

**INSTITUT DE RECHERCHE CRIMINELLE
DE LA GENDARMERIE NATIONALE
DEPARTEMENT BIOLOGIE**

**EFFET DU REVELATEUR
DE SANG *BLUESTAR*[™]
SUR LA DETERMINATION
D'EMPREINTES GENETIQUES**

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	3
MATERIELS ET METHODES	5
1. <u>RÉALISATION DES TACHES DE SANG</u>	5
2. <u>TRAITEMENT DE CES TACHES A LA SOUDE ET AU BLUESTAR™</u>	5
3. <u>EXTRACTION ORGANIQUE DE L'ADN</u>	5
4. <u>QUANTIFICATION DE L'ADN</u>	7
5. <u>GÉNOTYPAGE DE L'ADN PAR STR</u>	7
RESULTATS.....	8
1. <u>DETERMINATION DU PH DE LA SOLUTION</u>	8
2. <u>DETERMINATION D'EMPREINTES GENETIQUES APRES TRAITEMENT</u> <u>AU BLUESTAR® DE TACHES DE SANG</u>	9
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	11
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	12
ANNEXES.....	13

INTRODUCTION

Sur le lieu présumé d'un crime, la recherche de traces de sang est une mission capitale. Leurs analyses morphologiques, biochimiques, génétiques sont des éléments déterminants lors d'une enquête. Ainsi, le département thanatologie-anthropologie-odontologie (TAO) de l'Institut de recherche criminelle de la gendarmerie nationale (IRCGN) s'intéresse à la morphologie des traces de sang. Les personnels du département empreintes digitales (EDG), quant à eux, révèlent les empreintes digitales présentes dans les traces sanglantes. Enfin, les experts du département biologie (BIO) sont chargés d'analyser toutes les traces biologiques, dont le sang, afin d'en déterminer l'appartenance par détermination des empreintes génétiques et comparaison ultérieure à des profils de référence, dont celui du ou des suspects et de la victime.

Dans le cas où les taches de sang sont encore fraîches et présentes en quantité importante, un examen visuel peut suffire à leur mise en évidence. En pratique, ces traces peuvent être invisibles à l'œil nu (lavage, essuyage du sang), il est donc indispensable de recourir à l'utilisation de produits intensifiants permettant leur visualisation.

Deux grandes catégories de produits existent pour cette révélation :

- ceux qui réagissent avec des protéines et acides aminés contenus dans le fluide biologique (DFO, Amido Black etc.)
- ceux qui révèlent une activité enzymatique (activité de type peroxydase) : Benzidine, Leucomalachite vert (LMV), Leucocrystal violet (LCV), Luminol, Blue star®, Fluorescéine (1).

Certains de ces réactifs ne sont plus utilisés aujourd'hui, soit pour des raisons pratiques (préparation longue et difficile) soit pour des raisons de sécurité (toxicité).

Deux études ont été réalisées à l'IRCGN sur le Leucomalachite vert et le Leucocrystal violet, révélateurs utilisés par le département EDG pour mettre en évidence les empreintes digitales sanglantes. Les auteurs ont montré que l'utilisation de ces deux réactifs ne permettait pas de déterminer des profils génétiques lorsque le sang est en petite quantité (2, 3). Le département biologie s'est donc intéressé à un produit utilisé par le département TAO, à base de luminol, appelé BlueStar™.

Le luminol est un produit connu depuis longtemps. C'est actuellement un des réactifs les plus communément utilisés pour la détection de taches de sang sur une scène de

crime. L'oxydation de ce produit en présence de peroxyde d'hydrogène et d'un catalyseur, tel que le noyau d'hème de l'hémoglobine (activité peroxydase), va émettre une chimiluminescence détectable à l'obscurité. Ainsi, ce procédé chimique permettra de révéler la présence de l'hémoglobine du sang. Par contre, Quickenden et Cooper ont montré que le luminol pouvait produire une chimiluminescence en présence de certains produits ménagers (eau de Javel par exemple) ainsi qu'au contact de l'hémoglobine provenant de sang d'animaux (4, 5). Toutefois, des différences d'intensité, de spectre d'émission et de temps de réaction entre les produits ménagers et le sang permettent de les différencier.

De nombreux auteurs ont cherché à voir si l'utilisation de luminol sur des taches de sang permet l'obtention de profils génétiques. Ainsi, Miller montre qu'il est possible d'extraire de l'ADN après traitement au luminol de taches de sang diluées jusqu'au 1/1000 (6). De même, l'analyse par PCR (Polymerase Chain Reaction) de séquences courtes répétées en tandem (STR) a permis de montrer qu'un traitement au luminol ne compromettait pas l'obtention d'un profil génétique (7, 8, 9).

Le BlueStar™ est un réactif à base de luminol, élaboré par la société ROC IMPORT, et utilisé dans le secteur de la chasse pour la détection de sang de gibier. Il est utilisé à l'IRCGN parce qu'il produit une chimiluminescence plus intense et plus longue que le luminol I et II. Le département TAO s'en sert pour l'étude de la morphologie des taches de sang sur les scènes de crime. Son utilisation pourrait intéresser le département biologie à la condition qu'à la suite de traitement par ce réactif, l'obtention de profils génétiques soit possible.

Cette étude s'est déroulée en deux étapes. Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer une gamme de pH pour laquelle la dégradation de l'ADN du sang est moindre. Au cours de la seconde étape, nous nous sommes intéressés à l'action d'une nouvelle solution de BlueStar™ dont le pH a été adapté, en fonction des premiers résultats analytiques obtenus. Le but final étant de savoir si l'obtention d'un profil génétique est possible après traitement.

