A mentionner enfin qu'il y a souvent intérêt, dans les affaires où des textes dactylographiés sont en cause, à séquestrer la ou les machines à écrire suspectes pour éviter toutes modifications ultérieures et permettre l'examen technique de leurs mécanismes. Certaines machines présentent en effet des irrégularités dans l'entraînement du papier, dans l'entraînement du ruban, etc., qui peuvent avoir des effets très caractéristiques et donc fournir des éléments d'identification de grande valeur. Or, de telles défectuosités typiques disparaissent forcément par un simple réglage.

Pratiquant l'expertise en écritures et enseignant sa technique d'application depuis bientôt quarante ans, nous croyons être bien placé pour juger de la valeur réelle de ce mode de preuve. On nous permettra donc de dire, en conclusion de ce travail, que, si les magistrats qui ordonnent la vérification par comparaison d'écritures veulent bien s'efforcer de réaliser dans chaque cas les conditions optimum de son application en mettant l'expert dans les meilleures conditions de travail possibles, ils réduiront automatiquement au minimum les risques d'erreur et contribueront efficacement à la réhabilitation d'un mode de preuve qui, en lui-même, ne mérite pas la défiance dont, trop souvent, on fait preuve à son égard.

LES MÉTHODES ACTUELLES D'IDENTIFICATION DU SPERME. LEUR VALEUR

par les Docteurs A. J. Chaumont et E. Weil

de l'Institut de Médecine légale et de Médecine sociale (directeur: professeur C. Simonin), Strasbourg

Dans les affaires d'attentats aux mœurs, le laboratoire de médecine légale est souvent appelé à donner son opinion sur l'origine d'une tache suspecte.

Le produit biologique le plus caractéristique en pareil cas est le sperme. Sa mise en évidence sur la culotte d'une fillette, par exemple [1], est hautement significative.

Il est possible d'effectuer, à l'heure actuelle, pour la recherche du sperme, toute une série d'épreuves délicates, basées sur la mise en évidence de tel ou tel constituant de cette sécrétion. Le seul typique est le spermatozoïde, élément reproducteur mâle visible au microscope dans certaines conditions techniques. Au point de vue chimique, si on considère la composition moyenne du sperme: albumines coagulables ou non par la chaleur, nucléoprotéines, bases azotées, lipides, sels minéraux et diastases, il ne semble pas à première vue y exister de substances vraiment caractéristiques, c'est-à-dire impossibles à rencontrer dans aucun autre produit. On voit immédiatement les difficultés du diagnostic et on comprend que ce chapitre de la médecine légale soit en constant remaniement.

A côté des méthodes anciennes de recherche, modifiées et perfectionnées, d'autres techniques physico-chimiques, histologiques ou biologiques variées ont été proposées récem-

[1] *Cf.* C. Simonin, *Précis de Médecine légale judiciaire*, 3e éd., Maloine éd., Paris 1955, Expertise n° 64.

ment. Une mise au point critique sur cette question présente donc un grand intérêt.

Méthodes physiques

Découverte en 1915 par Heller, la fluorescence blanc-bleuâtre des taches de sperme à la lumière ultra-violette filtrée, permet un dépistage rapide, sensible mais non spécifique. Un grand nombre de substances protéiques donnent lieu au même phénomène, mais comme le font remarquer Ponthus et Husson, seul le sperme présente un spectre de fluorescence continu situé entre 4900 et 4000 Å. Ce spectre se distingue ainsi de celui des autres produits organiques tels que l'urine, la salive, etc., ce qui pourrait lui conférer un caractère spécifique. Ce dernier point est contesté par divers auteurs (Dheré); des études sont actuellement poursuivies au laboratoire, à l'aide du spectrophotomètre pour déterminer la valeur de la technique et constater si elle est utilisable dans la pratique.

Méthodes chimiques

1. *Réactions microcristallographiques.*

On trouve proposées, dans la littérature médico-légale, un grand nombre de réactions microcristallines du sperme ; la multiplicité des réactifs, tour à tour en vogue dans les laboratoires, indique à elle seule l'incertitude des techniques.

L'une d'elles, la *réaction de Florence*, décrite dès 1896, trouve encore sa place dans tous les ouvrages classiques. On sait qu'il suffit d'humecter la tache suspecte avec de l'eau distillée et de mettre en contact l'extrait ainsi obtenu avec une solution iodo-iodurée diluée et froide. L'examen microscopique révèle des cristaux jaunes ou bruns, rhomboédriques, souvent analogues comme aspect aux cristaux de Teichman qui servent à l'identification du sang, mais qui n'en ont pas la constitution chimique, puisqu'il s'agit d'un periodure de choline et non de chlorhydrate d'hématine.

