



HAL
open science

Les empreintes génétiques en médecine légale

Céline Bry

► **To cite this version:**

Céline Bry. Les empreintes génétiques en médecine légale. Sciences pharmaceutiques. 1999. dumas-01598219

HAL Id: dumas-01598219

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01598219>

Submitted on 29 Sep 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1^{er} exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

ANNEE 1999

n°: 7036

LES EMPREINTES GENETIQUES EN
MEDECINE LEGALE

THESE PRESENTEE POUR
L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

CELINE BRY

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 10 SEPTEMBRE 1999 A 18 H.
DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

- ◆ Monsieur le Professeur Favier - Président du jury -
- ◆ Madame le Docteur Amblard.
- ◆ Madame Marka - Maître de conférence universitaire- Praticien Hospitalier-
- Directeur de thèse -

REMERCIEMENTS :

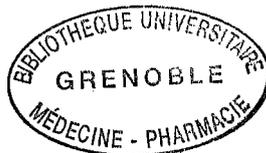
J'adresse tous mes remerciements :

+ Au professeur Alain Favier et au Docteur Florence Amblard pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

+ A Madame Chantal Marka, ma directrice de thèse, pour sa grande disponibilité et son aide tout au long de mes travaux jusqu'à la soutenance d'aujourd'hui.

+ A ma famille et à mes amis qui m'ont entouré pendant ces sept années d'études.

+ A Elsa et María pour notre amitié indéfectible depuis 10 ans.





Serment des Apothicaire

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIË

ALARY	<i>Josette</i>	<i>Chimie Analytique</i>
BAKRI	<i>Abdelaziz</i>	<i>Pharmacie Galènique</i>
BENOIT-GUYOD	<i>Jean-Louis</i>	<i>Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie</i>
CALOP	<i>Jean</i>	<i>Pharmacie Clinique et Bio-technique</i>
CUSSAC	<i>Max</i>	<i>Chimie Thérapeutique</i>
DECOUT	<i>Jean-Luc</i>	<i>Chimie Générale</i>
DEMENGE	<i>Pierre</i>	<i>Physiologie/Pharmacologie</i>
DROUET	<i>Emmanuel</i>	<i>Microbiologie-Immunologie</i>
FAVIER	<i>Alain</i>	<i>Biochimie</i>
GOULON	<i>Chantal</i>	<i>Physique-Pharmacie</i>
GRILLOT	<i>Renée</i>	<i>Parasitologie</i>
LECLERC	<i>Gérard</i>	<i>Chimie Organique</i>
MARIOTTE	<i>Anne-Marie</i>	<i>Pharmacognosie</i>
ROCHAT	<i>Jacques</i>	<i>Hygiène environnement Droit et Economie Pharmaceutiques</i>
ROUSSEL	<i>Anne-Marie</i>	<i>Biochimie</i>
SEIGLE-MURANDI	<i>Françoise</i>	<i>Botanique et Cryptogamie</i>
STEIMAN	<i>Régine</i>	<i>Biologie Cellulaire</i>
WOUESSIDJEWÉ	<i>Denis</i>	<i>Pharmacie Galènique</i>

PLAN

Introduction (p.6)

Chapitre I : Rappels en génétique et biologie moléculaire (p.7)

- 1- L'ADN (p.7)
- 2- Les VNTR ou minisatellites (p.9)
- 3- Les STR ou microsatellites. (p.10)
- 4- L'ADN mitochondrial. (p.10)
- 5- Les enzymes de restriction : rappel de biologie moléculaire (p.13)
- 6- Les RFLP (Restriction Fragment Length polymorphic) multi-allélique (p.14)
- 7- Les sondes ADN utilisées en médecine légale (p.15)
- 8- Marquage des sondes (p.21)

Chapitre II : Les méthodes de référence. (p.22)

I : La méthode de transfert selon SOUTHERN : (p.22)

- 1- Extraction de l'ADN de nos échantillons biologiques : (p.23)
 - 1-A- Extraction d'ADN à partir de sang frais. (p.23)
 - 1-B- Purification par une extraction phénol-chloroforme. (p.24)
 - 1-C- Extraction d'ADN à partir de taches de sang. (p.25)
 - 1-D- Extraction d'ADN à partir de taches de sperme. (p.26)
 - 1-E- Extraction d'ADN à partir d'un support contenant des cellules mâles et femelles. (p.27)
 - 1-F- Extraction d'ADN de cheveux ou de poils. (p.28)
 - 1-G- Extraction d'ADN à partir de tissu humain à l'exception du tissu osseux. (p.29)
- 2- Fragmentation de l'ADN par les enzymes de restriction. (p.29)
- 3- Electrophorèse de l'ADN. (p.31)
- 4- Transfert selon Southern. (p.31)

- 5- Hybridation. (p.33)
- 6- Autoradiographie (p.33)
- 7- Les contrôles de qualité (p.35)

7-A- Contrôle de la qualité et de la quantité de l'ADN qui constitue notre échantillon. (p.35)

7-B- Contrôle de l'origine de l'ADN de l'échantillon. (p.36)

7-C- Contrôle de la digestion enzymatique. (p.37)

7-D- Contrôle de la bonne migration électrophorétique de l'ADN.(p.37)

8- Les limites de la méthode de Southern : (p.37)

8-A- Les limites inhérentes à la résolution électrophorétique. (p.38)

8-B- Les limites inhérentes à la quantité et à la qualité de l'ADN de départ. (p.39)

9- Interprétation des résultats obtenus. (p.39)

II : La méthode d'amplification d'ADN in vitro. (p.41)

1- La méthode d'amplification par PCR (p.41)

1-A- Intérêt de la méthode. (p.41)

1-B- Principes généraux de la méthode : (p.42)

⇒ Déroulement de la méthode : 1- Dénaturation. (p.42)

2- Hybridation. (p.42)

3- Elongation.(p.43)

⇒ Matériel biologique utilisé : 1-L'échantillon d'ADN (p.43)

2- L'enzyme de polymérisation.(p.44)

3- Les nucléotides. (p.44)

4- Les amorces (p. 44)

5- Le magnésium.(p. 45)

6- Le milieu réactionnel (p.45)

- 1-C- Les limites de la méthode. (p.45)

- 2- La technique multiplex. (p.46)

- 3- La technique PCR appliquée à la médecine légale. (p.47)
 - 3-A- Les fragments explorés en médecine légale : (p.47)
 - 1- Les STR et les VNTR. (p.47)
 - 2- La région HLADQ α (p.48)
 - 3- L'ADN mitochondrial. (p.48)
 - 3-B- Mise en évidence des amplimères : (p.48)
 - 1- L'électrophorèse. (p.48)
 - 2- Le dot blot inverse. (p.51)
 - 3-C- Les applications de la PCR en médecine légale : (p.53)
 - 1- Le matériel aussi utilisé dans la technique de Southern : (p.55)
 - a- Recherche sur un échantillon de sang. (p.55)
 - b- Recherche sur les cheveux. (p.55)
 - c- Recherche sur les cellules sexuelles. (p.55)
 - d- Recherche sur les taches. (p.56)
 - 2- Le nouveau matériel biologique utilisable grâce à la PCR : (p.56)
 - a- Les dents. (p.56)
 - b- Les os. (p.56)
 - c- La salive. (p.57)

Chapitre III : Le séquençage de l'ADN. (p.59)

- 1- La méthode de Sanger. (p.60)
 - 1-A- Les fragments d'ADN utilisés.(p. 60)
 - 1-B- La réaction de séquençage enzymatique. (p.61)
 - 1-C- Les ADN polymérase utilisées. (p.67)
 - 1-D- Les progrès technologiques. (p.67)

- 2- La méthode Maxam et Gilbert. (p.69)

- 2-A- Les fragments d'ADN utilisés. (p.69)
- 2-B- Les agents chimiques. (p.69)
- 2-C- La technique elle même. (p.70)
- 2-D- La révélation. (p.71)

- 3- Utilisation du séquençage en médecine légale. (p. 73)
 - 3-A- L'ADN utilisé. (p.73)
 - 3-B- Les fragments étudiés. (p.75)
 - 3-C- Informativité des fragments étudiés. (p.75)
 - 3-D- Le problème des personnes hétéroplasmiques. (p.76)
 - 3-E- Utilisation de l'ADN mitochondrial dans quelques cas historiques. (p.76)

Chapitre IV : Empreintes génétiques et pratique légale. (p.78)

- 1- Recours aux empreintes génétiques en pratique judiciaire. (p.78)
 - 1-A- Quand ? (p.78)
 - 1-B- Qui ? (p.79)

- 2- Le prélèvement et le droit. (p.80)
 - 2-A- Prélèvement sur le lieu du crime. (p.80)
 - 2-B- Prélèvement du suspect. (p.82)

- 3- Les laboratoires et le personnel. (p.84)
- 4- Empreintes génétiques et fichier informatique. (p.85)
- 5- Les efforts européens de standardisation. (p.87)

Conclusion. (p.89)

Bibliographie (p.91)

LES EMPREINTES GENETIQUES

EN MEDECINE LEGALE

INTRODUCTION :

En juillet 1998 dans le but de résoudre l'enquête sur le meurtre de la petite Caroline Dickinson, la population masculine entière d'un village a été soumise à des tests génétiques. Ce phénomène n'est pas un cas isolé, et on assiste partout dans le monde à de tels déploiements de tests. On ne peut que constater que depuis sa mise au point en 1987 par l'équipe du docteur Jeffreys en Angleterre [10], la détermination des empreintes génétiques afin d'aider la justice, a pris aujourd'hui une place prépondérante dans les enquêtes criminelles.

En l'espace de 12 ans les techniques se sont multipliées, affinées et spécialisées. C'est pourquoi il nous a paru intéressant, à partir d'une recherche bibliographique, de faire un état des lieux de cet extraordinaire outil judiciaire qu'est la détermination des empreintes génétiques.

Dans un premier temps nous ferons un rappel des bases de génétique et des bases de biologie moléculaire sur lesquelles reposent les techniques des empreintes génétiques, dans un deuxième temps nous étudierons les techniques dites de « référence » que sont la technique de Southern et la PCR, dans un troisième temps nous étudierons la méthode la plus récente, et en constante évolution, qui repose sur l'étude de l'ADN mitochondrial, enfin nous parlerons de l'aspect légal et de l'utilisation judiciaire des empreintes génétiques.

CHAPITRE PREMIER :

RAPPELS EN GENETIQUE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE.

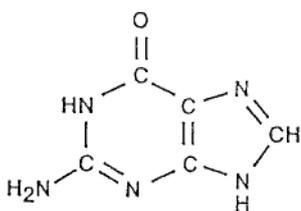
1. L'ADN :

L'acide désoxyribonucléique ou ADN, est le support génétique de tout individu. On le retrouve dans le noyau des cellules de l'organisme et aussi en plus petite quantité dans les mitochondries. Il a la particularité d'être identique dans toutes les cellules d'un même organisme, en effet chaque cellule mère qui se divise pour donner des cellules filles va transmettre une réplique à l'identique de son ADN. De même il se transmet de manière héréditaire et chaque parent transmet une partie de son patrimoine génétique à son enfant par le biais des cellules germinales.

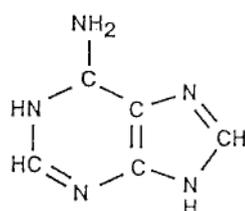
La structure de l'ADN est connue depuis 1953 grâce aux travaux de Watson et Crick, il est formé de structures élémentaires: les nucléotides.

Chaque nucléotide est formé par l'association :

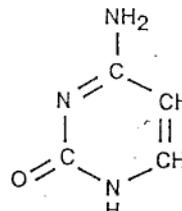
- D'un sucre à 5 carbones (désoxyribose).
- D'un groupement phosphate.
- D'une des 4 bases azotées : adénine, thymine, guanine et cytosine.



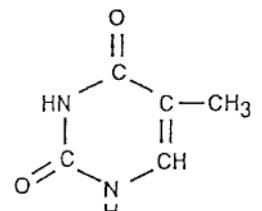
Guanine (G)



Adénine (A)



Cytosine (C)



Thymine (T)

Les quatre bases qui forment l'ADN [28]

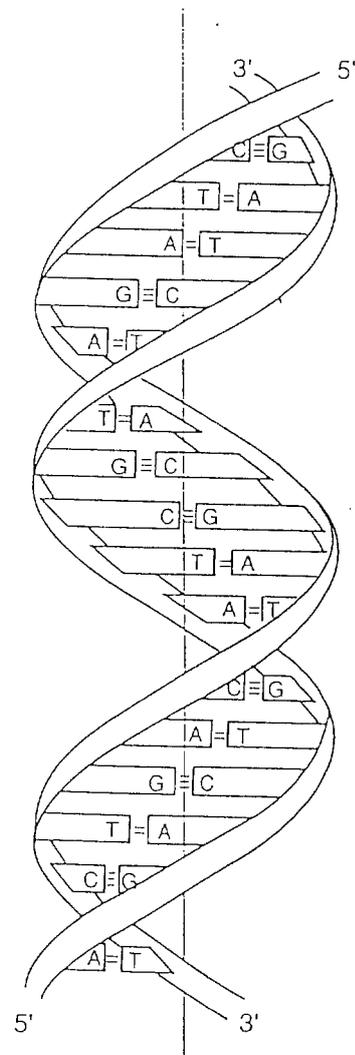
L'assemblage des nucléotides entre eux est complexe et conduit à la synthèse d'une structure en double hélice formée de deux brins complémentaires.

On dit que ces deux brins sont complémentaires car les bases vont s'associer **spécifiquement** entre elles grâce à des **ponts hydrogènes** :

- L'adénine s'associe toujours avec la thymine par **2** ponts hydrogène.
- La cytosine s'associe toujours avec la guanine par **3** ponts hydrogène.

Ainsi quand on connaît la structure d'un des deux brins d'ADN, on connaît automatiquement la structure de son brin homologue.

Double brin d'ADN en hélice [28]:



Les propriétés physico-chimiques de l'ADN :

In vivo quand deux brins sont séparés, ils vont **spontanément se réassocier de manière complémentaire** on appelle ce phénomène **la renaturation**.

Les deux brins sont associés entre eux par des liaisons hydrogène qui sont des liaisons dites faibles en énergie. C'est pourquoi il suffit pour les séparer de soumettre l'ADN à des fortes températures ou à des changements de pH. Ainsi en laboratoire on peut artificiellement

séparer les deux brins en les soumettant à une température de 95°C, c'est la **dénaturation**, et il suffit de faire descendre la température aux alentours de 37°C pour que l'ADN se reforme, c'est l'**hybridation**.

Une particularité de l'ADN qui en fait son grand intérêt en médecine légale, est sa résistance face aux agressions extérieures, c'est une molécule très stable quand elle est conservée à l'abri de l'humidité. Ainsi des prélèvements effectués sur une personne décédée sont tout à fait utilisables même plusieurs années après la découverte du cadavre. Ceci est un grand progrès par rapport aux analyses effectuées auparavant comme les empreintes digitales, les recherches de groupe et le typage HLA (en effet les protéines sont très vite dénaturées après le décès ce qui empêche d'utiliser les anciennes techniques).

Organisation cellulaire de l'ADN :

Si la plupart du temps l'ADN existe sous forme non organisée dans la cellule, à certaines époques de la vie cellulaire il va se condenser sous forme de ce que nous appelons les chromosomes. On dénombre 46 chromosomes chez l'homme (22 paires de chromosomes autosomes et homologues, plus 1 paire de chromosomes sexuels). Sur chaque chromosome ont été définis des loci qui correspondent à un emplacement précis d'une séquence d'ADN. On retrouve ces loci sur tous les chromosomes identiques des individus mais ils peuvent être occupés par des séquences d'ADN différentes. On dit qu'un même locus est occupé par des allèles différents, spécifiques de chaque individu.

Tout l'ADN n'est pas codant c'est à dire que tout l'ADN ne va pas être transcrit en protéine. En effet seule une partie minime de l'ADN constitue l'ensemble de nos gènes et la plus grande partie de l'ADN est non codante et assure des fonctions encore méconnues. Il faut noter que les séquences codantes de notre ADN sont généralement semblables d'un homme à l'autre (puisque codant pour des protéines très proches voire identiques), alors qu'au contraire les séquences non codantes ont subi d'assez grandes variations au cours de l'évolution.

Les techniques d'empreintes génétiques reposent sur les parties **d'ADN non codantes**.

2. Les VNTR ou minisatellites [14].

Les travaux de Jeffreys ont montré que certains loci non codants de l'ADN sont occupés par des séquences très particulières : des séquences d'ADN répétées en tandem (c'est -à-dire que les séquences sont disposées côte à côte sans interruption). Ces séquences sont répétées un nombre variable de fois selon chaque individu.

On les appelle soit selon leur appellation anglaise : VNTR (Variable Number of Tandem Repeat), soit selon leur appellation française : les minisatellites (en raison de leur disposition en périphérie de l'ADN lors de la centrifugation de celui-ci dans un gradient de chlorure de Césium)

Ces loci bien précis (il en existe une soixantaine), sont donc occupés par des allèles très différents selon les individus . Comme chaque locus est multi-alléliques, cela les rend spécifiques de chaque individu et la probabilité de rencontrer deux individus ayant le même nombre de séquence est très infime, on appelle cela le **polymorphisme de répétition**. (On appelle polymorphisme une séquence dont la fréquence d'apparition est inférieure à 0.95 pour cent). Ces séquences répétitives ont un motif de base de 11 à 16 paires de bases (séquence GGAGGTGGGCAGGA[A/G]G)

De plus il a été montré que ces séquences se transmettent **héréditairement** selon les **lois mendéliennes** comme on le voit dans la figure suivante [14]:

⇒ L'individu 1 possède :

- Dans un locus hérité de son père : une séquence répétée en tandem 3 fois.
- Dans ce même locus hérité de sa mère : la même séquence répétée 8 fois.

⇒ L'individu 2 possède :

- Dans ce même locus hérité de son père : cette même séquence répétée 7 fois.
- Dans ce même locus hérité de sa mère : cette même séquence répétée 5 fois.

Si on étudie grâce à un même couple enzyme/sonde ce locus, on va trouver 4 images différentes de ce même locus par migration électrophorétique.

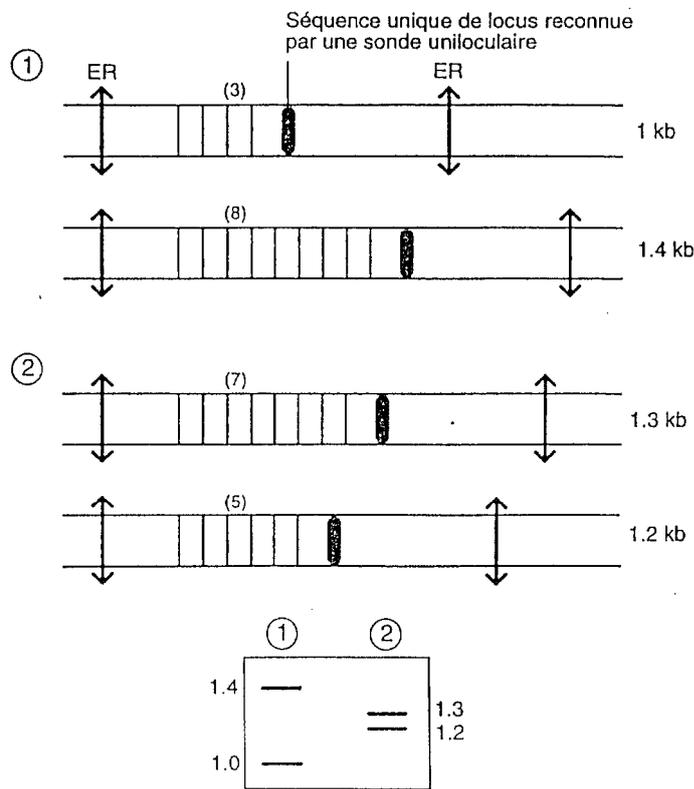


Schéma de la transmission mendélienne d'un locus polymorphe.

De l'étude de ce polymorphisme est issue la technique des empreintes génétiques.

3. Les STR ou microsatellites.

Les microsatellites ou STR (Short Tandem Repeat) sont eux aussi des fragments d'ADN qui comportent une **séquence fixe qui est répétée un nombre variable de fois** selon les individus. Leur différence par rapport aux minisatellites réside dans le fait que le motif de base ne dépasse pas **quelques paires de bases** (entre une et quatre paires de bases seulement.). De plus les motifs ne sont pas répétés plus de quarante fois (avec un minimum de douze répétitions pour être considérés comme un STR).

De même que les VNTR, les STR sont donc polymorphes, très informatifs, et ils se transmettent selon les lois mendéliennes. Ils vont donc être très précieux pour identifier des individus, et de par leur petite taille, ils pourront être étudiés par des techniques d'amplification in vitro [18].

4. L'ADN mitochondrial (ADN mt).

Les mitochondries sont des organites présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Ces mitochondries contiennent de l'ADN. Il est composé de 16569 pb, il est circulaire clos et il est bicatenaire. Une cellule contient facilement une centaine de

mitochondries et chacune contient environ 10 ADN mt circulaires, on estime donc qu'il y a au minimum un millier d'ADN mt par cellule !

La majorité de cet ADN est codant , mais cependant il existe une zone non codante appelée région de contrôle ou D-loop (Distorsion-loop) [5]. Cette région, longue de 1100 pb, est **variable d'un individu à l'autre** : on estime qu'il y a **3 %** de variations entre deux individus sans relation pris au hasard (soit sur la totalité de la région environ trente bases sont différentes).

Cette région de contrôle a été arbitrairement divisée en deux zones : les régions hypervariables 1et 2 (HVR1 et HVR2) [25]. L'emplacement de ces deux régions est assez précis sur le génome de l'ADN mitochondrial :

- HVR1 : 16024-16440
- HVR2 : 50- 340

Contrairement à l'ADN nucléaire, la transmission de l'ADN mitochondrial ne se fait pas selon les lois mendéliennes, la transmission se fait **exclusivement** par le côté **maternel**. En effet lors de la fécondation, l'ADN nucléaire vient pour moitié du spermatozoïde et pour moitié de l'ovocyte, alors que les mitochondries et l'ADN qu'elles contiennent viennent uniquement du cytoplasme de l'ovocyte. On peut ainsi établir des arbres de filiation uniquement en étudiant le côté maternel d'une famille.

La transmission de cet ADN étant uniparental, on devrait trouver un seul type d'ADN mitochondrial chez un même individu qui est alors **homoplasmique**. Cependant les études de cet ADN mitochondrial ont prouvé qu'il n'en était rien et qu'un certain nombre d'individu est **hétéroplasmique [3]**, et contient dans ses mitochondries deux types d'ADN mt. On attribue ce phénomène au fait que les mutations spontanées de l'ADN mt sont 17 fois plus nombreuses que sur l'ADN nucléaire (dus à un moins bon système de réparation). Ainsi certaines mutations ne sont pas corrigées lors des toutes premières divisions cellulaires (pendant l'embryogenèse) et elles vont être transmises à d'autres mitochondries lors de la duplication de l'ADN mt en vue de la synthèse de nouvelles mitochondries. De plus les mitochondries mutées ne vont pas se répartir équitablement dans les différentes cellules [26], ce qui fait que certains tissus sont porteurs de la mutation et que d'autres non. On dit que le degré d'hétéroplasmie n'est pas le même dans chaque tissu [32]. Parfois on peut même trouver deux cellules de peau (par exemple) très différentes, l'une ayant des mitochondries hétéroplasmiques, l'autre des mitochondries homoplasmiques. Chez des individus

hétéroplasmiques, deux types d'ADN mt coexistent et même parfois dans une seule et même mitochondrie.

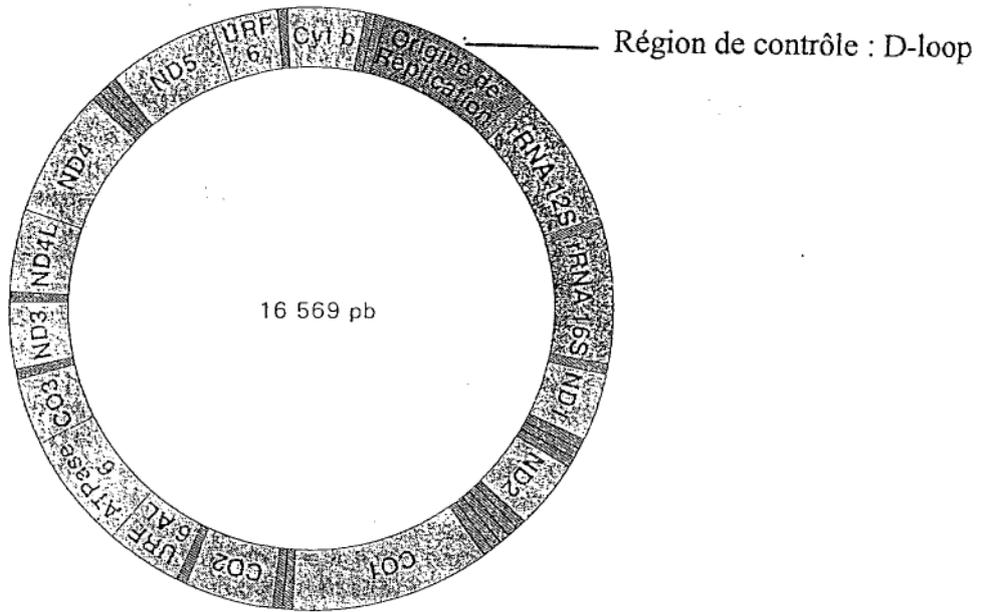


Schéma de l'ADN mitochondrial. [23]

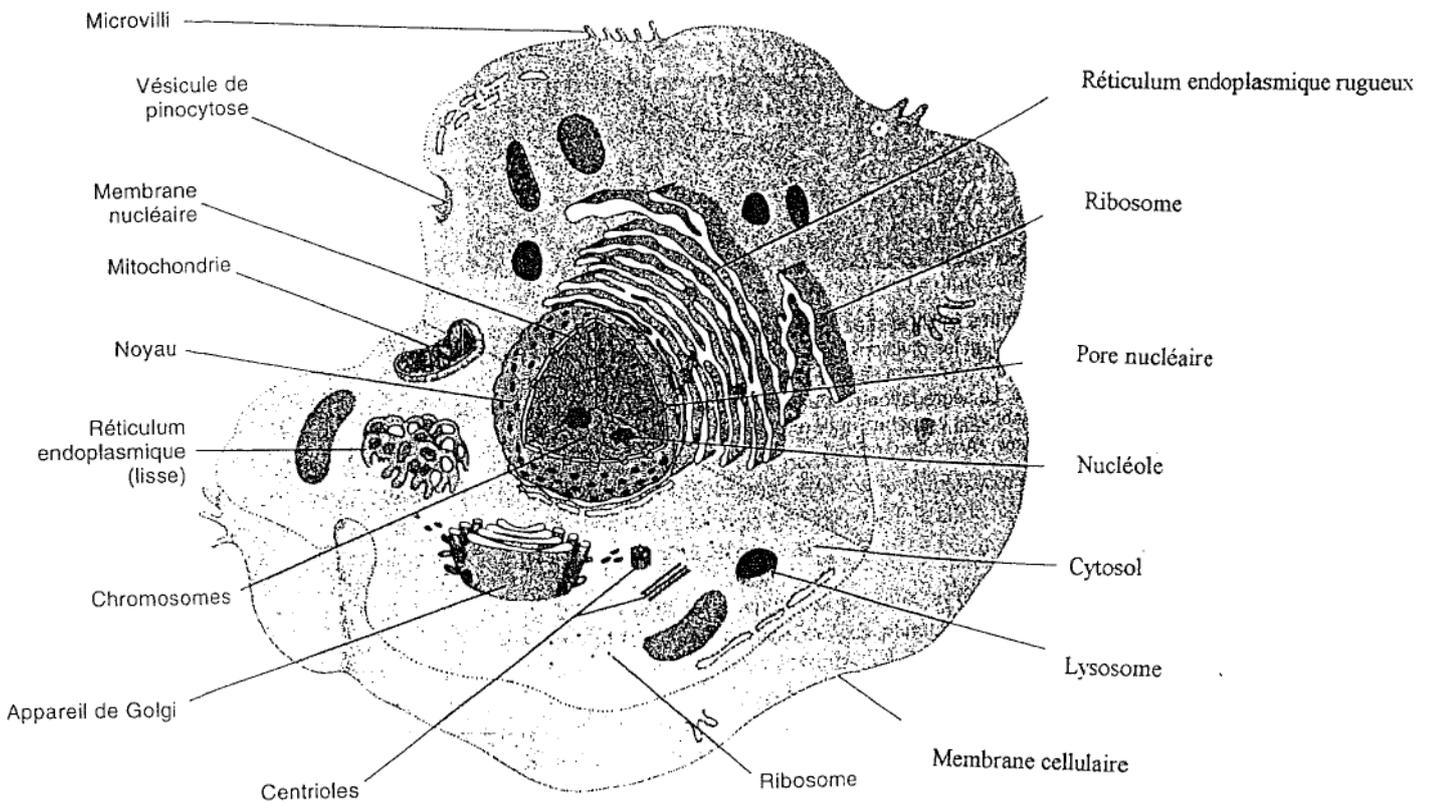


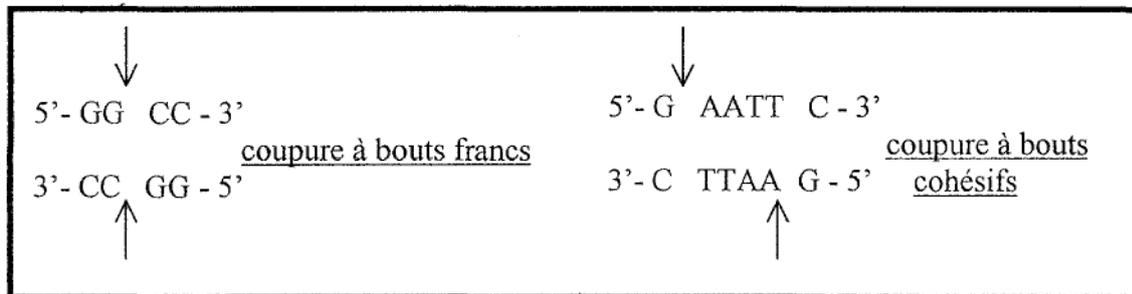
Schéma d'une cellule. [23]

5. Les enzymes de restriction : rappels de biologie moléculaire.

Les enzymes de restriction sont à la base de nombreuses techniques de biologie moléculaire et donc à la base des techniques d'empreintes génétiques.

Ce sont des endonucléases produites par des micro-organismes qui coupent de manière **définie et reproductible** l'ADN. Les enzymes de restriction utilisées en médecine légale sont de type 2. C'est-à-dire qu'elles vont reconnaître une séquence précise et vont couper l'ADN à ce niveau très exactement. Les séquences spécifiques reconnues font généralement entre 4 et 8 nucléotides. Ces séquences sont dites **palindromiques**, c'est-à-dire que leur séquence est identique lorsqu'elle est lue de gauche à droite sur un brin et de droite à gauche sur l'autre brin. Ainsi les enzymes peuvent lire l'ADN dans les deux sens et les deux brins de la double hélice sont coupés en même temps au même site. Deux types de coupes existent suivant les enzymes : les coupures à bouts francs et les coupures à bouts cohésifs.