MATERIELS ET METHODES

1. Réalisation des taches de sang

Les expériences sont toutes réalisées à partir de sang frais provenant d'un même donneur masculin. Le sang, après prélèvement, est conservé dans des tubes en présence d'un anticoagulant, l'EDTA.

Plusieurs dilutions de sang sont réalisées et chaque échantillon est reproduit 3 fois.

Pour chaque dilution, un volume de 10 μ l est déposé sur du papier Whatman®. Ce papier a été préalablement découpé dans des conditions stériles en petits carrés de 1,4 cm x 1,4 cm. Chaque papier a ensuite été placé dans des racks stériles en plastiques (Amplitype DNA typing Trays, Perkin Elmer) afin de diminuer les risques de contaminations et d'éviter les pertes de matériels par capillarité avec le support.

Une fois déposées, ces taches de sang sont mises à sécher à température ambiante pendant 4 heures.

2. Traitement de ces taches à la soude et au BlueStar™

Un volume de 15 μ l de solution de soude à différentes concentrations et de BlueStar™ préparée extemporanément est déposé, à l'aide d'une micropipette, sur chaque tache de sang de sorte que la solution recouvre la totalité de la tache.

Les taches sont alors soumises à différents temps de traitement (à température ambiante) : 24 heures ; 48 heures ; 7 jours ; 15 jours et 30 jours ainsi que 4 heures et 12 heures uniquement pour un traitement à la soude.

En parallèle, une série de taches non traitées est étudiée.

3. Extraction organique de l'ADN

L'extraction organique (technique du phénol-chloroforme) est effectuée conformément à la méthode d'essai utilisée au département biologie (ME 78).

◆ *Digestion à la protéinase K*

Les taches de sang sont incubées sur la nuit, à 56°C, dans un tampon de digestion enzymatique contenant :

- 400 µl de tampon SEB
- 10 µl de protéinase K à 10 mg/ml (MERCK)
- 16 µl de DTT 1M (Sigma)

Le lendemain, les échantillons sont vortexés et essorés dans des microspins à 12900 g pendant 3 minutes.

◆ *Extraction organique*

- Ajout de 500 µl de Phénol-Chloroforme-Alcool Isoamylique (25:24:1), pH 8, Tris 10 mM, EDTA 1 mM (Sigma)
- Agitation pendant 10 minutes à température ambiante
- Centrifugation durant 5 minutes à 12 000 g
- Prélèvement de la phase supérieure aqueuse
- Ajout de 500 µl de Chloroforme (Sigma)
- Agitation pendant 10 minutes à température ambiante
- Centrifugation 5 minutes à 12 000 g
- Récupération de la phase aqueuse
- Un mélange de 240 µl de NaCl 5 M (Sigma) et de 30 µl de glycogène (ROCHE) est réalisé
- 9 µl de ce mix sont ajoutés dans chaque tube
- Agitation pendant quelques secondes
- Ajout de 1 ml d'éthanol absolu (Carlo Erba) glacé, par tube
- Agitation pendant quelques secondes
- Les échantillons sont placés à – 20°C pendant 4 heures pour permettre la précipitation de l'ADN.
- Centrifugation des tubes pendant 30 minutes à 4°C et à 12900 g
- Le surnageant est éliminé, le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol à 70 % glacé (Carlo Erba)
- Centrifugation des tubes 15 minutes à 4°C et à 12900 g
- Elimination du surnageant
- Les culots sont séchés sous vide pendant 10 minutes à 60 °C
- Les culots sont repris dans 60 µl d'eau stérile
- Les échantillons sont ensuite incubés à 56°C pendant 2 heures
- Stockage des échantillons à –20 °C.

4. **Quantification de l'ADN**

Pour la détermination du pH, L'ADN est quantifié par une méthode courante en criminalistique, le "Dot Blot". La quantification de l'ADN humain est réalisée selon le même protocole indiqué dans le Kit "ACES™ 2.0+ Human DNA quantitation System" (Life technologies).

Le principe consiste en l'hybridation d'une sonde d'oligonucléotide D17Z1 avec des extraits d'ADN immobilisés sur une membrane de nylon. Cette sonde, spécifique de l'ADN humain, reconnaît une région centromérique du chromosome 17. La liaison d'une enzyme conjuguée à la sonde permet une détection par chimiluminescence.

Pour l'étude concernant l'obtention de profils génétiques, l'ADN est quantifié par spectrofluorimétrie. Pour réaliser cette quantification, 20 µl d'ADN sont ajoutés à 180 µl d'une solution contenant du Picogreen®. Chaque échantillon est placé dans un puits individuel, sur une plaque 96 puits. Il est ensuite examiné au spectrofluorimètre.

En parallèle, une gamme contenant 15 échantillons de concentrations différentes est quantifiée (0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 ; 0,9 ; 1 ; 2 ; 3 ; 5 ; 10 nanogramme/microlitre).

5. **Génotypage de l'ADN par STR**

La PCR est un processus enzymatique qui permet, à partir de très petites quantités d'ADN d'amplifier des fragments définis à partir de deux amorces encadrant la région de l'ADN à étudier.

Cette technique utilise les caractéristiques biochimiques de la Taq polymérase : enzyme capable de synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'une matrice d'ADN simple brin et d'une amorce. La réaction PCR consiste en une succession de cycles comprenant trois phases : une phase de dénaturation, une phase d'appariement et une phase d'élongation.

Dans cette étude, des séquences courtes répétées en tandem sont amplifiées par PCR selon le protocole décrit dans le Kit SGM+ (Applied Biosystems).

La PCR est réalisée par coamplification de 11 loci.

Après cette phase, les fragments d'ADN amplifiés sont séparés par électrophorèse dans un capillaire (séquenceur ABI 310 Applied Biosystems). Des marqueurs fluorescents couplés aux amorces permettent de distinguer les différents loci.