La réaction est facile à exécuter à condition d'utiliser un réactif conservé au frais. Malgré cette précaution, il existe de nombreux échecs; la cristallisation est loin de présenter un caractère uniforme et spécifique du sperme, pas plus d'ailleurs que la modification introduite par Peltzer [1]. En effet, le mucus nasal, les crachats, le mucus vaginal, le jaune d'œuf entre autres, grâce à leurs dérivés choliniques complexes, sont susceptibles de fournir une réaction positive. Struve a pu démontrer que de nombreuses substances, la bétaïne, la muscarine et la sinalbine donnaient facilement des combinaisons cristallisées avec l'iode. Dans la plupart des cas, il est vrai, un traitement chlorhydrique préalable est nécessaire, mais non pas toujours indispensable pour libérer la choline de ses complexes. Il n'est toutefois pas exclu que cette scission ne puisse s'effectuer dans d'autres conditions, telle une saponification alcaline par lavage au savon d'une tache provenant d'une des substances précédentes. Ce fait enlève évidemment toute spécificité à la réaction.

Il était logique d'essayer de mettre en évidence la *spermine*, base azotée importante du sperme. Barberio la caractérise sous forme de picrate en traitant l'extrait aqueux de la tache par une solution saturée à froid et filtrée d'acide picrique. Les cristaux jaunes ainsi obtenus présentent malheureusement des aspects fort variables rendant leur identification incertaine; par ailleurs, la cristallisation propre du réactif n'est nullement exclue et interfère fréquemment de façon gênante.

Guarino s'est servi dans le même but de l'acide styphnique, trinitro dérivé du résor-

[1] *Cf.* Gradwohl, *Legal Medicine*, Mosby Co., Saint-Louis, 1954.

cinol. Il s'agit d'une réaction classique des amines donnant naissance dans le cas de la spermine à une double cristallisation typique: cristaux α vert-jaune piniformes et cristaux β jaunes arborescents et émoussés.

Puranen traite l'extrait aqueux de la tache au moyen d'une solution neutre ou légèrement alcaline de *jaune naphtol S*[1]. Les cristaux jaunes de *flavianate de spermine* qui se forment dans ces conditions sont d'allure caractéristique soit en forme de croix oblique ou d'aiguilles à angles rentrants (aspect « en queue de pie »).

La réaction offrirait une double spécificité: tout d'abord l'extraction aqueuse, premier temps de la technique de Puranen, ne solubilise la spermine que s'il s'agit de sperme. En effet, si on peut rencontrer cette tétramine aliphatique ailleurs que dans le liquide séminal, par exemple dans le pancréas, le foie, la levure de bière, son extraction à partir de ces substances exige un traitement chlorhydrique préalable. La salive, le mucus vaginal ou nasal, l'urine et le lait, les sécrétions ou excrétions, qu'elles soient normales ou pathologiques, ne donnent pas la réaction. Selon Berg, d'autre part, seul le sperme d'origine humaine donnerait une réaction de Puranen positive. Avec le sperme animal, notamment celui de taureau, il n'y a pas formation de cristaux.

Il semble donc à l'heure actuelle qu'il s'agisse là d'une des meilleures réactions chimiques d'identification du sperme. L'aspect microcristallographique typique qu'il faut compléter à notre avis par une détermination du point de fusion (240°), nous paraît offrir de sérieuses garanties. La grande valeur de la réaction de Puranen réside dans sa spécificité due à la fois à l'extraction en milieu aqueux et à l'isolement des cristaux de flavianate de spermine. Il est à noter d'autre part qu'elle se montre également positive dans les cas d'azoospermie.

Quant à la réaction proposée par Niederland, l'auteur la considère lui-même comme non caractéristique et précise qu'il est indispensable d'effectuer en même temps la réaction de Florence. En effet, les cristaux obtenus à l'aide du réactif proposé (acide sulfurique à 3 %) sont constitués par du sulfate de calcium, cation universellement répandu dans la nature et nullement spécifique du sperme. Nous ne voyons pas l'intérêt de compléter cette méthode avec celle de Florence; elle n'apporte guère plus de certitude puisque le calcium et la choline ne sont pas spécifiques. Par contre, elle possède l'avantage de se montrer positive même au bout d'un délai très long (plus de trente années suivant l'auteur) en raison de l'indestructibilité de l'élément alcalino-terreux par le vieillissement. On peut donc considérer cette réaction comme une technique d'orientation précieuse, surtout pour de vieilles taches.

