

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA  
Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques  
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme  
Master en Sciences de la nature et de la Vie  
Filière : Biologie  
Option : Génétique & Physiologie

## Extraction de l'ADN à partir des dents anciennes par la technique Phénol-Chloroforme

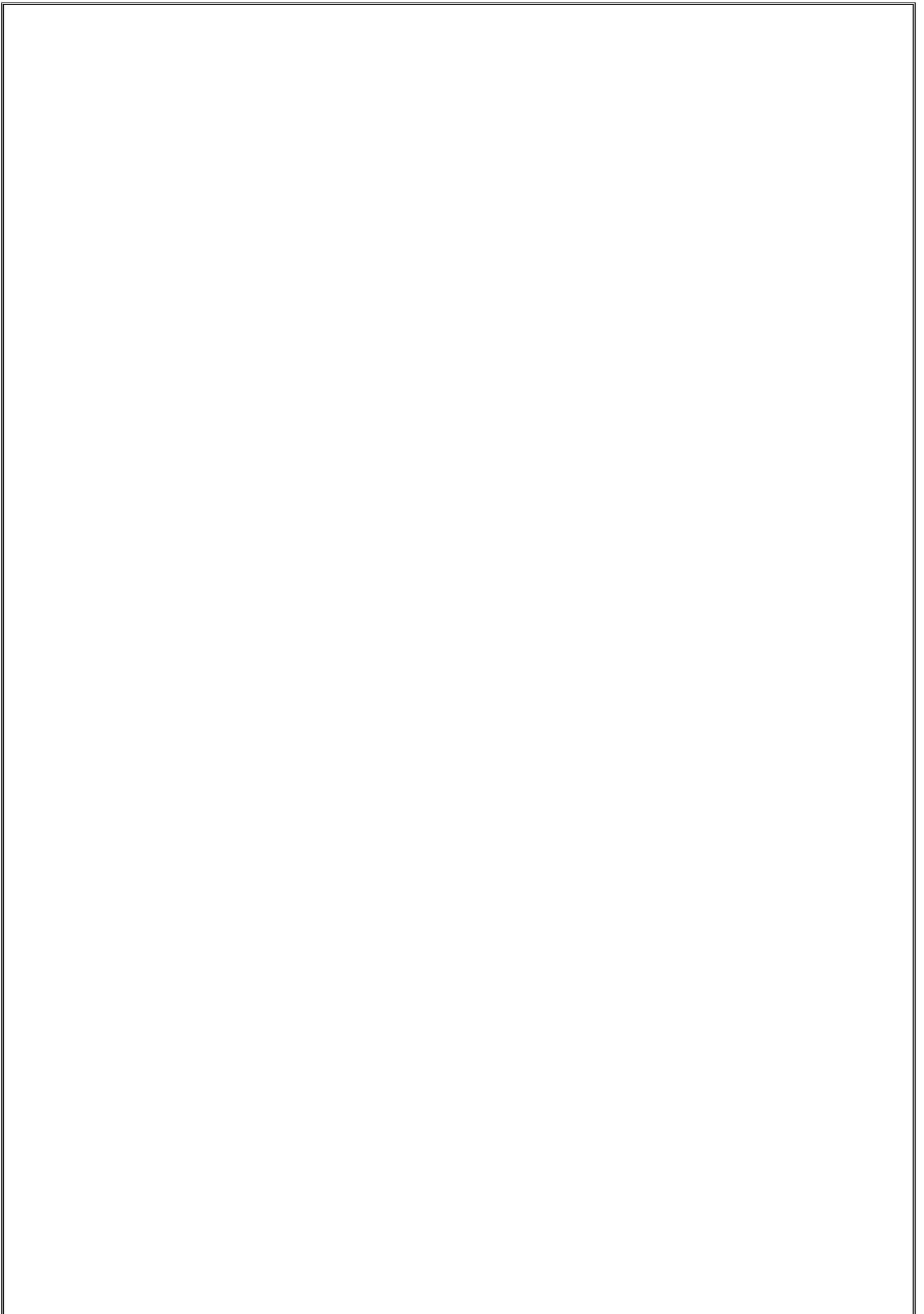
**Présenté par :** Hadjer BITOUR

*Date de soutenance*  
10/12/2012 à 14:30h

**Les membres du jury :**

M<sup>r</sup> R. MOHAMED SAID -MAA: Président  
M<sup>me</sup> A. CHERRALLAH -MAA: Promotrice  
M<sup>r</sup> S. KEBACHE -MAA: Co-promoteur  
M<sup>r</sup> N. BENYAHIA -MAA: Examineur  
M<sup>me</sup> A. AISSANI -MAA: Examineur

Promotion : 2011/2012



## Remerciements

« Louange à Allah, Seigneur des univers » ..

Cette passade de « mémoire » aura certainement été un chapitre important de ma vie, j'aimerais remercier ceux et celles qui, d'une manière ou une autre ont participé à son écriture.

En tout premier lieu, je tiens à remercier tout particulièrement ma promotrice, Amira Cherrallah, sans qui ce travail n'aurait jamais pu magnifiquement aboutir, pour la qualité de son encadrement, sa gentillesse, son énergie incroyable, son enthousiasme, sa disponibilité, sa patience, ses précieux conseils et surtout ses qualités humaines!..Ce fût un réel plaisir de travailler sous sa guidance et d'apprendre à son contact, Il est vraiment impossible pour moi de lui exprimer toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance. « Thanmirth » infiniment !

Je tiens à remercier ensuite Mr KEBACHE Sofiane pour m'avoir accueillie au sein de l'INCC,..., pour sa confiance, sa générosité, sa bonne humeur et surtout son aide inconditionnelle.. J'ai toujours cru que « les gens du bien » existent encore, MERCI de me l'avoir confirmé, mOn Commandant !

J'adresse aussi ma gratitude aux membres de jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce modeste travail. Qu'ils soient assurés de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

