figure	Titre	page
1	Les régions Polymorphes du génome humain.	8
2	Sonde Taqman.	17
3	Déroulement de la PCR.	19
4	Illustration schématique de la séparation et détection des allèles des STR avec le séquenceur ABI 310.	21
5	Spectre d'émission des cinq fluorochromes utilisés dans le kit Identifier.	40
6	Résultat du test Hexagon OBTI.	41
7	Photo d'un bulbe sous microscope.	42
8	Résultat du test phadebas.	42
9	Courbe d'amplification de l'ensemble des échantillons.	43
10	Courbe d'amplification du témoin négatif de la PCR.	44
11	Schéma d'une courbe d'amplification.	45
12	Courbe standard.	46
13	Représentation des échantillons sur la courbe standard.	46
14	Quantités d'ADN obtenues des différents prélèvements sur le véhicule A.	48
15	Quantités d'ADN obtenues des différents prélèvements sur le véhicule B.	49
16	Quantités d'ADN obtenues des différents prélèvements sur le véhicule C.	50
17	Profil obtenu avec le témoin négatif de la PCR.	53
18	Profil obtenu avec l'ADN contrôle.	55

Liste des tableaux

Tableau	titre	page
01	Loci amplifiés et colorants correspondants utilisés par le kit AmpFISTR Identifier.	7
02	Codification des prélèvements sur le véhicule A.	26
03	Codification des prélèvements sur le véhicule B.	26
04	Codification des prélèvements sur le véhicule C.	26
05	Préparation de la gamme standard pour la PCR temps réel.	35
06	Calcul des volumes nécessaires pour la PCR Temps réel.	36
07	Contenu du kit AmpFISTR identifier.	38
08	Calcul du volume des réactifs nécessaires à la PCR.	38
09	Volumes nécessaires pour la post-amplification.	39
10	Résultats de la quantification des échantillons des quatre affaires.	47
11	Résultats de la quantification des échantillons secs et humides prélevés sur le véhicule A.	48
12	Résultats de la quantification des échantillons secs et humides prélevés sur le véhicule B.	49
13	Résultats de la quantification des échantillons secs et humides prélevés sur le véhicule C.	50
14	Résultats de la quantification des prélèvements buccaux effectués sur les personnes ayant participé à l'expérience.	51
15	Résultats de l'analyse des STR de l'affaire n° 01.	57
16	Résultats de l'analyse des STR de l'affaire n°02.	59
17	Résultats de l'analyse des STR de l'affaire n°03.	60
18	Résultats de l'analyse des STR de l'affaire n°04.	61
19	Profil du propriétaire du véhicule A (AC).	63

Suite :

20	Résultats de l'analyse des STR pour le véhicule A.	64
21	Résultats de l'analyse des STR pour le véhicule B.	67
22	Profil du propriétaire du véhicule B.	68
23	Allèles restant de chaque profil après élimination de ceux du propriétaire du véhicule B.	68
24	Profil déduit du chauffeur du véhicule B.	70
25	Profil réel du chauffeur du véhicule B.	70
26	Résultats de l'analyse des STR pour le véhicule C.	71
27	Profil du propriétaire du véhicule C.	72
28	Allèles restant de chaque profil après élimination de ceux du propriétaire du véhicule C.	73
29	Profil déduit du chauffeur du véhicule C.	75
30	Profil réel du chauffeur du véhicule C.	75

Introduction

Introduction

Tous les individus qui composent l'espèce humaine sont génétiquement très proches les uns des autres, mais la présence d'un grand polymorphisme au niveau des régions non codantes rend chaque être humain unique. Ce polymorphisme est à la base de l'identification par empreintes génétiques. Il s'agit d'une méthode d'identification quasi absolue des individus. Elle est basée sur le concept que deux individus ne peuvent avoir le même profil ADN, excepté les vrais jumeaux.

Durant les deux dernières décennies, les empreintes génétiques se sont considérablement développées tant dans leur technologie que dans leurs domaines d'application. L'amélioration des techniques a permis de diminuer le temps de réalisation des analyses et de travailler sur des quantités d'ADN de plus en plus faibles et souvent partiellement dégradées. Ces progrès ont été décisifs, surtout dans le domaine de la criminalistique.

Actuellement, en Algérie tous les services de sécurité font appel à la technique d'identification par profils ADN, pour l'élucidation des différents crimes (vols, homicides, agressions, attentats terroristes...), ou lors de catastrophes naturelles telles que les séismes, inondations,...etc

Dans la première partie de ce travail, que nous avons effectué au département ADN du laboratoire de police scientifique et technique d'Alger, seul laboratoire en Algérie à disposer de cette technique, nous avons suivi quatre affaires réelles qui illustrent l'intérêt de cette méthode en criminalistique.

Le corps humain peut perdre jusqu'à 400.000 cellules épithéliales par jour (Wickenheiser, 2002), cette particularité est exploitée dans la deuxième partie de ce travail pour identifier les chauffeurs des véhicules en analysant les traces de contacts laissées par ces derniers sur les différentes parties de ces véhicules, également démontrer l'apport de la technique du double prélèvement utilisant un écouvillon humide suivi d'un écouvillon sec sur le même endroit dans tels cas.

Cette étude sera consacrée à l'identification de suspects par analyse de profils génétiques en utilisant des sources d'ADN divers.

I- Synthèse bibliographique

I- Synthèse bibliographique

I-1- Généralités sur l'ADN

L'ADN ou l'acide désoxyribonucléique est le support de l'information génétique; ce n'est qu'en 1953 après la découverte de la structure de l'ADN par Watson J. et Crick F. que les généticiens ont admis qu'il était le constituant des gènes responsables du développement et de l'évolution de toutes les espèces vivantes.

L'ADN humain est arrangé en un ensemble de 23 paires de chromosomes dont chacun est une unique molécule d'ADN double brin de 55 à 250 millions de paires de bases. Le génome humain constitué de 6 milliards de paires de bases comporte environ 35000 gènes, cependant près de 90% du génome est non codant, c'est-à-dire ne commande directement aucune synthèse protéique (Jarman et Wells, 1989; Winter *et al.*, 2000). Puisque l'ADN non codant, contrairement à l'ADN codant, n'est pas soumis aux pressions sélectives, les mutations qui y surviennent sont conservées et transmises à la descendance (Brown, 2004). La grande variabilité de ces régions est exploitée en criminalistique où l'analyse génétique doit répondre à certains standards (Schneider, 2006), aussi bien pour les techniques que pour l'interprétation des résultats et l'utilisation de l'ADN mitochondrial. Plusieurs types de polymorphismes ont été utilisés, chacun révélant un niveau différent de variabilité.

I-2- Empreintes génétiques

I-2-1- Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP (restriction fragment length polymorphism) résulte de variations individuelles de la localisation de sites de restriction pour une enzyme donnée. Il peut être dû soit à une création ou une suppression d'un site de restriction en relation avec une mutation, soit à une variation de distance entre deux sites suite à une insertion ou une délétion d'ADN. Les fragments de restriction après digestion par une enzyme sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose selon la méthode Southern blot (Stryer, 1992; Serre et Coll, 2002).

I-2-2- Polymorphisme de répétitions

L'analyse de l'ADN non codant a mis en évidence des régions variables, caractérisées par la répétition en tandem d'unités de base composées de deux ou

plusieurs nucléotides; la taille de ces fragments varie en fonction du nombre de répétition (Jarman et Wells, 1999). On distingue les minisatellites et les microsatellites:

I-2-2-1- Les minisatellites

Les loci des minisatellites ou VNTR (variable number of tandem repeats) sont une famille de séquences répétées en tandem, ayant en commun un motif central de 11 à 16 paires de bases (séquence GGAGGTGGGCAGGA[A/G]G) (Kaplan et Delpech, 1989; Griffiths *et al.*, 2001). La longueur totale des minisatellites varie suivant les loci entre 0,5 et 500 kb ; les minisatellites les plus longs sont généralement localisés dans les régions télomériques des chromosomes (90%), tandis que les minisatellites interstitiels ont une longueur qui excède rarement 1 kb (Debrauwère *et al.*, 2000). Ce sont une classe très polymorphe de répétition en tandem riche en GC, qui inclut certains loci les plus variables du génome humain, avec un taux de mutation de 0,5% à plus 20% par génération (Bois, 2003). Le nombre de répétition varie énormément d'une personne à une autre; elles ne sont pas codantes donc ne permettent pas de les relier à une éventuelle maladie génétique (Rouger, 2000 ; Kashyap *et al.*, 2004). Par contre des études ont montré qu'ils peuvent avoir un rôle fonctionnel important, par exemple certains gènes contiennent des VNTR qui peuvent réguler leur expression (Naslund *et al.*, 2005).

Le développement des sondes multiloci qui, dans des conditions de stringence faibles, s'hybrident à un grand nombre de régions dispersées hypervariables a permis le développement de l'empreinte génétique. Ils constituent de puissants marqueurs pour l'étude de la carte génétique (Armour et Jeffreys, 1992). Certains loci minisatellites avec des allèles relativement courts (≈ 1000 pb) peuvent être amplifiés par PCR (Tamakia et Jeffreys, 2005).

Comme les autres séquences répétées en tandem, les minisatellites sont polymorphes. En effet, ces séquences subissent des fluctuations de leur nombre de motifs. Ce phénomène est dû à la duplication en tandem, un événement qui ajoute un motif copié à côté de l'original, et de l'événement inverse, la délétion en tandem (Bérard et Rivals, 2002).

I-2-2-2- Les microsatellites

A l'autre extrême, les microsatellites ou STR (short tandem repeats), sont répartis de façon régulière le long des chromosomes et correspondent aux répétitions de 1 à 6 nucléotides (Whittaker *et al.*, 2003), dont la longueur totale ne dépasse pas 100pb (Tamakia et Jeffreys, 2005). Par exemple, le chromosome 22 contient environ 2361 séquences microsatellites (di-, tri-, tétra- et penta-nucléotides) couvrant environ 200 kb. Par contre, Les minisatellites sont moins nombreux (305), mais couvrent néanmoins 100kb environ. (Debrauwère *et al.*, 2000). Les microsatellites dont la séquence core est un dinucléotide sont les plus fréquents dans le génome humain (Toth *et al.*, 2000), mais leur analyse basée sur la PCR est la moins adaptée à l'identification génétique. Leur variabilité semble principalement liée à des dérapages de réplication (Whittaker *et al.*, 2003). En effet, des dérapages, analogues à ceux survenant lors de la réplication *in vivo*, surviennent lors de l'amplification *in vitro* de dinucléotides répétés en tandem provoquant l'apparition de sous-produits artéfactuels appelés stutters. Ces produits correspondent en taille à des allèles réduits le plus souvent d'une ou de deux répétitions par rapport à l'allèle réel (Gill *et al.*, 2005). Dans les STR ayant une séquence répétitive de 2 paires de bases, le pic du stutter est presque aussi grand que celui de l'allèle nominal (Coquoz, 2003). Ils apparaissent moins fréquemment lors de l'analyse de tétra- ou pentanucléotides, ce qui les rend plus appropriés aux applications médico-légales. La réduction de la proportion des stutters est cruciale pour l'analyse de mélanges d'ADN de plusieurs individus (Buckleton *et al.*, 2007). Chez les chromosomes humains, les répétitions de tétranucléotides sont plus abondantes que celles des trinucléotides; les plus fréquentes sont AAAG, AAGG, AAAC et AGTA. Les microsatellites de type (AATT)*n* sont absents des génomes eucaryotes; ce sont des répétitions qui semblent être interdites (Subirana et Messenguer, 2008). Le chromosome 17 apparaît comme celui qui présente le plus grand nombre de séquences répétées.

D'autres facteurs de validation entrent dans la sélection des STR pour l'identification génétique parmi lesquels l'absence d'autres produits artéfactuels et la taille du marqueur; les chances d'obtenir de bons résultats à partir d'échantillons dégradés augmentent lorsque des miniSTR sont analysés avec des fragments amplifiés de petite taille (Tsukada *et al.*, 2002; Buttler, 2007; Barbaro *et al.*, 2008), et la possibilité d'analyse simultanée avec d'autres marqueurs. En effet, ces derniers critères sont cruciaux lors de

l'analyse d'ADN dégradé ou en très faible quantité (Hill *et al.*, 2008). Les kits commercialement disponibles permettent l'analyse entièrement automatisée et simultanée de 15 marqueurs ainsi que celle du gène de l'amélogénine afin de révéler le sexe de la personne à l'origine de l'échantillon. Le pouvoir discriminant de ces profils génétiques est très fort avec la probabilité que deux personnes prises au hasard partagent les mêmes allèles est inférieure à 10^{-15} (Pascal, 1998). Néanmoins, il est recommandé d'utiliser des kits ayant le plus grand nombre de marqueurs afin d'augmenter le pouvoir d'identification (Moroni *et al.*, 2008).

La taille réduite des STR dimérique, trimérique et tétramérique facilite leurs études simultanées par PCR (Polymerase chain reaction) multiplex, où 9 à 16 loci sont amplifiés en une seule réaction à partir d'un seul échantillon. Les STR choisis pour l'utilisation en criminalistique possèdent généralement 7 à 30 allèles différents (Kashyap *et al.*, 2004). La nomenclature des loci est construite avec les quatre éléments suivants :

- Le premier est un 'D' pour DNA ;
- Le deuxième est le numéro du chromosome portant la séquence d'ADN ;
- Le troisième indique le type de séquence d'ADN : séquence unique (symbolisée par S), séquence se trouvant en plusieurs endroits sur le même chromosome (symbolisée par Z), séquence faisant partie d'une famille de séquences homologues trouvées sur plusieurs chromosomes (symbolisée F) ;
- Le dernier est un nombre conférant le caractère unique au locus; il correspond en quelque sorte à l'ordre de découverte des séquences d'ADN sur le chromosome considéré.

Le locus D21S11 est donc une région de l'ADN du chromosome 21 portant le numéro de série 11.

Le reste des loci qui ne répondent pas à cette nomenclature sont rapportés par Buttler (2003) : le marqueur CSF1PO est localisé dans le proto-oncogène *c-fms* du récepteur CSF-1, situé sur le bras long du chromosome 5. Le marqueur FGA est localisé sur le troisième intron du locus de l'alpha fibrinogène situé sur le bras long du chromosome 4. Le marqueur TH01 est localisé sur le premier intron du gène de la tyrosine hydroxylase situé sur le bras court du chromosome 11. Le marqueur TPOX est localisé sur le dixième intron du gène de la thyroïde peroxydase humaine situé sur le bras

court du chromosome 2. Le marqueur VWA est localisé sur l'intron 40 du gène codant le facteur Von Willebrand situé sur le bras court du chromosome 12.

La nomenclature des allèles des STR suit une logique très simple. Les allèles sont dénommés d'après le nombre d'éléments répétitifs qu'ils comportent. Ainsi l'allèle 6 du STR TH01 porte six fois l'élément répétitif AATG. L'allèle 9.3 correspond à l'allèle 9+3 paires de bases, cette dénomination respecte le principe de nomenclature pour les allèles irréguliers, qui portent le numéro de l'allèle immédiatement inférieur, avec en décimal, le nombre de paires de bases supplémentaires (Coquoz, 2003).

La structure des STR peut être simple ou complexe. Les STR complexes montrent une grande variabilité et sont de ce fait plus informatifs, alors que les STR simples permettent une standardisation facile et montrent un taux de mutation plus faible (Lazaruk *et al.*, 2001).

La majorité des kits disponibles renferment les treize STR du système CODIS (Combined DNA Index System) qui sont : CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, et D21S11. Ces loci sont les plus utilisés pour leurs facilités d'utilisation sous forme de kit (Butler, 2006). Le kit AmpFISTR Identifier d'Applied Biosystem (tableau 1) permet l'analyse simultanée des marqueurs du système CODIS, du marqueur de l'amélogénine, ainsi que deux marqueurs additionnels D2S1338 et D19S433.

Tableau 1: Loci amplifiés et colorants correspondants utilisés par le kit AmpFISTR
Identifier (p et q, respectivement bras court et long du chromosome).

Locus	Localisation chromosomique	Allèles inclus dans l'identifier allelic ladder	Fluorochrome	DNA control 9947 A
D8S1179	8	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6- FAM	13
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38.		30
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 11
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 12
D3S11358	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
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	NED	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		14, 15
VWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		17, 18
TPOX	2p23-2pter	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13		8
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	PET	15, 19
Amélogénine	X : p22.1-22.3 Y : p11.2	X, Y		X
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		11
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		23, 24

(Applied Biosystems, 2006)

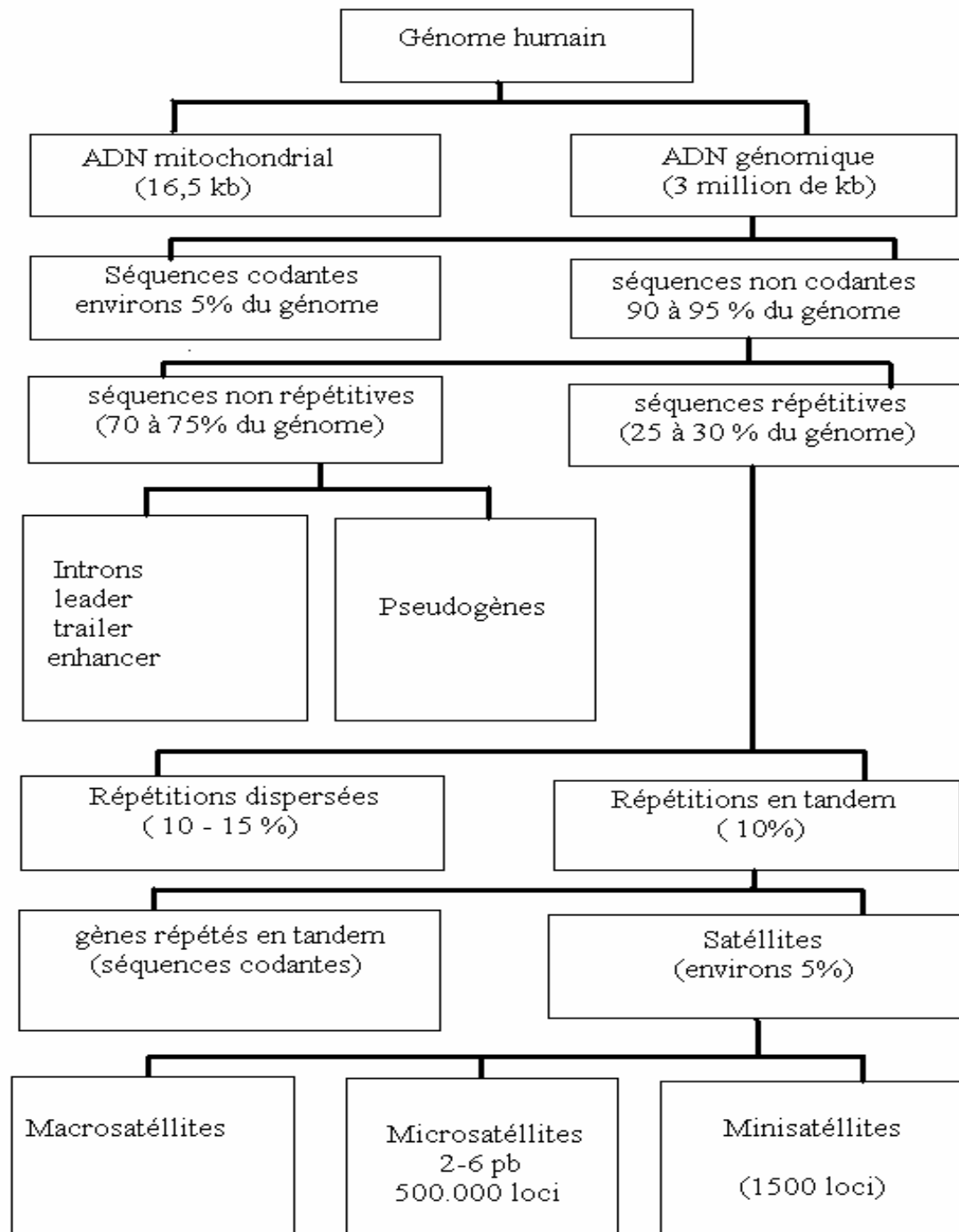


Figure 1 : Les régions Polymorphes du génome humain (Kashyap *et al.*, 2004).

I-2-3- Les marqueurs haplotypiques

Les marqueurs autosomaux subissent un brassage génétique à chaque génération puisqu'ils sont transmis de manière biparentale. Ainsi, la moitié de l'information génétique d'un individu lui vient de son père et l'autre moitié de sa mère. Les marqueurs uniparentaux, c'est-à-dire ceux situés sur le chromosome Y et sur l'ADN mitochondrial, sont transmis d'une génération à l'autre sans changement sauf dans le cas de mutations. Les marqueurs de l'ADN mitochondrial, transmis de mère à enfant, permettent de retracer les lignées maternelles (Etienne et Clauser, 2001) et ceux du chromosome Y, transmis de père en fils, les lignées paternelles (Primorac *et al.*, 2000). Cette caractéristique rend les marqueurs moins informatifs pour l'identification individuelle. L'information génétique de chaque marqueur uniparental est appelée haplotype au lieu de génotype, puisqu'un seul allèle est détecté par individu.

I-2-3-1- Les marqueurs du chromosome Y

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

Ces marqueurs peuvent être utilisés pour de nombreuses applications :

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

I-2-3-2- L'ADN mitochondrial

Les mitochondries sont des organelles cytoplasmiques qui fournissent l'énergie à la cellule, la séquence complète de l'ADN-mt humain compte 16 569 pb, et code deux ARN ribosomiaux, 22 ARNt et 13 chaînes polypeptidiques différentes (Alberts *et al.*, 1989; Lodish *et al.*, 1997). Les mitochondries sont présentes en nombre variable dans le cytoplasme des cellules (de 75 dans le spermatozoïde à 100 000 dans l'ovocyte). Elles possèdent plusieurs copies d'ADN-mt dont la séquence est connue depuis 1981 (Quintana-Murci *et al.*, 1999). L'ADN-mt évolue beaucoup plus rapidement que l'ADN nucléaire ; les mutations s'y accumulent dix fois plus (Singer *et al.*, 1992), ce taux de mutation est particulièrement élevé en raison de l'absence d'histone, mais surtout du fait de sa localisation à proximité de la machinerie respiratoire cellulaire, source reconnue de radicaux libres, fortement mutagène (May-Panloup *et al.*, 2006).

L'ADN-mt présente peu de régions codantes puisque les gènes qu'il porte sont dépourvus d'introns et parfois même chevauchant. Il existe cependant deux régions non codantes. L'une d'environ 1200 pb présentant une structure en triple brin appelée région de contrôle ou D-Loop (displacement-loop), l'autre d'environ 30pb (Lodish *et al.*, 1997). La région D-Loop présente un degré de variation inter-individus relativement important rendant son analyse utile pour l'identification (Ingman et Gyllensten, 2001). La méthode la plus répandue consiste en l'amplification par PCR puis le séquençage d'environ 610pb sur deux fragments qui sont particulièrement polymorphes, les régions hypervariables I et II (HVI et HVII).

Une autre caractéristique de l'ADN-mt est son hérédité maternelle, en effet, l'ovule est bien fourni en mitochondries, alors que les spermatozoïdes n'en contiennent qu'un petit nombre qui ne persiste pas dans la descendance, la mère transmet donc son ADN-mt à tous ses enfants, mais seules les filles le transmettront à leur tour à leurs progéniture (Etienne et Clauser, 2001), seul peut être analysée la relation maternelle entre deux échantillons, une étude de filiation paternelle n'étant pas possible (De Mazancourt et Pfitzinger, 2005).

L'ADN-mt permet l'identification d'échantillons extrêmement dégradés, l'étude d'ossements (Keyser-Traquis *et al.*, 2002) et particulièrement des tiges de cheveux ne contenant pas de bulbe.

I-2-4- Détermination du sexe

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

La méthode de sexage utilisée aujourd'hui est basée sur l'amplification d'une région présentant une délétion de 6 pb sur le chromosome X. La taille des fragments amplifiés, 106 pb pour le chromosome X et 112 pb pour le chromosome Y (Shadrach *et al.*, 2004), est parfaitement adaptée à l'étude d'échantillons tels qu'ils peuvent être rencontrés lors de l'identification médico-légale ou criminalistique, c'est-à-dire dégradés ou en très faible quantité. Actuellement, les kits commerciaux d'amplification des STR autosomaux incluent systématiquement l'amplification de cette portion du gène de l'amélogénine.

Néanmoins chez certains hommes, l'amélogénine du chromosome Y n'est pas amplifiée suite à une délétion sur le bras court du chromosome, ce qui donne un profil ADN qui peut être faussement interprété comme profil féminin (Jobbling *et al.*, 2007). De même, des études récentes ont montré que certains sujets féminins peuvent porter les deux variantes du gène amélogénine, et donner ainsi un profil XY pour ce marqueur (Stapleton *et al.*, 2008). Certaines mutations au niveau des sites de fixation des amorces peuvent interférer avec l'identification du sexe (Shadrach *et al.*, 2004).

I-2-5- Domaines d'application

L'identification par profils génétiques est utilisée dans plusieurs cas :

- Dans les recherches de filiations.
- Dans le cas de grandes catastrophes, que se soit naturelles comme les séismes, tsunami ou criminelles comme les attentats (Budowle *et al.*, 2005), pour d'une part identifier les victimes et d'autre part reconstituer les corps déchiquetés.
- Dans l'identification de criminels (Pizzamiglio *et al.*, 2004) et investigation sur les Crimes en série (Barbaroa *et al.*, 2004).
- Dans le cas des personnes disparues (Gonzalez-Andrade *et al.* 2006).
- Identification des restes humains, notamment les ossements (Cunha *et al.*, 2006).

I-2-6- Sources d'ADN en criminalistique

Il est possible d'obtenir des profils d'ADN à partir de la plupart des substances biologiques, par exemple le sang, excepté les globules rouges (Ginestra *et al.*, 2004), le sperme, particulièrement en utilisant les nouvelles techniques de micromanipulation (Petit *et al.*, 2008), Les cheveux (Pfeiffer *et al.*, 2004 ; Andreasson *et al.*, 2006), les rabats d'enveloppes et timbres (Lay-Keow *et al.*, 2007), des restes de squelettes humains (Prado *et al.*, 1997 ; Loreille *et al.*, 2007). La conservation d'ADN semble meilleure au niveau des tissus durs (Calvo *et al.*, 2001). Également d'échantillons très dégradés (Bender *et al.*, 2004; Dixon *et al.*, 2006) ou très anciens ; Des profils ADN ont été obtenus à partir de taches de sang laissées entre 17 à 26 ans à température ambiante (Tsukada *et al.*, 2002).