2. *Réactions diastasiques.*

Les enzymes constituent des éléments normaux et indispensables de toute cellule vivante et de nombreux liquides biologiques. C'est ainsi que le sperme renferme une hyaluronidase, glucidase mucinolytique, capable de faciliter la fécondation par « lyse » des cellules de la couche externe de l'ovule. Une histaminase a également pu être décelée dans ce liquide et a fait l'objet d'une étude enzymologique. Mais la relative difficulté d'un procédé vraiment pratique de dosage rend celui-ci inutilisable pour le diagnostic. Il n'en est pas de même des glucidases d'esters d'acides minéraux, plus spécialement des phosphomonoestérases également présentes dans le sperme. Ces enzymes du groupe des hydro-

[1] Jaune naphtol S 5,0; eau distillée q.s.p. 100,0. Neutraliser uniquement à la soude.

lases agissent par rupture d'un substrat spécifique constitué par des monoesters orthophosphoriques. Or le sperme ou plus exactement le liquide prostatique renferme une *phosphatase II* dite *acide* dont l'activité se manifeste essentiellement à des Ph situés entre 5 et 5,6. Sa mise en évidence ainsi que son dosage n'offrent aucune difficulté.

Walker a mis au point un procédé rapide basé sur la technique histochimique de Seligman et Manheimer et convenant à des recherches médico-légales. La partie suspecte de la tache, décelée si nécessaire à la lumière de Wood, est immergée dans une solution tampon à Ph 5 renfermant du naphtylphosphate de calcium comme substrat et du chlorure d'anthraquinone 1-diazonium.

La phosphatase acide présente dans le sperme agit dans ces conditions sur l'ester phosphorique et libère le naphtol qui réagit immédiatement sur le sel de diazonium en formant un colorant diazo rouge-orangé insoluble et adhérent au support. Le même résultat peut être obtenu grâce à la méthode des empreintes sur papier buvard.

Cette réaction *qualitative* offre l'avantage de mettre en évidence l'activité phosphatasique. Elle permet une localisation et une recherche ultérieure des spermatozoïdes qui, malgré le traitement, restent intacts et non colorés par le réactif.

Plus récemment, a été préconisée l'utilisation du chlorhydrate de dianisyltetrazonium à la place du dérivé anthraquinonique; la coloration finale bleu-violette en présence de naphtylphosphate semble plus facile à discerner.

Le sperme a une très forte teneur en phosphatase acide, en moyenne 2500 unités King Armstrong, beaucoup plus que d'autres liquides. On a donc songé à réaliser un test pratiquement spécifique en dosant *quantitativement* l'enzyme. Ce dosage comprend une extraction à l'eau physiologique de la tache sèche, puis une détermination du pouvoir diastasique sur une partie aliquote de l'extrait obtenu agissant sur du phénylphosphate pendant une heure dans des conditions bien déterminées. Le phénol libéré du substrat est dosé par colorimétrie. Les résultats sont exprimés en centimètres cubes et rapportés à l'unité de surface. Traités de cette façon, la plupart des liquides biologiques ou alimentaires présentent une activité inférieure à 5 unités King Armstrong. Seul le sperme a un pouvoir enzymatique plus intense. Après de nombreux essais effectués sur des taches de différents produits (urine, salive, sang, jus de fruits, lait) Kaye estime qu'un taux minimum de 25 unités King Armstrong par centimètre cube et pour une surface de 1 cm^2 environ est caractéristique du sperme.

Néanmoins, en raison de leur plus ou moins grande sensibilité à l'égard de certains inhibiteurs, il nous semble plus spécifique d'effectuer une réaction témoin en bloquant la diastase. Cette manière d'opérer éliminerait d'emblée les causes d'erreur dues aux phosphatases acides de type différent (phosphatase III végétale et phosphatase IV des hématies). La différence obtenue entre dosage témoin (après inhibition) et dosage total proprement dit représenterait l'activité phosphatasique II qui sera alors exprimée en unités diastases. Là encore il semble indispensable de s'en tenir à une seule et unique technique précise puisque l'application d'une méthode différente, faite dans des conditions dissemblables, est susceptible de fournir des résultats difficilement comparables. Peut-être y a-t-il lieu également de s'assurer que la tache suspecte n'est pas constituée par du sérum provenant d'un cancéreux de la prostate, sérum caractérisé par une élévation du taux phosphatasique. Il s'agit là de cas exceptionnels il est vrai, et dont l'élimination ne

doit guère présenter de difficultés grâce aux réactions microcristallographiques.