Exemple de coupure :



Les enzymes de restriction utilisées en médecine légale vont donc couper spécifiquement l'ADN au niveau des VNTR. Chacune sert pour un nombre limité de locus. Les plus utilisées sont répertoriées dans le tableau ci après. (Une même enzyme peut servir pour plusieurs VNTR car les motifs qui entourent les séquences répétitives sont souvent très voisins).[28]

ENZYME	MICROORGANISME	SITE DE RESTRICTION
<i>Alu I</i>	Arthrobacter luteus	AG ↓ CT
<i>Bam HI</i>	Bacillus amyloliquifaciens	G ↓ GATCC
<i>Dde I</i>	Desulfovibrio desulfuricans	C ↓ TNAG
<i>Eco RI</i>	Escherichia coli RY 13	G ↓ AATTC
<i>Hae III</i>	Haemophilus aegyptius	GG ↓ CC
<i>Hind III</i>	Haemophilus influenzae Rd	A ↓ AGCTT
<i>Hinf I</i>	Haemophilus influenzae RF	G ↓ ANTC
<i>Pvu I</i>	Proteus vulgaris	CGAT ↓ G
<i>Pst I</i>	Providencia stuartii 164	CTGCA ↓ G
<i>Taq I</i>	Thermus aquaticus YT 1	T ↓ CGA

Tableau des différentes enzymes de restriction utilisées en Médecine Légale

A : Adenine G : Guanine
T : Thymine C : Cytosine ↓ : zone de fragmentation de l'enzyme
N : Une base (indifférent)

6. Les RFLP (Restriction fragment Length Polymorphism) multi-allélique.

Notons pour commencer qu'il existe des RFLP bi-alléliques et multi-alléliques et que seuls ces derniers sont utilisés en médecine légale, nous ne chercherons donc pas à étudier plus en détails les RFLP bi-alléliques.

Les RFLP multi-alléliques (RFLP m.a) sont les fragments obtenus après l'action des enzymes de restriction sur les minisatellites.

Comme chaque minisatellite est spécifique d'un individu, le RFLP m.a obtenu après l'action de l'enzyme est lui aussi spécifique. De par l'extrême polymorphisme de répétition des VNTR, on estime que le degré d'informativité des RFLP m.a qui en découle est idéal.

Une fois que ces fragments de restriction très spécifiques vont être obtenus, il va falloir les étudier grâce à des sondes ADN.

7. Les sondes ADN utilisées en médecine légale.

Une fois que l'ADN est digéré par les enzymes de restriction, il faut détecter les fragments obtenus. Nous effectuons ces détections grâce à des sondes ADN qui vont pouvoir s'hybrider à nos fragments en utilisant la propriété d'appariement complémentaire spontanée de l'ADN.

⇒ Définition d'une sonde ADN:

Une sonde moléculaire est constituée d'une séquence d'acide nucléique (d'au moins 20 nucléotides) homologue à un fragment de l'ADN à explorer. Cette sonde est capable de s'hybrider de façon stable et très spécifique (une sonde est capable de reconnaître une séquence unique parmi des milliers d'autres) par association avec des bases complémentaires.

Cependant en modifiant les conditions de l'utilisation de la sonde on peut jouer sur la spécificité de l'appariement, ainsi en modifiant ce que l'on appelle les conditions de stringence on peut diminuer la spécificité de complémentarité de l'association entre le fragment et la sonde. Par exemple dans un milieu de faible stringence c'est-à-dire ayant une basse température et étant fortement concentré en ions, on a une hybridation même si la complémentarité n'est que partielle. De plus **l'hybridation est un processus réversible** on peut donc utiliser plusieurs sondes successivement.

En médecine légale on utilise des sondes dites indirectes ou anonymes qui correspondent à une fraction d'ADN non codant, ce sont donc les sondes qui vont correspondre aux RFLP que nous avons obtenues après utilisation des enzymes de restriction. Il faut bien noter que, à chaque enzyme de restriction, il peut correspondre plusieurs

fragments, mais qu'à chaque fragment il ne correspond qu'une seule sonde ADN. On définit toujours un fragment par rapport à un couple enzyme /sonde et non pas juste par rapport à une enzyme.

Il existe deux types de sondes : les sondes uniloculaires qui s'apparient avec une seule séquence localisée sur un seul locus, les sondes multiloculaires qui s'apparient avec une seule séquence mais localisée à de nombreux endroits sur l'ADN.

Il existe une nomenclature très précise pour les loci . Un **D** signifie que l'on parle d'un locus de l'ADN, le chiffre suivant indique le numéro du chromosome, le **S** indique que la sonde est uniloculaire et le dernier nombre représente la catégorie d'enzymes utilisées pour étudier le locus. Par exemple une sonde qui explore le locus D₂ S₄₄ est uniloculaire et elle agit sur le chromosome 2.

Une fois que nos sondes sont hybridées, il faut les visualiser. Pour cela on utilise une technique de marquage des sondes ainsi on peut avoir une image autoradiographique de nos fragments. Nous étudierons les différents marqueurs dans un prochain paragraphe.

⇒ Utilisation d'une sonde uniloculaire :

Après utilisation d'une enzyme de restriction on obtient donc des fragments d'ADN qui correspondent au locus que l'on veut étudier. Si on leur associe une sonde uniloculaire on obtient par autoradiographie : 2 bandes si la personne est hétérozygote pour le locus étudié et 1 seule bande si la personne est homozygote pour ce locus.

Une sonde uniloculaire s'associe totalement et spécifiquement avec le fragment adéquat, il n'y a pas besoin de modifier les conditions de stringence pour obtenir l'hybridation. Si on utilise une seule sonde uniloculaire le pouvoir discriminatif de l'analyse est faible, en revanche en utilisant plusieurs sondes uniloculaires à la suite on obtient d'excellents résultats. Par exemple, avec 4 sondes uniloculaires successives, la probabilité de retrouver la même empreinte génétique (c'est à dire obtention d'images radiographiques identiques pour les 4 sondes utilisées) dans la population est de 10^{-6} à 10^{-15} (on obtient cette probabilité en multipliant les fréquences de chacun des allèles dans la population pour chaque locus).

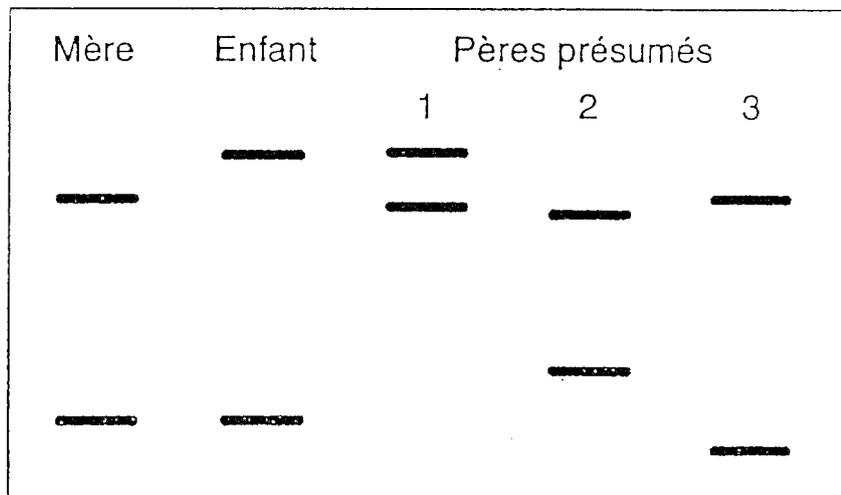
De nombreuses études de population sont menées par différents laboratoires à travers le monde afin de trouver de nouvelles enzymes de restriction et de nouvelles sondes qui vont correspondre à un locus dont la **fréquence allélique est la plus faible possible**. En effet pour

être informatif, le fragment d'ADN étudié doit avoir des allèles les plus rares possible [8]. Ainsi tous les minisatellites et les microsatellites n'ont pas le même intérêt en médecine légale. En effet il ne sert à rien d'étudier un locus ayant des allèles très répandus qu'on retrouve chez 30 % de la population.

De plus selon les populations étudiées (Russe, Brésilienne, Chinoise, Américaine...) on se rend compte que la fréquence observée n'est pas la même et que les enzymes et les sondes à utiliser pour procéder à des identifications ne sont pas les mêmes.

Les sondes uniloculaires sont les plus utilisées en médecine légale car elles donnent un résultat beaucoup plus facile à lire.

Dans le schéma ci-dessous [14] on peut voir les empreintes génétiques d'une mère, d'un enfant et de 3 pères présumés. On obtient pour chaque individu 2 « traits » qui correspondent aux deux allèles du locus étudié. Le père présumé 1 est le père de l'enfant car ils ont un allèle en commun.



Exemple d'empreintes génétiques dans un cas de recherche de paternité.

Ci dessous nous présentons un tableau des sondes uniloculaires les plus utilisées en médecine légale pour étudier les minisatellites [28].

<i>SONDES</i>	<i>LOCUS ETUDIE</i>
<i>YNH 24</i>	<i>D2 S44</i>
<i>VI</i>	<i>D17 S79</i>
<i>MIJ 14</i>	<i>D14 S13</i>
<i>MS 8</i>	<i>D5 S43</i>
<i>3' HVR</i>	<i>D16 S85</i>
<i>pH 30</i>	<i>D4 S139</i>
<i>MS 1</i>	<i>D1 S7</i>
<i>MS 31</i>	<i>D7 S21</i>
<i>Ms 43</i>	<i>D12 S11</i>

Tableau des différentes sondes utilisées pour étudier les VNTR

⇒ Les sondes multiloculaires :

Certaines séquences répétitives peuvent être retrouvées sur plusieurs loci, elles présentent quand même quelques variations d'un locus à l'autre mais elles ont un motif central commun qui permet à une sonde de s'hybrider dans des conditions de stringence précise. Une sonde multiloculaire va donc reconnaître le cœur d'une séquence répétitive et s'hybrider avec tous les fragments qui comportent ce motif central. Ainsi sur l'autoradiographie on obtient une succession de bandes dont le nombre et la localisation après migration sont spécifiques de chaque individu. Certaines sondes comme les sondes 33.15 et 33.6 utilisées par Jeffreys peuvent ainsi révéler 34 bandes différentes, on obtient alors un vrai code barre de l'individu pour un couple enzyme/sonde comme on peut le voir sur le schéma suivant [14].

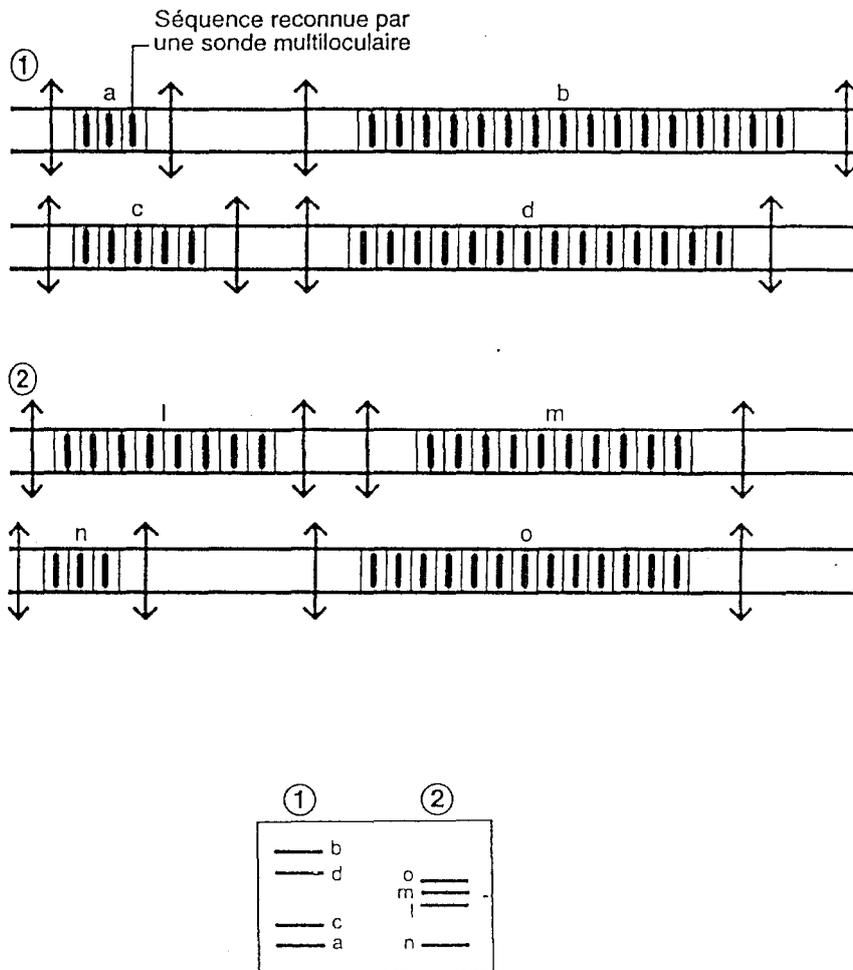


Schéma : utilisation d'une sonde multiloculaire pour réaliser des empreintes génétiques

Généralement on utilise deux couples enzyme /sonde pour obtenir une cartographie dont le pouvoir discriminatif est idéal.

Cependant l'utilisation des sondes multiloculaires est délaissée au profit des sondes uniloculaires qui sont plus faciles à lire, nécessitent moins d'ADN, permettent d'étudier un mélange, sont basées sur des calculs de population. Le seul désavantage de leur emploi réside dans le fait qu'il faut utiliser 4 sondes uniloculaires quand 2 sondes multiloculaires suffisent.

Une fois que nos sondes sont hybridées, il faut les visualiser. Pour cela on utilise une technique de marquage des sondes puis on fait une autoradiographie de nos fragments. Nous allons étudier les différents marqueurs et la technique d'autoradiographie dans le prochain paragraphe.

8. Marquage des sondes.

Une fois nos fragments spécifiques hybridés avec nos sondes, nous allons les détecter grâce à une technique appelée autoradiographie que nous étudierons en détail ultérieurement. Pour cette technique nos sondes sont préalablement marquées. Il existe plusieurs types de marquage :

- le marquage radioactif :

Plusieurs isotopes peuvent être utilisés pour ce marquage : le P_{32} , le S_{35} et le tritium qui sont des émetteurs β et l' I_{135} qui est émetteur γ . Cependant, en médecine légale, c'est le P_{32} qui est le plus utilisé car c'est un composant naturel des nucléotides et qu'il est donc facile à introduire dans un nucléotide. De plus il a une activité spécifique importante qui lui permet d'être détecté même à de faibles quantités. Pour incorporer le P_{32} dans nos sondes il existe plusieurs techniques, les plus utilisées étant la nick-translation et le multi-amorçage au hasard :

•La nick-translation :

Dans un milieu réactionnel on introduit les sondes ADN que l'on veut marquer, des DNases, des ADN polymérase et des nucléotides radioactifs. Les DNases vont couper le double brin et les polymérases vont le resynthétiser en incorporant des bases radioactives. Les sondes sont alors radioactives.

•Le multi-amorçage au hasard :

On procède à une séparation du double brin par chauffage puis refroidissement brutal. On ajoute des petits fragments d'ADN qui vont s'hybrider tout au long de la sonde. Ces fragments servent d'amorce à une ADN polymérase qui va reconstituer le second brin en incorporant des nucléotides radioactifs. Les sondes ainsi synthétisées sont radioactives.

- le marquage non radioactif :

On appelle les sondes nucléaires non radioactives des sondes froides. Actuellement ces sondes froides sont d'efficacité égale et leur emploi est de plus en plus fréquent.

Pour produire ces sondes, on incorpore à nos sondes ADN des nucléotides couplés à de la biotine. Une fois hybridées avec nos fragments, on ajoute un ligand hautement spécifique de la biotine (comme l'avidine) à notre solution d'hybridation. On aura préalablement couplé l'avidine à une substance chromogène. Après un temps de pause on va révéler notre hybridation par coloration. Le temps de révélation est inférieur à celui des sondes radioactives et de plus leur manipulation est moins complexe, c'est pourquoi elles remplacent peu à peu les sondes radioactives. Des sociétés ont commercialisé des kits de diagnostic (Cellmarks diagnostics par exemple) facilitant encore le travail des manipulateurs qui n'ont pas à créer leurs propres sondes et de plus les résultats sont plus reproductibles et les sondes utilisées identiques d'un laboratoire à un autre.

Maintenant que nous avons vu ces quelques rappels de génétique et de biologie moléculaire, nous pouvons étudier les techniques d'analyse de l'ADN.

CHAPITRE DEUX : METHODES DE REFERENCE

1. LA METHODE DE TRANSFERT SELON SOUTHERN :

La méthode mise au point par E.Southern en 1975 permet de visualiser des fragments d'ADN. En médecine légale ce sont les polymorphismes que l'on veut visualiser car ils sont spécifiques de chaque individu. On utilisera pour cela des enzymes et des sondes spécifiques.

La technique se déroule en plusieurs étapes très distinctes :

- 1- Extraction de l'ADN des échantillons biologiques.
- 2- Fragmentation de l'ADN par les enzymes de restriction.
- 3- Electrophorèse sur gel d'agarose pour séparer les fragments selon leur taille.
- 4- Transfert des fragments ordonnés sur une membrane de nylon.
- 5- Hybridation des fragments isolés avec des sondes spécifiques.
- 6- Autoradiographie puis lecture des résultats.

Nous allons étudier ces étapes les unes après les autres, puis nous étudierons les contrôles de qualité à effectuer (7), les limites de la méthode (8) et le mode d'interprétation des résultats (9).

1- Extraction de l'ADN des échantillons biologiques.

Les types d'échantillons utilisés en médecine légale sont très différents et il existe des techniques spécifiques pour chacun d'eux que nous allons étudier en détail. Un grand nombre de réactifs est nécessaire et pour des raisons évidentes de clarté ces différents réactifs et leur mode d'obtention sont regroupés dans l'annexe VI à IX . Les méthodes décrites ci après sont celles qu'utilisait le Centre de Transfusion Sanguine de Grenoble pour réaliser des empreintes génétiques.

1-A- Extraction de l'ADN à partir de sang frais :

Principe :

Après lavages et centrifugations successifs, les globules blancs contenus dans le sang frais sont isolés puis lysés pour libérer l'ADN qu'ils contiennent . Cet ADN est ensuite précipité et isolé à deux reprises, puis conservé à une concentration connue dans une solution tampon.

Mode opératoire :

① Extraction des globules blancs :

Mettre 5 ml de sang dans un tube falcon conique de 50 ml

Compléter à 45 ml avec du TE 20,5.

Laisser reposer 15 mn dans la glace.

Centrifuger 15 mn à 2500 rpm (centrifugeuse Jouan)

Décanté dans de l'eau de Javel diluée.

Laver 2 fois le culot de globules blancs avec du TE 20,5 . Centrifuger à chaque fois 10 mn à 2500 rpm.

Reprendre le culot dans 2,5 ml de TE 20,5 et le mettre en suspension. Notre suspension **contient alors les globules blancs** de l'échantillon.

② Extraction de l'ADN des globules blancs.

Ajouter 250 µl de sarcosyl 10 % (1% au final)

Ajouter 50 µl de protéinase K à 10 mg/ml.

Agiter doucement.

Incuber une nuit à 37°C sous agitation douce.

③ Précipitation de l'ADN :

Ajouter 1,4 ml d'acétate d'ammonium 7,5 M

Précipiter avec 8 ml d'éthanol absolu froid.

Agiter doucement jusqu'à la formation d'un flocon blanc d'ADN.

Pêcher le flocon avec une pipette Pasteur coudée à la flamme en forme d'hameçon et flambée à l'alcool avant emploi.

Le redissoudre pendant 2 heures à 37°C dans 4 ml de TE 20,5 / NaCl 0,2 M.

Reprécipiter l'ADN avec 8 ml d'éthanol absolu.

Estimer la quantité d'ADN et le redissoudre à 37°C sous agitation douce dans du TE 20,1 de manière à obtenir une concentration d'environ 100 µg/ml.

Conserver à 4°C jusqu'à l'analyse.

1-B- Purification par une extraction phénol-chloroforme :

Après son extraction de l'échantillon (sauf le sang frais), il est souvent nécessaire de réaliser une extraction « phénol-chloroforme ».

- Ajouter 500µl d'un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique par tube Eppendorf d'extraction.
- Agiter vigoureusement à la main. Laisser sur l'agitateur basculant pendant 10 mn à température ambiante.
- Centrifuger 10 mn à 8000 rpm.
- Récupérer la phase aqueuse supérieure.
- Si on ne peut pas récupérer suffisamment de liquide rajouter 100 µl de TE 10-0,1, centrifuger 5 mn à 8000 rpm et récupérer la phase aqueuse (sans prélever la galette protéique qui sépare les deux phases.)
- Ajouter 500 µl de chloroforme sur la phase aqueuse récupérée précédemment.

- Agiter vigoureusement à la main.
- Laisser sur l'agitateur à bascule pendant 10 mn à température ambiante.
- Centrifuger 10 mn à 8000 rpm .
- Récupérer la phase aqueuse supérieure.
- Ajouter 8 µl de NaCl 5 M et 1µl de glycogène.
- Ajouter 800 µl d'éthanol absolu froid puis agiter par retournement.
- Précipiter à - 20 °C pendant 30 mn minimum (on peut laisser l'échantillon ainsi plusieurs jours.)
- Centrifuger 30 mn à 13000 rpm.
- Eliminer le surnageant, laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70%
- Centrifuger 15 mn à 13000 rpm , éliminer le surnageant .
- Sécher le culot au Speed-vac environ 15 mn.
- Reprendre le culot avec du TE 10-0,1 en quantité différente selon la technique de détection que l'on va utiliser ensuite :
 - 32 µl pour la méthode de Southern
 - 50 µl pour la PCR
 - 40 µl pour une PCR et un Southern.
- Si l'échantillon n'est pas utilisé immédiatement, le congeler à - 20°C.

1-C –Extraction de l'ADN à partir de taches de sang :

Principe :

Après mise en solution des taches de sang et lyse des globules blancs contenus dans ces taches, l'ADN est purifié par une extraction « phénol-chloroforme »

Mode opératoire :

- Découper sur le tissu des taches de sang d'au minimum 1 cm². (Bien mettre des gants stériles et différents pour chaque prélèvement, utiliser des ciseaux flambés à l'alcool à chaque nouvel échantillon.)
- Déposer le morceau de tissu découpé dans un Eppendorf contenant le tampon SEB.
- Laisser incuber une nuit au bain-marie à 56°C.
- Centrifuger quelques secondes.
- Percer des bouchons de tube type Eppendorf avec une aiguille stérile et y déposer le tissu ayant incubé. Bien essuyer le tissu sur la paroi de l'Eppendorf.
- Placer le tout sur l'Eppendorf.
- Centrifuger 5 mn à 10000 pm.
- Faire une extraction « phénol-chloroforme » de notre ADN dissout dans notre Eppendorf.

1-D- Extraction de l'ADN à partir de taches de sperme :

Principe :

Après incubation des taches de sperme et lyse des spermatozoïdes, l'ADN est purifié par une extraction « phénol-chloroforme ».

Mode opératoire :

- Découper des taches d'au maximum 1cm² (en respectant les mêmes règles d'hygiène que pour les taches de sang.)
- Mettre le tissu à incuber dans un tube Eppendorf contenant 500 µl de tampon M.
- Laisser incuber une nuit à 37 ° C au bain-marie.
- Percer un bouchon de type Eppendorf .

- Essorer le tissu sur la paroi du tube et le mettre dans le bouchon percé. Placer le bouchon percé sur un autre Eppendorf.
- Centrifuger 5 minutes à 8000 rpm .
- Faire une extraction « phénol-chloroforme » sur le surnageant.

1-E- Extraction d'ADN à partir d'un support contenant des cellules mâles et femelles (par exemple un écouvillon vaginal). [annexe I]

Principe :

Après mise en suspension des cellules fixées sur le support, les cellules mâles et femelles sont séparées par une **lyse différentielle**. L'ADN qu'elles contiennent est purifié par l'extraction « phénol-chloroforme ».

Mode opératoire :

- Déposer le coton de l'écouvillon avec une pince stérile dans un tube Eppendorf contenant la solution tampon F2.
- Laisser la nuit à 37 ° C (au minimum 4 heures).
- Percer un bouchon Eppendorf, égoutter le coton dans l'Eppendorf et mettre le coton dans le bouchon percé.
- Essorer par centrifugation à 8000 rpm pendant 5 mn.
- Récupérer le surnageant F2 et le garder à 4° C jusqu'à l'extraction « phénol-chloroforme ».
- Jeter le coton.
- Sur le culot de centrifugation qui contient les spermatozoïdes (qui sont plus lourds) ajouter 500µl de solution tampon M.
- Remettre ce culot en suspension.
- Placer 4 heures au bain-marie à 37° C.

- Après ce délai, les deux fractions F2 et M sont prêtes pour l'extraction « phénol-chloroforme » : on reprend ces 2 fractions dans 40 µl de TE 10-0,1.

Remarque : il est indispensable de faire une extraction préalable des écouvillons dans le tampon F1 quand il y a beaucoup de sang ou de cellules féminines sur l'écouvillon et de faire incuber une nuit entière à + 4°C.

1-F- Extraction d'ADN de cheveux ou de poils.

- Laver éventuellement les cheveux ou les poils dans de l'eau distillée stérile pour enlever des impuretés.
- Placer l'extrémité des cheveux, (minimum trois sauf cas exceptionnel) ou des poils (il faut au moins prélever 5 à 10 mm de poil au total) contenant absolument la racine dans laquelle se trouve l'ADN, dans du tampon SEB en y ajoutant 20 µl de DDT 1 M.
- Incuber 6 heures minimum à 56 ° C.
- Les cheveux sont parfois ramollis mais pas dissous. Dans ce cas, ajouter 20 µl de DTT 1M et 15 µl de Protéinase K à 10 mg/ml et incuber de nouveau au moins 6 heures à 56 ° C. Après ce traitement l'ADN qui se trouvait dans les racines du poil ou du cheveux est libéré.
- On procède alors à une extraction « phénol-chloroforme » .

1-G- Extraction d'ADN à partir de tissu humain à l'exception du tissu osseux.

Principe :

Le tissu est dissous dans un tampon contenant de l'urée. L'ADN est ensuite purifié par extraction au « phénol-chloroforme » et précipitation à l'éthanol.

Mode opératoire :

- Couper un cube de tissu de 5 mm de côté et le couper en petits morceaux.
- Le placer dans un tube Falcon de 15 ml contenant 5 ml de TEB.

- Incuber la nuit dans l'étuve à 56°C sous agitation douce.
- Extraire avec 5 ml de « phénol- chloroforme », puis avec 5 ml de chloroforme.
- Précipiter l'ADN avec 10 ml d'éthanol absolu.
- Agiter doucement jusqu'à l'apparition éventuelle d'un flocon d'ADN.
- En cas d'apparition du flocon, le pêcher et le redissoudre dans du TE 20-1 à la concentration de 100 µg/ml.
- En cas de non apparition du flocon il faut procéder à une nouvelle extraction :
 - Incuber à -20 °C pendant 30 mn.
 - Centrifuger 30 mn à 10000 rpm.
 - Décantier l'éthanol.
 - Rincer avec 10 ml d'éthanol 70 %.
 - Centrifuger 30 mn à 10000 rpm.
 - Décantier et estimer la masse du culot.
 - Sécher à la lampe.
 - Redissoudre l'ADN dans 300 µl de TE 20-1 et estimer la concentration sur minigel d'agarose.

2- Fragmentation de l'ADN par les enzymes de restriction :

L'ADN extrait est donc soumis à une digestion enzymatique grâce à des enzymes qui agissent au niveau des minisatellites.

D'une manière générale en Europe les enzymes utilisées sont Hinf I, Hae III, et Pst I (un effort d'harmonisation est réalisé en Europe pour obtenir des résultats comparables et reproductibles). Un des couples les plus utilisés est le couple Hinf I plus une sonde uniloculaire. En revanche les laboratoires du FBI utilisent plutôt Hae III .

Pour faciliter l'étape de digestion il faut opérer à 37°C et à un pH spécifique de l'enzyme utilisée. On met en excès l'enzyme et on laisse incuber 2 heures pour être certain que la digestion soit optimale.

3. Electrophorèse de l'ADN :

La suspension de fragments obtenue est ensuite déposée sur une plaque de gel d'agarose. Sous l'effet d'un champ électrique d'environ 23 V appliqué aux extrémités de la plaque, les fragments vont migrer dans le gel du pôle négatif vers le pôle positif.

L'ADN étant uniformément chargé négativement, les fragments vont migrer dans les « mailles » du gel selon leur taille. Le gel filtre les fragments et ralentit leur progression quand ils sont volumineux. Ainsi à la fin de la migration, les fragments sont donc strictement rangés sur le gel selon leur taille et leur poids.

Pour les techniques utilisées plus tard il est indispensable que la migration ait lieu sur un gel d'agarose. La concentration en agarose est généralement située entre 0.6 et 0.9%, ces gels permettent de séparer des fragments dont la taille varie de 0.5 à 20 kb.

Pour être certain qu'il n'y a pas de problème lors de la migration il est indispensable de faire migrer un fragment d'ADN connu très précisément et dont la migration est prévisible (donc on sait où on doit trouver ce fragment sur le gel). On utilise pour cela un marqueur de taille, le fragment utilisé varie d'un laboratoire à l'autre.

Préparation du gel :

- Dissoudre 1,3g d'agarose dans 130 ml de TAE 1X.
- Porter à ébullition tout en agitant avec un barreau aimanté (recouvrir avec une feuille d'aluminium), le liquide doit être limpide. Refroidir le mélange jusqu'à ce que la température soit inférieure à 50 °C.
- Nettoyer une plaque en verre à l'alcool. Poser cette plaque strictement à l'horizontal (vérification avec un niveau à bulle.). Placer le peigne qui sert à former des puits de dépôts (à distance égale) sur la plaque en verre. Couler 100 ml d'agarose en surfusion sur la plaque et laisser gélifier.
- Remplir la cuve de migration de 900ml de TAE 1X et placer le gel froid dans la cuve.

Dépôt des échantillons :

- Oter le peigne au dernier moment en le tirant verticalement.
 - Déposer les échantillons d'ADN et les fragments de contrôle sur le gel dans les traces du peigne : 1.5 ng d'ADN pour le marqueur de taille, 2 µg d'ADN pour les recherches de paternité et 0,5 µg pour les autres cas, 1µg d'ADN de cellule K562 digéré.
- La migration électrophorétique dure plusieurs heures (en moyenne 16 heures.).

4- Transfert selon Southern :

C'est à cette étape que Southern a réellement innové. En effet l'ADN ainsi séparé est piégé dans notre gel, il est impossible de l'hybrider directement à des sondes donc il est impossible d'identifier les fragments séparés. Southern et son équipe ont eu l'idée de transférer les fragments du gel sur un support solide. Le transfert se fait grâce au phénomène de capillarité.

Le gel d'agarose nécessite avant le transfert une préparation préalable : il faut agiter doucement le gel dans une solution de soude pour casser les fragments et faire passer l'ADN double brin en ADN simple brin.