Des profils ont été également obtenus à partir de prélèvements par écouvillonnage sur la surface de la peau ; cas des strangulations (von Wurmb-Schwark *et al.*, 2006), ainsi qu'à partir de traces de contacts direct sur divers objets (Wickenheiser, 2002 ; Phipps et Petricevic, 2007)

I-3- Prélèvements pour Analyse ADN

Il existe deux catégories de prélèvements pour une analyse criminalistique:

- 1- Les prélèvements de référence correspondent à des prélèvements sur une personne clairement identifiée, à laquelle on associe son profil génétique. L'identification de l'individu via ce profil génétique permettra de faire des comparaisons avec des empreintes génétiques issues de prélèvements de questions.
- 2- Les prélèvements de questions correspondent à différentes substances biologiques (sang, sperme, salive, éléments pileux, matières fécales, ossements...), qui peuvent être retrouvées sur des scènes de crimes et sur tout type de support (mégots de cigarettes, bouteilles, vêtements...).

I-4- Techniques utilisées au laboratoire

I-4-1- Tests préliminaires

Les tests préliminaires permettent de déterminer la nature des traces incriminées.

I-4-1-1- Le sang

La détermination de la nature sanguine d'une trace repose sur des réactions d'orientation telles que la réaction Kastle-Meyer ou Adler. La première est basée sur l'activité peroxydasique de l'hémoglobine sur la phénolphtaléine, réduite par le Zinc en présence de (H₂O₂), s'oxyde pour donner une coloration rose. La seconde sur l'activité peroxydasique de l'hémoglobine sur la Benzidine réduite en présence de (H₂O₂) qui s'oxyde pour donner une coloration bleu vert.

L'origine est déterminée par le test Hexagon OBTI, qui est un test immunochromatographique pour la détection de sang humain.

I-4-1-2- La salive

La présence de la salive dans un échantillon est mise en évidence par le test padebas qui repose sur l'activité de l'alpha amylase. (Da Vela *et al.*, 2006)

I-4-1-3- Le sperme

La mise en évidence du sperme se fait par la recherche de la phosphatase acide prostatique (Caine *et al.*, 2008), qui est synthétisée essentiellement, mais non exclusivement, dans la prostate. Elle se fait également par la recherche de la PSA (Antigène spécifique prostatique), glycoprotéine produite par la prostate (Talthip *et al.*, 2007), ou directement par observation microscopique après coloration.

I-4-2- Extraction de l'ADN

Un échantillon biologique obtenu à partir d'une scène de crime sous forme de tache de sang ou tache de sperme et autre, ou l'échantillon provenant d'un suspect ou d'un cas de recherche de paternité contient un certain nombre de substances autre que l'ADN. La molécule d'ADN doit être séparée des autres constituants cellulaires. Les protéines cellulaires qui empaquettent et protègent l'ADN dans l'environnement cellulaire peuvent empêcher son analyse. Pour ce, des méthodes d'extraction ont été développées pour séparer les protéines et tout autre matériel cellulaire des molécules d'ADN.

Il existe plusieurs méthodes d'extraction, principalement utilisées dans les laboratoires de médecine légale, mais le procédé exact varie selon la nature de l'échantillon analysé.

L'extraction organique ou extraction au phénol chloroforme implique l'addition successive de plusieurs produits; le sodium dodécyl sulfate (SDS) et la protéinase K sont ajoutés pour dénaturer les protéines enveloppant l'ADN. Puis le mélange phénol-chloroforme est rajouté pour séparer les protéines de l'ADN qui est soluble dans la phase aqueuse. L'extraction organique nécessite beaucoup de temps, l'utilisation de produits chimiques dangereux et plusieurs transferts de l'échantillon, ce qui l'expose à des risques de contamination (Butler, 2003).

La méthode chelex est simple, rapide et dépourvue de toute toxicité (Aknin-Seifer *et al.*, 2004). Elle implique peu d'étapes, donc peu de risque de contamination; cependant, elle produit un ADN simple brin en raison du processus d'extraction.

Le papier FTA est une chimie brevetée de la société Whatman. Cette chimie sur matrice de cellulose permet d'une part la lyse des membranes des cellules déposées et de leurs organelles suivie du largage des acides nucléiques qui seront enchâssés et protégés dans les fibres du support. D'autre part, elle inactive les phages, bactéries et virus rendant ainsi inertes (pour le manipulateur et pour les acides nucléiques) les échantillons collectés (Muthukrishnan *et al.*, 2008; Wolfgramm *et al.*, 2009). Une fois secs, les acides nucléiques sont protégés de la dégradation enzymatique, microbienne, oxydative ou par les radicaux libres, et peuvent être conservés durant plusieurs années à température ambiante.

Un prélèvement sur carte FTA consiste en la découpe, à l'aide d'un emporte-pièce, d'une rondelle (*punch*) de 1,2 mm de diamètre imprégnée de sang (ou de salive) séché. Le *punch* est lavé plusieurs fois puis séché à température ambiante et conservé transitoirement à 4°C ou utilisé directement en PCR (Picozzi *et al.*, 2002).

L'extraction différentielle est une version modifiée de l'extraction organique; elle sépare les cellules épithéliales des spermatozoïdes dans le cas des agressions sexuelles, ce qui permet de différencier le profil masculin du profil féminin. Cette méthode implique la lyse préférentielle des cellules épithéliale par une incubation dans un mélange SDS/protéinase K, puis les cellules spermatiques sont lysées par traitement avec le mélange SDS/Protéinase K/dithiothréitol (DTT). Le DTT permet de rompre les ponts dissulfures présents dans la membrane nucléaire des spermatozoïdes. La différence majeure avec la méthode d'extraction organique est l'incubation initiale dans le mélange SDS/protéinase K sans la présence du DTT (Buttler, 2003).

I-4-3- Quantification de l'ADN

Le problème typique d'une analyse ADN est la détermination de la quantité d'ADN optimale pour la réaction PCR (Tringali *et al.*, 2004 ; Kline *et al.*, 2005), une déviation de cette quantité produit des profils présentant un déséquilibre des pics, un allèle ou locus drop-out ou absence totale de profil (Alonso *et al.*, 2004). Le grand impact de la concentration de l'ADN sur le succès de l'amplification par PCR fait qu'une quantification fiable, sensible et spécifique de l'ADN humain est essentielle (Schulz *et al.*, 2006). La quantification de l'ADN fait donc appel à la technique de PCR en temps réel (Swango *et al.*, 2007), qui est réalisée en présence d'un contrôle interne de la PCR (IPC) qui permet la détection des inhibiteurs de PCR (Swango *et al.*, 2006 ; Costello et Schumm, 2006), et renseigne sur l'état de dégradation de l'ADN dans l'échantillon (Swango *et al.*, 2006, Ricci *et al.*, 2006). Quantifiler™ donne des résultats reproductibles pour des échantillons dont la concentration en ADN varie de 0.1 ng/μl à 5 ng/μl. Néanmoins, une concentration en ADN de 0,03ng/μl a pu être détectée (Johns *et al.*, 2006). Les kits ABI profiler plus et COfiler pour l'analyse multiplex des STR recommandent l'addition de 1- 2,5 ng d'ADN pour un résultat optimal (Perkin Elmer coporation, 1998).

La PCR en temps réel permet de mesurer l'accumulation du produit de PCR à chaque cycle au cours de la réaction d'amplification (Valasek *et al.*, 2005). Le principe est d'utiliser un marquage fluorescent du produit de PCR. Le fluorochrome est ajouté à la réaction de PCR. La réaction de PCR et la détection du produit sont donc simultanées. L'appareil de PCR en temps réel n'est autre qu'un thermocycler classique sur lequel vient s'ajouter un détecteur de fluorescence. L'appareil mesure l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. (China *et al.*, 2002). Au début de la réaction PCR, les réactifs sont en excès mais en concentration assez faible afin d'éviter que la renaturation des amplicons n'entre en compétition avec l'hybridation des amorces (primers). L'amplification est alors réalisée de façon constante à un taux exponentiel à l'aide d'une ADN polymérase thermostable. Après la phase exponentielle, la réaction d'amplification entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable à cause d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. Suit une phase plateau où le taux d'amplification décroît à près de zéro générant très peu d'amplicons (Poitras et Houde, 2002).

L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR (Walker, 2002). En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (Stratagene, 2004). Étant donné qu'elle utilise généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification, les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont significativement réduits (Klein, 2002).

I-4-3-1- Sonde Taqman

La sonde Taqman est un court oligonucléotide (20 – 30 paires de base) (Houghton et Cockerill, 2006), complémentaire à la séquence cible. Cette méthode repose sur l'activité 5' nucléase de l'ADN polymérase impliquée dans la réaction de PCR. En effet, en progressant celle-ci va déplacer et cliver la sonde spécifique hybridée à l'ADN cible (figure 2). Cette sonde est dessinée de manière à permettre la capture de la fluorescence du fluorophore donneur (en 5' de la sonde) par le fluorophore receveur (en 3' de la sonde) (Suzuki *et al.*, 2005). Ainsi, lors du clivage de la sonde par l'ADN polymérase, les fluorophores donneur et receveur sont éloignés permettant la détection de la fluorescence (Liu *et al.*, 2006). La sonde hybridée avec un mésappariement à l'ADN cible (hybride instable) sera déplacée sans être clivée lors de la progression de l'ADN polymérase.

Les principes à respecter dans le design des sondes Taqman sont aussi applicables aux autres sondes et comprennent comme règles générales :

- 1) une longueur de 20-40 nucléotides,
- 2) un contenu en G-C variant de 40- 60%,
- 3) aucune séquence permettant une hybridation ou un chevauchement avec les amorces,
- 4) un A, un C ou un T à l'extrémité 5' parce qu'un G supprime la fluorescence de l'émetteur même après clivage,
- 5) un T_m de 5 à 10°C plus élevé que les amorces afin de s'assurer qu'elles s'hybrident avant les amorces et qu'elles demeureront hybridées pendant l'étape combinée d'hybridation et de polymérisation (Bustin, 2000 ; Mackay *et al.*, 2002).

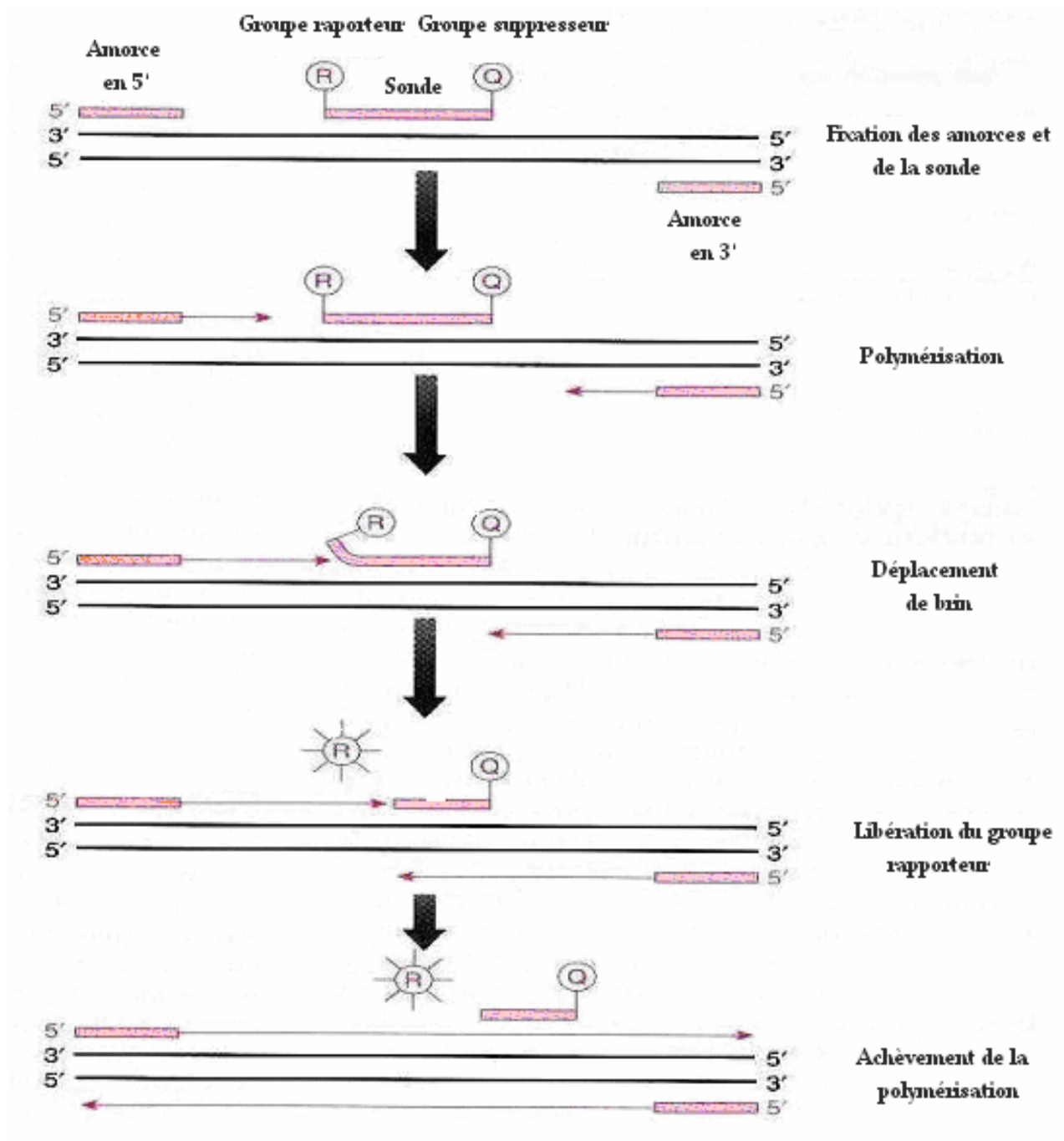


Figure 2: Sonde Taqman (Primrose *et al.*, 2004)

I-4-4- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne permet d'amplifier de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle se fait en 3 étapes (figure 3) :

- La dénaturation de l'ADN réalisée à haute température (1 minute à 94°C) conduit à la séparation des deux brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogènes.
- L'hybridation des amorces spécifiques est réalisée à une température T_m déterminée en fonction de la composition nucléotidique des amorces et de leur longueur (0,5 à 2 minutes à 50 – 60°C).
- L'élongation des brins d'ADN est effectuée à 72°C (2 minutes).

La durée de ces étapes dépend de plusieurs facteurs, comme la performance de l'appareil utilisé et la longueur des fragments à amplifier.

L'enzyme utilisée pour l'amplification de l'ADN est l'AmpliTaQ-Gold, qui est une ADN polymérase modifiée pour n'être activé qu'à une température supérieure à 90°C durant une étape pré PCR. Elle est plus sensible particulièrement pour les faibles quantités d'ADN et la détection des marqueurs difficiles à détecter le cas du marqueur FGA (Spitaleri *et al.*, 2004).

La PCR multiplex, co-amplification de plusieurs STR en une seule réaction permet une économie de temps, de matériel, la conservation de l'échantillon et réduit les risques de contaminations (William *et al.*, 1998 ; Tsukada *et al.*, 2002), ce qui fait de la PCR une technique très utile pour les investigations criminelles où la quantité d'ADN retrouvée est infime (Panneerchelvam et Norazmi, 2003), particulièrement pour l'amplification de fragments inférieurs à 200 pb, ou dégradés (Jobling et Gill, 2004 ; Bender *et al.*, 2004). Des résultats d'analyse fiable ont été obtenus avec de l'ADN amplifié à partir de 500 pg d'ADN génomique (Shneider *et al.*, 2004). Beaucoup de substances inhibent cette réaction, le cas des polysaccharides et certains acides présents dans les aliments (Di Pinto *et al.*, 2007), le sang (Abu Al-Soud *et al.*, 2000), colorants des jeans...etc.

L'inhibition peut être levée, ou ses effets diminués par l'une des solutions suivantes :

- 1- Diluer l'échantillon, ce qui dilue également l'inhibiteur puis ré-amplifier (Abu Al-Soud *et al.*, 2000) ;
- 2- Ajouter plus d'ADN polymérase ;
- 3- Il est également démontré que la BSA (sérum albumine bovine), prévient ou minimise les inhibiteurs de la PCR ;

- 4- Récemment, il est démontré que le traitement de l'ADN par l'hydroxyde de sodium neutralise les inhibiteurs de la Taq polymérase ;
- 5- Enfin séparation de l'ADN des inhibiteurs avant l'amplification. Les filtres centricon-100 et microcon-100 sont utilisés.

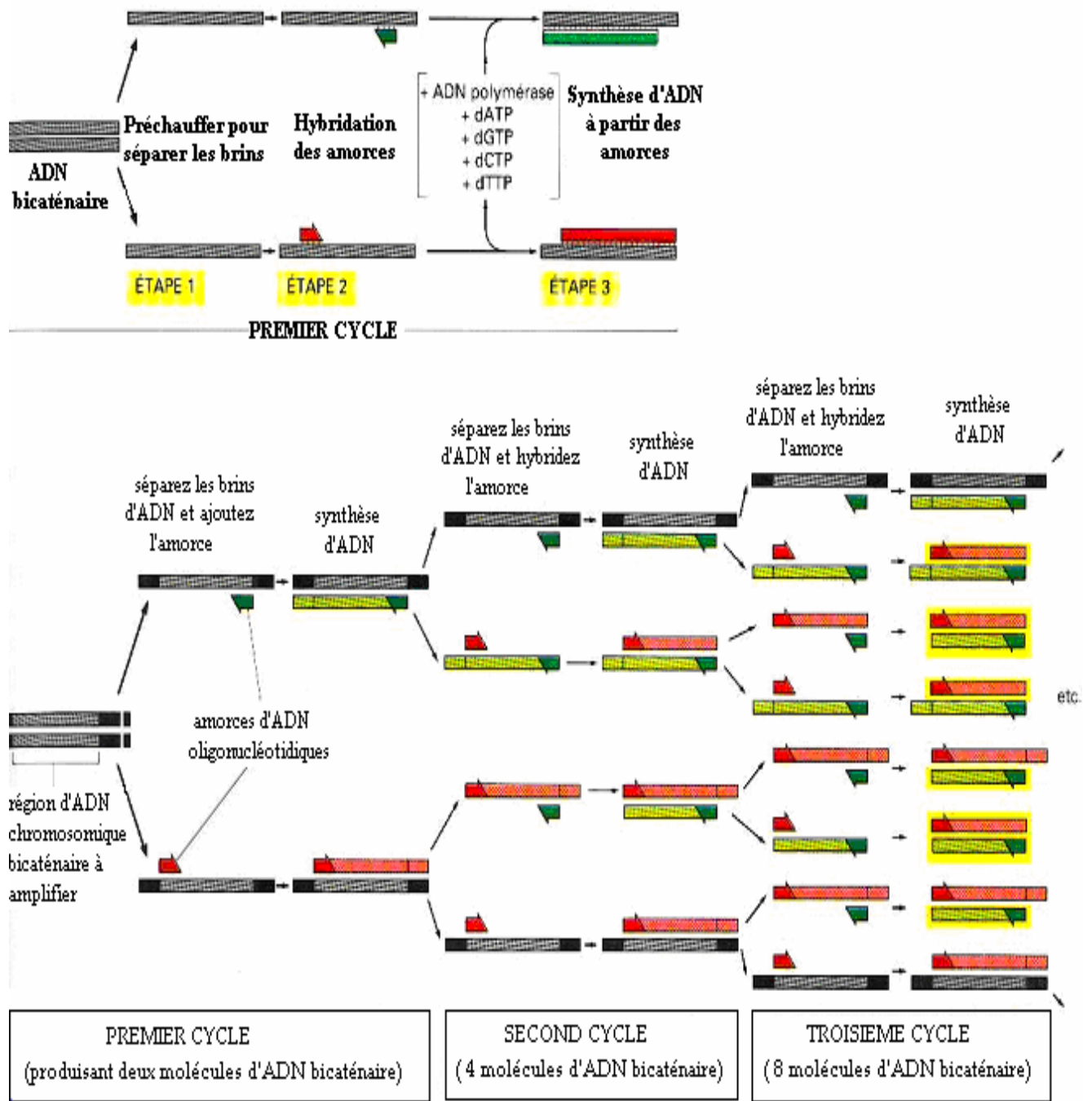


Figure 3 : Déroulement de la PCR (Alberts et Bray , 1999).

I-4-5- L'analyse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique qui permet l'étude de molécules très variées avec une excellente résolution et une grande rapidité (Trevin et Le Bricon, 2003). Dans l'analyse des STR, elle est utilisée pour quantifier (aires des pics) et déterminer la taille des fragments d'ADN marqués, obtenus après la réaction PCR multiplex par comparaison à un standard de taille interne (LIZ) et un étalon (ladder) spécifique du kit utilisé (annexe 1).

La préparation de l'ADN simple brin pour l'électrophorèse capillaire est réalisée par l'ajout de la formamide, qui est un puissant dénaturant. Cependant, un chauffage rapide à 95°C suivi d'un refroidissement instantané est généralement exécuté pour s'assurer que le processus de dénaturation s'est produit (Butler *et al.*, 2004).

Une plaque 96 puits rempli d'échantillon est placée dans le séquenceur, les fragments d'ADN, sous l'influence d'un courant (15kv) migrent, en fonction de leurs taille, à l'intérieur du capillaire en verre ayant quelques microns de diamètre, sur plusieurs dizaines de centimètres de longueur (30 à 50 cm en général) (EL Fahime et Ennaji-Mly, 2007) rempli d'un polymère qui exerce un effet de tamisage moléculaire (Trevin et Le Bricon, 2003).

Lorsque ces fragments atteignent la fenêtre de détection, ils sont excités par un faisceau laser à Argon; les fluorochromes excités vont réémettre une fluorescence spécifique. Une lentille concave appelée spectrographe va décomposer pour chacun des capillaires la fluorescence entre 500 et 700 nm et diriger chaque faisceau en direction de la caméra CCD, qui est une puce en silicone composée de milliers de cellules photoélectriques (pixels). Chacun de ces pixels va accumuler une charge électrique proportionnelle à l'intensité de la fluorescence émise. Les données sont traitées par un logiciel (Applied Biosystems, 2001).

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

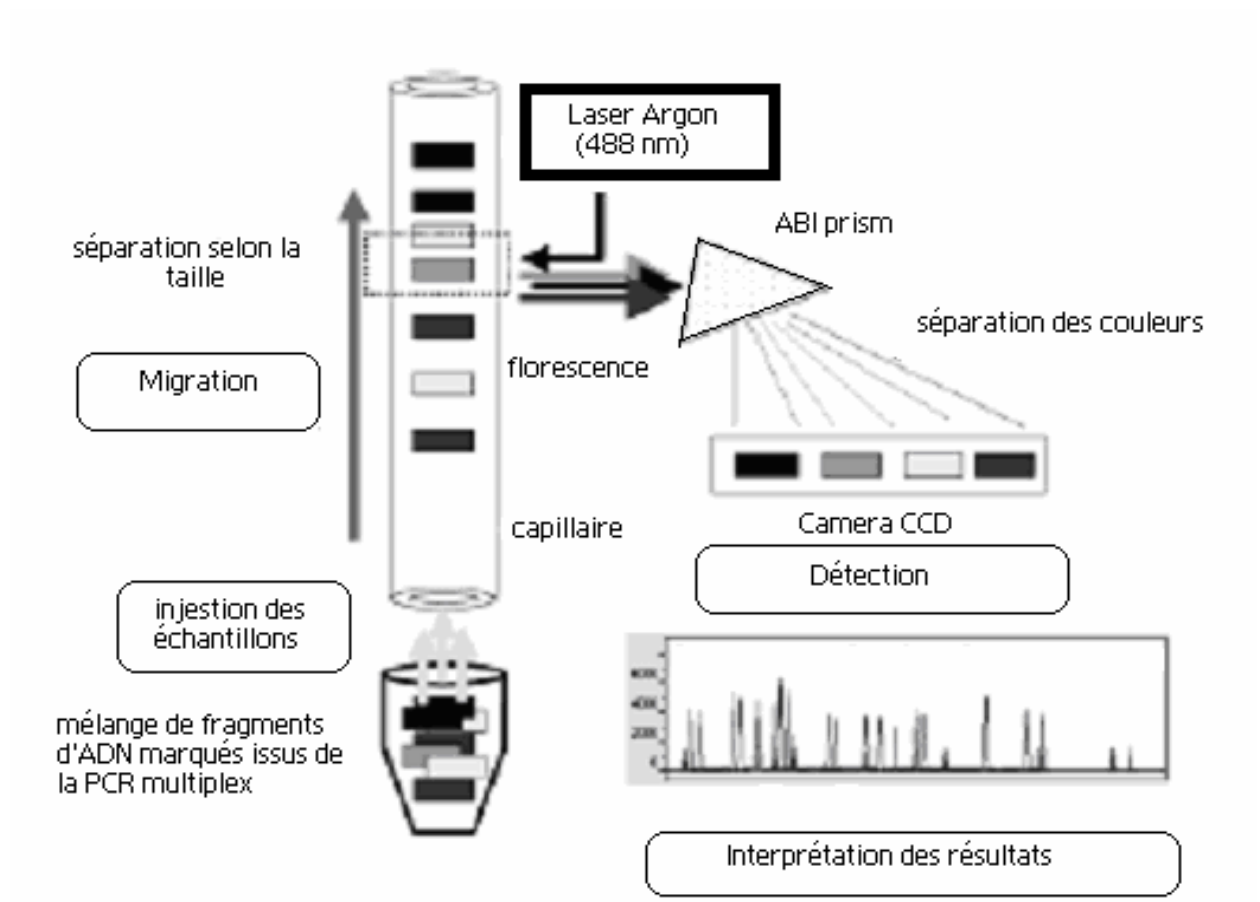


Figure 4 : Illustration schématique de la séparation et détection des allèles des STR avec le séquenceur ABI 310 (Butler *et al.*, 2004).

I-5- Interprétation d'une analyse STR :

Le pouvoir de discrimination (Pd) est la probabilité d'avoir deux génotypes différents en analysant deux individus pris au hasard dans la population considérée. Il est calculé à partir de la probabilité d'identité (Pid), qui est calculé par la formule suivante (Coquoz, 2003):

$$Pid = \sum_{i=1}^n P_i^2$$

Où P_i est la fréquence de la variante i , et n est le nombre de variantes

Dans le cas des marqueurs génétiques, la variante est un génotype et P_i est la fréquence du génotype i . Une fois la probabilité d'identité calculée, le pouvoir de discrimination qui lui est complémentaire, est calculé par la formule :

$$P_d = 100\% - P_{id}$$

Le pouvoir de discrimination se calcule à partir des fréquences des génotypes ; ces fréquences ne sont pas forcément identiques dans tous les groupes ethniques (Moroni *et al.*, 2008).