Mes plus sincères remerciements vont également à tous mes enseignants tout au long de mes études, je me permets là d'exprimer ma gratitude plus spécifiquement aux "piliers" de la faculté de biologie:

"" Mr. Med Brahim Errahmani ---- La probabilité qu'au moins un enseignant lui ressemble est quasiment nulle!"

"" Mr. Ramdane Med Said ---- Désolée Mendel, mais c'est bien lui notre " père de la génétique ! "

"" Mr. Mustapha Oumouna ---- Une gloire « innée » , "ce n'est pas donnée à tout le monde" ! "

"" Mr. Nourdinne Benyahya, ---- Un prof qui ne se clone pas ! ""

Un **Merci** énorme à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

## Résumé

L'identification génétique à partir des ossements reste encore à l'heure actuelle, un défi de taille pour les criminologues. Le principal objectif de ce travail de mémoire a été de déterminer l'éventualité de l'obtention des profils génétiques à partir des restes humains ayant subi des dommages dans le temps, aux fins d'identification.

Pour appréhender cette problématique, nous avons étudié six spécimens osseux anciens provenant de différents restes squelettiques non identifiés. Des analyses génétiques ont été menées sur ces échantillons, et pour ce faire, nous avons utilisé une approche récente en criminalistique ( PowerPlex®16HS ) combinant l'étude de plusieurs marqueurs génétiques informatifs à l'aide des méthodes classiques de la génétique plus ou moins modifiés (Extraction, quantification et analyse de l'ADN), en accord avec les protocoles internes du laboratoire de réalisation du travail.

Nous avons eu la possibilité de déterminer des profils génétiques (plus ou moins partiels) pour le tiers des individus analysés. A partir de ces résultats, nous avons pu témoigner de la difficulté de l'étude de l'ADN ancien même à partir d'un matériel biologique de choix (dents) en raison de ses enjeux, liés non seulement à sa dégradation et sa forte contamination par de l'ADN étranger, mais aussi à la présence d'inhibiteurs pouvant entraver son analyse.