Malgré ces restrictions à faire sur les réactions diastasiques, il n'en reste pas moins qu'elles peuvent apporter au diagnostic une contribution très sérieuse, à condition qu'on ne se contente pas de la réaction colorée, malgré sa rapidité et son intensité, et qu'on y ajoute le dosage de l'enzyme.

Méthodes histologiques

Seules les méthodes histologiques permettent en pratique un diagnostic de certitude dans l'identification du sperme. Mais on rencontre de nombreuses difficultés pour leur exécution correcte: manipulations nombreuses, longues et fastidieuses, mais toujours indispensables, raréfaction si ce n'est disparition des spermatozoïdes par la dissociation des fibres lorsqu'il s'agit d'un tissu souillé et le lavage de l'excès de colorant. Il n'est donc nullement étonnant que de multiples techniques aient été utilisées, leur différence portant essentiellement sur le choix de colorants électifs pour les éléments figurés situés sur les fibres et le traitement du support.

A première vue, il semble que la destruction du support constitue un procédé de choix; or, malgré la résistance des spermatozoïdes aux divers agents chimiques préconisés (liqueur de Schweitzer — d'ailleurs utilisable que pour un support cellulosique, acide sulfurique), il est très souvent impossible de conserver les queues, parties les plus fragiles de la cellule. Aussi la plupart des auteurs donnent-ils leur préférence aux procédés mécaniques de dilacération des fibres du support tout en faisant observer la relative brutalité de la méthode si elle n'est pas exécutée de manière délicate et minutieuse.

Corin et Stockis traitent les fibres suspectes par l'érythrosine ammoniacale, colorant électif, puis les dilacèrent. L'examen microscopique permet de déceler les spermatozoïdes par leurs têtes colorées en rouge; l'observation des queues exige qu'on diaphragme fortement la préparation.

La méthode de Dervieux consiste essentiellement en une surcoloration par rapport à la technique précédente. La dissociation s'effectue après passage successif dans le réactif de Corin et Stockis puis dans le bleu de méthylène. Ceci présente l'avantage de colorer également les fouets des cellules en bleu alors que les têtes présentent une teinte violette (action de l'érythrosine rouge sur le bleu de méthylène).

Baecchi utilise un mélange colorant préparé avec de la fuchsine acide et du bleu de méthylène en solution chlorhydrique. Dans ces conditions, les têtes se colorent en rouge et les flagelles en bleu, ce qui permet une bonne différenciation.

Une modification particulièrement intéressante a été introduite par Fourcade qui fixe sur la lame les spermatozoïdes grâce à une solution albumineuse à 1 %. La coloration s'effectue ensuite au glychémalun de Carazzi. Cette nouvelle technique permet de garder intacts les spermatozoïdes. La coloration violette est très nette.

La méthode de Muller et Guidoux, parue en 1954, est basée sur un « enrichissement » de la tache par une fixation préalable pendant dix minutes dans du formol acétique. La coloration préconisée est celle de Corin et Stockis. Ce procédé rend la recherche moins longue et évite dans une certaine mesure l'entraînement et donc la raréfaction ou même la disparition complète des spermatozoïdes par a dissociation et le lavage. Par contre les résultats sont moins intéressants lorsqu'il s'agit de fibres textiles artificielles (rayonne).

