#### UNIVERSITE DE NANTES

#### UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE D'ODONTOLOGIE

Année : 2009 N°: 1

# Les empreintes génétiques en médecine légale: réalisation, législation

# THÈSE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement par

# LOISTRON Soléna

Née le 18 novembre 1984

Le 6 janvier 2009 devant le jury ci-dessous

Président: Monsieur le Professeur Olivier LABOUX

Assesseur : Madame le Docteur Brigitte LICHT

Assesseur: Madame le Docteur Bénédicte ENKEL

Directeur de thèse: Monsieur le Docteur Gilles AMADOR DEL VALLE

# **SOMMAIRE**

INTRODUCTION	5
I – Bases fondamentales	7
I-1 Composition	7
I-1-1 Les bases	7
I-1-2 Sucre	11
I-1-3 Acide phosphorique	11
I-1-4 Liaisons entre les composants	11
I-2 Structure	14
II - Les particularités du génome	18
II-1 Les SNP (Single Polymorphism Nucleotide)	18
II-2 Les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	19
II-3 Les séquences répétées en tandem	20
II-3-1 Les minisatellites ou VNTR (Variable number of tandem repeat)	21
II-3-2 Les microsatellites	21
II-4 Les marqueurs haplotypiques	26
II-4-1 Le chromosome Y	26
II-4-2 L'ADN mitochondrial (ou ADNmt)	27
II-5 Les séquences répétées dispersées : SINEs, LINEs	30
II-5-1 SINEs (Short INterspersed Elements)	30
II-5-2 LINEs (Long INterspersed Elements)	30
III – Techniques	33
III-1 Choix d'une région variable pour l'utilisation médico-légale	33
III-2 Les supports de l'ADN	34
III-2-1 La dent	34
III-2-1-1 Composition	34
III-2-1-2 Structure	34
III-2-1-3 Propriétés	37
III_2_1_3_1 Physiques	37

III-2-1-3-2 Chimiques	38
III-2-1-4 Prélèvement	38
III-2-2 Le cheveu	38
III-2-2-1 Morphologie	38
III-2-2-2 Prélèvement	39
III-2-3 Le sang	
III-2-3-1 Composition	
III-2-3-2 Prélèvement	
III-2-4 Le sperme	
III-2-4-1 Composition	
III-2-4-2 Prélèvement	
III-2-5 La salive	
III-2-5-1 Composition	
III-2-5-2 Prélèvement	
III-3 Les techniques d'analyse de l'ADN	
III-3-1 L'extraction de l'ADN	
III-3-1-1 Cas classique : le sang	
III-3-1-2 Cas particuliers	
III-3-1-2-1 La dent	
III-3-1-2-2 Le sperme	
III-3-1-2-3 La salive	
III-3-2 La purification	
III-3-2-2 Purification utilisant les propriétés de la silice	
III-3-3 La quantification	
III-3-4 La technique la plus ancienne	
III-3-4-1 Les enzymes de restriction	
III-3-4-2 l'électrophorèse	
III-3-4-2-1 Technique	
III-3-4-2-2 L'électrophorèse capillaire	
III-3-4-3 Le Southern blot	
III-3-4-4 Les sondes moléculaires	
III-3-4-4-1 Les sondes uniloculaires	
III-3-4-4-2 Les sondes multiloculaires	

III-3-5 La technique la plus couramment utilisée	71
III-3-5-1 LA PCR (Polymerase Chain Reaction)	71
III-3-5-1-1 Matériel :	
III-3-5-1-2 Méthode:	
III-3-5-1-3 Limites de la technique	77
III-3-5-1-4 Utilisation	77
III-3-5-1-5 Avantages	77
III-3-5-1-6 La PCR quantitative	78
III-3-5-1-7 La « real time PCR »	
III-3-5-1-9 La PCR multiplex	82
IV – Conservation des données et législation	85
IV-1 Introduction	85
IV-2 Valeur des tests ADN devant la justice	88
IV-1-1 Civil	88
IV-1-2 Pénal	89
IV-1-1-1 Déroulement de l'instruction d'une affaire pénale	89
IV-1-1-2 Composition de la cour d'assises	90
IV-1-1-3 Déroulement du procès	91
IV-1-1-4 Impact des empreintes génétiques sur la décision du jury	91
IV-3 Le débat autour du fichier national automatisé des empreintes génétiques	93
IV-3-1 Les principes de l'article 26 de la loi du 17 juin 1998, relative à la répressi	on des
infractions sexuelles et à la protection des mineurs :	96
IV-3-1-1 But	96
IV-3-1-2 Contenu	
IV-3-2 Loi du 15 novembre 2001, relative à la sécurité quotidienne	97
IV-3-3 Loi du 18 mars 2003, relative à la sécurité intérieure	98
IV-3-3-1 La liste des infractions	98
IV-3-3-2 Les personnes concernées	98
IV-3-4 Décret du 25 mai 2004	99
IV-3-5 Sécurisation du FNAEG	100
IV-3-5-1 Les modalités pratiques des analyses	100
IV-3-5-2 La nature et le contenu des informations contenues dans le fichier	102
IV-3-5-3 Le fonctionnement du fichier	102
IV 3 6 Les problèmes d'utilisation du ENAEC	102

IV-4 Le service central de conservation des prélèvements biologiques	104
IV-4-1 Missions	104
IV-4-2 Organisation	105
IV-4-2-1 Cellule réception /contrôle	105
IV-4-2-2 Cellule gestion/stockage	105
IV-5 Deux exemples d'application des empreintes génétiques	106
IV-5-1 L'affaire Guy Georges	106
IV-5-2 Les télomères	108
CONCLUSION	110
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	112
ANNEXES	122
Autorisation de reproduction	122
Figures 27 et 30	122
GLOSSAIRE	123
Liste des figures	125
Liste des tableaux	126

# INTRODUCTION

C'est en 1869 que Friedrich Miescher, un biochimiste suisse, découvrit l'acide désoxyribonucléique, ou ADN, en essorant des bandages purulents. Avec le pus obtenu, il disposa d'une source commode de globules blancs, cellules qui l'intéressèrent en raison de leur gros noyau. Quelques années plus tôt, E.H. Haeckel avait en effet affirmé que l'information héréditaire résidait dans le noyau. A partir du pus, Miescher isola une substance riche en phosphore et la baptisa nucléine (du latin nucleus, noyau). La condensation de la matière du noyau, lors de la division cellulaire, en bâtonnets nommés chromosomes, fut décrite peu après. En 1903, l'américain Walter S. Sutton proposa que les "facteurs" héréditaires mis en évidence par Gregor Mendel 40 ans plus tôt (on parlera bientôt de gènes) soient localisés sur les chromosomes. Cette "théorie chromosomique de l'hérédité" sera étayée à partir de 1910 par les travaux de Thomas Hunt Morgan.

Molécule de l'hérédité, l'ADN est essentiel à tout être vivant, car il porte dans sa structure même l'information génétique qui va déterminer la structure des protéines. Il est présent dans toutes les cellules de l'organisme, hormis les globules rouges et les plaquettes, qui n'ont pas de noyau. Jamais une molécule n'aura eu une telle célébrité!!

Il existe deux sortes d'ADN : la première est l'ADN génomique ou nucléaire ; il se situe dans le noyau de chaque cellule eucaryote, sous la forme de chromosomes (une molécule d'ADN par chromosome). La deuxième forme est l'ADN mitochondrial ou chondrome ; on le trouve en plusieurs copies dans les mitochondries de l'organisme.

La médecine légale concerne de larges domaines et va trouver beaucoup d'applications à notre époque. L'analyse de l'ADN est utile pour déterminer la filiation entre les individus, mais aussi en criminalistique (lors d'un viol ou d'un meurtre par exemple), pour rechercher des personnes disparues, ou encore pour l'identification de victimes lors d'une catastrophe de masse.

Le terme d'empreinte génétique provient du terme « fingerprinting », qui devient relativement impropre avec l'évolution des technologies. Le terme « fingerprinting » provenait d'une image, car les première analyses génétiques étaient réalisées avec des sondes multiloculaires, et elles donnaient un spectre de type « code-barres ». On pouvait alors caractériser un individu selon son profil, et comparer les profils entre eux. De nos jours, les analyses sont plutôt une étude du polymorphisme de l'ADN, c'est-à-dire l'étude successive des zones uniques et indépendantes de l'ADN réparties sur les chromosomes.

Les techniques d'identification les plus efficaces aujourd'hui sont basées sur l'ADN, ce sont les empreintes génétiques. Il existe de nombreuses sources d'ADN: cheveux, salive, sang, sperme, dents, ... Ces techniques viennent s'ajouter aux techniques actuelles, comme les empreintes digitales, ou l'analyse du phénotype sanguin par exemple, voire du système HLA.

Nous allons tout d'abord étudier rapidement la structure de l'ADN, puis nous verrons quelles spécificités de l'ADN permettent l'indentification génétique. Nous verrons ensuite les protocoles d'extraction de l'ADN dans ses différents supports, ainsi que les moyens d'analyse pour réaliser l'empreinte génétique de l'individu. Enfin, nous verrons quelle est la place des tests ADN dans le droit, et quelle valeur ils peuvent avoir devant un tribunal.

# I – Bases fondamentales (26, 46, 51, 56,70,73,74)

En 1944, O. T. Avery montre que l'ADN est la molécule de l'hérédité, et qu'elle contient toutes les informations du code génétique, transmises de manière héréditaire. L'ADN de chaque individu est donc unique (sauf celui des vrais jumeaux).

L'ADN constitue les chromosomes, et détermine les gènes. Chaque individu possède 23 paires de chromosomes : 23 chromosomes d'origine maternelle et 23 chromosomes d'origine paternelle. Ces chromosomes sont identiques dans toutes les cellules de l'individu (hormis les gamètes).

A l'état sec, l'ADN a un aspect cotonneux, tandis qu'il est visqueux quand il est hydraté, et on peut alors l'étirer en fibres.

## **I-1 Composition**

L'ADN est un polymère linéaire non ramifié constitué d'unités monomériques aussi appelées nucléotides, eux même formés de trois éléments : une base hétérocyclique azotée, un sucre (pentose) et un acide phosphorique. Si on déroule une molécule d'ADN, elle fait alors 3 mètres de long !

#### I-1-1 Les bases

Elles sont au nombre de quatre : adénine, cytosine, guanine, et thymine.

Ce sont des hétérocycles plans, hydrophobes et basiques. L'adénine et la guanine sont des purines (structures bi cycliques), tandis que la cytosine et la thymine sont des bases pyrimidines.

A l'intérieur de la double hélice d'ADN, l'adénine ne peut s'apparier qu'avec la thymine, et la cytosine ne peut s'apparier qu'avec la guanine.

Ainsi, une base pyrimidine est toujours appariée avec une base purine. En moyenne, il y a 39% d'appariement C-G dans l'ADN de l'Homme.

Cet appariement complémentaire de bases est aussi appelé appariement de Watson-Crick, et il est à la base de la formation de la double hélice d'ADN. Il en résulte que le nombre d'adénine est strictement égal au nombre de thymine dans la double hélice, de même que pour la cytosine et la guanine.

Figure 1 : Guanine

Figure 2 : Adénine

Figure 3 : Cytosine

Figure 4: Thymine

#### I-1-2 Sucre

C'est un pentose, le β D désoxyribose.

Dans l'ADN, une base liée à un pentose par une liaison covalente forme un nucléoside.

#### I-1-3 Acide phosphorique

C'est un triacide, dont seulement deux fonctions acide sont engagées dans une liaison ester, avec les pentoses.

La base, le sucre et l'acide phosphorique forment un nucléotide, qui est la sous unité élémentaire de chaque brin d'ADN.

#### I-1-4 Liaisons entre les composants

La base est liée au pentose, qui est lié à l'acide phosphorique.

La première liaison est une liaison  $\beta$  N osidique, la seconde est une liaison phosphodiester.

Puis les nucléotides s'enchaînent, pour former une chaîne d'ADN.

Cette chaîne d'ADN, également appelée brin d'ADN, va s'apparier à un deuxième brin d'ADN, chacun tournant sur lui-même tous les 34 Å, ce qui forme au final une double hélice.

La liaison entre les deux brins est réalisée entre deux bases complémentaires :

- -c'est une triple liaison hydrogène entre la cytosine et la guanine
- -c'est une double liaison entre l'adénine et la cytosine.

De ce fait, la liaison C-G est plus difficile à rompre que la liaison A-T, et cette cassure nécessite plus d'énergie.

Figure 5 : Pentose

Figure 6 : Acide phosphorique

Figure 7 : Schéma du nucléotide

Figure 8 : Liaison adénine-thymine

Figure 9 : Liaison cytosine-guanine

#### **I-2 Structure**

La molécule d'ADN est asymétrique, c'est une double hélice, aussi appelée hélice de Watson et Crick. Elle a été décrite pour la première fois en 1953.

Son diamètre est de 20 Å, et elle est constituée de deux chaînes d'ADN enroulées l'une autour de l'autre, produisant une double hélice orientée vers la droite.

Dans la double hélice, les groupes sucre/phosphate se situent à l'extérieur de l'hélice, et forment ainsi son squelette. Les bases, quant à elles, se situent à l'intérieur de l'hélice, pour former les liaisons hydrogènes avec l'autre brin.

Les paires de bases sont disposées à plat, elles sont empilées les unes sur les autres de manière régulière (elles sont espacées de 3,4 Å), perpendiculairement à l'axe principal de la double hélice d'ADN.

Les deux chaînes d'ADN possèdent une particularité, elles sont orientées. Chaque brin d'ADN est polarisé, la polarité étant déterminée par le sens dans lequel sont orientés les nucléotides. L'extrémité dite 3' de la chaîne est celle qui se termine par un groupement hydroxyle, et l'extrémité dite 5' est celle qui se termine par un groupement phosphate. Les deux brins constituant la double hélice d'ADN sont orientés dans des directions opposées.

Les enzymes qui reconnaissent des séquences spécifiques de l'ADN peuvent détecter cette polarité, et elles « lisent » la séquence de nucléotides de chaque brin dans des directions opposées. Comme la structure globale de la double hélice est constante, les enzymes peuvent donc copier, couper ou réparer l'ADN à n'importe quel endroit, sans tenir compte de l'information génétique portée par le segment d'ADN considéré.

La stabilité de la structure est obtenue par les liaisons hydrogènes. Même si celles-ci sont faibles, dans les conditions physiologiques, le nombre de bases important fait que les deux brins d'ADN ne se dissocient jamais spontanément.

En revanche, si le pH est inférieur à 3, ou supérieur à 10, on peut avoir une dénaturation, c'est-à-dire une séparation des deux brins d'ADN.

D'autre part, comme nous l'avons déjà vu, les paires C-G se séparent moins facilement que les paires A-T.

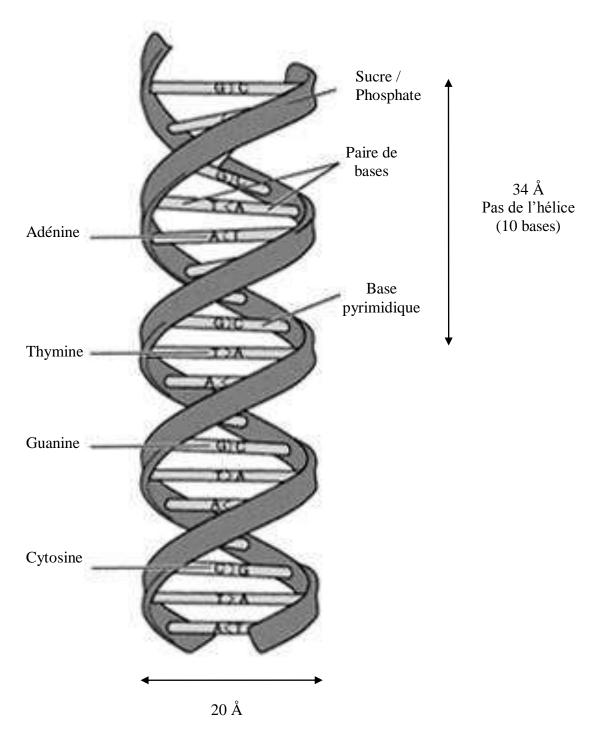


Figure 10 : Structure tertiaire de l'ADN

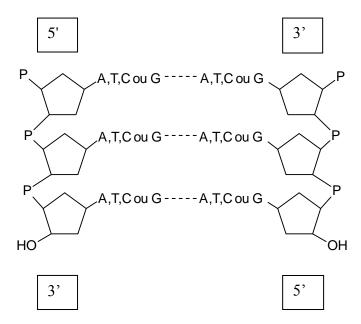


Figure 11 : Schéma des chaînes d'ADN

# II - Les particularités du génome

L'ADN est donc le support des gènes. Toutefois, ceux-ci ne sont pas tous identiques, et les séquences qui codent pour les protéines sont rares. Elles sont appelées séquences codantes, contrairement aux séquences non codantes, qui composent la partie la plus importante du génome. Cette partie non codante est extrêmement variable, c'est ce que l'on appelle le polymorphisme.

L'exemple extrême est le gène de la dystrophine, qui couvre plus de 2 millions de nucléotides sur le chromosome X, et dont la partie codante représente moins de 1% de la longueur totale (11).

Le polymorphisme est à la base de l'identification par les empreintes génétiques, car grâce à lui chaque individu possède un génome unique. Tout site polymorphe peut servir de marqueur génétique, en particulier ceux responsables de maladies génétiques.

# II-1 Les SNP (Single Polymorphism Nucleotide)

Les SNPs sont des marqueurs bi alléliques correspondant à la substitution d'un seul nucléotide à une position spécifique dans le génome, ce qui créé des allèles différentes. Le SNP est donc un polymorphisme de séquence.

En moyenne, on trouve un SNP tous les 500 à 1000 paires de bases chez l'Homme ; ils représentent 90% du polymorphisme du génome humain. Pour chaque SNP, 4 allèles sont théoriquement possibles, mais souvent seules deux sont rencontrées.

A l'origine c'est une mutation d'une cellule germinale qui a échappé au système de réparation de l'ADN, et donc la mutation a été transmise à la descendance (si non létale). Selon l'endroit d'apparition, l'effet est différent. Ils se situent en majorité dans les régions non codantes, donc n'ont pas d'effet sur le phénotype. En revanche, ils sont très utiles en criminalistique, ou pour la détermination de paternité.

Le premier marqueur bi allélique de ce type a été décrit en 1994 (24).

Leur taux de mutation est plus faible que celui des microsatellites ( $10^{-8}$  contre  $10^{-3}$  par génération), ce qui permet une comparaison génétique sur une période plus longue. De plus, ils sont répartis dans tout le génome. En revanche, leur polymorphisme est limité, ce qui nécessite l'analyse combinée de dizaines, voire de centaines de SNPs pour l'obtention d'une puissance d'identification satisfaisante. Il fut en moyenne 30 à 50 SNPs pour obtenir la même puissance d'information qu'avec l'analyse d'un seul microsatellite.

Un groupe de méthodes d'analyse des SNPs a été rassemblé sous le terme de « puce à ADN » ; ce sont des dispositifs miniaturisés qui permettent d'analyser des centaines ou des milliers de SNPs simultanément. Leur détection, analyse et interprétation facile sont adaptables à toutes les plateformes d'étude de l'ADN existantes et automatisables (23).

Mais cette puce présente quelques défauts :

-Pour que l'analyse soit possible, elle nécessite en premier lieu une amplification par PCR de toutes les zones portant les SNPs à analyser. Il faut amplifier des dizaines de fragments différents en une seule opération, et donc réussir des PCR fiables avec un degré de multiplexing important.

-D'autre part, sur un cas complexe, comme de l'ADN dégradé, le nombre de SNPs nécessaire à l'analyse est augmenté, et l'interprétation des résultats difficile.

-Enfin, si les analyses de l'ADN génomique étaient remplacées par des analyses de SNPs, les banques de données d'ADN actuelles ne seraient plus utilisables (10).

En réalité, l'analyse SNP étant très rapide et de moindre coût par rapport aux analyses STR, c'est un faux problème.

Les analyses des SNPs sont donc très intéressantes, et sont amenées à se développer rapidement dans certains domaines en particulier : analyse de l'ADN mitochondrial (polymorphisme limité), analyse du chromosome Y, ou encore identification de restes humains très dégradés (6).

# II-2 Les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Ils proviennent des variations individuelles, au sein de la molécule d'ADN, de la répartition des sites de restriction pour une enzyme donnée. Celle-ci peut être comparée à de véritables

ciseaux biologiques qui coupent la chaîne d'ADN à des endroits précis, appelés sites de restriction. Un tel site est représenté par 4 à 6 nucléotides appariés et toujours identiques pour une enzyme donnée.

Le RFLP est représenté par des différences individuelles dans la taille des fragments de restriction obtenus pour un couple donné sonde/enzyme de restriction, et révélé par la méthode de Southern.

C'est un véritable marqueur génétique, dont la transmission est de caractère mendélien.

Les différentes formes correspondant à un même emplacement sur le génome sont exclusives les unes des autres sur un même chromosome : ce sont des allèles. Chez un hétérozygote, deux marqueurs sont visibles, ils sont co-dominants.

Chaque système allélique de restriction détermine un locus polymorphe.

Pour qu'un RFLP soit utilisé en médecine légale, il faut qu'il soit hautement informatif, ce qui est défini par la probabilité d'un individu d'être hétérozygote au locus considéré, et dépend de la fréquence des allèles dans la population.