Il apparait ainsi évident que de nombreuses études sont encore nécessaires pour retracer finement le processus de préservation de l'ADN au sein des échantillons osseux afin de faire face aux contraintes empêchant son analyse.

## Abstract

The genetic identification from bones stills currently a big challenge for criminologists. The main goal of this work is to determine the possibility to obtain genetic profiles from degraded human remains to identification. To address this issue, we've studied six old specimens from different non identified skeletal remains.

Genetic analysis was carried out on these samples, for that, we've used a recent approach in criminalistics (PowerPlex 16HS) combining the study of several informative genetic markers using the classical methods of genetics less or more modified (Extraction, quantification and DNA analysis).

We could determine the genetic profiles (more or less partial) for one of the third of the analyzed old individuals. From these results, we can testify of the difficulty to study ancient DNA because of its challenges, not only related on its degradation and strong contamination by foreign DNA, but also to the presence of inhibitors which can block its analysis.

It appears thus obvious that many studies are still necessary to determine finely the process of the preservation of DNA within the osseous samples in order to face these enemies, preventing its analysis.

## المُلخَص

لأ تزال عملية تحديد الهوية الجينية من العظام إلى اليوم تحدياً لعلم الجريمة. الهدف الرئيسي من هذا العمل هو تحديد مدى إمكانية الحصول على " البصمة الوراثية " من البقايا البشرية التي تعرضت للتلف مع مرور الوقت لأغراض تحديد الهوية.

للإجابة على هذا التساؤل قمنا بدراسة ست عينات من عدة هياكل عظمية قديمة مجهولة الهوية ، لهذا استخدمنا تقنية حديثة (الباوريلكس 16) التي تعتمد على دراسة عدة " علامات جينية " ذات دلالة ، مع استعمال الأساليب التقليدية لعلم الوراثة ( إستخراج الحمض النووي تحديد كميته و تحليله ) .

أتيح لنا إمكانية تحديد الهوية الجينية ( أقل أو أكثر جزئية ) لثلاث العينات المدروسة . من خلال هاته النتائج إستطعنا أن نُثَمِّن صعوبة دراسة الحمض النووي القديم بسبب ميزاته الغير مُقتصرة فقط على تدهوره والعدوى الخارجية ولكن أيضاً وجود المثبطات القادرة على منع تحليله.

يبدو واضحاً أنه لا تزال هناك الحاجة إلى العديد من الدراسات لتحديد العملية الدقيقة لحفظ الحمض النووي داخل العينات العظمية بهدف مواجهة أعدائه التي تمنع تحليله.

## Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>
--------------------------	-----------

### **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

<b>I. Identification par l'ADN.....</b>	<b>02</b>
I .1. Origines du matériel génétique dans les analyses médicaux légales.....	03
I .2. Analyse de l'ADN.....	04
I-2-1. La nature des profils rencontrés.....	06
<b>II. Marqueurs génétiques.....</b>	<b>07</b>
I .1. Les régions polymorphes de l'ADN.....	08
I .2. Les marqueurs spécifiques utilisés en médecine légale.....	10
<b>III. Limites de l'analyse de l'ADN ancien.....</b>	<b>12</b>

### **Chapitre II : Matériel et méthodes**

II .1. Matériel .....	19
II .1. 1. Matériel biologique.....	19
II .1. 2. Matériel non biologique.....	20
II .2. Méthodes.....	21
II .2.1. Préparation des échantillons et extraction de l'ADN.....	21
II .2.2. Quantification par Rt-PCR.....	22
II .2.3. Amplification des marqueurs STR par PCR.....	23
II .2.4. Séparation des produits PCR par le séquenceur ABI prism 3130xl.....	24
II .2.5. Interprétation des résultats et établissement des profils génétiques par GeneMapper.....	25