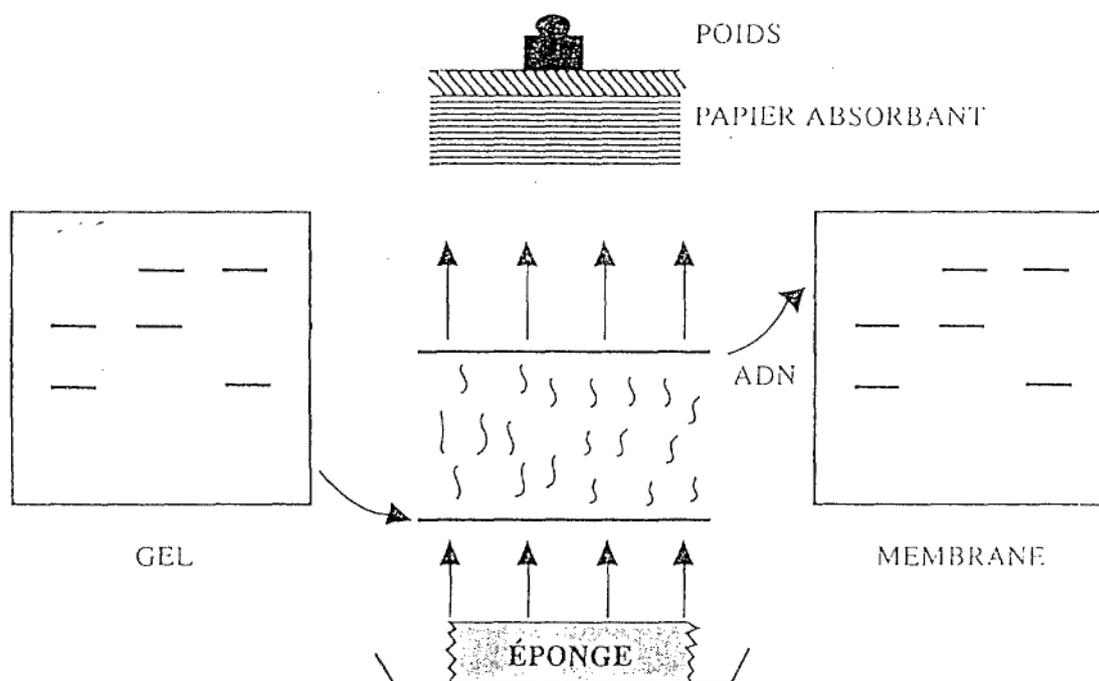
Le transfert se fait de manière très simple grâce à un dispositif ingénieux que nous allons décrire (voir l'illustration du principe en fin de page):

- On dépose le gel sur une éponge baignant dans une solution tampon de soude diluée. L'éponge trempe en permanence dans le tampon pour maintenir en permanence l'état d'hydratation nécessaire au transfert.
- Dépôt d'une membrane de nylon (sur laquelle se fait le transfert) sur le gel d'agarose. Celui-ci se retrouve donc littéralement pris en sandwich entre l'éponge hydratante et la membrane de nylon.
- On recouvre notre « sandwich » d'un papier hydrophile très absorbant qui va attirer par capillarité le tampon d'hydratation. Ainsi on crée un véritable courant liquidien ascendant qui va entraîner l'ADN du gel sur notre membrane de nylon. L'ADN est piégé dans la membrane grâce à un mécanisme inconnu. Les membranes utilisées sont de différentes qualités selon les fragments que l'on va étudier. En médecine légale on utilise des membranes en nylon, il va donc être indispensable de fixer notre ADN de manière

irréversible sur la membrane grâce à une irradiation UV (254 nm) pendant quelques minutes ou grâce à une cuisson à 80 ° C.

Ces opérations de transfert ont pour but de récupérer la totalité de nos fragments sur un support qui soit hybridable.

SCHEMA DU DISPOSITIF POUR EFFECTUER UN TRANSFERT D'ADN SELON SOUTHERN [28]



5- L'hybridation :

Il est nécessaire de faire une étape préalable à l'hybridation : la préhybridation. On va saturer notre membrane de nylon avec de l'ADN hétérologue qui ne fixera pas nos sondes mais qui permettra une bien meilleure résolution de l'image obtenue par autoradiographie. En effet cette étape est nécessaire car de même qu'elle est capable de fixer nos fragments d'ADN, la membrane est capable de fixer nos sondes ADN et alors on aurait une image uniformément noire sur l'autoradiographie. L'ADN hétérologue est obtenu à partir de sperme de saumon ou de hareng il est sous sa forme double brin (hétérologue), il ne fixera donc pas nos sondes.

On peut alors procéder à l'hybridation proprement dite, pour cela il existe différentes sondes suivant le locus que l'on veut étudier. Les sondes uniloculaires majoritairement utilisées en médecine légale sont actives à 65°C et nécessitent un temps de contact variant de 8 à 12 heures. On peut diminuer la température d'utilisation en ajoutant du formamide (dilué à 50%) et du sulfate de dextrane (5 à 10 %).

La solution comportant la ou les sondes utilisées est déposée au contact de la membrane de nylon soit dans un sachet thermoscellé, soit dans le rotor d'un four à hybridation.

Pendant cette phase on a donc hybridation entre l'ADN simple brin et nos sondes.

Après l'hybridation on procède à un lavage très strict de notre membrane là aussi pour obtenir une meilleure image par autoradiographie, car sans lavage on aurait des sondes qui resteraient « accrochées » à l'ADN.

6- L'autoradiographie :

Notre membrane étant lavée, on va appliquer à son contact un film photographique sensible au marqueur de sondes utilisées. Que les sondes soient radioactives ou non, le principe de détection est le même. La sonde marquée émet un signal qui va imprimer une plaque photographique. Ainsi on obtient une photo de la migration de nos fragments. Cette photo est le support que nous allons utiliser pour comparer les empreintes génétiques entre elles.

Le schéma ci après illustre le marquage d'une plaque photographique par une sonde radioactive [28].

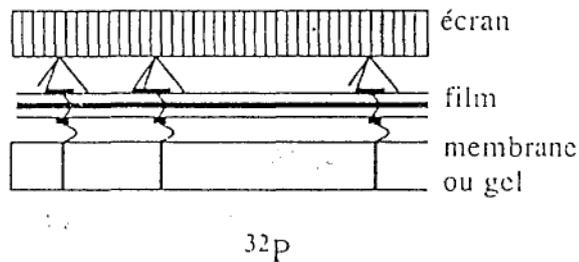


Schéma : Impression d'une plaque photographique par du phosphore 32

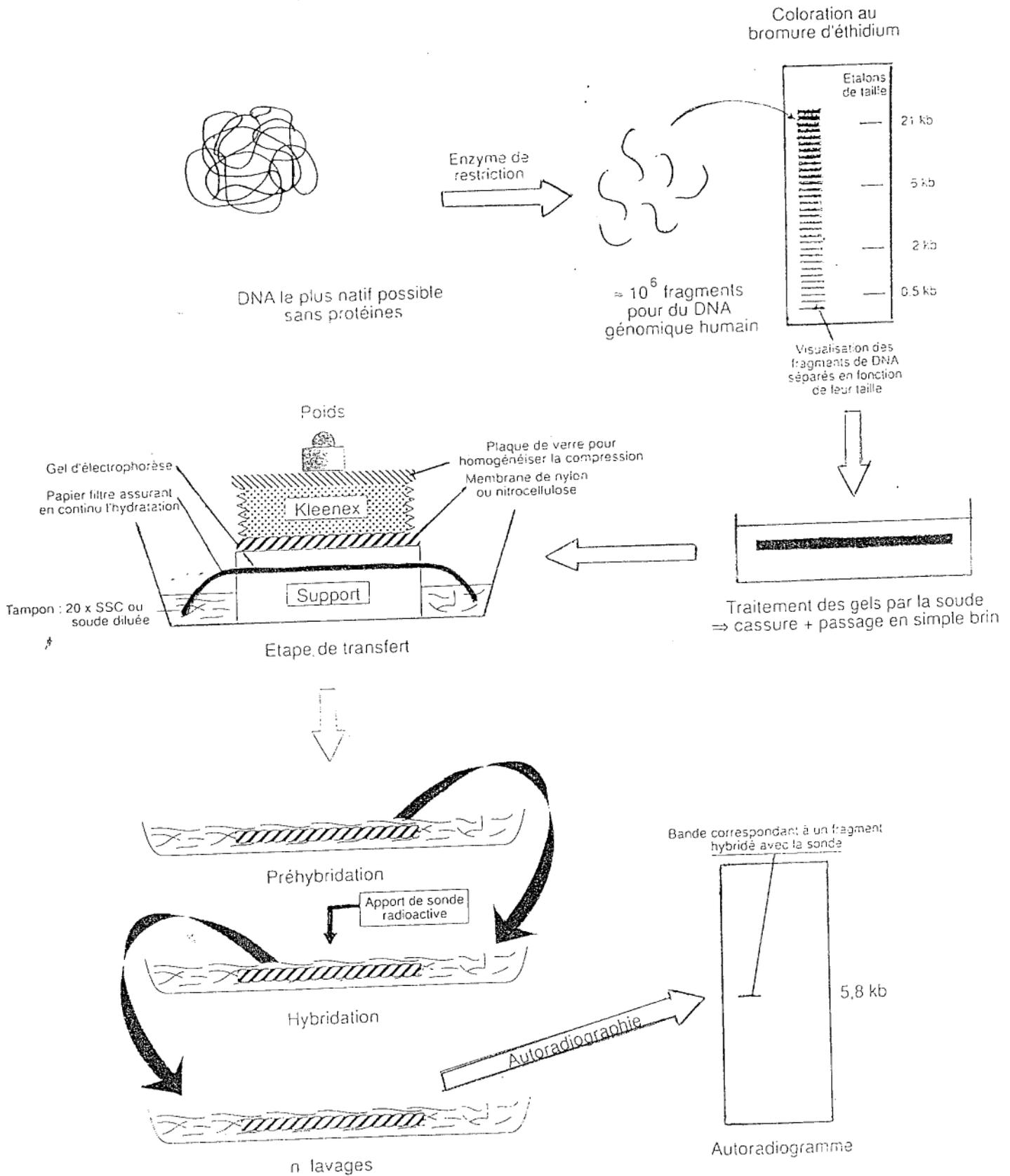
On place le dispositif à -80°C en présence d'écrans amplificateurs. Le temps d'exposition varie suivant la sonde et la quantité d'ADN à visualiser. On développe ensuite le film et on obtient une image de nos fragments ADN : deux bandes maximum pour les sondes uniloculaires et de multiples bandes pour les sondes multiloculaires (l'image forme un code à barres).

Après le développement, il est possible d'étudier d'autres fragments d'ADN avec de nouvelles sondes. On doit pour cela faire une déshybridation par incubation de la membrane avec de la soude à 0.4 N puis réhybrider avec notre nouvelle sonde (on peut réaliser jusqu'à 10 hybridations successives avec la même membrane de nylon).

Après toutes ces étapes l'ADN a révélé ce qu'on attendait de lui et il reste à faire les interprétations qu'il se doit.

Sur la page suivante nous trouvons un schéma récapitulatif des différentes étapes de la méthode de Southern [23].

Schéma : les différents étapes de la technique de Southern [23]



7- Les contrôles de qualité :

Etant donné les implications juridiques qu'ont les tests ADN, aucune erreur n'est admise et de nombreux contrôles sont effectués tout au long des différentes étapes.

7-A Contrôle de la qualité et de la quantité de l'ADN qui constitue l'échantillon :

Dès l'arrivée au laboratoire on doit faire une première estimation macroscopique de l'échantillon. En effet si l'échantillon a une odeur nauséabonde, un aspect putréfié ou une couleur grisâtre (autour d'une tache de sang sur un tissu), on en déduit qu'il y a une contamination bactérienne ou fongique et que l'ADN a été détruit partiellement. Dans ce cas la technique de Southern ne peut être utilisée. Après le premier contrôle visuel d'autres contrôles de qualité et de quantité sont menés en même temps. Il existe classiquement deux méthodes pour mener ces tests.

- la spectrophotométrie U.V :

Cette méthode consiste à mesurer la D.O de notre échantillon à 260 nm , sachant qu'une D.O de une absorbance correspond à 50µg/ml d'ADN double brin et 40 µg/ml d'ADN simple brin. Cette équivalence est obtenue par la formule :

$$\text{Concentration d'ADN en } \mu\text{g/ml} = \text{D.O}_{260} \times \text{facteur de dilution} \times 50 .$$

On connaît donc la quantité d'ADN extrait par simple mesure de sa D.O (on vérifie ainsi que après nos extractions il y a assez de matériel génétique pour poursuivre l'analyse).

Pour estimer la qualité de l'ADN, on se base sur le fait qu'un ADN de haut poids moléculaire (donc non dégradé par des bactéries ou des champignons.) a une absorbance maximale à 260 nm et qu'au contraire un ADN dégradé aura un maximum d'absorbance à 280 nm. On mesure donc l'absorbance à 260nm et à 280 nm et on calcule leur rapport. On considère qu'une empreinte génétique peut avoir lieu si le rapport A_{260}/A_{280} est supérieur à 1.5.

On utilise cette technique pour les grandes quantités d'ADN.

• Estimation sur gel d'agarose.

On compare nos extraits avec des fragments d'ADN connus utilisés comme des étalons internes (on utilise en général des dilutions du phage lambda). Ici encore on va étudier la qualité et la quantité de notre extrait en même temps, par une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 0.8 % pendant 2 heures. On utilise ce procédé pour les faibles quantités.

De plus, lorsque l'on pratique notre extraction on fait en même temps une extraction à partir de cellules témoins dont on connaît la quantité en ADN (on utilise généralement des cellules provenant d'une culture cellulaire de la lignée leucémique K 562), ainsi on vérifie qu'en cas de quantité insuffisante d'ADN ce n'est pas la technique d'extraction qui est en jeu mais l'échantillon initial.

Sur notre gel de contrôle de migration on a donc les calibreurs de taille, notre échantillon et de l'ADN de cellule K 562, on peut donc estimer la taille de l'ADN extrait en comparant sa migration avec la migration des calibreurs et on peut estimer la bonne marche de l'extraction en comparant la migration de notre extrait avec de l'ADN extrait des cellules K 562.

On peut en plus vérifier la qualité de l'ADN extrait qui doit migrer d'un seul tenant s'il n'a pas été dégradé par des contaminants extérieurs (les plus petits fragments font alors 20 kb). En effet s'il y a contamination préalable de notre échantillon, l'ADN est déjà un peu fragmenté et des petits fragments d'ADN vont migrer en laissant des traces , on obtient alors une tache de migration disparate (dans ce cas on n'utilise pas la technique de Southern pour analyser le prélèvement). Il faut donc être en présence d'ADN en quantité suffisante et de bonne qualité.

7-B Contrôle de l'origine de l'ADN de l'échantillon.

Il convient aussi de s'assurer de l'origine humaine du prélèvement lorsqu'il y a un doute (par exemple du sang sur un tissu...). Pour cela on fait une digestion de notre extrait par une enzyme de restriction précise (Pst I) par exemple, puis on fait une migration électrophorétique de 12 heures à 20 Volts suivie par un transfert sur membrane de nylon. On procède ensuite à une hybridation par les sondes DxZ1 et DyZ1 qui explorent respectivement les VNTR des chromosomes X et Y [22].

Les fragments obtenus par ces enzymes ont une migration parfaitement connue et spécifique. C'est pourquoi, si on obtient ces bandes de migration spécifique, on est certain de bien être en présence d'ADN humain. Si à cette étape on ne révèle ni chromosome X ni chromosome Y, alors on ne poursuit pas l'analyse.

7-C Contrôle de la digestion enzymatique.

La bonne digestion enzymatique de l'ADN de haut poids moléculaire par les enzymes de restriction est contrôlée par comparaison de la migration de nos fragments avec des fragments d'ADN témoin (extraits de cellules K 562) digérés dans des conditions contrôlées. On fait une migration avec les témoins, si la digestion est incomplète on replace l'ADN en présence de l'enzyme de restriction pendant au moins 2 heures à 37 ° C et on refait un nouveau contrôle. Quand le résultat de digestion est satisfaisant on peut continuer notre technique d'analyse.

7-D Contrôle de la bonne migration électrophorétique de l'ADN.

Ce contrôle se fait grâce à l'observation de la bonne migration de fragments témoins qui sont placés avec notre ADN sur le gel de migration électrophorétique avant le transfert.

On fait le contrôle grâce à une coloration par du BET (0.5 µg/ml) pendant 5 à 10 minutes, puis on rince le gel dans de l'eau distillée. On fait alors une vérification en milieu U.V : on éclaire le gel par une lumière U.V, on prend une photo et on vérifie la bonne migration de nos témoins (vérification de la distorsion ou du chevauchement) et si la photo est bonne on peut procéder au transfert sur la membrane de nylon.

8- Les limites de la méthode de Southern.

Les limites de cette méthode sont principalement de deux catégories :

8-A Les limites inhérentes à la résolution électrophorétique elle-même.

- Imprécision de résolution.

Il est vrai que le grand facteur limitant de la technique est la résolution électrophorétique. En effet tout repose sur la migration dans le gel des fragments en fonction de leur poids moléculaire (P.M). Donc le résultat final dépend de la capacité du gel à séparer des fragments d'ADN de P.M très voisins.

On sait que l'électrophorèse n'est pas capable de séparer des fragments ne différant que de quelques paires de bases, or on peut statistiquement retrouver des individus dont le nombre d'unités répétées dans un locus précis ne diffère que d'un seul motif (soit entre 11 et 16 pb) ce qui est extrêmement peu. Donc quand deux bandes sont franchement distinctes, on n'a pas de problème d'interprétation. En revanche quand deux bandes sont identiques sur l'autoradiographie ou presque identiques, il existe toujours un risque d'avoir une confusion entre deux fragments identiques ou deux fragments très voisins. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser plusieurs enzymes de restriction car alors la probabilité d'avoir deux fragments très semblables avec plusieurs enzymes est infime.

- Imprécision due à la quantité déposée dans les puits.

En plus de l'imprécision due à la séparation électrophorétique, la quantité d'ADN déposée dans les puits peut influencer l'interprétation des résultats [annexe II] . En effet, il est toujours difficile de charger la même quantité d'ADN dans les puits (car on manipule des quantités extrêmement petites) et ainsi la largeur de la bande obtenue par autoradiographie peut varier uniquement à cause de ce phénomène. De même que précédemment, c'est quand on a deux bandes très proches que l'on peut avoir une erreur. Si une bande est large cela peut être du à un dépôt trop important où bien à deux bandes très proches qui ont la même migration et qui se confondent sur l'autoradiographie. Pour éviter ce type de problème, on utilise plusieurs sondes et on fait plusieurs migrations pour une même affaire criminelle.

- Imprécision due à la qualité de l'ADN :

Les imprécisions ne sont pas forcément dues à la résolution électrophorétique ou à la quantité du dépôt mais elles peuvent être dues à des différences de provenance de l'ADN.

En effet on a pu constater que l'ADN extrait de sang, de cheveux, ou de sperme n'a pas exactement la même migration même si la provenance est la même. On appelle cela un **asynchronisme** de migration. Par exemple pour apprécier ce décalage en médecine légale dans une affaire de viol, on mesure le décalage entre la migration des cellules sanguines de la victime et les cellules vaginales de l'échantillon pris au moment du viol. Dans un deuxième temps on applique ce décalage à l'ADN des spermatozoïdes de l'échantillon et à celui du ou des suspects.

8-B Les limites inhérentes à la quantité et à la qualité de l'ADN de départ.

Pour utiliser la technique de Southern il faut une quantité d'ADN suffisante : il faut au minimum 50 ng d'ADN soit quelques microlitres de sang ou 3 bulbes de cheveux. Au dessous de ces quantités, les résultats ne sont pas valables. De plus certains facteurs extérieurs peuvent jouer sur la qualité de l'ADN :

- Dégradation par les U.V quand l'échantillon reste au soleil.
- Fragmentation de l'ADN par les enzymes de lyse cellulaire libérée lors de la mort de la cellule.
- Contamination par des bactéries du milieu extérieur.

Les **conditions de stockage** de l'échantillon sont donc **primordiales** mais ne dépendent pas souvent des personnes qui vont ensuite manipuler l'ADN, c'est pourquoi d'autres techniques d'identification génétique sont nécessaires pour contourner ces problèmes de quantité et de détérioration.

9. Interprétation des résultats obtenus.

La détermination de la taille des fragments est une étape essentielle dans l'interprétation des résultats. La distance de migration est appréciée par rapport à une échelle de taille, constituée d'ADN viral de taille connue. La taille du fragment étant proportionnelle à la distance de migration, on peut la déterminer soit par une méthode graphique (échelle logarithmique de correspondance entre la distance de migration et le nombre de paires de bases), soit par une méthode informatique (traitement d'image après scanning des autoradiographies).

Selon l'enzyme de restriction, le fragment étudié et la sonde choisie on utilise des marqueurs de taille différents .

L'erreur qui peut être commise lors de la mesure d'un fragment dépend en fait de sa taille : les fragments entre 2 et 4 kb présentent une meilleure définition sur l'autoradiographie. Au dessous de 1 kb, l'interprétation est délicate car ces fragments subissent un phénomène de diffusion entre les « mailles » du gel. De même le signal sur l'autoradiographie est très faible (certains fragments très petits vont même sortir du gel d'autoradiographie). Pour des fragments trop gros les erreurs sont possibles, et on ne distingue pas bien au niveau de la migration des fragments différents de peu de bases.

En médecine on admet que deux profils dont les allèles correspondent à 2,5 % ou 2,8 % du nombre moyen de paires de bases des fragments étudiés sont considérés comme provenant de la même source.

Les problèmes de contamination et de décalage :

Les contaminants bactériens et fongiques [Annexe III] peuvent entraîner une migration légèrement différente entre deux profils. Si la limite des 2,5 % - 2,8 % est respecté on peut en déduire que les profils sont identiques . On a déjà vu qu'il pouvait y avoir des décalages et que pour pallier à ce problème il faut faire des comparaisons de migration.

Avant d'affirmer l'inclusion ou l'exclusion d'un suspect, il faut être bien certain que l'on peut se fier à notre migration. C'est pourquoi autour de la migration des fragments du suspect et des échantillons biologiques prélevés sur le lieu du crime, on procède à des migrations de fragments témoins connus qui vont nous indiquer si la migration est bonne ou non.

Conclusion :

Cette technique est encore assez utilisée notamment dans les cas de recherche de paternité [8] [Annexe IV et V], mais ses limites quant à la quantité d'ADN minimum requis ainsi que la nécessité d'avoir un ADN bien conservé font que dans de nombreux cas elle ne peut être utilisée. C'est pourquoi de nouvelles techniques ont été mises au point.

2.LA METHODE D'AMPLIFICATION D'ADN IN VITRO.

Introduction :

Cette méthode a été mise au point par K.Mullis en 1985 , ce qui lui valut le prix Nobel de chimie. Cette méthode a connu un succès et un essor spectaculaire qui en font aujourd'hui une des techniques de biologie moléculaire les plus répandues.

La méthode d'amplification élective in vitro, plus connue sous le nom de PCR (Polymerase Chain Reaction) est extrêmement répandue de nos jours et elle rend, notamment en médecine légale, de nombreux services.

Elle sera utilisée chaque fois que la quantité d'ADN est insuffisante où que l'ADN est partiellement dégradé, car elle ne nécessite que peu de matériel génétique. Dans un premier temps nous allons étudier la méthode générale de la technique PCR, puis dans un deuxième temps, nous étudierons ses applications au travers des nombreuses publications qui sont parues à ce sujet.

1. La méthode d'amplification par PCR :

1-A Intérêt :

L'intérêt de cette méthode réside principalement dans trois points :

- Une très petite quantité d'ADN de l'ordre du nanogramme (ng) est suffisante pour réaliser cette technique.
- C'est une méthode rapide.
- Elle permet d'obtenir des centaines de répliques de l'échantillon à analyser.

1-B Principes généraux de la méthode :

La méthode repose sur une des propriétés fondamentales de l'enzyme « ADN polymérase » (enzyme qui permet de synthétiser à partir d'un brin d'ADN simple brin le brin complémentaire) qui ne peut répliquer l'ADN simple brin que s'il existe une amorce d'ADN dans le milieu réactionnel. Pour réaliser une amplification par PCR, il faut connaître le fragment que l'on veut étudier ainsi que les deux séquences nucléotidiques qui l'encadrent.

Les amorces qui seront utilisées **correspondent** justement à **ces séquences d'encadrement**. Ainsi les amorces vont s'hybrider aux extrémités 3' du fragment à répliquer et l'ADN polymérase va effectuer son travail de réplication du fragment. A chaque cycle de réplication on augmente la quantité du fragment souhaité par deux, on a donc une réplication exponentielle. Ainsi après une trentaine de cycles, on obtient une amplification de 10^6 ce qui permet de pouvoir étudier ce fragment beaucoup plus facilement.

⇒ Déroulement de la méthode :

La technique PCR se déroule en trois étapes : dénaturation, hybridation, et élongation.

1- Dénaturation :

L'ADN contenant le segment à amplifier est placé dans un tube spécifique imbriqué dans un bloc chauffant. Il est placé en présence de tous les composants nécessaires à la bonne marche de l'amplification que nous étudierons en détail ultérieurement. On chauffe notre tube et son contenu à 95°C pendant 30 à 60 secondes. Cette étape a pour but de dénaturer le brin d'ADN qui passe sous la forme d'ADN simple brin.

2- Hybridation :

Pour effectuer cette opération on fait descendre la température jusqu'à obtenir un milieu réactionnel voisin de 50°C . A cette température, les amorces vont pouvoir s'hybrider avec leur séquence complémentaire. Cette opération dure entre 30 et 60 secondes. On met dans le milieu réactionnel deux amorces, chacune correspondant à une extrémité 3' d'un des deux brins.

3- Elongation :

Lors de la troisième étape, on chauffe à nouveau le tube pour obtenir une température voisine de 72°C. A cette température, l'ADN polymérase va pouvoir faire son travail de réplication et on obtient une copie du fragment désiré. En fait on obtient deux copies car chaque brin issu de la séparation du double brin va être répliqué.

Au cours de ces trois étapes on a donc une amplification spécifique d'un fragment d'ADN préalablement défini. On peut recommencer un nouveau cycle - dénaturation, hybridation, élongation - jusqu'à 50 fois, sans changer de milieu réactionnel ni ajouter de nouveaux réactifs. A la fin de nos n cycles, on devrait donc obtenir 2^n fragments de l'ADN de départ. Cependant le rendement de l'amplification n'est pas de 100 % mais de l'ordre de 85 %, on obtient donc en général $(1.85)^n$ copies de notre échantillon de départ. Le produit de notre amplification est communément appelé **amplimère**.

Voir le schéma récapitulatif de la technique PCR sur la page suivante [23]

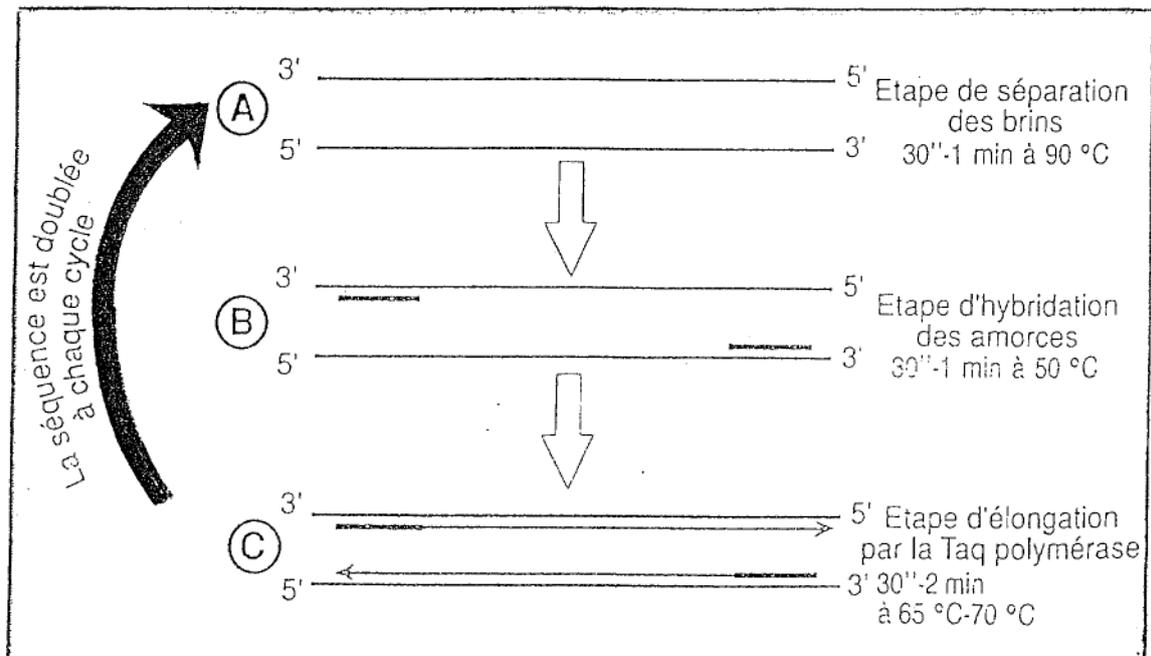
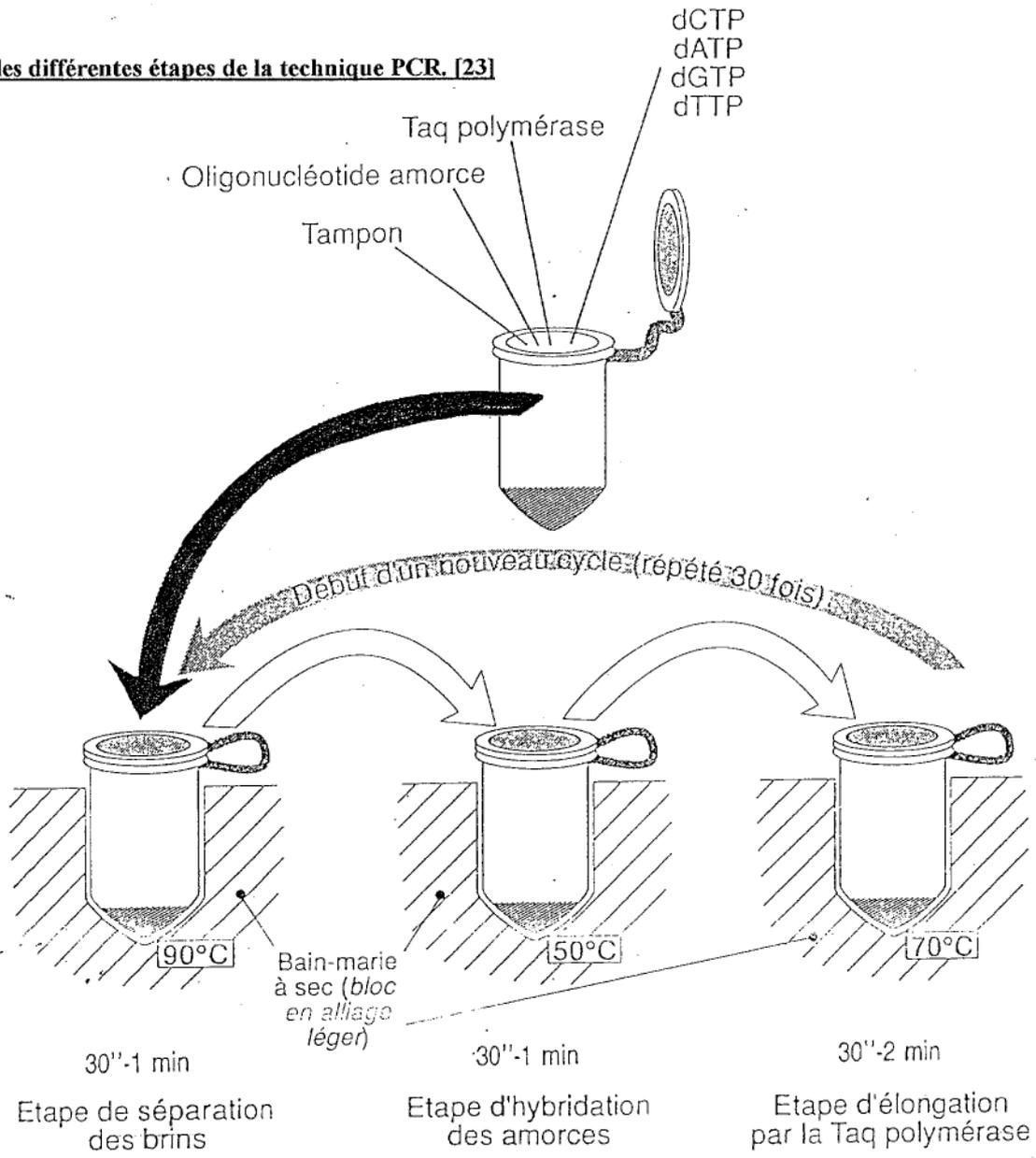
⇒ Matériel biologique utilisé :

Si le principe de la technique PCR est simple, sa mise en route en revanche est plus complexe : toutes les étapes et tous les réactifs doivent être extrêmement maîtrisés afin que les fragments obtenus soient conformes à ce que l'on attend. C'est pourquoi nous allons étudier le matériel biologique utilisé pour faire cette technique :

1-L'échantillon d'ADN :

En médecine légale les échantillons d'ADN qui sont utilisés viennent souvent de traces biologiques retrouvées sur le lieux d'un crime. Dans ces échantillons, l'ADN y est donc toujours en petite quantité et pour l'utiliser il faut préalablement l'extraire de notre prélèvement par une méthode dite chelex qui nous permet de récupérer le maximum d'ADN. De toutes les façons, **la quantité d'ADN minimale à utiliser est de 1 ng d'ADN**. Nous

Schéma : les différentes étapes de la technique PCR. [23]



étudierons ultérieurement plus en détail les différents types de matériel biologique qui peuvent être utilisés lors de l'analyse médico-légale par PCR.