TABLEAU COMPARATIF DES MÉTHODES D'IDENTIFICATION DU SPERME

RÉACTIFS réactions ou procédés	SUBSTANCES ou éléments caractérisés	RÉSULTATS	SPÉCIFICITÉ	CAUSES D'ERREURS
		MÉTHODES PHYSIQUES		
Examen aux rayons U.V.		Fluorescence blanc-bleuâtre	nulle	salive, mucus, pus, amidon
Spectrographie		Spectre d'absorption continu de 4000 à 4900 Å avec maximum à 4200 Å	semble bonne	
		MÉTHODES CHIMIQUES a) *microcristallographiques*		
Florence	choline	Periodure de choline	nulle	autres amines, choline de la lécithine, extraits de champignons, céréales, oignons, salive, sécrétion vaginale
Niederland	calcium	Sulfate de calcium	nulle	l'élément caractérisé est universellement répandu
Barberio	spermine	Picrate de spermine	bonne	cristallisation variable, peu fidèle, peu sensible
Guarino	spermine	Styphnate de spermine	bonne	
Puranen	spermine	Flavianate de spermine	très bonne	peu de causes d'erreurs si extraction en milieu aqueux et caractérisation physico-chimique des cristaux
		b) *diastasiques*		
Walker	phosphomonoestérase	Coloration rouge orangé d'un diazoïque	moyenne	
Kaye	phosphomonoestérase	Dosage du phénol libéré	bonne	taux significatifs $\geq$ 25 unités King Armstrong par cm^3/cm^2
		MÉTHODES HISTOLOGIQUES		
Corin et Stockis	spermatozoïdes	Aspect caractéristique (tête et queue)	parfaite	azoospermie, confusion possible avec spores de champignons si absence de queue. Echecs fréquents avec tissus artificiels
Dervieux	id.	id.	id.	
Fourcade	id.	id.	id.	
Baecchi	id.	id.	id.	
Muller et Guidoux	id.	id.	id.	
Microscopie à contraste de phase	id.	id.	id.	méthode délicate
		MÉTHODES BIOLOGIQUES		
Sérums précipitants	albumines	précipité blanc	moyenne	albumines du sang
Anaphylaxie	id.	réaction déchaînante	bonne	exige au minimum 0,5 cm^3 de sperme.

Les divers inconvénients des méthodes de coloration que nous venons de signaler peuvent être surmontés en s'adressant à l'*examen microscopique à contraste de phase*. Avec de l'expérience et de l'habitude il est ainsi possible de reconnaître les spermies sans aucune préparation, après simple dilacération du tissu. Sur d'autres supports non dissociables, une recherche à l'épimicroscope (Ultropak Leitz) peut conduire à des résultats satisfaisants.

Tous les procédés cités ont leur valeur et ont été éprouvés par la pratique médico-légale. Il est difficile de donner sa préférence à l'un ou l'autre. Tout au plus peut-on avancer que la fixation préalable aboutit à des succès plus nombreux.

Malheureusement, toutes ces méthodes échouent en cas d'azoospermie, écueil insurmontable pour toutes les recherches histologiques.

Méthodes biologiques

Farnum, en 1902, a été le premier à appliquer au sperme la méthode des sérums précipitants, dérivée de celle des taches de sang. A l'aide d'un sérum de lapin « antisperme », il est possible d'obtenir une précipitation sous forme d'un anneau blanc avec le liquide de macération de la tache. La méthode est sensible mais non spécifique, car l'albumine sérique donne lieu au même phénomène.

Par ailleurs, le pouvoir sensibilisant de l'albumine du sperme peut être utilisé (méthode anaphylactique). L'injection intracardiaque du liquide de macération d'une tache de sperme aboutit à une manifestation anaphylactique (réaction déchaînante) chez le cobaye sensibilisé par une injection antérieure de sperme. Contrôlée par rapport à des animaux témoins, la réaction déchaînante permet de conclure à la présence de sperme; elle est donc spécifique, mais ne se manifeste qu'à condition qu'une dose minima de 0,5 cm³ ait été injectée.

* * *

En conclusion de cette étude, nous estimons que le seul aspect morphologique révélé par les réactions microcristallographiques s'avère souvent insuffisant pour caractériser le sperme et qu'il conviendrait d'y ajouter la détermination de certaines propriétés physiques constantes comme le point de fusion, ainsi que des essais de solubilité dans différents solvants. De cette manière, il sera possible de se rendre compte si effectivement on se trouve en présence d'un corps défini tel le flavianate de spermine par exemple.

Lorsque la recherche histologique amenant un diagnostic de certitude échoue pour une raison ou une autre, il paraît souhaitable de pratiquer à la fois les réactions de Florence et de Puranen complétées par une analyse physico-chimique précise des cristaux obtenus, et d'effectuer une analyse spectrographique de la tache initiale précédée par le test de Walker. La présence à la fois de la choline, de la spermine extraite en milieu aqueux, de la phosphatase acide ainsi que l'aspect caractéristique de la courbe avec son maximum à 4200 Å sont de très sérieux éléments en faveur d'un diagnostic positif de sperme. De toute manière ces derniers examens restent les seuls possibles en cas d'azoospermie.