### **Chapitre III : Résultats**

III.. Résultats .....	27
-----------------------	----

### **Chapitre IV : Discussion**

IV.. Discussion.....	35
----------------------	----

<b>Conclusion .....</b>	<b>41</b>
-------------------------	-----------

**Références bibliographiques**

**Annexes**

# **Introduction**

## Introduction

L'histoire de la justice est émaillée de découvertes scientifiques qui constituent autant de pas dans le sens de la preuve voulue irréfutable (Deutremepuich, 1998). La lutte contre la criminalité a connu ces dernières années des avancées sans précédent, notamment en biologie. Aujourd'hui, l'analyse génétique est l'une des méthodes clés pour une identification dans le cadre d'une enquête judiciaire. Qu'elle se nomme « empreinte génétique », « profil génétique », « profil ADN » ou « empreinte ADN », l'analyse de l'ADN mise au service de la justice est un outil fascinant du point de vue technique, performant du point de vue policier, bénéfique du point de vue judiciaire (Coquoz, 2003).

L'établissement d'empreintes génétiques est utilisé en sciences médico-légales à des fins d'identification grâce à un principe essentiel de la génétique : l'unicité biologique des individus (Doutremepuich, 1998). Chaque être humain se distingue de ses semblables par un ensemble de caractéristiques morphologiques et biologiques qui rendent son identification possible. Qu'il s'agisse de personnes disparues, de grandes catastrophes ou de cadavres non identifiés, l'ADN peut permettre l'identification.

Par ailleurs, dans presque toutes les scènes de crime, des indices sont retrouvés et la police scientifique dispose de suffisamment de moyens techniques et scientifiques pour pouvoir les exploiter. Nous pouvons citer la célèbre citation d'Edmond Locard (le père fondateur de la criminalistique) : « Nul individu ne peut séjourner en un point sans y laisser la marque de son passage ». En effet, l'ADN est devenu l'indice numéro 1 pour toute enquête criminelle. C'est un instrument puissant retrouvé dans toutes les cellules nucléées permettant effectivement de résoudre l'énigme de l'identité afin de prouver la culpabilité ou l'innocence d'un individu (Lomhoff, 1987).

Toutefois, lors de la découverte des restes squelettiques non identifiés, les ossements se présentent comme un matériel de choix permettant l'obtention et l'analyse de l'ADN. Cependant, les caractéristiques de l'ADN ancien sont à l'origine de nombreuses problématiques rendant ainsi son exploitation pas toujours efficace. L'objectif très général de ce travail de mémoire a donc été de connaître la limite de la méthode d'extraction organique dite phénol-chloroforme isoamylique à partir des ossements ayant subi des dégradations dans le temps afin d'apporter des correctifs sur cette technique et de limiter l'intervalle de temps de la réception des échantillons pour ce type d'analyse .

La première partie de ce mémoire sera consacrée à la mise en place du contexte général de l'identification par l'ADN incluant les étapes de l'établissement d'un profil génétique et les marqueurs étudiés en criminalistique, ainsi que les caractéristiques principales de l'ADN ancien, essentielles pour comprendre la nature des études réalisées. Dans la deuxième partie, le matériel analysé, de même que les méthodes et l'ensemble des protocoles d'analyses utilisés pour cette étude seront décrits. Enfin, après la présentation des principaux résultats obtenus dans la troisième partie, ces derniers seront remis dans leur contexte et discutés dans la quatrième partie de ce travail de mémoire.