Pour chaque RFLP utilisé en médecine légale, la fréquence dans la population a été déterminée chez des sujets non apparentés, recrutés au hasard.

# II-3 Les séquences répétées en tandem

Ce sont des séquences plus ou moins longues, répétées en tandem dans le génome (cf figures 13 et 14). Ces séquences sont présentes à différents loci connus sur les chromosomes, et sont donc recherchées lors de la réalisation d'une empreinte génétique.

Selon la taille de la séquence, on distingue les minisatellites (31) et les microsatellites (35).

Ces satellites sont nommés ainsi en raison de leur disposition en périphérie de l'ADN après ultracentrifugation de ce dernier dans un gradient de chlorure de césium (34).

Ce polymorphisme a tout d'abord été analysé par la technique des RFLP. Il représenterait 20 à 30% de notre génome (18).

# II-3-1 Les minisatellites ou VNTR (Variable number of tandem repeat)

Ils ont été découverts en 1985 par Alec Jeffreys.

Le motif de base compte 9 à 100 paires de bases (3). Il est répété entre 2 et 100 fois à chaque locus, ce qui aboutit à des fragments de 500 paires de bases à 20 kpb. Le nombre de répétitions est variable d'un individu à l'autre, ce qui constitue une série d'allèles.

Des études récentes montrent que nous aurions 1500 zones de ce type dans chaque génome.

Les minisatellites se transmettent selon le mode de la génétique formelle, c'est-à-dire selon le mode mendélien (l'enfant reçoit un allèle de son père, et une de sa mère). Ils sont hautement polymorphes, et cette variabilité est due à des crossing over inégaux entre deux tandems répétés, et à des reconversions génétiques.

Les minisatellites sont souvent associés à d'autres zones hypervariables, et il est possible que ces séquences soient des zones privilégiées de recombinaison ou d'appariement génique, mais aucune preuve n'a encore été apportée à ce sujet (14).

On ne connaît pas leur fonctionnalité, mais on sait qu'ils sont capables de mutation, aussi bien au niveau des cellules germinales que des cellules somatiques. Plus le minisatellite est polymorphe, plus il a de chances de présenter une mutation. Aussi, il est important d'utiliser plusieurs sondes et de ne conclure qu'à partir d'un nombre significatif de sondes possédant un résultat similaire.

#### II-3-2 Les microsatellites

Ils sont aussi nommés STR (short tandem repeat) ou SSR (répétition de simple séquence), et ont une distribution uniforme dans le génome.

Leur motif de base est composé de 2 à 6 paires de bases, répété entre 20 et 50 fois à chaque locus, ce qui créé des allèles de taille variable (entre 50 et 500 paires de base). Les microsatellites ont été étudiés avec intérêt, et nous connaissons leur séquence de bases, ainsi

que leur emplacement sur les chromosomes (cf figure 12), mais c'est le nombre de répétitions chez chaque individu qui est différent.

Un locus est présent environ tous les 6 à 10 kpb (4). Le nombre de répétitions est différent d'un individu à l'autre, ce qui créé sa particularité.

Ces séquences sont présentes en forte quantité dans le génome, et elles permettent de réaliser une cartographie génétique, qui représente en quelque sorte le pedigree de l'individu.

Pour réaliser une empreinte génétique, on va le plus souvent rechercher les microsatellites. En effet, des chercheurs ont référencés des régions sur les chromosomes où se situent les microsatellites, mais leur longueur est différente selon les individus. La séquence de base est donc toujours la même au locus recherché, mais c'est le nombre de bases qui est différent. En analysant plusieurs loci (de 11 à 16 selon la législation française), le risque d'erreur d'identification est de 1 sur 1 milliard.

La structure d'un STR peut être simple ou complexe ou composée. S'il est complexe, le STR sera plus informatif car il aura une plus grande variabilité. En revanche, s'il est simple, le STR permettra une meilleure standardisation, car il a un taux de mutation plus faible.

Le plus souvent, dans le génome humain, la séquence de bases du microsatellite est un dinucléotide (CA la plupart du temps), ce qui est moins adapté pour la réalisation de la PCR (Polymerase Chain Reaction).

En effet, lors de la PCR, comme *in vivo*, il peut se produire un dérapage, qui va conduire à la formation de stutters, encore appelés pics de « bégaiement » de la polymérase (27,39). Ces produits sont le plus souvent des allèles réduits d'une à deux répétitions par rapport à l'allèle réel. Les erreurs sont moins importantes lorsque l'on est en présence d'un tétra ou penta nucléotide, qui est donc plus adapté à la médecine légale.

Lors de la réalisation d'une empreinte génétique, les microsatellites sont détectés par amplification PCR, grâce à des amorces marquées par des fluorophores, et analysés par électrophorèse capillaire automatique.

Avec très peu d'ADN, il est possible par cette méthode d'obtenir le profil génétique d'un individu. En revanche, si l'ADN est trop dégradé ou contaminé, comme dans le cas de catastrophe de masse, il ne sera pas utilisable. Dans ce cas, on peut analyser l'ADN mitochondrial.

Le pouvoir discriminant des STR est très important, ainsi la probabilité pour que deux individus pris au hasard possèdent les mêmes allèles est de  $10^{-15}$  (50).

Ces deux types d'ADN satellites permettent donc de déterminer un profil génétique d'un l'individu. Alors que l'identification génétique, à ses débuts, utilisait principalement les minisatellites et l'analyse des RFLP, elle utilise aujourd'hui plutôt les microsatellites et la PCR.

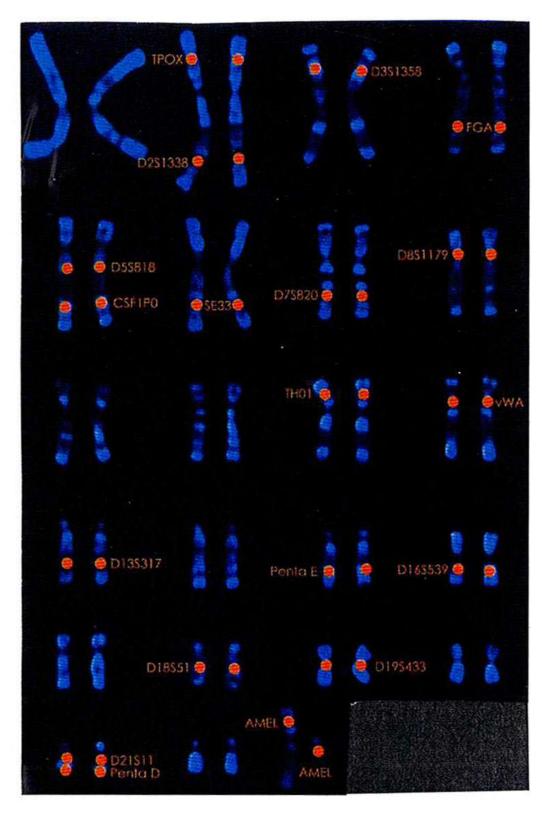


Figure 12 : loci à rechercher pour réaliser une empreinte génétique

A T T G C A G T A C T A G G C G T A C T A G G C T T G A C G G T
T A A C G T C A T G A T C C G C A T G A T C C G A A C T G C C A



Figure 13 : Exemple de minisatellite

A G G C T C G A A C A C A C A ... C A C A A T G T A A G T C G
T C C G A G C T T G T G T G T ... G T G T T A C A T T C A G C

Séquence flanquante unique gauche

(CA)<sub>n</sub>

Séquence flanquante unique droite

Figure 14 : Exemple de microsatellite répété en tandem

# II-4 Les marqueurs haplotypiques

Les marqueurs transmis par les deux parents subissent un brassage à chaque génération, la moitié des informations transmises provenant de la mère, et l'autre moitié du père.

Ce n'est pas le cas pour les marqueurs haplotypiques, qui sont appelés ainsi car ce sont des marqueurs uni parentaux, transmis par la mère pour l'ADN mitochondrial, ou par le père pour les marqueurs du chromosome Y. Ces marqueurs sont transmis sans changement d'une génération à l'autre (sauf mutation), et permettent donc de retracer la lignée maternelle (ADN mt) ou paternelle (chr Y). Les SNP constituent une classe importante des marqueurs du chromosome Y.

Nous possédons un seul allèle par individu, et l'information est dite haplotype.

Ces marqueurs sont moins informatifs pour l'identification individuelle, car ils ne font pas la différence entre 2 frères par exemple, mais ils peuvent être utilisés sur de l'ADN dégradé, alors que l'analyse des STR n'est pas possible.

# II-4-1 Le chromosome Y (22, 30, 69)

L'ADN situé dans le chromosome Y est un héritage purement paternel, ce qui permet de retracer cette lignée si besoin est. L'autre intérêt du chromosome Y se présente lorsque l'on doit étudier un mélange d'ADN masculin et féminin (sperme et secrétions vaginales par exemple.) En effet, nous verrons plus tard par quelle méthode nous pouvons séparer les cellules afin d'établir les deux profils ADN qui nous intéressent.

Le premier microsatellite polymorphique a été décrit en 1992 ; il s'appelait DYS19 (51).

Le chromosome Y comporte plusieurs STR, mais leur valeur probante est limitée. En 1997, un ensemble de 9 microsatellites du chromosome Y sont décrits comme formant l'haplotype « minimal » (10); ce sont les STR les plus utilisés pour l'analyse du chromosome Y (DYS19 DYS389I, DYS389I, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, et DYS385). Quand il y a présence de marqueurs supplémentaires ils forment l'haplotype dit « étendu » (20, 36, 55).

Il existe de nombreuses applications à l'analyse du chromosome Y : lors d'agressions sexuelles (criminalistique), de recherche de personne disparue (quand on possède un échantillon d'ADN de la lignée paternelle de la personne disparue), de test de paternité (pour un garçon), ou encore lors de recherches historiques ou généalogiques.

#### II-4-2 L'ADN mitochondrial (ou ADNmt)

Selon les espèces, il représente 1 à 5 % de l'ADN total. La mitochondrie est une petite organelle cytoplasmique qui fournit de l'énergie à la cellule.

Elle contient un petit génome circulaire, ou chondrome, de 16569 paires de bases, formé de deux brins (H et L), avec 37 gènes codants (2). Ce génome code pour les chaînes polypeptidiques nécessaires au fonctionnement de la mitochondrie et pour des ARN. Toutes ses séquences sont codantes.

Chaque cellule contient 1000 à 10000 mitochondries identiques, chacune contenant plusieurs copies du chondrome. Le chondrome a été séquencé en 1981 (2); il sert à présent de séquence de référence, appelée séquence d'Anderson.

Le chondrome ne possède pas d'ADN répétitif, donc son polymorphisme est limité au polymorphisme de séquence. Celui-ci est concentré dans une région constituée d'environ 1100 nucléotides, appelée D-loop (displacement loop) ou région de contrôle. Elle présente un degré de variation entre les individus relativement important. Elle comporte deux sous ensembles, les régions HV1 et HV2. D'environ 350 kb chacune, elles révèlent un polymorphisme et peuvent être amplifiées par PCR. Puis, les produits sont séquencés à plusieurs reprises, et comparés avec la séquence d'Anderson (séquence de référence), ou avec des séquences provenant d'un prélèvement à étudier. Le risque de trouver la même séquence chez deux individus pris au hasard dans la population est de 1/1000 ; c'est donc une analyse au pouvoir limité, à n'utiliser que dans le cas où une analyse de l'ADN nucléaire n'est pas réalisable.

Seule la région D-loop est étudiée en médecine légale, car elle présente un taux de mutations spontanées assez élevé pour montrer une hétérogénéité individuelle au sein d'une population.

Le taux de mutation de l'ADNmt est 10 fois plus important que celui du génome nucléaire, de plus il n'y a pas de recombinaison, donc il y a une diversité réduite des marqueurs.

La transmission de ce chondrome est essentiellement uni parentale (par la mère), car c'est l'ovule qui fournit la quasi-totalité du cytoplasme du zygote. En conséquence, tous les enfants issus de la même mère auront le même ADNmt.

Aujourd'hui, on sait que l'ADN du spermatozoïde contribue aussi au matériel mitochondrial de l'œuf (71), mais cette quantité d'ADN paternel est très faible (50 mitochondries par spermatozoïde, 100 000 par ovule !!)

L'ADNmt se prête donc bien aux études phylogénétiques, car elles permettent de reconstruire de probables liens historiques entre les populations humaines. L'analyse de l'ADNmt est également très utile lorsque que l'on possède un échantillon d'ADN dégradé, comme un cheveu sans bulbe par exemple (62). En revanche, l'analyse de l'ADN mitochondrial est plus fastidieuse que l'analyse de l'ADN nucléaire, car l'étape de purification doit être extrêmement performante, sous peine de contamination.

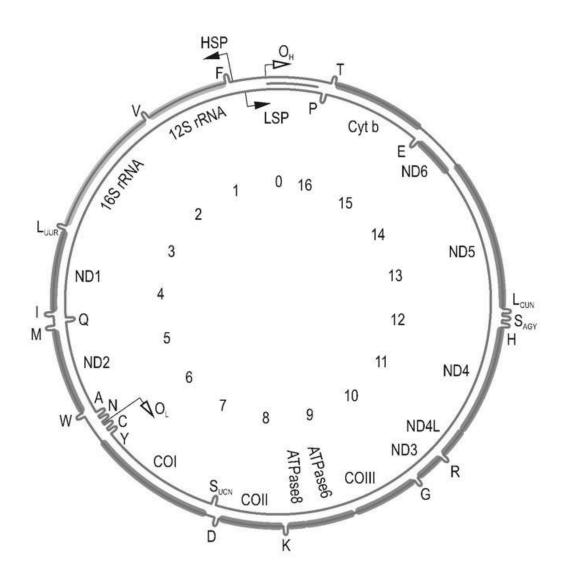


Figure 15 : Schéma du chondrome (60)

# II-5 Les séquences répétées dispersées : SINEs, LINEs

Ces séquences représentent 25 à 40% du génome humain (34), et sont majoritairement des séquences SINEs et LINEs. Leur rôle n'est pas très bien connu.

### **II-5-1 SINEs (Short INterspersed Elements)**

L'archétype de cette séquence est constitué de la famille Alu (29).

Elle est composée de séquences de 300 paires de bases environ, et sa structure est dimérique. Il existe plusieurs centaines de milliers de copies du gène Alu par génome, avec en moyenne une copie tous les 5 kilobases. On peut en trouver jusqu'à 10<sup>4</sup> par génome.

Les gènes Alu constituent une source importante de polymorphisme. Ce sont des éléments mobiles du génome, dérivés des ARN de transfert, ou de l'ARN cytoplasmique 7SL.

Aujourd'hui, on ne connaît pas encore vraiment la fonction de ces éléments. Toutefois, ils participent activement à l'évolution des génomes, en facilitant par exemple les remaniements chromosomiques.

Ce sont des outils très efficaces en systématique moléculaire, car l'insertion d'un SINE est un évènement unique et irréversible au niveau du génome, donc ils sont importants pour les études phylogénétiques.

Les SINEs présentent une spécificité d'insertion très faible, puisqu'elle dépend de combinaisons nucléotidiques variées et fréquentes : ils peuvent donc s'insérer à peu près partout dans le génome. Après leur insertion irréversible, les SINEs subissent les forces de mutation et des sélections propres à cette région du génome.

# II-5-2 LINEs (Long INterspersed Elements)

Dans ces séquences les éléments répétitifs sont constitués de 7 kilobases, et il y a plus de 100000 copies par génome.

Les éléments LINEs codent pour 2 protéines, une qui est capable de se lier à l'ARN simple brin, et la deuxième qui a une activité d'endonucléase et de transcriptase.

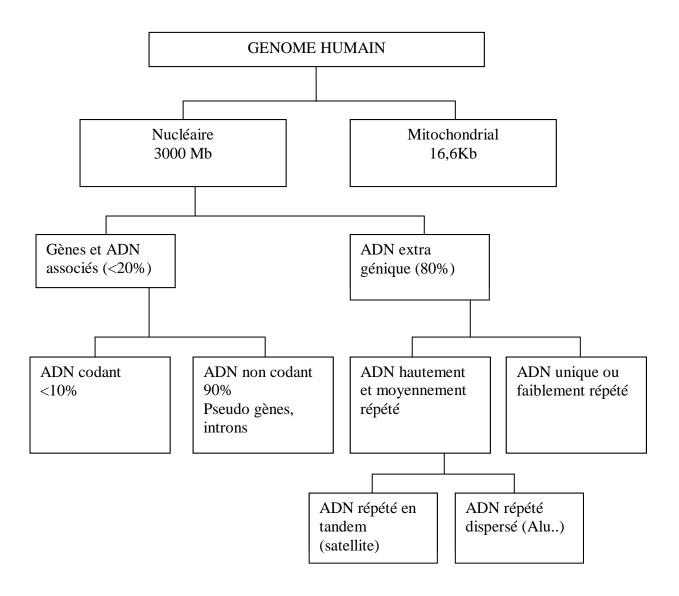


Figure 16 : Schéma récapitulatif des caractéristiques du génome humain

# III - Techniques

Au début de la médecine légale, seul l'ADN nucléaire était utilisé, et il reste aujourd'hui la méthode la plus fiable, malgré l'apport indéniable de l'ADN mitochondrial. Il s'agit de comparer des prélèvements de question (origine inconnue, qu'on doit identifier), à des prélèvements de référence (ADN d'individu identifié, comme un suspect par exemple).

Cette méthode repose sur trois principes : le caractère unique du génome de chaque individu (sauf jumeaux monozygotes), l'unicité de l'ADN dans toutes les cellules du corps humain, et la ségrégation allélique des séquences homologues des gènes lors de la transmission à la descendance (pour la recherche de paternité).

# III-1 Choix d'une région variable pour l'utilisation médicolégale

Pour les recherches de paternité, les loci privilégiés doivent avoir un faible niveau de néo mutation.

Pour les applications pénales, on préfère les séquences courtes, amplifiables par PCR, et montrant une variabilité inter individuelle importante.

Les STR sont privilégiés pour toutes les applications, les plus utilisés se résumant à environ 20 systèmes reconnus mondialement.

La technique du Southern blot, connue depuis de nombreuses années, est progressivement remplacée par des méthodes d'amplification. En peu de temps, la PCR a révolutionné les empreintes génétiques, car elle a fait gagné un facteur mille en sensibilité, et a beaucoup diminué le temps des analyses (quelques heures). En revanche, du fait du risque de contamination important, elle est sujette à des procédures d'assurance qualité strictes, qui assurent la validité du résultat.

L'étape d'extraction est la plus critique, elle requiert une compétence particulière. Vient ensuite l'étape de purification, puis la quantification qui permet de déterminer la quantité d'ADN à disposition. Enfin vient l'amplification proprement dite, par la PCR. Celle-ci est la

plupart du temps réalisée grâce à des kits commerciaux, parfaitement optimisés, caractérisant jusqu'à 16 loci au cours de la même réaction. Beaucoup de ces étapes sont automatisables, mais l'interprétation reste du domaine de l'humain.

# III-2 Les supports de l'ADN

#### III-2-1 La dent

Dans un certain nombre de cas, les dents constituent les seuls éléments d'un cadavre qui peuvent être utilisés à des fins d'identification. L'ADN issu de la dent est souvent le plus fiable, mais il ne peut être utilisé que lorsque la personne est décédée (dans le cas d'une catastrophe de masse ou d'un incendie par exemple).

#### **III-2-1-1 Composition**

L'organe dentaire est composé de deux grands ensembles, que sont l'odonte et le parodonte.

L'odonte, ou encore la dent proprement dite, est composé d'une couronne et d'une racine, dont le collet forme la séparation anatomique. A l'intérieur de la dent, se trouve la cavité pulpaire.

Chaque dent humaine est composée de trois tissus calcifiés : l'émail, la dentine et le cément et d'un tissu conjonctif non spécialisé : la pulpe dentaire. Ce sont ces quatre tissus qui constituent l'odonte.

Le parodonte est l'appareil de soutien de la dent ; sa limite est marquée sur la dent par le collet physiologique. Il comprend l'os alvéolaire, le ligament alvéolo-dentaire, la gencive et le cément.

#### III-2-1-2 Structure (53, 68)

L'émail, d'origine ectodermique (épithéliale), est un tissu spécialisé extrêmement dur. En réalité, c'est le tissu le plus dur et le plus minéralisé de l'organisme. Ce tissu qui recouvre l'organe dentaire va être soumis à tous les effets qui se manifestent dans la cavité buccale, et c'est aussi lui qui va protéger la dent en cas d'agression extérieure. Il est acellulaire, et ne pourra donc pas être utilisé pour recueillir de l'ADN.

Le cément, d'origine mésodermique, recouvre la racine. Selon sa position sur la racine, il peut être cellulaire ou acellulaire, mais il n'est pas utilisé dans les techniques de médecine légale.

La dentine, d'origine mésodermique également, est le tissu qui est recouvert par l'émail au niveau de la couronne, et par le cément au niveau de la racine. C'est un tissu acellulaire qui ne va pas permettre de recueillir d'ADN.

La pulpe dentaire, d'origine conjonctive, est un tissu mou situé dans la cavité pulpaire, à l'intérieur de la dent, donc protégée des agressions extérieures. Cette cavité pulpaire comprend deux parties : la chambre pulpaire et les canaux pulpaires.