RESULTATS

Cette étude a deux objectifs. Dans un premier temps, il s'agit de déterminer une gamme de pH (basique) pour laquelle l'ADN n'est pas ou peu dégradé. A partir de ces résultats, une solution de BlueStar™ sera préparée dans une gamme de pH adaptée. Il faudra ensuite déterminer si l'obtention d'un profil génétique est possible après traitement de taches de sang avec cette même solution de BlueStar™.

1. Détermination du pH de la solution

On se propose d'étudier les effets du pH sur l'ADN. Différentes solutions de NaOH sont testées aux pH suivants:

- | | |
|-------------|-------------|
| - pH = 10 | pH = 12 |
| - pH = 10,5 | pH = 12,5 |
| - pH = 11 | pH = 13 |
| - pH = 11,5 | Eau stérile |

Huit dilutions de sang sont réalisées:

- | | |
|-------------------|-----------|
| - 0 = eau stérile | - 1/500 |
| - 1 = sang pur | - 1/1000 |
| - 1/50 | - 1/5000 |
| - 1/100 | - 1/10000 |

Le dépôt, puis le traitement des taches de sang se fait comme indiqué dans le chapitre "matériels et méthodes".

La quantification se fait par la technique du Dot Blot.

Faute de temps et suite à des problèmes techniques, l'ADN des échantillons traités pendant 7 jours, 15 jours et 30 jours n'a pu être quantifié. Néanmoins, des résultats sont obtenus pour les traitements de 4, 12, 24 et 48 heures (tableaux 1, 2, 3 et 4).

Les résultats pour des traitements de 4 heures et 12 heures ne permettent pas de déterminer un domaine de pH néfaste à l'ADN. En effet, la quantification met en évidence de l'ADN même à pH = 13. Par contre, à 24 et 48 heures, il n'y a pas d'ADN lorsque les échantillons sont traités avec une solution de soude dont le pH est supérieur à 11,5.

En conclusion, un pH supérieur à 11,5 commence à dégrader l'ADN au bout de 24 heures, altération confirmée à 48 heures.

Le pH de la solution de BlueStar™ devra donc se situer entre 10 et 11,5.

2. Détermination d'empreintes génétiques après traitement au BlueStar™ de taches de sang

Suite aux précédents résultats, la société ROC IMPORT a préparé une solution de BlueStar™ dont le **pH final**, mesuré après le mélange, est de **11,4**.

Le but de cette seconde étape est donc de savoir si un traitement de taches de sang par cette nouvelle solution de BlueStar™ permet d'obtenir une empreinte génétique.

Selon le même principe que décrit précédemment, des dilutions de sang sont réalisées :

- Sang non dilué : 1
- 1/10
- 1/50
- 1/100
- 1/1000
- Un témoin négatif d'extraction (eau stérile)

Les taches de sang sont traitées avec cette solution de BlueStar™ préparée à l'aide d'une pastille de H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) ajoutée à un volume de 170 ml de solution. L'ADN est extrait par la méthode organique puis quantifié par spectrofluorimétrie. Le but de la quantification est de déterminer la quantité d'ADN optimale à amplifier par PCR. A cause des limites du spectrofluorimètre (résultats peu fiables en dessous de 0,5ng/μl), 20 μl des échantillons dont la concentration est inférieure à 0.5 nanogramme / microlitre (ng/μl) sont utilisés pour la PCR. Par contre, les échantillons, dont la concentration en ADN est supérieure à 0,5 ng/μl, sont dilués afin que la concentration finale pour la PCR soit de 0,1 ng/μl. Ensuite, 1 μl d'ADN amplifié est utilisé pour le génotypage.

Les résultats du génotypage montrent trois points importants (tableaux 5, 6, 7, 8) :

- Il n'est pas possible d'obtenir une empreinte génétique lorsque la dilution de sang est de 1/1000, et ce, même lorsque le sang n'est pas traité.
- Les profils obtenus suite à un traitement au BlueStar™ sont en accord avec ceux obtenus pour des échantillons non traités (Fig 1 et 2). La fréquence, pour chaque profil, représente la probabilité de retrouver ce même profil dans la population. On s'aperçoit que ces fréquences sont sensiblement les mêmes entre deux échantillons, l'un non traité et l'autre, traité au BlueStar™. Ces résultats sont très importants en criminalistique. En effet l'obtention d'une empreinte génétique fiable (fréquence élevée), même partielle, permet de conclure avec un minimum de risque d'erreur.
- Enfin, les deux résultats précédents sont encore valables au bout de 30 jours de traitement au BlueStar™ (Fig3).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La détermination d'un pH basique idéal pour ne pas dégrader l'ADN a permis, dans un premier temps, à la société ROC IMPORT, de préparer une solution qui pourrait être utile en criminalistique. Cette nouvelle solution de BlueStar™ à pH=11,4 présente beaucoup d'avantages par rapport à une solution de luminol classique. L'intensité de sa luminescence est plus importante, elle perdure plus longtemps et ne nécessite pas l'obscurité totale pour être observée. De plus, ce mélange est plus stable dans le temps et peut encore être utilisé 30 jours après sa préparation. Cette réactivité plus importante pouvait nous faire craindre une possible dégradation de l'ADN suite à son application sur des taches de sang.

En fait, cette étude a clairement démontré qu'un traitement avec cette nouvelle solution de BlueStar™ n'empêche pas l'obtention d'un profil génétique fiable (fréquence élevée). Il est même possible d'obtenir une empreinte génétique à partir de sang dilué au 1/100 (quantité théorique=0,03 ng/μl) au bout de 30 jours de traitement. Ces résultats, très encourageant, rendent ce produit très intéressant pour la criminalistique.

Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires pour tester ce produit de façon plus approfondie. Une expérience portant sur un traitement de plus de 30 jours serait utile. Des dilutions de sang intermédiaires entre 1/100 et 1/1000 devraient être étudiées afin de connaître la quantité limite d'ADN nécessaire pour la détermination d'une empreinte génétique. En parallèle, l'utilisation d'un kit pour la PCR plus sensible (actuellement sur le marché) permettrait également d'obtenir des résultats aussi fiables à des concentrations plus faibles. Enfin, une étude sur d'autres supports, devrait être conduite afin de couvrir le maximum de situations rencontrées sur les scènes de crime.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Budowle B, Leggitt J.L, Defenbaugh D.A, Keys K.M, Malkiewicz S.F, The presumptive Reagent Fluorescein for detection of dilute bloodstains and subsequent STR Typing of recovered DNA. *Journal of Forensic sciences* 2000 ; 45 (5) : 1090-1092.
2. Clause D, Drouet B, Effets des révélateurs d'empreintes digitales dans le sang sur l'exploitation ultérieure d'empreintes génétiques. *Rapport de l'IRCG, département Biologie* 1998-1999
3. Ferard S, Pendino F, Effet de révélateurs de sang sur la réalisation d'empreintes génétiques. *Rapport de l'IRCG, département Biologie* 1999-2000 : 1- 23
4. Quickenden T.I, Cooper P.D. Increasing the specificity of the forensic luminol test for blood. *Luminescence* 2001 ; 16 : 251-253.
5. Quickenden T.I, Cooper P.D. A study of common interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence* 2001 ; 16 : 295-298.
6. Miller k, Réactifs du sang : leur application et leurs effets sur l'analyse génétique. *SREIJ*, ottawa 1998.
7. Gross A-M, Harris K.A, Kaldun G.L. The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase Chain reaction. *Journal of forensic sciences* 1999 ; 44 (4) : 837-840.
8. Manna D A, Montpetit S, A nouvel approach to obtaining reliable PCR results from luminol treated bloodstains. *Journal of forensic Sciences* 2000 : 45; (4) : 886-890.
9. Eikelenboom R, Kloosterman A, Successful DNA STR-typing on luminol visualised bloodstains. Netherlands Forensic Institute.

ANNEXES

PH de la soude Dilution de sang	7	10	10,5	11	11,5	12	12,5	13	Gamme étalon	
	0	—			<0,4	—	<0,2	—		40
1	2	0,4	4	0,4	3	4	4	10	20	0,04
1/50	0,2	0,2	0,2	0,2	—	0,2	—	—	10	T-
1/100	—	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	—	—	4	
1/500	—	<0,2	—	—	—	—	—	—	2	
1/1000	—	—	—	—	—	—	—	—	1	
1/5000	—	—	—	0,2	—	—	—	—	0,4	
1/10000	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	

Tableau 1 : DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ADN PRESENTE APRES TRAITEMENT A LA SOUDE PENDANT 4 HEURES

Les résultats sont exprimés en nanogramme par microlitre (ng/μl) T- = Témoin négatif (-) : Pas d'ADN

PH de la soude Dilution de sang	7	10	10,5	11	11,5	12	12,5	13	Gamme étalon	
0	—								40	0,1
1	<10	10	4	5	10	4	<10	10	20	0,04
1/50	0,4	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	1	10	T-
1/100	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	4	
1/500	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
1/1000	—	—	—	—	—	—	—	—	1	
1/5000	—	—	—	—	—	—	—	—	0,4	
1/10000	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	

Tableau 2 : DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ADN PRESENTE APRES TRAITEMENT A LA SOUDE PENDANT 12 HEURES

Les résultats sont exprimés en nanogramme par microlitre (ng/μl) T- = Témoin négatif (-) : Pas d'ADN

PH de la soude Dilution de sang	7	10	10,5	11	11,5	12	12,5	13	Gamme étalon	
	0	—								40
1	10	10	1	1	1	1	0,4	1	20	0,04
1/50	0,04	0,1	0,1	0,1	0,2	—	—	—	10	T-
1/100	—	—	0,04	0,04	0,1	—	—	—	4	
1/500	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
1/1000	—	—	—	—	—	—	—	—	1	
1/5000	—	—	—	—	—	—	—	—	0,4	
1/10000	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	

Tableau 3 : DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ADN PRESENTE APRES TRAITEMENT A LA SOUDE PENDANT 24 HEURES

Les résultats sont exprimés en nanogramme par microlitre (ng/μl) T- = Témoin négatif (-) : Pas d'ADN

PH de la soude Dilution de sang	7	10	10,5	11	11,5	12	12,5	13	Gamme étalon	
0	—								40	0,1
1	10	10	10	10	10	10	<4	0,4	20	0,04
1/50	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	—	10	T-
1/100	—	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	<0,1	0,04	4	
1/500	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
1/1000	—	—	—	—	—	—	—	—	1	
1/5000	—	—	—	—	—	—	—	—	0,4	
1/10000	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	

Tableau 4 : DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ADN PRESENTE APRES TRAITEMENT A LA SOUDE PENDANT 48 HEURES

Les résultats sont exprimés en nanogramme par microlitre (ng/μl) T- = Témoin négatif (-) : Pas d'ADN