# Chapitre I :

## **Synthèse Bibliographique**

## I. Identification par l'ADN

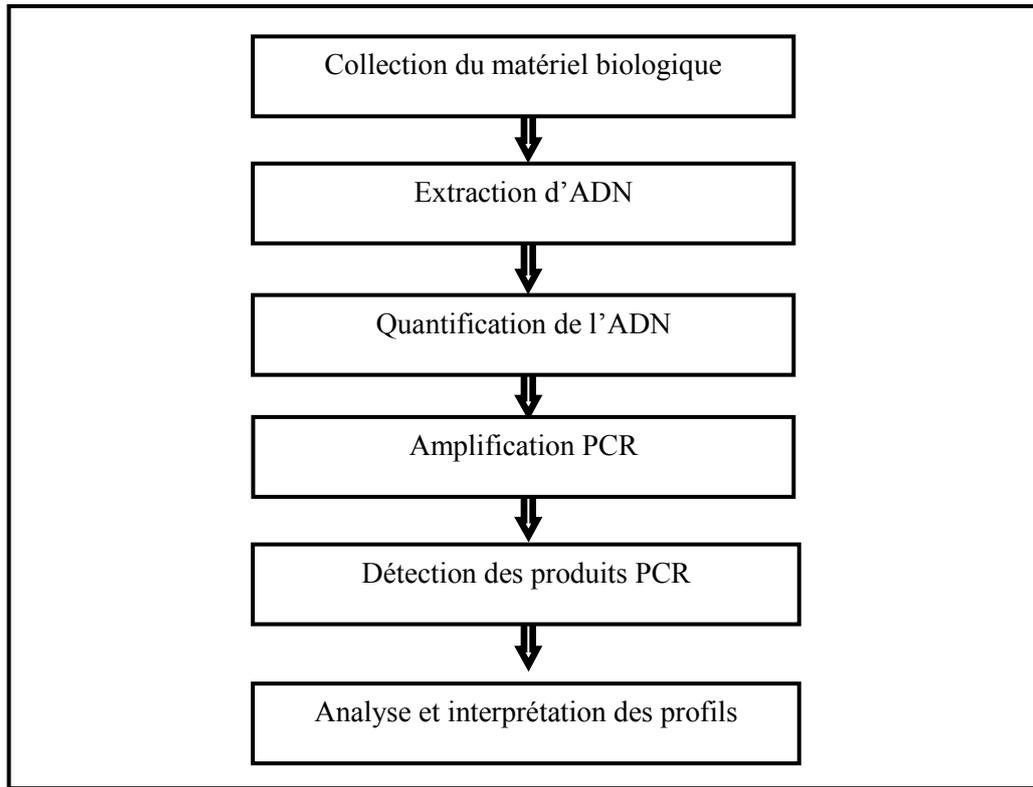
L'analyse génétique, à des fins médico-légales pour les crimes, est révolutionnaire. Les éléments de preuve à caractère génétique se révèlent être un des outils les plus puissants à la disposition des tribunaux. Le principal rôle que joue la molécule d'ADN, consiste en la possibilité d'identifier n'importe quel vestige biologique qui apparaît sur le lieu des faits (Susanne *et al.*, 2003).

Le concept de l'identification par l'ADN, fut introduit en 1985 par le généticien britannique Alex Jeffreys quand il a trouvé que certaines régions de l'ADN étaient extrêmement variables entre les individus (Gill *et al.*, 1985 ; Jeffreys). L'analyse de ces régions polymorphiques a conduit à l'établissement d'une « empreinte génétique » (Doutremepuich, 1998).

Les empreintes génétiques sont le relevé des caractéristiques génétiques qui permettent de reconnaître un individu (Doutremepuich, 1998). En effet, cette preuve biométrique fascine. C'est presque un truisme de dire qu'elle est séduisante et particulièrement prometteuse, non pas seulement parce qu'elle repose sur une biotechnologie de pointe, la génétique, mais surtout parce qu'elle permet, soit de confirmer une identité sans un besoin de témoignage, soit d'exclure une telle identité (Grimoud, 1994). L'établissement de profils génétiques permet d'incriminer ou d'innocenter des suspects, ce qui offre aux enquêteurs un nouvel outil extrêmement efficace pour l'élucidation des affaires criminelles. L'analyse génétique est donc une nouvelle technique d'une importance décisive venue s'ajouter à celles dont disposaient déjà les enquêteurs.

Les résultats d'un test d'identification par ADN sont plus significatifs, plus informatifs que ceux des techniques biologiques traditionnelles. Dès lors, leurs utilisations se multiplient devant les tribunaux civils et criminels (Watson *et al.*, 1992).