2- L'enzyme de polymérisation :

Il faut que cette enzyme soit thermostable, c'est-à-dire qu'elle ne soit pas détériorée par de fortes températures. L'enzyme la plus utilisée actuellement est « Taq polymérase », c'est une enzyme extraite d'une bactérie, *Thermus aquaticus*, qui vit dans des sources d'eau chaude (50°C à 80°C). Les quantités optimales d'enzymes à utiliser sont de l'ordre de 50 à 100 µl suivant le nombre de cycles que l'on désire pratiquer.

3- Les nucléotides :

Afin d'éviter au maximum les erreurs de réplication de notre enzyme de polymérisation, chaque nucléotide est introduit en petite quantité égale. On recommande d'obtenir dans le milieu réactionnel une concentration entre 20 et 200 µM de chaque nucléotide.

4- Les amorces :

Ce sont les amorces qui **permettent d'amplifier** une séquence plutôt qu'une autre, elles ne sont donc pas choisies au hasard. Pour amplifier un fragment, il faut d'abord **connaître les séquences qui le flanquent**, car les amorces vont correspondre à ces séquences latérales. L'hybridation entre l'ADN et l'amorce se fait à une température inférieure à celle de l'activité de la Taq polymérase. En fait, plus la température spécifique d'hybridation de l'amorce est éloignée de celle de l'activité de la Taq polymérase, plus la réaction se déroule dans de bonnes conditions. Ainsi à chaque étape (donc à chaque température) on a un seul mécanisme biologique qui se produit ce qui est meilleur pour le rendement. On estime qu'il faut au moins une différence de 5°C entre les deux températures optimales de la sonde et de la polymérase. On utilise en général une concentration entre 0,1 et 0,2 µM d'amorces pour notre amplification.

5- Le magnésium :

Il permet de stabiliser la réaction d'hybridation , il faut obtenir dans le milieu réactionnel une concentration en ions magnésium de l'ordre de 0,5 à 2 mM.

6- Le milieu réactionnel :

On utilise des solutions de tampon Tris HCl à un pH compris entre 8,3 et 8,8 afin que l'activité de l'enzyme soit maximale. On utilise des concentrations de 10 à 50mM.

C- Les limites de la méthode :

La première limite est celle de la taille des fragments que l'on peut amplifier. Il n'est guère possible d'amplifier des fragments de plus de 3 kb et d'une façon générale, on amplifie des fragments de l'ordre de 1,5 kb car c'est pour cette taille de fragments que le milieu réactionnel est le plus maîtrisé.

La seconde limite est la quantité d'ADN que l'on veut amplifier. En effet il faut au minimum 1 ng d'ADN pour que notre amplification soit réalisable. De même pour des quantités avoisinants le ng, il est préférable d'effectuer deux amplifications successives pour être certain d'obtenir une bonne quantité du fragment cible voulu .

La troisième limite concerne le nombre de cycle maximum que l'on peut effectuer. En effet, après 40 à 50 cycles, la quantité d'ADN ne change plus, le plateau d'amplification est atteint.

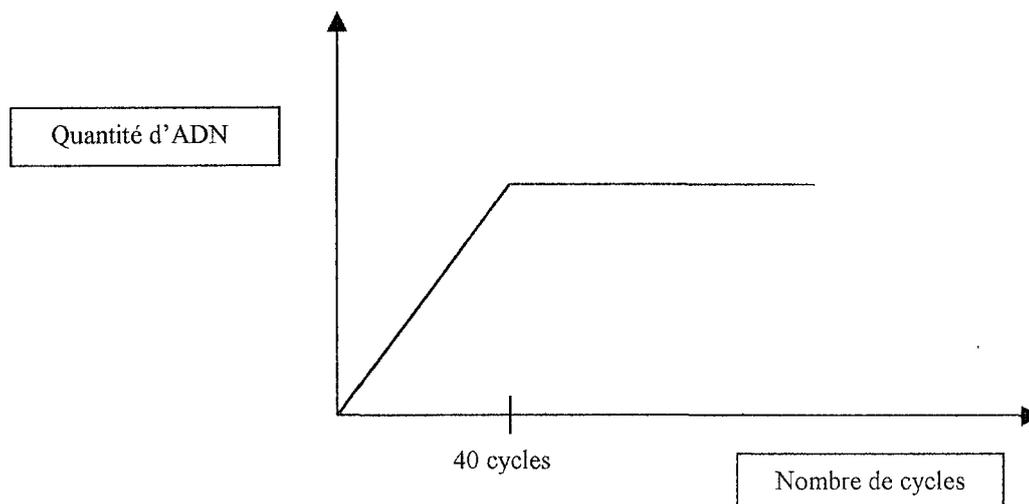


Schéma : plateau d'amplification PCR.

La quatrième limite qui pose le plus de problème car elle est moins bien maîtrisée, c'est le problème de la contamination. En effet, on imagine bien que la moindre trace d'ADN qui ait pu rester dans l'appareil d'amplification peut être amplifiée à son tour et peut alors totalement fausser les résultats. On imagine les conséquences qu'une contamination pourrait avoir sur un résultat utilisé en médecine légale. En pratique la plus grande source de contamination vient des manipulations antérieures car après amplification, on possède des milliers de copies du fragment cible et la moindre éclaboussure même « invisible » projette des copies sur les appareils de manipulation. Même s'il est impossible de supprimer totalement le risque de contamination, toutes les précautions sont prises pour éviter au maximum d'avoir des contaminants :

- Utilisation au maximum de matériel jetable.
- Autoclaver autant que possible les solutions pour dégrader un possible ADN contaminant. (on ne peut par contre pas autoclaver les solutions de nucléotides et les solutions d'enzymes.)
- Décontaminer les cuves d'électrophorèse utilisées pour la purification des fragments amplifiés avec de l'HCl 1 N pendant une heure (dépurination de l'ADN).
- Certains laboratoires séparent dans une pièce spéciale les réactifs utilisés avant l'amplification. Dans ce local on ne doit manipuler ni ADN cloné, ni produit d'amplification.

2- La technique multiplex [33]:

Les progrès sont tels dans le domaine de la PCR qu'il est actuellement possible, dans un même bain réactionnel et sans augmenter le nombre de cycles d'amplification, de réaliser des amplifications de plusieurs fragments désirés. En effet, si les amorces utilisées sont suffisamment différentes pour qu'il n'y ait pas d'erreur d'appariement, des séquences différentes du même brin d'ADN peuvent être co-amplifiées. Il faut pour cela mettre les amorces en quantité adéquate et bien respecter les temps de chaque cycle. De nombreux kits sont actuellement commercialisés. On peut amplifier jusqu'à six loci informatifs simultanément. Sachant que l'étude d'un seul fragment polymorphe n'est pas suffisante pour donner une conclusion quand au profil génétique d'un individu et qu'il faut toujours étudier

entre 5 et 6 fragments pour avoir un degré d'informativité de 0.99 , on comprend que la possibilité d'amplifier plusieurs fragments en même temps soit extrêmement utile en médecine légale. Ainsi on gagne beaucoup de temps et à partir d'une seule manipulation on peut avoir un profil génétique.

3- La technique PCR appliquée à la médecine légale :

Dans cette partie nous allons aborder plus précisément l'utilité de cette méthode dans des cas pratiques vus en médecine légale.

A- Les fragments explorés en médecine légale :

De même que dans la méthode de Southern, les fragments qui sont intéressants vont être des fragments dits informatifs qui vont donc donner des renseignements très précieux sur l'origine des différents échantillons d'ADN que l'on peut être amené à rencontrer en médecine légale. Ils sont de trois types :

1- Les STR et les VNTR :

Ce sont les fragments décrits lors de la première partie ils ont un degré de spécificité élevé, ce sont toujours les mêmes fragments qui sont étudiés (après étude de population [4] [35]), ils sont représentés dans le tableau ci dessous.

LOCUS	NATURE DU FRAGMENT
D1S80 [34]	VNTR
D17S30	STR
D20S85	STR
CSF1PO	STR
TPOX	STR
TH01	STR
D3S1358	STR
VWA	STR
FGA	STR

Tableau des loci étudiés par PCR en médecine légale.

2- La région HLA DQ α :

L'amplification de la région HLA DQ α permet elle aussi d'établir un premier profil d'un suspect. Cette région code pour des protéines du système majeur d'histocompatibilité. C'est une région de haut degré de polymorphisme. Elle comporte 239 bases et il existe 8 allèles différents de ce locus. (A1-1, A1-2, A1-3, A2, A3, A4-1, A4-2 et A4-3).

On peut étudier le profil d'un suspect en amplifiant cette région pour savoir quel est son génotype pour ce locus HLA DQ α . (Remarque : Le système d'amplification utilisé aujourd'hui ne reconnaît que 6 des 8 allèles de la région HLA DQ α) .

3- L'ADN mitochondrial :

L'ADN mitochondrial est très utilisé lorsqu'on utilise la méthode PCR et son étude fera l'objet d'une troisième partie.

B- Mise en évidence des amplimères :

Les fragments amplifiés sont maintenant en grand nombre, et nous disposons d'une quantité d'ADN suffisante pour les analyser. Il existe plusieurs techniques pour révéler nos amplimères que nous allons étudier une à une.

1- L'électrophorèse :

• Sur un gel non dénaturant horizontal :

On utilise un gel d'électrophorèse non dénaturant quand les fragments amplifiés ne sont pas trop petits et qu'ils vont donc être correctement séparés par le gel. Les gels non dénaturants sont à base d'agarose, ils servent à séparer des fragments de 0,2 à 50 kb (gel à 1,5 % d'agarose pour l'ADN de 0,2 à 3 kb, gel à 0,9 % pour l'ADN de 1 à 7 kb, et gel inférieur à 0,9 % pour les plus gros fragments d'ADN). Après migration, on fait passer sur notre gel une solution de bromure d'éthidium ou de sels d'argent. Ces deux composés ont la particularité de se fixer à l'ADN. La coloration aux sels d'argent est directement visible. En revanche, il faut éclairer notre gel grâce à une lampe ultra violet pour mettre en évidence le

bromure d'éthidium qui est alors fluorescent. On fait toujours migrer sur le gel en même temps que notre échantillon des marqueurs de taille et des marqueurs de bonne migration afin de pouvoir connaître le PM de notre échantillon et d'être certain que l'analyse s'est bien déroulée, et qu'elle est donc valable.

- **Sur un gel dénaturant horizontal :**

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (ou PAGE en Anglais), dit gel dénaturant, va permettre une très bonne séparation lors de la migration de fragments ne pouvant varier que de quelques paires de bases. La révélation de la migration dans un tel gel ne peut se faire par le bromure d'éthidium ou les sels d'argent (car l'ADN est sous forme monobrin et que ces colorants ne se fixent que sur de l'ADN double brin.). On procédera préalablement à un marquage (radioactif ou non) des amorces qui sont utilisées lors de l'amplification. On fait après migration une lecture, soit par autoradiographie si les amorces sont marquées par du P32, soit par fluorimétrie si les amorces sont marquées par un produit chromophore fluorescent.

Le gel dénaturant sert donc à séparer des fragments inférieurs à 500 pb. Pour des fragments entre 80 et 500 nucléotides on utilise des gels à 5 % de polyacrylamide, pour des fragments entre 25 et 120 nucléotides des gels à 25 % de polyacrylamide

- **Sur un gel, dénaturant ou non, suivit d'un transfert sur membrane :**

Lorsqu'on a effectué une coamplification de plusieurs fragments en même temps par la méthode multiplex, la détection de nos amplimères ne peut se faire directement par coloration du gel. On doit d'abord procéder à un transfert du gel sur une membrane de nylon. Une fois le transfert effectué, on peut procéder à des hybridations successives des amplimères avec des sondes marquées (radioactives ou non) qui soient spécifiques de chaque amorce utilisée.

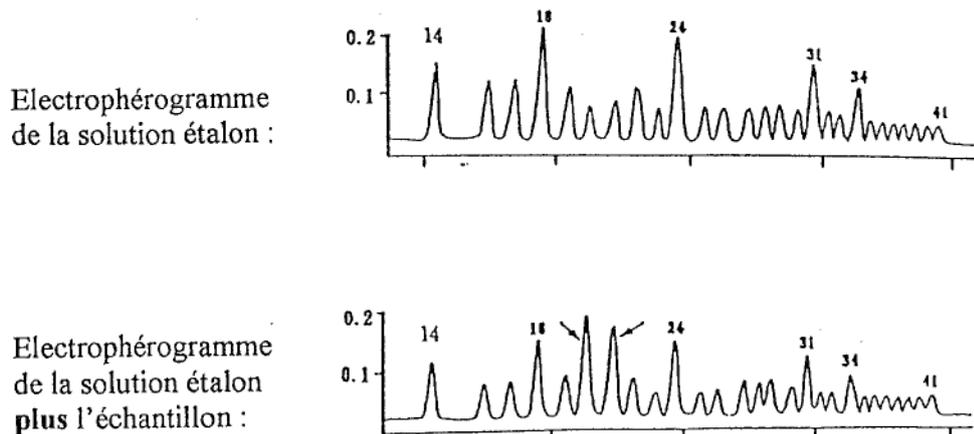
• **L'électrophorèse capillaire (Capillary Zone Electrophoresis : CZE)[41] [43]:**

L'avantage de cette méthode de détection des amplimères est son extrême degré de résolution. Elle peut permettre de différencier des allèles très voisins (en théorie voisin de 2 paires de bases).

Technique :

- On prépare un gel de 10 cm de long et 50 μ m de circonférence.
- On introduit 50 μ g d'amplimère sur le sommet du capillaire. On soumet le gel pendant 45 secondes à une tension de 400 V/cm. On force ainsi le début de migration.
- On procède ensuite à une électrophorèse classique : on soumet le gel pendant 15 minutes à une tension de 250 V/cm, puis pendant 25 minutes à 210 V/cm. Le tout à 29°C.
- A la sortie du capillaire, on détecte les fragments par spectrophotométrie. On obtient alors un électrophérogramme (voir schéma) que l'on peut comparer à un électrophérogramme de référence. Par exemple si on étudie le locus D1S80 par électrophorèse capillaire, on fait dans un premier temps un étalonnage de notre gel en faisant passer une solution contenant les 16 allèles de ce locus (solution d'étalonnage), puis on fait passer dans un deuxième temps la solution contenant notre amplimère plus la solution étalon. En comparant les deux électrophérogrammes, on en déduit quel est ou quels sont le ou les allèles présents [41].

Schéma : électrophérogrammes de la solution étalon et de l'échantillon [41]



L'échantillon contient les allèles 20 et 21

Dans cette méthode, on évite les problèmes d'interférence de bandes (distorsions) que l'on peut rencontrer avec les électrophorèses classiques. Cependant elle n'est pas utilisée en routine mais seulement quand on rencontre un problème de résolution.

- **Révélation par un système de couleur :**

Avec l'électrophorèse dite classique, nous avons vu qu'il peut y avoir des interférences au niveau des bandes lors de la migration. Une nouvelle technique a été mise au point en utilisant des marqueurs colorés, on appelle cette technique le « dualcolour system » [9], qui tente de limiter voir d'annuler ces problèmes de distorsion. On va introduire lors de la migration dans le gel des marqueurs de taille qui sont marqués par un marqueur fluorescent. De même les amorces qui ont servi à l'amplification sont marquées par un marqueur fluorescent.

On peut par exemple utiliser le TRI-TC pour marquer les marqueurs de taille, ils seront alors détectables à 585 nm par une lumière fluorescente : ils apparaîtront en vert dans les appareils de mesure. On marque alors les amorces au Rouge Texas détectable à 605 nm.

Après migration sur notre gel, un appareil peut lire le résultat de migration en émettant les deux longueurs d'onde spécifiques. Sur le gel on obtient donc les résultats en 2 couleurs et ainsi s'il y a eu chevauchement entre les fragments et les marqueurs de taille on a un moyen de ne pas les mélanger. D'après les études menées sur cette méthode, il s'avère qu'elle est très fiable et qu'on n'a pas le problème de distorsion de bandes que l'on peut avoir par les méthodes dites classiques. Cependant cette méthode n'est pas encore utilisée en routine.

2- Le dot blot inverse :

Le reverse dot blot n'a été longtemps utilisé en médecine légale que pour révéler les produits d'amplification de la région HLA DQ α

On fixe sur une membrane (en général un filtre) des sondes spécifiques de chaque allèle qui peut être mis en évidence (la fixation de chaque sonde est localisée très précisément). On dépose notre produit d'amplification sur les différentes sondes. Une réaction colorée se produit lorsqu'il y a appariement de l'allèle amplifié et de la sonde.

Grâce à ce procédé on peut avoir une première approche génotypique de l'individu.

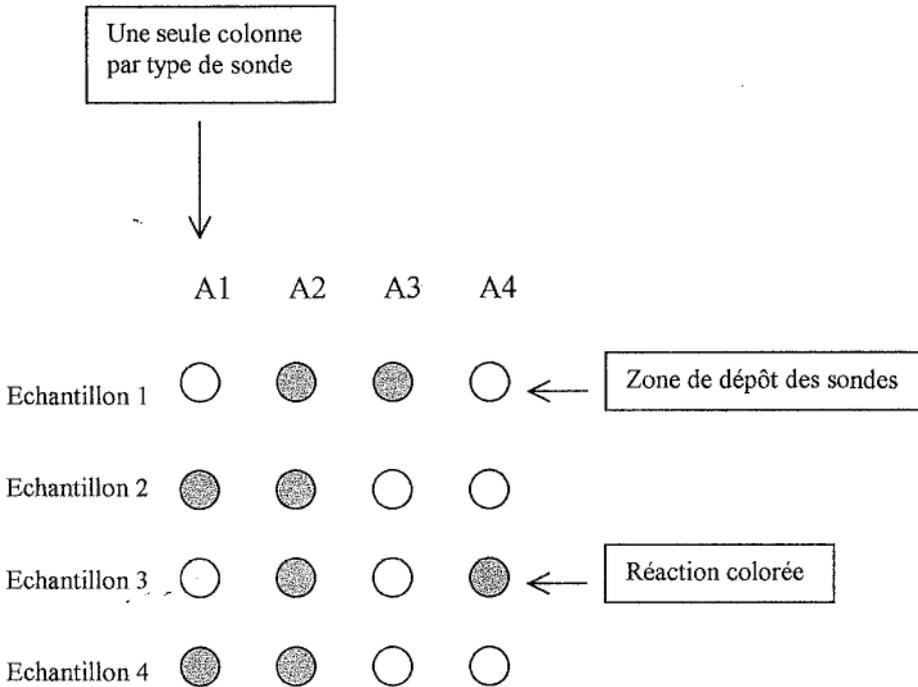
Exemple de l'étude de la région HLA par la technique de dot blot inverse dans une affaire de viol .

Echantillon 1 : ADN de la victime.

Echantillon 2 : ADN de sperme retrouvé sur la victime.

Echantillon 3 : ADN du suspect 1.

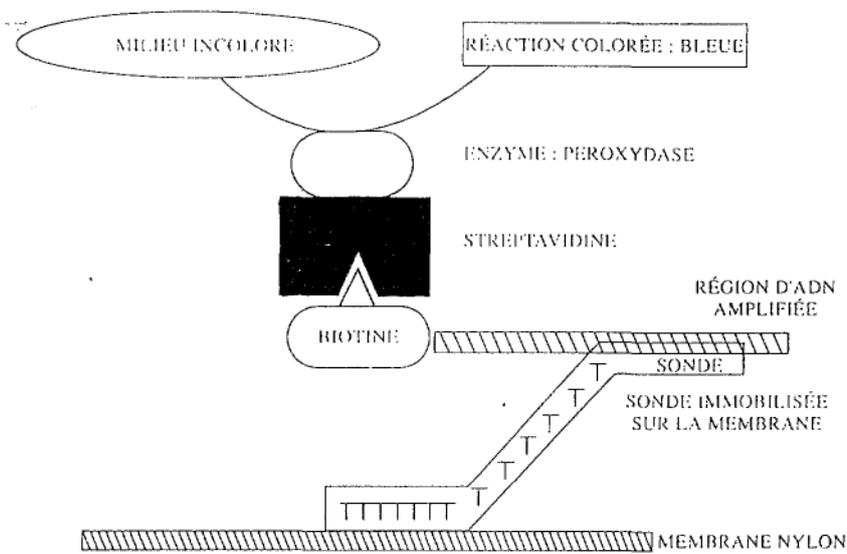
Echantillon 4 : ADN du suspect 2.



On peut tout de suite innocenter le suspect 1 par contre les soupçons sur le suspect 2 se renforcent et il faut faire des tests complémentaires pour conclure si oui ou non le suspect est bien l'auteur du viol.

Principe de la réaction colorée :

Pendant l'amplification par PCR, on fixe (par exemple) de la biotine à nos amorces. De même on fixe sur le filtre en même temps que nos sondes un colorant comme la streptavidine conjuguée à une enzyme peroxydase. S'il y a appariement entre la sonde spécifique et l'amorce, on a alors une réaction colorée entre la biotine et le complexe streptavidine- peroxydase. Le schéma ci après illustre la réaction colorée.[28]



L'avantage du dot blot inverse réside dans le fait qu'il n'est pas nécessaire de faire une électrophorèse sur gel. C'est un mode de révélation très rapide.

Depuis quelques années, une technique nouvelle se développe l'«Amplitype Polymarker DNA ». Cette technique permet de co-amplifier 5 loci et de les étudier ensuite par une technique de dot blot inverse. Un kit de détection par cette méthode est aujourd'hui disponible et il est régulièrement utilisé en médecine légale.

C- Les applications de la PCR en médecine légale :

En médecine légale, la PCR va être utilisée chaque fois que les quantités d'ADN dont nous disposons sont insuffisantes ou que l'ADN est endommagé. En effet à titre indicatif nous allons répertorier dans un tableau les quantités minimales nécessaires pour l'analyse de différents échantillons selon la méthode de Southern puis selon la méthode PCR.

	SOUTHERN multiloc.	SOUTHERN uniloc.	PCR
ADN	1 µg	0,1 µg	1 ng
SANG	60 µl	6 µl	1-2 µl
SPERME	5 µl	2,5 µl	0,5- 1µl
CHEVEUX	5 racines	2-3 racines	1 cheveu même sans racine
ETAT DE L'ADN	Bien conservé	Bien conservé	Bien conservé Partiellement dégradé

Les supports génétiques utilisés peuvent être classés en deux catégories: ceux qui sont utilisés aussi pour la méthode de Southern et ceux qui constituent un progrès par rapport à Southern car ils n'étaient pas exploitables par cette méthode.

D'une manière générale, même si le mode de récupération de l'ADN du support sur lequel il se trouve est le même dans la méthode de Southern et dans la méthode PCR, la purification de l'ADN extrait est différente dans la méthode PCR, elle se fait par une méthode dite chelex. On a pu constater que les prélèvements purifiés par cette méthode donnent de meilleurs résultats [12].

Déroulement de la méthode CHELEX :

- Incuber à température ambiante le produit récolté du support pendant 30 minutes dans de l'eau distillée en agitant doucement de temps en temps. (On incube le tout dans un tube en verre).
- Centrifuger 3 minutes à 3000 g.
- Jeter le surnageant, et ne garder que le culot.
- Ajouter 200 µl de solution de chelex (qui est une résine avec une haute affinité pour les ions) à 5 %.
- Vortexer 10 secondes.
- Incuber de 30 minutes à 12 heures selon l'origine de l'échantillon.
- Vortexer à nouveau 10 secondes.
- Placer le tube au bain-marie bouillant pendant 8 minutes.
- Vortexer 10 secondes.
- Centrifuger 5 minutes à 3000 g.
- Récupérer environ 170 µl du surnageant qu'il va falloir purifier par un appareil : notre ADN est prêt pour l'amplification.

1- Le matériel utilisé aussi pour la technique de Southern :

a- Recherche sur un échantillon de sang.

On peut utiliser la PCR pour les recherches de paternité ou de maternité, en faisant un prélèvement sanguin du père ou de la mère présumé et de l'enfant. On doit prélever au minimum 5 ml chez les adultes et 1 ml chez le petit enfant, on réalise le prélèvement sur un tube EDTA.

On utilise aussi du sang frais pour comparer l'ADN d'échantillons retrouvés sur le lieu d'un crime et l'ADN du ou des suspects. Quand on fait une PCR sur sang frais on n'est bien évidemment pas dans un cas où le matériel génétique manque, mais on l'utilise quand les quantités disponibles d'ADN sur le lieu du crime ne permettent pas de faire une analyse par Southern. En effet pour qu'on puisse comparer les profils entre eux, il est indispensable d'utiliser la même méthode d'identification.

b- Recherche sur les cheveux.

L'orientation vers la méthode de Southern ou la PCR dépend généralement du nombre de cheveux que l'on retrouve. Pour de faibles quantités (moins de 3 racines de cheveux) il est obligatoire de faire une amplification. De plus il est aujourd'hui possible d'avoir un profil génétique avec seulement un cheveu de 4 à 5 cm de long même privé de son bulbe.

c- Recherche sur les cellules sexuelles.

Il est possible par PCR d'étudier des cellules sexuelles simples ou mélangées. On se sert de la méthode PCR ici encore quand les échantillons sont endommagés : prélèvements sur un cadavre ou prélèvements tardifs qui contiennent alors de l'ADN partiellement dégradé ce qui empêche l'utilisation de la méthode de Southern.

d- Recherche sur les taches.

Que ce soit sur des taches de sang ou de sperme, là encore on utilise la méthode PCR quand les taches sont anciennes (ADN dégradé) ou que nous ne disposons que de microtaches.

2- Le nouveau matériel biologique utilisable grâce à la PCR :

La méthode PCR qui utilise de très petites quantités d'ADN a permis d'élargir le champ des échantillons biologiques utilisables en médecine légale.

a- Les dents :

On se sert de l'ADN contenu dans la pulpe de la dent quand on ne dispose que d'un cadavre. Cependant l'ADN de la pulpe n'est pas stable très longtemps c'est pourquoi on utilise toujours la méthode PCR. Il faut casser la dent pour en extraire la pulpe puis l'ADN par les méthodes classiques d'extraction d'ADN de tissus humains : le tissu est dissous dans un tampon contenant de l'urée puis on fait ensuite une extraction type CHELEX.

b- Les os [36]:

L'utilisation d'ADN provenant d'os de personnes décédées ne se fait qu'avec une méthode d'amplification à cause du risque important d'avoir un ADN dégradé.

Protocole d'extraction d'ADN à partir d'un os :

- Prélever l'os ou une partie et le laver soigneusement avec une brosse en fer et de l'eau distillée.
- Découper un petit fragment d'os.
- Pulvériser le fragment d'os.
- Récupérer 20 mg de poudre.
- Dissoudre la poudre dans de l'EDTA à 0,5 M pendant 12 heures.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 9000 g.
- Faire une extraction de l'ADN par du NaI (Digestion du matériel biologique par une solution concentrée de NaI pendant 4 heures, suivie d'une extraction de l'ADN par une solution d'isopropanolol pendant 30 minutes).

- Récupérer la pelote d'ADN dans un peu d'eau distillée. L'ADN est prêt pour l'amplification.

On a pu ainsi identifier des personnes presque totalement calcinées, des squelettes déjà en décomposition, des noyés ... L'étude des os est très utile car ce sont eux qui résistent le plus longtemps à l'action du temps. Cependant à partir d'une certaine limite de décomposition (qui dépend de l'âge du cadavre et du lieu de conservation), l'ADN du noyau va être trop dégradé et on utilisera alors l'ADN mitochondrial.

c- La salive :

Dans ce domaine aussi l'utilité de la PCR est phénoménale, en effet on peut détecter des traces d'ADN sur des timbres, des mégots de cigarettes, des goulots de bouteille, des gommes à mâcher ou même des traces de salive sur la peau (morsures, baisers...).

Extraction d'ADN d'un mégot :

- Placer le mégot dans une boîte de Pétri stérile.
- Couper une tranche de 5 mm sur le filtre du côté de la bouche.
- Découper la tranche avec un scalpel stérile.
- Placer les morceaux dans un Eppendorf contenant 1 ml d'eau distillée stérile.
- Passer à l'extraction par la méthode chelex.

Extraction d'ADN de goulots de bouteilles :

- Humecter un écouvillon d'eau distillée stérile.
- Le passer de nombreuses fois à l'intérieur et à l'extérieur du goulot.
- Couper le coton de l'écouvillon avec un scalpel et le placer dans un Eppendorf contenant 1 ml d'eau distillée stérile.
- Passer à l'extraction par la méthode chelex.

Extraction d'ADN à partir de salive déposée sur la peau (par exemple une morsure) [40]:

- Passer un premier coton d'ouate mouillé très localement (pour ne pas étaler l'ADN), le mettre de côté.
- Passer un deuxième coton d'ouate toujours au même endroit.
- Faire sécher les deux cotons 30 minutes à température ambiante.
- Mettre les deux cotons dans 1,5 ml d'eau distillé plus 1,5 ml de solution de protéinase K concentrée à 1µg/ml.
- Agiter minimum 1 minute.
- Incuber 60 minutes à 56°C puis 8 minutes à 100°C : après ces étapes , les cellules de la salive sont libérées des fibres de notre support en coton.
- Mettre les cotons dans une seringue que l'on presse.
- Récupérer la solution de premier pressage plus les solutions de rinçage dans un tube en polypropylène.
- Centrifuger à 10000 g pendant 5 minutes.
- Récupérer le culot et pratiquer une extraction chelex.

Quelque soit le support sur lequel on recueille de la salive, les quantités d'ADN sont toujours très faibles c'est pourquoi on n'utilisait pas la salive avant l'apparition de la PCR.

Conclusion :

La possibilité d'amplifier des séquences très spécifiques d'un individu a permis de repousser les limites de l'expertise médico-légale. L'utilisation de la PCR en médecine légale est un énorme progrès par rapport à la méthode de Southern même si elle reste très utilisée quand les quantités d'ADN le permettent. En effet la méthode de Southern est plus longue à réaliser mais les risques de contamination sont moindres donc selon les laboratoires telle technique est privilégié par rapport à telle autre.

CHAPITRE TROIS : SEQUENCAGE DE L'ADN

Introduction :

Face à la qualité parfois médiocre et à la quantité souvent infime d'ADN que les laboratoires de médecine légale reçoivent, il est de plus en plus fréquent qu'il soit nécessaire d'utiliser la technique de séquençage de l'ADN. En effet cette technique permet d'étudier des fragments encore plus détériorés et elle nécessite un peu moins d'ADN que pour la méthode PCR.

En médecine légale ce sont toujours des fragments hautement polymorphes et spécifiques de l'individu qui vont être séquencés et étudiés. Ce sont soit des VNTR, soit des STR, soit des fragments hypervariables de la région D-loop de l'ADN mitochondrial [5] [37]. Les VNTR et les STR étudiés sont les mêmes que ceux étudiés par Southern ou par PCR car on connaît parfaitement leur fréquence dans la population, leur degré d'informativité et le nombre de fragments que l'on doit étudier pour avoir des résultats fiables à 99,9 %.