La pulpe dentaire est composée de quatre zones :

- -La zone odontoblastique, à la périphérie
- La couche de Weil
- La zone riche en cellules
- La zone centrale, riche en vaisseaux et en nerfs pulpaires

En périphérie, la pulpe est limitée par des odontoblastes ; ce sont des cellules prismatiques avec un noyau ovalaire allongé au pôle basal. Au niveau du pôle apical de la cellule, on retrouve un fin prolongement cytoplasmique (ou procès de Tomes) riche en mitochondries.

La zone centrale de la pulpe est constituée principalement de fibroblastes, de macrophages, de cellules mésenchymateuses indifférenciées, et d'autres cellules immunocompétentes.

C'est donc ce tissu particulièrement bien protégé, à la fois par l'émail, et par les tissus qui l'entourent (joue, os) qui peut être utilisé pour l'identification génétique de l'individu (si toutes les autres méthodes ont échoué.)

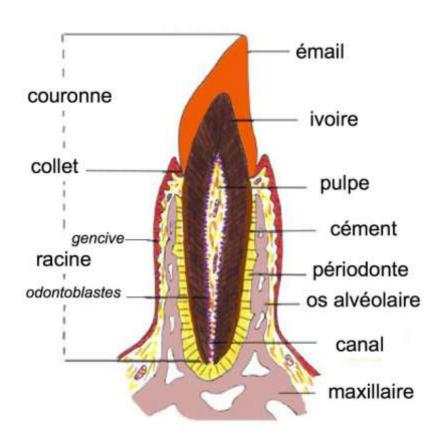


Figure 17 : Schéma d'une dent en coupe (59)

## III-2-1-3 Propriétés

#### III-2-1-3-1 Physiques

Une dent se conserve plutôt bien, même dans des conditions défavorables. De par son emplacement, elle est protégée par la peau et les tissus (lèvres, joues...), qui sont dégradés en premier lieu (en particulier lors d'un incendie par exemple). De plus, l'émail étant le tissu le plus dur du corps humain, il protège la cavité pulpaire des agressions extérieures.

#### - Conservation dans le sol :

- Sableux : la dent peut y être conservée pendant des siècles !
- Marécageux : on observe une dissolution lente de la dent
- Argileux : les dents deviennent rugueuses, les cavités radiculaires sont remplies de bactéries.
- •Terreau : destruction de l'ADN contenu dans la pulpe dentaire à 25° et 37° C. Si température de 4° C, on ne peut plus obtenir d'ADN au-delà de 3 semaines (64)
  - Air et eau : ils ont peu d'action sur la dent.

## - Action de la température sur la dent :

Si la température augmente brusquement, cela peut provoquer l'explosion de la dent. En revanche, si la température augmente lentement, cela provoque une disparition progressive de la dent. Ainsi, lors d'expérimentations *in vitro* :

- A 4° C : la dent peut être conservée 6 semaines (64)
- A 25° C : une dent peut être conservée jusqu'à 19 ans.
- A 37° C : la dent peut être conservée 6 mois.
- A 100°C: l'aspect et la teinte ne sont pas modifiés
- •A 150°C: l'histologie de la dent est normale, mais la racine prend une teinte jaune brun clair, et des craquelures apparaissent.
- •A 175°C: l'histologie de la dent est normale, mais la racine brunit, et des fissures longitudinales apparaissent.
- A 200°C: l'émail devient brillant, il est recouvert d'un vernis grisâtre. Les fissures longitudinales le long de la racine réalisent un quadrillage.
  - A 225°C: l'émail est toujours grisâtre, et la dentine devient noire.
  - A 300°C: les dents sont très fragiles, et la dentine est noire

- A 700°C: après une exposition supérieure à 15 minutes, la dentine est bleue, amincie, et l'émail se fendille. Au bout de trois heures, la dent diminue de volume.
  - A 1100°C: la dentine est rose, et le volume de la dent est très réduit.

## III-2-1-3-2 Chimiques

#### - Action de l'humidité sur la dent :

L'action de l'humidité seule ne semble pas avoir d'effet significatif sur la dent. L'ADN est toujours exploitable après 3 semaines, que la dent ait été soumise à 20%, 66% ou 98% d'humidité (64).

## - Action du pH sur la dent :

L'exposition de la dent à un pH 3 ou 7 à 37° C pendant 3 semaines ne détruit pas l'ADN de la dent, de même qu'une exposition de la dent à un pH 10 pendant 3 semaines à 4 ou 25° C. En revanche, l'exposition de la dent au même pH à 37° C pendant 3 semaines ne permet pas d'exploiter l'ADN de la dent (64).

#### III-2-1-4 Prélèvement

La dent possède la particularité de ne pas être retrouvée sous forme de trace sur le lieu d'un crime par exemple. Elle est le plus souvent prélevée sur un cadavre afin de l'identifier. La technique est celle d'une extraction classique, mais les tissus gingivaux sont bien plus rigides, ce qui complique l'opération.

#### III-2-2 Le cheveu

Il est largement retrouvé dans les crimes et les délits liés au vol et terrorisme. Les cagoules, vêtements et objets divers peuvent contenir des cheveux. Il peut faire l'objet d'une analyse morphologique, sérologique, toxicologique et génétique; en revanche, il ne permet pas d'estimer l'âge.

#### III-2-2-1 Morphologie

Les cheveux comportent deux parties :

-Le bulbe, qui est responsable de la croissance du cheveu, et contient des cellules renfermant à la fois de l'ADN nucléaire, et de l'ADN mitochondrial. Malheureusement, les cheveux retrouvés sur une scène de crimes sont souvent tombés naturellement, et leur bulbe

est mort. Dans ce cas, la plupart du temps, la quantité d'ADN nucléaire extraite du cheveu est insuffisante pour une analyse par les STR, et seul l'ADN mitochondrial est exploitable (45).

-La tige, composée de kératine, et qui contient de très nombreuses mitochondries. Chez l'homme, le diamètre moyen de la tige varie de 50 à 125 μm. Morphologiquement, après analyse microscopique, le diagnostic différentiel avec un poil d'origine animale est facile à établir.

#### III-2-2-2 Prélèvement

S'il est tombé naturellement, la racine est droite, le bulbe est plein, sans gaine, avec un aspect en massue. S'il a été arraché, le bulbe est creux avec des gaines adhérentes. Si la racine est de bonne qualité (choix par une étude morphologique de la racine), une analyse de STR en multiplex peut être réalisée. La tige est quant à elle gardée pour une étude microscopique.

Le cheveu prélevé doit être conservé au sec et à froid.

Malgré une forte automatisation, l'analyse de l'ADN mitochondrial reste longue et coûteuse. De plus, son pouvoir de discrimination n'atteindra jamais celui de l'ADN nucléaire.

L'interprétation des résultats doit être très prudente, et les limites de l'analyse doivent être expliquées au magistrat (non discrimination entre plusieurs personnes de la même lignée maternelle, fréquence élevée de certains mitotypes).

## III-2-3 Le sang

#### **III-2-3-1 Composition**

Le sang est composé d'une partie liquide, le plasma, et d'une partie solide, représentée par les globules blancs, les globules rouges et les plaquettes. On peut séparer les phases liquides et solides par centrifugation ou filtrage, après adjonction d'un anti-coagulant (41).

Le plasma est essentiellement constitué d'eau dans laquelle peuvent se dissoudre de nombreuses substances telles que l'oxygène, le gaz carbonique, ou les sels minéraux.

Les globules rouges ont une forme de lentille biconcave (diamètre de 7  $\mu$  environ), et sont aussi appelés hématies ou érythrocytes. On en trouve environ 5 millions par mm3 de sang. Ils

ne contiennent pas de noyau, et ne permettent donc pas de réaliser une identification génétique.

Les plaquettes sont des cellules plus petites que les globules. Elles contribuent à la coagulation sanguine et à la cicatrisation des plaies. Leur durée de vie est de 10 jours environ. Comme les globules rouges, elles ne possèdent pas de noyau.

Les globules blancs, plus gros que les globules rouges (de 7 à 30 µm), sont également appelés leucocytes. Ils possèdent un noyau, et on une fonction de protection contre les infections. On en retrouve 6000 à 8000 par mm³ de sang. Il existe 3 sortes de globules blancs : les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes. Ce sont ces cellules qui seront utiles à l'identification génétique dans le cadre d'un prélèvement sanguin.

Toute trace de sang visible à l'œil nu peut être analysée (10).

#### III-2-3-2 Prélèvement

Il est le plus souvent retrouvé soit sur le corps, soit sous forme de tache. Le sang frais est rouge vif, tandis qu'il devient plus sombre en séchant. Lorsqu'il est visible, on fait le prélèvement directement. En revanche, dans bien des cas, le sang a été nettoyé, et les enquêteurs doivent le rechercher. Pour cela ils peuvent utiliser le bluestar, un liquide à vaporiser sur les surfaces, et qui fait apparaître une fluorescence en présence d'un élément ferrique, comme le sang (cf figure 18) ou l'eau de javel. Il faut être rapide, car la fluorescence disparaît après 3 secondes. C'est l'analyse du prélèvement qui permettra ensuite de connaître la nature de la trace révélée.

Le prélèvement de sang est réalisé avec une pipette stérile, ou par imbibition de petits fragments de tissus en coton (ou d'un coton-tige) si le sang est frais (donc liquide).

Si le sang est coagulé, on peut le gratter avec un scalpel, sans oublier de recueillir le support vierge témoin. Puis on imbibe un tissu de coton humecté de sérum physiologique ou d'eau distillée stérile pour recueillir ce sang sec. On peut également imbiber un coton stérile, technique qui apporte de meilleurs résultats.

Deux prélèvements doivent être réalisés (12). Ils doivent être conservés à 4° C pour une utilisation rapide, ou congelés à -20° C dans le cas contraire.



Figure 18 : visualisation de traces de sang grâce au bluestar

## III-2-4 Le sperme

## **III-2-4-1 Composition**

Le sperme est composé d'une suspension de spermatozoïdes (100 000 cellules/ $\mu$ L) baignant dans le liquide séminal. D'autres cellules sont également présentes, comme des cellules épithéliales et des leucocytes (quelques centaines / $\mu$ L). On peut donc établir un profil ADN même à partir d'un sperme azoospermique. Le pH normal du sperme se situe entre 7,2 et 8.

Les spermatozoïdes survivent en général 24h dans le vagin (75), mais quelquefois ce délai est plus long (3 à 7 jours).

#### III-2-4-2 Prélèvement

Il forme des taches empesées, jaunâtres, fluorescentes aux ultraviolets (3650Å). Pour repérer ces taches invisibles à l'œil nu, on peut utiliser un crimescope. C'est un appareil qui émet de la lumière de longueurs d'onde différentes, et qui fait apparaître des fluorescences différentes selon la trace, à condition d'être dans le noir. On réalise ensuite un prélèvement, sur lequel on effectue plusieurs tests afin d'identifier sa nature. Pour identifier le sperme, on peut par exemple effectuer le test PSA, qui recherche la phosphatase présente dans le sperme. On peut enfin confirmer en recherchant directement les spermatozoïdes au microscope.

On recueille le sperme par imbibition directe ou après humidification (eau stérile distillée) d'un tissu ou d'un écouvillon de coton. L'échantillon doit ensuite être congelé, pour ne pas risquer d'être lysé par les germes présents.





Figure 19 : visualisation d'une tache grâce au crimescope

#### III-2-5 La salive

La salive est couramment retrouvée au niveau de morsures ou de mégots. Du fait de l'innocuité de son prélèvement, elle devient une référence pour la médecine légale française.

## **III-2-5-1 Composition**

La salive est un liquide buccal secrété par les glandes salivaires : les glandes parotides, les glandes sous-maxillaires et les glandes sublinguales. Sa sécrétion est maximale pendant les repas, mais elle est aussi sécrétée entre les repas (15 mL par heure). Elle est composée à 99,5% d'eau, ainsi que de nombreux composés chimiques (cf. tableau 1). Parmi tous ces composés chimiques, 3 intéressent plus particulièrement la médecine légale :

- -L' $\alpha$  amylase, enzyme dont la présence permet de mettre en évidence facilement la présence de salive (par hydrolyse de l'amidon par l' $\alpha$  amylase).
- -La mucine salivaire, contenant des substances hapténiques des groupes ABO qui permettent le groupage sanguin (chez 75% des sujets).
  - -Des débris épithéliaux et des leucocytes, contenant de l'ADN.

#### III-2-5-2 Prélèvement

La salive est toujours fixée sur un support, que ce soit un bâillon, une morsure, ou un mégot de cigarette.

Détecter la salive n'est pas toujours facile, car elle est transparente. Pour faciliter cette étape, on peut ici encore utiliser le crimescope. Il existe également de nombreux tests, comme le test Phadebas par exemple (17). Ce test fonctionne par la recherche de l'amylase sur le support supposé contenir de la salive. Il utilise pour cela de l'amidon insoluble additionné d'une molécule contenant un colorant bleu. S'il y a présence d'amylase, elle digère l'amidon et le colorant bleu est libéré. Après centrifugation des restes insolubles, il suffit ensuite d'observer l'intensité du colorant bleu dans le liquide pour connaître la quantité de salive présente.

Pour recueillir la salive sur son support, le plus difficile est de ne pas dégrader l'ADN en l'extrayant du support. Pour cela, la méthode de WALSH semble prédominer : il découpe le support en petits morceaux qu'il met à incuber pendant une nuit à 56° C dans un tampon de lyse (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,1M NaCl, 2% SDS et 35 µL de 20 mg/ml de protéinase

K). Puis ont lieu l'extraction et la quantification. Une trace de salive sur un timbre peut par exemple donner un profil génétique plusieurs mois, voire plusieurs années après le dépôt.

Sur une personne vivante, le prélèvement au niveau buccal utilise un écouvillon frotté plusieurs fois à l'intérieur de la joue (72). Puis l'écouvillon doit être séché avant sa conservation.

Pour recueillir la salive sur une morsure, il existe 3 méthodes : avec du coton humide, avec un papier filtre humide, ou la technique du double tampon (coton humide puis coton sec), qui semble être la plus efficace (67). Curieusement, la contamination par l'ADN du cadavre n'a jamais été retrouvée.

Le prélèvement doit ensuite être congelé pour sa conservation (77).

Tableau 1: Composition de la salive (61, 68)

Volume	500 à 1200 mL/j
Electrolytes	Na+, K+, Cl-, HCO3-, Ca2+, Mg2+, HPO42-, SCN-, F-
Protéines secrétées	Amylase, lactase, mucine, histatine, cystatine, peroxydase, lysozyme, lactoferrine, proline, lipase, kallicréine, stathérine, gustine, anhydrase carbonique, protéases, phosphatases, albumine
Immunoglobulines	IgA, IgM, IgG
Petites molécules organiques	Glucose, urée, acides aminés, acide urique, phospholipides, acide citrique, créatinine, cholestérol
Autres	EGF, insuline

# III-3 Les techniques d'analyse de l'ADN (1, 14, 42, 43, 44, 51, 56, 65)

## III-3-1 L'extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est relativement facile, et semblable quelle que soit le support utilisé. Il faut tout d'abord laisser tremper la trace (ou les cellules recueillies) dans un peu d'eau, additionnée le cas échéant d'un détergent. L'action du détergent est combinée à l'action d'enzymes dégradant les protéines, comme la protéinase K. L'étape la plus difficile est ensuite la purification de cet ADN.

## III-3-1-1 Cas classique : le sang

L'extraction varie selon le substrat et les auteurs. Ainsi en France, chaque laboratoire possède ses « recettes maisons » pour réaliser une même empreinte génétique. Les kits et les méthodes utilisés sont différents, et participent à la renommée de chaque laboratoire.

Pour Kaplan, il faut mélanger le sang avec une solution hypotonique, afin de faire éclater les globules rouges. On isole les globules blancs par centrifugation, puis on les lave avec la même solution hypotonique.

On fait ensuite baigner les globules blancs dans une solution avec un détergent (SDS ou Sodium Dodécyl Sulfate) et la protéinase K. Cette étape permet de libérer du globule blanc l'ADN entouré de ses protéines (ou histones).

Puis ont lieu une série d'extractions :

- -Extraction phénolique : pour séparer l'ADN de ses protéines (les acides nucléiques sont insolubles dans le phénol)
  - -Extraction au chloroforme ou à l'éthanol : pour éliminer toute trace de phénol.
- -Extraction à l'isobutanol : pour extraire et concentrer à 10% les molécules organiques de la solution d'acide nucléique.

Enfin, on réalise une précipitation de l'ADN avec un alcool éthylique absolu froid (-20° C) à haute force ionique. On obtient alors un ADN sous forme de filaments, que l'on récupère par enroulement sur une baguette de verre.

## III-3-1-2 Cas particuliers

#### III-3-1-2-1 La dent

La dent est un cas particulier car elle n'est pas retrouvée sous forme de trace le plus souvent. Généralement, elle est extraite à partir d'un cadavre non identifié, lorsque les autres méthodes d'identification ont échoué.

En pratique médico-légale, pour des personnes décédées depuis trois mois à vingt ans, le meilleur outil génétique est l'ADN dentaire (21). L'étude des pulpes dentaires permet la recherche d'ADN mitochondrial (49) et nucléaire (64,76, 19, 49, 52,66), mais également la recherche d'agents pathogènes (16,54).

On peut extraire l'ADN de la dent, situé dans la pulpe, par deux méthodes : la méthode de la dent broyée, ou la méthode de la dent sectionnée. D'après Garcia et coll (1996), c'est la méthode de la dent sectionnée qui offre les meilleurs résultats.

L'incision va être située à différents endroits, en fonction du type de dent :

#### -Dents monoradiculées :

Il s'agit des incisives mandibulaires et maxillaires, des canines mandibulaires et maxillaires et des prémolaires mandibulaires. L'incision est réalisée sur les faces vestibulaire et palatine (ou linguale pour les dents mandibulaires). Le trait d'incision ne doit pas atteindre la cavité pulpaire.

## -Dents biradiculées :

Il s'agit des prémolaires supérieures, et on utilise le même tracé d'incision que sur les dents monoradiculées, sur les faces vestibulaires et palatines.

## -Dents pluriradiculées :

Les molaires maxillaires présentent trois racines, deux vestibulaires et une palatine; une première incision vestibulaire passe entre les deux racines vestibulaires et vient entamer la racine palatine sur sa face vestibulaire, tandis qu'une deuxième incision est réalisée sur la face palatine.

Les molaires inférieures présentent deux racines, la racine mésiale comportant deux canaux pulpaires ; une incision mésiale passe entre ces deux canaux puis intéresse la racine distale sur ses faces mésiale et distale.

L'incision faite, il ne reste plus qu'à fracturer la dent et à recueillir la pulpe dentaire.

Cette fracture est réalisée à l'aide d'un syndesmotome droit placé dans le trait d'incision et en réalisant un petit mouvement de luxation. Une légère pression doit être exercée simultanément afin d'assurer le partage de la dent sur toute sa longueur (8).

La dent sectionnée est ensuite maintenue au-dessus d'un tube stérile. Les restes de pulpe dentaire sont recueillis à l'aide d'une sonde stérile ou d'une curette. La substance ainsi détachée des parois de la chambre pulpaire tombe directement dans le tube. La sonde est un outil préférable à la curette. En effet, son extrémité fine permet d'accéder aux anfractuosités camérales(8).

On peut ainsi recueillir en moyenne 7,64mg (8) de poudre par dent.



Figure 20 : Incision vestibulaire (21)



Figure 21 : Incision palatine (21)



Figure 22 : Molaire supérieure sectionnée (21)

## III-3-1-2-2 Le sperme

La difficulté ici réside dans le fait que le sperme retrouvé est souvent mélangé à des secrétions vaginales. Il existe cependant une méthode permettant de séparer les deux. En effet, les spermatozoïdes sont des cellules très résistantes. Il suffit donc d'appliquer à l'échantillon recueilli des conditions douces, pour faire éclater les cellules autres que les spermatozoïdes et récupérer leur ADN. Puis on ajoute des réactifs plus agressifs pour extraire à son tour l'ADN des spermatozoïdes ; On peut donc obtenir les deux profils ADN à partir de ce mélange de secrétions.

## III-3-1-2-3 La salive

La salive peut être récupérée au niveau jugal : le tampon est ensuite séché à température ambiante pendant une nuit, puis transféré dans un micro tube avec 0,7 mL de tampon de lyse et 35 µL de protéinase K. Puis WALSH fait agir Hinf I (enzyme de restriction) et utilise comme marqueurs MS1, MS31, MS43, et g3 (sondes uniloculaires).

## III-3-2 La purification

C'est une étape délicate, pour laquelle de nombreux kits commerciaux existent. Il existe plusieurs méthodes de purification, et les laboratoires utilisent des kits différents. Le plus souvent c'est la méthode de la purification à l'éthanol qui est utilisée, mais on peut également utiliser les propriétés de la silice.

#### III-3-2-1 Purification à l'éthanol

La purification est réalisée en 2 étapes :

- -Utilisation de phénol et de chloroforme dans un premier temps, pour précipiter les protéines. L'ADN, quant à lui, reste dans la phase aqueuse.
- -Ajout d'alcool qui créer un processus de précipitation, rendant l'ADN insoluble. Il suffit alors de centrifuger à haute vitesse pour accumuler l'ADN insoluble au fond du tube, et éliminer les autres substances en éliminant le surnageant. Puis dissoudre à nouveau l'ADN dans un peu d'eau stérile.

