

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel



BC.23/07

02
02

Faculté des Sciences
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire

de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures
(D.E.S)

Option : Biochimie

Thème :



Empreintes génétiques et leurs applications

Membres de jury :

Encadreur : RECHRECHE Hocine

Examineur : OUMEDOUB Abdelkader



présenté par :

BOUNAR Merieme

MAHRANE kenza

SAMAR Imene

Promotion-Juin 2007

Table de matière

CHAPITRE I: INTRODUCTION.....1

CHAPITRE II : Etablissement des empreintes génétiques.

II . 1 - Historique.....	4
II . 2 - Notions générales.....	5
II. 2. 1- Polymorphisme de l'ADN.....	5
II.2.1.1- polymorphisme de l'ADN nucléaire et ADN satellites.....	5
II.2.1.2- Polymorphisme de l' ADN mitochondrial.....	7
II . 3 - Mise en œuvre des empreintes génétiques.....	8
II. 3. 1- Préparation de l'ADN à analyser.....	8
II. 3. 2- Analyse de l'ADN nucléaire.....	9
II.3.2.1- Sondes polylocus.....	10
II.3.2.2- Sonde monolocus.....	11
II.3.2.3- Technique RFLP	12
II. 3.2.4-Technique de PCR.....	13
II. 3. 3- Analyse de l'ADN mitochondrial.....	15
II. 3 . 4- Précaution à prendre.....	15
II. 3. 5- Interprétation des résultats.....	16

CHAPITRE III: Applications des empreintes génétiques

III . 1 - Identification des individus.....	18
III. 1. 1- Recherche d'identité.....	18
III. 1. 2- Identification des cheveux.....	19
III. 1. 3- Identification des cadavres.....	19
III. 1. 4- Résolution des problème criminalistiques	20
III . 2 - Ribotypage.....	21
III . 3 - Identification des agroaliments.....	22
III. 3. 1 - Identification des plantes.....	22



III. 3 . 2-	Traçabilité et détection des organismes génétiquement modifiés.....	23
III. 4 -	Le suivie de greffe de moelle osseuse dans le domaine médicale.....	24
III. 5 -	En médecine légale	25
III. 5 . 1-	Recherche de paternité et maternité	25
III. 5 . 2-	Recherche de parenté biologique.....	26
III. 6 -	Domaine archéologique.....	27
<u>Chapitre IV</u> :	Discussion et Conclusion	29

Chapitre I

I. Introduction

Au croisement de la Génétique, de la Biochimie et de la Physique, la Biologie Moléculaire est une expression qui en elle-même n'a pas grande signification, mais qui est maintenant consacrée par l'usage, et que l'on utilise dans le sens de Biologie des gènes, leur expression, et le contrôle de cette dernière [Etienne, 1999].

L'expression «Génie Génétique» est due à Monod, en novembre 1973, les pionniers Cohen, Chang, Boyer et Helling résumèrent en ces termes cette expression: le transfert artificiel par un vecteur d'un gène d'un organisme à un autre d'une autre espèce, avec la possibilité de répllication et d'expression, le gène étant prélevé ou synthétisé. Il y a donc opération, manœuvre, on pourrait dire chirurgie sur le matériel génétique des microorganismes, végétale ou animal. Le Génie Génétique désignait toutes les techniques, et manipulations de recombinaison de l'ADN et représente donc l'application technologique des connaissances de la Biologie Moléculaire [Scribon, 1999].

En dehors des méthodes analytiques classiques et évolutives de la Biochimie, les découvertes successives en Biologie Moléculaire depuis près de cinquante ans, ont été liées étroitement à la mise au point de nouvelles techniques de plus en plus sophistiquées, les chercheurs utilisent des méthodes spécifiques pour évaluer cette science, parmi ces techniques on trouve, l'amplification génique ou réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui est l'une des plus importantes révolutions technologiques, qui a valu à son auteur, Kary Mullis, le prix Nobel de médecine en 1993 [Salmon, 1998], il combine ces procédés de plus en plus avec celles-ci de la Génétique et de la Biochimie; il n'y a pas de frontière bien définie entre ces disciplines, bien qu'il y en ait eu à une certaine époque. L'essentiel du travail en Biologie Moléculaire est quantitatif, et récemment, beaucoup de travaux ont été faits [Bernot, 1999], juste après la découverte de l'acronyme ADN, qui désigne une macromolécule, d'acide désoxyribonucléique, dont on a dit qu'elle était l'unité de base de la vie, l'empreintes génétiques du corps. Cette molécule est présente dans le noyau de la quasi-totalité des cellules à l'exception des globules rouges ainsi que dans les mitochondries. L'expertise génétique se concentre prioritairement sur l'ADN nucléaire, par contre l'ADN mitochondrial peut également, fournir des informations utiles bien que moins discriminantes [Moulessoul, 2004].

L'ADN est une molécule constituée de deux brins associés par des liaisons hydrogènes assurent la cohésion du double brin; chaque brin résulte d'un ensemblage linéaire de quatre nucléotides, d'où il est composé d'une base azoté (respectivement adénine, guanine, cytosine, ou thymine), d'un sucre (désoxyribose) et d'un groupement phosphate. L'usage à consacrer l'utilisation des lettres A, C, G et T; l'ordre des bases sur la chaîne linéaire de nucléotides formant l'ADN qui constitue sa séquence nucléotidique, qui est complète d'une cellule humaine formant le génome déroulé mesure 1,80 mètre et comporte environ 3 milliards de nucléotides (fig.1) [Josué, 1998].

On hérite de son ADN au moment de la conception, L'ovule fécondé renferme cette molécule provenant du spermatozoïde du père et de l'ovule de la mère. L'ADN est donc identique dans chaque cellule, quelque soit la partie du corps où il se trouve et il reste essentiellement le même de la conception jusqu'à la mort. De structure bicaténaire, l'ADN s'organise, dans les cellules somatiques, en vingt trois paires de chromosomes hérités de la mère et du père dont vingt deux paires de chromosomes homologues et deux hétérochromosomes sexuels (génotype XX chez la femme, XY chez l'homme) [karp, 1997].

La science a des horizons illimités, surtout s'il s'agit de découvrir les secrets et les mystères de la vie. La Biologie Moléculaire est une science qui connaît une évolution incomparable et répondait aux besoins de la vie moderne et de sa complexité. Jadis, la terre a était très peu peuplée, se reconnaissent entre eux grâce aux liens familiaux, mais maintenant elle est plus encombrée de plus de 6 milliards habitants, ce qui rend leurs reconnaissances difficile, et tout cela ouvre les grands portes en face aux crimes à travers le monde entier. Aujourd'hui, et grâce au développement de la biotechnologie, il est très possible d'identifier des personnes à partir d'une nouvelle technique nommées empreintes génétiques, et avant sa découverte il existait les empreintes digitales et vocales, qui mènent à un grands bruits, et permet d'arrêter les criminels d'une part et la détermination de leurs identités de l'autre part, à partir des traces trouvées sur la scène de crime, même si elle est de faible quantité comme une goutte de sang, salive, cheveux ou de sperme dans un cas de viol sexuel. L'utilisation des empreintes génétiques peut servir à autres domaines différents et variés, parmi ces domaines on trouve la

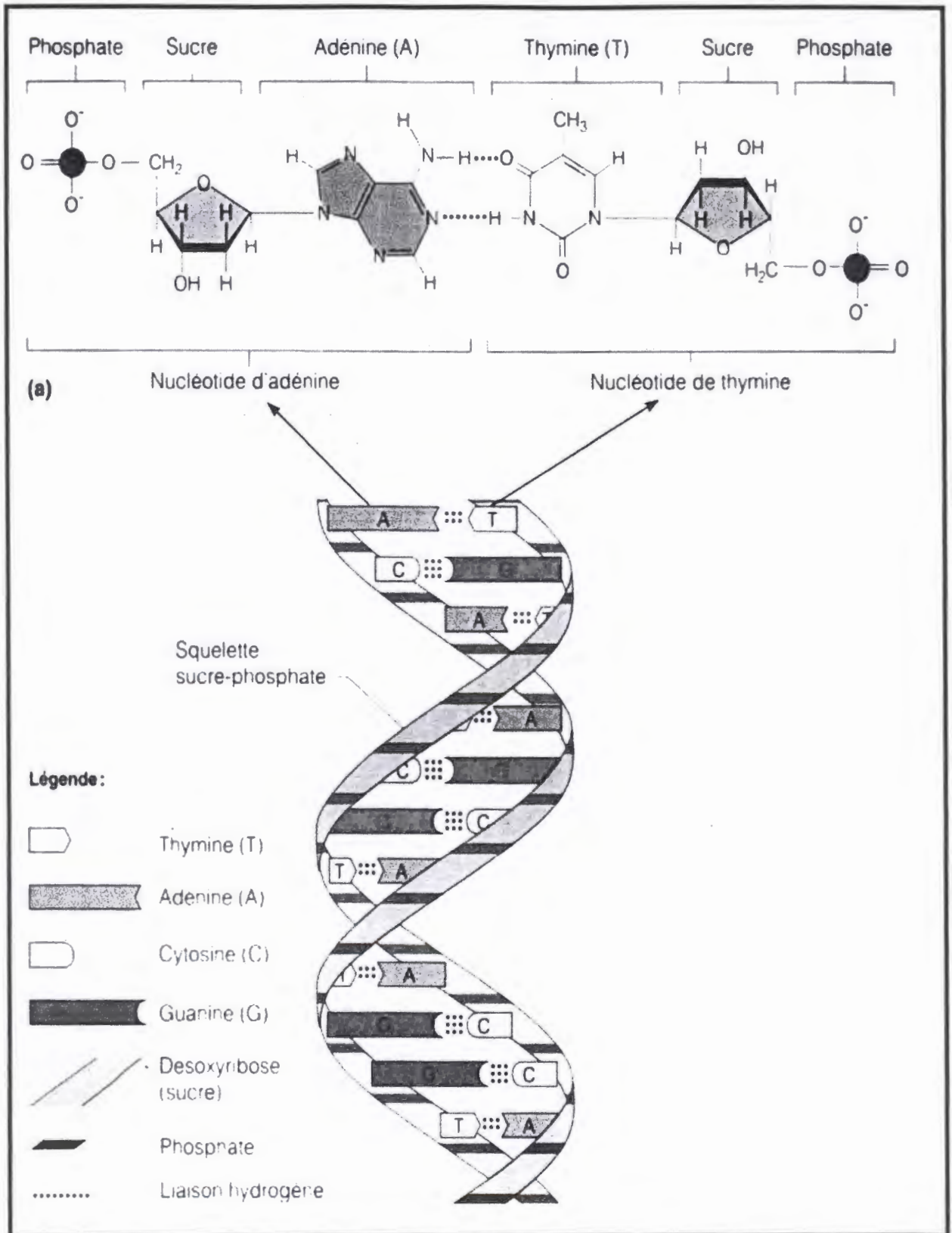


Figure 1 : Structure moléculaire de l'ADN

recherche de paternité, maternité, parenté biologique qui peut être serviable dans les cas des accidents et catastrophes naturelles.

Nous ne prétendons pas en ces quelques pages de ce rapport répondre à toutes les questions que pose cette biotechnologie. Notre intention se limite à établir un constat, et à tenter d'apporter le plus objectivement possible, des éléments de réponses. Notre travail est organisé en cinq chapitres qui s'intitulent successivement : introduction, établissement des empreintes génétiques, leurs applications, discussion et enfin une brève conclusion.

Chapitre II

II- Etablissement des empreintes génétiques

II.1- Historique

Les empreintes génétiques n'ont pas encore trenté ans d'existence, les années 1980 étaient d'abord le temps des sondes polylocus, en qui ont révélé globalement les empreintes de plusieurs gènes, ces sondes permis de réaliser pour la première fois une photographie moléculaire d'un individu. L'existence du polymorphisme peut être révélé par la technique dite southern blot, mise au point par l'anglais « southern » en 1975. Cependant ces marqueurs sont peut performant pour la réalisation d'empreintes génétiques [Salmon, 1998].

Dès le début des années 1980, les premiers polymorphismes de l'ADN ont été mis en évidence. Il s'agissait de changement d'un seul nucléotide créant ou abolissant un site de coupure pour une enzyme dite de restriction .Ces enzymes issus de bactéries dont il existe une très grande variété, reconnaissent une courte séquence d'ADN de 4 à 8 bases généralement, et coupe l'ADN à ce niveau. On parle communément de polymorphisme de restriction. Ce polymorphisme est caractériser par les deux formes ou allèles possible que peut prendre la séquence d'ADN considérer : puisque les deux brin de l'ADN existe : un allèle sera reconnu et coupé par l'enzyme de restriction l'autre ne le sera pas. L'existence du polymorphisme, peut être révélé par la technique du southern blot mise au point par l'anglais southern en 1975. Cependant ces marqueurs sont peu performants pour la réalisation d'empreintes génétiques. Au milieu des années 80 d'autres marqueurs polymorphes, appelés des minisatellites ont été découverts, c'est Alec Jeffreys de l'université d'oxford qui fut le premier à utiliser les minisatellites pour créer des empreintes génétiques, il est désormais considéré comme le père des empreintes génétiques.

Vers la fin des années 1980, la découverte d'un nouveau type de polymorphisme, les microsatellites, couplée à l'utilisation d'une nouvelle technique révolutionnaire, la PCR qui a permi une nette avancée pour la réalisation d'empreintes

génétiques. Dans les années 1990, une superbe invention technologique de la PCR amène le temps des amorces, permettant l'amplification artificielle des gènes et révolutionnant les capacités d'analyse de leur polymorphisme [Salmon, 1998].

II.2- Notions générales

II.2.1- Polymorphisme de l'ADN

La séquence complète de l'ADN d'une cellule humaine formant le génome déroulé mesure 1,80 mètre et comporte environ 3 milliards de nucléotides. La théorie généralement acceptée veut qu'il n'y ait pas, à l'exception des jumeaux homozygotes, deux personnes porteuses du même ADN. Mais il serait beaucoup trop long et coûteux de procéder, pour l'établissement d'une comparaison, à l'examen de la totalité de la chaîne contenue dans une cellule. Il convient donc de s'appuyer sur les ressources offertes par le polymorphisme de l'ADN [Rouger, 2000].

Un polymorphisme est l'existence de deux allèles ou plus à un locus dans une population; il peut exister au minimum à trois niveaux: chromosome, gène, ou longueur de fragment de restriction. Le polymorphisme de séquence d'ADN peut être aussi simple qu'une simple différence de nucléotide (connu sous le nom de SNP pour le polymorphisme simple de nucléotide), ou une insertion, ou une suppression d'un nombre des nucléotides. L'un ou l'autre de ces types de polymorphisme peut mener à des différences dans les capacités des enzymes de restriction d'identifier et de couper un site spécifique. Mais celui de longueur de fragment de restriction reste le plus utile dans l'établissement d'une empreinte d'ADN; un système allélique est d'autant plus utile qu'il possède une informativité sur la transmission des allèles de génération en autre (tab.1)[Rossignol, 2000].

II.2.1.1- Polymorphisme de l'ADN nucléaire et ADN satellite

Pour 10 à 20 %, la molécule d'ADN est constituée par les gènes qui sont le support de l'information génétique. Ces unités codantes sont transcrits lors de la

	SNP (RFLP)	VNTR (Minisat) [Variable Number of Tandem Repeat]	STR (Microsat) [Short Tandem Repeat]
Polymorphisme	De substitution, Déletion/insertion	de répétition >10nucléotides	de répétition 1 à 5nucléotides
Marqueur génétique	Biallélique	Multiallélique	Multiallélique
Informativité	+	+++	+++
Détection	Southern PCR (hybridation, RFLP)	PCR Southern	PCR uniquement

Tableau1. Utilité des différents polymorphismes dans l'établissement des empreintes d'ADN

transcription en produits finaux (ARNt et ARNr) ou intermédiaires (ARNm) qui seront à leur tour traduits en polypeptides lors de traduction. En revanche, la plus grande partie (90 à 95 %) de l'ADN nucléaire ne commande directement aucune synthèse protéique et l'on ignore actuellement sa fonction précise. Dans cette partie non codante, l'analyse a mis en évidence des régions variables: il s'agit de segments d'ADN satellitaire [Etienne, 1999].

Le terme d'ADN 'satellite' est justifié par le fait que ceux-ci ont été isolés pour la première fois; par une technique de purification de l'ADN, consiste à procéder à une centrifugation à très grande vitesse (ultracentrifugation) dans une solution de chlorure de césium. Les fragments d'ADN présents dans la solution migrent jusqu'au niveau de région du tube qui correspond à leur propre densité. Celle-ci est d'autant plus forte que l'ADN est riche en C-G. On obtient un pic principal correspondant à la masse de l'ADN ordinaire et plusieurs petits pics de densités différentes du reste de l'ADN, en raison de leur faible teneur en C-G, appelées satellites [Rossignol, 2000]. Ces ADN satellites consistent en courtes séquences, de longues d'environ 5 à 100 paires de bases, répétés un grand nombre de fois pour former de grands ensembles qui contiennent jusqu'à 10 millions de paires de bases d'ADN. Les satellites sont dispersés dans le génome d'une espèce donnée et leur nombre varie selon l'espèce; par exemple, la *drosophila virilis* possède trois séquences satellites différentes, chacune longue de sept nucléotides. Parallèlement, l'ADN génomique humain contient types différents de séquences satellitaires représentés par trois pics autour du pic principal lors de l'ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium, deux légers (I et III) et un lourd (II) - comme le montre la figure 2. On a prouvé maintes fois, en utilisant l'hybridation, que les ADN satellites sont localisés dans les centromères des chromosomes. Cependant, en dépit de plus de vingt ans de recherche, leur rôle n'est pas encore clarifié [Josué, 1998].