Le manuel d'utilisation du kit d'amplification AmpFISTR® Identifier® d'Applied Biosystems (2006), rapporte que la probabilité que deux personnes prises au hasard aient le même génotype en utilisant ce kit est estimée à $1/7.64 \times 10^{17}$ (population Américaine d'origine Africaine), $1/2.00 \times 10^{17}$ (Américains Caucasiens), $1/1.31 \times 10^{17}$ (Américains d'origine Hispanique), et $1/2.76 \times 10^{16}$ (Natifs Américains).

La valeur probante se calcule selon la fréquence des allèles présents à chaque locus. Comme ordre de grandeur, il peut y avoir environ une chance sur 10 que deux personnes non apparentées aient le même profil ADN à un locus. A partir de 5 loci, il peut y avoir moins d'une chance sur un million d'observer une telle correspondance de façon fortuite. Les probabilités de paternité obtenues en routine avec 15 STRs sont généralement supérieures à 99,999%. Selon la jurisprudence suisse, une valeur supérieure à 99,8% permet de conclure que le lien de parenté est pratiquement prouvé. Si une personne présente un profil génétique qui n'est pas compatible avec celui de l'enfant, et que ces incompatibilités ne sont pas dues à des mutations, il est conclu que le parent présumé est exclu comme étant le parent biologique. Cette conclusion est une certitude et aucun calcul statistique n'est nécessaire (Castella, 2006).

Dans plusieurs cas concrets, des véhicules volés ont été utilisés puis abandonnés après avoir commis un crime ou un acte terroriste. A travers ce travail nous étudierons plusieurs cas réels, et exploiterons les traces de contacts, laissées sur plusieurs endroits d'un véhicule pour identifier le propriétaire et le dernier chauffeur de ce véhicule, en utilisant la technique du double écouvillonnage ; un prélèvement humide suivi d'un prélèvement sec sur le même endroit.

II- Matériels et méthodes

II- MATERIELS ET METHODES

II-1-Matériels

Lors des différentes manipulations, nous avons fait appel au matériel suivant :

II-1-1 - Appareillage

- Centrifugeuses
- Vortex
- Bain marie agitateur
- Microscope
- Thermocycleur AmpPCR system 9700 d'Applied Biosystems
- Thermocycleur real time: 7500FAST version1.4
- Séquenceurs ABI Prism 3100-Avant Genetic analyzer
- Congélateurs

II-1-2- Matériel biologique

Les échantillons utilisés dans ce travail sont, du sang sous forme de taches, de la salive des cheveux ainsi que des cellules cutanées laissées par contact direct.

II-2- Méthode

Dans ce travail nous avons traité quatre affaires réelles et réalisé une expérience afin de déterminer des profils génétiques à partir de traces de contacts laissées sur différentes parties de véhicules en utilisant deux types de prélèvement : un premier sec suivi d'un autre humide pour la même zone de prélèvement.

II-2-1- Echantillonnage

Les différents échantillons sont recueillis par un personnel spécialisé (techniciens de scène de crimes), lors des constatations effectuées sur les différentes scènes d'infraction. Les prélèvements concernant la première affaire ont été effectués au laboratoire de police scientifique, alors que les autres échantillons ont été acheminés au laboratoire par les différents services de police sous scellés.

II-2-1-1- Affaire n°01

Cette affaire concerne une recherche de paternité ; pour ce, nous avons reçu la mère, la fille, et quatre présumés pères sur lesquels nous avons effectué des prélèvements buccaux et mis sous scellés comme suit :

Le scellé n° 1-1, contenant deux prélèvements buccaux de la mère.

Le scellé n° 1-2, contenant deux prélèvements buccaux de la fille.

Le scellé n° 1-3, contenant deux prélèvements buccaux du père présumé 1.

Le scellé n° 1-4, contenant deux prélèvements buccaux du père présumé 2.

Le scellé n° 1-5, contenant deux prélèvements buccaux du père présumé 3.

Le scellé n° 1-6, contenant deux prélèvements buccaux du père présumé 4.

II-2-1-2- Affaire n° 02

Cette affaire concerne un vol qualifié commis dans un appartement ; pour ce, nous avons reçu les six scellés suivants :

Le scellé n° 2-1, contenant un morceau de papier taché de sang.

Le scellé n° 2-2, contenant un prélèvement d'une tache de sang par écouvillonnage sur la poignée de la porte d'une des chambres de l'appartement cambriolé.

Le scellé n° 2-3, contenant des cheveux.

Le scellé n° 2-4, un prélèvement de salive par écouvillonnage sur une bouteille.

Le scellé n° 2-5, contenant deux prélèvements buccaux sur le suspect n°01.

Le scellé n° 2-6, contenant deux prélèvements buccaux sur le suspect n°02.

II-2-1-3- Affaire n° 03

Cette affaire concerne un homicide volontaire, pour laquelle nous avons reçu les quatre scellés suivants :

Le scellé n° 3-1, contenant une tache de sang prélevée par écouvillonnage sur le parquet de la maison.

Le scellé n° 3-2, contenant une tache de sang prélevée par écouvillonnage sur une vitre brisée.

Le scellé n° 3-3, contenant deux prélèvements buccaux du suspect n°01.

Le scellé n° 3-4, contenant deux prélèvements buccaux du suspect n°02.

II-2-1-4- Affaire n° 04

Cette affaire concerne une agression, pour laquelle nous avons reçu les quatre scellés suivants :

Le scellé n°4-1, contenant un mouchoir en papier.

Le scellé n°4-2, contenant une trace de sang prélevée par écouvillonnage.

Le scellé n°4-3, contenant deux prélèvements buccaux de la victime.

Le scellé n°4-4, contenant deux prélèvements buccaux du suspect.

II-2-1-5- Expérience

L'expérience consiste à faire des prélèvements sur trois véhicules différents A, B et C. les cellules de peau laissées pendant le contact sont recueillies par un écouvillon humide d'abord puis par un écouvillon sec. L'écouvillon humide est préparé en ajoutant une goutte d'eau stérile au coton. La surface est tamponnée environ 15 secondes avec une pression modérément forte et un mouvement circulaire. Les tiges tournées le long de leurs axes, permet à chaque côté d'entrer en contact avec la surface cible.

Les prélèvements sec et humide sont séchés à l'air libre puis extrait séparément. Cinq endroits différents ont été choisis pour effectuer cette expérience :

- 1- Le volant : qui est partagé en deux parties :
 - partie 1 : partie supérieure à l'axe horizontale du volant
 - partie 2 : partie inférieure à l'axe horizontale du volant.
- 2- Le levier de vitesse
- 3- Le clignotant
- 4- Le frein à main
- 5- La poignée intérieure côté chauffeur

Les véhicules A et C appartiennent à des hommes, et le véhicule B appartient à une femme. Les prélèvements ont été effectués directement sur le véhicule A, par contre, pour les véhicules B et C, ils ont été réalisés après qu'une deuxième personne de sexe masculin ai conduit le véhicule pendant 05 minutes. Des prélèvements buccaux ont été effectués sur les propriétaires et les chauffeurs des trois véhicules.

Les tableaux 1, 2 et 3 présentent les différentes codifications utilisées, respectivement pour les prélèvements sur les véhicules A, B et C.

Tableau 2 : Codification des prélèvements sur le véhicule A.

Véhicule A	Type de prélèvement	Volant		Lever de vitesse	clignotant	Frein à main	Poignée intérieure
		Partie 1	Partie 2				
	Humide	AHV1	AHV2	AHL	AHC	AHF	AHP
	Sec	ASV1	ASV2	ASL	ASC	ASF	ASP

Propriétaire du véhicule A : AC

Tableau 3 : Codification des prélèvements sur le véhicule B.

Véhicule B	Type de prélèvement	Volant		Lever de vitesse	clignotant	Frein à main	Poignée intérieure
		Partie 1	Partie 2				
	Humide	BHV1	BHV2	BHL	BHC	BHF	BHP
	Sec	BSV1	BSV2	BSL	BSC	BSF	BSP

Propriétaire du véhicule B : BC1

Chauffeur du véhicule B : BC2

Tableau 4 : Codification des prélèvements sur le véhicule C.

Véhicule C	Type de prélèvement	Volant		Lever de vitesse	clignotant	Frein à main	Poignée intérieure
		Partie 1	Partie 2				
	Humide	CHV1	CHV2	CHL	CHC	CHF	CHP
	Sec	CSV1	CSV2	CSL	CSC	CSF	CSP

Propriétaire du véhicule C : CC1

Chauffeur du véhicule C : CC2

Remarque

- Toutes les personnes ayant participé à l'expérience sont consentantes.
- Dans le but de réduire le nombre d'échantillons, le propriétaire du véhicule C et le chauffeur du véhicule B (BC2 et CC1) sont la même personne, le propriétaire du véhicule A et le chauffeur du véhicule C (AC et CC2) sont une seule personne.
- Le profil de BC1 existe déjà.

- Mise en tube

Dans la salle examen traces, après nettoyage de la paillasse au SDS 0,1%, et sur un papier paillasse, les différents prélèvements ont été mis dans des tubes eppendorf préalablement identifiés. La totalité du coton de l'écouvillon est découpée avec un scalpel stérile puis mise dans le tube correspondant. Les gants, le scalpel, pince et papier paillasse sont changés systématiquement après manipulation de chaque échantillon.

Dans une deuxième salle réservée à l'examen des traces de comparaison, les cotons des différents écouvillons prélevés sur les chauffeurs et les propriétaires des trois véhicules ont été découpés et mis dans des tubes eppendorf préalablement identifiés.

Des tubes témoins négatifs sont réalisés pour chaque série d'échantillon. Une feuille de route ainsi que les formulaires nécessaires pour l'assurance qualité, sont remplis pour chaque série d'échantillon.

II-2-2- Test préliminaire

La découverte de traces nécessite un travail minutieux ; elle fait appel à des éclairages artificiels ainsi que des réactifs chimiques pour la détection de traces non visibles. Les tests préliminaires ou indicatifs permettent d'attester de la nature biologique d'une trace. Chaque matériel biologique nécessite des tests indicatifs particuliers.

II-2-2-1- Le sang

La caractéristique chimique la plus spécifique du sang est son contenu en hémoglobine. C'est cette propriété qui est exploitée par les tests chimiques destinés à identifier la présence de sang. L'hémoglobine est un puissant catalyseur de l'oxydation de substances oxydables par l'eau oxygénée (Coquoz, 2003).

II-2-2-1-1-Test Kastle-Meyer (KM)

Ce test est utilisé pour la détection de taches de sang sans pour autant déterminer son origine. Il a été réalisé sur toutes les taches de sang, à savoir le contenu des scellés n° (2-1), (2-2), (3-2) et (4-2).

- Principe de la méthode

La réaction KM est basée sur l'activité peroxydasique de l'hémoglobine sur la phénophtaléine réduite par le zinc, en présence de H_2O_2 , qui s'oxyde pour donner une coloration rose (Geansslen, 1983).

- Mode opératoire

Le mode opératoire suivi est celui rapporté par Alexander *et al.* (1943) modifié. Une partie du coton de l'écouvillon des scellés (2-2), (3-1), (3-2) et (4-2) a été découpée avec une lame stérile puis déposée dans une coupelle de pesée stérile. De même, une partie du morceau de papier contenu dans le scellé (2-1) est également découpée ; deux gouttes d'eau distillée ont été rajoutées pour chaque échantillon pour l'humidifier, puis deux gouttes du réactif KM et enfin deux gouttes d'eau oxygénée à 0,1V. Un test témoin positif avec du sang est réalisé pour tester la réaction.

II-2-2-1-2 Test Hexagon OBTI

C'est un test rapide immunochromatographique pour la détection de sang humain. Il produit des résultats fiables sur des traces de sang anciennes ou dégradées (Turrina *et al.* 2008).

- Principe de la méthode

L'hémoglobine contenue dans l'échantillon réagit avec le conjugué composé de particules bleues et anticorps monoclonaux anti-hémoglobine humaine. Les complexes ainsi formés migrent dans la zone du test (T) et réagissent avec un deuxième anticorps anti-hémoglobine humaine. L'apparition d'une ligne de test bleue indique un résultat positif. L'excès de réactif migre plus loin et va se fixer sur une seconde ligne en réagissant avec des anticorps anti-souris de type IgG. Cette ligne de contrôle indique le bon fonctionnement et l'application correcte du test. Un résultat apparaît positif en

l'espace de 2 à 3 minutes, alors qu'un résultat négatif ne doit être confirmé qu'après 10 min.

- Mode opératoire

Le mode opératoire suivie est celui dicté par le fabricant et fournit avec le kit, rapporté par RUWAG DIAGNOSTICS. Pour ce, une fine partie est découpée de chaque écouvillon des mêmes scellés utilisés pour le test Kastle-Meyer, ainsi qu'une partie de l'échantillon (2-1), puis transférés dans des tubes comprenant le milieu de transport fournit en kit, bien agiter les tubes pour assurer un mélange correct, briser la pointe du tube et distribuer deux gouttes dans la zone ronde (S) inférieure du test posée horizontalement. Attendre cinq minutes avant d'effectuer la lecture, un résultat négatif est interprétable seulement après 10 min.

- Mise en tube

Le reste du coton de chaque échantillon ainsi que le morceau de papier taché de sang sont mis dans des tubes eppendorf préalablement identifiés, un tube témoin négatif est également réalisé.

II-2-2-2 -Examen de cheveux

Les cheveux contenus dans le scellé (2-3), sont examinés en deux étapes ; en premier lieu les éléments pileux ont été mesurés en décrivant leurs aspects selon un formulaire bien précis à savoir, l'aspect (souple, raide, ondulé, crépu...), la couleur (blanc, blond, châtain, brun, noir clair, foncé), la forme racine (absente, bulbaire, entortillée...) et la médula (non visible, continue, discontinue, en échelle), suivi d'un examen microscopique sous lame et lamelle.

- Principe de la méthode

L'examen consiste à rechercher des cheveux présentant un bulbe, qui peuvent être exploités pour l'extraction de l'ADN.

- Mode opératoire

Pour cet examen, déposer deux gouttes séparées de glycérine alcoolisée (éthanol absolu et glycérine v/v) sur la lame, puis placer l'élément pileux et couvrir d'une lamelle, observer au microscope (objectifs 10, 20 et 40).

- Mise en tube

Le poil présentant un bulbe est récupéré après rinçage à l'éthanol puis à l'eau. Une fois séchée, le poil est découpé à l'aide d'une lame stérile à environ 1cm du bulbe, la partie contenant le bulbe est mise dans un tube eppendorf pour servir à l'extraction de l'ADN.

II-2-2-3- La salive

La substance la plus spécifique de la salive est une enzyme digestive qui transforme l'amidon en maltose, c'est aussi la principale enzyme salivaire.

II-2-2-3-1- Test Phadebas

Ce test permet la mise en évidence de la salive dans un échantillon donné, c'est aussi une méthode appropriée à la détermination de l'activité de l'alpha amylase (Da Vela *et al.*, 2006).

- Principe de la méthode

Le substrat est un haut polymère insoluble d'amidon branché sur lequel est couplé un chromophore bleu. Lorsqu'il est hydrolysé par l'alpha amylase, le substrat libère des fragments solubles et marqués par le colorant bleu (Pharmacia Diagnostics AB, 1997)

- Mode opératoire

Une partie du coton de l'écouvillon du scellé (2-4) et une partie du mouchoir en papier contenu dans le scellé numéro (4-1) ont été découpés puis mis dans des tubes Falcon. Dans un troisième tube est mis un écouvillon stérile qui servira de témoin négatif de la réaction. Un volume de 04 ml d'eau distillée est une tablette phadebas ont été rajoutés pour chacun des tubes qui seront ensuite incubés à 37°C pendant 30 minutes

sous agitation horizontale. Enfin, un volume de 0,1 ml de NaOH (0,5M) a été rajouté pour chaque tube avant une centrifugation à 6000tr/min pendant 05 minutes.

- Mise en tube

Le reste du coton de l'écouvillon (2-4) ainsi que la tache suspecte du scellé (4-1) ont été mis dans des tubes eppendorf préalablement identifiés. Un tube témoin négatif est également réalisé avec un écouvillon stérile. La moitié du coton des écouvillons réalisés sur les suspects et victime des différentes affaires a été découpée puis mise dans des tubes eppendorf préalablement identifiés pour extraction de l'ADN.

II-2-3- Extraction de l'ADN

- Principe de la méthode

Le but de l'extraction est de rompre la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire des cellules en présence de tampon ATL et de protéinase K qui dégrade les protéines. L'utilisation de tubes passoirs permet d'éliminer le support. L'ajout d'éthanol absolu, solvant neutre qui agit en déshydratant la double hélice d'ADN, entraîne alors sa précipitation.

La purification basée sur l'adsorption d'ADN se fait par une colonne QIAGEN standard pouvant être utilisée dans une microcentrifugeuse. Cette colonne contient une résine de silice qui a pour rôle de retenir sélectivement les molécules d'ADN chargée négativement (par interaction électrostatique). Le kit utilisé emploie deux tampons qui permettent de laver l'ADN en éliminant les agents contaminants (ARN, reste de protéines), la solution AW1 rend le milieu défavorable pour l'ADN, forçant l'ADN à se réfugier dans la membrane, et la solution AW2 stabilise les liaisons. L'ADN est ensuite détaché de la colonne (élution) et entraîné par un tampon d'élution AE fourni dans le kit.

- Mode opératoire

Soixante seize échantillons dont onze témoins négatifs, ont subi une extraction selon la méthode QIAGEN, en suivant le protocole fourni avec le QIAamp® DNA mini Kit (QIAGEN®, 2003), composé principalement des deux étapes suivantes :

1- La lyse

Pour les échantillons des scellés (2-1), (2-2), (3-2) et (4-2) contenant du sang, l'échantillon est immergé avec 180 µl d'ATL, vortexé brièvement puis incubé à 85°C pendant 10min. Un volume de 20µl de PK du kit est rajouté à chaque échantillon, qui sera ensuite vortexé et incubé à 56°C pendant une heure. L'échantillon est ensuite passé en tube passoire avec centrifugation à 13000 rpm pendant 03min pour récupérer le lysat.

La partie du cheveu du scellé (2-3) contenant le bulbe est immergée dans un volume de 360 µl d'ATL et 500µl de PK puis incubée une nuit à 56°C.

Pour les prélèvements buccaux et ceux effectués sur les différents véhicules, un volume de 18 µl de tampon ATL et 20µl de PK du kit ont été rajoutés à chaque échantillon avant une incubation d'une heure à 56°C. Chaque échantillon est passé par un tube passoire en centrifugeant 03 min à 13 000 rpm pour récupérer l'éluât auquel sont rajoutés 200 µl de tampon AL, avant une seconde incubation à 70°C pendant 10min.

2- Purification

Les échantillons de sang ont été incubés à 70°C pendant 10 min après avoir ajouté 200µl de tampon AL et 200 µl d'éthanol absolu. Après Vortex et une brève centrifugation, le contenu de chaque tube a été déposé doucement au centre d'une colonne préalablement identifiée. Après centrifugation à 8000 rpm pendant une minute, le tube contenant l'éluât est éliminé. La colonne est transférée dans un nouveau tube et un volume de 500µl de tampon AW1 y est rajouté. Après une autre centrifugation à 8000 rpm pendant une minute, 500µl du tampon AW2 ont été rajoutés à la colonne déjà transférée dans un autre tube, suivie d'une centrifugation à 13 000 rpm pendant trois minutes. La colonne de nouveau transférée, à laquelle on a rajoute 100 µl du tampon AE a été incubée 05 min à température ambiante. Une centrifugation à 8000 rpm pendant 01 min permet la récupération de l'extractum contenant l'ADN.

Le tube contenant le bulbe, après incubation pendant une nuit à 56°C, a été centrifugé quelques secondes pour faire tomber les gouttes accumulées dans le capuchon. 400µl du tampon AL du kit ont été rajoutés avant une incubation à 56°C pendant 10 min et additionnées de 400µl d'éthanol absolu. Le reste des étapes de purification est similaire pour tous les échantillons. Pour les prélèvements buccaux et traces de contacts sur les véhicules, un volume de 20µl d'éthanol absolu est rajouté après la lyse.

En nous basant sur l'expérience de Pang et Cheung (2007), le volume du tampon AE a été réduit de moitié (50µl du tampon AE) pour les échantillons contenant les traces de contacts afin d'obtenir une solution d'ADN finale concentrée. Des aliquôts de 0,5 µl sont transférés de chaque échantillon vers de nouveaux tubes Eppendorf préalablement identifiés qui serviront à la quantification de l'ADN par la PCR en temps réel. Les extracums et les aliquôts sont conservés à 04°C.

II-2-4 Quantification de l'ADN par la PCR quantitative en temps réel

Cette technique permet d'estimer la quantité d'ADN présente dans un échantillon et renseigne également sur son état de dégradation ainsi que sur la présence éventuelle d'inhibiteurs de la PCR.

- Principe de la méthode

La technologie de la PCR en temps réel détecte et mesure l'accumulation du produit amplifié au cours de l'amplification. Cette technologie mesure de manière précise la quantité initiale de la cible. Plusieurs chimies de détection existent : elles utilisent soit des molécules se liant à l'ADN (SYBR® Geen I), soit des sondes moléculaires spécifiques de la cible amplifiée (TaqMan®, Molecular Beacon,...). Les résultats sont enregistrés et analysés par un logiciel sous forme de graphes d'amplification, de tableaux de données et de rapports (Joëlle Broutin, 2007).

Les sondes Taqman sont des oligonucléotides à l'extrémité 5'P desquels est attaché un groupe fluorescent émetteur (reporter) (ex. FAM : 6-carboxyfluorocéine), et, à l'extrémité 3'OH, un groupe suppresseur qui absorbe la fluorescence du premier (quencher), (ex. TAMRA : 6-carboxy-tetraméthyl-rhodamine).

Selon le manuel d'utilisation du Kit Quantifiler (quantifiler®Human DNA quantification kit de Applied Biosystems, Foster City, CA), la quantification de l'ADN combine deux analyses, la première cible l'ADN humain et la seconde est un contrôle interne de la PCR (IPC : Internal PCR control). L'analyse de l'ADN humain nécessite deux amorces pour l'amplification, et une sonde TaqMan®MGB marqué avec le fluorochrome FAM pour la détection du produit amplifié. La cible de cette sonde est le gène de la reverse transcriptase de la télomérase humaine (hTERT : Human Telomerase reverse transcriptase gene) localisé au niveau de 5p15.33.

Le contrôle interne de la PCR, consiste en une séquence d'ADN synthétique inexistante dans la nature, deux amorces pour son amplification, et une sonde TaqMan®MGB marquée avec le fluorochrome VIC pour la détection du produit amplifié. La sonde TaqMan®MGB contient un groupe reporter (FAM ou VIC) à l'extrémité 5'P, à l'extrémité 3'OH, un suppresseur de fluorescence NFQ (non fluorescent quencher) et un groupement (MGB : minor groove binder), cette modification augmente la température de fusion T_m . Lorsque stimulé et stabilise la sonde (Mackay, 2004), le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (fluorescence resonance energy transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence. La sonde s'hybride à un site de la séquence-cible situé en aval de celui d'une des amorces. Pendant l'élongation de l'amorce, l'activité nucléase de 5'P vers 3'OH de la polymérase Taq clive la sonde et sépare le groupe fluorescent rapporteur du groupe suppresseur, ce qui provoque une augmentation du signal. L'activité nucléase dégrade la sonde, permettant ainsi à la polymérisation de se poursuivre jusqu'à l'extrémité du brin cible. Des molécules fluorescentes sont détachées de leurs sondes à chaque nouveau cycle, ce qui génère un accroissement d'intensité de la fluorescence proportionnel à la quantité d'ADN amplifié (Primrose et al., 2004). Le marqueur fluorescent ROX TM permet de normaliser les variations de fluorescence non reliées à la PCR (fluorescence des plaques ou tubes, contamination du bloc PCR,...)

- Mode opératoire

Le kit quantifier contient un tube de 5ml du mélange réactionnel composé de l'ADN polymérase Ampli Taq-Gold, les dNTPs, Mg^{2+} , ainsi qu'un normalisateur de fluorescence, le ROX. Le kit contient également trois tubes de 1,4 ml chacun de mélange d'amorces (primer mix), contenant les amorces sens et anti-sens pour l'amplification de l'ADN humain, les sondes pour la détection de l'amplification, ainsi que les amorces et sondes de l'IPC. L'ADN humain standard concentré à 200ng/ μ l est fourni dans un tube contenant 120 μ l. Le mode opératoire suivi est:

1- Préparation de la gamme standard

Il faut d'abord réaliser une série de dilutions, allant de 50ng/μl jusqu'à 0,023ng/μl à partir d'un ADN standard humain de 200 ng/μl selon le tableau suivant :

Tableau 5: Préparation de la gamme standard pour la PCR temps réel

Standard	Concentration ng/μl	Dilution	Facteur de dilution
Std.1	50	10μl (200ng/μl AND)+ 30μl Tampon T10E0.1	4X
Std.2	16,7	10μl std.1 +20μl Tampon T10E0.1	3X
Std.3	5,56	10μl std.2 +20μl Tampon T10E0.1	3X
Std.4	1,850	10μl std.3 +20μl Tampon T10E0.1	3X
Std.5	0,62	10μl std.4 +20μl Tampon T10E0.1	3X
Std.6	0,21	10μl std.5 +20μl Tampon T10E0.1	3X
Std.7	0,068	10μl std.6 +20μl Tampon T10E0.1	3X
Std.8	0,023	10μl std.7 +20μl Tampon T10E0.1	3X

2- Préparation de la réaction

2-1- Matériel nécessaire

- réactifs du Kit
- Tubes 10ml
- pipettes
- Plaque 96 puits
- Echantillons à analyser
- Adhésif

2-2-Préparation

Avant toutes préparations, le volume de chaque composé est calculé en fonction du nombre d'échantillons à analyser, suivant le tableau suivant :

Tableau 6 : Calcul des volumes nécessaires pour la PCR Temps réel

Nombre d'échantillons à quantifier : N= 76	
Réactifs	Volume
Primer- mix human quantifier	$V(\mu\text{l}) = 10,5 \times (N+2) = 819$
Reaction- mix	$V(\mu\text{l}) = 12,5 \times (N+2) = 975$

Les réactifs sont préparés comme suit :

Faire fondre complètement le primer mix, puis vortexer 3 à 5 secondes et centrifuger brièvement avant d'ouvrir le tube. Remuer doucement le quantifier PCR réaction- mix (ne pas vortexer), puis pipeter le volume nécessaire de chaque composant dans un tube de volume approprié. Vortexer le mélange (PCR- mix) 3 à 5 secondes et centrifuger brièvement puis distribuer 23 μl du PCR-mix dans chaque puit de la plaque, ajouter ensuite, 2 μl de l'échantillon, du standard ou contrôle dans le puit correspondant selon le plan de dépôt. Deux séries standard sont réalisées. Après avoir rempli les puits, sceller la plaque avec l'adhésif fourni avec le kit et la centrifuger à 3000 rpm environ 20 secondes pour chasser les bulles d'air des puits.