## III-3-2-2 Purification utilisant les propriétés de la silice

De nombreux kits d'extraction reposent sur l'affinité remarquable de l'ADN pour les surfaces de silice (SiO2). Après dissolution de l'ADN (et des autres molécules contenues dans la trace ou la tache), le substrat obtenu est versé dans un tube fermé percé d'une membrane de silice (25). Si l'ADN baigne dans un milieu riche en sel, il a tendance à rester accroché à la

membrane de silice, tandis que les autres molécules vont passer au travers. Après quelques lavages successifs, on peut « décrocher » l'ADN de la membrane de silice avec de l'eau pure.

## III-3-3 La quantification

Il existe deux méthodes de quantification :

- -La quantification traditionnelle, qui n'est plus très utilisée
- -La quantification par la « real-time » PCR (traitée ci-dessous)

La quantification permet de connaître la quantité d'ADN à prélever sur le support pour réaliser la PCR. Ainsi, on ne prélève que la quantité nécessaire pour nos analyses, et on conserve le reste de la trace pour d'éventuelles futures analyses.

Nous ne verrons que la quantification traditionnelle, ou slot blotting, dans ce chapitre. Elle consiste en l'utilisation de la sonde D17ZI, qui est complémentaire à une séquence spécifique de l'ADN présente en milliers d'exemplaires dans l'ADN humain (sensibilité de quelques dizaines de pg). La sonde est marquée par un fluorochrome. Il existe des kits commerciaux qui mettent à disposition le matériel disponible pour la quantification. Quand la sonde est liée à sa séquence complémentaire, elle peut être digérée par des enzymes présentes dans le mélange, et elle libère alors sa fluorescence. Cette fluorescence est donc directement proportionnelle à la quantité d'ADN complémentaire à la sonde présent dans l'échantillon.

Une autre méthode consiste à ajouter non pas une sonde fluorescente, mais un colorant ayant une affinité très forte pour l'ADN : le picogreen (28). Celui-ci émet une fluorescence s'il se lie à l'ADN humain, et on peut la quantifier en comparaison avec un étalon ; cette technique permet donc de savoir quelle quantité d'ADN nous possédons dans l'échantillon.

III-3-4 La technique la plus ancienne

Elle consiste à analyser le polymorphisme des minisatellites.

Elle se déroule en plusieurs étapes :

-Extraction de l'ADN des cellules

-Utilisation d'une enzyme de restriction appropriée, pour cliver l'ADN au niveau des

sites de restriction.

-Séparation des fragments de différente taille par électrophorèse

-Transfert sur une membrane des fragments ainsi séparés (Southern blot)

-Marquage de certains fragments spécifiques avec une sonde monolocus

-Révélation photographique de l'emplacement des sondes.

Auparavant, on utilisait la technique décrite ci-dessus pour analyser les minisatellites.

Maintenant, cette méthode est remplacée par une amplification des microsatellites de l'ADN

grâce à la PCR. Après électrophorèse des fragments amplifiés, la taille de ceux-ci étant

représentative du nombre de répétitions, on peut identifier l'individu à qui appartient

l'échantillon d'ADN. L'analyse de l'électrophorèse est réalisée au moyen d'un laser qui

révèle la position des fragments.

La probabilité pour que deux personnes sans lien familial aient le même nombre de répétitions

est de 1 sur 1 milliard. Si de plus on analyse plusieurs microsatellites, la probabilité devient

nulle.

III-3-4-1 Les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction ont été découvertes en 1970.

La plupart ont été isolées à partir de bactéries; leurs noms réfèrent donc aux souches

bactériennes à partir desquelles elles sont issues.

Ex : Eco R1 est une enzyme de restriction isolée à partir de Escherichia coli.

En général, elles reconnaissent une courte séquence de paires de bases, de 4 à 6 pb.

Puis l'enzyme se lie à l'ADN sur ces sites, appelés « site de restriction », et elle agit ensuite

comme un ciseau biologique, en coupant chaque brin de la molécule d'ADN.

53

A chaque position, elle fabrique également un groupement 3' ou 5'.

Les enzymes de restriction ne reconnaissent qu'une seule séquence, quelle que soit la provenance de l'ADN.

Le nombre de coupures de l'ADN d'un organisme donné est donc dépendant du nombre de sites de restriction dans le génome.

Les enzymes peuvent couper les sites de restriction de façon symétrique (même site sur les deux brins), ou de façon asymétrique (site différent sur les deux brins).

Si la coupure est asymétrique, l'enzyme libère des extrémités cohésives, c'est-à-dire que chaque extrémité du site coupé possède une courte protrusion, complémentaire à la séquence de bases de l'autre extrémité.

Si la coupure est symétrique, les fragments d'ADN produits sont dits « à bouts francs ».

Dans tous les cas, la séquence du site de restriction est la même sur les deux brins, si l'on tient compte de la polarité. Ces fragments générés par une coupure sont appelés fragments de restriction.

Le plus souvent, une longue molécule d'ADN sera coupée en de nombreux fragments d'ADN de taille différente, qui seront suffisamment courts pour être manipulés et séparés par électrophorèse.

A partir des fragments, on peut donc établir une carte montrant les sites de coupure de l'ADN de l'organisme par une enzyme. Cette carte est appelée carte de restriction.

Toutes ces considérations amènent à la notion de polymorphisme de restriction. Celui-ci résulte des variations interindividuelles, au sein de la molécule d'ADN, de la disposition des sites de restriction pour une enzyme donnée.

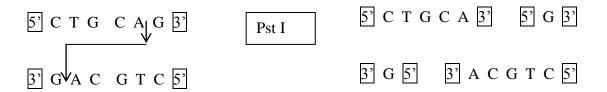


Figure 23 : Coupure à extrémités cohésives

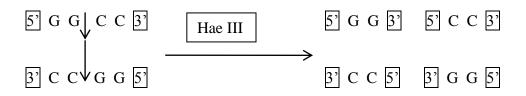


Figure 24: Coupure à bouts francs

Il existe trois types d'enzymes :

-Enzymes de type I: quand elles ont reconnu une séquence, elles déplacent de façon aléatoire 1000 à 5000 paires de bases, et libèrent quelques dizaines de nucléotides.

-Enzymes de type II : une fois la séquence reconnue, elles coupent l'ADN au niveau de cette séquence (57). C'est la seule utilisée en médecine légale. La longueur des séquences qu'elles peuvent reconnaître est comprise entre 4 et 8 bases. Pour certaines enzymes, la spécificité au niveau d'une ou deux bases peut ne pas être absolue.

Les séquences reconnues sont palindromiques, c'est-à-dire que la séquence est identique sur chaque brin, quand elle est lue dans le sens 5' vers 3'. La coupure a donc lieu sur les deux brins au même site.

-Enzyme de type III : Ces enzymes reconnaissent une séquence, et coupent l'ADN une vingtaine de nucléotides plus loin.

Tableau 2 : Les enzymes de restriction les plus couramment utilisées (42)

Enzymes	Microorganisme	Sites de restriction
Alu I	Arthrobacter luteus	$AG \rightarrow CT$
Bam H I	Bacillus amyloliquifaciens	$G \rightarrow GATCC$
Dde I	Desulfovibrio desulfuricans	$C \rightarrow TNAG$
Eco R I	Escherichia coli RY 13	$G \rightarrow AATTC$
Hae III	Haemophilus aegyptius	$GG \rightarrow CC$
Hind III	Haemophilus influenzae Rd	$A \rightarrow AGCTT$
Hinf I	Haemophilus influenzae Rf	$G \rightarrow ANTC$
Pvu I	Proteus vulgaris	$CGAT \rightarrow CT$
Pst I	Providencia stuartii 164	$CTGCA \rightarrow G$
Taq I	Thermus aquaticus YT1	$T \rightarrow CGA$

#### III-3-4-2 l'électrophorèse

L'électrophorèse est l'une des principales techniques mises en œuvre pour séparer et caractériser des molécules. Elle utilise un champ électrique, ce qui permet de séparer les molécules chargées en fonction de leur mobilité et leur poids. L'ADN étant chargé négativement (de part ses groupements phosphate), l'électrophorèse peut être utilisée.

#### III-3-4-2-1 Technique

La technique de l'électrophorèse est basée sur le déplacement d'ions dans un champ électrique, en fonction de leurs caractéristiques propres (poids, charge, mobilité...). Plus la molécule est riche en charges électriques, plus elle se déplace rapidement. D'autre part, plus la molécule est petite, plus elle est rapide (le support gélatineux utilisé pour l'électrophorèse exerce un effet de tamisage moléculaire qui freine d'autant plus les molécules qu'elles sont grosses).

Pour se déplacer dans un champ électrique, les molécules doivent se trouver sur un milieu liquide. Or, un milieu liquide est instable, en particulier s'il subit des vibrations ; le résultat est alors ininterprétable. La solution est d'utiliser un support d'électrophorèse, qui garde le liquide emprisonné dans un milieu plus rigide. Parmi les supports possibles, le plus fréquemment retrouvé est le gel d'agarose.

Lors de l'électrophorèse de l'ADN, au pH tampon de la solution, celui-ci va migrer vers l'anode. Si on dispose d'un étalon, on peut même déterminer la taille des fragments d'ADN analysés (10).

## III-3-4-2-2 L'électrophorèse capillaire

Cette technique d'électrophorèse est celle utilisée par les laboratoires de police scientifique.

Sa particularité réside dans le fait qu'elle est réalisée dans un tube presque aussi fin qu'un cheveu, aussi appelé capillaire.

Cette technique permet d'utiliser des tensions plus élevées de quelques dizaines de milliers de volts, et d'obtenir un résultat plus rapide (10).

C'est un outil de pointe qui ne nécessite pas de support, car il n'y a pas de phénomène de brassage liquidien. En revanche, pour obtenir le même effet de tamisage moléculaire que dans la technique classique, il faut utiliser une solution visqueuse de polymère.

Les molécules sont ensuite détectées par absorption, fluorescence ou encore spectrométrie de masse.

La difficulté réside dans le fait qu'on ne peut analyser qu'un seul échantillon par capillaire ; c'est pourquoi des appareils multi capillaires ont été créés, ils peuvent réaliser une centaine d'analyses en parallèle.

Cette technique est pour toutes ces raisons l'outil de choix des analyses ADN.

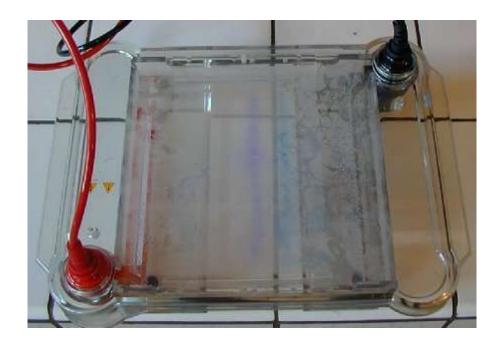


Figure 25 : Bac à électrophorèse

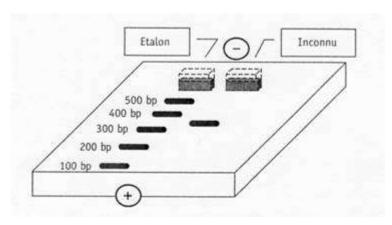


Figure 26 : Exemple de résultat d'électrophorèse

#### III-3-4-3 Le Southern blot

C'est en 1975 que E.M. SOUTHERN décrit une méthode permettant de détecter et de visualiser des fragments d'ADN de toute portion précise du génome.

#### III-3-4-3-1 Principe

L'ADN génomique extrait est découpé en de petits morceaux par des enzymes de restriction différentes, de façon reproductible. Dans le premier tube, l'ADN est digéré par une enzyme précise, dans le deuxième tube il est digéré par une deuxième enzyme de restriction, ...

On obtient alors un certain nombre de fragments de restriction (environ une centaine, mais ce chiffre varie selon l'enzyme de restriction utilisée).

Le produit de cette digestion subit ensuite une électrophorèse sur un gel d'agarose, afin de séparer les fragments de restriction en fonction de leur taille.

Pour visualiser les fragments d'intérêt, il est nécessaire d'hybrider ceux-ci avec une sonde moléculaire qui leur est complémentaire. Les conditions nécessaires à l'hybridation étant incompatibles avec le support en agarose, Southern eut l'idée de réaliser une réplique du gel en transférant l'ADN sur un support solide constitué par une membrane de nitrocellulose, avant l'hybridation. Ce support est aujourd'hui remplacé par une membrane de nylon.

Avant cette étape de transfert de l'ADN sur une membrane, l'ADN est transformé en un ADN monobrin, ou monocaténaire, à l'aide d'un agent dénaturant (soude NaOH); il peut alors s'hybrider avec la sonde. Le transfert (ou blotting) est obtenu par simple capillarité, en déposant le gel d'agarose recouvert de la membrane sur un système qui assure son hydratation. Un courant liquidien ascendant est créé à l'aide d'une couche de papier absorbant, et d'un poids pour permettre le déplacement de l'ADN du gel vers la membrane. Au bout de quelques heures, la membrane contient l'ensemble des fragments d'ADN qui étaient contenus dans le gel et aux même positions que dans celui-ci : il s'agit donc d'une réplique exacte du gel d'électrophorèse.

Enfin, les fragments monocaténaires présents sur le support sont hybridés avec une sonde marquée (radioactivement, enzymatiquement ou autre méthode de marquage) et complémentaire de ces fragments.

Il suffit ensuite de laver et de révéler la membrane (révélation sur un film photographique si sonde marquée avec un radio-isotope). Les bandes d'ADN monocaténaires hybridées avec une sonde sont alors visibles sous forme de bandes noires sur un fond blanc. La position des bandes permet de déterminer le poids moléculaire des fragments, par rapport à des fragments témoins.

La méthode de Southern est longue et coûteuse. Elle est également limitée dans ses possibilités de détection des mutations ; c'est pourquoi elle a été progressivement remplacée par la PCR (à partir de 1990). Néanmoins, elle reste nécessaire dans certains cas particuliers où la PCR s'avère inefficace.

## Méthode de SOUTHERN

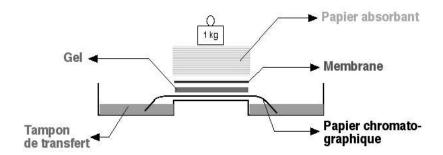


Figure 27 : Schéma du transfert par la méthode de Southern (47)

#### III-3-4-4 Les sondes moléculaires

Une sonde moléculaire est constituée d'une séquence d'acides nucléiques d'au moins 20 nucléotides, et homologue d'un fragment d'ADN à explorer.

Elle est capable de s'hybrider de façon stable et spécifique, par association entre bases complémentaires, quelle que soit la proportion de la séquence cible dans l'échantillon donné. En effet, la sonde peut reconnaître une séquence unique parmi des millions d'autres.

Il existe deux types de sondes :

- -Les sondes directes, qui reconnaissent spécifiquement tout ou partie d'un gène donné.
- -Les sondes indirectes, qui reconnaissent les polymorphismes de restriction, et qui sont utilisées en médecine légale pour reconnaître ces marqueurs génotypiques. Ces sondes ne renferment pas de séquences codantes, et sont nommées « sondes anonymes ».

D'après leur rôle, on distingue aussi les sondes uniloculaires et les sondes multiloculaires.

#### III-3-4-4-1 Les sondes uniloculaires

Elles sont répertoriées en fonction du chromosome porteur du locus comportant la séquence complémentaire de la sonde considérée. La première lettre « D » signifie « ADN », elle est suivie de la lettre « S » si la séquence est unique, ou de la lettre « Z » si la sonde est localisée en un site chromosomique défini. Puis un numéro est attribué, en suivant l'ordre de leur mise en évidence sur le même chromosome.

Par exemple, la sonde D2S44 désigne le locus défini par la 44ème sonde anonyme correspondant à une séquence unique du chromosome 2.

Elles ne s'apparient qu'avec une seule séquence localisée à un endroit précis de l'ADN, contrairement aux sondes multiloculaires.

Ce sont les sondes le plus souvent utilisées en médecine légale. Elles explorent les minisatellites qui siègent en un locus défini, et hybrident donc un seul RFLP très polymorphe, ce qui permet de déduire les informations génotypiques.

Les profils obtenus ne contiennent qu'un seul allèle si l'individu est homozygote pour ce locus, et deux allèles s'il est hétérozygote.

Ces sondes sont donc moins discriminatives; il faut associer plusieurs sondes pour obtenir un profil comparable à celui de sondes multiloculaires, mais leur lecture est plus aisée. Si on utilise 4 sondes, la probabilité d'obtenir le même profil pour deux individus non apparentés est de  $10^{-6}$  à  $10^{-15}$  (42).

Le principal avantage de ces sondes est qu'elles nécessitent très peu d'ADN, entre 20 et 50 ng, et qu'elles permettent l'interprétation de profil d'ADN issus de plusieurs sources.

En 1997, un groupe européen, l'EDNAP (European DNA Profiling Group), a constitué des groupes de travail afin d'établir un protocole commun d'analyses pour établir les empreintes génétiques, afin que celles-ci soient plus facilement comparables d'un pays à l'autre, et pour faciliter entre autres les contre expertises (10).

Tableau 3 : Les principales sondes uniloculaires utilisées en médecine légale (42)

Sondes	Locus
YNH 24	D2S44
V1	D17S79
MIJ14	D14S13
-	D18S27
-	D4S163
3'HVR	D16S85
pH30	D4S139
MS1	D1S7
MS31	D7S21
MS43	D12S11
g 3	D17S22
MS8	D5S43

Tableau 4 : Comparaison des statistiques des sondes uni- et multiloculaires (42)

	Sondes		
Caractéristiques	Uniloculaires	Multiloculaires	
ADN exploré	VNTR	VNTR	
Quantité minimale de matériel	10-50 ng	0,5-1 μg	
Nombre de bandes/hybridation	1 ou 2 bandes	Plus de 15 bandes, mais moins bonne résolution	
Taille minimale des fragments explorés	Jusqu'à 500 pb	Jusqu'à 3,5 à 4 kb uniquement	
Interprétation de mélange cellulaire	Oui	Non	
Calculs de probabilité	Basés sur des études de population permettant d'apprécier la fréquence allélique	Basés uniquement sur un degré de similitude entre deux résultats auto radiographiques	
Spécificité de l'espèce	Spécifique de l'espèce humaine	Existence d'hybridations croisées avec de l'ADN animal	
Nombre de sondes requises pour une identification	3 à 4 sondes	1 ou 2 sondes	

## III-3-4-4-2 Les sondes multiloculaires

Elles ont été les premiers instruments génétiques de l'identification, et sont différenciées en fonction de la nature de la séquence répétée tout au long de l'ADN. Contrairement aux sondes uniloculaires, elles s'associent avec une séquence qui peut être localisée en différents endroits de l'ADN.

En 1985, c'est Jeffreys qui a établi les premières empreintes génétiques grâce aux sondes 33.15 et 33.6, qui ont été utilisées pour identifier des auteurs d'agressions sexuelles, résoudre des demandes d'immigration en Grande Bretagne, et déterminer des filiations.

Ces sondes reconnaissent de courtes séquences répétitives de 16 à 64 pb, disséminées à travers le génome humain, et possédant un motif commun de 10 à 16 pb.

Elles permettent de visualiser en une seule analyse une soixantaine de loci polymorphes. Toutefois, certains fragments isolés semblent être liés entre eux et proviendraient en fait d'un même minisatellite de grande taille fragmenté par les enzymes de restriction, si bien qu'en réalité les sondes peuvent explorer environ 34 loci hypervariables non liés.

Pour pouvoir utiliser les sondes, il faut au préalable que l'ADN ait été digéré par l'enzyme de restriction Hinf1, et des conditions de faible stringence.

Parmi le grand nombre de bandes obtenues pour l'empreinte génétique par les sondes 33.15 et 33.6, on en retient 20 à 30 pour l'interprétation et la comparaison auto radiographique (car limite de discrimination de la technique de Southern blot et difficulté de lecture sinon).

La méthode nécessite 500 ng d'ADN pour obtenir un profil génétique facilement interprétable. A titre d'exemple, une tâche de sang de 50 microlitres, 15 à 25 bulbes pileux, ou 1 microgramme de tissus suffisent.

L'interprétation des résultats obtenus s'exprime par une probabilité, c'est la probabilité pour que deux individus non apparentés aient par hasard le même profil génétique. Cette probabilité est dépendante du nombre de bandes examinées, et plus ce nombre est important, plus la probabilité est faible.

Si on examine 20 bandes, la probabilité est de 1/1 000 000 000 000 !! Dans ces conditions, l'identification de la personne est quasi certaine...

En revanche, les sondes sont très sensibles aux contaminations par des microorganismes, et leur efficacité est limitée si l'ADN est dégradé.

Il existe d'autres sondes multiloculaires, comme les sondes M13 et MZ1.3, ou encore les sondes oligonucléotidiques.

On trouve également la sonde 3'HVR, qui a la propriété de s'hybrider, en fonction des conditions de stringence, soit à un locus précis (si forte stringence) soit à de nombreux loci disséminés à travers le génome (dans des conditions de faible stringence). Elle est constituée d'une répétition de séquence de 17 pb.

D'autre part, il existe différentes méthodes de marquage : le marquage d'oligonucléotides, la nick-translation (marquage d'ADN double brin par cassure-déplacement), ou le random priming (marquage d'ADN double brin par multi amorçage) et différents agents de marquage : les agents de marquage, les fluorochromes, les marquages colorimétriques, ou les marquages par chimioluminescence (47).