Il existe deux méthodes de séquençage que nous allons étudier l'une après l'autre.

1. La méthode de Sanger [24] :

Introduction :

Cette méthode de séquençage permet de déterminer la séquence d'un fragment d'ADN grâce à une technique de « **synthèse enzymatique interrompue** » du brin d'ADN complémentaire du fragment à étudier.

Principe :

Cette technique permet de déterminer très précisément la séquence d'acide nucléique d'un fragment d'ADN monobrin.

Le principe général est d'effectuer une synthèse d'un brin d'ADN qui soit radioactif et complémentaire du fragment que l'on veut étudier. Cette synthèse dite interrompue se fait en présence de di-désoxyribonucléotide triphosphate (ddNTP), ce sont des nucléotides modifiés qui ne possèdent pas de groupement -OH en 3'. Ainsi quand ils sont incorporés lors de la synthèse, celle-ci est interrompue. L'incorporation de ddNTP se fait de manière aléatoire en compétition avec des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) présents aussi. Ainsi le lieu de fin de synthèse du fragment complémentaire est différent à chaque cycle de synthèse.

Déroulement de la méthode :

1-A Les fragments d'ADN :

Le séquençage par la méthode dite de Sanger ne se fait que si l'on dispose d'une grande quantité du fragment à séquencer. C'est pourquoi on fait toujours une amplification par PCR préalablement, pour disposer de suffisamment de matériel génétique. Cependant nous avons besoin d'un ADN monocaténaire. Après notre amplification PCR il nous faut donc procéder à la formation d'un ADN simple brin. Pour cela il existe plusieurs techniques :

- Les colonnes à streptavidine :

Lors de la PCR, l'une des deux amorces est marquée par de la biotine, on obtient alors un ADN comportant un brin marqué. On fait une dénaturation de l'ADN par la chaleur et on le fait passer dans une colonne où se trouve fixée de la streptavidine. Le brin marqué au niveau de l'amorce reste fixé sur la colonne, l'autre ressort. En faisant une élution de la colonne, on obtient ainsi les deux brins de l'ADN bicaténaire séparés chacun dans un tube.

- Amplification PCR déséquilibrée :

On peut pratiquer une seconde amplification à partir d'un aliquote du fragment déjà amplifié. Mais lors de la seconde amplification, on va modifier les conditions expérimentales afin de ne produire qu'un des deux brins de l'ADN. Pour cela on va mettre en excès une des deux amorces par rapport à l'autre (quantité au moins cinquante fois supérieure d'une amorce par rapport à l'autre). Après une quinzaine de cycles, l'amorce minoritaire est épuisée et on obtient alors la production d'ADN simple brin. Généralement, on fait une première fois la réaction avec une première amorce et une deuxième fois avec l'autre amorce. Ainsi on obtient les deux brins séparés chacun dans un tube différent.

- Agent bloquant :

On peut lors de la première PCR ajouter après quelques cycles un agent bloquant spécifique d'une des deux amorces et là encore on obtient un brin monocaténaire.

1-B La réaction de séquençage enzymatique :

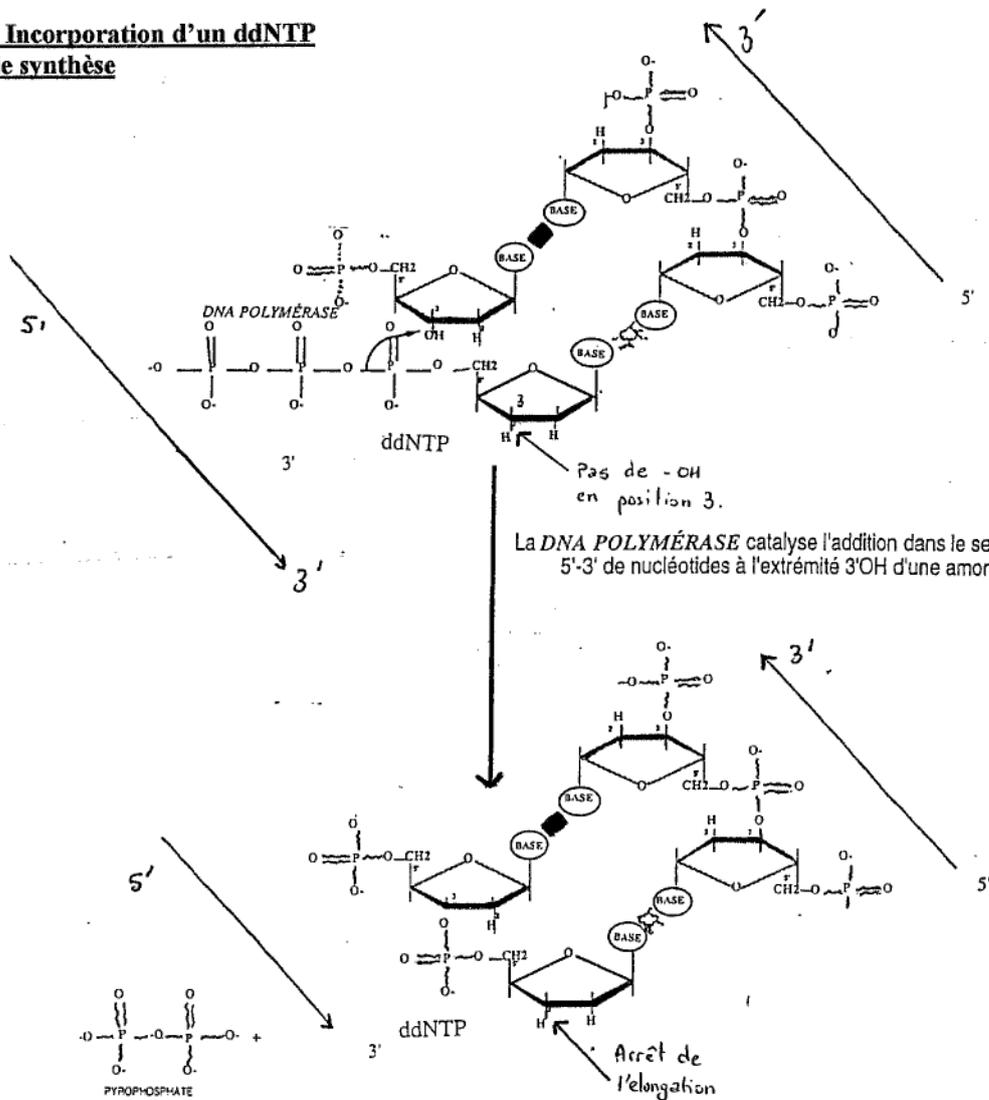
La réaction s'effectue de manière parallèle dans quatre tubes différents contenant chacun :

- L'ADN monobrin amplifié à étudier.
- 3 dNTP non radioactifs.
- 1 dNTP radioactif (en général du [³⁵S]dATP).
- Une amorce spécifique du brin à séquencer.
- Une ADN polymérase (Séquenase ou fragment de Klenow).

- Un ddNTP en très petite quantité. (le ddNTP est différent dans chaque tube).

A chaque base que l'ADN polymérase incorpore lors de la synthèse, elle peut incorporer soit une base non modifiée, soit un ddNTP et la réaction de synthèse s'arrête alors (voir schéma). Statistiquement, le ddNTP va s'associer le même nombre de fois avec son nucléotide complémentaire quelque soit son emplacement sur le fragment . Afin que tous les fragments possibles soient synthétisés, on fait plusieurs fois le cycle de synthèse interrompue.

Schéma : Incorporation d'un ddNTP et arrêt de synthèse



A chaque cycle on fait varier les températures :

- 50°C pour l'hybridation de l'amorce en 3' du monobrin.
- 72°C pour la synthèse du brin complémentaire.
- 95°C pour dénaturer le nouveau brin formé et qu'une nouvelle synthèse soit possible.

En général après 10 cycles on peut arrêter la synthèse. En effet on utilise au départ un grand nombre de réplique du fragment utile donc à chaque synthèse on obtient de nombreux fragments interrompus.

Dans chaque tube tous les fragments obtenus se terminent par la même base. On fait migrer le contenu de chacun des quatre tubes en parallèle sur un gel de polyacrylamide capable de séparer des fragments ne différant que d'une base. Les fragments migrent toujours selon leur taille (les plus petits vont migrer le plus bas, il correspondent au côté 3'). La taille des fragments néo-synthétisés, donc la taille des fragments détectés par autoradiographie, est égale à la distance entre le début de l'amorce et la base modifiée où s'est arrêtée la synthèse. L'enchaînement des fragments sur l'autoradiographie correspond à l'enchaînement des quatre bases dans le fragment d'ADN que l'on étudie. En faisant une lecture directe du gel on en déduit automatiquement la séquence complémentaire du fragment étudié donc sa propre séquence elle même.

Prenons une séquence au hasard pour illustrer cette technique :

5' ——— TACGAGCGTGAA ——— 3'

Dans le tube 1 on met :

- ddTTP + dTTP
- dCTP
- dGTP
- dATP*
- Amorce + ADN polymérase

Dans ce tube, les fragments synthétisés se terminent par une base thymine (T). Ainsi à chaque fois qu'on a une base adénine sur le fragment initial, la synthèse s'arrête.

Dans le tube 2 on met :

Dans le tube 2 on met :

- dTTP
- ddCTP+ dCTP
- dGTP
- dATP*
- Amorce + ADN polymérase.

Dans ce tube, les fragments se terminent par une base cytosine.

Dans le tube 3 on met :

- dTTP
- dCTP
- ddGTP + dGTP
- dATP*
- Amorce + ADN polymérase.

Dans ce tube, les fragments se terminent par une base guanine.

Dans le tube 4 on met :

- dTTP
- dCTP
- dGTP
- dATP* + ddATP
- Amorce + ADN polymérase.

Dans ce tube, les fragments se terminent par la base adénine.

Après séquençage par synthèse interrompue, nous allons étudier les différents fragments que l'on va avoir dans chaque tube.

Dans le tube 1 :

⇒ Séquence de départ :

5' ——— TACGAGCGTGAA ——— 3'

⇒ Séquences obtenues :

• ddTGCTCGCACTT

• ddTCGCACTT

• ddTT

• ddT

Dans le tube 2 :

⇒ Séquence de départ :

5' ——— TACGAGCGTGAA ——— 3'

⇒ Séquences obtenues :

• ddCTCGCACTT

• ddCGCACTT

• ddCACTT

• ddCTT

Dans le tube 3 :

⇒ Séquence de départ :

5' ——— TACGAGCGTGAA ——— 3'

⇒ Séquences obtenues :

• ddGCTCGCACTT

•ddGCACTT

Dans le tube 4 :

⇒ Séquence de départ :

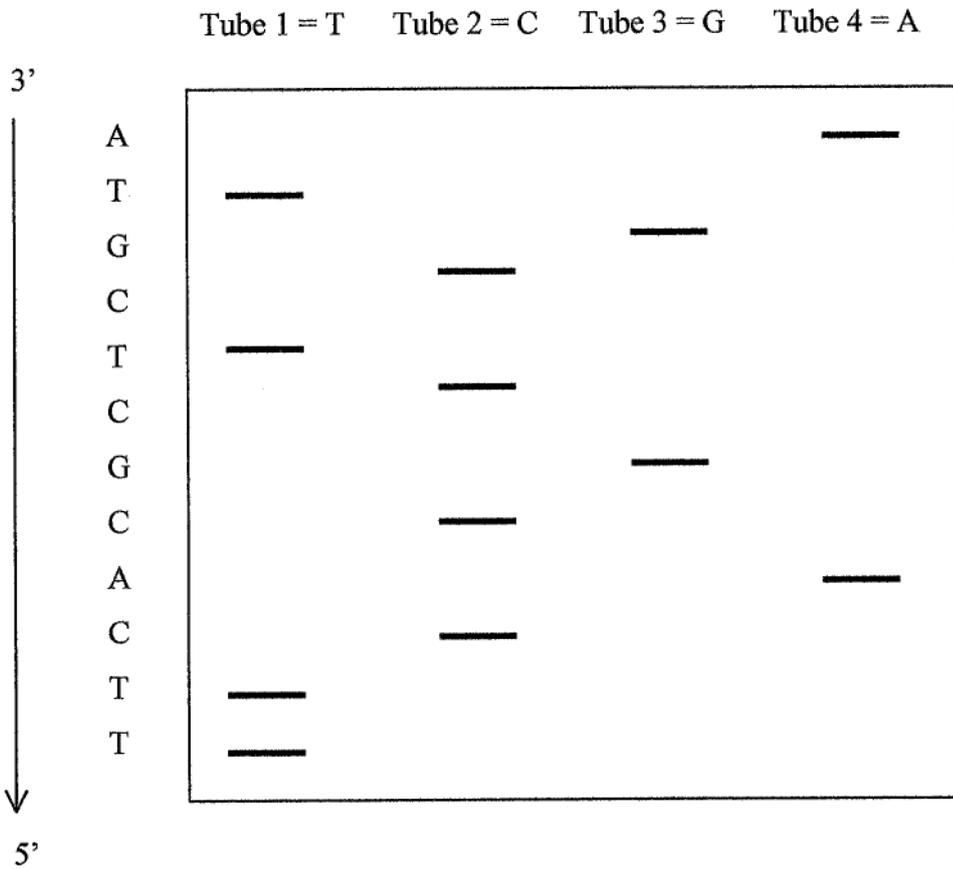
5' ——— TACGAGCGTGAA ——— 3'

⇒ Séquences obtenues :

•ddATGCTCGCACTT

•ddACTT

Lecture sur le gel d'électrophorèse après autoradiographie :



On a donc une lecture immédiate du brin complémentaire et donc une déduction non moins immédiate du brin initial que l'on étudie.

Grâce à cette technique on peut lire entre 300 et 800 bases sur un même gel. Ce système de séquençage est manuel et il peut être réalisé dans de nombreux laboratoires.

1-C Les ADN polymérases utilisées :

Deux fragments sont majoritairement utilisés pour la synthèse lors du séquençage.

Klenow : C'est le grand fragment de l'ADN polymérase d'E.Coli obtenu par coupure de l'ADN polymérase par la subtilisine.

Séquenase : Elle est de plus en plus utilisée. C'est l'ADN polymérase du phage T 7. Avec cette enzyme on obtient des résultats plus homogènes (baisse des bruits de fonds, bandes uniformes, rapidité de réaction).

1-D Les progrès technologiques :

Des séquenceurs automatiques sont maintenant disponibles. Ils n'utilisent pas des nucléotides marqués radioactivement mais marqués par des substances fluorochrome.

• Méthodes utilisant plusieurs couleurs :

- Technique des amorces marquées (« Dye primer ») [23]:

Les amorces qui déclenchent la synthèse sont marquées par un fluorochrome différent (au total 4 couleurs) et sont séparées en 4 tubes différents .

A chaque tube correspond donc une couleur et on ajoute dans chaque tube un des 4 ddNTP. Par convention on associe toujours la même couleur à chaque nucléotide (convention internationale):

- Vert = Adénine • Bleu = Cytosine.
- Jaune = Guanine • Rouge = Thymine.

Ainsi à chaque nucléotide de fin de synthèse correspond une couleur. Pour la lecture on mélange les 4 tubes de la synthèse et on fait une migration électrophorétique à partir du même point de départ.

- Techniques des ddNTP marqués (« Dye terminal »).

Dans cette technique, ce sont les ddNTP qui sont marqués en utilisant toujours le même code de couleurs. La synthèse peut se faire dans le même tube qui contient les 4 bases normales plus le ddATP-vert, le ddGTP-jaune, le ddCTP-bleu et le ddTTP-rouge plus des amorces et l'ADN polymérase.

Ainsi après le séquençage, toutes les molécules générées se terminent par un nucléotide marqué correspondant au ddNTP de fin de synthèse reconnaissable à sa couleur.

Quelque soit la technique de marquage utilisée, la lecture sur l'automate se fait de la même manière. Le gel d'électrophorèse va passer devant le faisceau d'un photomètre à laser. Ce détecteur est capable de détecter une par une les couleurs qui ont été greffées. Après analyse informatique des signaux recueillis, on obtient la séquence du fragment à étudier avec une extrême précision.

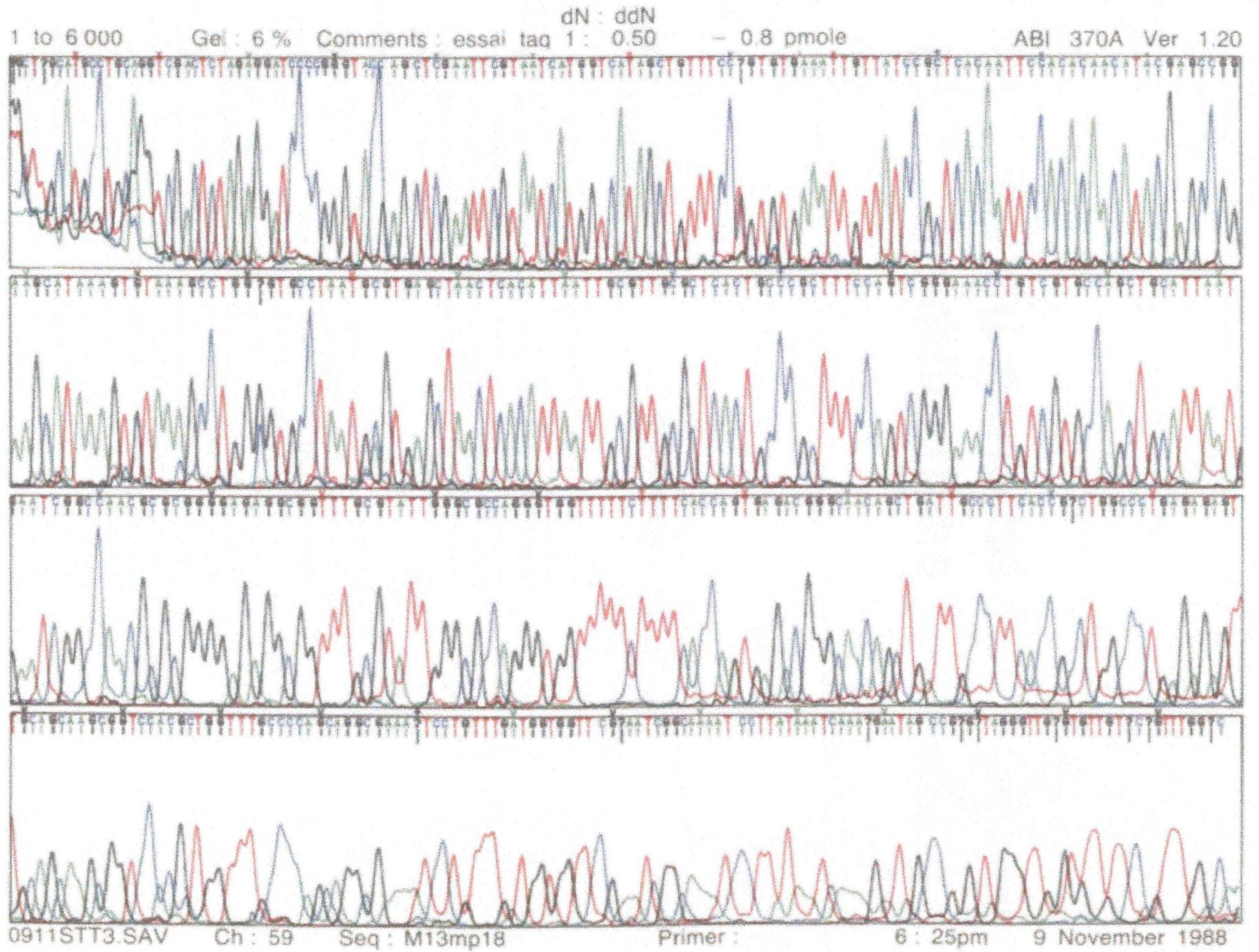
Voir le schéma en page suivante qui illustre les résultats obtenus par un séquenceur automatique [23].

- Technique utilisant une seule couleur :

On peut aussi n'utiliser qu'une seule couleur de marquage. Pour cela il faut réaliser 4 synthèses dans 4 tubes différents et pratiquer 4 électrophorèses différentes. On passe les 4 gels séparément sur le détecteur automatique et on obtient alors la séquence du fragment étudié.

L'analyse d'échantillons par la technique de Sanger est de plus en plus utilisée en médecine légale.

Exemple de résultat d'une détermination automatique de séquence [23]



2- La méthode de Maxam et Gilbert :

Principe :

Cette méthode fait appel aux propriétés de clivage spécifique de l'ADN par certains agents chimiques.

Déroulement de la technique :

2-A les Fragments d'ADN :

Dans cette technique, l'ADN utilisé est indifféremment monocaténaire ou bicaténaire selon l'origine de sa production. En médecine légale il est bicaténaire car il provient d'une amplification par PCR. En effet lorsqu'on utilise une technique de séquençage, c'est que le matériel génétique trouvé sur le lieu du crime est détérioré ou en petite quantité et alors on va l'amplifier pour qu'il soit utilisable. Les fragments qui sont amplifiés avant séquençage sont là encore des fragments hypervariables hautement spécifiques d'un individu.

Après l'amplification, ces fragments doivent impérativement être marqués radioactivement au niveau d'une des deux extrémités : 5' ou 3' au choix. En général on ajoute un nucléotide marqué (N*).

2-B Les agents chimiques :

Pour séquencer notre ADN, nous allons utiliser des agents chimiques qui coupent l'ADN de manière spécifique en un point précis. Nous allons donner quelques exemples des agents chimiques les plus utilisés et leur lieu de coupure :

- Un clivage par du Di Methyl Sulfate (DMS) coupe l'ADN en G.
- Un clivage avec de l'acide formique coupe l'ADN en A et en G.
- Un clivage avec de l'hydralasine plus des sels coupe l'ADN en C.
- Un clivage avec de l'hydralasine seul coupe l'ADN en C et T.

Le mécanisme de coupure est schématiquement le même :

- Modification de la base du nucléotide (c'est cette réaction qui détermine la spécificité de la coupure obtenue au terme du traitement chimique).
- Elimination de la base modifiée.
- Elimination du squelette du sucre : cassure du fragment.

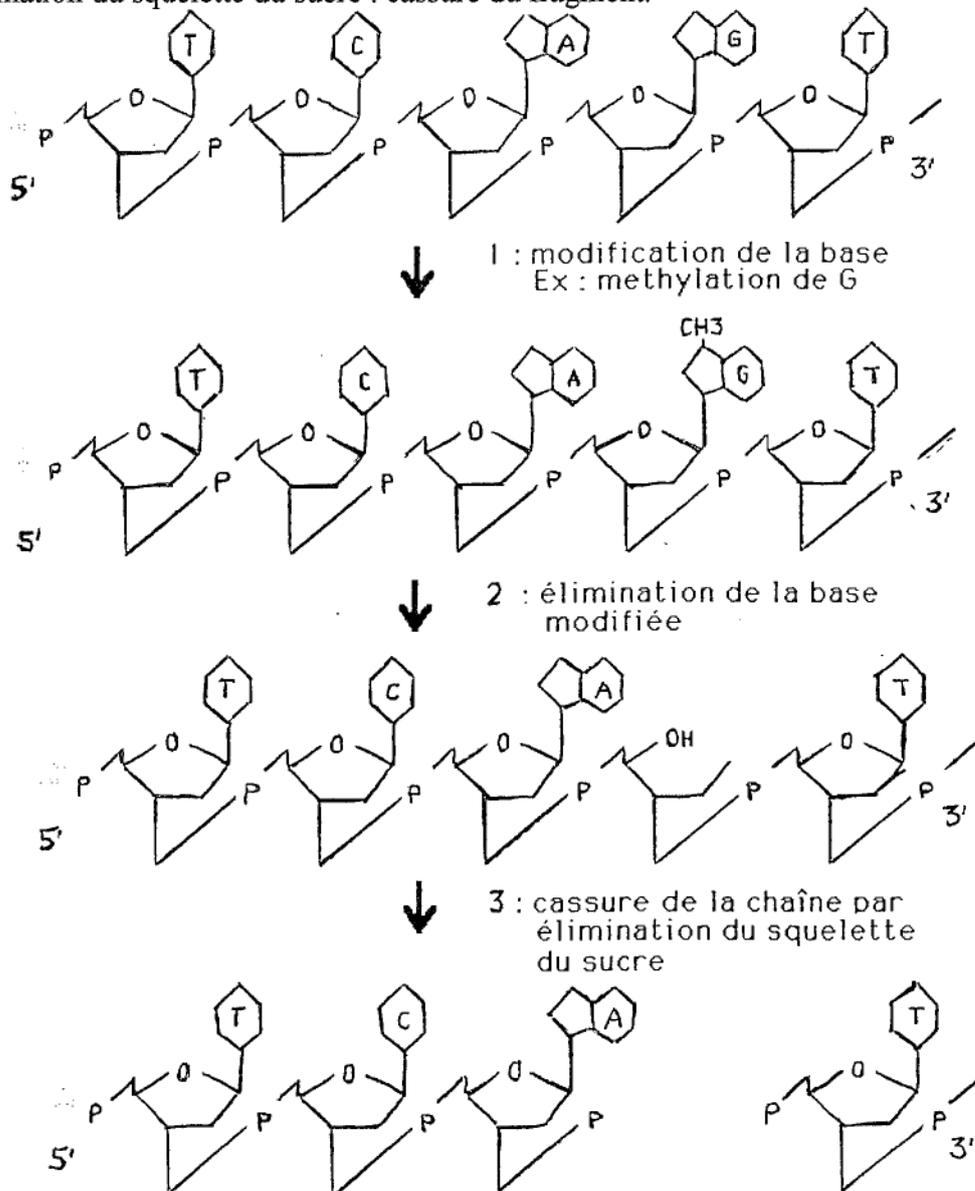


Schéma d'une coupure par un agent spécifique :

2-C La technique elle même :

L'ADN marqué radioactivement est séparé en 4 aliquotes qui vont chacun être traité par un agent chimique :

- Un agent qui coupe en C.
- Un agent qui coupe en C et T (la coupure en C étant connue, on en déduit la coupure en T).
- Un agent qui coupe en G.
- Un agent qui coupe G et A (la coupure en G étant connue, on en déduit la coupure en A).

D'une manière générale, les coupures ne s'effectuent qu'avec un faible rendement (environ 2 %). Il en résulte que statistiquement chaque copie de la séquence à étudier ne sera coupée qu'une seule fois en chaque endroit, et compte tenu du nombre de copies utilisées (car nous travaillons en post PCR), tous les fragments possibles seront obtenus sans exception.

2-D La révélation :

La révélation se fait aussi par migration sur gel d'électrophorèse en polyacrylamide dénaturant qui peut séparer des fragments différents d'une seule base. On fait migrer les 4 tubes sur une bande précise du gel. De même que pour la technique de Sanger, les fragments obtenus correspondent à la distance entre le point de coupure et le point de marquage. On fait ensuite une autoradiographie. Sur celle-ci, l'enchaînement des fragments correspond à l'enchaînement des bases sur le fragment étudié.

La lecture se fait directement sur le gel, on a directement lecture de la séquence initiale.

Nous allons prendre un exemple concret pour illustrer cette technique :

Fragment à étudier : 5'- N*ATGGCCATCGA - 3'

Tube 1 : Coupure en G

Les fragments obtenus par une coupure en G sont:

5' - N*AT - 3'

5' -N*ATG - 3'

5' - N*ATGGCCATC- 3'

Tube 2 : Coupure en G + A

Les fragments obtenus par une coupure en G et A sont :

5' - N* - 3'

5' - N*AT - 3'

5' - N*ATG - 3'

5' - N*ATGGCC - 3'

5' - N*ATGGCCATC - 3'

5' - N*ATGGCCATCG - 3'

Tube 3 : Coupure en C

Les fragments obtenus par une coupure en C sont :

5' - N*ATGG - 3'

5' - N*ATGGC - 3'

5' - N*ATGGCCAT - 3'

Tube 4 : Coupure en C + T

Les fragments obtenus par une coupure en C et A sont :

5' - N*A - 3'

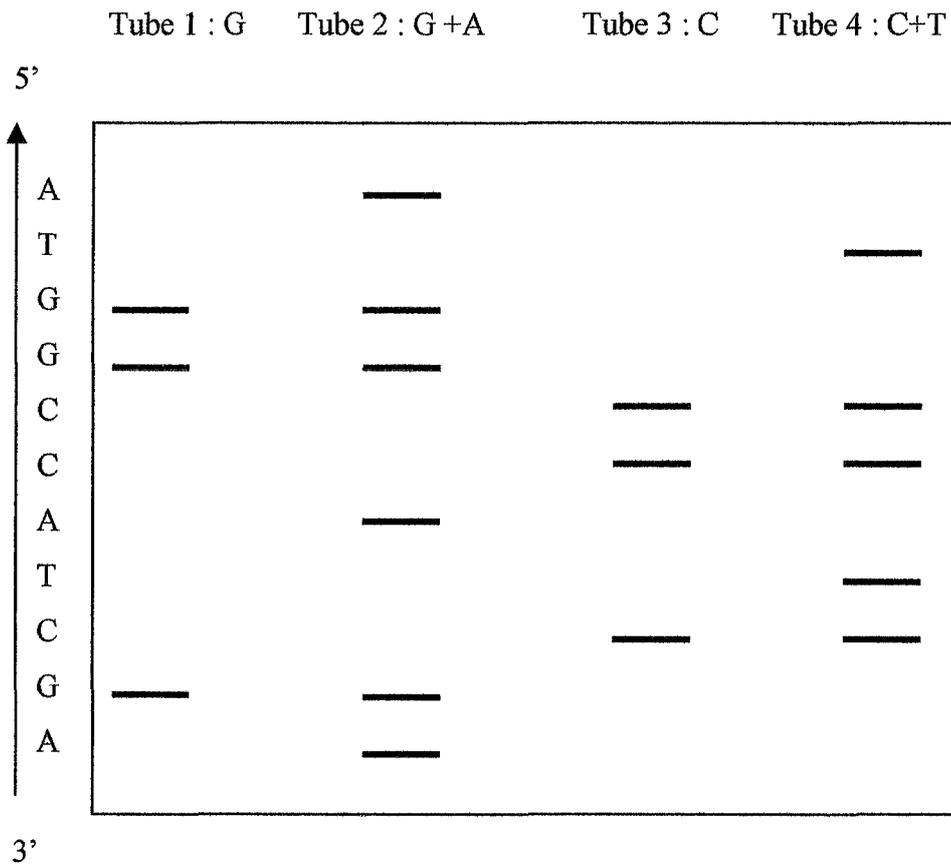
5' - N*ATGG - 3'

5' - N*ATGGC - 3'

5' - N*ATGGCCA - 3'

5' - N*ATGGCCAT - 3'

On procède ensuite à une électrophorèse du contenu des 4 tubes sur le même gel :



D'une manière générale c'est la méthode de Sanger qui est utilisée car elle permet l'utilisation d'automates.

3- Utilisation du séquençage en médecine légale :

3-A l'ADN utilisé :

Bien évidemment on peut utiliser tout le matériel biologique utilisable dans les techniques de Southern et de PCR, mais généralement l'utilisation du séquençage en médecine légale est réservée à l'exploration de l'ADN mitochondrial [39]. En effet l'utilisation de cet ADN permet de palier à bien des problèmes :

Problèmes de quantité :

Pour les cas où l'ADN recueilli se trouve en infime quantité, il est plus avantageux d'utiliser l'ADN mt. En effet si on ne dispose que de quelques cellules dans un échantillon, on dispose de plus d'ADN mt que d'ADN nucléaire. On a au minimum 1000 copies d'ADN mt par cellule contre une copie d'ADN nucléaire par cellule. C'est pourquoi une technique PCR sur des fragments d'ADN mt est plus efficace puisqu'on a dès le départ beaucoup plus d'exemplaires du fragment à amplifier. De ce fait les quantités nécessaires pour pouvoir faire une amplification par PCR d'ADN mt sont plus faibles de l'ordre de 10 picogrammes (une seule cellule est en théorie suffisante, le tout est d'arriver à la prélever).