La taille de ces satellites, ou allèles, varie en fonction du nombre de répétitions, constituant une série d'allèles. Ces zones se transmettent selon le mode Mendélien: l'enfant reçoit un allèle de son père et un allèle de sa mère. Par exemple

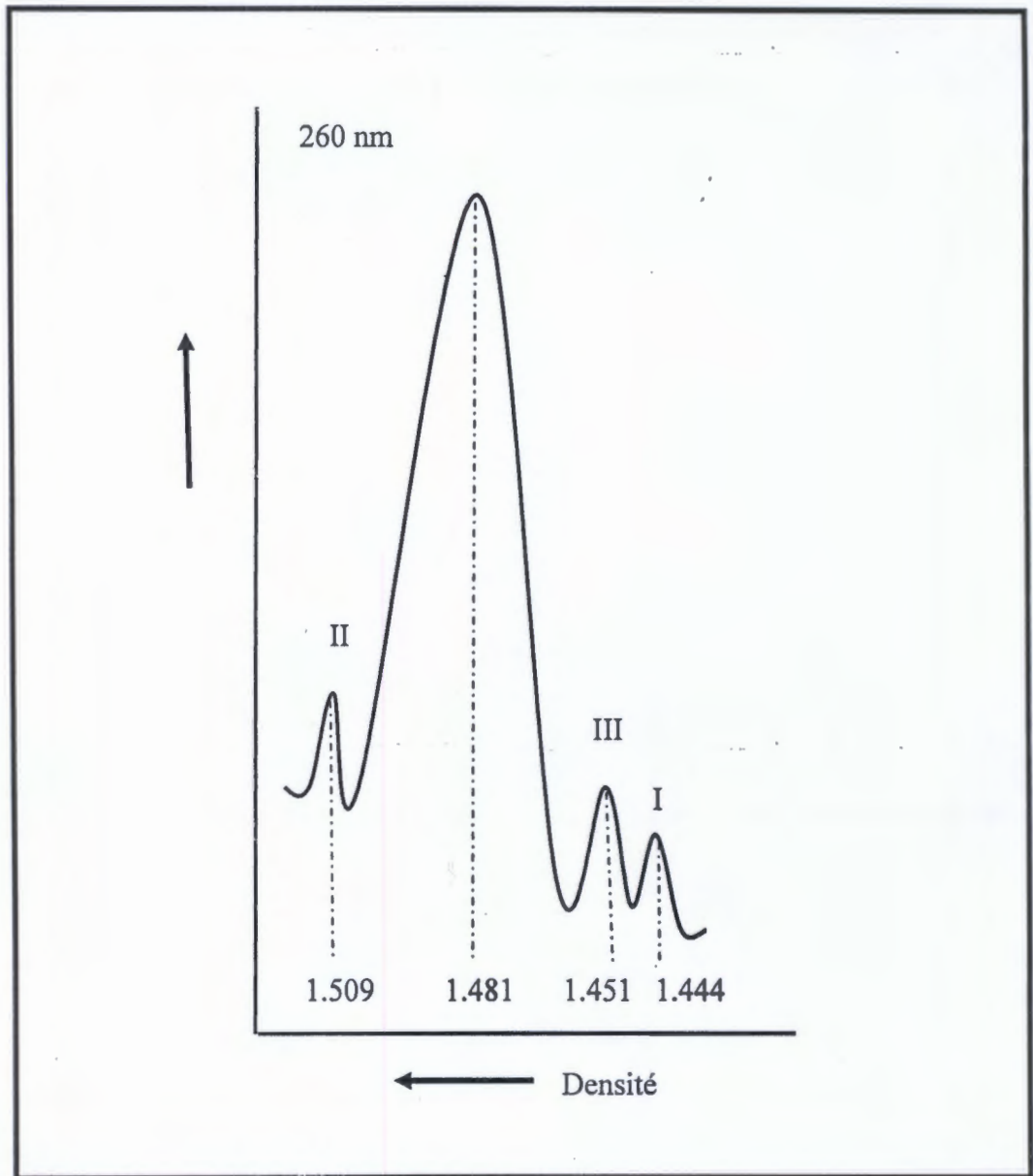


Figure 2. Résultats d'une ultracentrifugation dans un gradient de densité de chlorure de césium d'une solution d'ADN humain satellites de l'homme. La quantification des différents pools par mesure de l'absorbance à 260 nm, on constate la présence de trois pics autour du pic principal, représentant trois types d'ADN satellitaires humains : deux pics satellitaire légers (I et II) et pic lourd (II).

l'individu X_a , dans un locus, hérité de son père, une séquence satellite répétée trois fois; et il a dans ce même locus hérité de sa mère la même séquence, mais elle sera répétée un nombre de fois différent, par exemple douze fois (fig.3). Des études récentes considèrent que nous aurions 1500 zones de ce type, soit 1 500 systèmes de polymorphisme. On distingue ainsi deux types de polymorphisme (tab.2) :

Les minisatellites sont constitués de séquences de 20 à 70 nucléotides, appelées cores, répétés selon les individus: $(CAGCATCAGGTT)_n$. Ce sont des variations du nombre de répétition en tandem qui justifient leur appellation de VNTR (variation of number repeats) [Salmon, 1998.]. A titre d'exemple, la séquence correspondant à un allèle du minisatellite CEB310 (chromosome 22) est présentée dans la figure 4 avec les séquences flanquantes. Les microsatellites ou STR (Short Tandem Repeats), ils sont des séquences d'ADN constituées de répétitions d'un petit motif (core) de 2, 3 ou 4 bases: $(CA)_n$. Ce type de séquence, très fréquent dans l'ADN de toutes les espèces animales et végétales, présente une variabilité élevée entre variétés (différences au niveau du nombre de répétitions du motif) (fig.5). Des centaines de microsatellites ont été étudiés mais, peuvent seuls être retenus pour la pratique des empreintes génétiques ceux qui sont aisément amplifiables avec une expression simple des allèles, présentent un fort taux d'hétérozygotie et expriment un nombre d'allèles suffisamment élevé [Rossignol. 2000, kawchuk, lynch et coll. 1996].

II.2.1.2- Polymorphisme de l'ADN mitochondrial ou Polymorphisme de structure

L'ADN mitochondrial présent dans le cytoplasme, peut également être utilisé pour l'expertise génétique: il s'agit d'une petite molécule circulaire et monocaténaire de 15569 PB qui codent pour des chaînes polypeptidiques nécessaire pour le fonctionnement de la mitochondrie et pour des ARN. Sa séquence est entièrement connue et elle présente deux régions hypervariables. Le polymorphisme n'est pas lié ici à des variations de longueur mais à des variations dans la composition en nucléotides (polymorphisme de structure).

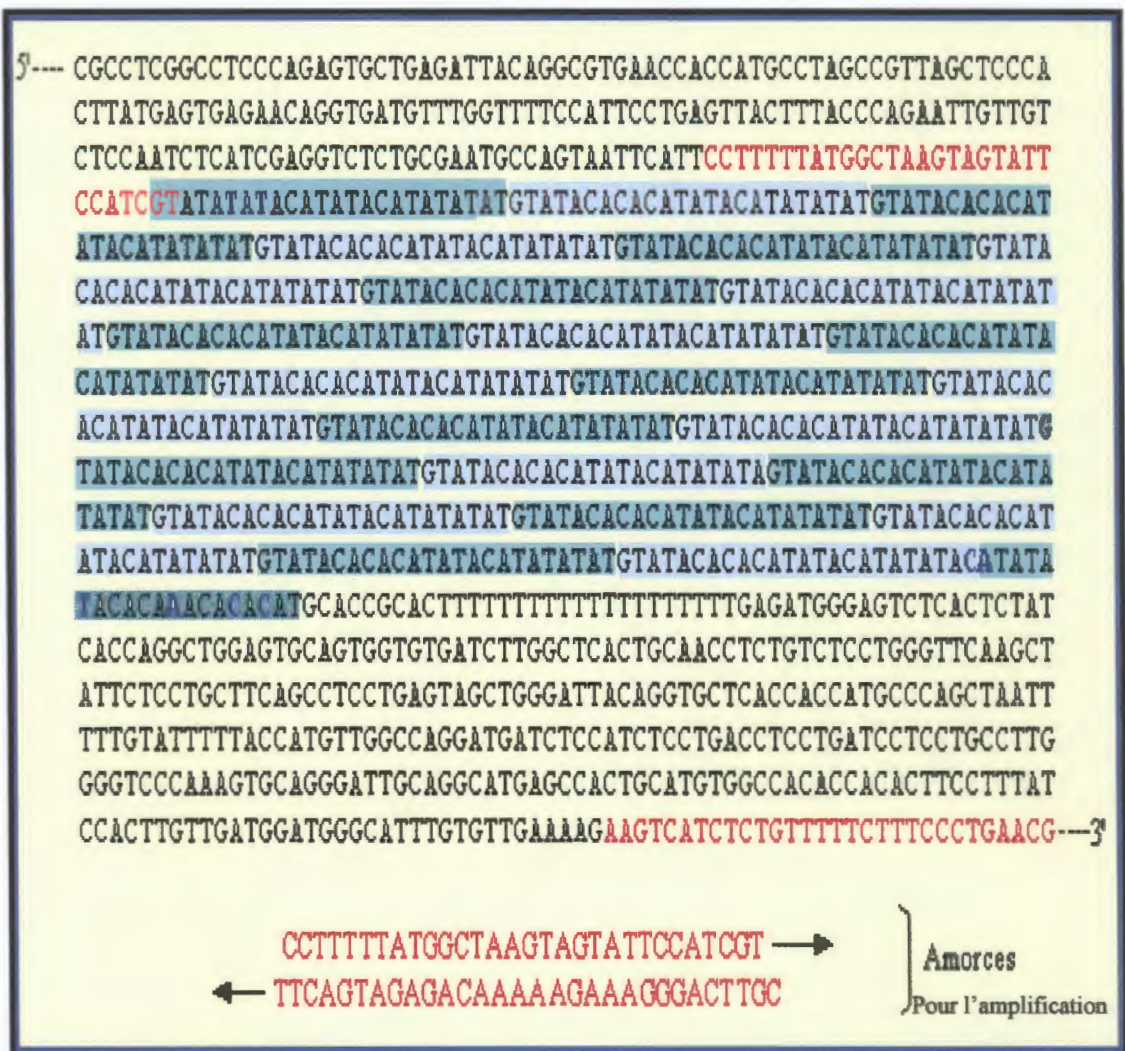


Figure 4. Localisation et dimension d'un minisatellite. Ce minisatellite est localisé sur le chromosome N°22 de l'homme, constitué par la répétition de 25 fois du motif de base de séquence consensus: GTATACACACATATACATATATAT (24 nucléotides); avec un très faible % de variation interne où les substitutions sont en bleu foncé. Les séquences (30 nucléotides) utilisées pour le choix des amorces sont en rouge qui sert pour l'amplification de ce minisatellite; et celles en noir sont des séquences flanquantes.

	Minisatellites	Microsatellites
Taille de l'unité répétée	(10 à 30 nt) _n	(CA) _n (tri) _n ou (tétra) _n (A) _n
Nombre de copies A chaque locus (n)	10 à 300	10 à 60 ≥7 10 à 50
Nombre total	3000	5 à 10.10 ⁴ 4.10 ⁵ 5.10 ⁵ à 10 ⁶

Tableau 2. Principaux types des séquences répétées du génome humain.

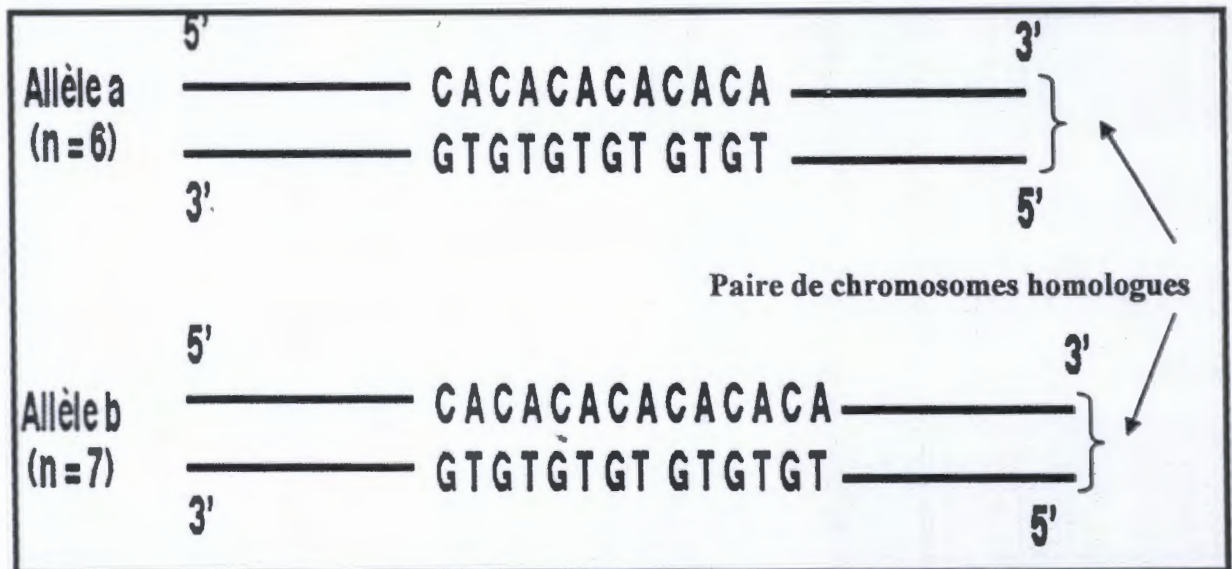


Figure 5. Exemple des séquences microsatellites. Cet microsatellite possède deux allèles a et b, qui se localisent sur deux chromosomes homologues d'un individu hétérozygote, dont il hérite le a de la part de sa mère et le b de son père; leurs séquences se différencient entre eux par le nombre de répétition (n= 6, 7 respectivement) de motif (AC).

Une autre caractéristique de l'ADN mitochondriale est son hérédité maternelle. En effet, l'ovule est bien fourni en mitochondries, alors que le spermatozoïde n'en contient qu'un petit nombre qui ne persiste pas dans la descendance. La mère transmet donc son ADN mitochondrial à tous ses enfants mais seules les filles, le transmettront à leur tour à leur progéniture.

Par ailleurs, le polymorphisme de l'ADN mitochondrial est moins marqué que celui de l'ADN nucléaire et l'analyse qui en est faite est donc moins discriminante, il présente néanmoins un double intérêt: il est préservés par la haute résistance de la mitochondrie, il peut être analysée sur des traces anciennes ou fortement dégradées ou l'ADN nucléaire n'est plus exploitable; ainsi il peut également permettre d'expertiser des tissus biologiques dépourvus d'ADN nucléaire mais riche en mitochondries qui sont prélevées sur une scène de crime. C'est notamment le cas des tiges de cheveux [Dermot, 1993].

II.3- Mise en œuvre des empreintes génétiques

II.3.1- Préparation de l'ADN à analyser

La nature et l'origine de l'ADN, ainsi que le but recherché par son amplification conditionnent souvent un protocole rigoureux utilisé pour préparer l'ADN à amplifier; débutant par le prélèvement qui peut être réalisé à partir d'une très faible quantité d'ADN représentant entre 1 et 20 cellules nucléés, récentes ou anciennes, et prélevées sur pratiquement n'importe quel type de support. Cela permet d'obtenir des résultats à partir de très petits échantillons. Le tableau 3 montre quelques objets pouvant servir de pièces à convictions et sur-lesquels il est possible de prélever des cellules (tab.3) (fig.6, 7). Ces dernières vont être transférées de leur tissu d'origine vers un support biologique ou non, il s'agit d'un transfert primaire, qui peut aussi être à son tour transféré vers un autre support : transfert secondaire. En suite, l'extraction de l'ADN s'effectue à partir des cellules récoltées qui sont lysées afin de libérer leur ADN en éliminant la protéine et les débris cellulaires du mélange. L'ADN extrait est

PIECES A CONVICTION	ENDROITS DU PRELEVEMENT	SOURCE DE L' ADN
Batte de base balle ou arme Semblable	Poignet, extrémité	Sueur, peau, sang, tissu
Chapeau, bandana, masque	A l'intérieur	Sueur, cheveux, pellicules
ongle, ongle partiel	Raclures	Sang, sueur, tissu
Marque de morsure	Peau ou habits	Salive
Couverture, oreiller	Superficie	Sueur, cheveux, sperme, urine, salive
Préservatif utilisé	Surface interne et externe	Cellules vaginales, rectales, sperme
Bouteille, verre, canette	Cotés embouchure	Salive, sueur
Bande ou ligature	Surface interne ou externe	Peau, sueur
Timbre ou enveloppe	Secteur léché	Salive
Cigarette utilisée	Bouts de la cigarette	Salive
Cure dents	Bouts	Salive
Linge sale	Superficie	Sang, sueur, sperme
balle	Surface extérieur	Sang, tissu
Coton tige, tampon, hygiénique, coton	Superficie	Mucus, sang, sperme, sueur, cire d'oreille

Tableau 3. Quelques exemples de pièces à conviction servent à recueillir les différents échantillons d'ADN

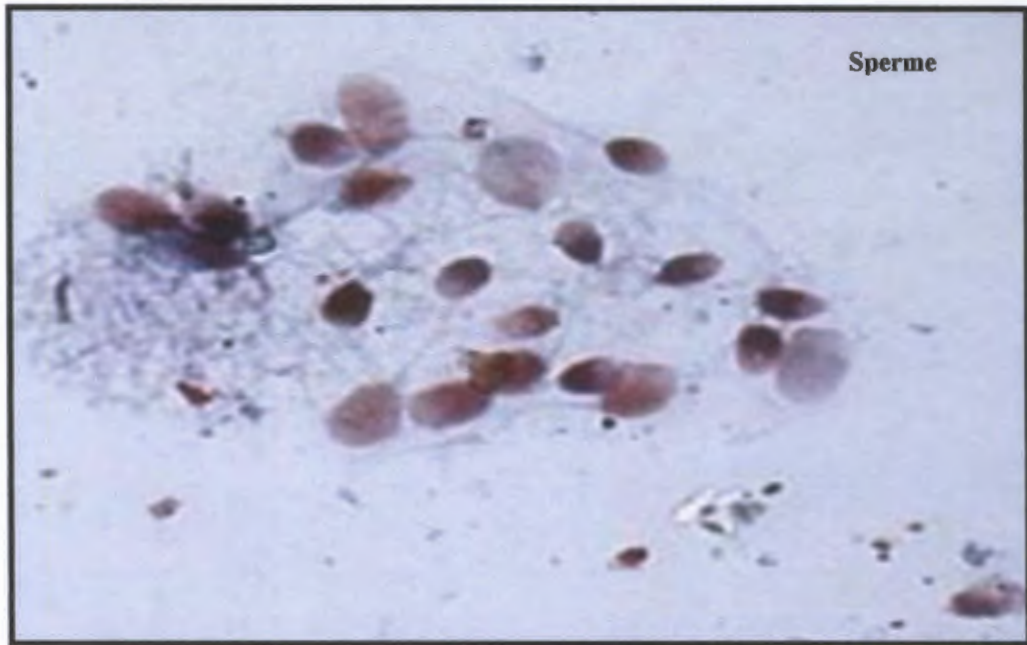


Figure 6. Image de spermatozoïdes obtenus par microscopie optique récoltés lors d'un viol sexuel.