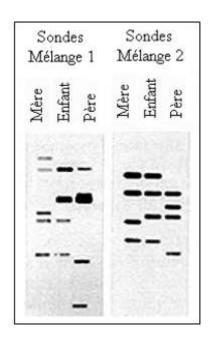


Figure 28 : Résultat d'une électrophorèse par sonde monolocus

3 sondes ont été utilisées pour cette électrophorèse, elles montrent que l'enfant examiné a bien pour parents les deux profils examinés.

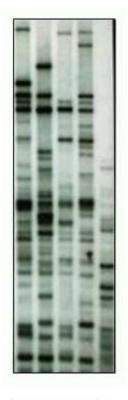


Figure 29 : Résultat d'une électrophorèse par sonde multilocus (ou empreinte génétique)

## III-3-5 La technique la plus couramment utilisée

Après avoir repéré, prélevé la trace, et extrait son ADN, on le purifie, puis on le quantifie, comme précédemment. Les enzymes de restriction ayant démontré leurs limites, on les a remplacé par une réaction de polymérisation en chaîne, ou PCR. Celle-ci permet d'augmenter la quantité d'ADN prélevé afin de réaliser notre empreinte génétique.

## III-3-5-1 LA PCR (Polymerase Chain Reaction)

C'est une technique qui a été mise au point au milieu des années 80, par Kary Mullis (prix Nobel 1993). La PCR a pour but d'obtenir une grande quantité d'une séquence d'ADN connue, par réplication d'un échantillon sélectif de l'ADN. On utilise à cet effet des kits commerciaux, qui vont répliquer toujours les mêmes séquences des chromosomes (cf figure 12).

Ce n'est pas une analyse en soi, mais elle permet de mettre à disposition une quantité d'ADN suffisante pour la réalisation ultérieure des analyses nécessaires. Elle a ouvert une nouvelle voie dans l'étude et l'analyse des gènes.

#### III-3-5-1-1 Matériel:

-Un brin simple d'ADN, contenant la séquence à amplifier ; il est obtenu en chauffant un ADN double brin jusqu'à sa température de fusion, ce qui s'appelle aussi dénaturer l'ADN.

-Des amorces encadrent la région à amplifier, de sorte que chaque brin nouvellement synthétisé s'étende au-delà de l'amorce sur le brin opposé, ce qui créer sur ces brins de nouveaux sites de fixation d'amorce.

Chaque amorce contient 18 à 30 nucléotides, pour assurer la spécificité de l'hybridation. L'amorce ne peut contenir un nombre de nucléotides inférieur à 18, afin qu'il n'y ait pas deux sites complémentaires dans les 3 milliards de bases de l'ADN. Leur composition en A et T et G et C doit être équilibrée (40% à 60%), et homogène sur la longueur de l'oligonucléotide. Les amorces sont complémentaires en séquence aux 2 extrémités de la région à amplifier.

-L'ADN polymérase est l'enzyme qui sert à la réplication de l'ADN. Ici c'est la Taq polymérase qui est utilisée ; elle est issue d'une bactérie.

En effet, la polymérase humaine est sensible à la chaleur, et est dénaturée en même temps que l'ADN lors de chaque cycle. Il fallait donc l'ajouter manuellement à chaque nouveau cycle, ce qui était fastidieux.

La Taq polymérase a été isolée chez une bactérie thermophile (Thermus aquaticus), qui vit à des températures supérieures à 90°C. C'est l'enzyme la plus utilisée.

Les erreurs générées par la Taq polymérase, qui garantit la sensibilité de la PCR, sont faibles ; elles ne concernent qu'une petite partie des fragments amplifiés, mais sont gênantes si on veut cloner les produits de PCR. C'est pourquoi des études sont en cours pour trouver une enzyme encore plus fiable. Aujourd'hui, la Vent ADN polymérase est déjà reconnue pour avoir des qualités supérieures à la Taq polymérase.

#### III-3-5-1-2 Méthode:

C'est une technique de laboratoire simple à mettre en œuvre, souple, avec un champ d'application étendu.

De plus, la réaction nécessite une faible quantité d'ADN (moins d'1 µg dans une expérience classique), c'est-à-dire qu'une molécule suffit.

On va réaliser une série de cycles pour augmenter de façon exponentielle le nombre de séquences. Pour n cycles, on obtiendra 2n molécules d'ADN.

Lors du premier cycle de réplication, l'ADN est dénaturé à 95°C environ, pendant 30 secondes à 1 minute, pour séparer les brins.

Puis la température est abaissée vers 50-60°C, pour permettre aux amorces présentes en large excès de se fixer sur leur séquence complémentaire. C'est l'étape d'hybridation des amorces.

On augmente alors à nouveau la température, jusqu'à 72°C, pendant 1 à 2 minutes, température optimale pour le fonctionnement de la Taq polymérase, ce qui favorise l'élongation.

Enfin, on porte le mélange à 95°C pendant 20 secondes, de façon à ce que les courtes régions d'ADN double brin (avec un brin initial et un simple brin) se séparent. Ces molécules serviront à leur tour de matrice pour la prochaine synthèse.

Au terme de ce premier cycle, on a obtenu 1 copie à partir de chaque séquence. Cependant, cette copie ne nous intéresse pas, car elle n'est pas bornée à ses deux extrémités.

Au terme du deuxième cycle, on a obtenu 2 copies bornées aux deux extrémités (brin court), et 6 copies non bornées (brin long). L'accumulation des brins courts est exponentielle, tandis que celle des brins longs est linéaire ; c'est pourquoi la quantité de brins longs obtenus à la fin de la PCR est négligeable, d'autant plus qu'ils sont éliminés par lavages au fur et à mesure.

Le cycle est ainsi répété 30 à 60 fois, à l'identique.

La spécificité de la PCR est encore augmentée par la méthode du préchauffage, qui consiste à chauffer tous les composants au préalable à 72°C, et à ajouter en dernier la Taq polymérase.

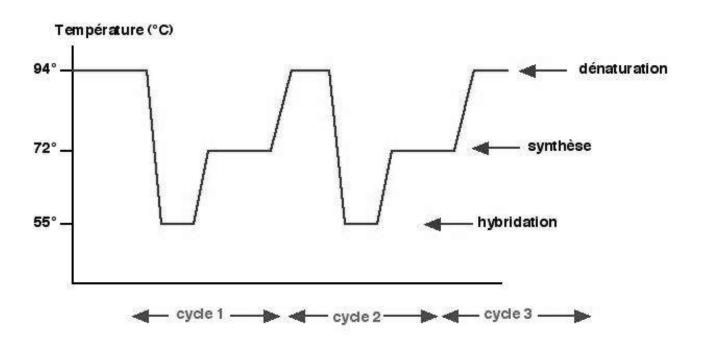
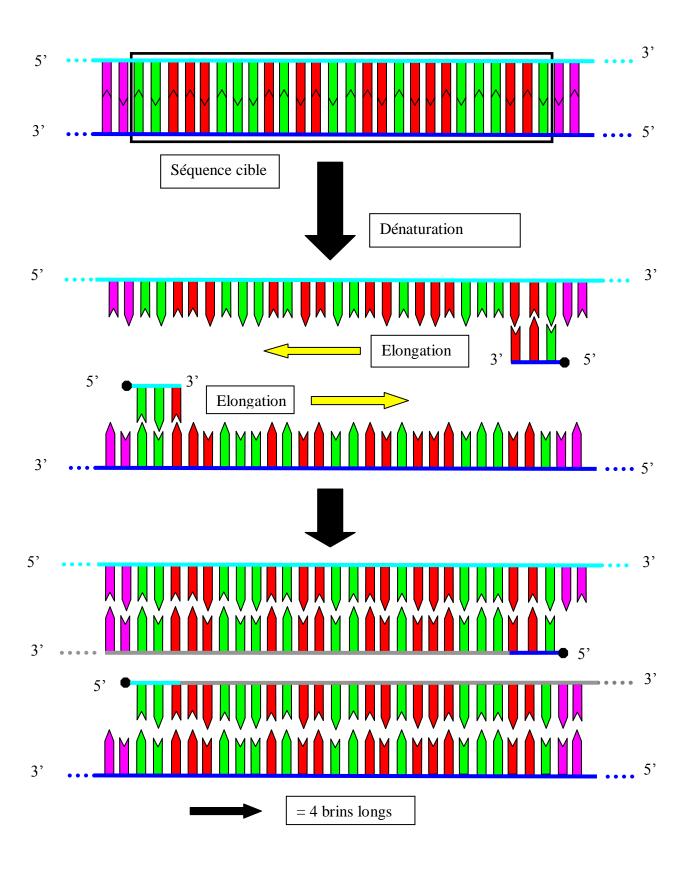


Figure 30 : La variation de température pendant un cycle de PCR (47)

### Premier cycle



### Deuxième cycle (après dénaturation)

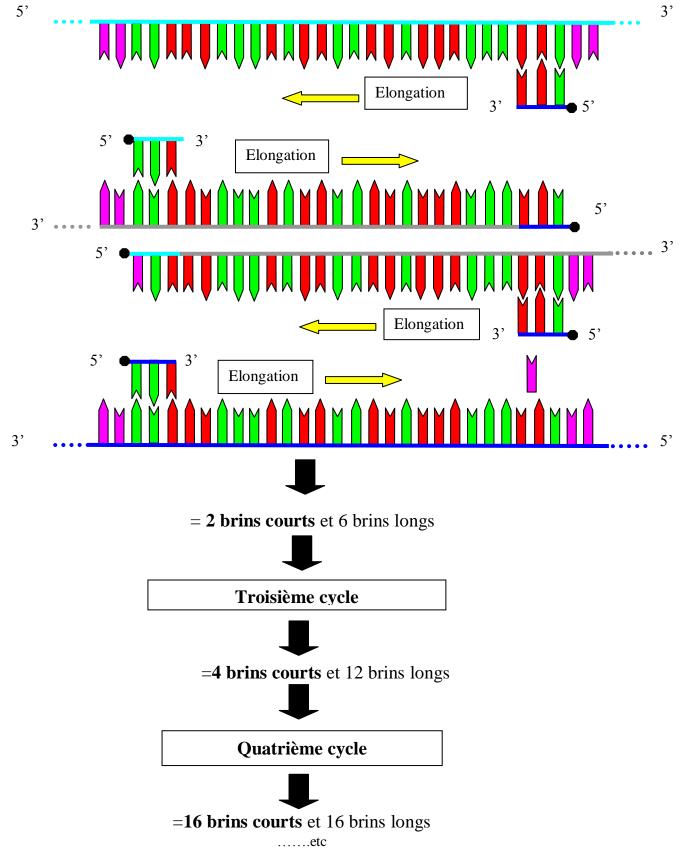


Figure 31 : Explication des cycles de la PCR

#### III-3-5-1-3 Limites de la technique

Il faut connaître les séquences d'ADN aux extrémités de la séquence à amplifier, afin de réaliser l'amorce. Avec le séquençage complet du génome, cette difficulté est maintenant levée.

L'ADN de l'échantillon ne doit pas être pollué, car dans ce cas tous les ADN présents dans l'échantillon vont être multipliés.

#### III-3-5-1-4 Utilisation

Les différents rôles de la PCR sont:

- -Le séquençage direct
- -L'amplification de séquences spécifiques d'ADN humain, notamment quand des cellules humaines ont fusionné avec d'autres cellules
- -Le suivi des thérapies anti-cancéreuses
- -La détection des infections virales ou bactériennes
- -L'identification du sexe des embryons, lors du diagnostic anténatal
- -L'étude de l'évolution au niveau moléculaire
- -La médecine légale

C'est une technique révolutionnaire pour la génétique moléculaire !!

#### III-3-5-1-5 Avantages

- -Peu d'ADN nécessaire
- -Pas d'utilisation d'enzymes de restriction
- -Pas d'utilisation de sondes moléculaires
- -Le taux d'erreur, mesuré lors de la réplication naturelle, est de 1 pour 10<sup>9</sup>.

Cette extraordinaire précision est due à la possible élimination par la machine de réplication des nucléotides mal incorporés dans la chaîne. In vivo, le taux d'erreur est plutôt d'une erreur tous les  $2x10^4$  nucléotides, ce qui représente une toute petite partie des fragments analysés.

-L'ADN utilisé pour la PCR peut avoir des sources variées, il peut provenir du noyau des cellules, ou même de l'ADN libéré par des cellules portées à ébullition, sans autre étape de purification.

Il existe plusieurs techniques de PCR : la PCR quantitative, la PCR qualitative et la PCR en multiplex.

#### III-3-5-1-6 La PCR quantitative

C'est la technique décrite ci-dessus.

#### III-3-5-1-7 La « real time PCR »

Elle est basée sur la PCR quantitative, mais permet dans le même temps de quantifier l'ADN présent dans l'échantillon.

Il existe de nombreuses méthodes de PCR en temps réel. Une méthode fréquemment utilisée est basée sur l'hybridation de sondes porteuses des deux molécules, un fluorochrome en 5' et un extincteur (ou quencher) en 3' (sondes "TaqMan"). Le rôle de l'extincteur est d'empêcher le fluorochrome d'émettre de la fluorescence lorsqu'il est excité. Pour que cette extinction ait lieu, il faut que l'extincteur et le fluorochrome soient très proches l'un de l'autre, ce qui est le cas sur la sonde, dont la taille est en général d'une quinzaine de nucléotides.

Au cours de la PCR, la sonde se lie à sa séquence complémentaire, située entre les deux amorces déterminant le fragment à amplifier par PCR.

Puis, au cours de la réplication de l'ADN, la Taq polymérase butte sur la sonde et la dégrade grâce à son activité exonucléasique, libérant le fluorochrome et l'extincteur dans le milieu. Le fluorochrome n'est plus "éteint" par l'extincteur et peut alors émettre sa fluorescence

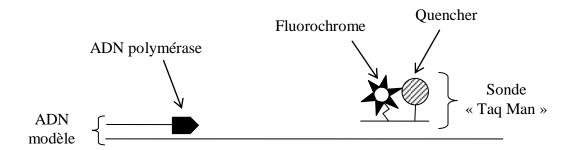
La méthode est donc très précise car la fluorescence émise est strictement proportionnelle au nombre de copies synthétisées au cours de la PCR. Cette fluorescence est mesurée grâce à des appareils dédiés qui mesurent la fluorescence émise par le fluorochrome au cours du temps.

Cette méthode permet d'éliminer la variation obtenue avec la PCR quantitative. Elle permet également d'optimiser les conditions de la PCR, et améliore sa sensibilité.

#### - Avantages :

- •L'hybridation spécifique de la sonde et de la cible seule génère un signal fluorescent, donc une amplification non spécifique ne créer pas de signal.
- •Le signal fluorescent est détecté en temps réel, la quantification de l'ADN est donc immédiate (48).

- Procédé simplifié et amélioré.
- Sensible, spécifique et reproductible. Procédé de choix
  - Inconvénients :
- •Les amorces sont fluorescentes, donc différentes amorces doivent être synthétisées pour les différentes séquences (en cas de PCR multiplex).





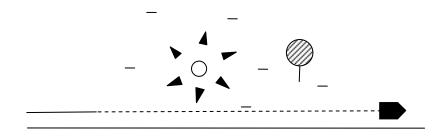


Figure 32 : Méthode de PCR par la sonde « Taq Man »

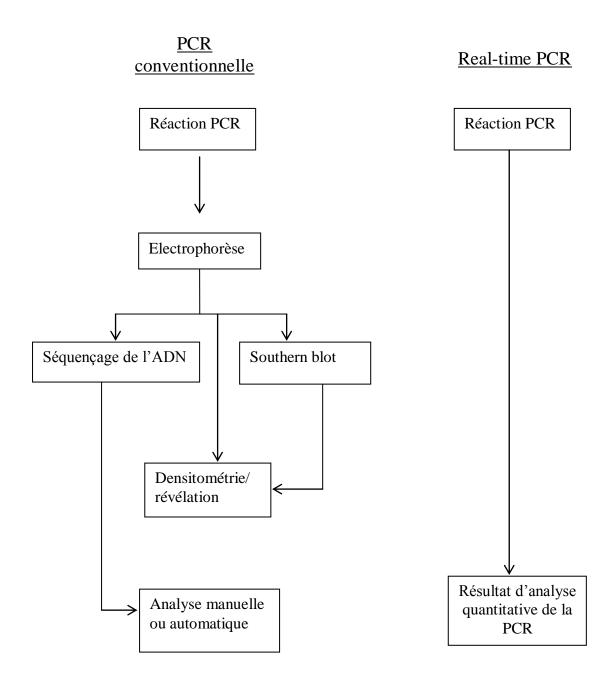


Figure 33 : Comparaison entre PCR et Real-time PCR

#### III-3-5-1-9 La PCR multiplex (10)

L'analyse de STR combinés en multiplex est une PCR qui copie simultanément et sélectivement plusieurs fragments d'ADN. La zone à copier est encadrée par des amorces, comme dans la PCR conventionnelle. Il est possible d'analyser environ 15 fragments différents par cette technique qui fait donc gagner un temps précieux.

La difficulté se présente lors de l'électrophorèse ; il est alors difficile d'attribuer l'allèle détecté à l'un ou l'autre des STR analysés. En effet, on peut avoir 2 allèles pour le même STR. Si on analyse 2 STR simultanément, on peut donc avoir 4 allèles révélés à l'électrophorèse Il n'est à priori pas possible de distinguer quel allèle appartient à l'un ou l'autre des deux STR.

#### -Solutions:

•On peut faire en sorte que les allèles des STR analysés simultanément aient des tailles différentes. Cette solution comporte une limite de taille qui est donnée par la PCR.

Exemple : on considère que nous analysons dans cet exemple des STR de 4 paires de bases (ou pb). Si ce premier STR présente 10 allèles possibles de 100 à 180 paires de bases (4x10 allèles possibles+2 amorces x 20 nucléotides+2x50 nucléotides car amorce placée à 50 nucléotides de la zone à copier par exemple= 180 pb maximum), il faut choisir un deuxième STR avec une taille comprise entre 200 et 280 pb. On augmente ainsi la taille à chaque STR analysé afin qu'il n'y ait pas de chevauchement possible après révélation de l'électrophorèse.

•La deuxième solution consiste à utiliser 2, 3, voire 4 détections différentes. On peut utiliser des colorants fluorescents accrochés aux amorces si deux STR ont des tailles identiques. Cette solution peut bien sûr être combinée avec la première pour augmenter le nombre de STR analysables en même temps. De plus, cette méthode permet de simplifier la détection des fragments ADN, et de supprimer l'étape de coloration à la fin de l'électrophorèse. A la place, on place un détecteur de fluorescence directement sur le système d'électrophorèse. On peut ainsi utiliser jusqu'à 5 colorants différents, et analyser jusqu'à 15 STR simultanément. Les spectres d'émission des colorants se chevauchent, d'où l'utilisation de l'informatique et de logiciels adaptés pour analyser le résultat (l'ordinateur transforme une collection de données brutes de mesure de fluorescence en une collection de pics qui déterminent la taille des morceaux d'ADN grâce à un standard interne ajouté à l'échantillon).

Une fois la PCR réalisée, notre échantillon subit une électrophorèse capillaire. Celle-ci est ensuite lue par un laser, qui nous fournit le résultat sous forme de graphique à interpréter. Cet électrophorégramme représente les différentes régions analysées lors de l'empreinte génétique. Pour chaque région, on peut observer un ou deux pics. Ces pics correspondent au nombre de répétitions du minisatellite au niveau de la région analysée, sur le chromosome maternel, et sur le chromosome paternel. Quand deux pics sont visibles, l'individu ne présente pas le même nombre de répétitions sur ses deux chromosomes. Il est alors dit hétérozygote. Dans le cas contraire, on observe un seul pic, et l'individu est homozygote (exemple : région DS7820).

Cette interprétation est le travail d'experts, dans les laboratoires d'analyses génétiques.

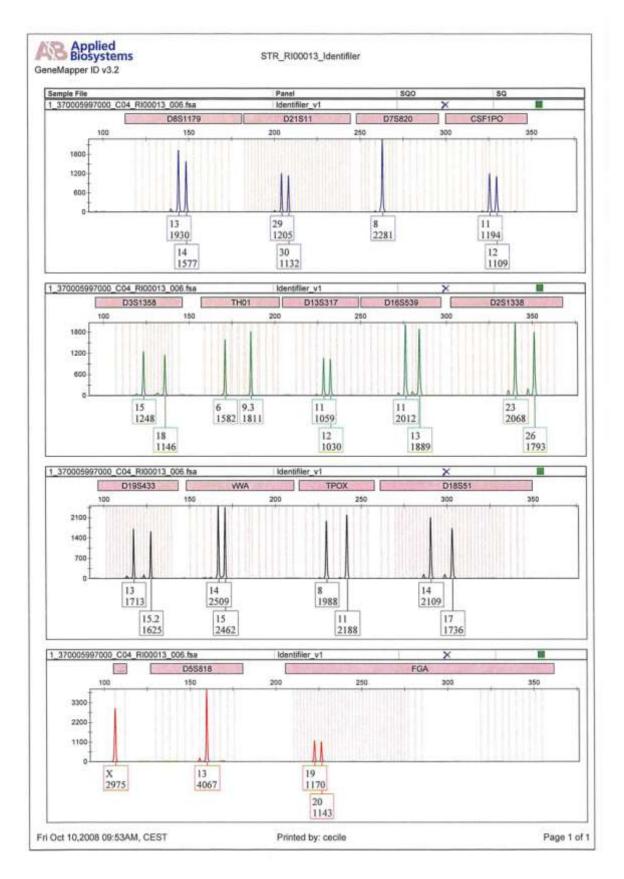


Figure 34 : électrophorégramme

### IV – Conservation des données et législation (7, 10, 13)

#### **IV-1 Introduction**

Le fichier national automatisé des empreintes génétiques (FNAEG) est une base de données informatique qui comprend :

- -Les résultats des analyses ADN issues de traces
- -Les résultats des analyses ADN issues de personnes condamnées ou suspectes de délits ou de crimes.