Une fois l'ordinateur allumé, mettre en marche le thermocycleur (ABI 7500 sequence detection system de Applied Biosystems) et choisir l'icône 7500 fast syst V1.4.0. Les puits à analyser sont choisis après introduction de la plaque dans le thermocycleur, auxquels on applique les détecteurs des fluorochromes FAM (bleu) pour human quantifier et VIC (vert) pour l'IPC. Le tableau est rempli selon le plan de dépôt.

Avant de lancer l'analyse, vérifier les paramètres suivants :

- cycle de la PCR : 10 : 00 min à 95°C (activation de la Taq polymérase)
 - 00 :15 min à 95°C (dénaturation de l'ADN)
 - 01 :00 min à 60°C (hybridation et polymérisation)
- Run mode 9600 émulation
- Sélectionner la dernière étape du cycle

II-2-5 Amplification de l'ADN par PCR

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne permet d'amplifier de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. La PCR utilisée est une

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

- Principe de la méthode

La réaction nécessite deux amorces oligonucléotidiques longues de 17 à 30 nucléotides, qui encadrent la séquence à amplifier. Les amorces s'hybrident avec les brins complémentaires de l'ADN après qu'il ait été dénaturé, et elles sont orientées de telle sorte que l'ADN polymérase synthétise la région encadrée. La réaction d'élongation crée deux régions cibles double brin, qui peuvent chacune être dénaturé, puis servir dans un deuxième cycle d'hybridation et d'élongation. Le troisième cycle produit deux molécules doubles brin qui contiennent exactement la région cible. La répétition des cycles de dénaturation thermique, hybridation d'amorces et élongation conduit rapidement à l'accumulation exponentielle du fragment d'ADN ciblé (Primrose *et al.*, 2004).

Le kit «AmpFISTR®identifiler™ Amplification Kit» permet l'amplification de 15 répétition tétranucléotidiques, et la marqueur de sexe l'amélogénine en une unique réaction.

- Mode opératoire

Le kit d'amplification, cité précédemment, fourni par Applied biosystems, contient une quantité de réactif suffisante pour réaliser 200 amplifications. L'amplification de l'ADN en utilisant ce kit nécessite 10µl d'échantillon avec une concentration de 0,05 à 0,125 ng/µl d'ADN. Le protocole suivi est dicté par le fournisseur et renferme les étapes suivantes :

1- Amplification

Les réactifs contenus dans le kit AmpFISTR Identifiler fourni par applied biosystems figurent sur le tableau 7.

Tableau 7 : Contenu du kit AmpFISTR identifier

Composé	Description	Volume
Amp FISTR®PCR réaction-Mix	Deux tubes contenant : -MgCl ₂ -Desoxynucléotides triphosphate -BSA dans le tampon avec 0,05% d'azoture de sodium	1,1 ml / tube
Amorces	Un tube	1,1 ml
ADN polymérase Ampli TaqGold®	Deux tubes contenant l'enzyme avec une activité de 5U/µl	50 µl / tube
ADN contrôle 9947 A	Un tube contenant 0,1ng/µl	0,3 ml
Ladder (AmpFISTR® identifier™ allelic ladder)	Un tube contenant tous les allèles amplifiés	50 µl

Les tubes contenant la réaction mix, la TaqGold et les amorces sont vortexés pendant 5 secondes puis centrifugés brièvement. Les volumes de ces composés sont calculés selon le tableau suivant :

Tableau 8 : Calcul des volumes des réactifs nécessaires à la PCR

Nombre d'échantillons 76 + 02 (un témoin positif et un témoin négatif)	
Réactif	volume
Reaction mix	78 x 10,5 µl = 819 µl
Taq Gold	78 x 0,5µl = 39 µl
Amorces	78 x 5,5 = 429 µl

Le mélange (master mix) est vortexé à vitesse moyenne pendant 05 secondes, puis 15 µl de ce dernier sont répartis dans chaque puit de la plaque. 10µl des échantillons

présentant une concentration d'ADN inférieure ou égale à 0,125 ng/μl sont déposés dans le puit correspondant selon le plan de dépôt, alors que les échantillons dont la concentration en ADN est inférieure à 0,125ng/μl sont dilués dans un tampon TE (10ml Tris HCl 1M, PH 8,0, 0,2ml EDTA 5M et 990ml eau désionnée) pour obtenir une concentration finale d'ADN entre 0,05 et 0,125ng/μl (0,5 à 1,25 ng d'ADN dans 10μl d'échantillon). 10μl de chaque dilution sont ensuite déposés dans le puit correspondant au plan de dépôt.

Le tube contenant l'ADN contrôle positif concentré à 0,1ng/μl est vortexé puis centrifugé avant de prélever 10μl et les déposés dans le puit correspondant. Enfin 10μl du tampon TE sont déposés dans le puit témoin négatif. La plaque est recouverte par un papier aluminium puis introduite dans le thermocycler Gene Amp PCR system 9700.

2- Post-amplification

Le volume des réactifs nécessaires (formamide et standard de taille (Liz)) est calculé selon le tableau suivant :

Tableau 9 : Volumes nécessaires pour la post-amplification

Nombre d'échantillons amplifiés : N = 78	
Réactif	Volume (V)
Formamide	$V(\mu\text{l}) = 24,5 \times 78 = 1911$
Standard de taille (Liz)	$V(\mu\text{l}) = 0,5 \times 78 = 39$

Un mélange de 1911μl de formamide et 39μl du standard de taille sont mélangés dans un tube, puis est ensuite vortexé et centrifugé. Un volume de 25μl de ce mélange est déposé dans chaque micro tube selon un plan de dépôt. Un volume de 2μl de chaque échantillon amplifié (chaque puit) est prélevé de la plaque amplifiée après centrifugation de cette dernière, puis déposé dans le puit correspondant de la plaque post-amplification. Le ladder est déposé après le dernier échantillon, puis les septas sont placés avant de d'introduire la plaque dans le thermocycler pendant 3 min à 95°C puis dans le cryobloc pendant 3 à 5 min. La plaque est ainsi prête à être analysée.

II-2-6 Electrophorèse capillaire

Après amplification, les fragments d'ADN sont analysés par électrophorèse capillaire.

- Principe de la méthode

Durant l'électrophorèse capillaire, les produits d'amplification sont injectés dans un capillaire contenant le polymère POP4 (Performance optimized polymer 4). Les fragments d'ADN sous l'action d'un champ électrique, migrent de la cathode vers l'anode. Un faisceau laser à argon vient exciter les fluorochromes qui vont ré-émettre une fluorescence spécifique. Les cinq fluorochromes utilisés dans le kit d'amplification sont : le 6-FAM™, VIC™, NED™ et PET™, le cinquième est le LIZ™ pour le standard de taille (Rao-Coticone *et al.*, 2003), chacun de ces marqueurs fluorescents a un maximum d'émission à une longueur d'onde spécifique (figure 5). Le colorant 6-FAM émet à la longueur d'onde la plus courte et est montré en bleu, suivi du colorant VIC (vert), NED (jaune), PET (rouge) et le LIZ (orange). Les signaux fluorescents sont séparés par diffraction et projetés sur une camera CCD (charge coupled device) qui traduit la fluorescence en données numériques. Les données brutes seront analysées par le logiciel gene mapper ID v3.2.

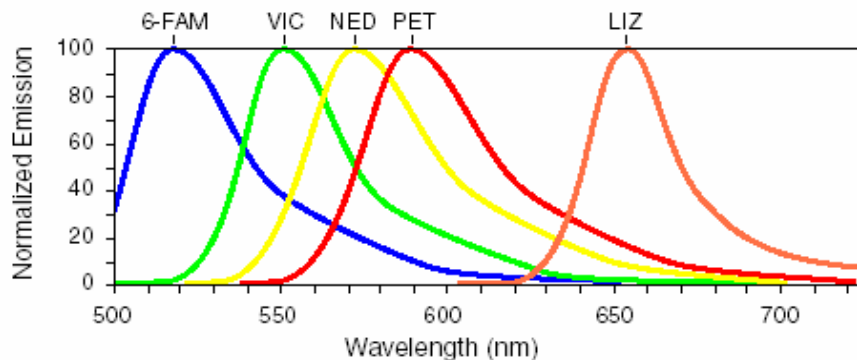


Figure 5 : Spectre d'émission des cinq fluorochromes utilisés dans le kit Identifier (Coquoz, 2003).

- Mode opératoire

La plaque est introduite dans le séquenceur 3100-avant doté de quatre capillaires qui permet l'analyse de quatre échantillons à la fois. Une fois la plaque introduite l'autosampler positionne la plaque et l'injection électrocinétique commence avec le lancement de l'analyse. Les données sont récupérées après traitement dans la salle de validation des résultats.

III- Résultats et discussions

III- Résultats et discussion

III-1- tests préliminaires

III-1-1- Sang

III-1-1-1- Test Kastle-Meyer

Une coloration rose vif est obtenue avec le test positif, témoin de la présence de sang. La même coloration est obtenue avec l'ensemble des échantillons testés, ce qui atteste de la présence de sang.

III-1-1-2- Test hexagon OBTI

Le résultat est négatif si seulement la ligne de contrôle bleue (C) apparaît dans la partie supérieure de la fenêtre rectangulaire, indiquant la bonne réalisation du test et le fonctionnement correct des réactifs. Le résultat est positif pour l'ensemble des échantillons testés, une deuxième ligne du test bleue (T) dans la partie inférieure de la fenêtre rectangulaire du test indiquant un résultat positif pour l'hémoglobine humaine dans les échantillons, donc il s'agit d'un sang humain dans tout les cas.

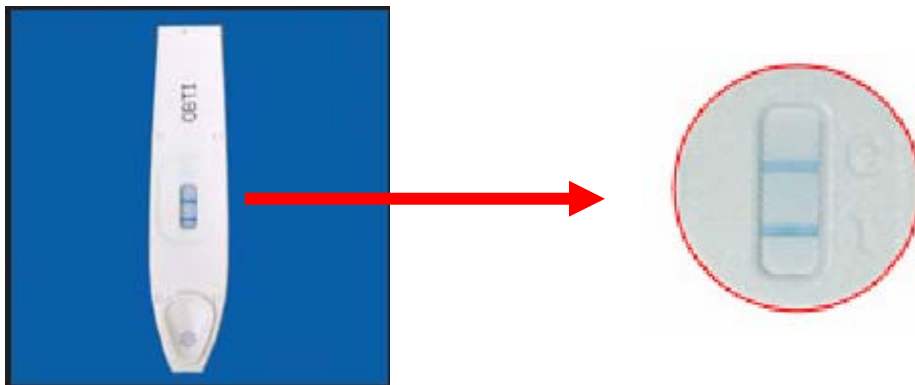


Figure 6 : Résultat du test Hexagon OBTI (résultat positif)

Même une ligne très faible doit être interprétée comme résultat positif. La différence d'intensité entre la ligne de contrôle (C) et la ligne de test (T) n'importe pas pour l'interprétation. Le résultat n'est pas valable si seulement la ligne du test ou aucune ligne de contrôle n'apparaît, répéter l'essai avec un test nouveau en faisant attention précise à cette directive.

III-1-2- Examen des cheveux

Seul un des trois cheveux contenu dans le scellé n° (2-3) présente un bulbe donc exploitable pour une analyse ADN.

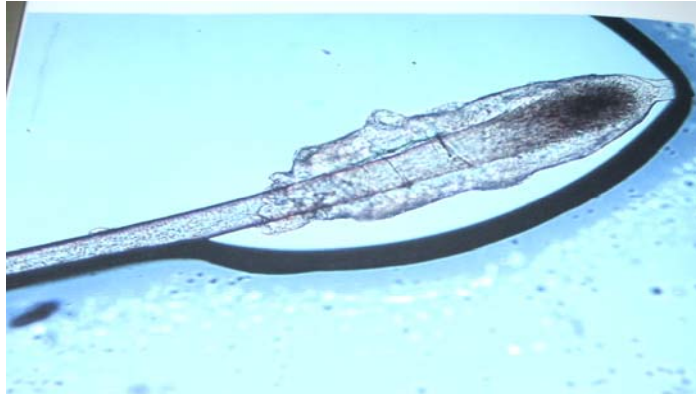


Figure 7 : Photo d'un bulbe sous microscope

III-1-3- La salive

III-1-3-1- Test Phadebas

Un surnageant bleu est obtenu pour les tubes (1 et 2) contenant les échantillons objets des scellés (2-4) et (4-1), ce qui atteste de la présence de la salive, alors qu'il est resté clair pour le témoin négatif (T-).



Figure 8 : Résultat du test phadebas (1 et 2 : présence de salive, T- : absence de salive)

III-2- Quantification de l'ADN par la PCR quantitative en temps réel

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par deux amorces, selon Généthron (2001), l'évolution de cette amplification peut être représentée par une courbe dont l'allure est celle d'une sigmoïde. Cette courbe peut être divisée en deux phases ; la première phase correspond à une amplification exponentielle. La quantité de produit de PCR obtenue à chaque moment de cette phase est directement fonction du nombre de copies initiales du fragment d'ADN amplifié. En revanche, la phase plateau correspond à un ralentissement de l'amplification qui peut être dû à l'épuisement des différents réactifs de la PCR comme les amorces. Ceci corrobore l'ensemble des courbes d'amplification obtenues à la fin de la PCR pour chaque échantillon analysé (figure 9), mis à part celles des différents témoins négatifs, où seule le contrôle interne de la PCR (IPC) est amplifié (figure 10).

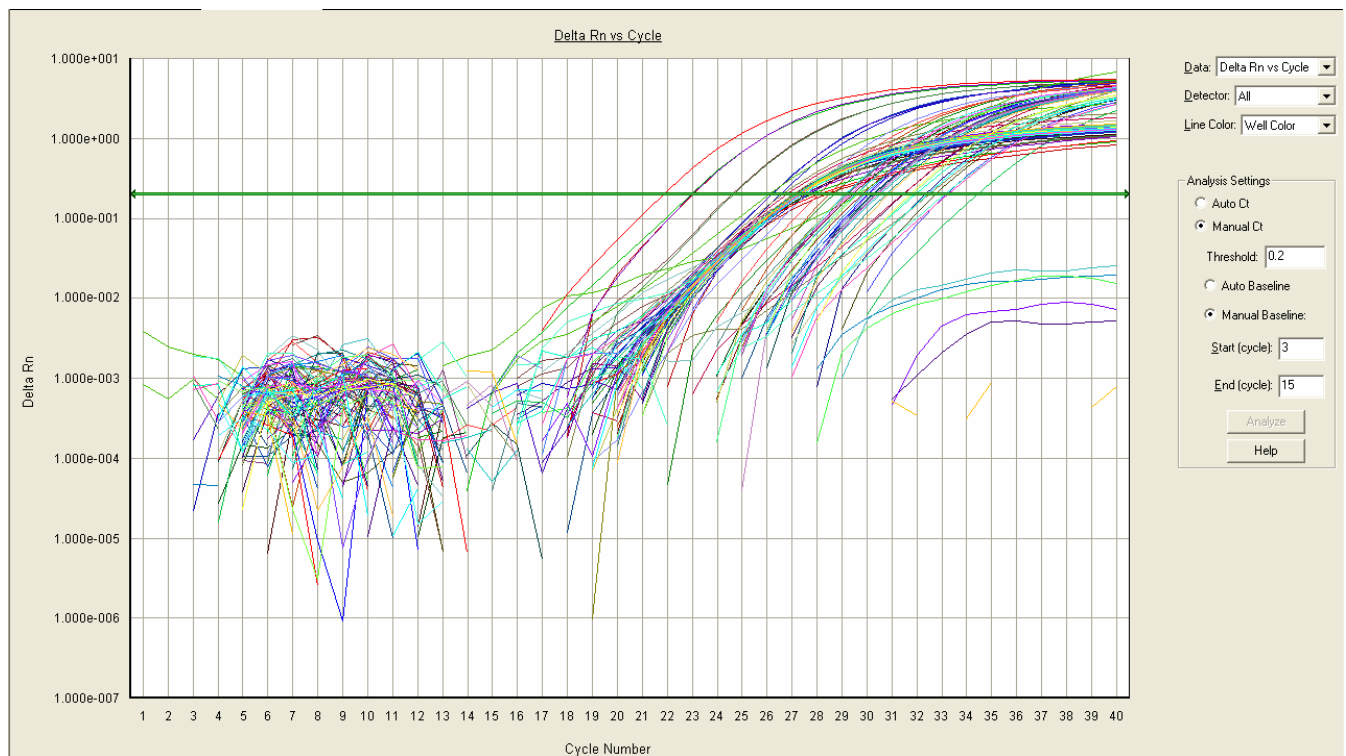


Figure 9 : Courbe d'amplification de l'ensemble des échantillons, qui présentent l'allure d'une sigmoïde, elle donne la quantité de fluorescence Delta Rn en fonction du nombre de cycle n.

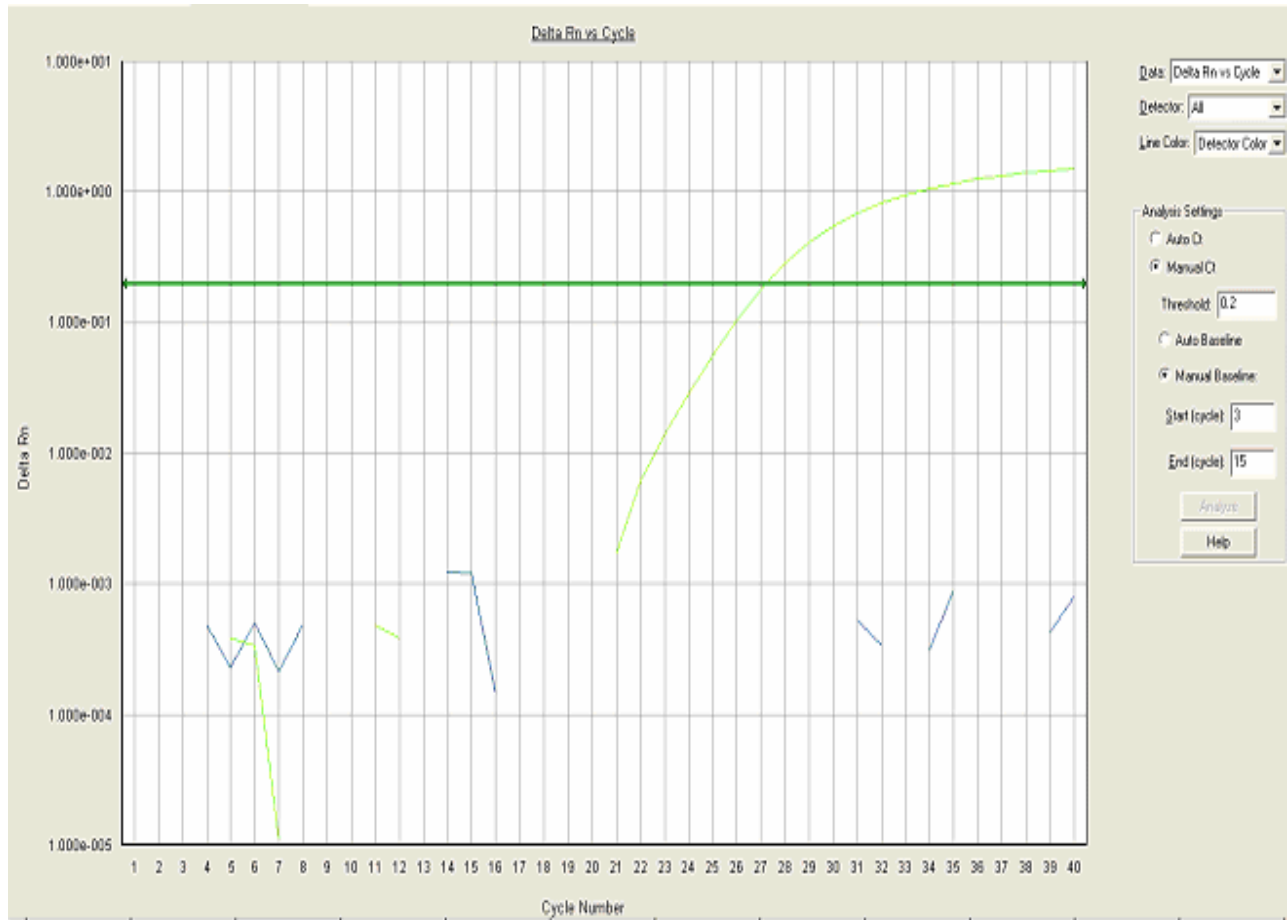


Figure 10 : Courbe d’amplification du témoin négatif de la PCR. Seul l’IPC est amplifié.

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de PCR et représente la quantité de produits amplifiés à cet instant. Selon Poitras et Houde (2002), plus l’échantillon est concentré en molécules cibles à l’origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme étant le cycle seuil (C_t) et apparaît au début de la phase exponentielle (figure 11). Ce concept de C_t est à la base de la précision et de la productivité de la technique.

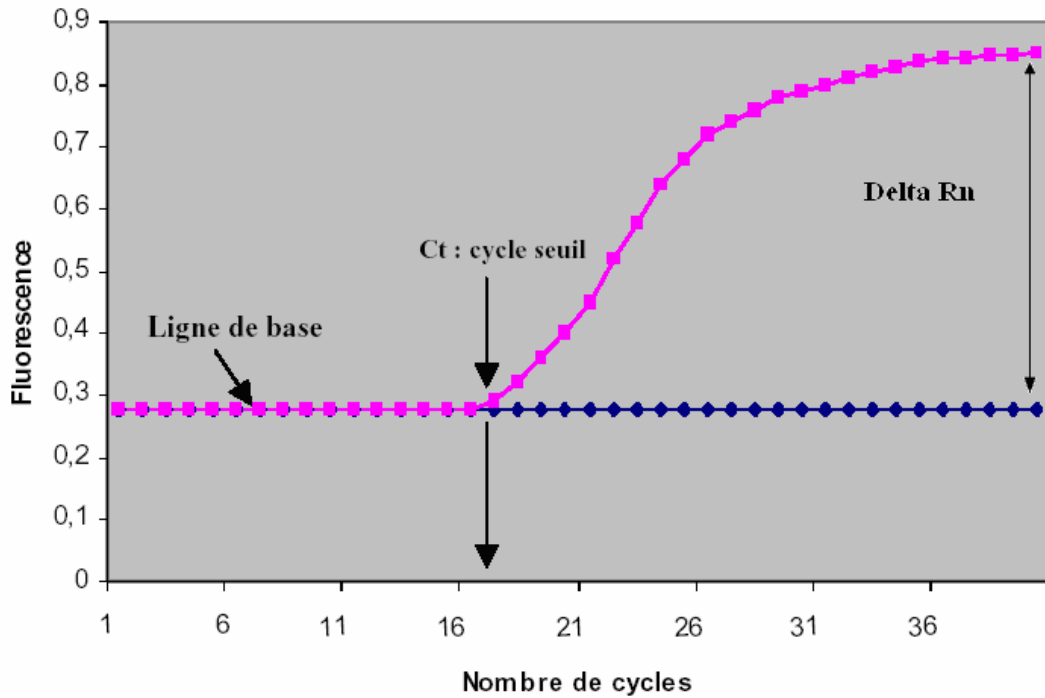


Figure 11 : Schéma d'une courbe d'amplification, montrant la ligne de base, le cycle seuil (Ct) et la quantité de fluorescence (Delta Rn) (Poitras et Houde, 2002).

La courbe standard (figure 12), est tracée à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN. La droite obtenue présente une pente (P) de -3,045935, qui est une valeur correcte du fait qu'elle est incluse dans l'intervalle [-2,9, -3,33], et un facteur de corrélation supérieur à 0.98 ($R^2 = 0.998665$), conformément aux recommandations de Applied Biosystem et rapportées par Schulz *et al.* (2006). Une pente de -3,322 est égale à une efficacité (E) de 100%. L'efficacité est calculée par la formule suivante :

$$E = 10^{(-1/P)} - 1.$$

Le nombre de copie à chaque cycle est calculé par la formule :

$$y = x (1+E)^n$$

Où y = nombre de copie

x = nombre de copie initiale

E = efficacité

n = nombre de cycles

Si l'efficacité de la PCR est de 100%, l'équation devient :

$$y = x \cdot 2^n$$

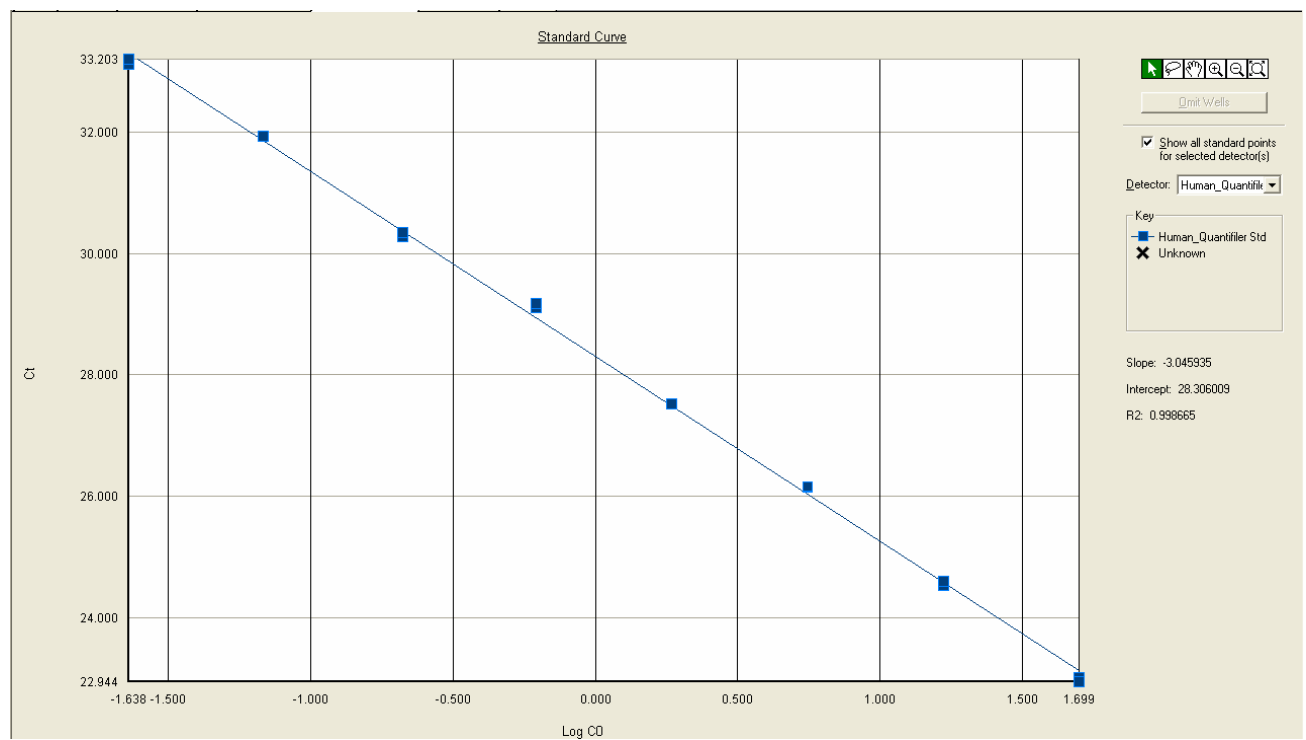


Figure 12 : Courbe standard tracée à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN dans les différentes dilutions.