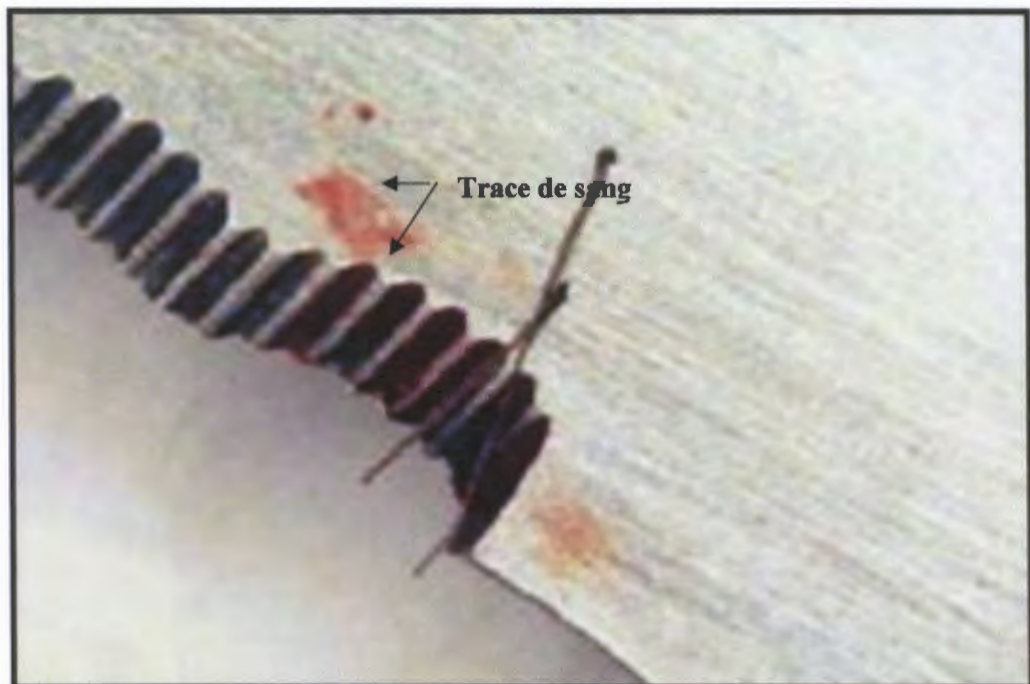


Figure 7. Exemple de source d'échantillon d'ADN (trace de sang) laissé dans une scène de crime.

généralement présent en quantité insuffisante à cause des pertes cellulaires au cours de chaque transfert, ou trouvé dans un état de dégradation. Ce qui empêche la réalisation d'une analyse génétique. Au temps réel, la PCR permet d'évaluer cette quantité restreinte, reproduit *in vitro* la réplication naturelle de l'ADN au cours de la division cellulaire et permet d'amplifier une séquence d'ADN en milliers de copies (fig.8). Cette technique est extrêmement sensible; il faut donc prendre d'extrêmes précautions pour ne pas contaminer les échantillons à analyser par l'ADN personnel de l'individu intervenant sur le lieu de crime ou bien au moment de manipulation dans les laboratoires [Androge, Delacroise et coll, 2005].

II.3.2- Analyse de l'ADN nucléaire

Cette analyse s'applique aux minisatellites et microsatellites, régions variables d'un individu à l'autre. Le nombre de répétition va induire une variation de la taille du fragment d'ADN. La tâche du biologiste consiste à mesurer la longueur de ces régions variables, le polymorphisme de taille s'appelle aussi RFLP, sigle pour Restriction Fragment Length Polymorphism; en utilisant pour le mettre en évidence, des enzymes de restriction et des sondes appropriées [Salmon, 1998]. Les enzymes de restriction (ou endonucléases de restriction) sont des enzymes qui coupent et digèrent l'ADN en des sites spécifiques, appelés sites de restriction, comprenant le plus souvent un nombre pair de bases (4, 6 ou 8, parfois plus), arrangées en générale en palindrome (tab.4) [Devienne, 1998].

Les sondes moléculaires sont des petits fragments (de 0,5 KB à 3 KB) d'ADN ou d'ARN, que l'on utilise pour repérer un fragment d'ADN particulier au milieu d'un mélange complexe. Ce que l'on exploite pour ce la est la propriété de s'hybrider avec son ADN complémentaire. Même sur un génome de très grande longueur, une sonde donnée ne va s'hybrider que dans la région dont sa séquence est complémentaire [devienne, 1998], et avec lui seul comme un anticorps ne reconnaît que son antigène et nul autre. Une sonde est un hameçon spécifique d'un segment donné d'ADN, elle ne reconnaît que son gène [Salmon, 1998]. Pourvu que la sonde soit

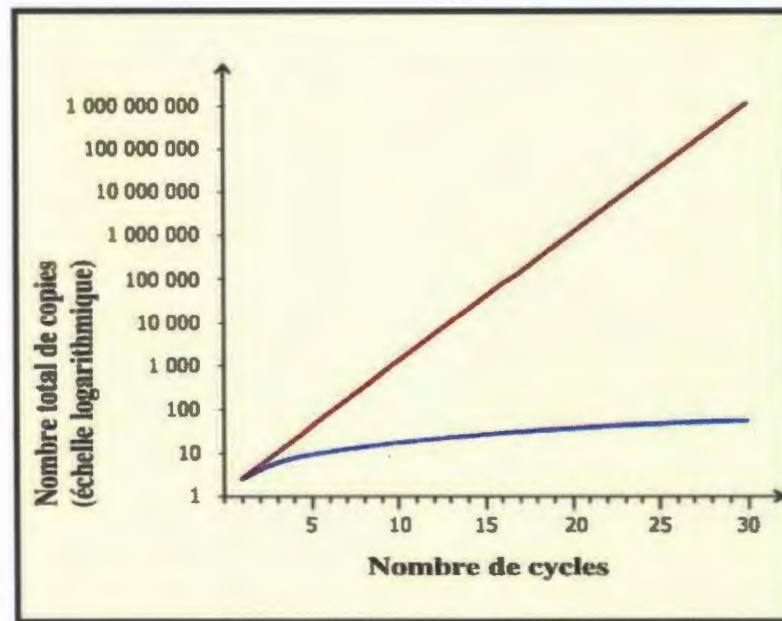


Figure 8. Graphe montre l'amplification d'ADN par PCR. Au cours de la réaction PCR, le nombre de copies d'ADN augmente d'un facteur 2^n , dont n est le nombre de cycle. La couleur bleu représente le nombre de copies longues et la couleur marron représente le nombre total de copies.



Figure 9. Exemple de sondes utilisées pour l'identification et quantification de LEGIONELLA et LEGIONELLA PNEUMOPHILIA. Lors de cette méthode, une sonde ADN s'hybride avec de l'ARN_r (au niveau de la sous unité 16s), spécifique de légionelles. Une fois marquées, les types de sondes vont être utilisées : une sonde spécifique de toutes les légionelles (fluorescence verte), et une autre spécifique des pneumophila (fluorescence rouge sondes d'ADN qui sont marqués par un fluorochrome vert pour les legionella SPP et rouge pour les legionella pneumophila. Les bactéries qui n sont pas celles recherchées, n'intègrent pas les marqueurs. De ce fait, elles ne pourront être observées et comptées lors de la lecture.

ENZYME	SITE DE RESTRICTION
<i>Eco</i> RV	5'...GAT ATC...3' 3'...CTA TAG...5'
<i>Hind.</i> III	5'...A AGCTT...3'
<i>Pst</i> I	3'...TTCGA A...5' 5'...CTGCA G...3'
<i>Eco</i> RI	3'...G ACGTC...5' 5'...G AATTC...3' 3'...CTTAA G...5'

Tableau.4 Enzymes de restriction couramment utilisées.



Espèce	ADN _g - <i>Eco</i> RI	ADN _g - <i>Pst</i> I	ADN _c
tomate	33	92	95
riz	50	58	85
lentille	38	41	88

Tableau 5. Pourcentage de locus uniques révélés selon l'origine des sondes.

marquée préalablement radioactivement ou chimiquement (Fig.9). Dans les deux cas le principe de base le plus couramment utilisé est le même, c'est le random priming, que l'on peut traduire par "amorçage aléatoire". Certains nucléotides peuvent être marqués radioactivement, ou liés à un antigène. Dans le premier cas, leur incorporation dans la sonde la rendra radioactive (différents types de radio-isotopes peuvent être induits dans un nucléotide: ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{33}P , ^{32}P .); dans le second cas on utilisera un anticorps couplé à une phosphatase alcaline (par exemple) pour visualiser la bande grâce à une réaction colorée (sonde froide) [fournier, 1994].

On utilise couramment deux sources de sondes: Les sondes génomiques (ADN_g), sont obtenues par digestion de l'ADN total du génome nucléaire de l'espèce étudiée à l'aide d'une enzyme de restriction. Les sondes d'ADN complémentaire (ADN_c), correspondent nécessairement à des gènes exprimés. Il s'agit en effet ici d'extraire les ARN messagers (ARN_m), de synthétiser leur ADN complémentaire à l'aide d'une enzyme, la transcriptase reverse, et de cloner ces ADN_c en vue de leur utilisation comme sondes. Par rapport aux autres types de sondes, les ADN_c révèlent effectivement une proportion élevée de locus uniques, ceci quelle que soit l'espèce (tab.5).

II.3.2.1- Sondes polylocus

Les premières sondes utilisées, en particulier en Angleterre par Alec Jeffreys, sont capables de se fixer sur plusieurs minisatellites, présents sur plusieurs chromosomes au sein d'un même génome et possédant en commun une même séquence centrale de 10 à 16 pb. Elles permettent de visualiser, en bloc, la structure des segments répétés d'ADN; ce sont elles qui reçoivent le nom d'empreintes. Le nombre de répétition de paire de base de l'ADN varie d'un individu à l'autre, si l'on coupe l'ADN à l'aide d'une enzyme de restriction, on obtient des fragments d'ADN dont la longueur est variable d'une personne à l'autre; ainsi se révèle ce nouveau polymorphisme. Chaque polymorphisme est défini, de manière très empirique, par le couple enzyme-sonde utilisé pour le mettre en évidence. On connaît désormais de nombreux sites d'ADN ou

s'exprime ce polymorphisme et chacun d'entre nous possède ainsi son "code à barre" personnel. Les premières sondes ne sont pas spécifiques: l'enzyme de restriction coupe, à l'aveugle pourrait-on dire, à tous les endroits du génome où elle reconnaît son fragment de coupure. La sonde correspondante explore alors plusieurs locus sur le génome d'un même individu. Elle reconnaît plusieurs motifs de génome présents sur plusieurs chromosomes. L'empreinte génétique est globale, comme la photographie d'un visage. Les premières sondes polylocus d'Alec Jeffreys, dénommées 33.15 et 33.6, sont restées célèbres, car elles ont permis d'identifier les auteurs d'agressions sexuels. La sonde 33.15 permet, à elle seule, d'explorer une trentaine de locus chez un individu. Les empreintes génétiques correspondantes sont donc constituées par un très grand nombre de bandes, dont la lecture n'est pas toujours aisée [Salmon. 1998, Bernot. 1999].

II.3.2.2- Sondes monolocus

En 1989, Alec Jeffreys améliora cette méthode en créant des sondes monolocus qui utilisent, comme les précédentes, la technique du Southern Blot et étudient le même type de variabilité mais se concentre sur une seule localisation du génome. On localise bien maintenant de nombreux sites de polymorphisme de longueur d'ADN sur des chromosomes différents et donc nécessairement transmis, lors de la méiose, de manière indépendante les uns des autres. Ils constituent chacun un système propre, où chaque gène peut être exploré par une sonde propre, une sonde monolocus. Avec une enzyme de restriction donnée et une sonde appropriée, on dispose d'un instrument très performant, définissant un polymorphisme monolocus dont on peut suivre la transmission à travers les générations. Les sondes monolocus ont donc été répertoriées par le chromosome porteur de la région qu'elle explore. La lettre D, pour "DNA", est suivie du numéro du chromosome, puis la lettre S pour "single" indique que la sonde est monolocus; un numéro lui est ensuite attribue selon son ordre de mise en évidence ou sa construction. Par exemple, D2S44, pour la sonde commercialisée sous la rubrique YNH24, est la quarante quatrième sonde pour le chromosome N°2 [Salmon, 1998].

II.3.2.3- Technique de RFLP

En 1980 Botstein et Coll ont publié une carte génétique du génome humain, qui pour la première fois, utilisait des marqueurs génétiques issus de la technique de longueur des fragments de restriction, ou RFLP. Cette technique a eu immédiatement un gros succès auprès des généticiens, car elle donnait accès à un nombre très élevé de marqueurs répartis le long du génome. En utilisant une enzyme de restriction, le génome d'un individu va être découpé en plusieurs parties dépendantes du nombre de sites de restriction présents dans le génome de cet individu pour l'enzyme utilisée. Le nombre de ces sites et leurs positions différent en fonction de l'individu. On a donc un polymorphisme de longueur des fragments de restriction, et l'on peut donc réaliser une empreinte génétique grâce à cette méthode; ainsi on pourra différencier deux individus [Bernot, 1999]. La technique (simplifiée) de RFLP nommée "Riflip" peut se réaliser suivant plusieurs étapes (fig.10). Les fragments produits à partir de l'ADN de tout individu après traitement par une ou plusieurs enzymes de restriction, forment un ensemble défini avec précision. Lorsque l'ADN d'individus différents est traité par une enzyme de restriction, les profils électrophorétiques sont semblables, mais non identiques, à cause de différences individuelles dans les séquences nucléotidiques. Dans la population humaine, la plupart de ces différences sont en relation avec la présence de courtes séquences répétitives (minisatellites et microsattellites). Les RFLP donnent des différences distinctes dans les profils après électrophorèse, qui peuvent servir à identifier les individus en préparant une empreinte d'ADN [Josué, 1998].