Il est actuellement géré par deux logiciels :

- -Le CODIS, gracieusement mis à disposition par le FBI, mais peu conforme à l'évolution de nos besoins.
  - -Un logiciel propre actuellement en test, qui devrait être le seul à fonctionner à terme.

Ce fichier crée en 1997 est peu connu, et il est très critiqué d'un point de vue éthique, d'où sa mise en place relativement lente en France.

L'intérêt d'une telle base de données est la possibilité de comparer un profil de question avec des profils ADN de personnes issues d'une population très large, potentiellement capables de réaliser l'acte dont il est question.

Grâce à un effort important réalisé par un niveau élevé d'étalonnage, les analyses sont comparables entre elles, même si une analyse statistique est nécessaire pour établir la force probante de la comparaison. En effet, les STR forment le noyau commun de toutes les bases nationales de données d'ADN, et des accords ont été obtenus pour un système commun de STR: l'European Standard Set ou ESS (38). Peu après, le groupe international sur les loci (ISSOL en anglais) a été défini par Interpol. Il est identique à l'ESS, excepté pour un locus (l'amélogénine). Cet effort a permis une meilleure coordination internationale, avec possibilité d'échanges de données internationales grâce à Interpol.

Si l'identification d'une personne par ses empreintes génétiques, dans le cadre d'une procédure pénale ne nécessite pas son accord, il n'en va pas de même en ce qui concerne le prélèvement de matériel biologique lui-même.

La loi de 1994 sur le respect du corps humain n'exige pas expressément l'accord de l'intéressé, dans la mesure ou il n'y a aucun formulaire à remplir, mais le prélèvement ne peut être réalisé sous la contrainte. Le refus de prélèvement est donc non sanctionné en tant que tel; il faut porter l'éventuel refus opposé par un détenu à la connaissance du juge d'application des peines, afin qu'il en apprécie les conséquences quant à l'octroi des mesures d'aménagement de peine, comme les réductions de peines, les permissions de sortie ou la libération conditionnelle.

En revanche, une circulaire du 10 octobre 2000 prévoit la possibilité de se saisir de matériel biologique qui serait détaché du corps si refus de prélèvement (brosse à dent, cheveu tombé...).

C'est ainsi qu'un habitant de Pleine-Fougères, qui avait refusé le prélèvement demandé par le juge d'instruction, avait été néanmoins mis hors de cause à son corps défendant, grâce à des prélèvements effectués sur sa brosse à dents, son peigne et son rasoir électrique.

La loi relative à la sécurité quotidienne (novembre 2001) a tenté de résoudre partiellement cette difficulté, non pas en rendant le consentement de l'intéressé facultatif, mais en incriminant le refus opposé par un condamné. La peine encourue est de 6 mois d'emprisonnement et de 7500 euros d'amende, portée à deux ans d'emprisonnement et 30 000 euros d'amende en cas de condamnation pour crime (en plus de la peine pour le crime!!).

D'autre part, si une personne faisant l'objet d'un prélèvement commet ou tente de commettre des manœuvres destinées à substituer à son propre matériel biologique le matériel biologique d'un tierce personne, avec ou sans son consentement, la peine est portée à 3 ans de prison et 45 000 euros d'amende.

Le cas du refus opposé par une personne seulement mise en cause n'était donc pas résolu.

C'est chose faite avec l'actuel projet de loi pour la sécurité intérieure qui applique à cette personne les peines actuellement encourues par un condamné pour un délit entrant dans le champ du FNAEG.

Tableau 5:Evolution des lois concernant le refus de prélèvement

		Loi du17/06/1998	Loi du15/11/2001	Projet de loi pour la
				sécurité intérieure
Nature	des	à caractère sexuel	+ crimes d'atteinte	+ délits entrant dans
infractions			volontaire à la vie	les catégories
				précédentes
			+ crimes de vols,	
			destructions	+ Proxénétisme
				+ stupéfiants
				+ etc
Personnes		Condamnés	Condamnés	Condamnés et mis en
concernées				cause
Refus	de	Pas sanctionné	Sanctionné	Sanctionné pour les
prélèvement			uniquement pour les	condamnés et les mis
			condamnés	en cause

#### IV-2 Valeur des tests ADN devant la justice

#### IV-1-1 Civil

Les affaires civiles en France peuvent correspondre à de nombreux cas différents ; il existe donc plusieurs juridictions civiles, qui sont :

- -Le tribunal d'instance
- -Le tribunal de grande instance
- -Le tribunal de commerce
- -Le tribunal maritime commercial
- -Le conseil des prud'hommes
- -Le tribunal paritaire des baux ruraux
- -Le tribunal des affaires de la sécurité sociale
- -Le tribunal du contentieux de l'incapacité

Ces différents tribunaux jugent des affaires civiles, c'est-à-dire des affaires qui peuvent donner lieu à des dédommagements et intérêts, mais pas à une peine de prison. Compte tenu du prix des analyses ADN, elles ne devraient pas être utilisées pour des procédures civiles. Cependant, le code civil n'exclut pas l'utilisation des tests ADN dans le cadre de mesures d'enquête ou d'instruction diligentée lors d'une procédure judiciaire, ou à des fins médicales, de recherche scientifique ou d'identification d'un militaire décédé (à l'occasion d'une opération conduite par les forces armées ou les formations rattachées.).

En matière civile, cette identification ne peut être recherchée que si elle est ordonnée par le juge, lors d'une action tendant soit à l'établissement ou la contestation d'un lien de filiation, soit à l'obtention ou la suppression de subsides.

Dans le cas d'une analyse de lien de filiation, l'analyse ADN constitue une preuve irrévocable, et c'est elle qui va directement influencer la décision du ou des juges. La peine sera donc en rapport avec le résultat de l'analyse, considérée comme une preuve indiscutable.

Dans ce contexte, le consentement de l'intéressé doit être préalablement et expressément recueilli. Sauf accord express de la personne manifesté de son vivant, aucune identification par empreintes génétiques ne peut être réalisée après sa mort.

Lorsque l'identification est effectuée à des fins médicales ou de recherche scientifique, le consentement express de la personne doit être recueilli par écrit préalablement à la réalisation de l'identification, après qu'elle a été dûment informée de sa nature et de sa finalité. Le consentement mentionne la finalité de l'identification, et il est révocable à tout moment.

#### IV-1-2 Pénal

Une procédure pénale peut être jugée par trois tribunaux :

- -Le tribunal de police (peine pouvant aller jusqu'à 1500 euros d'amende)
- -Le tribunal correctionnel (peine d'emprisonnement, d'amende, de substitution ou acquittement.)
  - -La cour d'assises (peine d'emprisonnement ou acquittement)

Les tests ADN vont nous intéresser en particulier dans le cadre d'un jugement en cour d'assises. Le principe d'un tel procès est basé sur l'intime conviction des jurés et des magistrats. L'ADN, aussi appelée « Reine des preuves », peut il influer dans cette intime conviction ?

#### IV-1-1-1 Déroulement de l'instruction d'une affaire pénale

Suite à une infraction constatée par la police judiciaire, après le dépôt de plainte d'un particulier le plus souvent, une instruction est ouverte. Le juge a alors plusieurs pouvoirs, aux moyens de mandats de comparution, d'arrêt, d'amener ou de dépôt. C'est pendant la phase de l'instance que les parties opposées (la défense et l'accusation) constituent un dossier réunissant preuves, faits et témoignages. Au terme de l'enquête, le juge peut alors ordonner une mise en examen des personnes contre lesquelles il existe des indices graves ou concordants, rendant vraisemblable qu'elles aient pu participer comme auteur ou comme complice à l'infraction jugée. La personne mise en examen a des droits qui doivent être respectés, comme celui de se faire assister par un avocat. Elle va être interrogée lors de la première comparution (si elle n'a pas déjà été entendue comme témoin assisté). La personne peut être placée ou non en détention provisoire, en attendant le déroulement de son procès, devant l'un des trois tribunaux pénaux.

#### IV-1-1-2 Composition de la cour d'assises

La cour d'assises est compétente pour juger les infractions qualifiées de crime. A l'audience, le verdict sera rendu par 3 magistrats professionnels et un jury ; c'est le seul cas où des personnes choisies au hasard parmi la population française participent directement à l'œuvre de la justice.

Les magistrats professionnels sont le président du tribunal et ses deux assesseurs.

Le jury est composé de 9 personnes sélectionnées au hasard parmi la population française. Tout citoyen français est donc susceptible d'être juré d'assise, dès lors qu'il satisfait à certaines conditions:

- -Avoir au moins 23 ans
- -Savoir lire et écrire
- -Etre inscrit sur les listes électorales
- -Ne jamais avoir été condamné pour un crime ou un délit à une peine d'emprisonnement de plus de 6 mois.
- -Etre capable, au sens juridique du terme (pas de majeur sous tutelle ou curatelle par exemple)
- -Ne pas participer au fonctionnement de la justice (magistrat, membre du gouvernement, fonctionnaire de police)
  - -Ne pas avoir déjà été juré dans le même département au cours des 5 dernières années
- -Ne pas être parent avec l'accusé, un autre membre du jury, le procureur ou un des avocats.

Les membres du jury sont tirés au sort après trois étapes :

- -Une première liste dite préparatoire est établie dans chaque commune sous l'autorité du maire, par tirage au sort à partir des listes électorales (200 noms minimum).
  - -Une seconde liste est ensuite établie au niveau départemental, à partir de la première.
- -Enfin, trente jours au moins avant l'ouverture de la session d'assise, une commission présidée par le président du tribunal de grande instance ou par le premier président de la cour d'appel tire au sort une liste de 40 jurés titulaires, qui forment le jury de session, ainsi qu'une liste spéciale de 12 suppléants.

À l'ouverture de l'audience, un dernier tirage au sort est effectué par le président de la cour d'assises. Sauf s'il est récusé par l'avocat de la défense ou l'avocat général, le jury est alors composé de 9 personnes ; la cour est donc composée de 12 membres au total.

#### IV-1-1-3 Déroulement du procès

Les jurés assistent au déroulement complet du procès :

- -Débat de la cour d'assise
- -Lecture de l'ordonnance de l'accusation
- -Audition des témoins et experts
- -Réquisitoire de l'avocat général
- -Plaidoiries des avocats de la défense
- -Déclaration de l'accusé
- -Clôture des débats
- -Lecture des questions principales et subsidiaires auxquelles la cour d'assise doit répondre.

Puis ils se retirent pour délibérer.

Le délibéré est le résultat d'une réflexion commune entre les jurés et les magistrats, chacun devant se prononcer en fonction de son intime conviction. Chacun vote à bulletin secret dans une urne. Puis le président de la cour dépouille cette urne.

Pour obtenir une décision défavorable à l'accusé, il faut une majorité de 8 voix au moins (les bulletins blancs ou nuls étant considérés comme favorables à l'accusé). Si la culpabilité est reconnue, le délibéré porte ensuite sur la peine et son application. Le vote est réalisé à bulletins secrets et la décision doit être prise à la majorité absolue des voix (soit 7 voix, et 8 voix pour que la peine maximale).

#### IV-1-1-4 Impact des empreintes génétiques sur la décision du jury

Le résultat d'une expertise génétique dispose d'un capital confiance extrêmement important fondé sur le très grand pouvoir discriminant de la technique. Il est intéressant non seulement dans le cadre d'un dossier pénal, car il va permettre d'établir la correspondance ou non entre les profils d'une trace et d'un individu, mais également pour établir le lien entre plusieurs dossiers judiciaires en apparence distincts (même en dehors de toute identification, par la correspondance entre les profils de traces issues de ces dossiers).

Il est pourtant important de prendre conscience que la prise en compte du résultat d'une comparaison de profils génétiques n'est pas sans limite. L'ADN renseigne très précisément sur l'auteur, mais il ne dit rien sur le contexte et les circonstances de ce contact (33)

En effet, la seule correspondance d'un échantillon d'ADN prélevé sur les lieux d'un crime avec le profil d'identité génétique d'une personne atteste uniquement de la présence de celleci sur ou à proximité des lieux du crime. Qui plus est, si l'échantillon d'ADN a été prélevé sur un objet mobile, la présence d'une personne sur les lieux du crime n'est même pas certaine.

Par conséquent, la correspondance entre un échantillon d'ADN et le profil d'identification génétique d'une personne peut n'avoir guère de signification, en particulier lorsque l'échantillon a été prélevé dans un lieu public. Comme l'exigent les directives policières, il est donc crucial d'obtenir des preuves supplémentaires.

Tous ces points ne manqueront pas d'être rappelés au jury par l'avocat de la défense.

Un jury populaire peut facilement se laisser influencer par une empreinte génétique, mais bien que l'on dise que l'ADN est la reine des preuves, il ne faut pas oublier qu'il n'est pas dissocié des autres moyens techniques. Les auditions de victimes et de témoins et les enquêtes de voisinage restent indispensables, car elles vont amener d'autres éléments à l'enquête. Si toutes les preuves ne vont pas dans la même direction, le doute s'installe dans l'esprit des jurés.

Or, en droit français, une affaire est jugée parce que le magistrat a une intime conviction. L'analyse ADN est l'un des éléments qui vont permettre au juge de se forger son intime conviction (au même titre que les autres preuves)

De plus, le doute que peut créer l'expression probabiliste des analyses peut se révéler favorable à l'accusé.

D'autre part, la naissance de la "preuve ADN" a ouvert la voie à la "falsification de preuve ADN", voire au dépôt volontaire d'un cheveu, d'un mégot... sur la scène d'un crime pour brouiller les pistes ou faire incriminer telle ou telle personne. Il faut donc être très prudent quant à l'analyse des empreintes génétiques.

Une conséquence imprévue de l'apparition des profils d'identification génétique a également été la réouverture d'affaires classées. Des personnes qui avaient été reconnues coupables de meurtre ou de viol avant que l'on dispose de profils d'identification génétique ont cherché à faire réévaluer, en recourant à cette nouvelle technique, les éléments de preuve utilisés dans leur cause personnelle.

Dans certains cas, les résultats des tests génétiques ont permis de disculper les personnes reconnues coupables des infractions et ont mené à leur libération. Le cas contraire est plus rare, car longtemps après les faits, les témoignages ne sont plus aussi précis, et les jurés ont plus facilement un doute quant à la culpabilité du « nouvel accusé ».

# IV-3 Le débat autour du fichier national automatisé des empreintes génétiques (15)

Comparée à certains de ses voisins, au premier rang desquels la Grande Bretagne ou les Pays-Bas, la France a fait preuve, en matière d'analyses génétiques et de constitution d'un fichier spécifique, d'une démarche particulièrement précautionneuse, pour ne pas dire hésitante.

Les craintes à propos de la confidentialité des fichiers informatisés jouent certainement un rôle dans cette hésitation. De plus, la création d'un tel fichier soulève de nombreux problèmes éthiques.

La création du FNAEG a été semée d'embûches, même si dès décembre 1989, le comité national d'éthique avait rendu un avis favorable, et avait précisé quelques recommandations :

- -Nécessité d'un agrément spécial des laboratoires
- -Nécessité d'une décision de justice
- -Désignation des seuls laboratoires agréés comme experts devant les juridictions

Les demandes de la création du FNAEG s'appuyaient sur une recommandation déjà ancienne du Comité des ministres du Conseil de l'Europe en 1992 (9), et sur une recommandation du Conseil de l'Union européenne.

Une ébauche de cadre juridique national a fait son apparition à partir de 1994.

Le 9 juin 1997, une résolution du conseil de l'union européenne encourage les Etats de l'Union européenne à créer des bases de données nationales, et à faciliter l'échange des résultats, à deux conditions :

-que les analyses soient réalisées à partir de segments non codants de la molécule d'ADN (sauf pour le chromosome Y)

-que des garanties spécifiques en faveur des personnes soient adoptées.

En réalité, le FNAEG en tant que tel a été institué par une loi du 17 juin 1998, relative à la prévention et à la répression des infractions sexuelles, ainsi qu'à la protection des mineurs. C'est donc à partir de 1998 que le fichier est crée, et il est commun à la gendarmerie et à la police nationale. Il sera cependant opérationnel à partir de juin 2001.

Dans toute cette affaire, le rôle de l'État s'est borné à encadrer juridiquement des initiatives venues d'ailleurs, plutôt que de donner l'impulsion première.

Tableau 6 : Introduction des bases de données nationales d'ADN en Europe (15, 63)

DATE	PAYS	
1995	Angleterre	
1996	Nouvelle-Irlande, Ecosse	
1997	Pays-Bas, Autriche	
1998	Allemagne, Slovénie	
1999	Finlande, Norvège	
2000	Danemark, Suisse	
2001	France, République Tchèque	
2002	Belgique Estonie, Lituanie, Slovaquie	
2003	Hongrie, Lettonie	
En préparation	Pologne, Portugal, Espagne, Grèce, Irlande, Yougoslavie	

# IV-3-1 Les principes de l'article 26 de la loi du 17 juin 1998, relative à la répression des infractions sexuelles et à la protection des mineurs :

#### IV-3-1-1 But

Centraliser les traces recueillies sur les scènes d'infraction, dont l'auteur n'a pu être identifié, ainsi que les génotypes des individus définitivement condamnés pour des infractions sexuelles.

#### IV-3-1-2 Contenu

-Les traces génétiques retrouvées sur le lieux d'un crime (et dont on n'a pas pu déterminer à qui elles appartiennent)

-Les empreintes génétiques des personnes condamnées dans le cadre d'une infraction sexuelle. Dans ce cas, figurent également le nom, le prénom, la date et le lieu de naissance, ainsi que la filiation et le sexe du condamné.

En aucun cas l'empreinte génétique d'un témoin ou des personnes mises en examen ne pourra être enregistrée dans le fichier national.

Un projet de décret prévoit également que le procureur de la république peut ordonner des analyses d'empreintes génétiques sur des personnes condamnées pour infraction sexuelle, antérieurement à la publication de la loi du 17 juin 1998, dès lors que ces personnes continuent à purger leur peine, et dans le cas contraire, dans un délai de 6 mois à partir de la date de la condamnation définitive.

Seul un magistrat peut alors ordonner l'enregistrement d'un profil génétique au FNAEG.

Un décret sera signé le 18 mai 2000 ; il précise les conditions de fonctionnement du FNAEG, et créer en complément un service central de préservation des prélèvements biologiques (SCPPB), correspondant aux empreintes conservées dans le fichier.

Deux traits spécifiques ressortent de ces dispositions : d'une part, le champ du FNAEG est limité aux seules infractions sexuelles ou à certaines atteintes de mineurs ; d'autre part, il y a exclusion des empreintes génétiques des personnes mises en cause au cours de la procédure.

Ces deux traits limitent considérablement l'efficacité d'un tel fichier. En effet, la première limite n'a aucune logique en matière criminelle, et passe sous silence le fait que de nombreux délinquants sexuels ont par le passé commis des infractions de nature différente.

La deuxième limite empêche par exemple de comparer les empreintes d'un même suspect dans deux affaires différentes, ce qui peut avoir des conséquences dramatiques (exemple de l'affaire Guy Georges).

# IV-3-2 Loi du 15 novembre 2001, relative à la sécurité quotidienne

Les deux obstacles ci-dessus ont été surmontés, au moins partiellement, depuis l'adoption de la loi du 15 novembre 2001, et surtout par le dépôt d'un projet de loi qui élargit les indications du FNAEG :

- -Aux crimes d'atteintes volontaires à la vie de la personne
- -Aux crimes de torture, actes de barbarie et de violences volontaires
- -Aux crimes de vols
- -Aux crimes d'extorsions, de destructions, dégradations et détériorations dangereuses pour les personnes
  - -Aux crimes constituant des actes de terrorisme

En 2001, près de 835 000 personnes ont ainsi été mises en cause, et rentrées au fichier.

Malgré cet élargissement des indications, certains crimes restent en dehors du champ, comme le trafic de stupéfiants ou le proxénétisme par exemple.

#### IV-3-3 Loi du 18 mars 2003, relative à la sécurité intérieure

Elle procède à une nouvelle extension du champ du FNAEG, au niveau de la liste des infractions, et des personnes concernées.

#### IV-3-3-1 La liste des infractions

#### Le FNAEG est alors ouvert :

- -Aux délits de vols, extorsion, escroquerie, destruction, dégradations, et menaces d'atteintes aux biens.
- -Aux atteintes aux intérêts fondamentaux de la nation, actes de terrorisme, fausse monnaie et associations de malfaiteurs
  - -Aux crimes et délits relatifs aux armes
  - -Aux crimes et délits de proxénétisme
  - -Aux infractions de recel et de blanchiment de l'une des infractions ci-dessus.

#### IV-3-3-2 Les personnes concernées

#### Peuvent être ajoutées au FNAEG:

- -Les personnes dont on a une raison plausible de soupçonner qu'elles ont commis un crime ou un délit. Dans ce cas, on peut prélever leur ADN pour le comparer avec les données du FNAEG.
- -Les personnes contre lesquelles des indices graves ou concordants sont mis en évidence. Dans ce cas, on peut enregistrer leur profil ADN dans le FNAEG et le conserver pendant 25 ans.
- -Les personnes concernées par des procédures de recherche des causes de la mort ou de la disparition, les personnes décédées et les personnes recherchées. On peut alors conserver leur profil ADN pendant 40 ans dans le fichier.