TABLEAU 5 – Traitement au BlueStar™ pendant 24 heures														
Profil génétique de chaque échantillon et sa fréquence														
LOCI	ECHANTILLONS NON TRAITES						TRAITEMENT BLUESTAR™							
Dilutions de sang	0	1	1/10	1/50	1/100	1/1000	0	1	1/10	1/50 (4)	1/100	1/1000		
D3S1358	Témoins négatifs d'extraction : pas de profil génétique	15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 - 16	15	Témoins négatifs d'extraction : pas de profil génétique	15 - 16	15 - 16 (1)	15	15 - 16 (1)	ND		
vWA		19 - 19	19 - 19	19 - 19	19 - 19	19		19 - 19	19 - 19	19 - 19	19 - 19	19 - 19	ND	
D16S539		11 - 12	11 - 12	11 - 12	11 - 12	ND		11 - 12	11 - 12	11 (2)	11 - 12	11 - 12	ND	
D2S1338		18 - 25	18 - 25	18 - 25	18 - 25	ND		18 - 25	18 - 25	ND	18 - 25	18 - 25	ND	
Amélogénine		X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	X - Y		X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	X - Y
D8S1179		9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10		9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	ND
D21S11		29 - 29	29 - 29	29 - 29	29 - 29	29 - 29		ND	29 - 29	29 - 29	29 - 33 (3)	29 - 29	29 - 29	29 - 29
D18S51		15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 - 16		ND	15 - 16	15 - 16	14 (3)	15 - 16	15 - 16	ND
D19S433		14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14		14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	ND
THO1		9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3		ND	9 - 9.3	9 - 9.3	9 (2)	9 - 9.3	9 - 9.3	ND
FGA		19 - 20	19 - 20	19 - 20	19 - 20	19 - 20		ND	19 - 20	19 - 20	ND	19 - 20	19 - 20	ND
1/Fréquence		8,20437E+14						47977,57	8,20437E+14			47490.286	8,2E+14	24,02922
1/Fréquence = Probabilité de retrouver le même profil dans la population. ND = Non Déterminé (19 - 20) = Allèles présents au niveau du locus. Si deux allèles sont différents = hétérozygotes. S'ils sont identiques = homozygotes.														
Remarque : Tous les pics d'intensité > 75 RFU ont été sélectionnés.														
(1) Profil 15 - 16 majoritaire. Présence de 2 pics artéfactuels minoritaires non significatifs (14 - 17). (Effet stochastique). (2) Profil partiel (3) Pic artéfactuel. (4) La différence observée entre l'échantillon traité et non traité n'est pas dû à l'action du BlueStar, mais à la quantité initiale de matériel biologique déposée. Cette remarque est confirmée par le fait que l'échantillon au 1/100 traité donne un profil identique à l'échantillon non traité.														

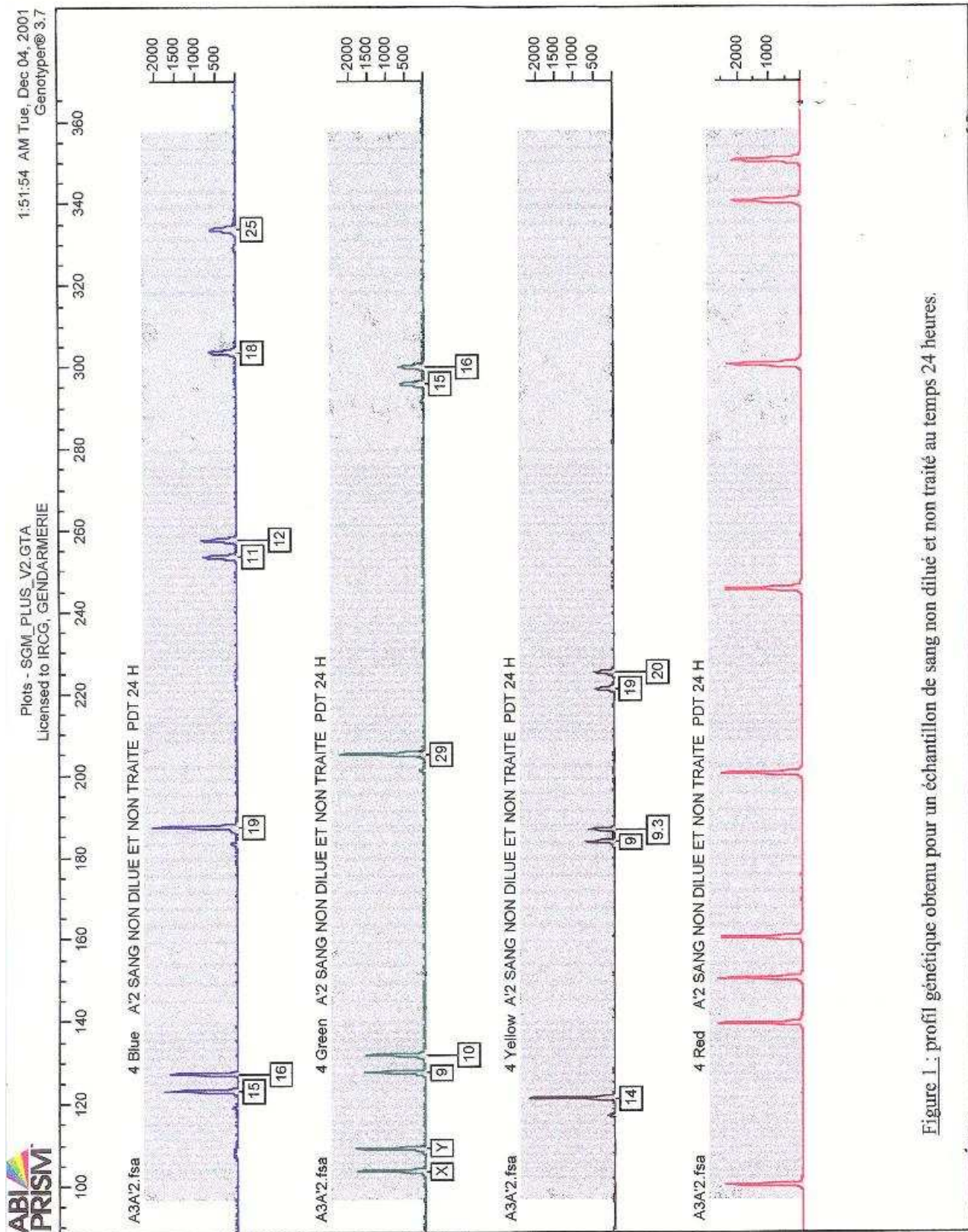


Figure 1 : profil génétique obtenu pour un échantillon de sang non dilué et non traité au temps 24 heures.