Les procédures exactes impliquées dans la collecte, le stockage des échantillons et l'extraction de l'ADN, varient pour les différents types d'échantillons, mais les étapes générales qui sont impliquées pour l'obtention d'un profil ADN sont les mêmes (**Figure1**) (Timothy, 2007).



**Figure 1 :** Processus impliqué dans l'identification par l'ADN (Timothy, 2007)

### **I-1. Origines du matériel génétique dans les analyses médicaux-légales**

Il est possible d'obtenir des profils d'ADN à partir de la plupart des substances biologiques. L'ADN est présent dans toutes les cellules nucléées des organismes vivants et par conséquent, il est présent dans les matières biologiques laissées dans la scène de crime. Une empreinte génétique peut donc être établie à partir de tout échantillon qui renferme de l'ADN (Butler, 2010).

En général, tout type d'échantillons biologique est analysable au laboratoire. Tout échantillon pouvant servir comme source d'ADN incluant non seulement les tissus solides, mais aussi le sang, la salive et tout autre tissu ou liquide biologique contenant des cellules nucléées (Clayton, 1995). Edmont locard en 1920 a démontré que :

« Tout individu, à l'occasion de ses actions criminelles en un lieu donné, dépose et emporte à son insu des traces et des indices : sueur, sang, poussière, fibres, sperme, salive, poils, squames, terre, etc. Qu'ils soient de nature physique, chimique ou biologique, ces indices, une fois passés au crible d'examens de plus en plus sophistiqués, parlent et livrent le

récit du crime avant de permettre au lecteur enquêteur de déchiffrer la signature de l'auteur coupable »

Le tableau I ci-dessous indique les vestiges biologiques les plus communément reçus en laboratoires légaux aux fins d'identification (Susanne *et al.*, 2003) :

**Tableau I :** Quantité d'ADN extraite de différents matériels biologiques

Type d'échantillon	Quantité d'ADN
Sang	2000 à 40000ng/ml
Sperme	150000 à 300000ng/ml
Cheveux	1 à 750ng/racine
Salive	1000 à 10000ng/ml
Urine	1 à 20ng/ml
Os	3 à 10ng/mg
Tissu	50 à 500ng/mg

En effet, quand on analyse de l'ADN pour l'identification des restes humains, le type d'échantillon choisi dépend de ce qui est disponible et aussi de l'état de dégradation. S'il y a eu un temps important entre la mort et la récupération du corps, les muscles décomposés, la peau et les cheveux ne feront pas un bon choix. L'os et les dents seront les matières les plus probables à fournir un profil ADN (Timothy, 2007).

### **I-2. Analyse d'ADN**

Le processus d'analyse d'ADN commence après un prélèvement tiré d'un minuscule échantillon. En effet, l'ADN récupéré de la scène de crime peut être de faible concentration ou dégradé. Ceci rend son analyse difficile, voir même impossible. Développée en 1986 par Mullis et ses collaborateurs, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) s'est révélée d'une importance capitale pour l'analyse d'ADN en criminalistique (Houck, 2007). Cette méthode d'amplification d'ADN permet en effet d'obtenir un grand nombre de copies d'ADN à partir

d'une concentration limitée d'ADN disponible pour l'analyse. Elle a été immédiatement perçue comme la méthode rêvée pour les applications de police scientifique (Coquoz, 2006).

L'amplification simultanée de plusieurs marqueurs spécifiques par PCR, suivie d'une détection automatisée des fragments d'ADN amplifiés, constituent une approche rapide et sensible permettant d'analyser un grand nombre d'échantillons et présentent un fort pouvoir de discrimination. Cependant, l'étude du matériel génétique en médecine-légale ne conduit pas toujours à un résultat. En effet, plusieurs paramètres sont susceptibles de faire échouer l'analyse.