La méthode employée pour l'analyse RFLP est par Southern blot, baptisé du nom de Southern qui l'a développé la première fois. Une digestion de l'ADN est soumise à une électrophorèse sur un gel d'agarose et est dénaturé en simples brins. L'ADN étant chargé négativement, migre de la cathode vers l'anode; les fragments les petits sont les plus rapides. Par exemple, un fragment de 8 kb est un fragment lourd, de migration lente. Un fragment de 2 kb est un fragment léger, de migration rapide. Les fragments sont alors transférés à partir du gel au papier de nitrocellulose où le gel est

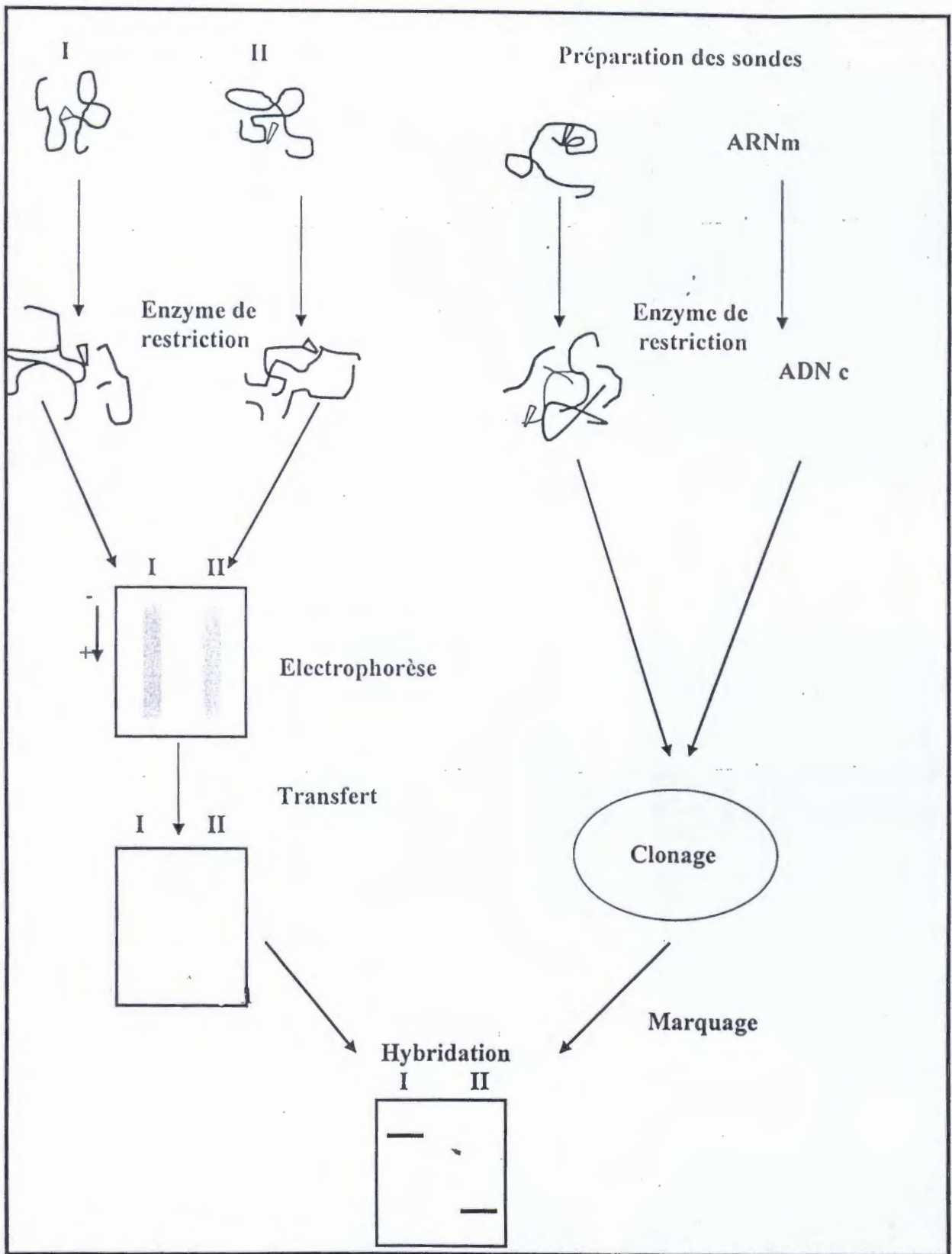


Figure 10. Étapes de la méthode RFLP.

La méthode du polymorphisme de longueur des fragments de restriction repose sur plusieurs étapes. Elle est appliquée sur deux individus I et II en traitant leurs ADN par une enzyme de restriction; les fragments résultent migrent sur électrophorèse, transférer et hybrider avec une sonde préparée à partir de l'ADN génomique ou l'ADN complémentaire.

placé sur le papier filtre normal, qu'a été imbibé dans la solution de sel concentrée. Le papier de nitrocellulose est placé sur le gel, avec un papier buvard sec et un poids sur celui-ci. La solution de sel se déplace dans le gel, portant les fragments d'ADN avec elle où ils deviennent emprisonnés; le modèle du fragment sur le gel est de ce fait précisément transféré. Les fragments d'intérêt peuvent alors être situés sur la nitrocellulose par hybridation avec une sonde, suivie de l'autoradiographie [Salmon, 1998] (fig.11). Une technique semblable, désignée sous le nom de Northern blot, est employée pour identifier les molécules d'ARN. Une autre technique appelée: la technique des taches "dot". Elle est beaucoup plus simple, car ni une fragmentation par enzyme de restriction, ni une électrophorèse ne sont nécessaires; elle est utilisée au cours de l'étude des petits fragments de l'ADN (allèle) (fig.12).

II.3.2.4- Technique de PCR

Cette technique décrite en 1985 par Karry Mullis, réaction de la polymérisation en chaîne ou PCR (Polymerase Chain Reaction) a ouvert de nouvelle voie dans l'étude et l'analyse des acides nucléiques et des gènes, permet d'amplifier en un nombre très élevé de copie une séquence particulière de l'ADN, ce qui facilite grandement son étude et son exploitation, et elle est basée sur le même principe de répllication que celui qui est naturellement utilisées par les cellules pour dupliquer l'ADN [Maftah et Raymond, 1999]. Cette méthode impose de connaître la séquence des régions qui délimitent le segment de l'ADN à amplifier. Connaissant chacune de ces deux séquences (sur des vingtaines des nucléotides), on synthétisera des oligonucléotides complémentaires. Ces oligonucléotides auront deux fonctions : ils permettront de repérer la partie de l'ADN à amplifier, il serviront d'amorce à l'ADN Polymérase [Etienne, 1999]. On apporte artificiellement tous les ingrédients qui vont permettre au gène de se dédoubler : tout d'abord une enzyme qui sera l'ouvrière de la construction du double; c'est l'ADN Polymérase (qui provenait au départ, d'une bactérie des eaux chaudes, *thermus aquaticus*, d'où son nom de Taq Polymérase) [Inman et Rudin, 1997]. On apporte, en même temps, les matériaux de construction du double d'ADN, c'est-à-dire acides

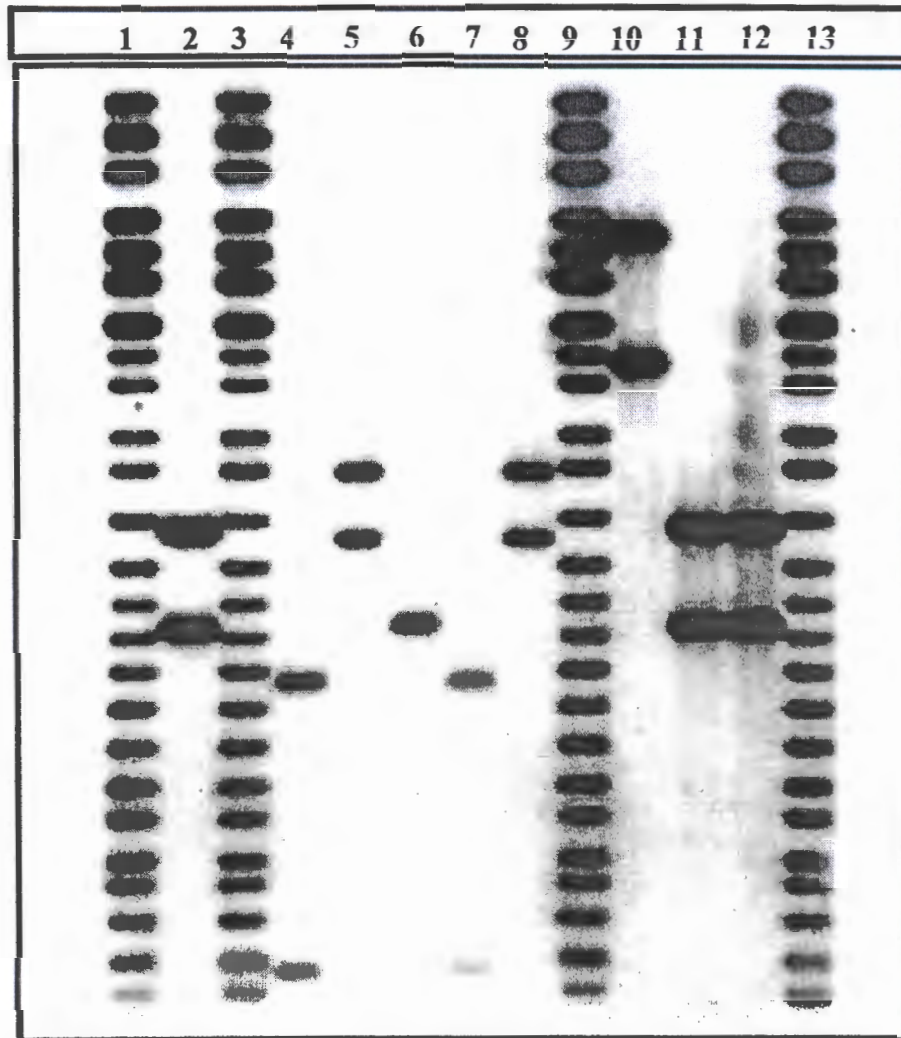


Figure 11. Résultat d'une analyse par RFLP d'une région du polymorphisme d'ADN. Les pistes représentent: 1, 3, 9 et 13: étalonnage, 2, 11 et 12: contrôle, 4: victime, 5: suspect 1, 6: suspect 2, 7: tache de sang, 8: sperme, 10: amis de la victime. On constate d'après la comparaison des profils d'ADN que la tache de sperme recueilli dans la scène de crime convient à celle du suspect 1 (piste 5).

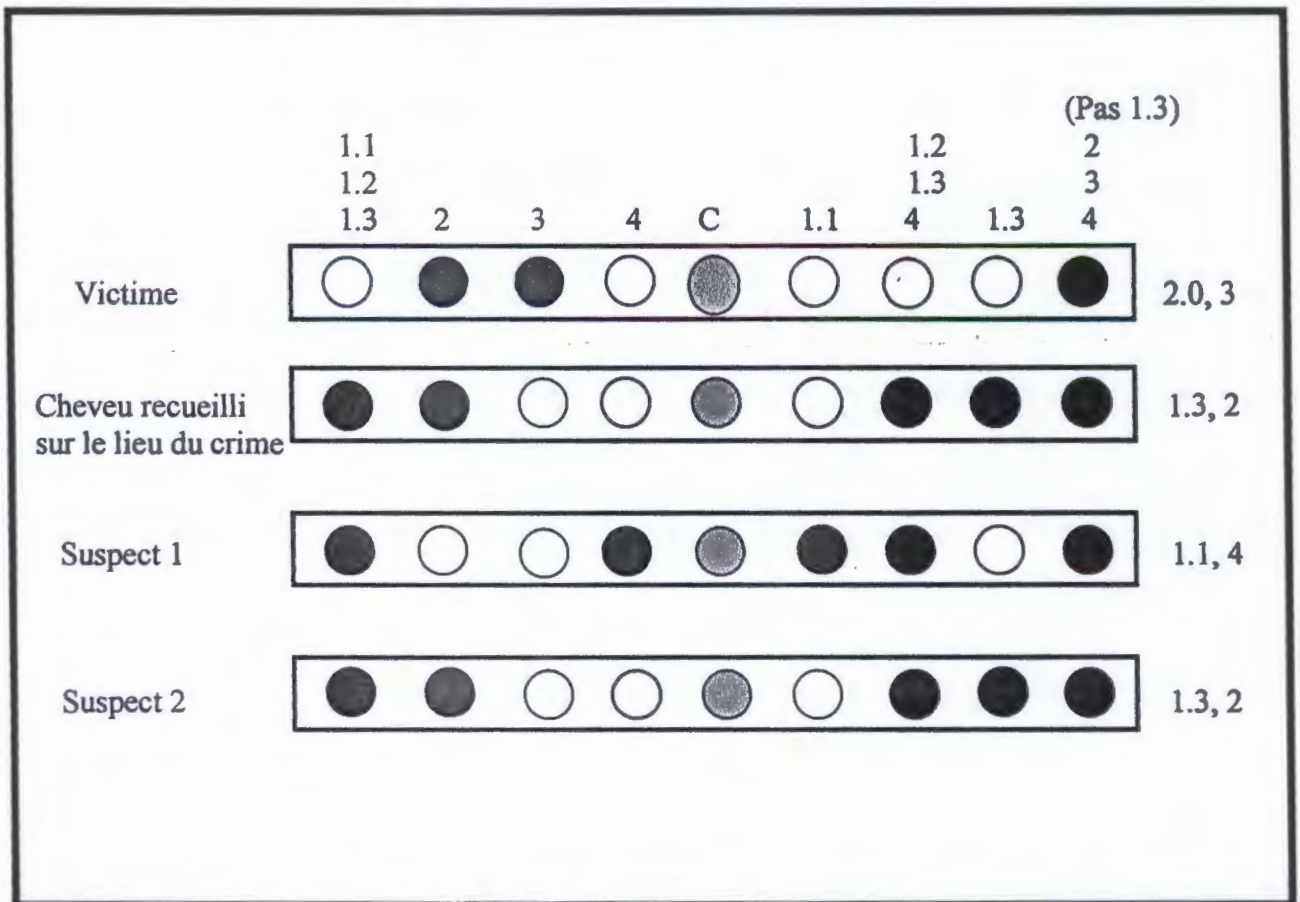


Figure 12. Obtention d'une empreinte génétique par la technique des dots, dans un cas de crime

- (C) : (C) est le contrôle détectant tous les allèle; une tache bleue doit être visible.
- : Indique la présence au moins de l'un des fragments d'ADN numérotés au dessus.
- : Indique l'absence de tous les fragments d'ADN numérotés au dessus.

Le typage indique que le cheveu recueilli provient d'un sujet 1.3, 2; alors on accepte le 2^{ème} et on écarte le 1^{ier}.

nucléiques construits par le synthétiseur d'oligonucléotides. Tout est donc en place pour que l'ADN puisse, artificiellement, construire son double: l'ADN Polymérase accroche, les uns après les autres, les acides nucléiques complémentaires de l'ADN entre les limites marquées par les deux amorces. De cette manière, l'ADN se dédouble artificiellement, *in vitro*, comme il le fait, *in vivo*, lors de sa réplication l'ADN Polymérase utilisée n'est pas sensible aux changements de température, c'est ce qui permet de faire intervenir la température pour séparer les deux brins d'ADN et obtenir aussi une première copie, puis stopper les processus [Salmon, 1998]. De ce constat, on peut ainsi effectuer un nouveau cycle (dissociation, hybridation des amorces, réplication de l'ADN), chacun de ces cycles est dépendant de la température à laquelle est placée le mélange réactionnel, ce qui justifie l'utilisation d'une polymérase thermostable [Bernot, 1999].

La technique de la PCR présente de nombreux avantages; parmi les quelles; on trouve qu'il ne faut qu'une très faible quantité d'ADN représentant cinquante à cent cellules, qu'il soit dégradé ou non, purifié ou non, récent ou ancien. Ceci permet d'obtenir des résultats à partir de très petits échantillons, La méthode est facile à pratiquer, les réactifs pouvant être fournis sous forme de kits prêts à l'emploi, Le recours à l'informatique permet d'obtenir le résultat de l'analyse dans un délai très court: douze heures pour une trace de sang, soixante douze heures pour une trace de sperme. Dans le cas d'un prélèvement buccal ce délai n'excède pas six heures [Primrose et Twyman. 2004, Salmon, 1998]. La seule faiblesse de cette méthode, liée à sa très grande sensibilité; réside dans le risque de contamination par un ADN étranger, et ce d'autant plus que la quantité d'ADN analysable est réduite. Des précautions draconiennes doivent donc être observées tant au recueil de l'échantillon qu'à celui de l'analyse [Primrose et Twyman, 2004].

La spécificité de la PCR dépend de façon critique des amorces. Les facteurs énumérés ci-dessus sont déterminés dans le choix d'amorces performantes; la longueur des amorces doit être comprise entre 17 et 30 nucléotides, un contenu en GC de 50% est

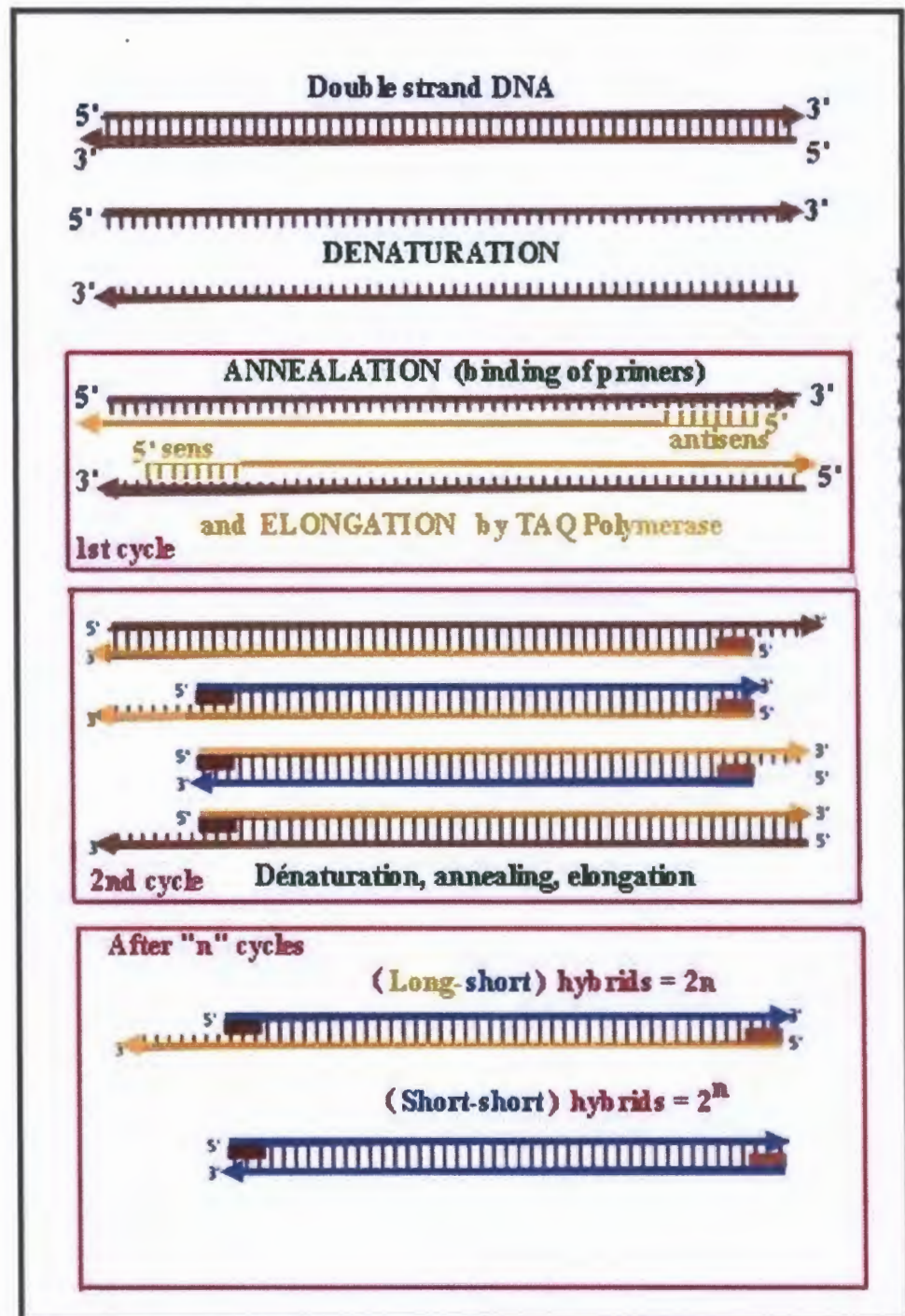


Figure 13. Schéma illustrant le mécanisme de la technique de PCR et ses étapes.