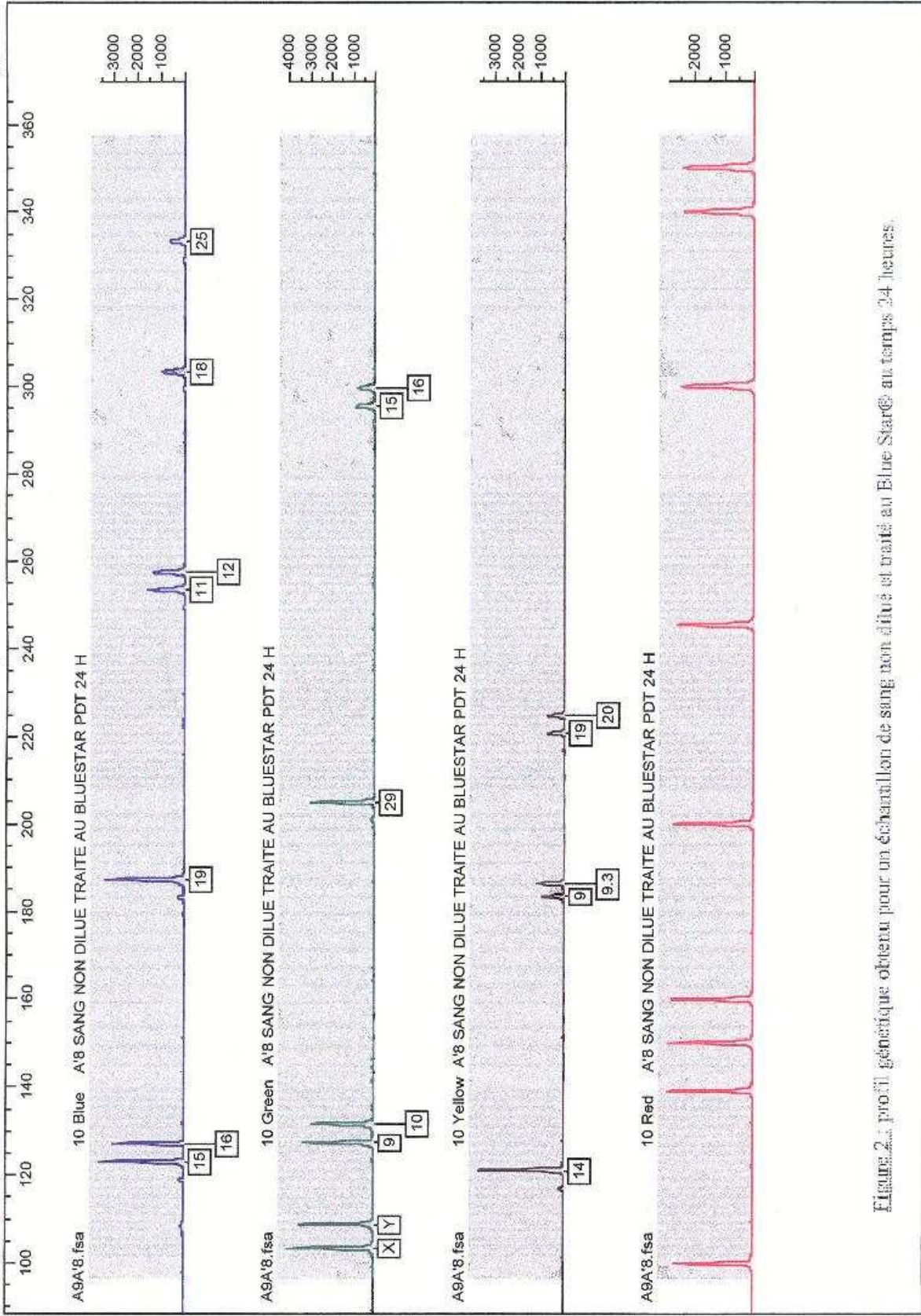


Figure 2.1 profil génétique obtenu pour un échantillon de sang non dilué et traité au Blue Star® au temps 24 heures.

TABLEAU 6 – Traitement au BlueStar™ pendant 48 heures												
Profil génétique de chaque échantillon et sa fréquence												
LOCI	ECHANTILLONS NON TRAITES						TRAITEMENT BLUESTAR™					
Dilutions de sang	0	1	1/10	1/50	1/100	1/1000	0	1	1/10	1/50 (4)	1/100	1/1000
D3S1358	Témoïn négatif d'extraction : pas de profil génétique	15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 (1)	ND	Témoïn négatif d'extraction : pas de profil génétique	15 - 16	15 - 16	15	15 - 16 - 17 (2)	ND
vWA		19 - 19	19 - 19	19 - 19	19 - 19	19		19 - 19	19 - 19	19 - 19	18 - 19	ND
D16S539		11 - 12	11 - 12	11 - 12	11 - 12	ND		11 - 12	11 - 12	11 - 12	11 - 12	ND
D2S1338		18 - 25	18 - 25	18 - 25	18 - 25	ND		18 - 25	18 - 25	18 - 25	18 - 25	ND
Amélogénine		X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	X - Y		X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	ND
D8S1179		9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	ND		9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	ND
D21S11		29 - 29	29 - 29	29 - 29	29 - 29	ND		29 - 29	29 - 29	29 - 29	29 - 29	ND
D18S51		15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 - 16	ND		15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 (1)	ND
D19S433		14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	ND		14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	ND
THO1		9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	ND		9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	ND
FGA		19 - 20	19 - 20	19 - 20	ND	ND		19 - 20	19 - 20	19 - 20	ND	ND
1/Fréquence		8,20437E+14			3,16E+12	145,1589		8,20437E+14			4,3E+11	1
1/Fréquence = Probabilité de retrouver le même profil dans la population. ND = Non Déterminé (19 - 20) = Allèles présents au niveau du locus. Si deux allèles sont différents = hétérozygotes. S'ils sont identiques = homozygotes.												
Remarque : Tous les pics d'intensité > 75 RFU ont été sélectionnés.												
(1) Profil partiel dû à la faible quantité de matériel biologique. (2) Pic artéfactuel.												