Afin d'accomplir une analyse d'ADN, la séparation et la détermination de la taille des fragments d'ADN est donc indispensable car bien qu'étant identiques dans leur composition chimique, ces fragments peuvent différer par leurs tailles (Robert *et al.*, 2009).

L'analyse des produits d'amplification est faite par électrophorèse capillaire. Le résultat se présente sous forme de pics. Chaque pic correspond à un des locus : il y a deux pics pour le même locus chez un hétérozygote, un seul pic pour un homozygote (Gilliquet, 2009).

Le processus d'amplification par PCR est un processus ciblé sur une zone précise de l'ADN. Par ailleurs, la détection des séquences d'ADN à la fin de l'électrophorèse ne va révéler que les zones de l'ADN qui ont été amplifiées. L'électrophorèse étant suffisamment puissante pour bien séparer tous les allèles les uns des autres, chacun des allèles à une dénomination qui lui est propre. La nomenclature recommandée par les organisations professionnelles pertinentes, repose sur l'attribution à chaque allèle d'un numéro correspondant au nombre d'éléments répétitifs qu'il contient (Coquoz, 2006).

L'utilisation de cette combinaison de méthodes permet de différencier les produits selon deux critères. L'électrophorèse permet de séparer les différentes molécules selon leur taille et la détection de fluorescence permet de distinguer des produits de même taille mais marqués par des fluorophores différents. L'incorporation de nucléotides marqués par des fluorophores permet de séparer et détecter par électrophorèse les produits d'extension d'amorces (Sanchez *et al.*, 2003).

L'observation des résultats d'électrophorèse lors de l'analyse des marqueurs est déjà substantiellement automatisée, mais la lecture finale du résultat est réalisée et vérifiée

manuellement (Buckelton et al., 2005). En effet, l'un des grands avantages de la technologie des empreintes génétiques est qu'elle est fondée sur une démarche scientifique objective, plus elle sera automatisée et plus la probabilité d'erreur humaine s'amenuisera.

### **I-2-1. La nature des profils rencontrés**

La démarche expérimentale conduisant à l'établissement de profils génétiques interprétables et fiables est semée d'embûches. En effet à la fin de l'expérimentation, l'analyseur doit parfois faire face à un ensemble de résultats difficilement interprétables voir même ininterprétables. La figure 2 représente les profils anormaux pouvant être rencontrés lors de l'établissement de profils génétiques.

#### **- Profils partiels et profils de mélange**

Les profils ADN obtenus peuvent prendre l'allure particulière des profils de mélange lorsque les traces contiennent l'ADN de plusieurs personnes, ou celui des profils partiels lorsque l'ADN des traces est trop dégradé. Dans les deux cas, les profils ADN obtenus ont une valeur probante amoindrie et les rapports d'expertise ne parviennent pas à afficher des valeurs de probabilité aussi impressionnantes que dans les cas plus simples (Coquoz, 2006).