Problèmes de qualité :

L'ADN mt est protégé au sein d'une matrice entourée d'une enveloppe lipidique. Cette enveloppe augmente la résistance de l'ADN mt aux agressions enzymatiques. On a pu constater que l'ADN mt est donc mieux conservé que l'ADN nucléaire. De plus le fait d'être en plus grande quantité augmente le nombre de fragments intacts qui pourront être étudiés.

Exemple [17]: le cas d'un séquençage d'ADN obtenu à partir de personnes décédées lors d'une catastrophe aérienne illustre les avantages que peut avoir l'étude de l'ADN mt par rapport à l'étude de l'ADN nucléaire. En effet lors d'une telle catastrophe une étude a été menée et on a pu obtenir des résultats avec 95 % des corps quand on a séquencé l'ADN mt et seulement 50 % de résultats avec l'ADN nucléaire.

Ainsi l'étude de l'ADN mt est réservée à des domaines précis :

- Identification par de l'ADN extrait des dents [15].
- Identification par de l'ADN extrait de salive [1].
- Identification par de l'ADN extrait d'os très ancien donc très dégradé[42] [15].
- Identification par de l'ADN retrouvé chez des grands brûlés.
- Identification par de l'ADN extrait de cheveux courts ou des poils même sans racine [21].
- Identification par de l'ADN extrait de cellules de fèces et d'urine [30].
- Identification par du sang retrouvé dans des parasites hématophages comme le Pthirus Pubis [27]

3-B Fragments étudiés :

Les fragments étudiés lors du séquençage sont aux nombres de 4 : 2 appartiennent à la région HVR1 et 2 à la région HVR2 [38]:

HVR1 : Région 15971-16258

 Région 16144-16410

HVR2 : Région 15-274

 Région 155-389

3-C Informativité des fragments étudiés :

Lorsqu'une séquence d'un ADN mt de suspect ne correspond pas à la séquence des échantillons prélevés sur le lieu du crime, on peut définitivement exclure le suspect avec une certitude de 100%. Cependant comme lors de l'étude des fragments polymorphes de l'ADN nucléaire, lorsque la séquence correspond les conclusions ne sont pas aussi évidentes. En effet, il existe une certaine probabilité pour que deux individus sans relation aucune aient une séquence identique. Pour éviter tout problème on procède toujours à la détermination d'au moins 4 séquences différentes grâce à l'amplification spécifique de 4 fragments bien définis. Ainsi on a une probabilité extrêmement faible que la personne ait 4 fragments identiques . De plus on n'étudie jamais un fragment au hasard, des études de population [31] très pointues sont menées à grande échelle systématiquement sur un nouveau fragment susceptible d'être utilisé. Ainsi quand un laboratoire utilise un fragment, il connaît parfaitement la fréquence de chacun de ses allèles et donc sa valeur informative, ainsi peut-il coupler son étude avec l'étude d'autres fragments très informatifs eux aussi . D'une manière générale on rend des résultats qui vont « incriminer » une personne avec 99,9% de certitude ou la discriminer avec 100% de certitude.

3-D Le problème des personnes hétéroplasmiques [2]:

Lorsqu'on rencontre une personne hétéroplasmique, le problème pour incriminer ou exclure une personne se complique un peu. Comme nous l'avons vu dans le rappel sur l'ADN mt, il se peut que des cellules voisines n'aient pas le même contenu en ADN mt. Ainsi il se peut qu'on ait qu'un seul type d'ADN mt dans un cheveu et deux types d'ADN mt dans un autre. Or dans certaines enquêtes on ne dispose parfois que d'un seul cheveu et on peut rencontrer le cas où les séquences entre le cheveu du crime et le cheveu du suspect ne diffèrent que d'une base. Dans ce cas on s'interroge s'agit-il de deux personnes différentes ou d'un cas d'hétéroplasmie mal répartie dans les cheveux ?

De ce fait quand des profils diffèrent d'une seule base on n'exclue pas la personne mais on ne peut l'inclure non plus car le niveau de certitude est plus faible (seulement entre 95 % et 98 %) et donc le résultat d'analyse est moins fiable. D'autres preuves doivent être fournies pour exclure ou inclure le suspect.

Lors des études de population, ce phénomène est bien évidemment pris en compte et pour chaque fragment on étudie le pourcentage de personnes hétéroplasmiques.

Remarque : l'exemple du cheveu s'applique à n'importe quel tissu.

3-E Utilisation de l'ADN mitochondrial dans quelques cas historiques.

L'avènement du séquençage de l'ADN mt a permis de résoudre un certain nombre d'énigmes historiques qui ont pour intérêt légal d'empêcher des usurpations. Nous ne les étudierons ici que brièvement et à titre anecdotique.

Les « disparus » de l'Argentine [11]:

Lors de la dictature militaire de 1970 de nombreuses personnes furent arrêtées et exécutées puis enterrées dans des fosses communes. Régulièrement des fosses sont retrouvées et un difficile travail d'identification commence. C'est presque exclusivement la technique de séquençage de l'ADN mt qui est utilisée pour comparer les os des disparus avec des membres restants de la famille.

Le fils de Louis XVI et de Marie-Antoinette [20]:

Officiellement le dauphin, futur Louis XVII, est mort pendant son emprisonnement au cours de la révolution Française en 1795. Cependant il y a toujours eu un doute quant à sa mort. Un dénommé Carl Naundorff a affirmé tout au long de sa vie être Louis XVII. Son âge correspondait, il savait beaucoup de choses et il réclamait le trône de France. De son vivant il ne fut pas reconnu et de nombreux historiens se sont penchés sur la question. Le mystère a été résolu. On disposait de la dépouille de Naundorff (os), de cheveux de Marie-Antoinette et de deux de ses sœurs (conservés par des collectionneurs). L'étude de l'ADN mt de Naundorff a montré qu'il existe dans sa séquence des différences par rapport à l'ADN mt des trois sœurs, il est donc exclu que Naundorff soit le fils légitime de Louis XIV et Marie-Antoinette.

Le tsar Nicolas II et sa famille [19]:

Neuf cadavres furent découverts en 1990 dans la région d'Ekaterinburg. Très vite on a supposé que ces corps étaient ceux de la famille impériale russe. On a pu identifier le Tsar en comparant son ADN mt avec celui de son frère (on a dû procéder à l'exhumation du prince Georgii Romanov) et les deux séquences furent parfaitement identiques (en plus les deux frères ont une grande particularité génétique, ils sont hétéroplasmiques et cette hétéroplasmie a été parfaitement retrouvée dans les deux cas). On a identifié que les trois enfants présents étaient sœurs (même ADN mt) et que le squelette de la femme était celui de leur mère. Pour prouver que le squelette de femme était bien celui de la Tsarine on a comparé son ADN mt avec de l'ADN mt de ses ascendantes maternelles. A l'issue de ces études on a pu certifier que les corps du Tsar, de la Tsarine et de trois de leur cinq enfants avaient bien été retrouvés.

Conclusion :

L'étude de l'ADN mitochondrial est un outil formidable en médecine légale : elle a élargi le champ des possibilités de façon incroyable. Sa seule limite réside dans le fait qu'elle est très chère à mettre en œuvre et que les risques de contamination et d'interférences sont très élevés (utilisation de la PCR). C'est une technique de pointe qui ne sert pour l'instant que dans les cas difficiles, mais on peut supposer qu'elle a un bel avenir devant elle.

CHAPITRE QUATRE : EMPREINTES GENETIQUES ET PRATIQUE LEGALE

Introduction :

Depuis son avènement, la recherche des empreintes génétiques en tant que preuve légale a connu un succès énorme et est de plus en plus utilisée. Sa grande popularité réside principalement dans le fait que c' est une preuve scientifique et donc en tant que telle , considérée comme la preuve « parfaite ». Son utilisation porte donc à de nombreuses conséquences et rien ne peut être laissé au hasard quand il s'agit d'inculper ou d'innocenter des personnes. C'est pourquoi la justice s'est penchée sur le cas « empreintes génétiques » afin de régulariser son utilisation et de garantir sa fiabilité. Dans ce chapitre nous allons étudier les différents aspects légaux [13] qui concernent la réalisation et l'utilisation des empreintes génétiques en France.

1- Recours aux empreintes génétiques en pratique judiciaire :

A- Quand ? :

Lors du recours aux empreintes génétiques en pratique judiciaire, il faut distinguer deux cas bien particulier :

- Cas civil : dans ce cas les empreintes génétiques sont demandées pour la recherche de filiation paternelle ou maternelle. A noter qu'on ne peut demander une telle pratique que sur « **forte présomption** » de paternité ou de maternité.

- Cas pénal: on utilise le recours aux empreintes génétiques pour rechercher des preuves tant dans le domaine des agressions contre les biens (vol avec ou sans arme, cambriolage...) que dans celui des agressions contre les personnes (homicides, agressions sexuelles, viols, coups et blessures, séquestration...).

B- Qui ? :

- Cas civil : c'est un juge qui demande une telle expertise après avoir consulté les dossiers qui permettent de fonder la présomption.
- Cas pénal : D'après les textes, l'utilisation des empreintes génétiques peut se faire aussi bien au niveau de l'enquête préliminaire que lors de l'instruction .

⇒ Enquête préliminaire : l'expertise est demandée par les enquêteurs (policiers ou gendarmes) qui agissent sous le contrôle et à la demande des magistrats du ministère public. Ces analyses peuvent donc être préconisées même si elles vont rallonger la garde à vue.

⇒ Instruction du dossier : lors de l'instruction elles sont très (et de plus en plus) demandées par le juge d'instruction, le ministère public ou la partie adverse.

L'empreinte génétique est considérée comme une preuve sans aucune autre distinction par rapport aux autres preuves utilisées lors d'enquête judiciaire, elle ne **bénéficie pas au regard de la loi d'un statut particulier**. En revanche de par son aspect scientifique elle a un impact considérable dans l'esprit des personnes qui pensent souvent qu'une telle preuve est irréfutable. La loi, elle, ne la considère pas comme telle et des contre-expertises peuvent être demandées. Pour qu'une telle preuve ait toute sa valeur, on comprend qu'elle doit apporter un maximum de garantie, c'est pourquoi son exécution est réservée à des spécialistes. De plus il faut bien garder à l'esprit que la détection des empreintes génétiques ne remplace pas une enquête approfondie, mais qu'elle la complète. Le juge dispose de nombreuses preuves

dont les empreintes génétiques, et grâce à toutes ces preuves il se forge un avis **selon son intime conviction**, mais en aucun cas la preuve génétique ne doit supplanter les autres preuves.

2- Le prélèvement et le droit :

Sans prélèvement sur le lieu du crime et sur le ou les suspects , il n'y a pas d'empreintes génétiques, c'est pourquoi nous allons étudier en détail les précautions qui doivent être prises à ce niveau pour que la technique puisse donner toute sa puissance.

A- Prélèvement sur le lieu du crime :

Depuis l'avènement des nouvelles techniques d'empreintes génétiques, les prélèvements sur une scène de crime sont devenus primordiaux. C'est pourquoi actuellement les prélèvements se font par un personnel spécifiquement formé pour cette recherche de matériel biologique. Que ce soit dans le personnel de la gendarmerie ou de la police, une équipe suit régulièrement des formations qui vont lui permettre d'être au fait de la technique et de ne négliger aucune piste biologique. On appelle ces unités les « techniciens du crime ». Parallèlement, les moyens techniques mis à la disposition des techniciens sont eux aussi plus performants et permettent de conserver les échantillons dans de bonnes conditions.

La scène du crime :

Il faut au maximum préserver la scène du crime tant que l'équipe n'a pas fait son travail de recueil. On délimite toujours un périmètre de sécurité où l'accès est très restreint même aux autorités « supérieures » (enquêteurs, magistrats, médecin légiste) qui doivent en théorie respecter un couloir de sécurité et ne pas intervenir sur les prélèvements.

Protection des techniciens :

Pour éviter au maximum que les techniciens contaminent les échantillons qu'ils vont prélever, ils disposent d'une tenue spécifique :

- Combinaison à usage unique.
- Sur-chaussures.

- Calot (on estime que la perte de cheveux se situe entre 40 et 60 par jour.)
- Une paire de gants en coton qui absorbe la transpiration.
- Une paire de gants en vinyle que l'on met par dessus et que l'on change après chaque prise d'échantillon.
- Un masque pour éviter la projection de postillons.

Les techniciens doivent toujours garder à l'esprit qu'ils peuvent rencontrer du matériel contaminé et qu'une grande prudence s'impose.

Matériel :

Il doit être à usage unique, stérile. Chaque échantillon est répertorié très précisément, photographié, puis mis sous scellé. Le technicien dispose de tubes stériles en verre, de coton épais, d'eau distillée, de scalpels...

Les types de prélèvements :

Il y a deux types de prélèvements biologiques , les prélèvements évidents (visibles) et les prélèvements non évidents (invisibles).

- prélèvements visibles : ce sont les taches de tout genre (sang, sperme, sueur), les cheveux ou les poils avec ou sans la racine, les fragments de peau ou de tout autre tissu sous les ongles, les traces de salives sur les verres, les bouteilles, les mégots ...
- prélèvements invisibles : ce sont surtout pour ces prélèvements que la formation est indispensable car si on ne connaît pas bien les progrès des techniques actuelles, on peut négliger de ramasser un objet qui est susceptible de porter des traces biologiques . Par exemple on prélève toujours d'éventuelle trace sur la peau d'une victime, qui a été ligoté ou étranglé, à l'emplacement des liens (le fait de serrer une corde arrache des cellules de la peau de l'agresseur). On recherche d'éventuelles traces de salive ou de sueur sur la peau de la victime.

D'une manière générale il faut toujours faire le prélèvement avec son support d'origine, le laboratoire se chargeant de récupérer les traces biologiques du support lui même.

Conditionnement et conservation :

Les échantillons biologiques sont sensibles aux agressions extérieures (chaleur, humidité, rayons UV). C'est pourquoi il faut les protéger déjà en les stockant à l'abri de la lumière. On peut conserver un échantillon trois jours dans un réfrigérateur (+4°C), au delà, il faut congeler l'échantillon à - 20°C. Dans le cas où le prélèvement est humide, il faut le faire sécher préalablement à l'air libre dans un sachet en papier kraft qui absorbe l'humidité. Une fois sec, on le conserve comme les autres prélèvements.

Protection juridique du prélèvement :

Comme toutes preuves relevées sur la scène d'un crime, les échantillons biologiques doivent être mis sous scellé. Ils sont mis directement au moment du recueil par le technicien. Chaque scellé est dûment identifié et décrit pour qu'il ne puisse pas y avoir de contestation. Ils sont ensuite acheminés vers les laboratoires qui eux seuls peuvent les ouvrir. Le laboratoire est chargé de conserver le scellé le temps du procès et dans les affaires pénales au moins 20 ans après la fin du procès. Dans tous les cas la destruction des scellés ne se fait que sur ordre écrit du procureur général ou du procureur de la république ou du juge d'instruction chargé de l'affaire. De plus pour chaque analyse effectuée il faut conserver un aliquote de 4 µl de la solution d'extraction (que l'on congèle à - 20°C) en cas de demande de contre expertise.

B- Prélèvement du suspect :

Il n'est bien évidemment pas suffisant d'avoir les échantillons prélevés sur le lieu du crime, il faut pouvoir les comparer à de l'ADN du suspect, se pose alors le problème légal du consentement du suspect au prélèvement sanguin. Ceci est un point de droit qui pose parfois problème en France.

- **Le consentement à l'identification :** il faut déjà préciser que l'identification d'une personne par ses empreintes génétiques tombe sous le coup de la loi. Ainsi une personne procédant à une identification à des fins qui ne seraient ni médicales, ni scientifiques, et en dehors d'une mesure d'enquête ou d'une instruction diligentée lors d'une procédure

judiciaire est punie d'un an d'emprisonnement et de 100 000 F d'amende (Article 226-28 du Code Pénal).

La recherche d'empreintes génétiques dans le cadre d'une enquête judiciaire se présente différemment si l'on se trouve dans une enquête civile ou pénale.

- Cas Civil :

Une **identification** peut être réalisée seulement avec le consentement exprès et préalable de la personne (article 16-11 du Code Civil).

- Cas Pénal :

Le code civil reste étrangement muet en ce qui concerne le consentement à l'identification dans le cas d'une enquête pénale. En fait le droit précise tous les cas où le consentement est nécessaire, et les affaires pénales n'en font pas partie. C'est pourquoi il est considéré actuellement que **si l'on dispose d'un prélèvement** du suspect, il ne peut s'opposer à une détermination d'empreintes génétiques. (Par exemple si on a effectué un prélèvement pour une recherche d'alcoolémie, on peut utiliser ce prélèvement pour la recherche d'empreintes génétiques)

Cependant le cas du consentement à l'identification résolu, il reste le cas du consentement au prélèvement du suspect sans lequel il ne peut y avoir d'identification.

- **Le consentement au prélèvement [29]**: Un des droits fondamentaux du droit français est le respect de l'intégrité physique de la personne. C'est pourquoi la question qui se pose est la suivante : « peut-on au nom de la vérité ne pas respecter le droit à l'intégrité physique d'une personne s'opposant à un prélèvement ? ».

Théoriquement, tout notre droit s'oppose à une telle action et si une personne refuse, il est impossible d'effectuer le prélèvement. Là encore, le droit reste muet sur cette question et comme l'acte de forcer un prélèvement n'est pas prévu par la loi il ne peut être réalisé.

Grâce aux progrès scientifiques ce refus peut être « contourné », et on va alors utiliser des objets appartenant à la personne (brosse à dents, peigne...) ou bien récupérer des échantillons

en faisant boire le suspect ou en lui offrant des cigarettes pendant la garde à vue ! Ces pratiques sont acceptables au niveau légal car elles ne sont nulle part décrites comme illégales, cependant on s'interroge sur leur respectabilité au niveau éthique. De plus, de tels procédés peuvent engendrer des problèmes procéduraux par la contestation quant à la certitude de ce que l'objet porte bien des traces biologiques du suspect et non pas d'une autre personne qui pourrait avoir utilisé l'objet.

On peut être surpris qu'une telle question ne soit pas clairement légiférée car elle oppose les besoins de l'enquête et le respect de l'individu.

Il faut noter que dans des pays comme les Etats-Unis et l'Angleterre, le consentement au prélèvement n'est pas nécessaire dans les affaires pénales. On prélève quelques cheveux avec le bulbe pour procéder au profil génétique du suspect.

3- Les laboratoires et le personnel :

La preuve scientifique se doit d'être parfaite compte tenu des conséquences qu'elle peut avoir sur les personnes, leur vie privée, leur réputation et leur liberté. De ce fait les résultats doivent être **exacts, fiables et reproductibles**. Pour assurer que de telles contraintes soient respectées, un certain nombre de garanties sont prises à plusieurs niveaux.

• Le personnel :

Les personnes habilitées à réaliser des empreintes génétiques vont être nommées par une **commission** prévue à cet effet, elles vont alors recevoir un agrément.

La commission est instituée auprès du garde des sceaux, elle est présidée par un magistrat de la cour de cassation. En plus du président elle comporte 10 membres :

- 6 membres sont nommés en relation avec leur fonction :
 - Directeur des affaires civiles.
 - Directeur des affaires criminelles et des grâces au ministère de la justice.
 - Directeur général de la Police Nationale.
 - Directeur général de la Gendarmerie Nationale.
 - Directeur de la santé.

- Directeur général des enseignements supérieurs.

- 4 membres sont nommés en raison de leur compétence dans le domaine de la biologie moléculaire . Chacun des 4 membres est désigné respectivement par le ministre chargé de la recherche, le ministre de la santé, le ministre de la défense et le ministre de l'intérieur.

Le décret du 6 février 1997 fixe les conditions de délivrance de l'agrément. (voir annexe XII, XIII, XIV) :

Les personnes doivent déjà être experts auprès des tribunaux, avoir un diplôme de 3^o cycle et justifier de travaux et d'expérience d'un niveau suffisant dans le domaine avant de recevoir l'agrément.

De même, les personnes travaillant en collaboration sous la surveillance de la personne agréée doivent justifier d'un niveau d'étude élevé et d'expérience. D'ici 5 ans à partir du décret, tout le personnel travaillant sur les empreintes génétiques devra être agréé que ce soit dans le domaine privé aussi bien que dans la gendarmerie ou la police.

⇒ Actuellement en France 21 personnes ont reçu l'agrément :(Annexe X, XI)

- 8 font partie des laboratoires de la police scientifique. (Paris, Lyon , Marseille, Toulouse, Lille)
- 1 fait partie des laboratoires de la gendarmerie. (Paris)
- 3 font partie de Centre de Transfusion Sanguine. (Lyon, Paris, Brest)
- 2 font partie d'un laboratoire privé. (Strasbourg)
- 7 font partie d'un Centre Hospitalo-Universitaire (Paris, Nantes, Bordeaux)

• Les locaux :

Lorsqu'une personne pose sa candidature pour l'agrément, une étude très approfondie des locaux où elle va officier est réalisée. Les conditions requises pour que le laboratoire soit conforme, sont décrites dans l'article 9 du décret de février 1997. Les infrastructures pour la PCR sont particulièrement étudiées. De même les locaux doivent garantir des conditions de sécurité précises pour qu'il n'y ai pas de vol de scellés.

• Garantie des résultats et des techniques :

C'est l'agence du médicament qui va être l'organisme chargé du contrôle de la fiabilité des résultats. Le nouvel article L761-24 du Code de la Santé publique définit les modalités du contrôle de qualité dont font l'objet les analyses par empreintes génétique dans le cadre de procédures judiciaires.

L'agence du médicament effectue un contrôle deux fois par an et envoie annuellement ses conclusions à la commission d'agrément. Un agrément est prévu pour 5 ans, le cas est réétudié ensuite. Si pendant cette période la commission détecte des anomalies de fonctionnement, l'agrément peut être retiré à la personne.

D'une manière générale pour des soucis de qualité les laboratoires qui réalisent des empreintes génétiques vont faire le nécessaire pour remplir les normes de contrôle de qualité.

4- Empreintes génétiques et fichier informatique [16]:

La France n'est pas en avance dans le domaine de l'utilisation des empreintes génétiques dans le domaine judiciaire, par rapport aux pays anglo-saxons notamment. En fait les preuves ADN commencent depuis seulement quelques années à être réellement prises en compte lors d'affaires pénales, et déjà un problème se pose : celui de la comparaison des résultats obtenus dans une affaire avec des résultats obtenus dans une autre affaire.

L'idéal serait de pouvoir comparer chaque nouveau cas avec les cas déjà connus, ce qui permettrait de faire le lien entre :

- des empreintes d'un suspect retrouvées sur plusieurs affaires.
- des empreintes d'un suspect avec les empreintes d'une personne déjà connue et donc d'identifier le suspect.

On comprend aisément l'intérêt de faire de tels recoupements grâce à l'outil informatique et le problème qui se pose n'est bien évidemment pas technique mais une fois encore juridique. En effet, chaque laboratoire peut se créer un fichier (manuel ou le plus souvent informatique) à partir des affaires qu'il traite et ce fichier peut être interrogé par des enquêteurs d'autres laboratoires. Mais attention, en aucun cas on ne peut appliquer un

programme informatique à de tels fichiers, la recherche dans le fichier doit se faire « à la main ». En effet, en France en vertu de l'article de la loi du 6 janvier 1978 relative à l'informatique et aux libertés, on ne peut se servir d'un programme informatique permettant d'effectuer automatiquement et systématiquement le rapprochement et le tri de données capables de désigner une personne. Or un fichier d'empreintes génétiques relie bien des données à un individu donc il ne peut être traité par l'informatique.

Le même problème s'est déjà posé avec les empreintes digitales et un décret du 8 avril 1987 [Annexe XV] a autorisé dans un cadre précis à créer un fichier informatique donc on peut supposer qu'il en sera de même pour les empreintes génétiques.

Le modèle anglais de fichier informatique d'empreintes génétiques:

Toute personne arrêtée comme suspecte dans une affaire criminelle va être fichée. Lors de la garde à vue, quelques cheveux seront arrachés ou un prélèvement buccal est effectué et l'échantillon est acheminé vers un laboratoire central qui se charge du fichier national. La même technique sera toujours utilisée (multiplex qui explore 6 STR et un locus sexuel) pour que les résultats soient toujours comparables.

Cependant l'inclusion définitive dans le fichier est limitée : toute personne innocentée lors de l'enquête ou du procès est éliminée du fichier. De même on garde les empreintes lors de cas de crimes graves. Ainsi environ 135 000 cas par an sont inscrits dans le fichier temporairement et une bonne moitié n'est pas conservée.

Aux Etats-Unis il existe aussi des fichiers qui sont propres à chaque état.

5- Les efforts Européens de standardisation [6]:

Avec un total de 150 laboratoires effectuant des empreintes génétiques et employant plus de 700 personnes en Europe, on se rend compte du besoin d'établir une collaboration entre les différents pays Européens. C'est pourquoi le conseil de l'Europe a proposé une recommandation en 1994 qui a pour but d'inciter les états membres à établir des standards techniques et de procédures : *Le conseil de l'Europe dans la recommandation R.92 sur « l'utilisation de l'analyse de l'ADN dans le cadre du système de la justice pénale » spécifie que les états membres doivent promouvoir la standardisation des méthodes de l'analyse ADN à la fois au niveau national et international. Ceci entraîne une collaboration inter laboratoire*

dans la validation des procédures analytiques et des contrôles. De plus chaque pays doit mettre au point une mesure d'accréditation du personnel.

Bien avant la recommandation du conseil de l'Europe, dans une perspective de collaboration entre les différents pays d'Europe un groupe de scientifiques travaillant sur les empreintes génétiques a formé en 1989 un organisme : l'European DNA Profiling Group ou EDNAP. Cet organisme regroupe des scientifiques travaillant sur les empreintes génétiques dans tous les pays d'Europe. Ce groupe cherche à promouvoir un protocole commun entre les pays d'Europe qui permettra de comparer des empreintes d'un pays à l'autre. A l'origine les participants de ce groupe ont fait des « exercices » et ont mis en commun les résultats obtenus [7]. Les objectifs de ces travaux étaient de caractériser les facteurs qui influençaient la taille des fragments de restriction au sein d'un laboratoire et entre les laboratoires, de déterminer les paramètres de l'analyse qui devaient être absolument définis et de comparer les différentes méthodes de lecture autoradiographique. Chaque laboratoire a analysé le même échantillon d'ADN à dix reprises. Les études ont montré que si les enzymes, les sondes et les conditions d'analyses sont similaires, les résultats sont très concordants. Actuellement les scientifiques de l'EDNAP travaillent sur une uniformisation des fragments étudiés, des enzymes utilisées et des protocoles opératoires. Le but d'un tel groupe est de pouvoir s'échanger des informations d'un pays à l'autre et de progresser tous ensemble et non pas de manière isolée.

Aux Etats-Unis un tel groupe a été formé : le Technical Working Group on DNA Analysis Methods ou TWGDAM. Ce groupe propose aussi d'établir des protocoles communs dans les différents états et au sein d'un même état.

Actuellement on peut constater que tous les pays membres ne suivent pas les recommandations du conseil de l'Europe (surtout en ce qui concerne le besoin d'agrément pour effectuer des empreintes génétiques et le peu (ou pas) de contrôles externes qui sont pratiqués).

Conclusion :

La loi fait son possible pour que la preuve génétique soit irréfutable en imposant à sa réalisation toute une série de limitations et de contrôles. Il reste cependant à légiférer sur certain point pour que le recours aux techniques d'empreintes génétiques soit parfois simplifié et ne constitue pas pour les magistrats un « casse-tête ».

LES EMPREINTES GENETIQUES EN MEDECINE LEGALE.

CONCLUSION

Traditionnellement, l'une des méthodes les plus sûres pour déterminer la présence d'un individu sur la scène d'un crime était le relevé des empreintes digitales. Depuis une quinzaine d'années, une nouvelle méthode est utilisée : la détermination des empreintes génétiques à partir d'ADN retrouvé sur le lieu du crime. La technique de détermination des empreintes génétiques repose sur des polymorphismes de séquence observés au sein de l'ADN nucléaire. Ces polymorphismes sont des portions d'ADN non codant où de courtes séquences vont être répétées un nombre variable de fois selon chaque individu. On distingue les VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) où la séquence répétée est formée d'une vingtaine de bases, et les STR (Short Tandem Repeat) où la séquence répétée n'est que de 2 à 6 bases. Ces VNTR et ces STR sont isolés du reste de l'ADN par des enzymes de restriction qui vont couper l'ADN spécifiquement au niveau du fragment voulu. Après l'action des enzymes de restriction on obtient alors des fragments dont la taille correspond au nombre de répétitions de la séquence de base. Grâce à la technique mise au point par Southern, on peut étudier les différences de taille des fragments en les faisant migrer par électrophorèse et en effectuant un transfert sur une membrane hybridable par des sondes spécifiques. On peut ainsi étudier des profils de migration entre le ou les suspects et l'ADN retrouvé sur le lieu du crime. On utilise aussi cette technique dans le cadre de recherche de paternité. La méthode d'identification de Southern a révolutionné le secteur de la preuve judiciaire, cependant ce procédé a ses limites : il faut une grande quantité d'ADN et il faut qu'il soit en bon état. C'est pourquoi l'étude de ces polymorphismes par la technique d'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) a très nettement augmenté les possibilités d'identification. En effet on peut, en procédant à une amplification spécifique des VNTR ou des STR, utiliser des quantités d'ADN de départ beaucoup plus faibles et même de l'ADN partiellement dégradé.

La grande majorité des cas pratiques est résolue par une de ces deux techniques, mais lorsque les quantités sont vraiment infimes ou que l'ADN est très dégradé, on va alors utiliser

une toute nouvelle technique : le séquençage de l'ADN mitochondrial . On étudie alors une région polymorphe de l'ADN mitochondrial comprise dans la région de contrôle de cet ADN. De par son polymorphisme, cette région est spécifique de chaque individu. On procède à un séquençage , c'est à dire une détermination base par base de la séquence, par la technique de Sanger ou de Maxam et Gilbert et on compare les séquences du ou des suspects avec les séquences de l'ADN mitochondrial retrouvé sur le lieu du crime.

Quelle que soit la technique utilisée, les résultats se doivent d'être parfaitement fiables car leurs conséquences en matière judiciaire sont énormes. En effet se sont des preuves scientifiques et elles sont considérées comme irréfutables. Pour être crédibles, elles doivent donc fournir un maximum de garanties. En France l'utilisation des empreintes génétiques est légiférée afin de fournir un maximum de garanties :

- Les preuves sur la scène du crime doivent être recueillies par un spécialiste et mises sous scellé.
- Les analyses doivent être réalisées par du personnel hautement qualifié ayant reçu l'agrément d'une commission gouvernementale formée à cet effet .
- Les locaux dans lesquels sont réalisées les empreintes génétiques sont contrôlés deux fois par an par l'agence du médicament.
- Les droits de l'individu sont protégés et respectés.

Les techniques utilisées sont très pointues, le personnel très qualifié et les lois existantes apportent un maximum de garanties. Dans ces conditions, on comprend aisément que cette preuve scientifique soit de plus en plus utilisée au cours des procédures pénales et civiles.