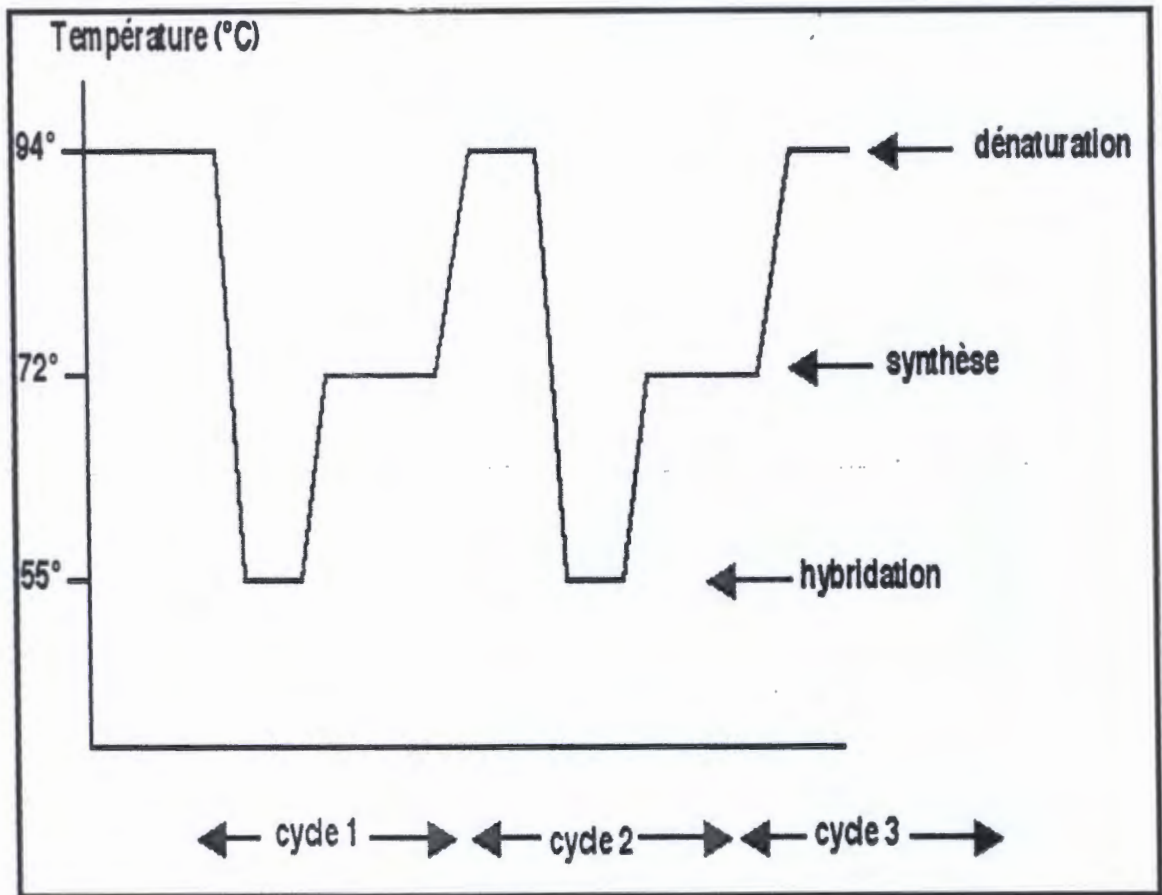


Figure14. Evolution de la température et des différents types de brins d'ADN au cours des 4 premiers cycles de la PCR. La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. Sauf pour certaines méthodologies (par exemple l'utilisation de sondes d'hydrolyse), chaque cycle contient trois étapes détaillées ci-dessous.

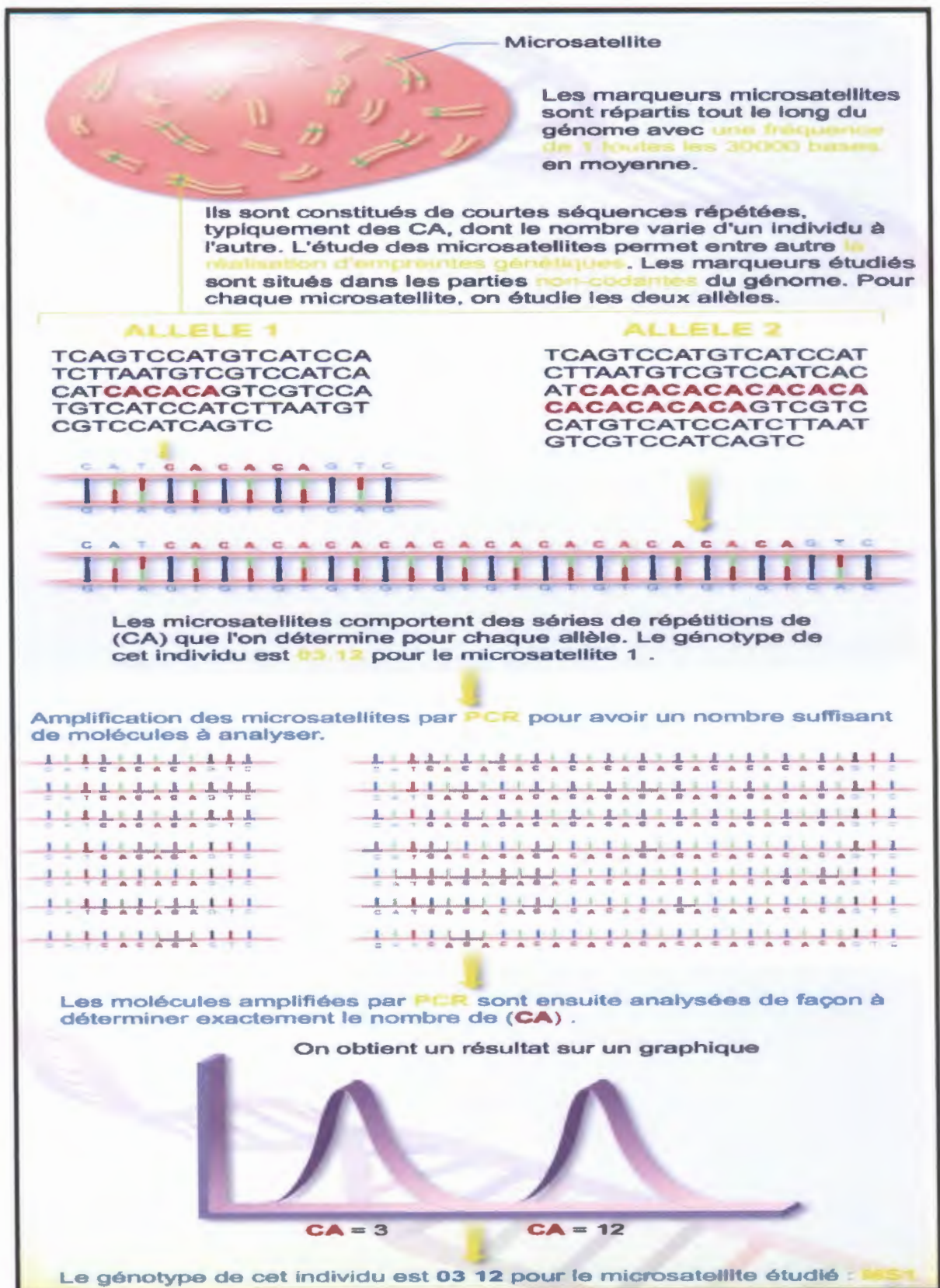


Figure15. Établissement d'une empreinte génétique à partir du couple microsatellite-PCR

idéal. Si les amorces correspondant à des séquences pauvres en GC; il convient de les allonger pour éviter des températures de fusion trop basses, des séquences contenant de longues répétitions d'un même nucléotide (c'est-à-dire plus de 3 ou 4 d'affilée) doivent être évitées, Des amorces susceptibles de former des structures secondaires sont inutilisables, les deux amorces ne doivent pas présenter de complémentarité de séquence, la grande majorité des amorces conformes à ces règles donnant de bons résultats bien que leur efficacité puisse varier d'une paire à l'autre; même dans des conditions de réaction optimales.

II.3.3- Analyse de l'ADN mitochondrial

Elle vise à mettre en évidence un polymorphisme de structure. La définition du mitotype porte sur la détermination d'environ 700 nucléotides par la technique du séquençage. L'utilisation d'un séquenceur automatique permet de raccourcir le délai de réponse. La séquence déterminée est comparée à une séquence de référence, les points de mutation sont mis en évidence et les mitotypes des pièces de question et des pièces de comparaison permettront, comme l'ADN nucléaire, d'affirmer, soit une exclusion (si plus de trois différences sont observées entre les deux ADN), soit une identité [Serre et coll, 2002]. Cette technologie est lourde et onéreuse. Comme il s'agit d'une méthode permettant l'analyse de micro prélèvement, elle est très sensible aux contaminations. Plus encore que pour l'ADN nucléaire, la séparation des activités et la mise en place de nombreux contrôles (extraction-amplification) révèlent une importance particulière pour la validation des résultats [Josué, 1998].

II.3.4- Précautions à prendre

La rapidité des analyses est d'un grand intérêt dans une enquête: les résultats sont obtenus rapidement, entre 24 et 48 heures pour une tache de sang, et en soixante-douze heures pour un échantillon de sperme. Cette analyse extrêmement sensible et performante a une grande faiblesse: la facilité de la contamination par un ADN étranger. il faut donc prendre des précautions draconiennes lors du recueil des échantillons, et tout

les acteurs intervenant dans le processus d'analyse, du technicien du police judiciaires effectuant les prélèvement aux biologistes réalisant les analyses de biologie moléculaire, doivent être très qualifiés et spécialisées .

Le terme de contamination se réfère ici au risque de pollution du prélèvement par un ADN étranger pouvant conduire à une analyse faussement positive. L'origine de la contamination peut avoir lors du prélèvement, lors des testes du biologie moléculaire au laboratoire. Tout ADN provenant de tissus biologique humain est par essence potentiellement contaminant par rapport à des traces d'ADN à tester. C'est pourquoi lors du prélèvement; le technicien portera une, combinaison, une coiffe des gants et un masque a fin d'éviter de contaminer les échantillons qu'il prélève avec son propre ADN (sueur, pellicules, postillon).

Au laboratoire, les manipulateurs prennent les mêmes précautions et des systèmes de décontamination sont utilisés (environnement protégé avec salles dites blanches, application de produits chimiques, irradiation par UV des surfaces et des instruments). Les laboratoires dans lesquelles se font les empreintes génétiques sont conçues de telle sorte que, lors du cheminement de l'échantillon d'une étape de l'analyse à la suivante, les risques de contamination soient réduits au maximum [Rouger, 2000].

II.3.5- Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats est une opération qui demande beaucoup de rigueur scientifique et une grande expérience, il faut donc être prudent face au manque d'objectivité car des conclusions prématurées pourrait avoir des conséquences graves. Si l'analyse comparée d'une STR dans le cadre d'une enquête judiciaire fournit, pour un individu, deux allèles différents en tailles de ceux qui caractérisent un ADN inconnu (prélèvement de question opère sur une scène de crime), l'identité peut être exclu. Cette exclusion est toujours formelle et ne souffre aucun risque d'erreur [Devienne, 1998]. Si, en revanche, les allèles caractérisant l'ADN du suspect sont de même taille que ceux mesurés sur l'ADN inconnu , on parlera de concordance sans pouvoir totalement écarter la

possibilité qu'un individu possède, sur cette région précise de l'ADN, les mêmes caractéristiques génétiques. On, doit donc, d'une part, estimer les fréquences des génotypes (association de 2 allèles) dans une population donnée, et d'autre part, utiliser un nombre de marqueur assez élevé pour réduire à un niveau infinitésimal le risque de coïncidence [Rouger, 2000] (fig.16).

Dans le test de Paternité, l'incompatibilité des allèles, dans plus d'un marqueur, entre l'enfant et le père supposé permet d'exclure ce père candidat comme père biologique avec une certitude de 100 %. Quand tous les allèles sont compatibles dans tous les marqueurs, nous pouvons affirmer la paternité conditionnée à une probabilité qui est calculée statistiquement. Le résultat s'exprime de manière numérique avec une Probabilité de Paternité (c'est la probabilité de que la personne analysée soit le père biologique - degré de fiabilité-) et l'indice de Paternité Accumulé (il exprime le nombre de fois qu'il est plus probable que le supposé père soit le père biologique face à n'importe quelle autre personne de la population). Pour aider à la compréhension des résultats, joints à la valeur numérique de la probabilité, nous incluons une phrase explicative sur le degré de fiabilité ou de certitude. Nous pouvons affirmer la paternité avec une fiabilité de l'ordre de 99,99 % quand la mère y participe [Serre, 2002] (fig.17).

Dans le test de Maternité, l'incompatibilité des allèles, dans plus d'un marqueur, entre l'enfant et la mère supposée permet d'exclure cette mère candidate comme mère biologique avec une certitude de 100 %. Dans le Test des Jumeaux également dit Test de Zymostérol, quand il existe des différences entre les allèles dans n'importe quel marqueur des deux supposés vrais jumeaux, nous affirmons avec une certitude de 100 % que ce sont de faux jumeaux (jumeau bivitellins). Par contre, si tous les allèles de tous les marqueurs des deux supposés vrais jumeaux sont identiques, nous affirmons que ce sont de vrais jumeaux (jumeaux univitellins). Cette affirmation est accompagnée d'un degré de fiabilité qui indique la probabilité qu'ils soient effectivement identiques. Il est impossible d'établir cette affirmation à 100 %. Cependant nos résultats sont fiables à hauteur de 99,99% [Salmon, 1998].

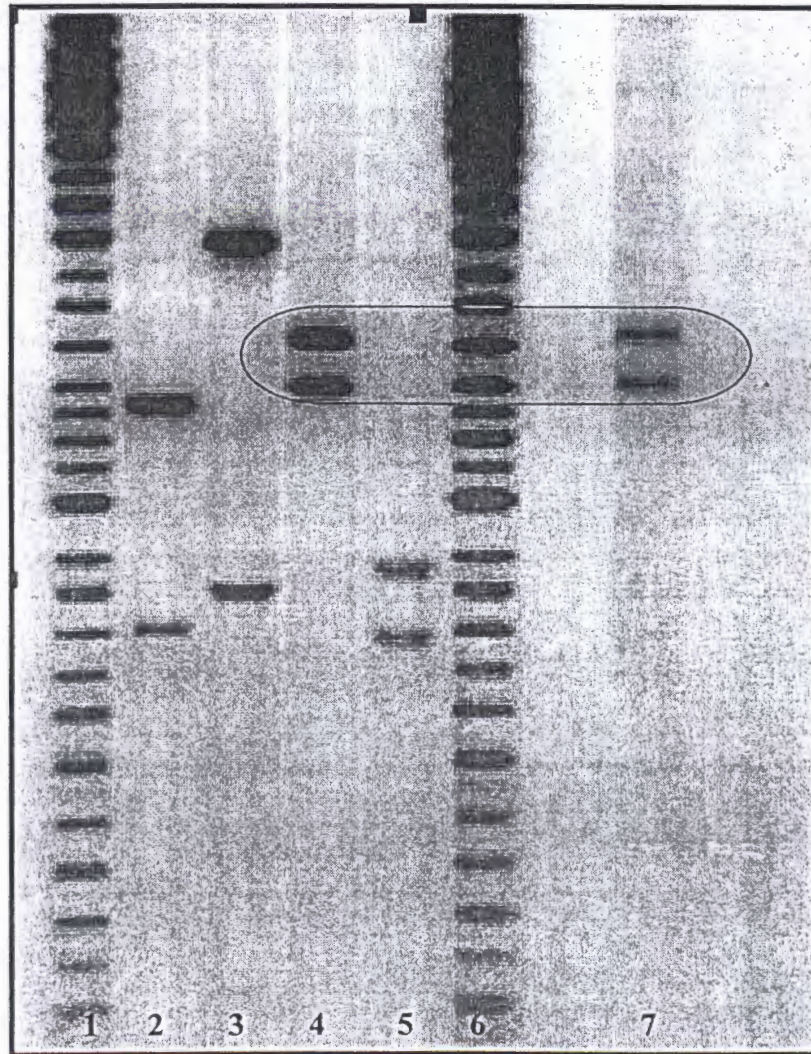


Figure16. Interprétation des résultats d'une analyse effectuée à partir d'un échantillon de sperme prélevé sur le vagin d'une victime violée. Les pistes représentent: 1et 6 Marqueurs de poids moléculaire (référence afin d'évaluer la taille des Fragments amplifiés), 2: Profil de l'ADN du technicien (vérification du risque de contamination lors de la manipulation), 3: Profil de l'ADN de la victime, 4 et 5: Profils des deux suspects, 7: Profil de l'ADN contenu dans le prélèvement de sperme. Par comparaison on trouve que le profil de la piste 7correspondant à celui de la piste 4; alors le suspect N°1 est l'agresseur accepté.