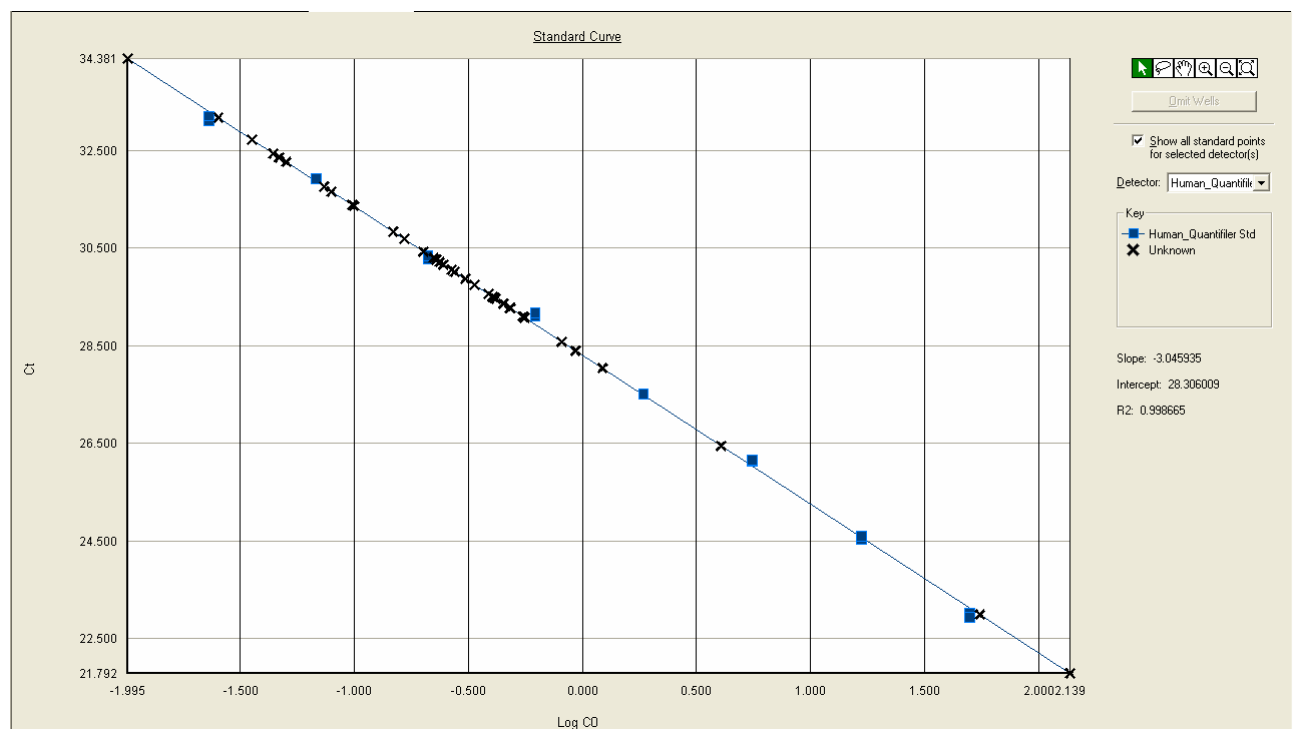


Figure 13 : Représentation des échantillons sur la courbe standard.

Le contrôle interne de la PCR (IPC), consiste en l'amplification d'un ADN exogène de rat, dans le même tube que l'échantillon quantifié, selon Costello et Schumm (2006), si aucun inhibiteur n'est présent, le seuil d'amplification de l'IPC restera inchangé, par contre ce dernier augmente dans le cas contraire, ce qui corrobore l'ensemble de nos résultats où le seuil d'amplification de l'IPC ne dépasse pas 28 cycles. Selon le manuel d'utilisation, le Ct de l'IPC doit être entre 20 et 30 cycles pour conclure à l'absence d'inhibiteurs de la PCR. Enfin, la conformité des paramètres précédents, permet de valider les résultats de la quantification, pour l'ensemble des échantillons quantifiés, dont les valeurs sont reproduites sur les tableaux 11, 12, 13, 14 et 15.

Tous les échantillons prélevés lors des quatre affaires présentent des quantités d'ADN supérieures à celle préconisée pour l'amplification par PCR. Des dilutions sont nécessaires puisque la quantité soumise à la PCR doit être comprise entre 0,5 et 1,25 ng pour le kit AmpFISTR Identifier et le thermocycleur AmpPCR system 9700 d'Applied Biosystems. Les témoins négatifs seront également amplifiés dans les mêmes conditions.

Tableau 10 : Résultats de la quantification des échantillons des quatre affaires

Affaire n° 01	Numéro du scellé	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6	T-
	QuantitéADN ng/µl	14,421	20,123	12,451	9,872	16,345	13,964	0,00
	Inhibiteurs	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
	Dilution nécessaire	1/144	1/201	1/124	1/89	1/163	1/139	Pure
Affaire n° 02	Numéro du scellé	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	T-
	QuantitéADN ng/µl	0,952	1,632	2,564	0,878	11,238	16,357	0,00
	Inhibiteurs	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
	Dilution nécessaire	1/9	1/16	1/25	1/8	1/112	1/163	Pure
Affaire n° 03	Numéro du scellé	3-1	3-2	3-3	3-4	T-	/	/
	QuantitéADN ng/µl	2,560	1,987	10,235	15,639	0,00	/	/
	Inhibiteurs	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	/	/
	Dilution nécessaire	1/25	1/19	1/102	1/156	Pure	/	/
Affaire n° 04	Numéro du scellé	4-1	4-2	4-3	4-4	T-	/	/
	QuantitéADN ng/µl	0,2389	2,534	6,568	9,120	0,00	/	/
	Inhibiteurs	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	/	/
	Dilution nécessaire	1/2	1/25	1/65	1/91	Pure	/	/

Tableau 11: Résultats de la quantification des échantillons secs et humides prélevés sur le véhicule A :

Echantillons humides	AHV1	AHV2	AHC	AHP	AHL	AHF	T-
Quantité d'ADN (ng/μl)	0,147	0,335	0,236	0,025	0,010	0,165	0,00
Seuil d'amplification de l'échantillon	30,835	29,750	30,210	33,168	34,381	30,687	indet
Seuil d'amplification de l'IPC	27,265	27,198	27,199	27,266	27,160	27,119	27,189
Dilutions nécessaires	Pure	1/3	1/2	Pure	Pure	Pure	Pure
Echantillons secs	ASV1	ASV2	ASC	ASP	ASL	ASF	T-
Quantité d'ADN (ng/μl)	4,060	0,277	0,387	0,044	0,073	0,046	0,00
Seuil d'amplification de l'échantillon	26,452	30,262	29,559	32,435	31,759	32,261	indet
Seuil d'amplification de l'IPC	27,172	27,254	26,066	26,587	27,209	27,011	27,254
Dilutions nécessaires	1/40	1/2	1/3	Pure	Pure	Pure	pure

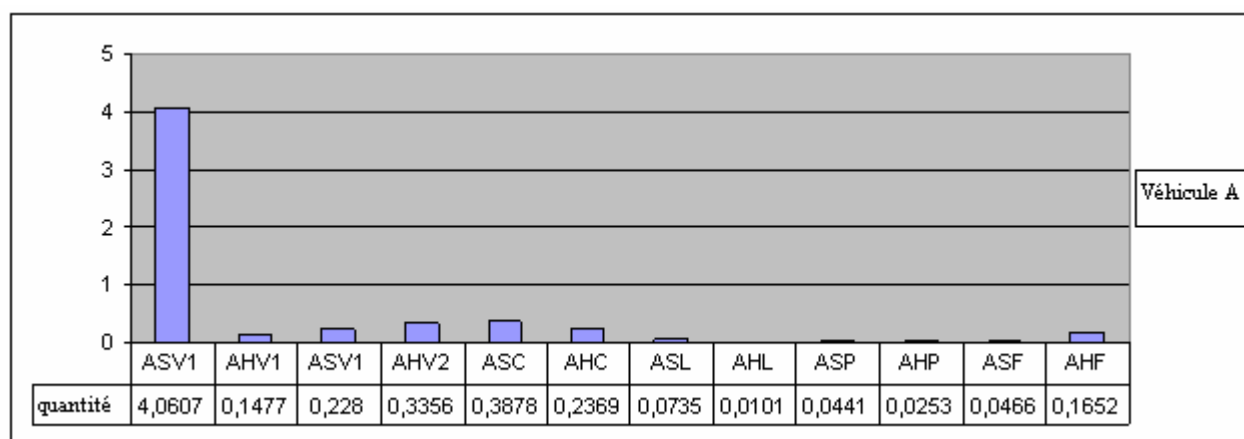


Figure 14 : Quantités d'ADN obtenues des différents prélèvements sur le véhicule A. La quantité la plus élevée est obtenue à partir du prélèvement sec sur la partie supérieure du volant.

Tableau 12 : Résultats de la quantification des échantillons secs et humides prélevés sur le véhicule B :

Echantillons humides	BHV1	BHV2	BHC	BHP	BHL	BHF	T-
Quantité d'ADN (ng/μl)	0,222	0,266	0,479	0,035	0,050	0,931	0,00
Seuil d'amplification de l'échantillon	30,291	30,053	29,278	32,720	32,261	28,400	indet
Seuil d'amplification de l'IPC	27,270	27,287	27,340	27,346	27,640	27,108	27,203
Dilutions nécessaires	½	1/2	1/4	Pure	Pure	1/9	Pure
Echantillons secs	BSV1	BSV2	BSC	BSP	BSL	BSF	T-
Quantité d'ADN (ng/μl)	0,416	0,548	0,810	0,099	0,097	1,222	0,00
Seuil d'amplification de l'échantillon	29,463	29,100	28,583	31,358	31,381	28,039	indet
Seuil d'amplification de l'IPC	27,189	27,338	27,181	26,795	27,184	27,162	27,202
Dilutions nécessaires	¼	1/5	1/8	Pure	Pure	1/12	pure

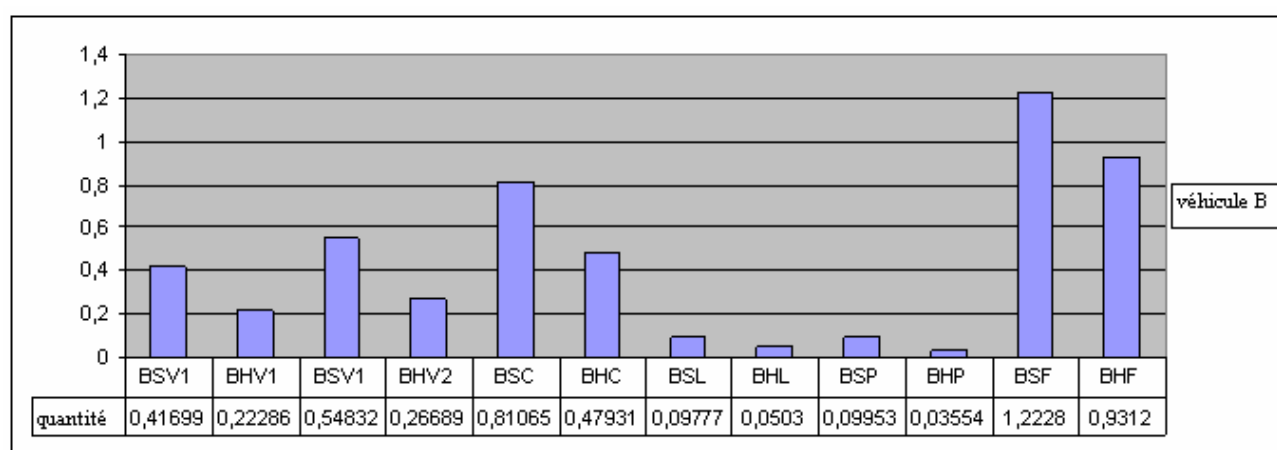


Figure 15 : Quantités d'ADN obtenues des différents prélèvements sur le véhicule B. Les quantités les plus importantes sont obtenues à partir des prélèvements sur le frein à main.

Tableau 13 : Résultats de la quantification des échantillons secs et humides prélevés sur le véhicule C :

Echantillons humides	CHV1	CHV2	CHC	CHP	CHL	CHF	T-
Quantité d'ADN (ng/µl)	0,275	0,305	0,200	0,046	0,411	0,483	0,00
Seuil d'amplification de l'échantillon	30,011	29,873	30,433	32,354	29,480	29,268	indet
Seuil d'amplification de l'IPC	27,155	27,346	27,193	27,401	27,122	27,376	27,248
Dilutions nécessaires	½	1/3	1/2	Pure	1/4	1/4	Pure
Echantillons secs	CSV1	CSV2	CSC	CSP	CSL	CSF	T-
Quantité d'ADN (ng/µl)	0,558	0,554	0,403	0,449	0,079	0,245	0,00
Seuil d'amplification de L'échantillon	29,077	29,087	29,506	29,364	31,657	30,165	indet
Seuil d'amplification de l'IPC	27,153	27,124	27,319	27,515	27,345	27,215	27,376
Dilutions nécessaires	1/5	1/5	1/4	1/4	Pure	1/2	Pure

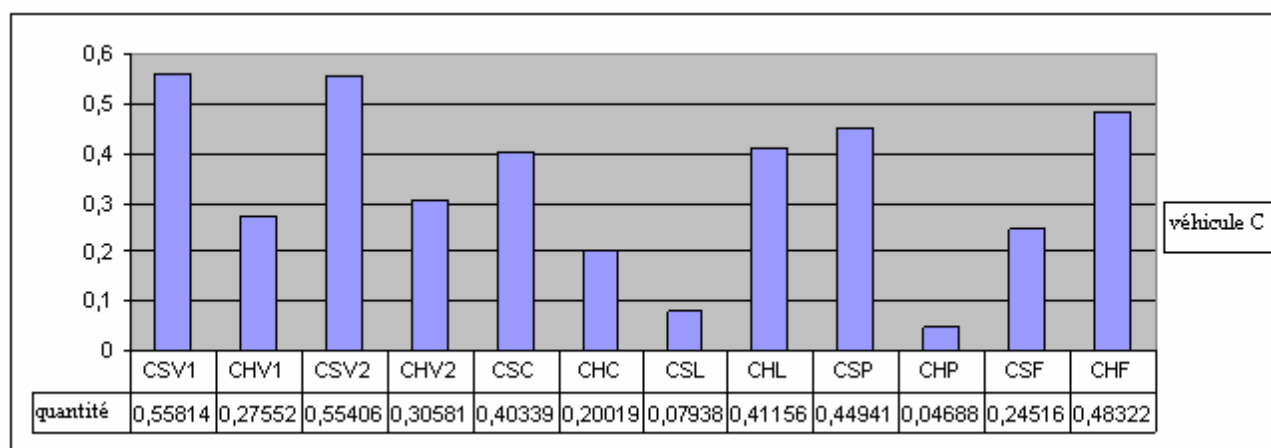


Figure 16 : Quantités d'ADN obtenues des différents prélèvements sur le véhicule C. Les quantités les plus élevées sont obtenues à partir des prélèvements sec sur la partie supérieure et inférieure du volant.

Tableau 14: Résultats de la quantification des prélèvements buccaux effectués sur les personnes ayant participé à l'expérience

Chauffeur	AC/CC2	CC1/BC2	T-
Quantité d'ADN (ng/μl)	137,632	55,429	0,00
Seuil d'amplification de l'échantillon	21,791	27,152	Indet
Seuil d'amplification de l'IPC	28,071	27,467	27,186
Dilutions nécessaires	1/1376	1/554	Pure

Le seuil d'amplification Ct pour l'ADN des échantillons analysés est fonction de la quantité contenue dans chacun d'eux, il augmente si la quantité d'ADN est faible et diminue dans le cas contraire. On observe bien un Ct de 3,3 cycles de plus lorsqu'il y a 10 fois moins d'ADN.

Sur les trente six prélèvements effectués sur les trois véhicules, 23 présentent des quantités ADN supérieures à celles nécessaires pour la PCR nécessitant des dilutions, 02 présentent une quantité égale, et 11 présentant des quantités inférieures qui seront amplifiés sans aucune dilution (pure), comme c'est le cas des témoins négatifs qui ne présentent aucune quantité d'ADN. Ces quantités sont significatives pour des traces de contact. Giradet, *et al.* (1999), ont rapportés des études récentes qui ont démontrées qu'un seul contact avec la peau peut transférer suffisamment d'ADN pour une analyse STR, et que l'ADN d'une seule cellule peut permettre une amplification et une analyse STR.

La quantité d'ADN obtenue à partir des prélèvements secs effectués sur différents endroits des trois véhicules est supérieure à celle obtenu à partir des prélèvements humides effectués sur le même endroit, sauf pour la partie inférieur du volant et le frein à main du véhicule A, et le levier de vitesse et frein à main du véhicule C (figures 14, 15 et 16).

Ces résultats obtenus avec les prélèvements secs peuvent être expliqués par le mécanisme de prélèvement des cellules épithéliales de la surface cible. Ceci dépend de la nature du support, de la durée et force générée lors du contact, de l'activité exercée par l'individu avant le contact (Ladd *et al.*, 1999), comme c'est le cas pour le volant et le frein à main. Ils dépendent également de l'état de déshydratation des cellules.

Le transfert du solvant du coton humide vers la surface sèche pour hydrater les cellules peut prendre un certain temps. Selon Pang et Cheung (2007), les cellules réhydratées se détachent et adhèrent au coton de l'écouvillon humide, mais encore d'avantage et plus facilement au coton du second écouvillon sec, puisque les cellules sont réhydratées après le premier prélèvement.

Le détachement des cellules de la surface cible est également facilité par l'action capillaire ; une fois hydratées, ces dernières sont absorbées par les fibres du coton sec (Wichenheiser, 2002).

Puisqu'il est montré que les prélèvements secs seuls, donnent des quantités d'ADN significatives, donc ces dernières peuvent être considérablement améliorées en joignant les deux écouvillons sec et humide lors de l'extraction de l'ADN, particulièrement pour les endroits peu touchés.

III-3- Amplification par PCR

La détermination des quantités d'ADN contenues dans chaque échantillon a permis d'estimer les dilutions nécessaires pour l'amplification par PCR. Elles sont reportées sur les différents tableaux des résultats de la quantification par PCR en temps réel. Les dilutions sont calculées de manière à obtenir une concentration en ADN dans l'échantillon égale à 0,1ng/μl (soit 1ng d'ADN dans 10 μl d'échantillon).

III-4- Electrophorèse capillaire

Les résultats obtenus, après analyse du polymorphisme des STR, pour un individu sont constitués de deux chiffres correspondant aux deux « longueurs » (ou nombre de répétitions) des deux allèles hérités des deux parents, et cela pour chaque système. Par exemple dans le profil obtenu à partir du prélèvement humide sur la partie supérieure du volant du véhicule A, le marqueur D18S51 est composé des deux allèles 13 et 16.

Aucun profil n'est obtenu suite à la séparation électrophorétique de l'échantillon témoin négatif (figure 17), attestant de l'absence de toutes contaminations lors de l'amplification des échantillons. Si un contrôle négatif donne un profil ADN, cela démontre l'existence d'une contamination. Le profil obtenu devrait d'ailleurs permettre l'Identifier la source de la contamination et aider à prendre les mesures correctives adéquates.

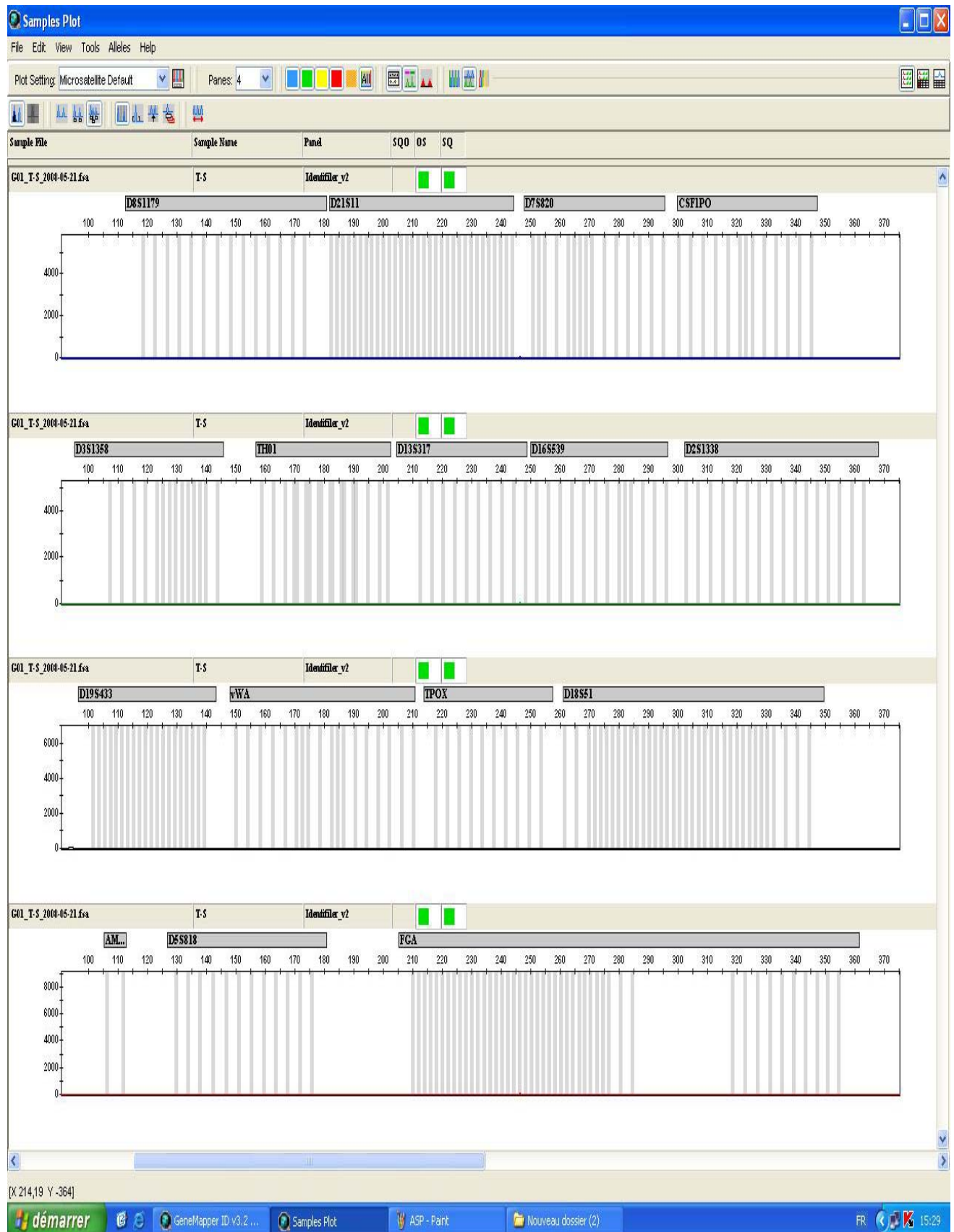


Figure 17 : Profil obtenu avec le témoin négatif de la PCR. Aucun allèle n'est détecté pour l'ensemble des marqueurs analysés.

Un contrôle positif de la PCR permet de s'assurer que le processus d'analyse fonctionne. Si aucun échantillon d'une série d'analyse ne fournit de résultats, le contrôle positif est là pour démontrer que cette absence de résultats n'est pas due à une déficience du processus d'analyse. Il permet en outre de vérifier que les démarches de reconnaissance des allèles fonctionnent de façon satisfaisante et que les allèles détectés dans un profil ADN sont étiquetés avec le nom adéquat. Le profil du contrôle positif doit donc être connu. La teneur en ADN du contrôle positif étant connue, il permet en outre de vérifier que les méthodes d'analyse permettent d'atteindre la sensibilité voulue. Tous les STR analysés figurant sur le profil obtenu avec le témoin positif de la PCR contenant l'ADN contrôle 9947A (figure 18) sont correctement amplifiés et correspondent exactement au profil de cet ADN connu (tableau 1). Ceci témoigne du bon déroulement de la réaction de polymérisation en chaîne.

III-4-1- Affaire n° 01 (recherche de paternité)

Le patrimoine génétique d'un individu étant constitué d'un ensemble de 23 chromosomes hérités de la mère et d'un deuxième ensemble de 23 chromosomes hérités du père, conformément aux lois génétiques fondamentales :

- Sur les deux allèles de l'enfant, on doit retrouver un allèle chez la mère et le deuxième allèle chez le père biologique ;
- Et l'enfant ne peut posséder un allèle qui n'est pas retrouvé chez ses parents biologiques.

Pour chaque locus analysé, on établit donc d'abord quel allèle de l'enfant provient de sa mère (allèles en gras sur le tableau 15), et on déduit de ce fait l'allèle hérité de son père biologique que l'on compare au génotype du père présumé (De Mazancourt et Pfitzinger, 2005).