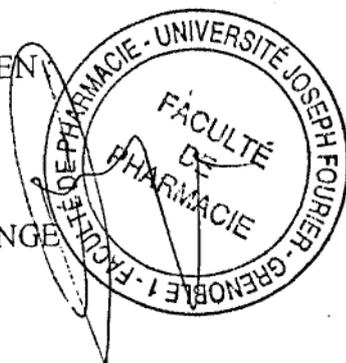
Si actuellement se sont les techniques de PCR qui sont les plus utilisées, on observe un net développement de la technique de séquençage de l'ADN mitochondrial et on peut supposer que son utilisation va encore augmenter dans les années à venir.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble le : 30/08/99

LE DOYEN

P. DEMENGE



LE PRÉSIDENT DE THESE :

A. EAVIER

Bibliographie.

- [1] ALLEN.S , Ph.D, ENGSTRÖM.A *et al.*
Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery capps : sensitivity and matching probabilities. *J Frensic Sci* , 1984, 43 : 453-464.
- [2] BENDALL.K, MACAULAY.V, SYKES.B.
Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individual hair roots. *Am.J.Hum.Gen.*, 1997, 61 : 1303-1308.
- [3] BENDALL.K, MACAULAY.V, SYKES.B.
Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am.J.Hum.Gen.*, 1996, 59 : 1276-1287.
- [4] BHOOPAT.T, STEGER.H.F
Frequency distribution of D1S80 alleles in the Northern Thai population analysed by amplified fragment length polymorphism technique. *Forensic. Sci. Int.*, 1996, 81 : 149-155.
- [5] BUTLER.J., LEVIN.B.
Forensic applications of mitochondrial DNA. *Trends in biotechnology* 1998,16 (4) : 158-62.
- [6] CARRACEDO.A, RODRIGUEZ-CALVO.M, PESTONL.C. *et al.*
Forensic DNA analysis in Europe: current situation and standardization efforts. *Forensic. Sci. Int.*, 1997, 86 : 87-102.
- [7] CARRACEDO.A, D'ALOJA.E, DUPUY.B, JANGBLAD.A. *et al.*
Reproductibility of mtDNA analysis between laboratories : a report of the European DNA profiling Group (EDNAP). *Forensic sci. Int.* 1998 97 (2-3) :165-70.
- [8] CHAKRABORTY.R, STIVERS.D.
Paternity exclusion by DNA markers : Effects of paternal mutations. *Journal of Forensic Science*, 1996, 41 : 671-677.
- [9] CHIBA.S, OSHIDA.S, OKANO.K, KAMBARA.H, ESUMI.M.
Paternity testing by the detection of D1S80 VNTR using fluorescence image analyzer (Dualcolour system). *Forensic. Sci. Int.*, 1996, 83 : 87-94.
- [10] COQUOZ.R.
Les empreintes génétiques et la criminalistiaque: Passé, présent, futur. *Revue internationale de criminologie et de police technique*, 1989, 3 , 330-349.
- [11] CORACH.D, SALA.A, PENACINO.G, IANUCCLN, BERNARDI.P. *et al.*
Additional approaches to DNA typing of skeletal remains : the serach for « missing »persons killed during the last dictatorship in Argentina. *Electrophoresis* 1997, 18(9) :1608-12.
- [12] DIMO-SIMONIN.N, BRANDT-CASADEVALL.C.
Evaluation and usefulness of reverse dot blot DNA-PolyMarker typing in forensic case work. *Forensic. Sci. Int.*, 1996, 81 : 61-72
- [13]DOUTREMEPUICH.C
Les empreintes génétiques en pratique judiciaire. La documentation Française, Paris, 1998.
- [14] ETIENNE.J.
Biochimie génétique/Biologie moléculaire, 4^eEdition, Masson,Paris,1998
- [15] EIVSON.M, SMILLIE.D, CHAMBERLAIN.A.
Extraction of single-copy Nuclear DNA from forensic specimens with a variety of postmortem histories. *Journal of forensic science*, 1997, 42 : 1032-1038.

[16] FANARDJIAN.P.

Ethical and legal issues related to forensic DNA typing : the legal situation in France. *Forensic. Sci. Int.*, 1997, 88 : 71-73.

[17] GOODWIN.W, LINACRE.A, VANEZIS.P.

The use of mitochondrial DNA and short tandem repeat typing in the identification of air crash victims. *Electrophoresis* 1999, 20 (8) :1707-11.

[18] GLOCK.B, DAUBER.E, SCHWARTZ.D, MAYR.W.

Additional variability at the D12S391 STR locus in an Austrian population sample: sequencing data and allele distribution. *Forensic. Sci. Int.*, 1997, 90 : 197-203.

[19] IVANOV. PL.

The expert identification of the remains of the imperial family by means of molecular genetic verification of genealogical relations. *Sud med. Ekspert* 1998, 41(4) : 30-47.

[20] JEHAES.E, DECORTE.R, PENEAU.A, PETRIE.JH. et al.

Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette. *Eur. J. Hum. Genet.* 1998 6 : 383-95.

[21] JEHAESE.E, GILISSEN.A, CASSIMAN.JJ, DECORTE.R.

Evaluation of a decontamination protocol for hair shafts before mtDNA sequencing. *Forensic sci . int.* 1998, 94 (1-2) : 65-71.

[22] JOBLING.M.A, PANDYA.A, TYLER-SMITH.C.

The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med*, 1997, 110 : 118-124.

[23] KAPLAN J.C, DEPLECH M.

Biologie moléculaire et médecine, Médecine-Sciences Flammarion, Paris, 1989.

[24] KHETERPAL.I, SCHERER.J, CLARK.S. et al.

DNA sequencing using a four color confocal fluorescence capillary array scanner. *Electrophoresis*, 1996, 17 :1852-1859.

[25] KRINGS.M, STONE.A, SCHMITZ.R, KRAINITZKI.H, STONEKING.M , PÄÄBO.S.

Neandertal DNA Sequences and the origin of Modern Humans. *Cell*, 1997, 90 , 19-30

[26] LIGHTOWLERS.R, CHINNERY.P, TURNBULL.D, HOWELL.N.

Mammalian mitochondrial genetics : heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet.*, 1997, 13 :450-455.

[27] LORD.W,DIZINNO.J.

Isolation, amplification, and sequencing of human mitochondrial DNA obtained from human crab louse, *Pthirus Pubis*. *Journal of Forensic Science*, 1998,43(5) : 1097-1100.

[28] LUDES.B, MANGIN.P

Les empreintes génétiques en médecine légale. Technique et documentation-Lavoisier, Paris, 1992

[29] MANGIN.P.

Ethical and legal issues raised by DNA fingerprinting in France. *Forensic. Sci. Int.*, 1997, 88 : 67-69.

[30] MORLEY.JM, BARK.JE, EVANS.CE, PERRY.JG.

Validation of mitochondrial minisequencing for forensic casework. *Int.J.Legal med.* 1999,112(4) :241-8.

[31] PARSON.W, PARSONS.TJ, SCHEITHAUER.R, HOLLANDMM.

Population data for 101 Austrian caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences : application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *Int. J. Legal. Med.* 1998, 111(3) : 124-32.

[32] RIEDER.M, TAYLOR.S, TOBE.V, NICKERSON.D.

Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing : anaysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26 : 967-973.

[33] ROSTED.I, LALU.K, LUKKA.M, SAJANTILA.A.

Genotyping of five short tandem repeat loci via triplex and duplex PCR. *Forensic. Sci. Int.*, 1996, 82 : 217-226.

[34] ROY.R.

Infrared fluorescent detection of D1S80 alleles . *Forensic. Sci. Int.* , 1997, 87 : 63-71.

[35] SANTOS.S, BUDOWLE.B, SMERICK.J, KEYS.K, MORETTI.T.

Portuguese population data on the six short tandem repeat loci – CSF1PO, TPOX, THO1, D3S1358, VWA and FGA. *Forensic. Sci. Int.*, 1996, 83 : 229-235.

[36] SASAKI.M, SHIONO.H, FUKUSHIMA.T, SHIMIZU.K.

Human identification by genotyping of personal articles. *Forensic. Sci. Int.*, 1997, 90 : 65-75.

[37] STEIGHNER.R, HOLLAN.M.

Amplification and Sequencing of mitochondrial DNA in forensic Casework. *Methods in Molecular Biology*, 1998, 98 :213-223.

[38] STONEKING.M, HEDGECOCK.D, HIGUCHI.R, VIGILANT.L, ERLICH.H.

Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am.J.Hum.Gen.*, 1991, 48 : 370-382.

[39] STRADMANN-BELLINGHAUSEN.B, RITTNER.C, TAKAHAMA.K, SCNEIDER.PM. et

al.
Sequence polymorphism of mitochondrial DNA control region in Japanese. *Forensic sci. Int.* 1998 97(2-3) :155-64.

[40] SWEET.D, LORENTE.M, VALENZUELA.A, LORENTEJ, ALVAREZ.J.

Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. *Forensic. Sci. Int.*, 1996, 83 : 167-177.

[41] TIE.J, TSUKAMOTO.S, OSHIDA.S et al.

DNA typing of the D1S80 locus using capillary zone electrophoresis. *Forensic. Sci. Int.* 1997, 87 : 193-199.

[42] YAMADA.Y, OHIRA.H, IWASE.H, TAKATORI.T. et al.

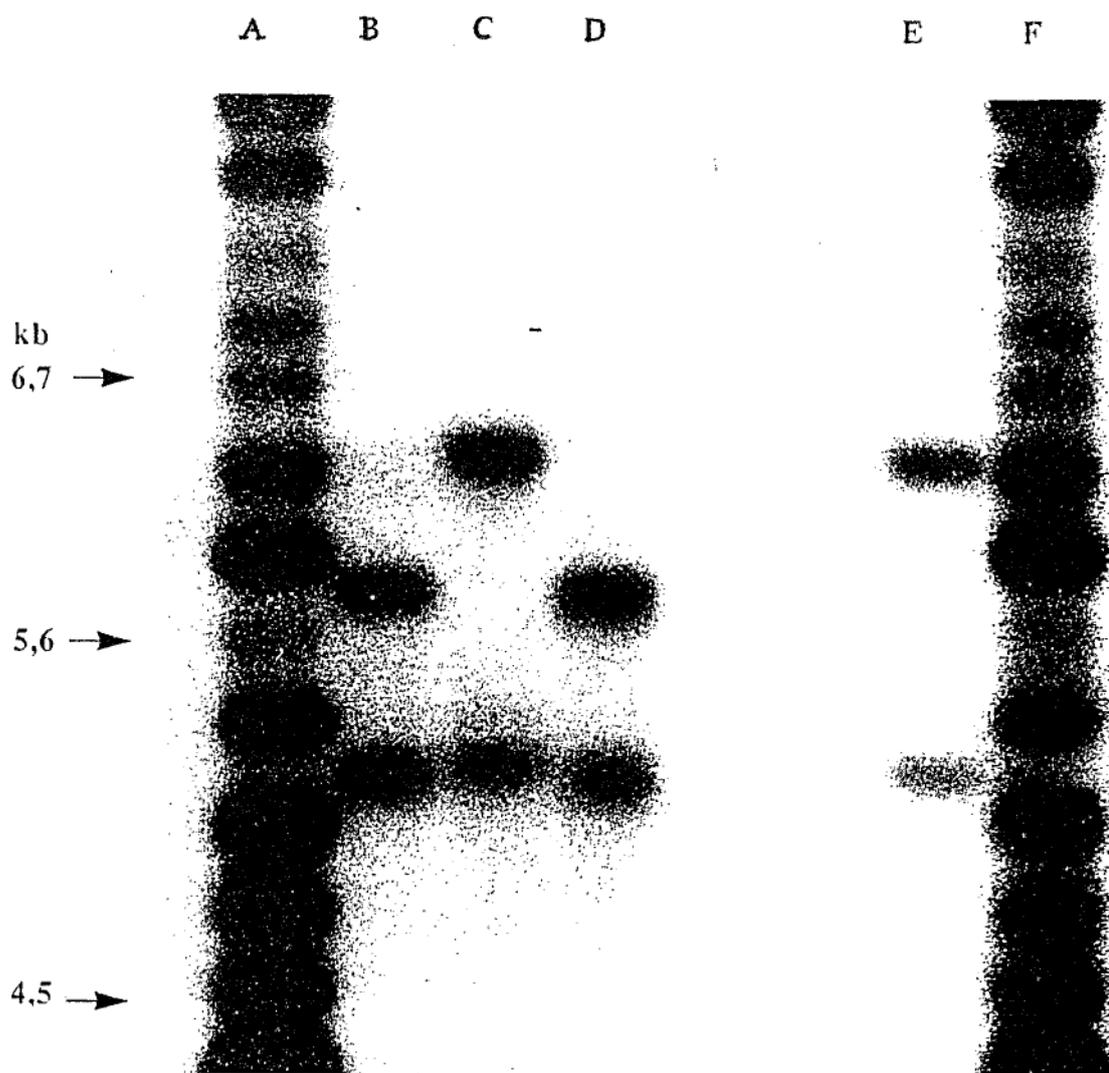
Sequencing mitochondrial DNA from a tooth and application to forensic odontology. *J. Forensic odontostomology* 1997,15 (1) : 13-6.

[43] WOOLLEY.A, HADLEY.D, LANDRE.P. et al.

Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal. Chem.*, 1996, 68 :4081-4086.

ANNEXES

RESOLUTION D'UN CAS DE VIOL A L'AIDE DE LA SONDE UNILOCULAIRE MLJ 14 (D₁₄S₁₃).



Lignes A et F : marqueur de taille.

Ligne B : profil génétique établi à partir du suspect.

Ligne C : profil génétique établi à partir de la victime.

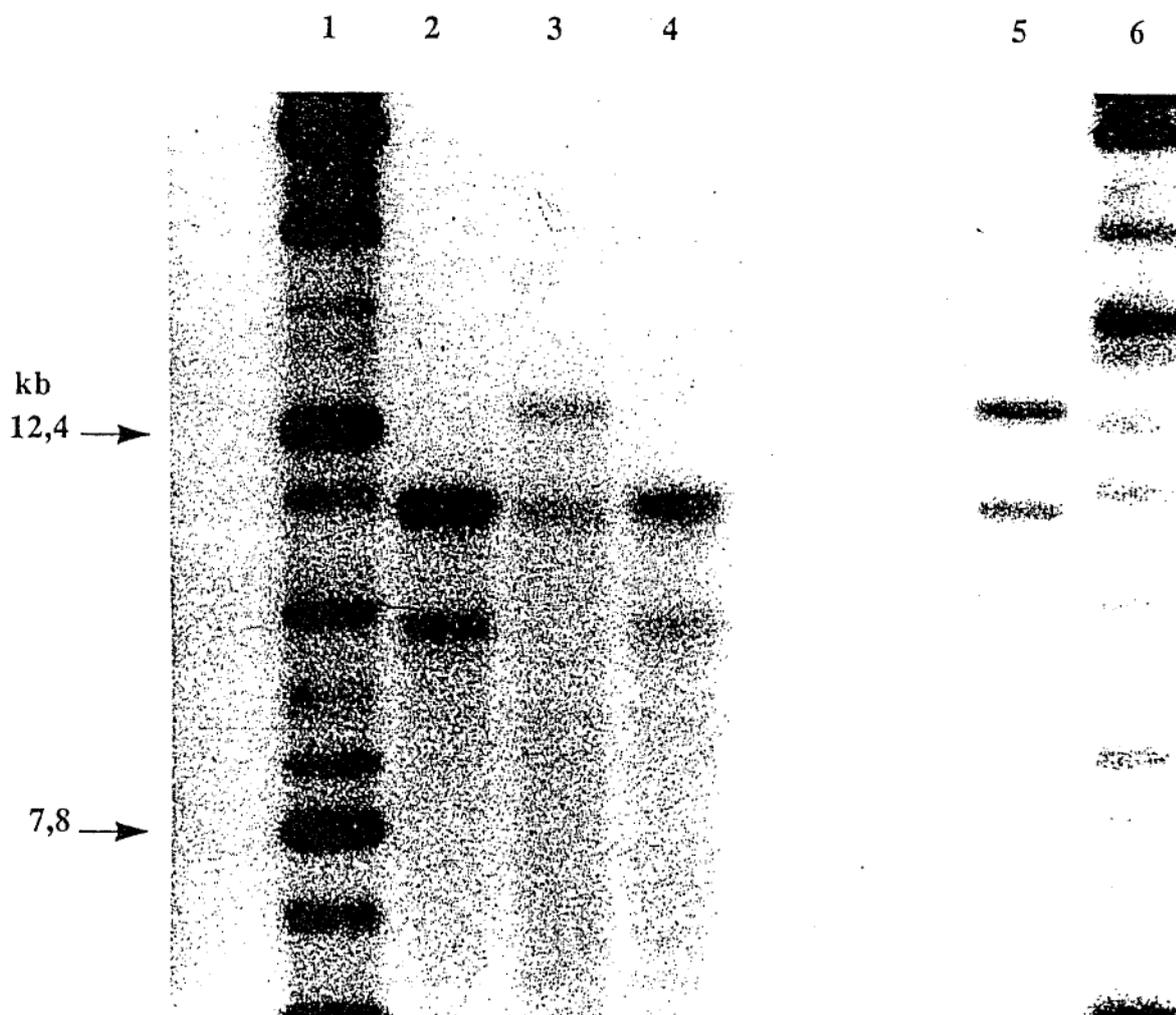
Ligne D : profil génétique établi à partir des spermatozoïdes trouvés sur la tache.

Ligne E : profil génétique établi à partir des cellules vaginales présentes sur la tache et correspondant à la victime.

Les profils B et D correspondent, il s'agit bien de l'agresseur.

(Conditions d'analyse : gel d'agarose à 0,8 %, électrophorèse à 20 volts pendant 65 heures, enzyme de restriction Pst I, sonde MLJ 14, membrane nylon).

DIFFICULTE DE CHARGER DANS CHAQUE PUIITS LA MÊME
CONCENTRATION D'ADN SURTOUT EN CAS D'ANALYSE DE
TACHES : DANS CET EXEMPLE, UNE TACHE DE SPERME.



Lignes 1 et 6 : marqueur de taille.

Ligne 2 : empreinte génétique de la victime (établie à partir d'un prélèvement sanguin).

Ligne 4 : empreinte génétique des cellules vaginales présentes sur la tache.

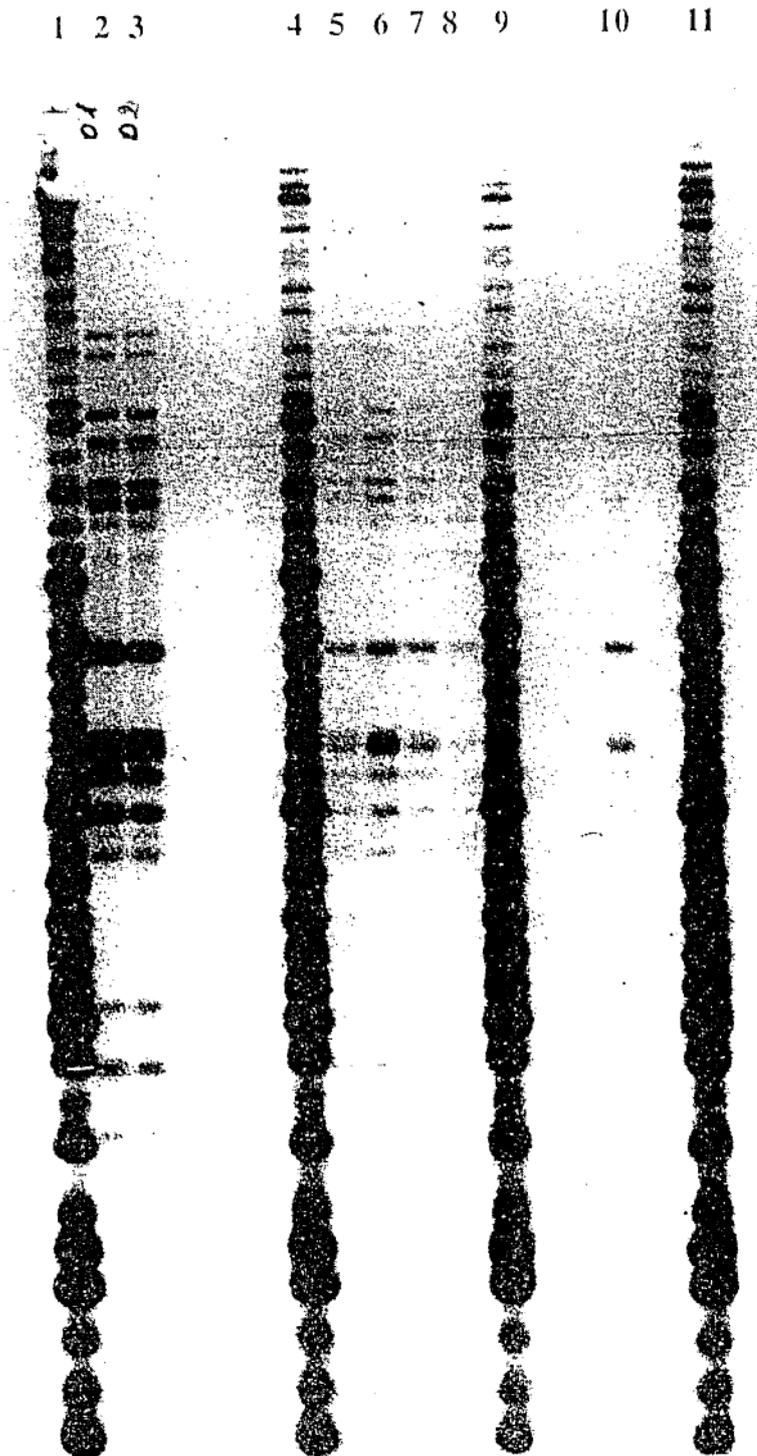
Ligne 3 : empreinte génétique des spermatozoïdes.

Ligne 5 : empreinte génétique du suspect (établie à partir d'un prélèvement sanguin).

Le signal des lignes 3 et 4 est plus faible que celui obtenu à partir de l'ADN extrait du sang (lignes 2 et 5).

(Conditions d'analyse : gel d'agarose 0,8 %, électrophorèse 20 volts pendant 65 heures, enzyme de restriction Pst I, sonde YNH 24, membrane nylon).

CONTAMINATION BACTERIENNE DES EMPREINTES GENETIQUES

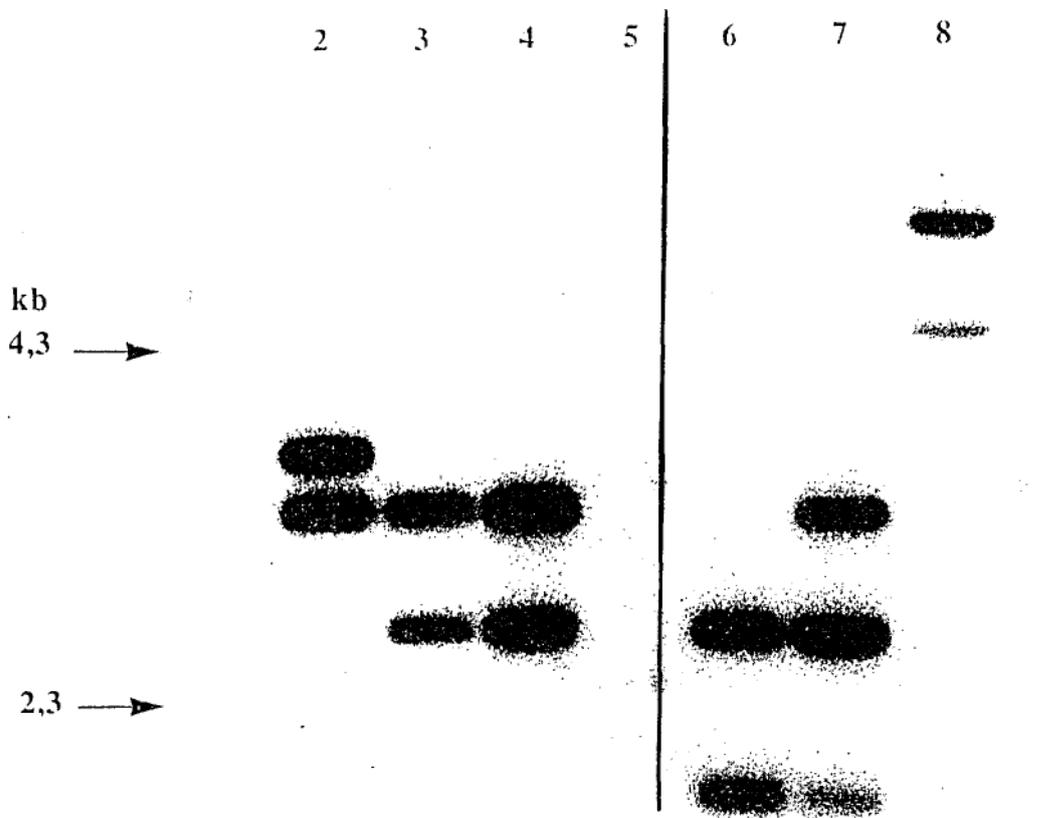


La sonde moléculaire révélant les marqueurs de taille (composés de phages Lambda, Phi X) est responsable de la visualisation des fragments bactériens au sein de l'ADN à analyser.

Lignes 1, 4, 9, 11 : marqueurs de taille.

*Lignes 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 : empreintes bactériennes contaminant l'analyse ANNEXE III
des profils génétiques humains.*

EMPREINTES GENETIQUES ET RECHERCHE DE PATERNITE (ENZYMES DE RESTRICTION *HINF I*, SONDES D18S27)



- **PREMIER TRIPLET: Cas 1**

Ligne 2 : *empreinte de la mère.*

Ligne 3 : *empreinte de l'enfant.*

Ligne 4 : *empreinte du père présumé.*

L'allèle supérieur de l'enfant a été transmis par la mère (allèle inférieur) et l'allèle inférieur de l'enfant peut avoir été transmis par le père présumé.

- **DEUXIÈME TRIPLET: Cas 2**

Ligne 6 : *empreinte de la mère.*

Ligne 7 : *empreinte constituée par un mélange de tissus fœtaux et maternels lors d'un avortement par aspiration.*

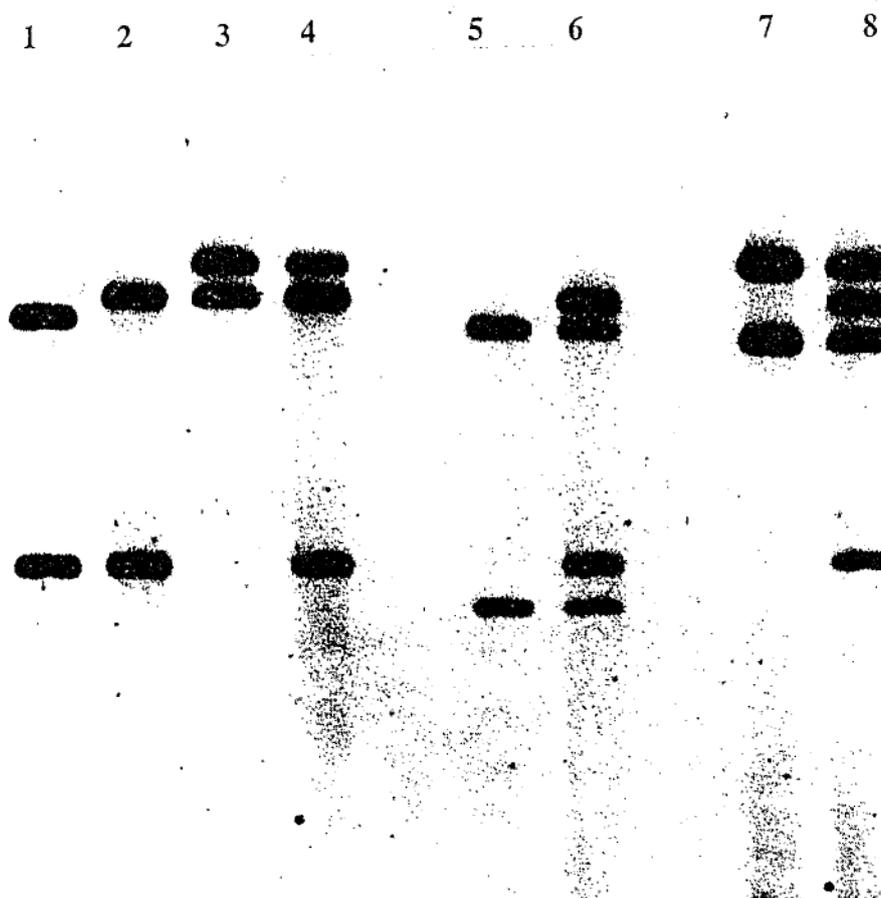
Ligne 8 : *empreinte du père présumé.*

Dans ce cas, le père présumé est exclu.

L'allèle inférieur du fœtus provient des tissus maternels et l'allèle médian a été transmis par la mère.

*(Conditions d'analyse : gel d'agarose à 1,2 %, électrophorèse à 20 volts pendant 12 heures, enzyme de restriction *HinfI* sonde $D_{18}S_{27}$, membrane nylon)*

EMPREINTES GENETIQUES OBTENUES A L'AIDE DE LA SONDE FROIDE MS 31 NICE (ICI CELLMARK DIAGNOSTICS) DANS LE CAS D'UNE PATERNITE



La qualité des empreintes obtenues à l'aide des sondes froides est équivalente à celle des empreintes réalisées à l'aide de sondes marquées au ^{32}P .

Ligne 1 : empreinte de la mère.

Ligne 2 : empreinte de l'enfant.

Ligne 3 : empreinte du père présumé.

Ligne 4 : mélange enfant-père présumé pour vérifier la migration des allèles de même origine.

Ligne 5 : empreinte du deuxième père présumé.

Ligne 6 : mélange de l'ADN des lignes 2 et 5.

Ligne 7 : empreinte du troisième père présumé.

Ligne 8 : mélange de l'ADN des lignes 2 et 7.

Le premier allèle de l'enfant a été transmis par le premier père présumé (allèle inférieur) et le deuxième allèle de l'enfant a été transmis par la mère (allèle inférieur de la mère).

(Conditions d'analyse : gel d'agarose 0,8 %, électrophorèse à 20 volts pendant 12 heures, sonde MS 31 Nice, membrane nylon, enzyme de restriction Hinf I).

PREPARATION DES REACTIFS

ACETATE D'AMMONIUM 7,5 M

NH₄OAc 57,81 g
H₂O stérile qsp 100 ml 0123456789
Autoclaver, conservation à température ambiante.

CHELEX 5%

CHELEX 100 17,85 g
H₂O stérile qsp 100 ml
Stocker à température ambiante.

DTT 1 M

DTT 1,54 g
H₂O stérile qsp 10 ml
Aliquoter en 50 µl. Conservation à -20°C.

EDTA 0,2 M pH 8

Na₂EDTA 74,4 g
NaOH 7,7 g
H₂O stérile 800 ml
Ajuster le pH à 8 avec de la soude 10 N
H₂O stérile qsp 1000 ml
Autoclaver, conserver à température ambiante.

ETHANOL ABSOLU :

Stocker à -20°C pour la précipitation d'ADN.

ETHANOL 70 %

Ethanol absolu 350 ml
H₂O stérile 150 ml
Stocker à -20°C.

PBS

NaCl 8 g

KCl 2 g

KH₂PO₄ 2 g

Na₂HPO₄ 15 g

Dissoudre dans un litre d'eau.

PROTEINASE K (10 mg/ml)

Dissoudre 25 mg de PK dans 2,5 ml d'H₂O en ampoule.

Conserver à -20°C.

SARCOSYL 10 %

Dissoudre 10 g de N-Lauroylsarcosine H₂O qsp 100 ml

Filtrer sur 0,22 µM

Stocker à 4°C.

TAMPON D'EXTRACTION SEB (taches de sang)

Tris HCL 2M pH 8 0,5 ml

NaCL 5 M 2 ml

EDTA 0,2 M 5 ml

SDS 10 % 10 ml

Proteinase K 10 mg/ml 5 ml

H₂O stérile qsp 100 ml

Aliquoter stérilement par 500 µl.