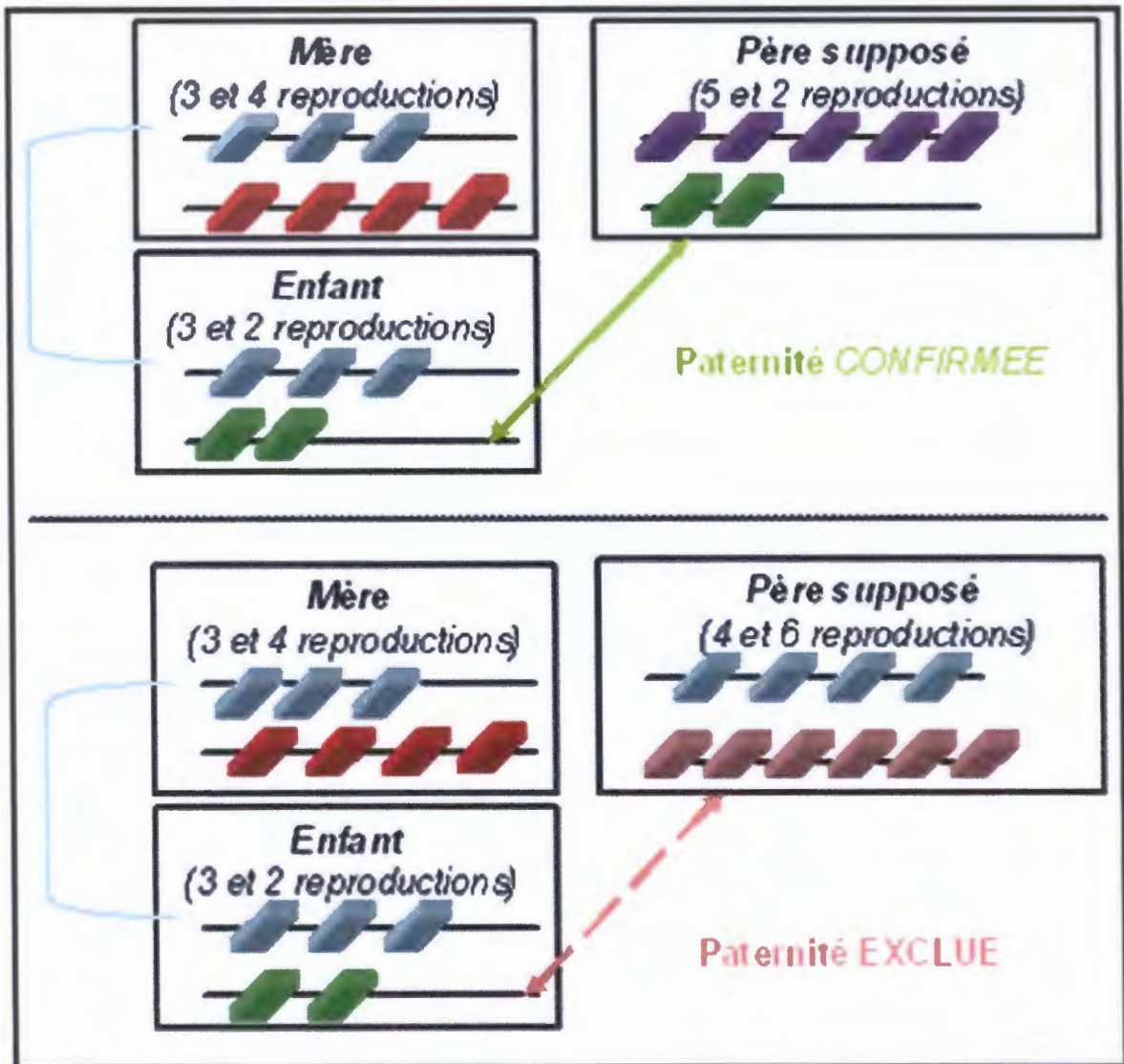


Figure 17. Interprétation des résultats lors d'un test de paternité. Les rectangles schématisés représentent les motifs constitutifs des microsatellites, situés sur deux chromosomes homologues d'un individu, qui se différencient entre eux par leurs nombres de répétition; ainsi que la variabilité des couleurs de ces motifs indique la différence en structure nucléotidique. L'enfant reçoit un chromosome de sa mère et un de son père, ce qui traduit la présence de deux allèles différents pour un locus. Concernant cet microsatellite les répétitions sont de l'ordre: 3.4 pour la mère, 5.2 pour le 1^{er} père supposé, 4.6 pour le 2^{ème} père supposé et 3.2 pour l'enfant; par une simple comparaison on trouve que cet enfant est le fils du 1^{er} père supposé.

Chapitre III

III- Applications des empreintes génétiques

III.1- Identification des individus

III.1.1- Recherche d'identité

C'est par la recherche d'identité que les empreintes génétiques ont été connues du public. Dans ce domaine, les empreintes génétiques monolocus atteignent des performances que l'on avait peine à imaginer: naguère encore [Salmon, 1998]. Chacun d'entre nous est réellement un être unique. Cela peut être mathématiquement démontré en utilisant cette cinquantaine de système de marqueurs disponible. Le même calcul, utilisant les mêmes méthodes, montre que l'utilisation d'une dizaine seulement des systèmes d'empreintes génétiques monolocus suffit à garantir que l'on ne peut confondre un individu pris au hasard avec n'importe lequel des habitants actuels de la terre [Josué, 1998].

Pour analyser les empreintes génétiques, les laboratoires de la police scientifiques ou de la gendarmerie utilisent de plus en plus l'amplification génique (PCR), de préférence à la technique enzyme sonde (RFLP), car elle permet de travailler à partir d'une très petite quantité de matériel. La condition indispensable pour l'utilisation des empreintes génétiques est, bien évidemment, que le prélèvement étudié contient des cellules dont le noyau soit resté intact. Le résultat final se présente sous la forme d'une série de taches colorées caractérisées par leur situation dans le gel où elles ont migré sous l'influence d'un champ électrique: elles constituent le profil génétique de l'individu. Bien entendu, l'expert ne peut que rendre compte de l'interprétation des résultats, il constate ou non l'identité entre deux profils, il n'est pas magistrat et n'a donc pas qualité pour conclure à une culpabilité [Salmon, 1998].

Cette recherche permet d'identifier un cadavre lors de catastrophes de trains, avion, etc., en comparant les empreintes génétiques du mort avec celles d'un descendant ou ascendant présumé.

On imagine également les applications qui peuvent être actuellement faites pour lever certaines énigmes (comme celle de Louis XVII, un exemple ...) [Etienne, 1999].

III.1.2- Identification des cheveux

On trouve aussi une application à l'identification des cheveux; l'analyse de l'ADN mitochondrial a permis une avancée extraordinaire des cheveux. Ce travail est largement retrouvé dans les délits et crimes liés au vol (vols simples, vols à main armés, prise d'otage) et au terrorisme. Les cagoules, les vêtements et objets divers sont les dépositaires de ces éléments pileux. Le cheveu comporte deux parties: le bulbe, responsable de la croissance de l'élément pileux, contient des cellules renfermant à la fois de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondrial. Malheureusement le cheveu retrouvé sur le lieu du crime est généralement tombé naturellement (on en perdrait jusqu'à cinquante par jour), c'est-à-dire que son bulbe est mort. La quantité d'ADN nucléaire extraite est souvent insuffisante pour utiliser la caractérisation par les STR nucléaire. La plupart du temps seul l'ADN mitochondriale reste accessible; la tige est composée de chératine, mais a, conservé de très nombreuses mitochondries. Ce cheveu va donc focaliser l'attention de tout enquêteur avisé. Malheureusement des limitations vont exister: la quantité d'ADN qui ne permettra pas d'obtenir un résultat dans tous les cas, le faible pouvoir discriminant (fréquence élevée de certains mitotypes), et la possible implication (sans discrimination possible) de tout individu de la même lignée maternelle [Serre, 2002].

III.1.3- Identification des cadavres

(Utilisé du recours aux empreintes génétiques sur ADN mitochondrial)

Si l'ADN nucléaire d'un cadavre « frais » est intégré, plus le temps passe, plus les phénomènes de destruction cellulaire sont importants. En conditions extrême, la chair aura totalement disparu et seul les ossements seront accessibles. Il est quelque fois possible de caractériser l'ADN nucléaire à partir d'ossements anciens, mais il s'agit d'un exercice difficile et d'obtention d'un résultat est aléatoire. D'autre part, il n'est pas toujours possible d'avoir accès à des parents très proches (parents, enfants) pour la comparaison, alors que la plupart du temps, une apparenté par la ligné maternelle reste plus facile à trouver (tantes, cousins.....etc.). Jusqu'à présent, tous les cadavres soumis à une étude d'identification par empreinte génétique, on pu être identifiés par la technique sur ADN mitochondriale [Serre, 2002].

III.1.4- Résolution des problèmes criminalistiques

L'utilisation la plus connue est celle qui en est faite en criminologie pour confondre un suspect ou identifier une personne décédée. Dans le domaine des enquêtes judiciaires de nombreuses raisons en conduit le service de police à recourir aux empreintes génériques [Cabal, 2001]; les techniques permettent d'innocenter certain suspect, parallèlement, d'en identifier d'autre, et d'autre part; un enquêteur peut par conséquent; exploiter cette technique d'analyse par des fins diverses: il peut également identifier une victime alors même une partie du corps seulement découverte; identifier une victime designner un suspect lorsque, par exemple, l'ADN d'une partie du corps concorde avec celui des traces de sang prélevée sur un objet dont le suspect a été trouvé en possession; identifier un suspect au moyen de substance que l'auteur du méfait a laissé sur les lieux du crime. Dans certain cas

(Analyse du sperme laissé dans le vagin d'une victime de viol) [Berry et Clément, 1987], la concordance des analyses fournira une forte présomption de culpabilité; dans d'autre (frottis de salive provenant d'une morçure ou morceau de peau découvert sur des ongles de la victime), la valeur de la concordance devra être apprécié, plus encore que dans le premier cas, en fonction des autres éléments de l'enquêtes; comme le cas lorsque le profil ADN de la victime d'un meurtre correspond à celui du sang trouvée sur les vêtements du suspect; reconnaître les crimes en séries et les distingués des crimes par imitation [Barinage, 1998].

Un suspect peut être innocenté si l'empreinte génétique obtenue avec son sang est différente de l'empreinte donnée par leur spermatozoïde recueilli chez la victime. Les spermatozoïdes donnent deux bandes, car bien que l'ADN d'une spermatozoïde ne comprenne que n chromosome, et non de $2n$ comme un cellule du sang; il s'agit d'une population mixte constituée des spermatozoïdes type x et de type y (fig.18) [Etienne, 1999].

Pour les viols, outre l'écouvillon, tout élément portant du sperme est utilisable; le slip est un excellent matériel s'il est resté bien sec, et conserver à l'abri de la lumière (un tel matériel a permis de caractériser, après plusieurs années, l'empreintes génétiques d'un auteur de viol en série), les lames utilisées par les

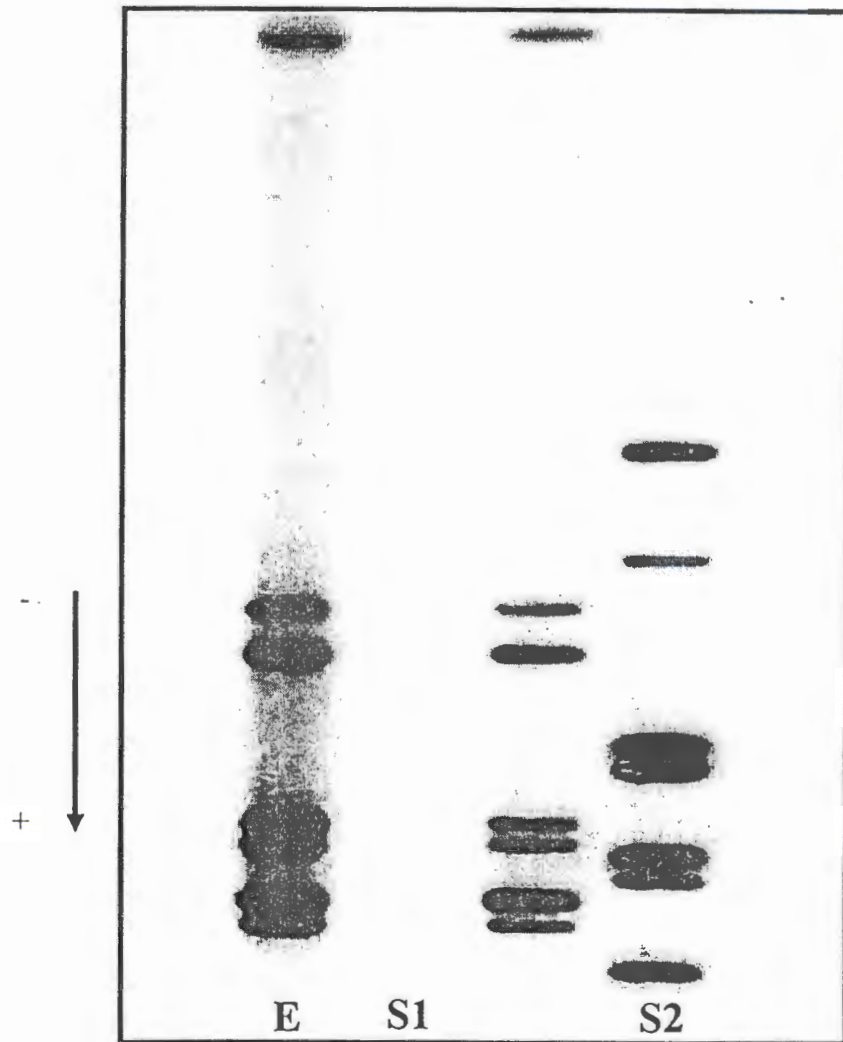


Figure 20. Résultat de migration des fragments d'ADN sur électrophorèse, utilisant la méthode RFLP au cours d'une affaire judiciaire. L'identification du criminel est effectuée par le polymorphisme de longueur de fragment de restriction utilisant l'enzyme HinfI et la sonde polylocus YNH24. Cette technique est appliquée sur une goutte de sang trouvée sur une scène de crime (E), ainsi sur le sang prélevé du suspect 1 et 2, le résultat montre que L'empreinte génétique d'échantillon E est correspondante de celle du suspect S2.

biologistes pour la recherche de sperme, les mouchoirs, les vêtements. La quantité minimale de spermatozoïdes qui peut être mise en évidence est de 100 à 200. Ce seuil de détection a été volontairement fixé assez haut. La lecture de certaine publication montre que des équipes travaillent sur une seule cellule. Elle se situe dans un contexte particulier où les conditions de stérilités peuvent être contrôlées du début à la fin des manipulations [serre, 2002].

En médecine légale, il n'y a aucune maîtrise des opérations en amont (prélèvement sur la victime) et de nombreuses contaminations peuvent être introduites. L'abaissement du seuil de sensibilité obligerait à augmenter le nombre de cycles de la PCR et multiplierait les risques d'amplification d'ADN étranger au prélèvement initiale (L'ADN apporté par l'enquêteur ou introduit au cours des manipulations dans le laboratoire), ce qui conduirait à rendre un résultat sans, cependant pouvoir certifier de son exactitude. Ainsi, le préservatif est un excellent support pourvu que son utilisateur veuille bien l'abandonner sur le lieu du crime. Cet objet présente un avantage énorme, outre qu'il protège la victime de toute maladies sexuellement transmissibles, il va apporter un double information: à l'intérieur se trouvent les spermatozoïdes de l'agresseur et à l'extérieur, il est possible de mettre en évidence l'ADN de la victime. On outre, certains violeurs prétendant avoir utilisé le préservatif avec une de leurs amies de rencontre ont été confondus par l'ADN de la victime présent sur la face externe [Cabal, 2001].

III.2-Ribotypage

Le ribotypage est une technique basée sur l'analyse de l'ADN bactérien, qui permet de faire comprendre à chaque souche son empreinte génétique sous forme d'un simple code à barre, empreinte appelée "ribotypage". Grâce à cette analyse, à la richesse des banques de données constituées, à la puissance de l'outil informatique qui garantissent performance, le ribotypage constitue un outil sans précédent d'investigation et d'enquête en écologie bactérienne et l'étude de l'environnement où l'archivage du répertoire génétique de souches bactériennes qui peuplent un site donne (détermination des points de contamination, traçabilité des souches...); ainsi que l'évaluation du risque où on trouve la comparaison des

ribotypes de souches isolées à celles de souches présentant un danger pour la santé (isolats cliniques) [Broeck et Smith, 1988].

Une autre application intéressante est la recherche et l'identification de germe pathogène et le diagnostic de maladies microbiennes; le problème peut être complexe: il faut trouver une séquence génétique spécifique d'une espèce ou d'un biotype donné, ceci n'est pas toujours évident à obtenir, bien que de telles séquences existent généralement; la méthode est utilisable pour la détermination de nombreux gènes pathogènes: biotype de *Salmonella*, *E-coli*, *Listeria*... [Hopwood, 1992]. En ce qui concerne le contrôle de qualité, l'identification peut s'effectuer à partir d'un produit quelconque (prélèvement biologique, produits alimentaires) par l'intermédiaire d'un isolement direct sur biote *Petri* ou à la suite d'une étape d'enrichissement ou de préenrichissement. Des parties aliquotes de ce milieu d'enrichissement sont utilisables directement, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer des purifications ultérieures [Guirand, 1993]. En cas d'enquête, le ribotypage sert aussi à révéler l'origine d'une infection, on comparant rapidement des souches isolées d'un environnement donné (exemple: prélèvement d'eau) aux souches isolées de malades [Broeck et Smith, 1988].