Les profils obtenus de l'analyse des STR pour les individus concernés par la recherche de paternité sont représentés sur le tableau 16. La paternité du père présumé 1 est exclue par huit systèmes : D21S11, D7S820, CSF1PO, TH01, D13S317, D19S433, D18S51 et

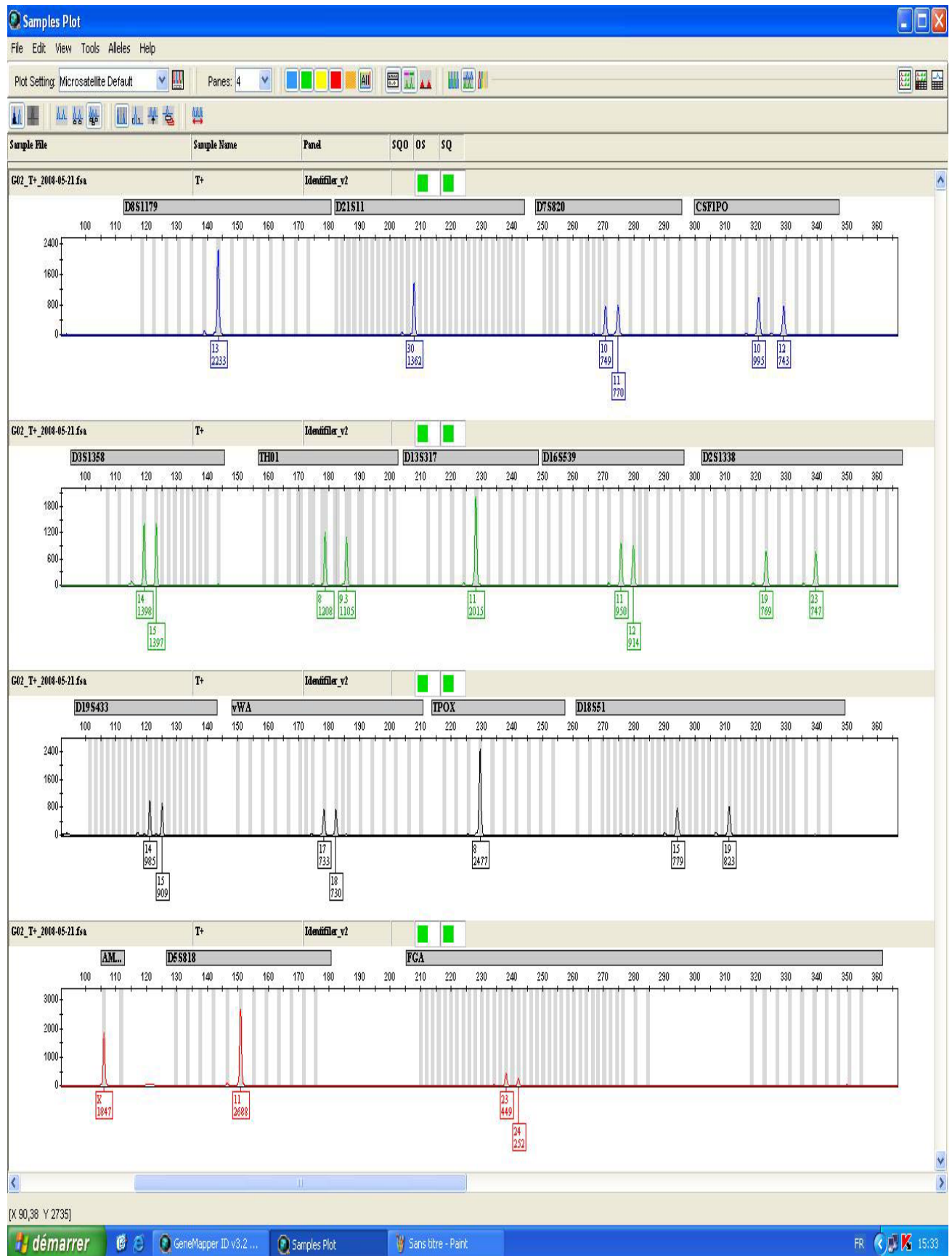


Figure 18 : Profil obtenu avec l'ADN contrôle 9947A, l'ensemble des allèles est détecté et Correctement étiqueté, ils correspondent exactement au profil de cet ADN connu.

D5S818, celle du père présumé 3 par neuf systèmes : D21S11, D7S820, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, D5S818 et FGA, alors que celle du père présumé 4 est exclue par dix systèmes : D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D2S1338, D19S433, VWA, D18S51 et FGA. Par contre la paternité du père présumé 2 est démontrée ; aucun des systèmes analysés ne l'exclue, donc il est sans aucun doute le père biologique de la fille.

Selon Mensuet lupo *et al.* (2008), la majorité des exclusions de paternité montre qu'il existe entre 8 et 13 incompatibilités entre le père putatif et l'enfant. Lorsqu'un seul système de STR est incompatible, il faut le considérer comme une mutation ; cependant, la présence de trois à cinq incompatibilités doit faire rechercher une parenté entre le père putatif testé et le père biologique (exemple : oncle paternel). Le taux de mutations des STR est faible, il a été estimé par Weber et Wong (1993), à 0,1 % dans une étude portant sur 1000 familles. Le problème occasionné par ces mutations est la fausse exclusion de paternité. Par convention, on parle d'exclusion lorsqu'il existe au moins trois incompatibilités indépendantes (Gunn *et al.*, 1997 ; Cifuentes *et al.*, 2006).

Dans les cas plus complexes (consanguinité entre les deux pères putatifs), des systèmes additionnels de STR peuvent être utilisés: 12 autres STR autosomaux (kit humantype Chimera®, Biotype AG, Dresden, Germany), 8 STR du chromosome X (Mentype® Argus X-8 Biotype) et 16 STR du chromosome Y (Y-Filer, Applied Biosystems) (Mensuet-lupo *et al.*, 2007).

Tableau 15 : Résultats de l'analyse des STR de l'affaire n° 01

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier	Mère (1-1)	Fille (1-2)	Père présumé 1 (1-3)	Père présumé 2 (1-4)	Père présumé 3 (1-5)	Père présumé 4 (1-6)
D8S1179	13-15	15- 15	11-15	15-15	13-15	15-16
D21S11	30-31.2	29- 30	30-31.2	29-30	30-31.2	28-29
D7S820	8-11	7- 11	11-12	7-12	8-11	9-10
CSF1PO	11-12	11-12	10-11	12-12	11-12	11-11
D3S1358	15-18	15- 15	15-17	15-15	15-18	16-16
TH01	7-9.3	9.3-10	6-9	7-10	6-9.3	7-9.3
D13S317	12-12	8- 12	12	8-12	12-12	11-12
D16S539	9-11	11-13	12-13	11-13	9-12	12-13
D2S1338	17-18	17-25	20-25	17-25	18-20	17-22
D19S433	14-14	14-14.2	13-13	14-14.2	13-14	13-15
VWA	15-19	15-17	17-19	14-17	17-19	18-18
TPOX	8-10	10-11	9-11	7-11	8-11	8-11
D18S51	15-15	15-15	14-16	15-16	15-16	14-16
Amel	x-x	x-x	x-y	x-y	x-y	x-y
D5S818	11-12	11-13	10-11	12-13	10-12	12-13
FGA	22-23	22-25	22-25	21-25	22-26	23-24

Les chiffres en caractère gras du profil de la fille représentent les allèles hérités de la mère, le reste des allèles doit provenir du père biologique de la fille. L'ensemble de ces allèles est identifié chez le père présumé 2 (chiffres en caractère gras), donc il est le père biologique de la fille.

III-4-2- Affaire n° 02 (vol qualifié)

Les profils obtenus après analyse des STR concernant les quatre échantillons et les deux suspects sont reportés sur le tableau 16. Le profil obtenu de l'échantillon (2-1) (papier taché de sang) présente deux pics pour l'amélogénine, ce qui indique l'origine masculine de la tache. Il présente également deux pics pour la plus part des STR analysés, donc il est hétérozygote pour ces marqueurs, alors que les STR : TH01,

D13S317 et D5S818 présentent un seul pic avec des RFU (Relative Fluorescence Units) dépassant 3000 RFU, donc l'individu est homozygote pour ces STR.

L'analyse de l'échantillon (2-2) (tache de sang sur la poignée) a donné un profil homozygote pour les marqueurs D13S317 et TPOX, il est hétérozygote pour le reste, y compris l'amélogénine témoin de l'origine masculine de la trace. L'échantillon (2-3) (cheveu) est d'origine masculine, cet individu est homozygote pour les marqueurs TPOX et D5S818 et hétérozygote pour le reste des marqueurs analysés. L'échantillon de salive, objet du scellé (2-4) est également d'origine masculine, il est homozygote pour les marqueurs TPOX et D5S818 avec des pics supérieurs à 1300 RFU, et hétérozygote pour le reste des marqueurs. La concordance absolue entre le profil obtenu du cheveu (2-3) et celui obtenu à partir de la salive (2-4), conclue à l'origine commune des deux traces.

Le profil obtenu à partir du prélèvement buccal sur le suspect 1 objet du scellé (2-5) est homozygote pour les marqueurs TH01, D13S317 et D5S813 ; par contre, il est hétérozygote pour le reste. Ce profil est identique à celui obtenu à partir de la tache de sang sur le papier (2-1).

Le profil obtenu à partir du prélèvement buccal sur le deuxième suspect (2-6) est homozygote pour les marqueurs D7S820, D13S317 et D5818 et hétérozygote pour le reste des marqueurs analysés. Ce profil ne correspond à aucun des profils obtenus à partir des traces incriminées prélevées sur les lieux du vol qualifié. Enfin, la concordance absolue entre le profil du suspect 1 et celui obtenu à partir de la trace de sang sur le papier permet de conclure qu'il est fort probable que ce suspect soit à l'origine de la trace biologique objet du scellé n° (2-1) prélevée sur les lieux du vol qualifié. Aucune trace incriminée n'est issue du suspect n° 2.

Tableau 16 : Résultats de l'analyse des STR de l'affaire n°02

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier	échantillon (2-1)	échantillon (2-2)	échantillon (2-3)	échantillon (2-4)	Suspect1 (2-5)	Suspect2 (2-6)
D8S1179	13-15	13-15	12-14	12-14	13-15	12-13
D21S11	29-32.2	30-32.2	29-31.2	29-31.2	29-32.2	30-32.2
D7S820	9-11	9-12	7-10	7-10	9-11	12-
CSF1PO	10-13	10-12	7-12	7-12	10-13	10-11
D3S1358	17-18	15-17	17-18	17-18	17-18	16-18
TH01	7-7	6-9	7-8	7-8	7-7	7-9
D13S317	11-11	11-11	9-12	9-12	11-11	11-11
D16S539	12-13	11-14	8-14	8-14	12-13	11-12
D2S1338	17-24	17-19	16-24	16-24	17-24	17-
D19S433	12-16.2	14-16.2	13.2-15	13.2-15	12-16.2	12-13
VWA	15-17	16-18	15-19	15-19	15-17	18-20
TPOX	8-9	8-8	8-8	8-8	8-9	8-12
D18S51	13-14	13-14	13-17	13-	13-14	17-
Amel	x-y	x-y	x-y	x-y	x-y	x-y
D5S818	12-12	12-13	11-11	11-11	12-12	12-12
FGA	21-24	21-22	22-23	22-23	21-24	19.2-23

Le profil obtenu à partir de la trace de sang (échantillon (2-1)) correspond exactement au profil du suspect 1 (chiffres en caractère gras). Le même profil est obtenu à partir du cheveu (2-3) et de la salive (2-4), mais ne correspond à aucun profil issu des deux suspects.

III-4-3- Affaire n° 03 (homicide volontaire)

Les profils obtenus des deux échantillons et des deux suspects sont reproduits dans le tableau 17. Le profil obtenu à partir du sang prélevé sur la vitre brisée objet du scellé (3-2) concorde avec le profil obtenu à partir du prélèvement buccal sur le suspect n° 1 (3-3) ; par contre, le profil du deuxième suspect (3-4) ne correspond à aucun autre profil. Le profil issu de la tache de sang sur le parquet de la maison objet du scellé (3-1) pourrait provenir de la victime, mais en l'absence de prélèvement sur cette dernière aucune comparaison ne peut être effectuée.

La concordance absolue entre le profil du suspect 1 et celui obtenu à partir de la trace de sang prélevée sur la vitre brisée permet de conclure qu'il est fort probable que ce suspect soit à l'origine de la trace biologique objet du scellé (3-2), prélevée sur les lieux de l'homicide volontaire. Aucune trace n'est issue du deuxième suspect.

Tableau 17 : Résultats de l'analyse des STR de l'affaire n°03

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier	échantillon (3-1)	échantillon (3-2)	Suspect 1 (3-3)	Suspect2 (3-4)
D8S1179	13-15	10-13	10-13	13-14
D21S11	29-32.2	29-30	29-30	29-30
D7S820	9-12	8-10	8-10	10-10
CSF1PO	12-12	11-12	11-12	11-13
D3S1358	17-18	15-15	15-15	16-18
TH01	6-9.3	8-9	8-9	9-9
D13S317	13-14	11-11	11-11	9-12
D16S539	11-12	11-13	11-13	11-13
D2S1338	17-17	18-20	18-20	24-24
D19S433	14-15	13-15.2	13-15.2	13-15.2
VWA	15-18	17-19	17-19	14-17
TPOX	10-11	8-11	8-11	8-9
D18S51	12-13	15-18	15-18	13-16
Amel	x-y	x-y	x-y	x-y
D5S818	12-12	12-13	12-13	12-14
FGA	21-24	22-22	22-22	20-24

Le profil obtenu à partir de la trace de sang (3-2) correspond exactement au profil du suspect 1 (allèles en caractère gras), ce qui le lie à la scène de crime. Le profil obtenu de l'échantillon (3-1) ne correspond à aucun suspect.

III-4-4- Affaire n° 04 (Agression)

Chaque STR analysé du mouchoir en papier contenu dans le scellé n° (4-1) présente deux allèles, donc c'est un profil net ; par contre, le profil obtenu à partir de la tache de sang présente quatre allèles pour les marqueurs : D8S1179, D19S433 et TH01, trois allèles pour les marqueurs D21S11, D13S317 et D3S1358 (tableau 18), donc il s'agit d'un mélange de deux personnes. La présence de plus de deux allèles à un ou plusieurs loci permet de conclure à un mélange (Tomsey *et al.*, 2001). L'intensité des pics est similaire, ce qui ne permet pas la distinction d'un profil majoritaire et d'un profil

minoritaire. La concordance absolue entre le profil obtenu à partir du mouchoir en papier objet du scellé (4-1) et celui de la victime permet de conclure que cette dernière est à l'origine de cette trace.

Le profil obtenu à partir de la tache de sang (4-2) est un mélange du profil de la victime et d'une autre personne, les allèles provenant de la victime sont identifiés dans le mélange, le reste des allèles sont retrouvés dans le profil du suspect ; les deux allèles pour les systèmes D8S1179, D21S11, D19S433, TH01, D13S317 et D3S1358, un allèle pour les systèmes : D7S820, CSF1PO, D5S818, VWA, TPOX et D16S539, ce qui permet de conclure que ce suspect est probablement le deuxième contributeur de ce mélange, ce qui ne peut exclure sa relation avec la scène de crime.

Tableau 18: Résultats de l'analyse des STR de l'affaire n°04

Les 16 loci du AmpFISTR Identifier	échantillon (4-1)	échantillon (4-2)	victime (4-3)	suspect (4-4)
D8S1179	14-15	13-14-15-16	14-15	13-16
D21S11	28-29	28-29-30	28-29	29-30
D7S820	8-10	8-10	8-10	10-10
CSF1PO	10-11	10-11	10-10	11-12
D3S1358	14-17	14-15-17	14-17	15-17
TH01	7-8	7-8-9-9.3	7-8	9-9.3
D13S317	11-12	9-11-12	11-12	9-11
D16S539	9-11	9-11	9-11	10-11
D2S1338	23-25	23-25	23-25	17-24
D19S433	14.2-15.2	12-14-14.2-15.2	14.2-15.2	12-14
VWA	15-15	15-17	15-16	14-17
TPOX	8-11	8-11	8-11	8-8
D18S51	11-15	11-15	11-15	12-13
Amel	x-y	x-y	x-y	x-y
D5S818	11-12	11-12	11-12	12-12
FGA	20-22	20-22	20-22	19-23

Le profil obtenu à partir du mouchoir en papier (4-1) correspond exactement au profil de la victime, alors que le profil issu de la trace de sang (4-2) est un mélange du profil de la victime et d'un autre profil qui correspond exactement au profil du suspect.

III-4-5- Identification des propriétaires et chauffeurs par les traces de contacts sur différentes parties des véhicules

Des profils ADN ont été obtenus à partir de l'ensemble des prélèvements effectués sur les trois véhicules : 24 profils complets et 13 partiels. Même l'échantillon humide prélevé sur le levier de vitesse du véhicule A présentant la plus faible concentration d'ADN (0.01ng/µl) a donné un profil partiel avec certains pics (15 pics) dépassant 150 RFU (annexe 09). Ce résultat est conforté par Wichenheiser (2002), qui a rapporté que des profils ADN peuvent être obtenus à partir de quantités d'ADN inférieures à 100 pg ou contenant approximativement 20 cellules grâce à la sensibilité de la réaction PCR, voire même l'analyse d'une seule cellule (Girardet *et al.*, 1999).

L'examen du nombre d'allèles pour chaque STR, la forme et la hauteur des pics et leurs intensités est nécessaire pour l'interprétation des résultats. Au niveau d'un locus, un échantillon contenant l'ADN de deux sources peut avoir un, deux, trois ou quatre pics. Selon les cas, les deux contributeurs peuvent avoir l'une des combinaisons génotypiques suivantes :

1- Un locus à quatre pics :

- Hétérozygote + hétérozygote : pas d'allèles en commun

2- Un locus à trois pics :

- Hétérozygote + hétérozygote : un allèle en commun
- Hétérozygote + homozygote : pas d'allèles en commun

3- Un locus à deux pics :

- Hétérozygote + hétérozygote : deux allèles en commun (même génotype)
- Hétérozygote + homozygote : un allèle en commun
- Homozygote + homozygote : pas d'allèles en commun

4- Un locus à un pic :

- Homozygote + homozygote : pas d'allèles en commun (même génotype)

Les stutters affecte l'interprétation des profils ADN, particulièrement dans le cas des mélanges, parce qu'il est très difficile de déterminer si ce petit pic est celui d'un contributeur minoritaire ou un produit stutter de l'allèle adjacent (Buttler, 2003). Les stutters apparaissent sur les profils sous la forme d'un pic de taille réduite correspondant à un allèle ayant un élément répétitif de moins que l'allèle nominal et 15% d'RFU en moins.

III-4-5-1-Véhicule A

Les marqueurs D3S1358, D19S433 et VWA présentent quatre pics, et les marqueurs D8S1179, D16S539 et D5S818 présentent trois pics, ce qui fait du profil obtenu à partir du prélèvement humide sur la partie supérieure du volant (AHV1) un mélange de profils de deux personnes. Selon Torres *et al.* (2003), un mélange est identifié par la présence de trois pics ou plus à un ou plusieurs loci qui peuvent être le résultat d'une co-amplification d'ADN issu de plus d'une personne, ou de produits artéfact. Ces derniers peuvent également être en partie le résultat d'un très faible degré de contamination au sein du laboratoire (Coquoz, 2003).

La totalité des allèles figurant sur le profil du propriétaire de ce véhicule est retrouvée sur le profil obtenu à partir du prélèvement AHV1. Par contre, le prélèvement sec sur cette partie supérieure du volant (ASV1) a donné un profil net et complet qui correspond exactement au profil du propriétaire (tableau 19). Les allèles étrangers figurant sur le prélèvement humide sont absents du prélèvement sec sur la partie supérieure du volant, ce qui laisse supposer que l'ADN étranger a été recueilli par le premier prélèvement humide.

Un profil net et complet du propriétaire de ce véhicule est obtenu à partir du prélèvement humide sur la partie inférieure du volant (AHV2) et du prélèvement sec sur le même endroit (ASV2). Un profil net et complet du propriétaire est obtenu à partir du prélèvement humide sur le clignotant (AHC). Le prélèvement sec sur le même endroit (ASC) a donné le profil du propriétaire, où seul l'allèle 10 du marqueur D7S820 n'est pas détecté.

Tableau 19 : Profil du propriétaire du véhicule A (AC)

Les 16 loci analysés															
D8 S1179	D21 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D18 S51	Amel	D5 S818	FGA
10-14	28- 28	10- 11	11- 12	15-17	6-9	11- 12	11- 14	24-25	15- 15.2	14-18	8-8	13-16	x-y	10- 12	22- 22

Tableau 20 : Résultats de l'analyse des STR pour le véhicule A (prélèvements humides et secs) (Profils en annexe)

Les 16 loci analysés															
D8 S1179	D21 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D18 S51	Amel	D5 S818	FGA
Prélèvement humide sur la partie supérieure du volant (AHV1)															
10-14 -15	28-	10- 11	11- 12	13-15 -16- 17	6-9	11- 12	11- 13 - 14	17- 24-25	13- 14.2- 15- 15.2	14- 15- 17-18	8-	13-16	x-y	10- 12- 13	22-
Prélèvement sec sur la partie supérieure du volant (ASV1)															
10-14	28-	10- 11	11- 12	15-17	6-9	11- 12	11- 14	24-25	15- 15.2	14-18	8-	13-16	x-y	10- 12	22-
Prélèvement humide sur la partie inférieure du volant (AHV2)															
10-14	28-	10- 11	11- 12	15-17	6-9	11- 12	11- 14	24-24	15- 15.2	14-18	8-	13-16	x-y	10- 12	22-
Prélèvement sec sur la partie inférieure du volant (ASV2)															
10-14	28-	10- 11	11- 12	15-17	6-9	11- 12	11- 14	24-25	15- 15.2	14-18	8-	13-16	x-y	10- 12	22-
Prélèvement humide sur le clignotant (AHC)															
10-14	28-	10- 11	11- 12	15-17	6-9	11- 12	11- 14	24-25	15- 15.2	14-18	8-	13-16	x-y	10- 12	22-
Prélèvement sec sur le clignotant (ASC)															
10-14	28-	-11	11- 12	15-17	6-9	11- 12	11- 14	24-25	14- 15- 15.2	14-18	8-	13-16	x-y	10- 12	22-
Prélèvement humide sur la poignée intérieure coté chauffeur (AHP)															
10-14	28-	-	-12	15-17	6-9	11- 12	11- 14	-25	15- 15.2	14-18	8-	-	x-y	10- 12	-
Prélèvement sec sur la poignée intérieure coté chauffeur (ASP)															
10-14	28-	-	-	15-17	6-9	-12	-	-	15- 15.2	14-	8-	-	x-y	10- 12	-
Prélèvement humide sur le levier de vitesse (AHL)															
10-14	28-	10- 11	11- 12	15-17	6-9	11- 12	11- 14	24-25	15- 15.2	14-18	8-	-16	x-y	10- 12	-
Prélèvement sec sur le levier de vitesse (ASL)															
10-14	28-	-	-	15-17	6-9	11-	-	-	15- 15.2	14-18	8-	-	x-y	10- 12	-
Prélèvement humide sur le frein à main (AHF)															
10- 13- 14-15	28-	10- 11	11- 12	13- 15-17	6-7- 9-9.3	11- 12	11- 13- 14	23- 24-25	12- 13- 14- 14.2- 15- 15.2	14- 15- 16-18	8-9	13-16	x-y	10- 12- 13	22-
Prélèvement sec sur le frein à main (ASF)															
10- 13-14	28-	-	-	13- 15- 16-17	6-8-9	11- 12	11- 14	24-	15- 15.2	14- 16-18	8-	-	x-y	10- 11- 12	-

III-4-5-2- Véhicule B

Le profil obtenu à partir du prélèvement humide sur la partie supérieure du volant (BHV1) présente cinq allèles pour le marqueur D8S1179 (tableau 21), donc il pourrait s'agir d'un mélange de trois personnes ; néanmoins, le reste des marqueurs ne présentent que deux à quatre allèles, ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'un mélange de deux personnes avec une légère contamination. Ce profil présente un déséquilibre des pics X (797 RFU) et Y (333 RFU) de l'amélogénine, ce qui fait de lui un mélange d'un profil féminin (propriétaire du véhicule) et d'un profil masculin (chauffeur du véhicule).

Tous les allèles du propriétaire sont présents sur le profil obtenu à partir du prélèvement humide sur la partie supérieure du volant (BHV1), sauf l'allèle 17 du marqueur D18S51 et l'allèle 19 du marqueur FGA. Le reste des allèles sont ceux du chauffeur, deuxième contributeur du mélange, dont le profil reste à déterminer. Les allèles restant du profil de BHV1, après élimination de ceux du propriétaire, sont reportés sur le tableau 23.

Le prélèvement sec effectué également sur la partie supérieure du volant (BSV1) est un mélange d'un profil féminin et d'un autre masculin (X=461 RFU et Y= 123 RFU). L'allèle 17 du marqueur D18S51 qui ne figure pas sur le profil du prélèvement humide est présent sur le profil obtenu à partir du prélèvement sec sur le même endroit, d'où un intérêt de l'analyse séparée des deux types de prélèvement.

Selon Tomsey *et al.* (2001), dans le cas d'un mélange de profils de deux individus dont l'un est connu, le deuxième profil est déterminé après élimination du profil connu du mélange. Les allèles restant du profil obtenu de BSV1, après élimination du profil du propriétaire, sont reportés sur le tableau 23.

La majorité des STR analysés présentent quatre allèles pour le profil obtenu à partir du prélèvement humide sur la partie inférieure du volant (BHV2), donc c'est un mélange de l'ADN du propriétaire (tous les allèles sont présent sauf l'allèle 26 du marqueur FGA) et de celui du chauffeur du véhicule. Les allèles restant du profil obtenu de BHV2, après élimination de ceux du propriétaire, figurent sur le tableau 23.

L'ensemble des allèles du propriétaire (tableau 22) est présent sur le profil obtenu à partir du prélèvement sec sur la partie inférieure du volant (BSV2), les allèles restant sont probablement ceux du chauffeur. Le prélèvement sec peut parfois recueillir plus d'ADN du chauffeur (22 allèles pour BSV2) que le prélèvement humide sur le même

endroit (21 allèles pour BHV2), d'où un autre intérêt d'analyser séparément les deux types de prélèvement (humide et sec).

Le profil obtenu à partir du prélèvement humide sur le clignotant (BHC) est également un mélange entre l'ADN du propriétaire (profil partiel) et celui du chauffeur. Les allèles restant après séparation de ceux du propriétaire sont portés sur le tableau 23. Le prélèvement sec au même endroit (BSC) est également un mélange d'un ADN féminin (propriétaire) et masculin ($X = 1168$ RFU et $Y = 893$ RFU). Les allèles du propriétaire sont séparés du reste.

Les deux prélèvements humide et sec sur le clignotant (BHC et BSC) ont donné le même nombre d'allèles appartenant au chauffeur (22 allèles).