TABLEAU 7 – Traitement au BlueStar™ pendant 7 jours														
Profil génétique de chaque échantillon et sa fréquence														
LOCI	ECHANTILLONS NON TRAITES						TRAITEMENT BLUESTAR™							
Dilutions de sang	0	1	1/10	1/50	1/100	1/1000	0	1	1/10	1/50 (4)	1/100	1/1000		
D3S1358	Témoins négatifs d'extraction : pas de profil génétique	15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 - 16	15	Témoins négatifs d'extraction : pas de profil génétique	15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 (1)	ND		
vWA		19 - 19	19 - 19	19 - 19	19 - 19	ND		19 - 19	19 - 19	19 - 19	19 - 19	19 - 19	ND	
D16S539		11 - 12	11 - 12	11 - 12	11 - 12	ND		11 - 12	11 - 12	11 - 12	11 - 12	12 (1)	ND	
D2S1338		18 - 25	18 - 25	18 - 25	18 - 25	18		18 - 25	18 - 25	18 - 25	18 - 25	25 (1)	ND	
Amélogénine		X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	ND		X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	
D8S1179		9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	ND		9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	9	
D21S11		29 - 29	29 - 29	29 - 29	29 - 29	ND		29 - 29	29 - 29	29 - 29	29 - 29	29 - 29	29 - 29	ND
D18S51		15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 - 16	ND		15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 - 16	ND	ND	
D19S433		14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	ND		14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	ND
THO1		9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	ND		9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	ND
FGA		19 - 20	19 - 20	19 - 20	19 - 20	ND		19 - 20	19 - 20	19 - 20	19 - 20	19 - 20	19 - 20	ND
1/Fréquence		8,20437E+14				15,684798		8,20437E+14				1,385E+11	45,454545	
1/Fréquence = Probabilité de retrouver le même profil dans la population. ND = Non Déterminé (19 - 20) = Allèles présents au niveau du locus. Si deux allèles sont différents = hétérozygotes. S'ils sont identiques = homozygotes.														
Remarque : Tous les pics d'intensité > 75 RFU ont été sélectionnés.														
(1) Profil partiel dû à la présence d'ADN et/ou à la faible quantité d'ADN.														

TABLEAU 8 – Traitement au BlueStar™ pendant 15 jours												
Profil génétique de chaque échantillon et sa fréquence												
LOCI	ECHANTILLONS NON TRAITES						TRAITEMENT BLUESTAR™					
Dilutions de sang	0	1	1/10	1/50	1/100	1/1000	0	1	1/10	1/50 (4)	1/100	1/1000
D3S1358	Témoins négatifs d'extraction : pas de profil génétique	15 - 16	15 - 16	15 (1)	15 (1)	ND	Témoins négatifs d'extraction : pas de profil génétique	15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 - 16	ND
vWA		19 - 19	19 - 19	19 - 19	19 - 19	ND		19 - 19	19 - 19	19 - 19	19 - 19	ND
D16S539		11 - 12	11 - 12	11 - 12	11 - 12	ND		11 - 12	11 - 12	11 - 12	11 - 12	ND
D2S1338		18 - 25	18 - 25	18 - 25	18 - 25	ND		18 - 25	18 - 25	18 - 25	(1)	ND
Amélogénine		X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	ND		X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	ND
D8S1179		9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	ND		9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	ND
D21S11		29 - 29	29 - 29	29 - 29	29 - 29	ND		29 - 29	29 - 29	29 - 29	29 - 29	ND
D18S51		15 - 16	15 - 16	15 - 16	(1)	ND		15 - 16	15 - 16	15 - 16	(1)	ND
D19S433		14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	ND		14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	ND
THO1		9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	ND		9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	ND
FGA		19 - 20	19 - 20	19 - 20	19 - 20	ND		19 - 20	19 - 20	19 - 20	(1)	ND
1/Fréquence		8,20437E+14				1,56E+09		1	8,20437E+14			
1/Fréquence = Probabilité de retrouver le même profil dans la population. ND = Non Déterminé (19 - 20) = Allèles présents au niveau du locus. Si deux allèles sont différents = hétérozygotes. S'ils sont identiques = homozygotes.												
Remarque : Tous les pics d'intensité > 75 RFU ont été sélectionnés.												
(1) Profil partiel dû à la présence d'ADN et/ou à la faible quantité d'ADN.												