Depuis cette loi, un officier de police peut alimenter le fichier, sans l'autorisation préalable d'un magistrat.

D'autre part, elle est mentionnée au dossier, et la personne concernée en est bien sûr tenue informée.

De plus, l'empreinte génétique est « effacée » quand elle n'apparaît plus nécessaire, en fonction de la finalité du dossier. Cet effacement est ordonné par le procureur de la république, ou sur requête de l'intéressé.

#### IV-3-4 Décret du 25 mai 2004

C'est le dernier en date à légiférer à propos du fichier national informatisé des empreintes génétiques. Suite à ce décret, le champ d'application est encore élargi :

- -Aux traces biologiques issues de personnes inconnues, prélevés dans le cadre d'une enquête préliminaire, ou d'une enquête pour crime ou délit flagrant (si infraction mentionnée à l'article 706-55)
- -Aux mêmes traces biologiques prélevées dans une enquête préliminaire, s'il existe une forte probabilité qu'elles appartiennent à la personne ayant commis l'infraction.
  - -Aux échantillons biologiques prélevés sur des cadavres non identifiés
- -Aux traces biologiques issues ou susceptibles d'être issues d'une personne disparue, dans le cadre d'une enquête ou d'une instruction pour disparition inquiétante.
- -Aux échantillons biologiques prélevés, avec leur accord (recueilli par procès verbal), sur les proches (au niveau familial) d'une personne disparue, dans le cadre d'une enquête ou d'une instruction pour disparition inquiétante.
- -A toutes les personnes condamnées à plus de 10 ans de prison. Qui refuse perd droit à réduction de peine.

Le décret précise aussi les conditions d'effacement des empreintes génétiques dans le FNAEG:

-Le procureur de la République peut ordonner d'office, ou à la demande de l'intéressé, l'effacement du fichier de l'empreinte génétique.

-Si c'est l'intéressé qui fait la demande, le procureur se doit de lui donner sa réponse par lettre recommandée, dans un délai de trois mois après réception écrite de la demande d'effacement. S'il n'a pas de réponse dans ce délai, l'intéressé peut alors saisir le juge des libertés et de la détention dans un délai de 10 jours, par lettre recommandée avec avis de réception. Ce juge statue dans un délai de deux mois (par une ordonnance motivée). Si le juge ne statue pas au bout de deux mois, il est alors possible de saisir le président de la chambre d'instruction, dans un délai de 10 jours, par lettre recommandée avec accusé de réception.

-Les empreintes génétiques d'une personne disparue, ou d'un de ses proches, sont

effacées du fichier dès la réception, par le service gestionnaire du fichier d'un avis de

découverte de cette personne, sans aucun préjudice.

IV-3-5 Sécurisation du FNAEG

Toutes les hésitations quant à la création du fichier national des empreintes génétiques ne sont

pas justifiées, et il est aujourd'hui parfaitement sécurisé. Son fonctionnement a été déterminé

par des dispositions prises en conseil d'Etat le 18 mai 2000, et a été modifié par un décret le 3

mai 2002. Comme le prévoit la loi, ces décrets ont ensuite été soumis à l'approbation de la

commission nationale des libertés informatiques (CNIL), ce qui a donné lieu à deux

circulaires.

Le dispositif réglementaire d'encadrement du fichier porte sur les modalités pratiques des

analyses, la nature et le contenu des informations contenues dans le fichier, et sur les

modalités d'alimentation et de consultation du fichier.

Les personnes et les laboratoires habilités à procéder à des identifications grâce aux

empreintes génétiques ont du auparavant se soumettre à une procédure d'agrémentation. Il

existe également une norme ISO 17025 qui définit une organisation stricte permettant aux

laboratoires de garantir des résultats de qualité.

IV-3-5-1 Les modalités pratiques des analyses

Cf. tableau

100

Tableau 7 : Modalités pratiques des analyses (37)

	Fichier automatisé des empreintes digitales (FAED)	Fichier national automatisé des empreintes génétiques (FNAEG)
Création	Décret du 8 avril 1987	Loi du 17 juin 1998
Fonctionnement	Décret du 8 avril 1987	Décret du 18 mai 2000
Infractions	Tous crimes et délits	Crimes et délits énumérés à l'article 706-55 du code de procédure pénale
Données incluses	-Traces relevées - Empreintes relevées sur les personnes détenues - Empreintes relevées sur les personnes mises en cause au cours d'une procédure	-Traces biologiques relevées - Empreintes génétiques des personnes mises en cause - Empreintes génétiques des personnes définitivement condamnées
Durée de conservation des données	-25 ans après l'établissement de la dernière fiche signalétique -10 ans pour la personne ayant atteint l'âge de 70 ans	40 ans à partir de l'analyse pour les traces, et à partirde la date de la condamnation pour les individus (limitée au 80ème anniversaire)
Architecture technique	<ul> <li>-1 site central informatique</li> <li>-3 sites centraux de saisie (et de consultation)</li> <li>-14 sites régionaux de consultation (services régionaux d'identité judiciaire auprès des SRPJ)</li> </ul>	1 site central unique pour l'alimentation et la consultation (Ecully)
Origine des empreintes	Service d'identité judiciaire de la police ou d'investigation criminelle de la Gendarmerie	Experts agréés
Consentement au relevé ou au prélèvement	Non	Oui, mais le refus constitue un délit pour les personnes condamnées ou les personnes mises en cause
Traçabilité des consultations	Oui	Oui

# IV-3-5-2 La nature et le contenu des informations contenues dans le fichier

Le décret du 18 mai 2000 impose des règles très précises quant à ce contenu.

Le fichier doit contenir les résultats, sous forme numérisée, des analyses d'identification par empreintes génétiques réalisées sur des segments d'ADN non codant (sauf pour les segments correspondants au marqueur du sexe).

#### On doit retrouver également :

- -La nature de l'affaire et la référence à la procédure.
- -Le nom de l'expert qui a procédé aux analyses, ainsi que leur date de réalisation.
- -Les références du scellé du prélèvement (service qui a procédé au prélèvement et à la mise sous scellé, lieux, date et numéro du scellé).
- -Les segments d'ADN utilisés pour l'analyse, et le nom du condamné ainsi que sa date de condamnation (s'il s'agit d'un condamné).
  - -Les rapprochements effectués avec d'autres traces figurant au fichier.

Toutes ces données sont conservées pendant 40 ans à partir de l'expertise d'identification si ce sont des traces, ou à partir de la date de la condamnation définitive si c'est un condamné.

Ce décret du 18 mai 2000 fixe également la liste des segments d'ADN sur lesquels peuvent porter les analyses génétiques pratiquées aux fins d'utilisation du FNAEG.

#### IV-3-5-3 Le fonctionnement du fichier

Jusqu'au 25 mai 2004, la direction centrale de la police judiciaire du ministère de l'intérieur orchestrait le fonctionnement du FNAEG. Depuis cette date, le fichier est placé sous le contrôle d'un magistrat du parquet hors hiérarchie, nommé pour 3 ans par arrêté du garde des Sceaux. Celui-ci est assisté d'un comité de trois membres, dont un généticien et un informaticien, nommés dans les mêmes conditions (par arrêté du ministre de la Justice).

Le fichier est localisé dans un site central et unique, à Ecully (banlieue ouest de Lyon), et sa consultation n'est possible qu'après demande au procureur de la République ou au juge d'instruction.

Seuls les responsables du FNAEG n'ont pas à faire cette demande, qui est ensuite jointe au dossier. Dans tous les cas, il existe également un dispositif qui permet de retracer, par suivi informatique, la consultation du fichier.

Il est donc possible de retrouver le nom du consultant, la date, et l'objet de consultation du fichier, afin de vérifier que toutes les consultations ont bien été conformes à la réglementation.

Le magistrat, et à sa demande, les membres du comité, disposent d'un accès permanent au fichier et au site d'Ecully, et peuvent effectuer régulièrement des visites programmées ou non sur le site.

Tous les ans, l'autorité qui gère le fichier doit adresser au magistrat un rapport annuel d'activité, ainsi que toutes les informations relatives au fichier, si le magistrat le demande.

Afin de faire toutes les vérifications nécessaires, il peut également ordonner des saisies ou enregistrements d'informations, ou même l'effacement de données illicites contenues dans le fichier.

#### IV-3-6 Les problèmes d'utilisation du FNAEG

Au moment de sa création, le fichier était prévu pour recueillir environ 10 000 profils ADN par an. Suite aux extensions successives qu'il a subies, il devrait contenir entre 800 000 et 1 million de profils. Or, la réalité est toute autre, puisqu'il contient aujourd'hui environ 220000 profils ADN, dont 90 000 condamnés et 120 000 personnes mises en cause, et 10 000 rapprochements.

Les blocages rencontrés par le FNAEG sont de plusieurs types :

- -Panne de kits de prélèvements par les enquêteurs (donc pas de prélèvements sur des personnes qui auraient dues l'être)
- -Les prélèvements ne sont pas aussi systématiques qu'ils le devraient dans les prisons, du fait de la complexité des opérations à mettre en œuvre.
  - -Les formulaires à renseigner par les préleveurs seraient d'usage complexe
  - -Les laboratoires de police sont surchargés
- -Les services du FNAEG sont également débordés : 25 000 à 30 000 dossiers traités par les laboratoires sont en attente de saisine par le FNAEG. Cette « thrombose » est due à une alimentation à partir de transmissions papiers du FNAEG. A terme, l'alimentation devrait

être possible directement par informatique, ce qui suppose la mise en place de la signature électronique; ceci pose donc la question centrale du financement, car l'analyse d'un prélèvement est aujourd'hui facturée entre 100 et 150 euros par un laboratoire de police judiciaire.

Face à ces difficultés subies par le FNAEG, le ministère a lancé en 2005/2006 un vaste plan d'équipement des 5 laboratoires de police scientifique de France (Lyon, Paris, Toulouse, Lille et Marseille). Le FNAEG a bénéficié de locaux neufs, et une unité de génotypage de masse de la police nationale a également été créée à Ecully; elle permet la réalisation de 120 000 analyses génétiques par an. Son équivalent pour la gendarmerie a été installé à Pontoise, il permet la réalisation de 60 000 analyses par an. Le coût de ces travaux est estimé à 2 millions d'euros.

# IV-4 Le service central de conservation des prélèvements biologiques

Il a été crée par le décret du 18 mai 2000, qui précise également les conditions de fonctionnement du FNAEG. C'est un service de conservation centralisée des prélèvements sous scellés qui correspondent aux empreintes conservées dans le fichier.

Ce service est géré par l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale (IRCGN). Auparavant localisé au fort de Rosny sous Bois (Seine Saint Denis), il est maintenant situé à Pontoise, dans le Val d'Oise.

Il est unique en Europe.

#### **IV-4-1 Missions**

Il a pour but principal la conservation des scellés normalisés pendant 40 ans maximum, dans des conditions optimales.

Mais il assure également :

- -La formation et l'information des magistrats et des enquêteurs.
- -La recherche et le développement.
- -L'assistance technique lors des opérations de prélèvement ADN.
- -La recherche nationale et internationale.

Pour cela, le service central dispose de 2400 m², ainsi que de 11 personnes : 2 officiers et 9 sous-officiers, dont 2 détachés pour emploi au FNAEG.

#### **IV-4-2 Organisation**

#### IV-4-2-1 Cellule réception /contrôle

Cette cellule a plusieurs fonctions:

- -Réceptions des scellés ambiants par voie postale, et des scellés congelés par transporteur spécialisé.
- -Contrôle de l'intégrité physique et juridique des scellés, ainsi que de la légalité des documents d'accompagnement.
- -Gestion des anomalies repérées auprès des magistrats, des enquêteurs, ou des laboratoires.
  - -Saisie des données d'identification dans le service central.
  - -Gestion de l'expédition des scellés.

#### IV-4-2-2 Cellule gestion/stockage

Les buts de cette cellule sont :

- -L'attribution de l'emplacement de bio stockage et de cryoconservation des scellés.
- -Le stockage des scellés et l'archivage des documents d'accompagnement.
- -La gestion.
- -L'enregistrement des dossiers conformes au SCPPB et le suivi de la conservation des scellés.
  - -La destruction des scellés sur réquisition judiciaire.

Le service central de préservation des prélèvements biologiques (SCPPB) dispose de conditions de conservation inégalées à ce jour. Les techniques de stockage doivent être extrêmement rigoureuses, du fait de la fragilité de la molécule d'ADN.

Les scellés sont soit conservés à température ambiante, soit congelés, jusqu'à une température inférieure à -80° C parfois. Les conditions de luminosité, d'hygrométrie, et de température sont soumises à des contrôles réguliers et stricts, pour assurer une bonne conservation des prélèvements.

En réalité, le SCPPB a subi une évolution plutôt négative. Ceci est du au décret du 27 mai 2004, qui impose un seul prélèvement de cellules buccales (pour des raisons économiques) au

lieu de 2. De ce fait, l'alimentation du fichier est en baisse. De plus, la deuxième conséquence est que s'il ne reste plus assez de matériel génétique pour faire une autre analyse, il faudra effectuer un second prélèvement, ce qui n'est pas toujours possible. Actuellement, le SCPPB reçoit environ 100 scellés par mois.

## IV-5 Deux exemples d'application des empreintes génétiques

### IV-5-1 L'affaire Guy Georges (58)

Guy Georges est un tueur en série qui a sévi dans les années 90 en France. Il a été impliqué dans 20 affaires criminelles, dont 7 meurtres. L'affaire du « tueur de l'Est parisien », comme elle a été nommée, a affolé l'opinion, et est en partie responsable de l'aboutissement du fichage génétique.

L'histoire commence avec la première agression de Guy Georges, à l'automne 1976. La victime est une des sœurs adoptives de Guy Georges, qui a alors 15 ans.

Puis Guy Georges va agresser encore 3 femmes, avant de rejoindre Paris. Là, il doit se prostituer pour survivre, ce qui augmente sa rancœur contre la société.

Sa première agression à Paris a lieu le 16 novembre 1981 ; la jeune femme de 18 ans est violée puis laissée pour morte, mais elle survit à l'agression. Guy Georges n'est pas inquiété, l'enquête n'aboutit pas.

Après avoir passé 5 mois en prison pour vol, il recommence, toujours avec le même mode opératoire, en juin 1982. Cette fois-ci, la jeune femme parvient à s'enfuir, après avoir été violée et poignardée. Guy Georges est rattrapé par la police, et condamné à 18 mois de prison, qu'il va purger partiellement, jusqu'à ce qu'il ait la permission de sortir pour bonne conduite. Il agresse alors une autre jeune femme, en février 1984, qui parvient encore à s'échapper. Cette fois-ci, Guy Georges est condamné à 10 ans de prison.

En janvier 1991, Guy Georges, qui bénéficiait d'un régime de semi-liberté, décide de ne pas se présenter à la prison un soir, et il s'enfuit pour vivre dans des squats à Paris. C'est à cette période qu'il va tuer sa première victime. Une semaine après Guy Georges rentre à la prison, aucune question ne lui est posée.

Il est libéré en avril 1992, et récidive seulement 18 jours après sa sortie de prison. La victime s'échappe et il est condamné à 5 ans de prison, dont 2 fermes.

Libéré en 1993, il récidive et tue ou agresse plusieurs jeunes femmes, sans être inquiété par la police. Dans la capitale, le tueur est alors surnommé le « tueur de l'est parisien ».

Le 16 juin 1995, il agresse une jeune femme qui parvient à s'enfuir, mais qui le décrit dans son portrait robot comme un maghrébin, et non comme un métis. De ce fait, l'enquête piétine.

En juillet 1995, après un autre meurtre, tout ce que possède la police est un vague portait robot, une trace de pieds, et deux traces du même ADN relevées sur les scènes de crime.

Le 25 août 1995, après une agression manquée, il est reconnu et dénoncé à la police, mais il n'est pas confondu. De plus, il n'est pas reconnu par une de ses précédentes victimes, ce qui lui permet d'échapper à la comparaison des profils ADN.

Fin 1997, après son dernier meurtre, c'est la panique dans l'opinion publique. La police a enfin fait le lien entre les différentes affaires, et l'existence d'un tueur en série dans la capitale est donc avérée. Son portrait robot est diffusé, mais la recherche n'aboutit pas. Apeuré par la médiatisation de l'affaire, Guy Georges se fait discret pendant quelques mois, puis il revient à Paris. Il va se faire arrêter pour un vol, puis une bagarre, mais à chaque fois il ressort libre.

Le 24 novembre, le juge Thiel donne la mission à tous les laboratoires privés et publics de comparer l'ADN suspect masculin retrouvé sur les scènes de crime à ceux contenus dans leurs fichiers. Ce à quoi les laboratoires répondent que c'est impossible, les fichiers ADN étant interdits. A défaut, le juge leur demande de comparer l'ADN à celui contenu dans leurs archives, la réponse devant être consignée par écrit.

Le 23 mars 1998, c'est le patron du laboratoire de Nantes, Olivier Pascal qui trouve à qui appartient l'ADN. L'ADN de Guy Georges était dans le laboratoire de Nantes depuis 1995, mais à l'époque, le FNAEG n'existait pas. Pourtant, il aurait évité deux meurtres et de nombreuses agressions. Le laboratoire de Nantes avait donc comparé à la main l'ADN du tueur présumé avec les 3500 échantillons d'ADN qu'il avait dans ses archives !!!

Guy Georges fut arrêté « en douceur », à la sortie d'une bouche de métro, le 26 mars 1998.

En décembre 2000, quelques semaines avant son procès, Guy Georges tente de s'évader en compagnie de 3 autres détenus en sciant les barreaux de sa cellule, mais ils seront repris de justesse par leurs geôliers.

Lors de son procès qui débute le 19 mars 2001, il commence par nier tous les meurtres, puis finit par avouer. Il est condamné à la réclusion criminelle à perpétuité avec une période de sûreté de 22 ans qu'il continue de purger aujourd'hui.

A la suite de cette affaire, Elisabeth Guigou, qui était alors ministre de la Justice, fait voter la création d'un fichier national regroupant les empreintes génétiques (FNAEG) des délinquants et criminels sexuels condamnés et les traces retrouvées sur les victimes.

## IV-5-2 Les télomères (5)

Un télomère est une région de taille variable, située à l'extrémité d'un chromosome. Cette région est associée à des protéines, et est constituée d'ADN hautement répétitif (TTA GGG), sur une longueur de 3 à 20 kb. Une région de 100 à 300 kb relie ensuite le télomère au chromosome. Les répétitions sont très variables d'une espèce à une autre, mais elles sont toujours riches en cytosine et guanine.

Le rôle du télomère est d'assurer la protection des terminaisons chromosomiques : il empêche le chromosome de s'effilocher, et évite donc que l'extrémité de celui-ci ne soit considérée comme une rupture du double brin d'ADN, ce qui aurait pour conséquence une soudure des chromosomes par fusion de leurs télomères respectifs.

Lors d'une mitose, le complexe enzymatique de l'ADN polymérase est incapable de copier les derniers nucléotides du chromosome. Les télomères raccourcissent donc avec l'âge, mais également avec le stress et l'inflammation. Des études ont montré que ces télomères courts sont associés à un risque plus élevé de maladies liées à l'âge.

Quand le télomère devient trop court, il ne joue plus son rôle protecteur. La cellule interprète ceci comme une corruption de son ADN, entre en sénescence et stoppe sa croissance. Des télomères trop raccourcis peuvent même provoquer une fusion de deux chromosomes. De

telles altérations n'étant pas réparables dans une cellule somatique normale, elles provoquent l'apoptose de la cellule.

Les télomérases sont des enzymes transcriptases inverses spécialisées, elles assurent la synthèse et la croissance des télomères chez l'homme et la plupart des autres espèces. Ce sont les seules enzymes capables d'allonger les télomères, et elles ne sont pas actives dans les cellules somatiques. Les télomères de ces cellules se raccourcissent donc à chaque division, on dit qu'ils constituent des horloges biologiques. Au contraire, dans les cellules à multiplication intense, comme les globules blancs du sang ou les cellules souches, la télomérase est exprimée et la longueur des télomères reste constante.

La plupart des cancers produisent des télomérases, mais souvent à un stade tardif, la cancérogenèse commençant par une érosion importante des télomères (40). L'inactivation de l'activité télomérase dans les cellules cancéreuses est donc une voie de recherche très prometteuse. S'il était possible de bloquer spécifiquement cette activité, alors les cellules cancéreuses devraient perdre leur immortalité. Il devrait donc être possible de stopper, ou tout du moins de ralentir, la progression du cancer. A l'inverse, il semble possible d'augmenter l'espérance de vie en injectant ou en faisant exprimer par les cellules la télomérase. Cependant, les risques sont très importants que ces cellules se répliquent sans contrôle, entraînant l'apparition de cancers.

## CONCLUSION

Aujourd'hui, l'empreinte génétique n'est plus réalisée de la même manière que lorsqu'elle a été découverte. Les techniques ont évoluées, et de nouvelles découvertes ont permis de les améliorer. Après repérage et prélèvement de la trace, le laboratoire en charge de l'analyse extrait la trace. Puis il la quantifie, et prélève ensuite sur le support la quantité d'ADN nécessaire pour réaliser l'analyse (d'après le résultat de la quantification). Il réalise ensuite une PCR, puis une électrophorèse multicapillaire. Le résultat de l'électrophorèse est lu par un laser, et le graphique issu de cette lecture est analysé par un expert, qui répond à la question initiale (la raison du prélèvement). Les laboratoires qui réalisent cette analysent sont agréés, et leur résultat est fiable.