Les allèles restants, après élimination de ceux du propriétaire, des profils obtenus à partir du prélèvement humide et sec sur la poignée intérieure côté chauffeur (BHP et BSP), sont portés sur le tableau 23. Le prélèvement humide a permis d'obtenir 9 allèles du chauffeur, alors que le prélèvement sec a permis d'obtenir 16 allèles. Les profils obtenus à partir du prélèvement humide sur le levier de vitesse (BHL) et du prélèvement sec sur le même endroit (BSL) sont des profils partiels, les allèles du propriétaire sont également séparés du mélange. De la même manière, les allèles du propriétaire sont séparés des profils obtenus à partir des prélèvements humide et sec sur le frein à main (BHF et BSF) pour laisser les allèles qui proviennent probablement du chauffeur.

Il est constaté que certains allèles du propriétaire présents dans certains profils issus des prélèvements humides ne figurent pas sur ceux issus des prélèvements secs sur le même endroit, le cas de l'allèle 12 du marqueur CSF1PO pour les prélèvements sur la poignée intérieure du véhicule A. De même pour d'autres qui ne figurent pas sur les profils issus des prélèvements humides, mais présents sur les prélèvements secs sur le même endroit, le cas de l'allèle 27 du marqueur FGA pour les prélèvements sur la partie inférieure du volant du véhicule B. Il est également constaté que certains allèles absents des profils obtenus de certains endroits figurent sur les profils obtenus à partir des prélèvements effectués sur d'autres endroits du même véhicule, par exemple l'allèle 22 du marqueur FGA pour les prélèvements sur le véhicule A. Cette complémentarité entre les profils obtenus des deux types de prélèvements (humide et sec), ainsi qu'entre les profils issus d'endroits différents du même véhicule, est exploitée pour tenter d'identifier le profil du dernier chauffeur.

Tableau 21 : Résultats de l'analyse des STR pour le véhicule B concernant les deux types de prélèvements (en gras les allèles du propriétaire) (Profils en annexe).

Les 16 loci analysés															
D8 S1179	D21 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D18 S51	Amel	D5 S818	FGA
Prélèvement humide sur la partie supérieure du volant (BHV1)															
11- 12- 13- 14-15	28- 29- 31.2- 33.2	9-11	10- 11- 12	15- 16-18	6-7- 8-9	10- 11- 12	9- 10- 11- 12	17-20	13- 14- 15- 16	14- 16-17	6-8-9	13- 14- 18	x-y	8- 11- 12- 13	20- 26
Prélèvement sec sur la partie supérieure du volant (BSV1)															
11- 12- 13- 14-15	-	9-11	10- 11- 12	16-18	6-7- 8-9	10- 11- 12	10-	17- 20-24	14- 15- 16	14-16	6-8-9	14- 17	x-y	8- 10- 11- 13	-
Prélèvement humide sur la partie inférieure du volant (BHV2)															
11- 12- 13- 14-15	28- 29- 31.2- 33.2	9- 10- 11	8- 10- 11- 12	16-18	6-7- 8-9	10- 11- 12	9- 10- 11- 12	17- 20-21	13- 14- 15- 16	14- 16-17	6-8-9	13- 14- 17- 18	x-y	8-9- 11- 13	19- 20
Prélèvement sec sur la partie inférieure du volant (BSV2)															
12- 13- 14-15	28- 29- 31.2- 33.2	9-11	10- 11- 12	16-18	6-7- 8-9	10- 11- 12	9- 10- 11- 12	17-20	14- 15- 16	14- 16-17	6-8-9- 10	13- 14- 17- 18	x-y	8- 11- 13	19- 20- 26- 27
Prélèvement humide sur le clignotant (BHC)															
11- 12- 13- 14-15	31.2- 33.2	9-11	10- 12	16-18	6-7- 8-9	11- 12	9- 10- 11- 12	20-	14- 15- 16	14- 16-17	6-8-9	14- 18	x-y	8- 11- 12- 13	20- 27
Prélèvement sec sur le clignotant (BSC)															
12- 13-14	28- 29- 30- 31.2- 33.2	9-11	10- 12	15- 16-18	6-7- 8-9	10- 11- 12	10- 11	20-	14- 15- 16- 17.2	14- 16- 17-18	6-9	14- 18	x-y	8- 11- 13	20- 27
Prélèvement humide sur la poignée intérieure coté chauffeur (BHP)															
12- 13- 14-15	-	-	-	16-18	6-7- 8-9	-	9-	-	13- 14- 15- 16	14-16	6-9	-	x-y	8- 11- 13	-
Prélèvement sec sur la poignée intérieure coté chauffeur (BSP)															
12- 13- 14-15	28- 29- 33.2	11-	12-	16-18	6-7- 8-9	10- 11- 12	9- 10- 11- 12	17-20	14- 15- 16	14- 16- 17	6-9	14-	x-y	8-9- 11- 13	-
Prélèvement humide sur le levier de vitesse (BHL)															
12- 13- 14-15	-	-	-	15- 16-18	6-7- 8-9	10- 12	11- 13	17- 19-20	14- 15- 16	14- 16- 17	6-9	-	x-y	9- 11- 13	-
Prélèvement sec sur le levier de vitesse (BSL)															
12- 13- 14-15	29-	-	-	15- 16-18	6-7- 8-9	11- 12	-	-	14- 15- 16	14- 16- 17	6-8-9- 10	-	x-y	8-9- 11- 13	-

Suite tableau 21

Prélèvement humide sur le frein à main (BHF)															
13-14-15	31.2-33.2	9-11	10-12	16-18	6-9	11-12	10-11	20-	14-16	14-16-17	6-9	14-18	x-y	11-12-13	20-27
Prélèvement sec sur le frein à main (BSF)															
12-13-14	31.2-33.2	9-11	10-12	16-18	6-7-8-9	11-12	9-10-11	20-	14-15-16	14-16-17	6-9	14-18	x-y	8-9-12-13	20-27

Tableau 22: Profil du propriétaire du véhicule B

Les 16 loci analysés															
D8 S1179	D21 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D18 S51	Amel	D5 S818	FGA
12-15	28-29	11-11	11-12	16-16	7-8	10-12	9-12	17-17	14-15	16-16	8-9	13-17	x-x	8-13	19-26

Tableau 23: Allèles restant de chaque profil après élimination de ceux du propriétaire du véhicule B

Les 16 loci analysés															
D8 S1179	D21 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D18 S51	Amel	D5 S818	FGA
Prélèvement humide sur la partie supérieure du volant (BHV1)															
11-13-14	31.2-33.2	9-	10-	15-18	6-9	11-	10-11-	20-	13-16	14-17	6-	14-18	x-y	11-12-	20-
Prélèvement sec sur la partie supérieure du volant (BSV1)															
11-13-14	-	9-	10-	18-	6-9	11-	10-	20-24	16-	14-	6-	14-	x-y	10-11-	-
Prélèvement humide sur la partie inférieure du volant (BHV2)															
11-13-14	31.2-33.2	9-10-	8-10-	18-	6-9	11-	10-11-	20-21	13-16	14-17	6-	14-18	x-y	9-11	20-
Prélèvement sec sur la partie inférieure du volant (BSV2)															
13-14	31.2-33.2	9-	10-	18-	6-9	11-	10-11-	20-	16-	14-17	6-10	14-18	x-y	11-	20-27
Prélèvement humide sur le clignotant (BHC)															
11-13-14	31.2-33.2	9-	10-	18-	6-9	11-	10-11-	20-	16-	14-17	6-	14-18	x-y	11-	20-27
Prélèvement sec sur le clignotant (BSC)															
13-14	30-31.2-33.2	9-	10-	15-18	6-9	11-	10-11	20-	15.2-16-17.2	14-17-18	6-	14-18	x-y	11-	20-27
Prélèvement humide sur la poignée intérieure coté chauffeur (BHP)															
13-14	-	-	-	18-	6-9	-	-	-	13-16	14-	6-	-	x-y	11-	-

Suite tableau 23

Prélèvement sec sur la poignée intérieure coté chauffeur (BSP)															
13-14	33.2-	-	-	18-	6-9	11-	10-11-	20-	16-	14-17	6-	14-	x-y	9-11-	-
Prélèvement humide sur le levier de vitesse (BHL)															
13-14	-	-	-	15-18	6-9	-	11-13	19-20	16-	14-17	6-	-	x-y	11-	-
Prélèvement sec sur le levier de vitesse (BSL)															
13-14	-	-	-	15-18	6-9	11-	-	-	16-	14-17	6-10	-	x-y	9-11-	-
Prélèvement humide sur le frein à main (BHF)															
13-14	31.2-33.2	9-	10-	18-	6-9	11-	10-11	20-	16-	14-17	6-	14-18	x-y	11-12-	20-27
Prélèvement sec sur le frein à main (BSF)															
13-14	31.2-33.2	9-	10-	18-	6-9	11-	10-11	20-	16-	14-17	6-	14-18	x-y	9-12-13	20-27

L'examen des pics obtenus et leurs l'intensité permet de déduire les allèles manquants du profil du chauffeur (profil recherché). L'examen des pics du marqueur CSF1PO du profil obtenu à partir de BSV1 et de BSV2 montre un pic pour l'allèle 12 nettement supérieur (deux fois plus grand) que les allèles 10 et 11, ce qui fait que ce pic est formé de deux allèles 12. Du moment que les allèles du propriétaire pour ce marqueur sont (11,12), les deux allèles restant (10,12) appartiennent donc au chauffeur.

Le pic de l'allèle 12 du marqueur D13S317 des profils de BHV1, BHV2, BSV2, BSC BSP, et BHL est très élevé par rapport aux autres. Ce pic est formé donc de deux allèles 12 dont un appartient au chauffeur

L'allèle 14 du marqueur D19S433 présente un pic très élevé pour les profils obtenus à partir des prélèvements BHV1, BSV1, BHV2, BSV2, BHL, BSL et BSF, donc ce pic est formé également de deux allèles 14, dont un appartient au chauffeur.

L'allèle 9 du marqueur TPOX présente un pic deux fois plus grand que les autres pics particulièrement pour les prélèvements BHV1, BSV1, BHV2, BSV2 et BSL, il est formé de deux allèles 9, dont un allèle provient du chauffeur.

De même pour le pic de l'allèle 13 du marqueur D5S818 qui est très élevé particulièrement pour les profils issus des prélèvements BHV1, BHC, BSP et BHL, ce qui indique la présence de deux allèles 13 dans ce pic, dont un appartient au chauffeur.

De ce qui précède, on peut déduire le profil final du chauffeur obtenu après combinaison des différents prélèvements sur divers endroit (tableau 24). Ce dernier correspond au profil réel du chauffeur du véhicule B (tableau 25).

Tableau 24: Profil déduit du chauffeur du véhicule B.

Les 16 loci analysés															
D8 S1179	D21 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D18 S51	Amel	D5 S818	FGA
13-14	31.2- 33.2	9-	10- 12	18-	6-9	11- 12	10- 11-	20	14- 16	14-17	6-9	14-18	x-y	11- 13	20- 27

Tableau 25: Profil réel du chauffeur du véhicule B

Les 16 loci analysés															
D8 S1179	D21 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D18 S51	Amel	D5 S818	FGA
13-14	31.2- 33.2	9-11	10- 12	16-18	6-9	11- 12	10- 11-	20	14- 16	14-17	6-9	14-18	x-y	11- 13	20- 27

III-4-5-3- Véhicule C

Les profils obtenus à partir des deux types de prélèvements sur les divers endroits du véhicule C sont majoritairement des mélanges (tableau 26). La taille des pics (X et Y) obtenu après analyse de l'amélogénine est très importante pour la majorité des profils, ce qui permet de déduire qu'il s'agit de mélanges de profils de deux individus de sexe masculin (profils en annexe). Suivant le même raisonnement que celui suivi pour le véhicule B, les allèles restants après séparation de ceux du propriétaire (tableau 27), et qui pourraient appartenir au dernier chauffeur de ce véhicule, sont rapportés sur le tableau 28.

Tableau 26: Résultats de l'analyse des STR pour le véhicule C concernant les deux types de prélèvements (en gras les allèles du propriétaire) (Profils en annexe).

Les 16 loci analysés															
D8 S1179	D21 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D18 S51	Amel	D5 S818	FGA
Prélèvement humide sur la partie supérieure du volant (CHV1)															
10- 13-14	28- 31.2- 33.2	9- 10- 11	11- 12	15- 16- 17-18	6-9	11- 12	10- 11- 14	20- 24-25	14- 15- 15.2- 16	14-18	6-8-9	13- 14-16	x-y	10- 11- 12- 13	20- 22
Prélèvement sec sur la partie supérieure du volant (CSV1)															
10- 13-14	28- 31.2- 33.2	9- 10- 11	10- 11- 12	15- 16- 17-18	6-9	11- 12	10- 11- 14	20- 24-25	14- 14.2- 15- 15.2- 16	14- 17-18	6-8-9	13- 14-16	x-y	10- 11- 12- 13	20- 22- 27
Prélèvement humide sur la partie inférieure du volant (CHV2)															
10- 13-14	28- 31.2- 33.2	9- 10- 11	11- 12	15- 16- 17-18	6-8-9	11- 12	10- 11- 14	17- 20- 24-25	13- 14- 14.2- 15- 15.2- 16	14- 17-18	8-	13- 14-16	x-y	10- 11- 12- 13	20- 22
Prélèvement sec sur la partie inférieure du volant (CSV2)															
10- 13-14	28- 31.2- 33.2	9- 10- 11	10- 11- 12	15- 16- 17-18	6-9	9- 11- 12- 13	10- 11- 14	20- 24-25	14- 14.2- 15- 15.2- 16	14- 15- 16- 17-18	6-8-9	13- 14- 16-18	x-y	8- 10- 11- 12- 13	20- 22- 27
Prélèvement humide sur le clignotant (CHC)															
10- 13-14	28- 31.2	-	-	15- 16- 17-18	6-9	11- 12	10- 11- 14	20-24	14- 14.2- 15- 15.2- 16	14- 15- 17-18	6-8-9	-	x-y	10- 11- 12- 13- 16	-
Prélèvement sec sur le clignotant (CSC)															
10- 13-14	28- 31.2- 33.2	9- 10- 11	10- 12	16- 17-18	6-9	11- 12	10- 11	19- 20- 24-25	14- 14.2- 15- 15.2- 16	14-17	6-8-9	13-14- 16-18	x-y	10- 11- 12- 13	20- 22- 27
Prélèvement humide sur la poignée intérieure coté chauffeur (CHP)															
10- 13-14	28- 33.2	-	-	16- 17-18	6-8-9	11- 12	11-	-	14- 14.2- 15- 16	14-17	6-8-9- 11	-	x-y	10- 11- 12- 13	-
Prélèvement sec sur la poignée intérieure coté chauffeur (CSP)															
13-14	31.2- 33.2	9-11	10- 12	16-18	6-9	11- 12	10- 11	20-	14- 16	14-17	6-9	14-18	x-y	11- 13	20- 27

Suite tableau 26

Prélèvement humide sur le levier de vitesse (CHL)															
10-13-14	28-31.2-33.2	9-10-11	10-11-12	15-16-17-18	6-9	11-12	11-14	17-20-24-25	13-14-14.2-15-15.2-16	14-17-18	6-8-9	13-14-16	x-y	10-11-12-13	20-21-22-27
Prélèvement sec sur le levier de vitesse (CSL)															
10-13-14	28-31.2-33.2	10-11	10-11-12	15-16-17-18	6-9-9.3	11-12	10-11-14	20-	14-15-15.2-16	14-17-18	6-8-9	13-	x-y	10-11-12-13	-
Prélèvement humide sur le frein à main (CHF)															
10-13-14	28-33.2	9-10-11	10-11-12	15-16-17	6-9	10-11-12	10-11-14	20-24-25	14-14.2-15-15.2-16	14-17-18	6-8-9	13-16	x-y	10-11-12-13	20-22
Prélèvement sec sur le frein à main (CSF)															
10-13-14	28-31.2-33.2	9-10-11	10-11-12	15-16-17-18	6-9	9-11-12	10-11-13-14	17-18-20-24-25	13-14-14.2-15-15.2-16	14-15-17-18	8-9-11	13-15-16	x-y	10-11-12-13	22-

Tableau 27: Profil du propriétaire du véhicule C.

Les 16 loci analysés															
D8 S1179	D21 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D18 S51	Amel	D5 S818	FGA
13-14	31.2-33.2	9-11	10-12	16-18	6-9	11-12	10-11	20-20	14-16	14-17	6-9	14-18	x-y	11-13	20-27

Tableau 28: Allèles restant de chaque profil après élimination de ceux du propriétaire du véhicule C.

Les 16 loci analysés															
D8 S1179	D21 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	TH01	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D18 S51	Amel	D5 S818	FGA
Prélèvement humide sur la partie supérieure du volant (CHV1)															
10-	28-	10-	11-	15-17	-	-	14-	24-25	15- 15.2	18-	8-	13-16	x-y	10- 12-	22-
Prélèvement sec sur la partie supérieure du volant (CSV1)															
10-	28-	10-	11-	15-17		-	14-	24-25	14.2- 15- 15.2-	18-	8-	13-16	x-y	10- 12	22-
Prélèvement humide sur la partie inférieure du volant (CHV2)															
10-	28-	10-	11-	15-17	8-	-	14-	17- 24-25	13- 14.2- 15- 15.2	18-	8-	13-16	x-y	10- 12	22-
Prélèvement sec sur la partie inférieure du volant (CSV2)															
10-	28-	10-	11-	15-17	-	9-13	14-	24-25	14.2- 15- 15.2	15- 16-18	8-	13-16	x-y	8- 10- 12	22-
Prélèvement humide sur le clignotant (CHC)															
10-	28-	-	-	15-17	-	-	14-	24-	14.2- 15- 15.2	15-18	8-	-	x-y	10- 12- 16	-
Prélèvement sec sur le clignotant (CSC)															
10-	28-	10-	-	17-	-	-	-	19- 24-25	14.2- 15- 15.2	-	8-	13-16	x-y	10- 12	22-
Prélèvement humide sur la poignée intérieure coté chauffeur (CHP)															
10-	28-	-	-	17-	8-	-	-	-	14.2- 15	-	8-11	-	x-y	10- 12	-
Prélèvement sec sur la poignée intérieure coté chauffeur (CSP)															
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prélèvement humide sur le levier de vitesse (CHL)															
10-	28-	10-	11-	15-17	-	-	14-	17- 24-25	13- 14.2- 15- 15.2	18-	8-	13-16	x-y	10- 12	21- 22
Prélèvement sec sur le levier de vitesse (CSL)															
10-	28-	10-	11-	15-17	9.3	-	14	-	15- 15.2	18-	8-	13-	x-y	10- 12	-
Prélèvement humide sur le frein à main (CHF)															
10-	28-	10-	11-	15-17	-	-	14-	24-25	14.2- 15- 15.2	18-	8-	13-16	x-y	10- 12	22-
Prélèvement sec sur le frein à main (CSF)															
10-	28-	10-	11-	15-17	-	9-	13- 14	17- 28- 24-25	13- 14.2- 15- 15.2	15-18	8-11	13- 15-16	x-y	10- 12	22-

La combinaison entre les allèles restant des profils du tableau 28 a permis de séparer le profil le plus probable du chauffeur. Les allèles manquants des différents marqueurs du profil sont déterminés par l'étude des pics. Le marqueur D8S1179 présente un pic très important pour l'allèle 14 dans l'ensemble des profils obtenus du véhicule C donc deux allèles 14 forment ce pic, dont un appartient au chauffeur.

Huit des douze profils obtenus de ce véhicule présentent des pics très élevés pour l'allèle 28 du marqueur D21S11, synonymes d'existence de deux allèles 28. Puisque le profil du propriétaire pour ce marqueur est (31.2, 33.2), on peut déduire que ces deux allèles appartiennent au chauffeur.

Les deux pics du marqueur TH01 présentent des valeurs très élevées pour la majorité des profils, donc chacun masque un deuxième allèle du même type. Comme le propriétaire possède les allèles (6, 9) pour ce marqueur, on déduit que le chauffeur possède les mêmes allèles pour le même marqueur.

Dix des douze profils obtenus du véhicule C ne présentent que les allèles 11 et 12 pour le marqueur D13S317, ce qui implique qu'ils peuvent masquer les allèles du chauffeur. Les deux allèles présentent des pics importants et de tailles presque égales dans la majorité des profils, ce qui permet de déduire que le chauffeur possède la même combinaison d'allèles que le propriétaire pour le marqueur considéré.

L'allèle 11 du marqueur D16S820 obtenu à partir des prélèvements CHV1, CHF, CSV1, CSV2 et CSL, présente un pic très élevé par rapport aux autres allèles du même marqueur. Dans ce cas, l'allèle 11 du propriétaire masque un deuxième allèle du chauffeur qui aura donc les allèles 11 et 14 pour ce marqueur.

La majorité des profils obtenus (neuf sur douze) à partir des prélèvements sur ce véhicule présentent un pic très élevé pour l'allèle 14 du marqueur génétique vWA. De ce fait, ce pic est formé par deux allèles 14. Puisque le propriétaire n'est pas homozygote pour cet allèle, on déduit que le chauffeur possède également un allèle 14 pour ce marqueur.

Après séparation des allèles du propriétaire (6 et 9) du marqueur TPOX, le seul allèle restant (l'allèle 8) présente un pic très important dans la majorité des profils obtenus (neuf sur douze), ce qui permet de déduire que le chauffeur est homozygote pour l'allèle 8 pour ce marqueur. Le profil déduit du chauffeur du véhicule C (tableau 29) correspond au profil réel de ce dernier (tableau 30).

Tableau 29 : Profil déduit du chauffeur du véhicule C.

Les 16 loci analysés															
D8 S1179	D21 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	THO1	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D18 S51	Amel	D5 S818	FGA
10-14	28	10-	11-	15-17	6-9	11-12	11-14	24-25	15-15.2	14-18	8	13-16	x-y	10-12	22

Tableau 30: Profil réel du chauffeur du véhicule C.

Les 16 loci analysés															
D8 S1179	D21 S11	D7 S820	CSF 1PO	D3 S1358	THO1	D13 S317	D16 S539	D2 S1338	D19 S433	VWA	TPOX	D18 S51	Amel	D5 S818	FGA
10-14	28	10-11	11-12	15-17	6-9	11-12	11-14	24-25	15-15.2	14-18	8	13-16	x-y	10-12	22

Les travaux de Ishiko *et al.* (2007), ont démontré que la méthode de double prélèvement sur différents endroits peut être très utile lors des investigations sur scène de crimes même si une personne avait conduit brièvement le véhicule à mains nues.

Wickenheiser (2002), a démontré que le profil ADN obtenu d'une trace est indicateur de la dernière personne ayant été en contact avec l'objet et que la quantité d'ADN transférée est indépendante de la durée du contact, le transfert étant instantané. Ceci conforte l'ensemble de nos résultats, puisque la durée de contact limitée entre le chauffeur est le véhicule (05 minutes) a permis de l'identifier dans les deux cas : propriétaire de sexe masculin ou de sexe féminin.

IV - Conclusion et perspectives

IV- Conclusion et perspectives

L'utilisation des polymorphismes de l'ADN à des fins d'identification des personnes est l'élément de preuve le plus performant offert par la science médico-légale. La précision et la fiabilité de l'expertise en fait l'un des meilleurs outils pour découvrir la vérité.

Dans le cas de la recherche de paternité, après identification chez l'enfant des allèles maternels, le père biologique est identifié avec certitude puisque l'ensemble des allèles restants est retrouvé sur son profil.

L'auteur du vol qualifié est identifié par analyse de la trace de sang laissée sur les lieux, alors que le deuxième suspect est exclu. Le cheveu et la salive retrouvés sur les lieux du vol qualifié présentent un même profil, différent de ceux des suspects, ce qui laisse supposer l'implication d'une autre personne dans ce vol.

Le sang retrouvé sur la vitre brisée a permis l'identification de l'auteur de l'homicide volontaire, alors que la tache de sang retrouvée sur le parquet présente un profil différent de ceux des suspects, ce qui laisse supposer qu'elle est issue d'un co-auteur du crime ou de la victime, d'où la nécessité de toujours effectuer un prélèvement sur la victime en vue d'élimination. En effet, l'intérêt d'un prélèvement sur la victime pour élimination est démontré dans le cas de l'agression, où l'un des échantillons prélevé sur les lieux est un mélange de deux ADN, qui après séparation du profil génétique de la victime a permis d'identifier l'auteur de cette agression.

Les profils ADN obtenus à partir de prélèvements sur les différentes scènes de crimes permettent, d'une part de confondre les auteurs dont les profils correspondent à ceux des traces incriminées, d'innocenter les suspects dont les profils ne correspondent pas, d'autre part permettent le rapprochement d'affaires non résolues en comparant entre eux, les profils des différents échantillons prélevés sur divers scènes de crime, d'où la nécessité de la création d'un fichier national d'empreintes génétiques.

L'utilisation de la double technique de prélèvement en utilisant un écouvillon humide et un écouvillon sec lors de prélèvements des traces de contacts, détermine les résultats des analyses STR. Cette étude démontre que le prélèvement humide seul, peut ne pas recueillir toutes les cellules épithéliales présentes à la surface d'un objet, et l'ADN obtenu à partir du deuxième écouvillon sec seul, peut donner un profil interprétable.

La quantité d'ADN obtenue à partir des prélèvements secs effectués sur différents endroits des trois véhicules est généralement supérieure à celles obtenues à partir des prélèvements humides sur le même endroit. Néanmoins, pour un meilleur rendement en ADN, les deux écouvillons, sec et humide, peuvent être joint lors de l'extraction de l'ADN.

Les prélèvements effectués sur les trois véhicules ont permis d'obtenir, 24 profils complets et 13 partiels. Donc même des quantités infimes d'ADN (traces de contacts) peuvent donner des profils ADN interprétables, pouvant contribuer à l'identification du chauffeur du véhicule.

Certains allèles qui ne figurent pas sur les prélèvements humides sont présents sur les prélèvements secs effectués au même endroit, de même pour d'autres allèles absents du prélèvement sec mais présents sur le prélèvement humide effectué au même endroit, ce qui permet de conclure que ces deux types de prélèvements sont complémentaires.

Des allèles absents du profil obtenu d'un échantillon prélevé sur une partie d'un véhicule sont retrouvés sur d'autres profils obtenus à partir d'échantillon prélevés sur d'autres parties du même véhicule, donc des prélèvements effectués sur plusieurs endroits d'un même véhicule sont complémentaires et contribueront à l'identification du chauffeur.