III.3- Identification des agroaliments

III.3.1- Identification des plantes

Les marqueurs moléculaires permettent d'établir l'empreinte génétique d'une plante. Elle est caractérisée par une succession de bandes correspondant à des fragments d'ADN: cette identification peut intervenir à différents niveaux: premièrement, l'identification variétales, par ces techniques, il devient possible de distinguer les lignées et de reconnaître les parents d'hybrides [Caboche, 1995]. Deuxièmement, le contrôle de la pureté variétale, il s'agit de détecter des contaminations variétales de lots de semence, ou de tester l'homogénéité d'une population à n'importe quel stade d'un schéma de sélection et finalement, la protection variétale, ce-ci fait partie intégrante de l'identification variétale [Boury et

Mabeau, 1996]. Il devient possible de détecter les Contrefaçons où copies de génotype. Ainsi, pour des questions de droits liés aux obtentions végétales, il a été introduit la notion de variété essentiellement dérivée (VED): c'est une variété dérivée d'une variété originale par modification de quelques zones chromosomiques réduites [De Vienne, 1998] (fig.19).

III.3.2-Traçabilité et détection des organismes génétiquement modifiés (OGM)

La traçabilité des OGMs depuis les matières premières consiste au suivi documentaire qui permet d'identifier l'origine et la nature ainsi que la destination des produits au sein d'une entreprise et à chaque transaction commerciale. En effet le dispositif communautaire en matière d'étiquetage porte aujourd'hui d'une part sur les semences et d'autre part sur les produits finis. La traçabilité des OGMs s'inscrit pour l'instant dans une démarche volontaire dans l'attente de nouvelles réglementaires.

Pour détecter les OGMs, on quantifie l'ADN ou les protéines issues d'OGM dans les matières premières, les ingrédients ou les produits finis, analyses qui s'inscrivent dans une démarche de traçabilité. Les pouvoirs publics déposent à la fois de laboratoire pour analyser les produits et de moyens classiques de contrôle (vérifications des documents, facteurs et évaluation de la fiabilité de la traçabilité des professionnelles) [Bertheau et Dioleza, 1999].

Pour la détection de produit de la modification, il s'agit le plus souvent de rechercher la protéine exprimée par la transgénèse par les tests immunologiques ou phénotypiques. Ces tests sont majoritairement utilisés par les pays producteurs et exportateurs de graines de fèves tel que ceux d'Amérique du nord. Les conditions nécessaires est de disposer d'anticorps correspondant à la protéine recherchée. Ce n'est pas toujours possible dans les cas où la modification génétique ne conduit pas à la synthèse d'une protéine nouvelle mais au contraire veut diminuer ou supprimer une protéine initialement présente. Parmi toutes les méthodes d'amplification de l'ADN, la technique de PCR est la plus utilisée dans le domaine de la détection des OGMs. Pour mettre en œuvre cette technique, il est nécessaire de disposer d'ADN en quantité suffisante est suffisamment purifié. Le protocole d'extraction et de purification de

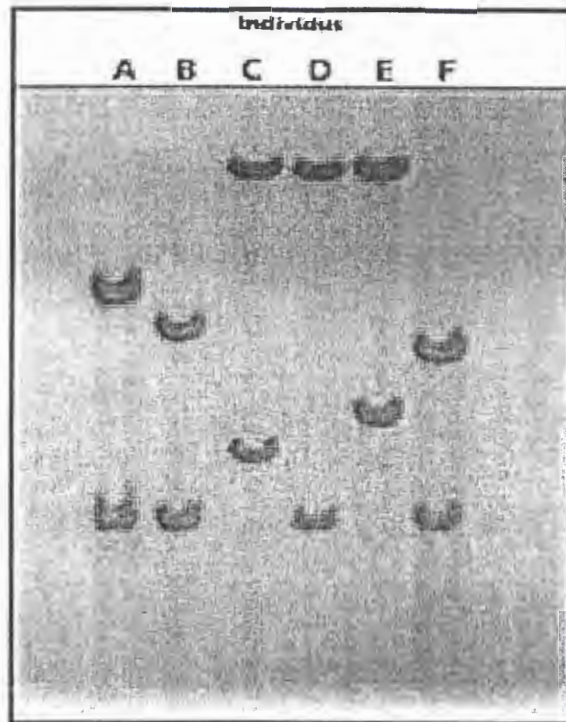


Figure 19. Exemple de l'utilisation de marqueurs RFLP pour distinguer génétiquement les plantes (caractérisation des individus par RFLP). Les marqueurs moléculaires permettent d'établir l'empreinte génétique d'une plante. Elle est caractérisée par une succession de bandes correspondant à des fragments d'ADN. La photographie représente un exemple de profil RFLP. Chaque individu est caractérisé par deux bandes, c'est-à-dire par deux fragments d'ADN. Elles sont bien séparées, ce qui permet une analyse visuelle facile et fiable. Sur la base de ces marqueurs, il est possible de prouver que deux individus sont génétiquement distincts car ils diffèrent au moins par une bande. C'est ce que l'on observe sur la photographie. Les six individus sont tous génétiquement différents

l'ADN est adapté à chaque type de produit. Egalement de couple d'amorces qui permettent d'amplifier spécifiquement le fragment recherché, les conditions d'amplification doivent être optimisées. Et enfin de standards témoins OGM pour interpréter les résultats. Les tests quantitatifs visent à connaître le pourcentage d'OGM présent dans un échantillon en estimant par PCR la quantité d'ADN cible présent dans un échantillon, parallèlement à une gamme étalon. Rappelons que la détermination du pourcentage d'OGM dans un produit fini est définie par rapport à chaque espèce végétale. Pour les OGMs, la méthode de PCR compétitive a été utilisée mais est progressivement remplacée par les PCR quantitatives en temps réel; elle est encore utilisée pour savoir si la teneur en OGM est au-dessus ou en dessous d'un certain seuil [Gachet, 1999].

III.4- Suivi de greffe de la moelle osseuse dans le domaine médical

De plus en plus les biologistes seront amenés à effectuer des diagnostics et pronostics, non plus avec les protéines, produits des gènes, comme ils l'ont essentiellement fait jusqu'à maintenant, mais avec l'ADN. Il s'agit donc de technologies complètement différentes aux méthodes traditionnelles, qui ne peuvent être appliquées dans chaque cas, et elles sont souvent longues et coûteuses. Cet ADN peut être un ADN étranger (bactérie, virus, parasite) ou un ADN humain muté [Etienne, 1999]

Dans certains types de leucémies (cancers du sang), les médecins sont amenés à greffer les cellules de la moelle osseuse. Le choix du donneur est conditionné par la compatibilité des cellules du receveur et du donneur, élément important du rejet de greffe. Les individus les plus proches sont bien sûr les frères et sœurs ou éventuellement les parents. Si ce choix du donneur est le plus satisfaisant pour le souci de compatibilité, il soulève le problème du suivi de l'intervention. En effet, après une irradiation qui va détruire les cellules souches sanguines du receveur, les cellules du donneur est injectée, les praticiens vont devoir diagnostiquer un éventuel rejet. Par les systèmes classiques (HLA au particulier), il est très difficile de différencier deux individus de la même famille (donneur et receveur ont été choisis en particulier pour la compatibilité de leurs systèmes HLA). L'empreinte génétique vient alors au secours du clinicien permettant très facilement de distinguer l'ADN de frères et sœurs et de déterminer si la greffe est stable

(ADN du donneur uniquement), s'il y a une rechute avec la présence d'un chimérisme (c'est-à-dire mélange de l'ADN du donneur et du receveur), ou s'il y a un rejet complet de la greffe (ADN du receveur uniquement) [Serre, 2002].

III.5- Médecine légale

III.5.1- Recherche de paternité et maternité

Si, en règle générale, l'identité de la mère d'un enfant ne pose pas de problème, celle du père peut être d'avantage sujette à controverses. comment déterminer parmi plusieurs hommes lequel est le vrai père de l'enfant, ou comment apporter la preuve que tel homme est bien le père de l'enfant alors qu'il le nie ?

si la recherche d'identité est parfois difficile en raison des condition du prélèvement, il n'en est pas de même pour la recherche de paternité qui est réalisée dans le confort d'un laboratoire de génétique et où le prélèvement est constituée de sang veineux en quantité suffisante [Salmon, 1998]. L'ADN étant transmis par moitié de chacun des parents à ses enfant, l'empreinte génétique trouve une application remarquable dans la recherche de paternité qui relève aussi bien du domaine civil (établissement ou contestation d'une filiation, action à des fins de subsides) que du domaine pénale (affaire de viol et d'inceste) [Serre, 2002]. Dans la recherche de paternité, il ne s'agit plus de comparer entre eux des profils génétiques de deux individus (fig.20), mais de confronter ce d'une mère et de son enfant avec celui d'un homme susceptible d'être le père et que l'on dénomme le (père présumé), on applique aux données observées les règles de la Génétique et on recherche si ce père présumé peut on ne peut pas être le père biologique c'est à dire le père réel, de l'enfant. Il s'agit d'une recherche d'exclusion de paternité, dans laquelle on admet que la mère est toujours la mère.

Si l'exclusion du père présumé est démontrée, l'expertise s'arrête a ce stade et on conclut que l'individu étudié n'est pas le père de l'enfant les empreintes génétiques monolocus améliorent encore les performances et la probabilité d'exclusion tend a ce rapprocher de 1. la valeur d'une probabilité se situe entre 0 et 1. La valeur 0 signifie l'impossibilité, la valeur 1 signifie la certitude. Une probabilité aura donc d'autant plus de valeur, pour affirmer un résultat, qu'elle se rapprochera de 1, mais elle ne pourra jamais atteindre cette valeur. Chacun des systèmes d'empreintes

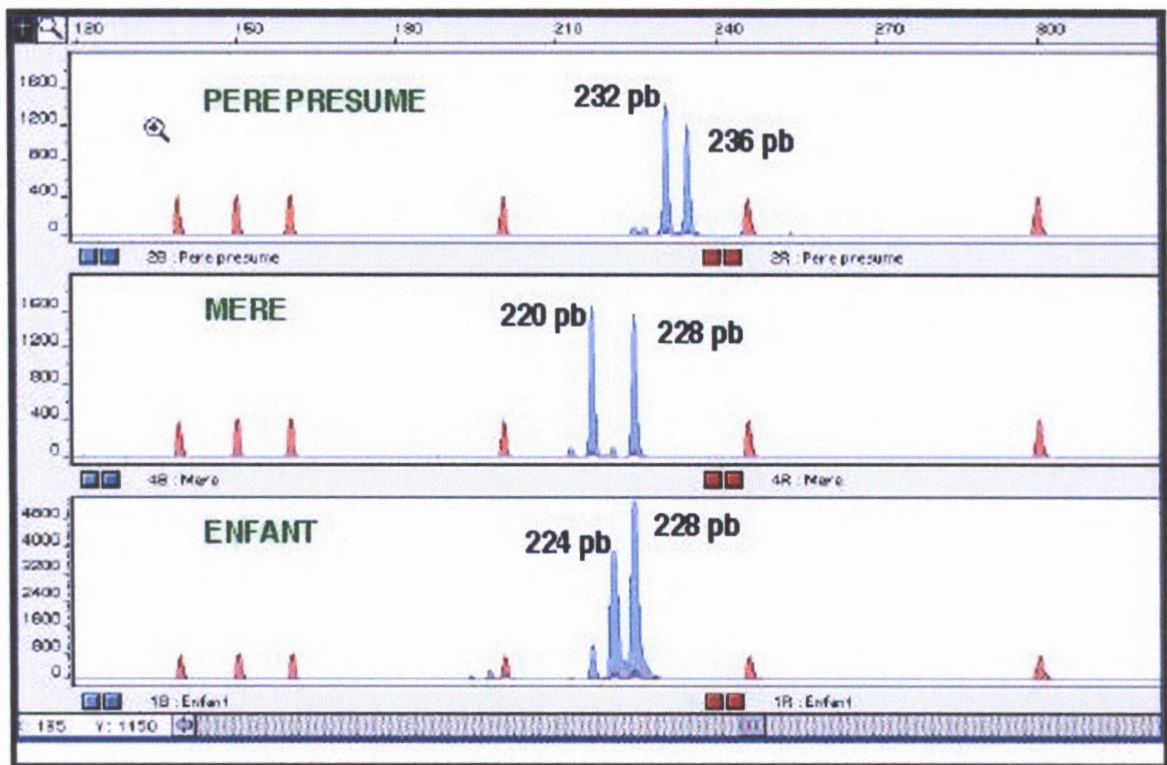


Figure 21. Résultat d'un test de paternité. Un locus microsatellite de type $(CA)_n$ est amplifié par PCR pour chacun des individus testés. Chaque produit de PCR est ensuite analysé sur un séquenceur automatique. L'un des oligonucléotides ayant servi à la PCR est marqué par fluorescence, ce qui rend le produit de PCR détectable sur un séquenceur automatique (pics de couleur bleue). Les pics de couleur rouge correspondent à un marqueur de poids moléculaire. Un fragment de taille 232 pb correspond à 12 répétitions du motif CA. Génotypes: père présumé 12/24; enfant 8/10.

génétiques monocus donne, à lui seul, une probabilité d'exclusion située entre 0,7 et 0,9. Un ensemble d'une dizaine de systèmes atteindra donc sans difficulté des valeurs de l'ordre de 0,99, ce qui est tellement proche de la certitude que l'on est alors pratiquement assuré de découvrir une exclusion de paternité quand elle existe, quand le père présumé n'est pas le père réel [Salmon, 1998].

Si l'on dispose des profils du père présumé, et de l'enfant, la méthode d'identification de la mère est similaire à celle du père: on retire du profil génétique de l'enfant tous les éléments en provenance du père présumé, il reste alors les caractéristiques qui provient de la mère; on peut déterminer alors un lien avec plusieurs générations en particulier on s'appuyant sur l'analyse de l'ADN_{mt} qui permet de tracer d'une génération à l'autre par la lignée maternelle. Plus précisément, tous les individus de la même lignée maternelle auront le même ADN_{mt}, de même, on aura des fréquences spécifiques de caractéristiques sur les chromosome Y qui vont se retrouver de père en fils. En effet, la pertinence de rapprochement de deux profils génétiques à l'aide de l'ADN_{mt} est beaucoup plus faible que dans le cas de l'ADN_n, par ailleurs, si on a des suspects qui sont de la même lignée maternelle, on aura plus de difficulté à les repérés à l'aide de l'ADN mitochondriale, par conséquent, le recours à cet ADN_{mt} peut être utile quand on ne dispose pas d'autre indices [Serre, 2002].

III.5.2- Recherche de parenté biologique

La précision des tests de parenté biologique va reprendre du niveau de rapprochement de la relation parentale sur laquelle on veut enquêter (plus la parenté est éloignée, plus la probabilité est faible), de l'information génétique additionnelle dont on dispose (plus on analyse de membres de famille, plus la probabilité est élevée), et les marqueurs génétiques analysés (plus il y a des marqueurs, plus la probabilité est élevée) [Serre, 2002].

Par ailleurs, il faut, dans certains cas; avoir recours à l'étude de l'ADN mitochondrial ou chromosome Y, pour pouvoir atteindre un niveau de probabilité suffisant. En principe, il suffit d'étudier deux individus pour réaliser un test de parenté (oncle-neveu, grand père- petit fils). Cependant, dans la plupart des cas, si l'on étudie

d'avantage (la mère, un autre oncle, la grande mère) on obtient plus d'informations génétiques, ce qui a des conséquences sur l'évaluation statistique du test, et les probabilités sont plus élevés.

Quand il s'agit de frères jumeaux univitellins monozygotes; ils partagent la même information génétique, ce sont en quelque sorte des clones et il est donc impossible de les distinguer par le test ADN. En revanche, les jumeaux bivitellins dizygote, peuvent être eux distingués par la voie génétique car ils sont aussi ressemblants que des frères normaux, le test d'ADN peut servir à les distinguer [Salmon. 1998, Egusquiza. 1995].

III.6- Domaine archéologique

Depuis une dizaine d'année, l'extraction et l'amplification d'ADN à partir des restes anciens de plantes et d'animaux ont été rendues possibles grâce au développement des techniques de la biologie moléculaire. Cependant, la découverte de molécules biologiques dans des tissus fossiles est ancienne. En 1914, deux chercheurs français, Neuville et Gautrelet, étudient le sang d'un mammouth congelé et identifient un produit de transformation de l'hémoglobine, l'hématine. Dans les années 1950, l'analyse par chromatographie permet la mise en évidence de molécules biologiques dans les archives fossiles: protéines, acides aminés, lipides,...etc. Mais la découverte d'acides nucléiques porteurs d'informations phylogénétiques ne date que dès 1984 avec l'étude de restes naturalisés de quagga (espèce fossile d'équidé sauvage, exterminée d'Afrique en 1883 et paraissant combiner des traits de cheval et de zèbre) et celle d'une momie égyptienne vieille de 2500 ans [Scriban, 1999]. Depuis lors, la recherche sur l'ADN fossile est une activité scientifique très médiatisée, a quoi peut-on alors servir l'ADN fossile ?. Les applications sont nombreuses et variées aussi bien en archéologie ou en paléontologie. L'ADN peut servir à caractériser un individu par son empreinte génétique en utilisant des séquences nucléotidiques très variable, ou encore à établir des liens de parenté entre individus.