TABLEAU 9 – Traitement au BlueStar™ pendant 30 jours													
Profil génétique de chaque échantillon et sa fréquence													
LOCI	ECHANTILLONS NON TRAITES						TRAITEMENT BLUESTAR™						
Dilutions de sang	0	1	1/10	1/50	1/100	1/1000	0	1	1/10	1/50 (4)	1/100	1/1000	
D3S1358	Témoïn négatif d'extraction : pas de profil génétique	15 - 16	ND	ND	15	ND	Témoïn négatif d'extraction : pas de profil génétique	15 - 16	15 - 16	ND	15 - 16	ND	
vWA		19 - 19	ND	19 - 19	19 - 19	ND		19 - 19	19 - 19	19 - 19	19 - 19	19 - 19	ND
D16S539		11 - 12	ND	11 - 12	11	ND		11 - 12	11 - 12	11 - 12	11 - 12	11 - 12	12
D2S1338		18 - 25	ND	ND	18	ND		18 - 25	18 - 25	18 - 25	18 - 25	18 - 25	ND
Amélogénine		X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	ND		X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	ND
D8S1179		9 - 10	9	9 - 10	9 - 10	ND		9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	9 - 10	ND
D21S11		29 - 29	ND	29 - 35	29 - 29	ND		29 - 29	29 - 29	29 - 29	29 - 29	29 - 29	ND
D18S51		15 - 16	ND	ND	ND	ND		15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 - 16	15 - 16	ND
D19S433		14 - 14	ND	14 - 14	14 - 14	ND		14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	14 - 14	ND
THO1		9 - 9.3	ND	ND	9 - 9.3	ND		9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	9 - 9.3	ND
FGA		19 - 20	ND	ND	19 - 20	ND		19 - 20	19 - 20	ND	19 - 20	19 - 20	ND
1/Fréquence		3,378E+22	45,454545	7441369.3	2,205E+11	1		8,20437E+14	5,912E+10	8,20437E+14	1,6556291		
<p>1/Fréquence = Probabilité de retrouver le même profil dans la population. ND = Non Déterminé (19 - 20) = Allèles présents au niveau du locus. Si deux allèles sont différents = hétérozygotes. S'ils sont identiques = homozygotes.</p>													
Remarque : Tous les pics d'intensité > 75 RFU ont été sélectionnés. Les différences observées sont uniquement liées aux échantillons.													

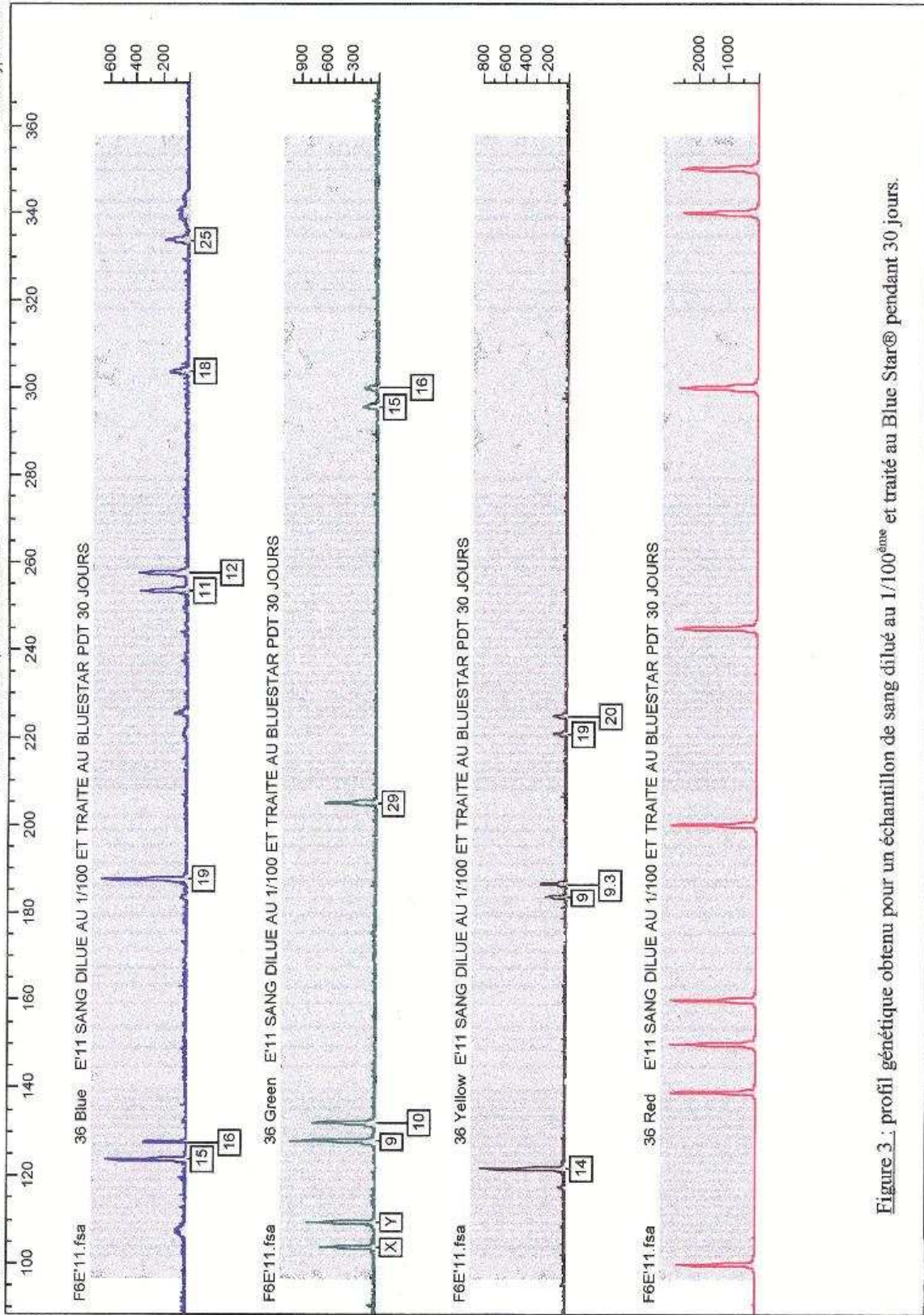


Figure 3 : profil génétique obtenu pour un échantillon de sang dilué au 1/100^{ème} et traité au Blue Star® pendant 30 jours.