Depuis leur découverte par Alec Jeffreys en 1985, les empreintes génétiques se sont donc imposées comme un outil formidable. Aujourd'hui, la recherche d'un profil ADN, ou empreinte génétique est rapide et bien maîtrisée, et ce profil possède de nombreuses applications :

- En médecine légale, pour identifier un cadavre ou des restes humains.
- En criminologie, pour identifier ou disculper un suspect.
- Pour réaliser un test de paternité.
- Pour organiser un don d'organes.
- Pour étudier des populations d'animaux sauvages.
- Pour étudier l'origine de l'Homme.
- Etc....

On peut dire aujourd'hui que les empreintes génétiques sont l'outil le plus perfectionné dont disposent les policiers et les magistrats à ce jour. Leur fiabilité est assurée, mais nécessite un encadrement très strict pour éviter les dérives. Les tests génétiques sont donc soumis à des contraintes légales, dictées notamment par le comité consultatif national d'éthique, en France.

Certains pays de l'Union européenne, comme la Grande-Bretagne ou le Danemark, ne sont pas régis par les mêmes lois, et conservent la totalité de l'ADN (codant et non codant) dans leurs bases de données. Il en est de même aux Etats-Unis. La dérive, qui consiste en la

possible réalisation de portraits robots à partir de ces empreintes génétiques, est alors tentante. Cependant, il ne faut pas oublier que le fichier national des empreintes génétiques contient le profil ADN de personnes seulement suspectes. D'autre part, l'empreinte génétique n'est qu'un élément parmi d'autre lors d'une enquête. Cet élément doit donc être associé aux méthodes traditionnelles d'investigation, pour construire le faisceau de preuves qui mènera à la vérité.

Aujourd'hui, et malgré l'apparition de nouvelles techniques, comme l'odorologie, qui consiste à reconnaître les suspects par l'odeur, les empreintes génétiques ont encore un bel avenir en médecine légale.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

#### 1-AMERICAN COLLEGE OF LEGAL MEDICINE.

Legal medicine.

Philidelphia: Mosby Elsevier, 2007.

## 2-ANDERSON S, BANKIER AT, BARRELL BG et coll.

Sequence and organization of the human mitochondrial genome.

Nature 1981;290(5806):457-465.

## 3-BAR W.

DNA profiling: evaluation of the evidentiary value.

Legal Med 2003; 5: S41-S44.

## 4-BECKMAN JS et WEBER JL.

Survey of human and rat microsatellites.

Genomics 1992;12:627-631.

## 5-BROUILETTE S, MOORE J, MCMAHON A et coll.

Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study.

Lancet 2007; 369:107-114.

## 6-BUDOWLE B, MASIBAY A, ANDERSON SJ et coll.

STR primer concordance study.

Forensic Sci Int 2001;124:47-54.

## 7-CABAL C.

Valeur scientifique de l'utilisation des empreintes génétiques dans le domaine judiciaire.

http://www.senat.fr/commission/offices/office010611.html

Consulté le 13/03/2008.

## 8-CALVO, RICAUT F, KEYSER C et coll.

Etude d'ADN ancien au niveau de la pulpe dentaire de la série ostéologique de Saint Côme et Damien.

Antropol 2001; 1: 21-29.

http://www.didac.ehu.es/antropo/1/1-3/Calvo.pdf

## 9-CONSEIL DE L'EUROPE, COMITE DES MINISTRES.

L'utilisation des analyses de l'acide désoxyribonucléique (ADN) dans le cadre du système de justice.

Strasbourg: Conseil de l'Europe, Division des publications et des documents, 1993.

## 10-COQUOZ R et TARONI F.

Preuve par l'ADN : la génétique au service de la justice.

Lausanne: Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 2006.

## 11-DESMARAIS E.

Détection du polymorphisme de l'ADN : applications en biologie et médecine diagnostique épidémiologique et pronostique.

Paris: INSERM, 1995.

#### 12-DIAZ C.

La police technique et scientifique.

Paris: Presses Universitaires de France, 2000.

## 13-DOUTREMEPUICH C.

Les empreintes génétiques en pratique judiciaire.

Paris: la Documentation Française, 1998.

## 14-DOUTREMEPUICH C.

10 ans d'empreintes génétiques.

Paris: la Documentation Française, 2001.

## 15-DOUTREMEPUICH C.

Le fichier des empreintes génétiques en pratique judiciaire.

Paris: La Documentation Française, 2006.

## 16-DRANCOURT M, ABOUDHARAM G, SIGNOLI M et coll.

Detection of 400-year-old Yersinia pestis DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of an ancient septicaemia.

Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:12637-12640.

#### 17-DURIGON M.

Pratique médico-légale.

Paris: Masson, 1999.

## 18-FOWLER DB et LIMIN AE.

Cold Hardiness Expression in Interspecific Hybrids and Amphiploids of the Triticeae.

Genome 1988; **30**:361-365.

## 19-GARCIA AA, MUNOZ I, PESTONI C et coll.

Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp.

Int J Legal Med 1996;**109**:125-129.

## 20-GILL P, HOLLAND M, TULLY G et coll.

DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome short tandem repeats.

Legal Med 2001;3:252-257.

## 21-GINTHER C, ISSEL-TARVER L et KING MC.

Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth.

Nature Genet 1992; 2:135-138.

## 22-GUSMAO L, BRION M, GONZALEZ NEIRA A et coll.

Y chromosome specific polymorphisms in forensic analysis.

Legal Med 1999;1:55-60.

## 23-GUT IG.

Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms.

Hum Mutat 2001;**17**(6):475–492.

#### 24-HAMMER MF.

A recent insertion of an alu element on the Y chromosome is a useful marker for human population studies.

Mol Biol Evol 1994;**11**(5):749-761.

## 25-HANSELLE T, OTTE M, SCHNIBBE T et coll.

Isolation of genomic DNA from buccal swabs for forensic analysis, using fully automated silica-membrane purification technology.

Legal Med 2003;5:S145-S149.

#### 26-HARTL LD et W. JONES E.

Génétique : les grands principes.

Paris: Dunod, 2003.

## 27-HAUGE XY et LITT M.

A study of the origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR.

Hum Mol Genet 1993;**2**(4):411-415.

## 28-HOPWOOD A, OLDROYD N, FELLOWS S et coll.

Rapid quantification of DNA samples extracted from buccal scrapes prior to DNA profiling. BioTechniques 1997;**23**:18-20.

## 29-HUCHON D, NIKAIDO M et OKADA N.

Éléments mobiles SINE en phylogénie.

Med Sci 2002;18:1276-1281.

## 30-IIDA R et KISHI K.

Identification, characterization and forensic application of novel Y-STRs.

Legal Med 2005;7:255-258.

## 31-JARMAN AP et WELLS RA.

Hypervariable minisatellites: Recombinators or innocent bytanders?

Trends Genet 1989;5:367-371.

#### 32-JEFFREYS AJ.

Minisatellites and V.N.T.R.

Nature 1985;314:67-73.

## 33-JOBARD F et SCHULZE-ICKING N.

Preuves hybrides : l'administration de la preuve pénale sous l'influence des techniques et des technologies (France, Allemagne, Grande-Bretagne)

Etudes et données pénales 2004; n°96

## 34-KAPLAN JC.

Biologie moléculaire et médecine.

Paris: Flammarion, 1990.

## 35-KARLIN S et BURGE C.

Dinucleotide relative abundance extremes: a genomic signature.

Trends Genet 1995;11:283-290.

## 36-KAYSER M, CAGLIA A, CORACH D et coll.

Evaluation of Ychromosomal STRs: a multicenter study.

Int J Legal Med 1997;**110(3**):125-133, 141-149.

## 37-LEFUR M.

Rapport d'information sur le fichier national automatisé des empreintes génétiques.

http://www.assemblee-nationale.fr/12/rap-info/i0504.asp

Consulté le 13/03/2008.

## 38-LERICHE A, VANEK D, SCHMITTER H et coll.

Final report on the INTERPOL European Working Party on DNA Profiling. Proceedings from the  $2^{nd}$  European Symposium on Human Identification.

Promega Corporation 1998; 48-54.

## 39-LITT M, HAUGE X et SHARMA V.

Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures.

Biotechniques 1993;5(2):280-284.

#### 40-LONDONO-VALLEJO JA.

Telomere instability and cancer.

Biochimie 2007;90:73-82.

## 41-LONGET F A.

Traité de physiologie.

Harvard: Victor Masson et fils, 1861.

## 42-LUDES B.

Les empreintes génétiques en médecine légale.

Paris: Editions Médicales Internationales, 1992.

## 43-LUDES B.

DNA fingerprinting from tissues after variable post mortem periods.

J Forensic Sci 1993a;38:689-690.

#### 44-LUDES B.

Genetic fingerprinting, methods, indication, legal and ethic aspects.

Rev Prat 1993b;43:1035-1038.

## 45-MAC NEVIN D, WILSON WILDE L, ROBERTSON J et coll.

Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair. Part 1 Review of of current status and knowledge gaps.

Forensic Sci Int 2005;**153**(2/3):237-246.

## 46-MAILLET-BARON L et SOUSSI T.

Séquençage des acides nucléiques.

Paris: Editions Médicales Internationales, 1992.

## 47-MORNET E.

Méthodes d'analyse de l'ADN: Applications médicales et médico-légales

http://www.sesep.uvsq.fr/formation/methodes.html

Consulté le 10/09/2008

## 48-NIEDERSTATTER H, KOCHL S, GRUBWIESER P et coll.

A modular real-time PCR concept for determining the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial DNA.

Forensic Sci Int 2007; Genetics 1:29-34.

## 49-OHIRA H et YAMADA Y.

Advantages of dental mitochondrial dna for detection and classification of the sequence variation using restriction fragment length polymorphisms.

Am J Forensic Med Pathol 1999;20:261-268.

## 50-PASCAL O.

Empreintes génétiques : pourquoi et pour qui ?

Med Droit sept-oct 1998;32:1-5.

## 51-PETKOVSKI E.

Polymorphismes ponctuels de séquence et identification génétique.

Thèse: Doctorat: Sciences du vivant, Strasbourg 1, 2006.

## 52-PFEIFFER H, HUHNE J, SEITZ B et BRINKMANN B.

Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth.

Int J Leg Med 1999;**112**:142-144.

## 53-PIETTE et GOLDBERG.

La dent normale et pathologique. 1<sup>ère</sup> ed.

Bruxelles: De Boeck Université, 2001.

## 54-RAOULT D, ABOUDHARAM G, CRUBEZY E et coll.

Molecular identification by "suicide PCR" of Yersinia pestis as the agent of medieval black death.

Proc Nat Acad Sci USA 2000;97:12800-12803.

## 55-ROEWER L, KRAWCZAK M, WILLUWEIT S et coll.

Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes.

Forensic Sci Int 2001;**118**(2/3):106-13.

## 56-ROUGER P.

Les empreintes génétiques.

Paris: Presses Universitaires de France, 2000.

## 57-SANS AUTEUR.

Encyclopedia universalis.

http://www.universalis.fr

## 58-SANS AUTEUR.

Guy Georges.

http://tueursenseries.org

## 59-SANS AUTEUR.

La cavité buccale.

http://histoblog2.joueb.com

## 60-SANS AUTEUR.

The power links of the mitochondriologist focusing on human mitochondrial genetics.

http://pimm.wordpress.com

## 61-SANS AUTEUR.

Wikipedia.

http://fr.wikipedia.org

## 62-SCHNEIDER PM.

Scientific standards for studies in forensic genetics.

Forensic Sci Int 2007;**165**(2/3):238-243.

#### 63-SCHNEIDER PM et MARTIN PD.

Criminal DNA databases: the european situation.

Forensic Sci Int 2001;119(2):232-238.

## 64-SCHWARTZ T, SCHWARTZ E, MIESZERSKI L et coll.

Characterisation of desoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environnemental conditions.

J Forensic Sci 1991:36:979-990.

## 65-SERRE JL.

Les diagnostics génétiques.

Paris: Dunod, 2002.

## 66-SIVAGAMI AV, RAJESWARAO A et VARSHNEY U.

A simple and cost-effective method for preparing DNA from the hard tooth tissue, and its use in polymerase chain reaction amplification of amelogenin gene segment for sex determination in an indian population.

Forensic Sci Int 2000;110:107-115.

## 67-SWEET D, LORENTE JA, VALENZUELA A et coll.

An improve method to recover saliva from human skin: the double swab technique.

J Forensic Sci 1997;42:320-322.

## 68-TEN CATE A.

Oral histology.

St Louis: Mosby, 1989.

## 69-TOUCHERON-DORANGE C.

Polymorphisme du chromosome Y : applications à la médecine légale.

Thèse : Diplôme d'état de docteur en pharmacie, Nantes, 2000.

## 70-TURNER PC.

L'essentiel en biologie moléculaire.

Paris: Berti, 2000.

#### 71-UMETSU K et YUASA I.

Recent progress in mitochondrial DNA analysis.

Legal Med 2005;7:259-262.

## 72-WALSH DJ.

Isolation of DNA from saliva and forensic science samples containing saliva.

J Forensic Sci 1992;37:387-395.

## 73-WATSON J, BERRY A et HOCHSTEDT B.

ADN le secret de la vie.

Paris: Odile Jacob, 2003.

## 74-WATSON J, GILMAN M, WITKOWSKI J et ZOLLER M.

ADN recombinant.

Bruxelles: De Boeck-Wesmael, 1994.

## 75-WILLOTT GM et ALLARD JE.

Spermatozoa: their persistance after sexual intercourse.

Forensic Sci Int 1982;19:133-154.

## 76-WOODWARD SR, KING MJ, CHIU M et coll.

Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. PCR Methods and amplification.

Technical Tips 1994;3:244-247.

## 77-WURMB SCHWARK N, MALYUSZ V, FREMDT H et coll.

Fast and simple DNA extraction from saliva and sperm cells obtained from the skin or isolated from swabs.

Legal Med 2006;8:177-181.

## **ANNEXES**

## Autorisation de reproduction

## Figures 27 et 30

Bonjour,
<b>3</b> /
Etudiante en chirurgie dentaire à Nantes, je réalise actuellement ma thèse sur les empreintes
génétiques en médecine légale. M'autorisez-vous à y faire figurer quelques images de votre
site (2 images pour être précise)? Merci d'avance de votre réponse.
Soléna Loistron
solena.loistron@laposte.net
Bonjour,
Bonjour,
Aucun problème et bon courage pour la thèse.
E. Mornet
etienne.mornet@cytogene.uvsq.fr

## **GLOSSAIRE**

#### ADN nucléaire

ADN situé dans le noyau de la cellule. C'est une molécule en forme de double hélice, constituée d'un squelette de sucres phosphatés et de séquences de paires de bases. Certaines séquences d'ADN constituent les gènes.

#### **ADN** mitochondrial

ADN situé dans les mitochondries, de forme circulaire.

#### Allèles

On appelle « allèle » les différentes versions d'un même gène. Tous les allèles occupent le même locus sur un même chromosome.

#### Amorce

Courte séquence d'ADN servant de matrice pour la synthèse d'un nouveau brin d'ADN par une polymérase.

## **Crossing-over**

Echange réciproque de matériel génétique entre chromosomes homologues, survenant en général au moment de la méiose au niveau des chiasmas. C'est ce mécanisme qui est responsable des recombinaisons génétiques.

## Electrophorèse

Procédé au cours duquel un mélange de molécules est soumis à un champ électrique, le déplacement de chaque molécule étant fonction de sa charge. Cette technique permet de classer les différentes molécules d'un mélange selon leur taille.

## Enzymes de restriction

Endonucléases bactériennes clivant spécifiquement les deux brins de l'ADN au niveau d'une séquence parfaitement définie, appelée site de restriction.

## Homozygote

Lorsque deux chromosomes d'une même paire portent deux gènes semblables au même emplacement.

## Hétérozygote

Lorsque deux chromosomes d'une même paire portent deux gènes dissemblables au même emplacement.

#### Locus

Emplacement précis et invariable d'un chromosome. Un locus peut contenir un gène, mais pas nécessairement. Le pluriel du mot « locus » est « loci ».

#### Mitose

Division de base des eucaryotes, qui permet d'obtenir deux cellules filles à partir d'une cellule mère.

## Polymorphisme de restriction

Variation individuelle de la séquence en bases du génome des eucaryotes, modifiant un ou plusieurs sites de restriction. Elle donne lieu à des RFLP (variation de la taille des fragments ADN obtenus avec une enzyme de restriction donnée).

## **Stringence**

C'est un terme dérivé de l'anglais, utilisé pour désigner la plus ou moins grande exigence des conditions expérimentales d'hybridation.

La stringence correspond donc aux conditions expérimentales de température, de PH et de force ionique permettant l'hybridation moléculaire. Des conditions très stringentes (T° élevée, concentration en Na+ faible) rendent l'hybridation moléculaire plus difficile mais permettent une hybridation spécifique, tandis que des conditions peu stringentes (T° plus faible, concentration en Na+ plus élevée) permettent une hybridation moins spécifique.

#### Stutter

Produit secondaire inévitable de l'amplification de séquences répétitives par PCR, apparaissant comme un allèle possédant un élément répétitif de moins que l'allèle réellement présent dans l'échantillon.

# Liste des figures

Figure 1 : Guanine	9
Figure 2 : Adénine	9
Figure 3 : Cytosine	10
Figure 4 : Thymine	10
Figure 5 : Pentose	
Figure 6 : Acide phosphorique	
Figure 7 : Schéma du nucléotide	12
Figure 8 : Liaison adénine-thymine	
Figure 9 : Liaison cytosine-guanine	
Figure 10 : Structure tertiaire de l'ADN	16
Figure 11 : Schéma des chaînes d'ADN	17
Figure 12 : loci à rechercher pour réaliser une empreinte génétique	24
Figure 13 : Exemple de minisatellite	
Figure 14 : Exemple de microsatellite répété en tandem	
Figure 15 : Schéma du chondrome (60)	29
Figure 16 : Schéma récapitulatif des caractéristiques du génome humain	32
Figure 17 : Schéma d'une dent en coupe (59)	36
Figure 18 : visualisation de traces de sang grâce au bluestar	41
Figure 19 : visualisation d'une tache grâce au crimescope	43
Figure 20: Incision vestibulaire (21)	50
Figure 21: Incision palatine (21)	50
Figure 22 : Molaire supérieure sectionnée (21)	
Figure 23 : Coupure à extrémités cohésives	55
Figure 24 : Coupure à bouts francs	55
Figure 25 : Bac à électrophorèse	60
Figure 26 : Exemple de résultat d'électrophorèse	
Figure 27 : Schéma du transfert par la méthode de Southern (47)	63
Figure 28 : Résultat d'une électrophorèse par sonde monolocus	70
Figure 29 : Résultat d'une électrophorèse par sonde multilocus (ou empreinte génétique)	70
Figure 30 : La variation de température pendant un cycle de PCR (47)	74
Figure 31 : Explication des cycles de la PCR	
Figure 32 : Méthode de PCR par la sonde « Taq Man »	
Figure 33 : Comparaison entre PCR et Real-time PCR	81
Figure 34 : électrophorégramme	84

## Liste des tableaux

Tableau 1: Composition de la salive (61, 68)	46
Tableau 2 : Les enzymes de restriction les plus couramment utilisées (42)	57
Tableau 3 : Les principales sondes uniloculaires utilisées en médecine légale (42)	66
Tableau 4 : Comparaison des statistiques des sondes uni- et multiloculaires (42)	67
Tableau 5:Evolution des lois concernant le refus de prélèvement	87
Tableau 6 : Introduction des bases de données nationales d'ADN en Europe (63, 15)	95
Tableau 7 : Modalités pratiques des analyses (37)	101

N°

**LOISTRON Soléna** – Les empreintes génétiques en médecine légale : réalisation, législation.

126f., 34 ill., 7 tabl., 30 cm, 77ref.-(Thèse : Chir. Dent.; Nantes; 2009). N°

## Résumé:

Apparues dans les années 80, les empreintes génétiques ont depuis énormément progressé, et occupent aujourd'hui une place prépondérante dans le domaine de l'identification des personnes.

Elles sont réalisées dans un premier temps par l'extraction, la purification et la quantification de l'ADN. Dans un deuxième temps, cet ADN est soumis à une PCR, puis à une électrophorèse, afin d'obtenir l'empreinte génétique de l'individu auquel il appartient.

Les empreintes ADN sont très utiles aux enquêteurs. A ce titre, elles se doivent d'être encadrées par une législation stricte, sous peine de dérives, notamment du point de vue éthique.

<u>Rubrique de classement</u> : Médecine et odontologie médico-légales.

<u>Domaine Bibliodent</u>: Odontologie légale.

Mots clés Bibliodent : ADN – Génétique – Identification – Odontologie légale.

Mots clés MeSH: ADN - Génétique – Chromosomes – Législation

DNA – Genetics – Chromosomes – Legislation

Jury:

<u>Président</u>: Monsieur le Professeur O.LABOUX <u>Assesseurs</u>: Madame le Docteur B.LICHT

Madame le Docteur B.ENKEL

<u>Directeur</u>: <u>Monsieur le Docteur G.AMADOR DEL VALLE</u>

Adresse de l'auteur :

13, Square du Grand Servial 49000 Angers

solena.loistron@laposte.net