L'identification d'un individu est fréquente dans des contextes historiques ou d'investigations policières (comparaison de l'ADN d'une victime non identifiée

avec les parents présumés), il est également possible de déterminer le sexe d'un individu grâce à des séquences spécifiques du chromosome Y (caractéristique du sexe male) ou des gènes dont la taille varie en fonction du sexe. En 1995 une équipe de l'université de Jérusalem a étudié le sexe de plusieurs squelettes de nouveau-nés (age de moins d'un jour) de la fin de l'époque romaine au début de l'époque byzantine, pour essayer de comprendre l'infanticide dans les sociétés passées. Contre toute attente, les nouveau-nés étaient majoritairement de sexe masculin [Paabo, 1993].

Certaines analyses peuvent porter sur des espèces animales: ainsi, en 1995, on a pu identifier les différentes espèces dont la peau avait été utilisées pour la fabrication des parchemins de la mer morte. Si certaines maladies sont parfois repérables sur les ossements, les agents pathogènes (virus, bactéries,...) ne peuvent être détectés grâce à des analyses moléculaires [Scriban, 1999].

La première étude de paléontologie a porté, aux *Etats-Unis*, sur la maladie de Lyme, maladie neurologique causée par une bactérie, et transmise par des tiques. L'ADN bactérien a été retrouvé dans des tiques conservées dans l'alcool trente ans avant la description de la maladie [Barriel, 1999]. Le virus du SIDA a été identifié dans les tissus d'un marin de Manchester mort d'une pneumonie en 1959, et la tuberculose a été mise en évidence, en Amérique du sud, à l'époque précolombienne. En 1995, 150ans après sa mort, les yeux de Jhon Dalton ont pu être analysés: la déficience visuelle du découvreur du daltonisme était liée à l'absence du gène MW opsine [Geigl, 1997]. Dans une perspective d'évolution moléculaire, les séquences peuvent servir à déterminer les relations de parenté entre espèces actuelles et fossiles. La première étude publiée sur l'ADN fossile, a permis, à partir d'une peau naturalisée de 140 ans, de construire un arbre phylogénétique fondé sur des données moléculaires [Humtetal, 1995].

Chapitre IV

IV- Conclusion et discussion

On appelle empreinte génétique le profil génétique d'un individu. Ce profil génétique n'est guère qu'une série de paires de numéros d'allèles, pour chacun des marqueurs ou systèmes génétiques analysés. L'empreinte génétique d'une personne est unique et reste invariable au fil de sa vie; elle sert donc à identifier les individus d'une manière beaucoup plus faible que l'empreinte digitale. Les techniciens offrent à ceux qui le sollicitent la possibilité d'obtenir leur propre carte en 24 heures à peine. Quand on dit l'empreinte génétique de chaque individu est absolument unique, on pense à l'ensemble du génome. Le procédé dit « empreinte génétique » permet l'identification de l'homme, mais aussi la connaissance de ses caractéristiques génétiques de manière si précise que, dans un avenir proche, on pourra prédire sa vie médicale, on remet alors, en question la fiabilité de ces techniques par de nombreux exemples, comme les tests d'ADN en médecine légale. Cependant, on choisit des régions non codantes de l'ADN extrêmement variable d'une personne à l'autre. Il y a donc très peu de chance que deux personnes (autre que des vrais jumeaux) portent exactement les mêmes séquences et présentent la même empreinte génétique pour les régions que l'on soumet au test. Le développement des techniques d'hybridation moléculaire (southern blotting) puis de l'amplification génique in vitro (PCR) a permis de travailler au niveau du génome et de s'affranchir des problèmes d'identification des individus.

Au sujet de taux de fiabilité de la méthode, on affirme que le 100% n'existe pas, on peut parler en pourcentage, mais le plus courant, c'est de dire qu'il y a une personne sur million, par exemple, qui présente un gène précis. Les chiffres varient, tout dépend de la rareté de gènes. Cependant on cherche à diminuer ce problème, comme on est jamais à l'abri d'une contamination, certains laboratoires sont dotés des empreintes génétiques de tous les manipulateurs afin de les comparer systématiquement aux résultats douteux, pour s'entourer d'un maximum de sécurité, deux tubes à essais subissent le même traitement que ceux qui contiennent l'échantillon. Le tube blanc est vide. Si, à la fin de l'analyse on y détecte de l'ADN c'est qu'il a été contaminé dans le laboratoire. Le second tube contient de l'ADN connu. Si l'empreinte génétique obtenue à partir de ce tube ne correspond pas à celle qu'on attendait, cela signifie que la PCR a aussi amplifiée de l'ADN contaminant. On trouve aussi d'autres erreurs, dues par

exemple, à l'inattention (mauvais étiquetage des échantillons), ou au contraire, à des erreurs délibérées, lors d'une recherche de paternité. La discussion porte sur le comportement des médecins généticiens face à la découverte fortuite d'une fausse paternité. Tout d'abord, il est important de rappeler, des examens des caractéristiques d'un individu présentent des particularités puisqu'elles sont à la fois des éléments constitutifs de l'individu en tant qu'être unique et des éléments qui relient l'individu à sa famille, passé, présent, et avenir. Leurs examens et leurs révélations touchent l'individu dans sa nature biologique intime, et dans ses attaches avec les siens. Ainsi, l'analyse éthique doit tenir compte de ce double rapport de l'individu à lui-même, et à sa famille.

La recherche de paternité est un acte grave, dont les conséquences psychologiques, sociales, juridiques, peuvent être considérable. Cependant elle constitue une démarche courante dans la recherche génétique humaine. Le père biologique, l'étude d'une famille humaine à des fins scientifiques commence toujours par une étape pudiquement appelée: « validation des données », il s'agit en fait de vérifier la paternité, ce qui peut entraîner des surprises, mais une exclusion découverte dans ces conditions demeure un secret médicale.

Lors d'un test génétique, on entre, bien plus que dans tout autre examen médicale, dans l'intimité corporelle d'une personne avec toute les significations qu'elle y attache et qui sont en rapport avec son identité physique, la plupart des généticiens sont contre le fait de faire signer préalablement au test un consentement par la mère, en lui expliquant en privé et à l'avance ce que peuvent révéler les examens, ils refusent également l'idée de demander aux couples qui devrait informer d'une fausse paternité. De plus, il paraît claire que l'information demandée par le couple, était leur chance d'avoir un enfant non atteint de la maladie transmissible, et non de savoir si le père était bien le père du premier enfant. D'un autre point de vue, en quoi l'enfant qui jusque là a vécu heureux avec l'homme qui était avec sa mère, a le besoin de savoir que ce n'est pas son père. En effet, aux liens génétiques s'ajoutent des liens affectifs et sociaux qui ont également toute leur importance.

L'analyse de l'ADN mitochondriale, malgré une automatisation importante reste longue et coûteuse. Son pouvoir discriminant n'atteindra jamais celui de l'ADN nucléaire. Cependant sa détermination apporte des indications précieuses sur des éléments qu'il était impossible jusqu'à présent d'analyser comme les cheveux, et les ossements. L'interprétation des résultats doit être extrêmement prudente et les limites de l'analyse doivent être expliquées au magistrat. (DIAG.GENE), C'est aux U.S.A et en Grand Bretagne que les premiers fichiers d'empreintes génétiques apparaissent. Les Anglais prennent de l'avance en caractérisant tout individu ayant commis un crime ou un délit. Mais à quel prix ! Un investissement intellectuel et financier énorme, mais un fichier d'une puissance extraordinaire. La base de données est gérée par le Forensic Science Service, organisme privé sous contrat avec l'état anglais. Dans le reste de l'Europe, les gouvernements sont plutôt fileux et peu ont passé le pas.

D'après notre point de vue générale, la méthode d'empreintes génétiques a fut développée plusieurs domaines; judiciaire, médicale, microbiologique,..., dont l'expert peut identifier une personne à partir d'une trace de sang par exemple, à fin de pouvoir admettre son identité comme dans le cas de meurtre, identifier un cadavre, ou dans une recherche de paternité. Les techniques d'empreintes génétiques ont values un grand succès et intérêt , surtout dans les pays européens ; par contre, ici en Algérie, on n'a pas les moyens pour l'utiliser, et même si on les avez, elle est complètement refusée, surtout dans les tribunaux, on l'apprend pas comme un vrais indice qui pourrait innocenter ou accuser des suspects, ainsi, on trouve que cette technique est moderne, utilisable et efficace, malgré sa nouvelle apparition, et les risques d'erreurs qu'on rencontre au moment des prélèvement ou de manipulation .

La Biologie Moléculaire est profondément marquée par la technique d'analyse de l'ADN, cette dernière est alors devenue une aide irremplaçable, en raison de leur rapidité, la capacité à déterminer simultanément les empreintes génétiques d'un grand nombre de personnes et leur utilisation sur des quantités restreintes et parfois dégradés de matériel biologique. C'est en effet, à l'époque d'Alec jeffreys, que ce jeune chercheur montre que l'ADN d'un individu peut apparaître sous forme

d'une image « code » qui est unique pour chacun d'entre nous., utilisant cet outil pour identifier un meurtrier ayant laissé du sperme sur une scène de crime. Il montrait la puissance de l'arme biologique, complément indispensable des techniques classiques d'enquête. Depuis cette période, une très longue route a été parcourue propulsant sur le devant de la scène d'empreinte [Etienne, 1999].

La technique d'empreinte génétique a bénéficiée de certaine réaction appelée PCR, qui présente de nombreux avantages. Tout d'abord, elle nécessite très peu de matériel comme il a été mentionné précédemment, quelques nanogrammes d'ADN contenu dans un échantillon de sang ou de tissu sont suffisants pour le diagnostic par PCR. Ce dernier peut être fait à partir d'un échantillon microscopique de tissu fœtal dans les maladies prénatales et postnatales. L'empreinte d'ADN est maintenant utilisée pour résoudre le problème de parenté dans plus de 3000 cas d'immigration chaque année. Elle y ait également utilisée comme un outil en médecine légale ; pour la recherche de paternité, pour une enquête sexuelle ou lors d'événement tel que les accidents, les attentats ou catastrophes naturelles. Le scientifique ou l'expert une part de la vérité. Il est capable d'identifier le propriétaire d'une trace biologique et son rapport s'arrête là. Ce n'est pas à lui de démontrer la culpabilité d'un individu. Ce rôle est tenue par le jury de la cour d'assise qui écoutera tous les éléments rassemblés par le juge d'instruction au cours de l'enquête. L'ADN n'est q'un des éléments de l'immense et l'oublier serait donner aux scientifiques ou aux experts un pouvoir qu'ils n'ont pas le droit de détenir. La découverte de l'ADN et de ses polymorphismes a fait avancer, d'un pas de géant, la génétique depuis un demi siècle. Le domaine de la justice en bénéficie pleinement par les empreintes génétiques qui sont, sans être la reine des preuves, une aide énorme pour la protection de notre société dans la recherche de la variété en minimisant le risque d'erreurs.

En fin, la technique d'empreinte génétique est extraordinaire, qui continue à se développer de façon rapide et constante. Récemment, des chercheurs qui travaillent dans des grands laboratoires, ont pu réaliser des puces spécifiques qui correspondent aux profils génétiques de chaque individu, où chaque scientifique a le droit d'entrer à ces grands laboratoires de recherche.

Références

Références

- Alemars J P. La dontologie médicale. (1997).
- Androge C, BostanA, DelacroiseA et Steuve S. Printemps des sciences. (2005).
- Barriel V. l'ADN ancien. La science au présent encyclopédia universalis. (1997), p135-139.
- Barinage. DNA finger printing database to finger criminal. (1998), p331- 203.
- Bernot A. L'analyse des génomes. (1999), p9-10.
- Berry J L et Clément. Science légale et police scientifique. (1987):
- Bertheau Y et Diolez A. les aliments passés au crible. (1999), p 28-192.
- Boury S et Mabeau. Sélection variétal: l'exemple du chou fleur. (1996), p 172.
- Broeck T D, Smith D W et Madigan M T. Biology of microorganisms. (1988).
- Cabal C. La valeur scientifique de l'utilisation des empreintes génétiques dans le domaine judiciaire. (2001), p 267-268.
- Caboche M. Les génomes des plantes livrent leurs secrets. (1999), p 34-172.
- Dermot O. Romanov Riddle: DNA Tests Identify Bones of Czar and Family. (1993), p 6-7. (Le mystère de la princesse Anastasia demeure non résolu).
- Dumez Y et Benachi A. Médecine foetale et diagnostic prénatal. (2004), p 280.
- Egusquiza. The legal role of biological proof and refusal to undergo testing in investigation of paternity, law and human gen. (1995), p 8-67.
- Elrod S et Stansfield.génétique. (2003), p 428-2003.
- Etienne J. Biochimie Biologie Moléculaire. (1999), p 309-402.
- Fournier J G. Histologie moléculaire. (1994), p 32.
- Gachet Eet martin G G.Detection of genetically modified organismes (GMOs) by pcr a brief review of methodologies available. (1999), p 9-388
- Geigl E M. L'émergence de la paléogénétique. (1997), p 34-164.
- Gill P, Jeffeys A J, Werrest D J. foringn application of DNA finger prints. (1985), p 318-579.

- Guirand J P. Génétique microbienne. (1993), p 247.
- Hopwood D A. Genetic analysis in microbiology. (1992).
- Humtetal D M. The chimistry of Jhon Dalton's color blindness. (1995).
- Inman et Rudin N. An Introduction to Forensic DNA Analysis, *CRC Press*. (1997), p 48.
- Josué F, Fellous M et Solignac M. Principe de génétique humaine. (1998), p 338.
- Karp G. Biologie Moléculaire et Cellulaire. (1998), p 435-446.
- kawchuk L, lynch D, Thomas J, Penner B, Sillito D et kulkcsar f. characterisation of solanum tuberosum simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. (1996), p 73-335.
- Ludes B et Mangin P. Les empreintes génétiques en médecine légale, technique et documentation. (1991).
- Maftah A et Raymond J. Biologie Moléculaire. (1999), p 116.
- Morange M. Histoire de la Biologie Moléculaire. (2003).
- Moulessehoul S. Biologie Moléculaire. (2004), p 1-7.
- Paabo S. L'ADN des fossiles, pour la science. (1993).
- Rimrose S P, Twyman R et Old R. Principe de génie gnétique. (2004), p 22.
- Rossignol J L. Génétique gène et génome. (2000), p 34.
- Rouger P. Les empreintes génétiques. (2000), p 40.
- Saikir k, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn GT, Erlich H et Amheim N. Enzymatic amplification of B- globin genomic sequences et restriction site Analysis for diagnosis of sickle cell anemia. (1985), p 230-1354.
- Salmon C. Des groupes sanguins aux empreintes génétiques. (1998), p 43-52.
- Sauramps M. Diagnostic anténatal et devenir. (2006), p 411.
- Scriban R. Biotechnologie. (1999), p20-22.
- Serre J L. Les diagnostics génétiques. (2002), p 273.
- Vienne D. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologie végétale. (1998), p 16-22
- Yves M. Petit larrousse de la médecine. (2002), p 244- 245.

Résumé :

La Biologie Moléculaire a donnée naissance a une invention importante, appelée : empreintes génétiques ; qui a été développée en 1985 par le pionnier Alec Jeffreys. L'établissement des empreintes génétiques peut s'effectuer, en appliquant un protocole bien précis d'analyse du polymorphe d'ADN, c'est-à-dire des régions de l'ADN non codantes et variables d'un individu à l'autre, appelées : minisatellites et microsatellites. Il y a deux principales techniques employées pour analyser l'ADN; la RFLP qui consiste à une digestion de l'ADN par une enzyme de restriction, suivie par une électrophorèse une révélation des bandes d'ADN spécifiques à aux différents fragments d'ADN. La PCR assure une amplification en plusieurs copies d'une région ciblée à l'aide d'une amorce et une enzyme polymérase, pour effectuer les profils génétique. Les applications des empreintes génétiques sont multiples et diverses, on citera comme exemple : l'identification des individus, la recherche de paternité, de la maternité et la parenté biologique.

Summary:

Molecular Biology gave birth to an important invention, named : genetic profiling; which has been developed in 1985 by the pioneer Alec Jeffreys. The establishment of a genetic profiling can be carried out by applying a quite precise protocol to the DNA samples. This technique is based on the analysis of DNA polymorphisms which are non coding and variable DNA regions, called: mini-satellites and micro-satellites. There are two principals techniques used to analyse DNA: the RFLP which consist to digestion of the DNA by restriction enzymes, followed by an electrophoresis and detection of a specific DNA bands corresponding to the different DNA fragments. The PCR is the second technique, it ensure an amplification of target DNA area and carry out the genetic profiles. There are many and variable applications of the genetic profiling, such as identification of persons, maternity affiliation and rib profeling.

المخلص :

البيولوجيا الجزيئية أعطت دفعا لاكتشاف مهم يدعى: البصمات الوراثية و التي اكتشفت من طرف العالم ALEC JEFFREY سنة 1985. إن الحصول على البصمات الوراثية يعتمد على معالجة جد معددة لنماذج من الـ ADN المدروس، تحليل هذا الأخير يرتكز على مناطق متغيرة من شخص لآخر، متعددة المظاهر وغير مشفرة تدعى minisatellites و microsatellites. توجد طريقتان رئيسيتان للحصول على البصمات الوراثية: RFLP : تستخدم تقسيم الـ ADN من طرف إنزيم enzyme de restriction متبوع بتطبيق للصيغة الكمبرائية و كشفه يعكس هذه البصمات على شكل أشرطة مميزة لمنتج تجاري خاصة بالـ ADN المدروس. PCR : يضمن تضاعف عدة نسخ من مناطق مستهدفة من الـ ADN اعتمادا على بادئاته و إنزيم polymérase تطبيقات البصمات الوراثية متعددة و متنوعة نذكر منها تحديد هوية الأشخاص، تحديد الأبوة، الأمومة والقرابة البيولوجية، كذلك تشخيص بعض الأمراض وكشف النباتات المغيرة جينيا.