Enfin, il serait souhaitable à l'avenir de réaliser une étude similaire en utilisant le kit minifiler, puisque les chances d'obtenir de bons résultats à partir d'échantillon dégradés ou en très faible quantité augmentent lorsque des miniSTR sont analysés, avec des fragments amplifiés de petites tailles. L'utilisation des STR du chromosome Y, pourrait être d'un grand apport lors de l'analyse de mélanges entre deux individus de sexes différents, le cas du véhicule B. Il est également essentiel de déterminer la fréquence de chaque allèle de chaque STR dans la population Algérienne, données indispensables pour le calcul de la probabilité d'identité et l'interprétation fiable des résultats.

V - Références bibliographiques

V- Références bibliographiques

A

Abu Al-Soud W., Jönsson L.J and Rådström P. (2000). Identification and characterization of Immunoglobulin G in Blood as a Major Inhibitor of Diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology* :345–350

Alexander O., Gettler and Kaye S. (1943). The phenolphthalin test for the detection of “occulte” blood. *The American journal of clinical pathology*, 13 (9).

Aknin-Seifer I., Touraine R.L., Lejeune H., Laurent J.L., Laurus B. et Levy R. (2004). Évaluation d’une technique simple et rapide de détection de microdélétions du bras long du chromosome Y. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*, 32: 34–41.

Alberts B. et Bray D. 1999. L’essentiel de la Biologie cellulaire – introduction à la biologie moléculaire de la cellule. Flammarion, p 316.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Watson J.D. (1989). *Biologie moléculaire de la cellule*. Flammarion 2^{ème} édition, p 401.

Alonso A., Martyna P., Albarran C., Garcia P., Garcia O., De Simon L.F., Garcia-Hirschfeld J.; Sancho M.; De la Rua C. and Fernandez-Piqueras J. (2004). Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Science International*, 139: 141–149.

Andreasson H., Nilsson M., Budowle B., Lundberg H. and Allen M. (2006). Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Science International*, 164: 56–64.

Applied Biosystems. (2001). ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer. Sequencing Chemistry Guide

Applied biosystems. (2006). AmpFlSTR[®] Identifiler[®] PCR Amplification Kit User’s Manual

Armour J.A.L. and Jeffreys A. J. (1992). Recent advances in minisatellite biology. *Elsevier Science Publishers B. V.*, 307 (1) : 113-115.

B

Barbaro A., Cormaci P. and Barbaro A. (2008). Study about the effect of high temperatures on STRs typing. *Forensic Science International: Genetics Supplement* , 1 : 92–94.

Barbaro A., Cormacia P., Barbarob A. and Louahlia S. (2004). DNA analysis in a case of serial murderers. *International Congress Series*, 1261: 465– 467.

Bender K., Farfan M. J. and Schneider P.M. (2004). Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. *Forensic Science International*, 139: 135–140.

Bérard S. et Rivals E. (2002). Comparaison de minisatellites. *Jobim* : 261-262.

Bois P.R.J. (2003). Hypermutable minisatellites, a human affair?. *Genomics*, 81: 349-355.

Broutin J. (2007). La PCR en temps réel. La PCR quantitative en temps réel: outil d'analyse pour la recherche et la clinique. *Les Technologies de Laboratoire*, 3 : 23-24.

Browwn T.A. (2004). Génomes. Edition Flammarion, p130.

Buckleton J.S., Curran J.M. and Gill P. 2007. Towards understanding the effect of uncertainty in the number of contributors to DNA stains. *Forensic Science International: Genetics* 1 : 20–28.

Budowle B., Bieberb F. R. and Eisenberg A. J. (2005). Forensic aspects of mass disasters: Strategic considerations for DNA-based human identification. *Legal Medicine*, 7: 230–243.

Bustin S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169-193.

Butler J. M., Buel E., Crivellente F. and McCord B. R. (2004). Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*, 25: 1397–1412.

Butler J.M. (2006). Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing. *Journal of forensic science*, 51 (2): 253- 265.

Butler J.M. (2007). Short tandem repeat typing technology used in human identity testing. *Biotechniques*. supplement to vol 43:2-5..

Buttler J.M. (2003). Forensic DNA typing: Biology and technology behind STR markers. Academic press, 2ème édition, 28- 82- 94.

C

Caine L., Pereira M.J., Pinheiro M.F. (2008). Identification of several profiles in a sexual assault case. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1: 403–404.

Calvo L., Ricaut F., Keyser C., Grimoud A.M., Lude B., Crubezy E., Lesca C. and Lodler J.P. 2001. Etude de l'ADN ancien au niveau de la pulpe dentaire de la serie ostéologique de saint côme et damien. *Antropo*, 1 : 21-29.

Castella V. (2006). Utilisation des profils ADN dans un contexte médico-légal. *Revue tunisienne de biologie clinique*, 18: 4 - 8.

China B., Ghafir Y. et Daube G. (2002). Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 147 : 99-109

Cifuentes L.O., Martinez E.H., Acuna M.P. and Jonquera H.G. (2006). Probability of exclusion in paternity testing: time to reassess. *Journal of Forensic Science*, 51(2): 349-50.

Coquoz R. (2003). Preuve par l'AND. La génétique au service de la justice. *Presse polytechniques et universitaires romandes*, Lausanne, p 112, 223.

Costello M.T. and Schumm J.W. (2006). A single assay for human-specific quantification of less than 1 pg DNA and detection of the presence of PCR inhibitors in forensic samples. *International Congress Series*, 1288 : 753– 755.

Cunha E., Pinheiro J. and Nuno-Vieira D. (2006). Identification in forensic anthropology: its reaction to genetics. *International Congress Series*, 1288: 807–809.

D

Da Vela G., Bertino M.G., Fusini F. and Ricci U. (2006). Evaluation of an automated system for amylase detection in forensic samples. *International Congress Series*, 1288: 636–638.

De Mazancourt P. et Pfitzinger H. (2005). ADN et recherche en paternité. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*, 33 : 461–463

Debrauwère H., Nicolas A., Vergnaud G., Buard J., Tessier J. et Aubert D. (2000). Mécanisme d'instabilité des minisatellites. *médecine/sciences*, 16 : 415-7.

Di Pinto A., Forte V.T., Guastadisegni M.V.C., Martino C., Schena F.P. and Tantillo G. (2007). A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control*, 18: 76–80.

Dixon L.A., Dobbins A.E., Pulker H.K., Butler J.M., Vallone P.M., Coble M.D., Parson W., Berger B., Grubwieser P., Mogensen H.S., Morling N., Nielsen K., Sanchez J.J., Petkovski E., Carracedo A., Sanchez-Diz P., Ramos-Luis E., Brio M., Irwin J.A., Just R.S., Loreille O., Parsons T.J., Syndercombe-Court D., Schmitter H., Stradmann-Bellinghausen B., Bender K. and Gill P. (2006). Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs-results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Science International*, 164: 33–44.

E

El Fahime E. et Ennaji Mly M. (2007). Évolution des techniques de séquençage. *Les technologies de laboratoire*, 5: 4 – 12.

Etienne J. et Clauser E. (2001). Biochimie génétique – Biologie moléculaire. Masson édition, p16.

G

Geansslen R.E. (1983). Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry, Identification of blood. Research Foundation of the City University of New York, p 73-133.

Généthon (2001). La PCR quantitative en temps réel ou la 'TAQMAN'. Centre de recherche et d'application sur les thérapies géniques.(<http://www.genethon.fr>).

Gill P. (2001). Biological evidence (including hair). 13th Interpol forensic symposium, Lyon, France, October 16-19.

Gill P., Curran J. and Elliot K. (2005). A graphical simulation model of the entire DNA process associated with the analysis of short tandem repeat loci. Nucleic Acids Research, 33 (2) : 632–643.

Ginestra E., Trapani C., Di Martino D. and Saravo L. (2004). DNA extraction from blood determination membrane card test. Forensic Science International, 146S : S145-S146.

Girardet A., Pellestor F. et Claustres M. (1999). Mise au point des conditions d'amplification de l'ADN unicellulaire. Medecine/sciences, 15: 86-9.

Gonzalez-Andrade F., Bolea M., Begona Martýnez-Jarreta B. and Sanchez D. (2006). DNA typing in missing persons in Ecuador (South America). International Congress Series, 1288 : 544–546.

Griffiths A.J.F., Gelbart W.M., Miller J.H. et Lewontin R.C. (2001). Analyse génétique moderne. De boeck université, p 380.

Gunn P.R., Trueman K., Stapleton P. and Klarkowski D.B. (1997). DNA analysis in disputed parentage: the occurrence of two apparently false exclusions of paternity, both at short tandem repeat (STR) loci, in the one child. Electrophoresis, 18(9):1650–2.

Gusmão L., Butler J. M., Carracedo A., Gill P., Kayser M., Mayr W. R., Morling N., Prinz M., Roewer L., Tyler-Smith C. and Schneider P. M. (2006). DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. International Journal of Legal Medicine, 120: 191–200.

H

Hill C.R., Kline M.C., Coble M.D. and Butler J. M. (2008). Characterization of 26 MiniSTR Loci for Improved Analysis of Degraded DNA Samples. Journal of forensic science, 53 (1): 73-80.

Houghton S. G. and Cockerill F.R. (2006). Real-time PCR: Overview and applications. *Surgery*, 139 (1): 1-5.

I

Ikawa T., Kakegawa A., Nagano T., Ando H., Yamakoshi Y., Tanabe T., Simmer J.P., Hu C.C., Fukae M. and Oida S. (2005). Porcine Amelogenin is Expressed from the X and Y Chromosomes. *Journal of Dentist Research*, 84(2):144-148.

Ingman M. and Gyllensten U. (2001). Analysis of the Complete Human mtDNA Genome: Methodology and Inferences for Human Evolution. *The American Genetic Association*, 92:454–461.

Ishiko A., Tsuji A., Yamaguchi H., Hayashiba Y., Inoue H. and Ikeda N. (2007). Experimental studies on identification of the driver based on STR analysis. *Legal Medicine*, 10: 115- 118.

J

Jarman A.P. and Wells R.A. (1999). Hyper variable minisatellite recombinators. *Trends genetics*, p 200.

Jobling M.A. and Gill P. (2004). Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Genetics*, 5: 739-751.

Jobling M.A., Lo I.C.C., Turner D. J., Bowden G.R., Lee A.C., Xue Y., Carvalho-Silva D., Hurles M.E., Adams S.M., Chang Y.M., Kraaijenbrink T., Henke J., Guanti G., McKeown B., Van Oorschot R.A.H., Mitchell R.J., De Knijff P., Tyler-Smith C. and Parkin E.J. (2007). Structural variation on the short arm of the human Y chromosome: recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y. *Human Molecular Genetics*, 16 (3): 307–316.

Johns L.M., Thakor A., Ioannou P., Kerai J. and Thomson J.A. (2006). Validation of Quantifiler™ Human Quantification Kit for forensic casework. *International Congress Series*, 1288: 762–764.

Jouquand S. (2008). Homicides : En l'absence de liquide biologique permettant d'avoir de l'ADN en grande quantité, les traces de contact peuvent suffire à confondre un agresseur. La lettre de l'Institut Génétique Nantes Atlantique. *Ressources génétiques* n° 05.

K

Kaplan J.C. et Delpech M. (1989). *Biologie moléculaire et médecine*. Flammarion 2^{ème} édition, p 222 – 230.

Kashyap V. K., Sitalaximi T., Chattopadhyay P. and Trivedi R. (2004). DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis. *International Journal of Human Genetic*, 4(1): 11-30.

Keyser-Traquis C., Ricaut F., Crubézy E. et Ludes B. (2002). Populations anciennes et ADN ancien : état actuel de la question. *Antropo*, 2 : 1-8.

Klein D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *TRENDS in Molecular Medicine*, 8 (6) : 257-260.

Kline M.C., Duewer D.L., Redman J.W. and Butler J. M. (2005). Results from the NIST 2004 DNA Quantitation Study. *Journal of Forensic Science*, 50 (3) : 571- 578.

L

Ladd C., Adamowicz M.S., Bourke M.T., Scherzinger C.A. and Lee H.C. (1999). A systematic analysis of secondary DNA transfer. *Journal of Forensic Science*, 44 (6): 1270–1272.

Lay-Keow Ng , Andy N.g., Cholette F. and Davis C. (2007). Optimization of recovery of human DNA from envelope flaps using DNA IQ™ System for STR genotyping. *Forensic Science International: Genetics*, 1 : 283 – 286.

Lazaruk K., Wallin J., Holt C., Nguyen T. and Walsh P.S. (2001). Sequence variation in humans and other primates at six short tandem repeat loci used in forensic identity testing. *Forensic Science International*, 119 (1): 1-10.

Leat N., Ehrenreich L., Benjeddou M. and Davison S. (2004). Developments in the use of Y-chromosome markers in forensic genetics. *African Journal of Biotechnology*, 3 (12): 637-642.

Liu H., Wang H., Shi Z., Wang H., Yang C., Silke S., Tan W. and Lu Z. (2006). TaqMan probe array for quantitative detection of DNA targets. *Nucleic Acids Research*, 34 (1) : e4

Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaïra et Darnell (1997). *Biologie moléculaire de la cellule*. De boeck université, p 810.

Loreille O.M., Diegoli T.M., Irwin J.A., Coble M.D. and Parsons T.J. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics*, 1 : 191–195.

M

Mackay I. M., Arden K. E. and Nitsche A. (2002). Real time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30: 1292-1305.

Mackay I.M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10: 190–212

Mansuet lupo A., Van Huffel V. et Rouger P. (2008). Les empreintes génétiques : nouvel outil en médecine légale. *Médecine et Droit*, 88 : 24–28.

Mansuet-lupo A., Rouger P. et Van Huffel V. (2007). Les empreintes génétiques : état de l'art en 2007, techniques, application et législation. *Transfusion clinique et biologique*, 14 : 334 – 342.

Mansuet-Lupo A., Van Huffel V. et Rouger P. (2007). Les empreintes génétiques: nouvel outil en médecine légale. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 22: 209–214.

May-Panloup P., Chrétien M.F., Malthiery Y. et Reynier P. (2006). ADN mitochondrial du spermatozoïde. *Gynécologie obstétrique et fertilité*, 34 : 847-854.

Moroni R., Gasbarra D., Arjas E., Lukka M. and Ulmanen I. (2008). Effects of reference population and number of STR markers on paternity testing. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1: 654–655.

Muthukrishnan M., Singanallur N.B., Ralla K. and Villuppanoor. S.A. (2008). Evaluation of FTA® cards as a laboratory and field sampling device for the detection of foot-and-mouth disease virus and serotyping by RT-PCR and real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 151 : 311–316.

N

Naslund K., Saetreb P., Salomé J.V., Bergstrfma T.F., Jareborga N. and Jazinb E. (2005). Genome-wide prediction of human VNTRs. *Genomics*, 85: 24– 35.

P

Pang B.C.M. and Cheung B.K.K (2007). Double swab technique for collecting touched evidence. *Legal medicine*, 9: 181 – 184.

Panneerchelvam S. and Norazmi M.N. (2003). Forensic DNA profiling and database. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 10 (2): 20-26.

Pascal O. (1998). Empreintes génétiques : pourquoi et pour qui ? *Médecine et Droit*, 32: 1-6.

Perkin Elmer coporation (1998) AmpFISTR® Profiler Plus™ PCR Amplification kit user's manual. Foster city, CA : Perkin Elmer corporation

Petit C., Martel-Petit V., Hienne R. and Frackowiak S. (2008). Single sperm cell isolation by micromanipulation for human identification in sexual assault. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1: 60–62.

Pfeiffer I., Volkel I., Taubert H. and Brenig B. (2004). Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. *Forensic Science International*, 141: 149–151.

Pharmacia Diagnostics AB, (1997). Phadebas amylase test. Mode d'emploi.

Phipps M. and Petricevic S. (2007). The tendency of individuals to transfer DNA to handled items. *Forensic Science International*, 168 : 162–168.

Picozzi K., Tilley A., Fèvre E.M., Coleman P.G., Magona J.W., Odit M., Eisler M.C and Welburn S.C. (2002). The diagnosis of trypanosome infections: applications of novel technology for reducing disease risk. *African Journal of Biotechnology*, 1 (2): 39–45.

Pizzamiglio M., Mameli A., Denari D. and Garofano L. (2004). Forensic identification of a murderer by typing volunteers of a small village of Northern Italy. *International Congress Series* 1261: 440–442.

Poitras E. et Houde A. (2002). La PCR en temps réel: principes et application. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2: 2-11.

Prado V.F., Castro A.K.F., Oliviera C.L., Souza K.T., Pena S.D.J. (1997). Extraction in forensic sciences. *Genetic analysis : biomolecular engineering*, 14 : 41-44.

Primorac D., Schanfield M.S. and Primorac D. (2000). Application of forensic DNA testing in the legal system. *Croatian medical journal*, (41)1: 32-46.

Primrose s., Twiman R. et Old R. 2004. Principes de génie génétique. De Boeck et Larcier s.a, p 19-24.

Q

QIAGEN®. (2003). QIAamp® DNA mini Kit User's manual.

Quintana-Murci L., Veitia R., Santachiara-Benercetti S., Mc Elreavey K., Fellous M. et Burgeron T. (1999). L'ADN mitochondrial, le chromosome y et l'histoire des populations humaines. *Médecine/sciences*, 15: 974-82.

R

Rao-Coticone S., Collins P., Dimsoski P., Ganong C. Hennessy L., Leibelt C., Shadravan F. and Reeder D. 2003. Applications of 5-dye technology in forensic DNA typing and analysis. *International Congress Series*, 1239: 3 – 4.

Ricci U., Marchi C., Previdere C. and Fattorini P. (2006). Quantification of human DNA by real-time PCR in forensic casework. *International Congress Series*, 1288: 750–752.

Rouger P. (2000). Les empreintes génétiques. PUF, p40

S

Sanchez D., Gonzalez-Andrade F., Bolea M. and Martýnez Jarreta B. (2008). False inclusion in a deficient paternity case with two alleged fathers. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1: 525–527.

Schneider P. M. (2006). Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Science International*, 165: 238–243.

Schulz I.; Schneider P.M. and Rothschild M.A. (2006). Absolute quantification of forensic casework samples using quantitative real-time PCR (qPCR) methods. *International Congress Series*, 1288: 765– 767.

Serre J.L. et Coll, (2002). Les diagnostics génétiques. *Biotech info*. Duno, p 61.

Shadrach B., Commane M., Hren C. and Warshawsky I. (2004). Consultations in Molecular Diagnostics: A Rare Mutation in the Primer Binding Region of the Amelogenin Gene Can Interfere with Gender Identification. *Journal of Molecular Diagnostics*, 6 (4): 401- 405.

Shneider P.M., Balogh K., Naveran N., Bogus M., Bender K., Lareu M. and Carracedo A. (2004). Whole genome amplification- The solution for a common problem in forensic casework ?. *International congress series*, 1261: 24-26.

Singer M. et Berg P. (1992). *Gènes et génomes*. Edition vigot, p 700.

Spitaleri S., Piscitello D., Di Martino D. and Saravo L. (2004). Experimental procedures comparing the activity of different Taq polymerases. *Forensic Science International*, 146S : S167–S169.

Stapleton P.M., Lai D., Millar C.D., Wua E., Andres M. and Love D.R. (2008). Discovery of three related females who type XY at the amelogenin locus. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1: 577–579.

Stratagene (2004). *Introduction to quantitative PCR. Methods and application guide*.

Stryer L. (1992). *Biochimie*. Edition Flammarion, p 121.

Stuber R. Détection de sang dans les selles hexagon OBTI "test immunologique pour le sang occulte". *Ruwag Diagnostics*. Ruwi News n° 64.

Subirana J.A. et Messenguer X. (2008). Structural families of genomic microsatellites. *Gene*, 408 :124- 132.

Suzuki N., Yoshida A. and Nakano Y. 2005. Quantitative Analysis of Multi-Species Oral Biofilms by TaqMan Real-Time PCR. *Clinical Medicine and Research*, 3 (3) : 176- 185.

Swango K. L., Timken M.D., Chong M.D. and. Buoncristiani M.R. (2006). A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic Science International*, 158: 14–26.

Swango K.L., Hudlow W. R., Timken M. D. and Buoncristiani M. R. (2007). Developmental validation of a multiplex qPCR assay for assessing the quantity and quality of nuclear DNA in forensic samples. *Forensic Science International*, 170: 35–45.

T

Talthip J., Chirachariyavej T., Peonim V., Atamasirikul K. and Teerakamchai S. (2007). An Autopsy Report Case of Rape Victim by the Application of PSA Test Kit as a New Innovation for Sexual Assault Investigation in Thailand. *Journal Medicine Association Thailand*, 90 (2): 348-51.

Tamakia K. and Jeffreys A.J. (2005). Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Legal Medicine*, 7: 244–250.

Toth G., Gaspari Z. Jurka J. (2000). Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.

Tomsey C. S., Kurtz M., Flowers B., Fumea J., Giles B. and Kucherer S. (2001). Case Work Guidelines and Interpretation of Short Tandem Repeat Complex Mixture Analysis. *Croatian medical journal*, 42(3): 276-280.

Torres Y., Flores I., Prieto V., Lopez-Soto M., Farfan M.J., Carracedo A. and Sanz P. (2003). DNA mixtures in forensic casework: a 4-year retrospective study. *Forensic science international*, 134: 180-186.

Trevin F. et Le Bricon T. (2003). Nouvelles techniques d'électrophorèse : application aux protéines et à l'ADN. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 18 : 11-22.

Tringali G., Barbaro A., Insirello E., Cormaci P. and Roccazzello A.M. (2004). Rapid and efficacious real-time quantitative PCR assay for quantitation of human DNA in forensic samples. *Forensic Science International*, 146S: S177–S181.

Tsukada K., Takayanagi K., Asamura H., Ota M. and Fukushima H. (2002). Mutiplex short tandem repeat typing in degraded samples using newly designed primers for the TH01, TPOX, CSF1PO and vWA loci. *Legal medicine*, 4: 239-2445.

Turrina S., Filippini G., Atzei R., Zaglia E. and De Leo D. (2008). Validation studies of rapid stain identification-blood (RSID-blood) kit in forensic caseworks. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1: 74–75.

V

Valasek, Mark A., and Repa J.J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151–159.

Von Wurmb-Schwark N., Malyusz V., Fremdt H.; Koch C., Simeoni E. and Schwark T. (2006). Fast and simple DNA extraction from saliva and sperm cells obtained from the skin or isolated from swabs. *Legal Medicine*, 8: 177–181.

W

Walker N.J. (2002). A Technique Who's Time Has Come. *Science*, 296 : 557-559.

Watson J.D. et Crick F.H.C. (1990). Molecular structure of nucleic acids. *Helis* horword publisher, p 24.

Weber J.L. and Wong C. (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genetics*, 2 (8): 1123–8.

Whittaker J.C.; Harbord R.M.; Boxall N.; Mackay I.; Dawson G. and Sibly R.M. (2003). Likelihood-Based Estimation of Microsatellite mutation rates. *Genetics*, 164: 781–787

Wickenheiser R.A. (2002). Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact. *Journal of Forensic Science*, 47(3): 442–450.

William J.M., Buoncristiani M.R., Lazaruk K., Fildes N., Holt c. and Walsh P.S. (1998). TWGDAM validation of the AmpFISTR™ blue PCR Amplification kit for forensic casework analysis. *Journal of forensic science*, 43(4): 854-870.

Winter P.C., Hickey G.I. et Fletcher H.L. (2000). L'essentiel en génétique. Berti edition, p 95, 368.

Wolfgramm E.V., de Carvalho F.M., Aguiar V.R.C., De Nadai Sartori M.P., Hirschfeld-Campolongo G.C.R., Tsutsumida W.M. and Louro I.D. (2009). Simplified buccal DNA extraction with FTA Elute Cards. *Forensic Science International: Genetics*, 3: 125 – 127.

Annexes

Résumé -----

Dans cette étude quatre affaires ont été traitées : une recherche en paternité, un vol qualifié, un homicide volontaire et une agression. Le père biologique est formellement identifié dans la première affaire. La confrontation des profils génétiques obtenus des différents échantillons prélevés sur les différentes scènes de crime avec ceux des suspects a permis l'identification des auteurs dans tous les cas étudiés.

L'exploitation des traces de contact laissées sur les différentes parties des véhicules (trois véhicules), recueillies par la technique du double prélèvement en utilisant un écouvillon humide suivi d'un écouvillon sec sur le même endroit, a permis l'identification des propriétaires et chauffeurs des trois véhicules.

Les résultats obtenus démontrent une complémentarité entre les profils issus des prélèvements humides et ceux issus des prélèvements secs sur le même endroit, de même pour les profils issus des prélèvements effectués sur les différentes parties du véhicule.

Mots clés : STR, Polymorphisme de l'ADN, profil ADN, trace de contact.

Abstract-----

In this study four forensic cases were treated: paternity, aggravated theft, murder and aggression. The biological father is formally identified in the first case. The confrontation of the genetic profiles obtained from the various samples taken on the various crime scenes with those from the suspects allowed the identification of the authors in all the studied cases.

The exploitation of contact traces left on the various parts of the cars (three cars), collected by the double swab technique (wet and dry), allowed the identification of the owners and drivers of the three cars.

The results obtained show a complementarity between the profiles resulting from the wet swab and those resulting from the dry swab on the same place, the same for the profiles resulting from the samples carried out on the various parts of the vehicle.

Keywords : STR, DNA polymorphism, DNA profile, touched evidence

ملخص-----

في هذه الدراسة تمت معالجة أربعة قضايا : الأبوة، السرقة الموصوفة، القتل العمدي و الاعتداء. الأب البيولوجي تم تحديده بدقة في القضية الأولى. بعد مقارنة البطاقات الجينية الخاصة بمختلف العينات التي تم رفعها بمختلف مسارح الجريمة مع البطاقات الجينية الناتجة عن تحليل الأحماض النووية المأخوذة من المشتبه فيهم، أسفرت عن هوية الفاعلين الحقيقيين في كل الحالات المدروسة.

من خلال استغلال آثار اللمس على مختلف الأماكن داخل السيارات (ثلاث سيارات)، والتي تم رفعها باستعمال تقنية المسح المزدوج بمسح نفس المساحة بقطن مبلل ثم بقطن جاف، تم تحديد هوية أصحاب السيارات وكذا السائقين الآخرين.

النتائج المتحصل أظهرت تكامل بين البطاقات الجينية المتحصل عليها من القطن المبلل و بين البطاقات الجينية المتحصل عليها من القطن الجاف، وكذا بين مختلف البطاقات الجينية المتحصل عليها من مختلف الأماكن داخل نفس السيارة.

كلمات المفتاح : STR ، Polymorphisme de l'ADN ، البطاقات الجينية ، آثار اللمس.