SDS 10 % (Lauryl Sulfate)

Dissoudre 100 g de SDS dans 1 litre d'eau stérile

TAMPON F1

500 µl par tube (mélange extemporané)

400µl de PBS

100 µl de sarcosyl 10 %

Conserver à -20°C.

TAMPON F2

TNE 400 μ l
SDS 10% 50 μ l
Protéinase K 10 μ l
H₂O stérile 40 μ l
Aliquoter en 500 μ l
Conserver à -20°C.

TAMPON M

TNE 150 μ l
Sarcosyl 10 % 100 μ l
Protéinase K 20 μ l
DTT 1 M 15,6 μ l
H₂O stérile 114,4 μ l
Aliquoter en 500 μ l
Conserver à -20°C.

TEB

Urée 10 M 4 ml
SDS 10 % 0,5 ml
EDTA 0,2 ml 0,25 ml
NaCl 5 M 0,3 ml
Tris-HCl 2 M pH 7,3 25 μ l
Protéinase K 250 μ l

TNE

Tris-HCl 2 M pH 8 5 ml
NaCl 5 M 20 ml
EDTA 0,2 M pH 8 5 ml
H₂O stérile qsp 1000 ml
Filtrer sur 0,45 μ . Autoclaver. Conserver à 4°C.

TRIS-HCL 2M pH 8

Tris-HCl 177,6 g
Tris base 106 g
H₂O stérile qsp 1000 ml
Autoclaver. Conserver à 4°C.

TRIS-EDTA

Tris base 2 M pH 7,3 5 ml
EDTA 0,2 M pH 8 2,5 ml
H₂O stérile qsp 500 ml
Autoclaver. Conserver à 4°C.

TE 20-5 / NaCl 0,2 M

Tris base 2 M pH 7,3 10 ml
EDTA 0,2 M pH 8 25 ml
NaCl 5 M 40 ml
H₂O stérile qsp 1000 ml
Autoclaver. Stocker à température ambiante.

UREE 10 M

Urée 60,06 g
H₂O distillée stérile qsp 100 ml
Conserver à température ambiante.

ANNEXE

Liste des personnes titulaires de l'agrément les habilitant à procéder à des identifications par empreintes génétiques dans le cadre d'une procédure judiciaire

(liste à jour au 1er juin 1999)

1 - Cour d'appel d'Aix-en-Provence

- Mlle FRACKOWIAK Sylvie, expert près la cour d'appel d'Aix-en-Provence (laboratoire de police scientifique de Marseille - 97, bd Camille Flammarion - 13248 Marseille Cedex 4)
- Mme BONINO Marie-Claude, expert près la cour d'appel d'Aix-en-Provence (laboratoire de police scientifique de Marseille - 97, bd Camille Flammarion - 13248 Marseille Cedex 4)
- Mlle TAILLE Annick, expert près la cour d'appel d'Aix-en-Provence (Laboratoire de police scientifique de Marseille - 97, bd Camille Flammarion - 13248 Marseille Cedex 4)

2 - Cour d'appel de Bordeaux

- M. DOUTREMEPUICH Christian, expert près la Cour de cassation et près la cour d'appel de Bordeaux (laboratoire d'hématologie médico-légale - 43, avenue de la République - 33000 Bordeaux)
- Mme DOUTREMEPUICH Françoise, expert près la cour d'appel de Bordeaux (laboratoire d'hématologie médico-légale - 43, avenue de la République - 33000 Bordeaux)

3 - Cour d'appel de Colmar

- M. LUDES Bertrand, expert près la cour d'appel de Colmar (laboratoire de recherche et d'identification génétique Codgène - 11, rue Humann - 67085 Strasbourg Cedex)
- Mme PFITZINGER Hélène, expert près la cour d'appel de Colmar (laboratoire de recherche et d'identification génétique Codgène - 11, rue Humann - 67085 Strasbourg Cedex)
- Laboratoire CODGENE - 11, rue Humann - 67085 Strasbourg Cedex (personne morale au sein de laquelle les missions d'identification par empreintes génétiques sont assurées par M. Bertrand LUDES et Mme Hélène PFITZINGER)

4 - Cour d'appel de Douai

- Mme BERLOT-PICARD Frédérique, expert près la cour d'appel de Douai (laboratoire de police scientifique de Lille - 7, bd Vauban - 59800 Lille)

5 - Cour d'appel de Lyon

- Mlle PALEOLOGUE Anne, expert près la cour d'appel de Lyon (laboratoire de police scientifique de Lyon - 40, rue Marius Berliet - 69371 Lyon Cedex 08)

- M. RIGAL Dominique, expert près la cour d'appel de Lyon (laboratoire d'histocompatibilité de l'établissement de transfusion sanguine de Lyon - 1 et 3, rue du Vercors - 69342 Lyon)
- M. MEYER Francis, expert près la cour d'appel de Lyon (laboratoire d'histocompatibilité de l'établissement de transfusion sanguine de Lyon - 1 et 3, rue du Vercors - 69342 Lyon)

6 - Cour d'appel de Paris

- Mlle CHERPIN Marie-Hélène, expert près la cour d'appel de Paris (laboratoire de police scientifique de Paris - 3, quai de l'Horloge - 75001 Paris)
- M. ROUGER Philippe, expert près la cour d'appel de Paris (laboratoire de génétique humaine de l'Institut national de la transfusion sanguine - 6, rue Alexandre-Cabanel - 75739 Paris Cedex 15)
- Mme CRAINIC Karine, expert près la cour d'appel de Paris (laboratoire de biochimie et biologie moléculaire - Université de Paris V - 104, bd Raymond Poincaré - 92380 Garches)
- Mme CARLOTTI Marie-Paule, expert près la cour d'appel de Paris (laboratoire de l'Institut de recherche criminelle - Fort de Rosny - 1, bd T. Sueur - 93111 Rosny-sous-Bois)

7 - Cour d'appel de Rennes

- M. MOISAN Jean-Paul, expert près la cour d'appel de Rennes (laboratoire de génétique moléculaire C.H.R.U. de Nantes - Hôtel Dieu - Quai Moncoussu - 44093 Nantes Cedex 1)
- M. PASCAL Olivier, expert près la cour d'appel de Rennes (laboratoire de génétique moléculaire C.H.R.U. de Nantes - Hôtel Dieu - Quai Moncoussu - 44093 Nantes Cedex 1)
- Mme LE ROUX Marie-Gaëlle, expert près la cour d'appel de Rennes (laboratoire de génétique moléculaire - C.H.R.U. de Nantes - Hôtel Dieu - Quai Moncoussu - 44093 Nantes Cedex 1)
- M. FEREC Claude, expert près la cour d'appel de Rennes (laboratoire de biogénétique - Etablissement de transfusion sanguine de Bretagne occidentale - 46, rue Félix le Dantec - B.P. 454 - 29275 Brest Cedex)

8 - Cour d'appel de Toulouse

- Mme SABATIER Myriam, expert près la cour d'appel de Toulouse (laboratoire de police scientifique de Toulouse - Hôtel de Police - 23, bd de l'Embouchure - B.P. 2162 - 31021 Toulouse Cedex)
- Mlle GAGNOR Corinne, expert près la cour d'appel de Toulouse (laboratoire de police scientifique - 23, bd de l'Embouchure - 31021 Toulouse)

MINISTÈRE DE LA JUSTICE

Décret n° 97-109 du 6 février 1997 relatif aux conditions d'agrément des personnes habilitées à procéder à des identifications par empreintes génétiques dans le cadre d'une procédure judiciaire

NOR: JUSC9620898D

Le Premier ministre,

Sur le rapport du garde des sceaux, ministre de la justice,
Vu le code civil, et notamment son article 16-12 dans sa rédaction issue de la loi n° 94-653 du 19 juillet 1994 relative au respect du corps humain ;

Vu le code de procédure pénale, et notamment son article 157 ;

Vu le code de la santé publique, et notamment ses articles L. 567-2 et L. 761-24 ;

Vu la loi n° 71-498 du 29 juin 1971 relative aux experts judiciaires ;

Le Conseil d'Etat (section de l'intérieur) entendu,

Décète :

Section 1^{re}

Commission chargée d'agrément les personnes habilitées à effectuer des missions d'identification par empreintes génétiques dans le cadre de procédures judiciaires

Art. 1^{er}. - Il est institué auprès du garde des sceaux, ministre de la justice, une commission chargée d'agrément les personnes habilitées à effectuer des missions d'identification par empreintes génétiques dans le cadre de procédures judiciaires.

Cette commission est présidée par un magistrat de la Cour de cassation, en exercice ou honoraire, désigné pour trois ans par arrêté du garde des sceaux, ministre de la justice.

Elle comprend en outre :

1^o Six membres siégeant en raison de leurs fonctions :

- le directeur des affaires civiles et du sceau ou son représentant ;
- le directeur des affaires criminelles et des grâces ou son représentant ;
- le directeur général de la police nationale ou son représentant ;
- le directeur général de la gendarmerie nationale ou son représentant ;
- le directeur général de la santé ou son représentant ;
- le directeur général des enseignements supérieurs ou son représentant.

2^o Quatre membres, ou leurs suppléants, désignés pour une durée de trois ans à raison de leur compétence dans le domaine de la biologie moléculaire, dont :

- un par le ministre chargé de la recherche ;
- un par le ministre chargé de la santé ;
- un par le ministre de la défense ;
- un par le ministre de l'intérieur.

Le mandat des membres désignés et de leurs suppléants est renouvelable une fois.

Le remplacement d'un membre désigné en cas de cessation de ses fonctions en cours de mandat, ou en cas d'absence sans motif légitime à plus de trois séances consécutives de la commission, s'effectue dans les mêmes conditions que sa désignation et pour la durée du mandat restant à accomplir.

Art. 2. - La commission se réunit à la diligence et sur convocation de son président, qui fixe l'ordre du jour.

Elle ne peut se prononcer que si sept au moins de ses membres, dont deux au moins désignés à raison de leur compé-

tence, sont présents. Les décisions sont prises à la majorité des voix des membres présents. En cas de partage égal des voix, celle du président est prépondérante.

Le secrétariat de la commission est assuré par la direction des affaires civiles et du sceau au ministère de la justice.

Section 2

Conditions de l'agrément permettant d'effectuer des missions judiciaires d'identification des personnes par leurs empreintes génétiques

Art. 3. - Sont seules habilitées à procéder à des identifications par empreintes génétiques dans le cadre d'une procédure judiciaire les personnes physiques ou morales ayant fait l'objet, dans des conditions fixées par les dispositions ci-après, d'un agrément délivré, pour une période de cinq ans renouvelable, par la commission instituée à l'article 1^{er}.

Paragraphe 1

Conditions relatives aux titulaires de l'agrément

Art. 4. - L'agrément prévu à l'article 3 ne pourra être accordé qu'à des personnes physiques ou morales inscrites sur une des listes instituées en vertu de l'article 2 de la loi du 29 juin 1971 susvisée relative aux experts judiciaires et de l'article 157 du code de procédure pénale.

Art. 5. - L'agrément prévu à l'article 3 est délivré à des personnes physiques justifiant au moins de l'un des diplômes suivants :

1. Doctorat en sciences biologiques ;
2. Diplôme d'études approfondies de génétique humaine ;
3. Diplôme d'études spécialisées de biologie médicale ;
4. Diplôme d'études spécialisées de génétique médicale (clinique, chromosomique et moléculaire) ;
5. Diplôme d'études spécialisées complémentaires de biologie moléculaire ou de cytogénétique humaine.

Les personnes titulaires des diplômes mentionnés au 1 ou au 2 de l'alinéa précédent doivent en outre justifier de travaux ou d'une expérience d'un niveau suffisant dans les activités d'application de la biologie moléculaire.

Lorsque l'agrément mentionné à l'article 3 est délivré à une personne morale, les personnes physiques appelées à assurer, en son sein et en son nom, des missions d'identification par empreintes génétiques doivent elles-mêmes être agréées.

Art. 6. - Pendant une durée de cinq ans à compter de la publication du présent décret, l'agrément prévu à l'article 3 peut, par dérogation à l'article précédent, être délivré à des personnes qui ne satisfont pas à l'une des conditions de diplôme définies par cet article s'il s'agit de personnes physiques dépendant des laboratoires de la police technique et scientifique de la police nationale ou de l'institut de recherche criminelle de la gendarmerie nationale, justifiant d'une formation ou de travaux ainsi que d'une expérience d'un niveau suffisant dans les activités d'application de la biologie moléculaire.

Art. 7. - Le maintien de l'agrément prévu à l'article 3 ainsi que son renouvellement éventuel sont subordonnés à la participation des titulaires de l'agrément à un contrôle de qualité organisé par l'Agence du médicament, conformément à l'article L. 761-24 du code de la santé publique.

Ce contrôle, destiné à assurer la fiabilité des résultats des analyses biologiques d'identification par empreintes génétiques, requiert la réalisation par les personnes agréées de missions d'identification par empreintes génétiques portant sur des échantillons biologiques simulant les conditions d'exécution des missions judiciaires qui leur sont habituellement confiées.

Il est effectué au moins deux fois par an dans des conditions garantissant la confidentialité des opérations d'évaluation.

Le résultat du contrôle est communiqué sans délai au titulaire de l'agrément par l'Agence du médicament.

L'Agence du médicament est chargée chaque année d'adresser à la commission les annales du contrôle de qualité, qui doivent comporter une note de synthèse contenant notamment des recommandations permettant d'améliorer la qualité des analyses.

Paragraphe 2

Conditions relatives aux laboratoires où il est procédé à l'identification des personnes par leurs empreintes génétiques

Art. 8. - La délivrance de l'agrément prévu à l'article 3 est subordonnée à la désignation par la personne candidate du laboratoire dans lequel celle-ci entend exécuter les missions d'identification par empreintes génétiques qui pourront lui être confiées.

Art. 9. - Les laboratoires où sont exécutées les missions d'identification par empreintes génétiques dans le cadre de procédures judiciaires doivent disposer d'infrastructures et d'équipements adaptés aux techniques de biologie moléculaire qui y sont mises en œuvre, notamment aux techniques d'amplification génique, et qui devront être utilisés de façon à garantir l'absence de toute contamination.

Les locaux affectés à la conservation des scellés, des échantillons biologiques et des résultats d'analyses doivent être équipés d'installations propres à garantir :

- une protection contre le vol ou la dégradation ;
- une confidentialité absolue ;
- la sauvegarde des scellés, des prélèvements et des résultats d'analyses.

Section 3

Procédure de délivrance de l'agrément

Art. 10. - Les demandes tendant à l'octroi de l'agrément prévu à l'article 3 ou les demandes de renouvellement de cet agrément sont transmises par le candidat ou par son représentant légal, s'il s'agit d'une personne morale, au président de la commission instituée à l'article 1^{er}, accompagnées d'un dossier justificatif comportant les éléments d'appréciation suivants :

- a) Documents attestant que le candidat est inscrit ou a sollicité son inscription sur une des listes dressées en application de la loi du 29 juin 1971 susvisée et de l'article 157 du code de procédure pénale, et indiquant la ou les rubriques des listes d'experts judiciaires dans lesquelles l'intéressé est inscrit ou a sollicité son inscription ;
- b) Lorsque l'agrément est sollicité par une personne morale, indication de l'identité des personnes physiques qui assureront, au sein de ladite personne morale et en son nom, les missions d'identification par empreintes génétiques ;
- c) Justificatifs relatifs aux conditions de qualification professionnelle visées aux articles 5 et 6 ;
- d) Justificatifs éventuels ayant trait à d'autres diplômes dont le candidat est titulaire ou à d'autres activités qu'il pratique dans le domaine de la biologie médicale ;
- e) Tous renseignements permettant d'identifier et de localiser le laboratoire dans lequel les candidats à l'agrément entendent réaliser les missions judiciaires d'identification ; descriptif détaillé des équipements techniques et des locaux que comporte ce laboratoire ; le cas échéant, présentation du système d'assurance de qualité qui y est établi ;
- f) Tous documents propres à établir la nature des liens juridiques existant entre le candidat et le laboratoire ;
- g) Si le candidat est une personne morale, statuts de celle-ci ;
- h) Indication des techniques d'identification auxquelles le candidat à l'agrément se propose de recourir.

Art. 11. - La commission instituée à l'article 1^{er} notifie aux postulants les décisions leur accordant ou leur refusant l'agrément visé à l'article 16-12 du code civil dans un délai de six mois suivant la date de réception de leur dossier de candidature.

Les demandes de renouvellement de l'agrément sont adressées à la commission au moins six mois avant l'échéance de la période visée à l'article 3.

Art. 12. - Les personnes habilitées à procéder à des identifications par empreintes génétiques dans le cadre de procédures

judiciaires sont tenues d'adresser à la commission dans les quinze jours de leur réception les évaluations résultant des contrôles de qualité prévus à l'article 7.

Elles font également parvenir à la commission un état annuel précisant le nombre des missions d'identification qu'elles ont accomplies en matière civile et pénale et indiquant la nature de la technique d'identification utilisée pour chacune d'elles.

La commission doit être avertie de tout projet tendant soit au transfert dans un autre site du laboratoire où sont exécutées les missions d'identification, soit à l'intervention de nouvelles personnes pour assurer celles-ci au sein de la personne morale et en son nom, soit à la cessation des fonctions ou au remplacement d'une ou plusieurs des personnes qui ont la charge de réaliser ces missions dans les conditions prévues à l'alinéa 3 de l'article 5 du présent décret.

Dans l'une ou l'autre de ces hypothèses, il appartient aux personnes agréées de communiquer à la commission les justificatifs propres à établir que les conditions d'habilitation mentionnées aux articles 4 à 9 demeurent remplies.

Section 4

Procédure de retrait de l'agrément

Art. 13. - Le retrait de l'agrément prévu par l'article 3 du présent décret est prononcé par la commission instituée à l'article 1^{er} dans les cas suivants :

- a) Radiation de la personne agréée des listes instituées par l'article 2 de la loi du 29 juin 1971 susvisée et par l'article 157 du code de procédure pénale ou non-renouvellement de l'inscription de l'intéressée ;
- b) Réalisation par la personne agréée d'identifications par empreintes génétiques hors des cas prévus à l'article 16-11 du code civil ;
- c) Refus de la personne agréée de participer aux contrôles de qualité périodiques prévus à l'article 7, résultats insuffisants obtenus lors de ceux-ci, non-communication à la commission des évaluations résultant des contrôles de qualité ;
- d) Violation des règles de sécurité et des exigences d'infrastructure ou d'équipement mentionnées à l'article 9 ;
- e) Réalisation de missions d'identification par empreintes génétiques par des personnes ou dans des conditions ne correspondant pas aux indications portées à la connaissance de la commission et ayant justifié la délivrance de l'agrément, son maintien ou son renouvellement.

Art. 14. - La décision de retrait d'agrément, prévue à l'article 10, est prise par la commission instituée à l'article 1^{er}, après que la personne qui en fait l'objet, ou son représentant, s'il s'agit d'une personne morale, a été invité à présenter ses observations.

Cette décision, qui doit être motivée, est notifiée par lettre recommandée avec avis de réception à la personne qu'elle concerne ou à son représentant.

Elle est portée à la connaissance du procureur général près la cour d'appel dans le ressort de laquelle la personne concernée est inscrite en qualité d'expert judiciaire et, le cas échéant, à la connaissance du procureur général près la Cour de cassation, s'il s'agit d'un expert judiciaire inscrit sur la liste nationale des experts.

Section 5

Dispositions transitoires

Art. 15. - Nonobstant l'article 3 et jusqu'au 31 décembre 1997, des missions d'identification par empreintes génétiques pourront être exécutées sur commission judiciaire par des personnes ou des laboratoires remplissant les conditions ci-après :

- a) Avoir effectué à titre habituel, sur commission judiciaire, des missions de même nature durant une période d'au moins trois ans précédant l'entrée en application du présent décret ;
- b) Avoir déposé, dans les quatre mois suivant ladite entrée en application, une demande tendant à obtenir l'agrément visé à l'article 3 ;

c) N'avoir pas fait l'objet, postérieurement au dépôt de cette demande, d'une décision de refus d'agrément notifiée par la commission instituée à l'article 1^{er}.

Art. 16. - Le garde des sceaux, ministre de la justice, le ministre de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche, le ministre de la défense, le ministre du travail

et des affaires sociales, le ministre de l'intérieur, le secrétaire d'Etat à la recherche et le secrétaire d'Etat à la santé et à la sécurité sociale sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent décret, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 6 février 1997.

ALAIN JUPPÉ

Par le Premier ministre :

Le garde des sceaux, ministre de la justice,
JACQUES TOUBON

*Le ministre de l'éducation nationale,
de l'enseignement supérieur et de la recherche,*
FRANÇOIS BAYROU

Le ministre de la défense,
CHARLES MILLON

Le ministre du travail et des affaires sociales,
JACQUES BARROT

Le ministre de l'intérieur,
JEAN-LOUIS DEBRÉ

Le secrétaire d'Etat à la recherche,
FRANÇOIS D'AUBERT

*Le secrétaire d'Etat à la santé
et à la sécurité sociale,*
HERVÉ GAYMARD

MINISTÈRE DE L'ÉQUIPEMENT, DU LOGEMENT, DES TRANSPORTS ET DU TOURISME

Arrêté du 29 janvier 1997 portant suppression de régies de recettes et d'avances

NOR : EQUH9700179A

Par arrêté du ministre de l'équipement, du logement, des transports et du tourisme et du ministre délégué au budget, porte-parole du Gouvernement, en date du 29 janvier 1997, les dispositions de l'arrêté du 12 avril 1994 instituant les régies de recettes et d'avances auprès de la direction des gens de mer et de l'administration générale du ministère de l'équipement, des transports et du tourisme sont abrogées à compter du 31 décembre 1996.

MINISTÈRE DU TRAVAIL ET DES AFFAIRES SOCIALES

Décret n° 97-110 du 7 février 1997 relatif à la composition de diverses instances consultatives en matière de travail et d'emploi dans la collectivité territoriale de Corse

NOR : TAST9611695D

Le Premier ministre,

Sur le rapport du ministre du travail et des affaires sociales,

Vu le code du travail, notamment les articles L. 133-2, L. 523-2, R. 311-4-6, R. 311-4-9 et R. 523-5 à R. 523-9 ;

Vu la loi n° 91-428 du 13 mai 1991 portant statut de la collectivité territoriale de Corse ;

Vu le décret n° 85-682 du 4 juillet 1985 relatif à l'organisme professionnel de prévention du bâtiment et des travaux publics, modifié par le décret n° 86-525 du 13 mars 1986 ;

Vu le décret n° 86-568 du 14 mars 1986 portant création de commissions régionales de la médecine du travail ;

Vu l'avis de l'assemblée de Corse en date du 29 juillet 1996 ;

Le Conseil d'Etat entendu,

Décète :

Art. 1^{er}. - I. - Dans la collectivité territoriale de Corse, il est ajouté un membre représentant les salariés, désigné par une organisation syndicale représentative dans le seul ressort de cette collectivité, dans chacune des instances suivantes :

a) Le comité régional mentionné à l'article R. 311-4-6 du code du travail ;

b) Le comité départemental mentionné à l'article R. 311-4-9 du même code ;

c) La commission régionale de conciliation mentionnée à l'article R. 523-3 du même code ainsi que, le cas échéant, la section régionale et les sections à compétence départementale instituées au sein de cette commission ;

d) Le comité régional de prévention du bâtiment et des travaux publics mentionné à l'article 8 du décret du 4 juillet 1985 susvisé ;

e) La commission régionale de la médecine du travail instituée par le décret du 14 mars 1986 susvisé.

II. - Dans la même collectivité territoriale, les organisations représentatives d'employeurs disposent d'un siège supplémentaire au sein de chacune des instances visées au I ci-dessus.

Le comité régional mentionné au a du I comprend en outre un représentant supplémentaire des administrations intéressées, désigné par le préfet de Corse ; la commission mentionnée au e comprend également une personnalité qualifiée supplémentaire, désignée par le préfet de Corse.

Art. 2. - Le mandat des personnes qui seront désignées pour la première fois en application des dispositions du présent décret prendra fin à la date du renouvellement des instances mentionnées à l'article 1^{er} ci-dessus.

Art. 3. - Le ministre du travail et des affaires sociales est chargé de l'exécution du présent décret, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 7 février 1997.

ALAIN JUPPÉ

Par le Premier ministre :

Le ministre du travail et des affaires sociales,
JACQUES BARROT

Décret n° 97-111 du 7 février 1997 relatif à la composition du comité régional et des comités départementaux de la formation professionnelle, de la promotion sociale et de l'emploi dans la collectivité territoriale de Corse

NOR : TASF9710133D

Le Premier ministre,

Sur le rapport du ministre du travail et des affaires sociales et du ministre de la fonction publique, de la réforme de l'Etat et de la décentralisation,

Vu le code du travail, et notamment ses articles L. 910-1, R. 910-14, D. 910-3, D. 910-9, D. 910-12 et D. 910-13 ;

Vu la loi n° 91-428 du 13 mai 1991 portant statut de la collectivité territoriale de Corse ;

prestation mentionnée à l'article 62 est subordonnée à une période de résidence et que la Partie contractante ne se prévaut pas des dispositions du paragraphe 3 de l'article 63, après cinq années de résidence ; et

b) Dans le cas des personnes protégées dont le soutien de famille n'avait pas rempli les conditions prescrites conformément aux dispositions du paragraphe 2 de l'article 63 pour la seule raison qu'il était trop âgé au moment de l'entrée en vigueur des dispositions relatives à l'application de cette partie, sous réserve des conditions prescrites relatives aux activités économiques antérieures du soutien de famille.

PARTIES II, III et IV

13. Une prestation pour frais funéraires s'élevant à :

- i) Soit vingt fois le gain journalier antérieur de la personne protégée qui sert ou aurait servi de base au calcul de la prestation de survivants ou de l'indemnité de maladie, selon le cas ; toutefois, il n'est pas nécessaire que la prestation totale soit supérieure à vingt fois le

saire journalier de l'ouvrier masculin qualifié, tel qu'il est déterminé conformément aux dispositions de l'article 65 ;

- ii) Soit vingt fois le salaire journalier de manœuvre ordinaire adulte masculin, tel qu'il est déterminé conformément aux dispositions de l'article 66.

Déclaration du Gouvernement de la République française

« Le Gouvernement français spécifie conformément à l'article 3 du présent Code qu'il accepte les obligations des parties suivantes :

- Partie II. - Soins médicaux ;
- Partie IV. - Prestations de chômage ;
- Partie V. - Prestations de vieillesse ;
- Partie VI. - Prestations en cas d'accidents du travail et de maladies professionnelles ;
- Partie VII. - Prestations relatives aux familles ;
- Partie VIII. - Prestations de maternité ;
- Partie IX. - Prestations d'invalidité. »

MINISTÈRE DE L'INTÉRIEUR

Décret n° 87-249 du 8 avril 1987 relatif au fichier automatisé des empreintes digitales géré par le ministère de l'intérieur

NOR : INTD8700094D

Le Premier ministre,

Sur le rapport du garde des sceaux, ministre de la justice, du ministre de la défense, du ministre de l'intérieur et du ministre délégué auprès du ministre de l'intérieur, chargé de la sécurité,

Vu le code de procédure pénale ;

Vu la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés ;

Vu le décret n° 78-774 du 17 juillet 1978 modifié pris pour l'application de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 ;

Vu le décret n° 79-1160 du 28 décembre 1979 fixant les conditions d'application aux traitements d'informations nominatives intéressant la sûreté de l'Etat, la défense et la sécurité publiques de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés ;

Vu l'avis de la Commission nationale de l'informatique et des libertés ;

Après avis du Conseil d'Etat (section de l'intérieur),

Décrète :

Art. 1^{er}. - Est autorisé, dans les conditions prévues au présent décret, le traitement automatisé de traces et empreintes digitales en vue de faciliter la recherche et l'identification, par les services de la police nationale et de la gendarmerie nationale, des auteurs de crimes et de délits et de faciliter la poursuite, l'instruction et le jugement des affaires dont l'autorité judiciaire est saisie.

Art. 2. - Ce traitement est mis en œuvre par la direction centrale de la police judiciaire au ministère de l'intérieur. Il porte la dénomination de fichier automatisé des empreintes digitales.

Art. 3. - Peuvent être enregistrées :

1^o Les traces relevées dans le cadre d'une enquête pour crime ou délit flagrant, d'une enquête préliminaire, d'une commission rogatoire ou de l'exécution d'un ordre de recherche délivré par une autorité judiciaire ;

2^o Les empreintes relevées dans le cadre d'une enquête pour crime ou délit flagrant, d'une enquête préliminaire, d'une commission rogatoire ou de l'exécution d'un ordre de recherche délivré par une autorité judiciaire, lorsqu'elles concernent des personnes contre lesquelles des indices graves et concordants de nature à motiver leur inculpation auront été réunis ou des personnes, mises en cause dans une procédure pénale, dont l'identification certaine s'avère nécessaire ;

3^o Les empreintes relevées dans les établissements pénitentiaires, en application du code de procédure pénale, en vue de s'assurer de manière certaine de l'identité des détenus qui sont l'objet d'une procédure pour crime ou délit et d'établir les cas de récidive.

Art. 4. - Les empreintes digitales enregistrées sont accompagnées des informations suivantes :

1^o Les nom, prénoms, date et lieu de naissance, filiation et sexe ;

2^o Le service ayant procédé à la signalisation ;

3^o La date et le lieu d'établissement de la fiche signalétique ;

4^o La nature de l'affaire et la référence de la procédure.

Les traces d'empreintes enregistrées sont accompagnées des informations suivantes :

1^o Le lieu sur lequel elles ont été relevées, ainsi que la date du relevé ;

2^o Le service ayant procédé à la signalisation ;

3^o La date et le lieu d'établissement de la fiche signalétique ;

4^o La nature de l'affaire et la référence de la procédure.

Art. 5. - Les informations enregistrées ne pourront être conservées au-delà d'une durée de vingt-cinq ans à compter de l'établissement de la fiche signalétique.

Elles sont effacées dès que le service gestionnaire est informé du décès de la personne qu'elles concernent.

Art. 6. - Le droit d'accès prévu par l'article 34 de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 s'exerce auprès du directeur central de la police judiciaire au ministère de l'intérieur, place Beauvau, Paris (8^e).

Art. 7. - Le présent traitement est placé sous le contrôle du procureur général près la cour d'appel de Paris, qui pourra ordonner la destruction des enregistrements dont la conservation ne paraîtrait manifestement plus utile compte tenu de la finalité du traitement.

Art. 8. - Les fonctionnaires dûment habilités du service d'identité judiciaire du ministère de l'intérieur et des unités de recherches de la gendarmerie nationale pourront seuls avoir accès aux informations enregistrées et procéder aux opérations d'identification à la demande de l'autorité judiciaire ou des officiers de police judiciaire de la police nationale ou de la gendarmerie nationale.

Art. 9. - Le fichier prévu au présent décret ne peut faire l'objet d'aucune interconnexion, rapprochement ou d'aucune autre forme de mise en relation avec un autre traitement automatisé d'informations nominatives.

Art. 10. - Le garde des sceaux, ministre de la justice, le ministre de la défense, le ministre de l'intérieur et le ministre délégué auprès du ministre de l'intérieur, chargé de la sécurité, sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent décret, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 8 avril 1987.

JACQUES CHIRAC

Par le Premier ministre :

Le ministre de l'intérieur,
CHARLES PASQUA

Le garde des sceaux, ministre de la justice,
ALBIN CHALANDON

Le ministre de la défense,
ANDRÉ GIRAUD

Le ministre délégué auprès du ministre de l'intérieur,
chargé de la sécurité,
ROBERT PANDRAUD

ANNEXE XV