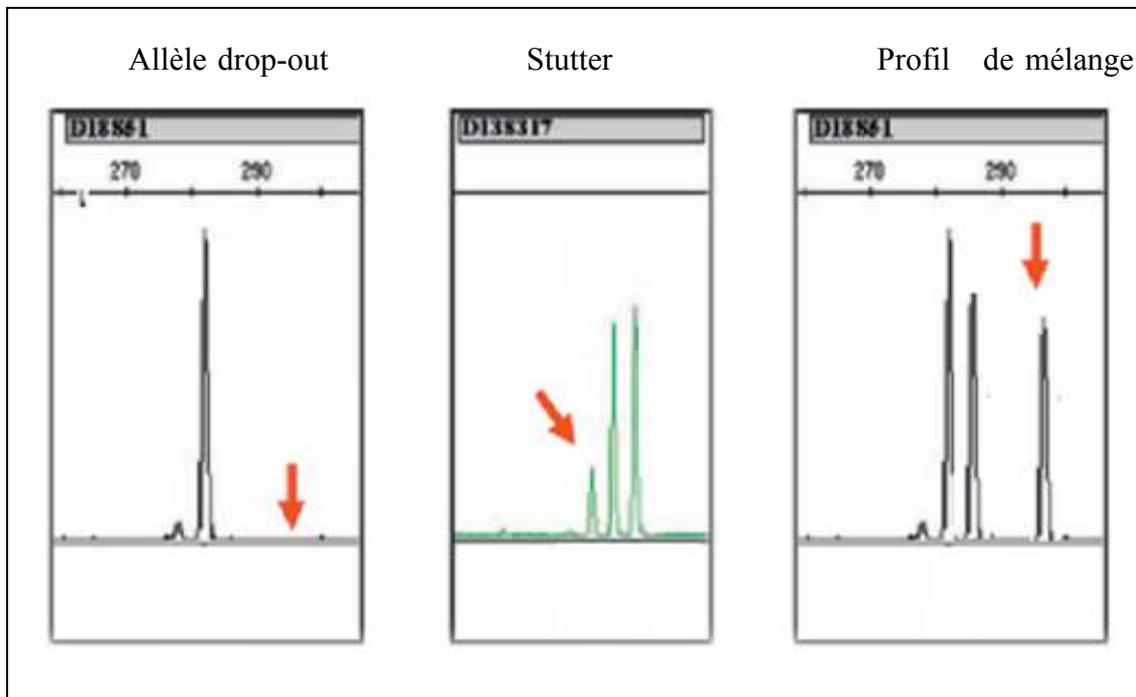
#### **- Les allèles muets (dropout)**

Certains allèles peuvent ne pas être amplifiés lors de la PCR du fait d'une mutation au niveau du site de fixation des amorces. Nous parlons alors d'allèles nuls. De plus, au cours de la PCR, il se produit généralement une amplification préférentielle des allèles les plus courts au détriment des allèles de plus grandes tailles, pouvant dans certains cas aboutir à la non détection des plus grands allèles lorsqu'ils sont à l'état hétérozygote. Il s'agit du phénomène de "allel dropout" (Wattier *et al.*, 1998). La perte d'hétérozygotie (ou allelic dropout) est un des artéfacts les plus fréquemment rencontrés lors de l'analyse des marqueurs sur de l'ADN dégradé et/ou de faible concentration. Cette absence d'amplification pour un seul des deux allèles affecte généralement l'allèle de plus haut poids moléculaire (Schneider *et al.*, 2004).

#### **- Les stutters**

lors de la réaction d'amplification, outre les produits de PCR attendus, des fragments de plus petites et plus grandes tailles sont également produits à la suite d'erreurs de la Taq polymérase (Hill *et al.*, 2010 ; Olejniczak et Krzyzosiak, 2006). Leur présence crée des pics

surnuméraires (encore appelés "stutters") sur les électrophorégrammes, rendant ainsi la discrimination entre homozygotes et hétérozygotes difficile lorsqu'un seul motif répété les sépare (Shinde *et al.*, 2003).



**Figure 2 :** Présentation des artéfacts de la détection des profils génétiques (Butler, 2010)

## II. Marqueurs génétiques

Un grand pourcentage de l'ADN, soit environ 99.7 %, est conservé ou semblable chez les êtres humains comme il est requis pour coder pour les protéines qui font de nous qui nous sommes. Cependant, il y a des segments d'ADN qui sont connus pour être différents d'une personne à une autre (Butler, 2010).

La plus grande partie de cet ADN, dont on ne connaît pas la fonction précise, est formée d'unités répétitives, c'est-à-dire de séquences identiques, d'un nombre variable de paires de base, qui sont propres à la personne (Coquoz, 2006).

Un marqueur génétique est définie par plusieurs critères (Mansuel-Lupo *et al.*, 2007):

- Sa transmission héréditaire.
- Son caractère stable au cours de la vie d'un individu.
- Son taux d'hétérozygotie.

- Son grand polymorphisme.
- Son pouvoir de discrimination

Dans la pratique, comme attendu, on n'étudie pas la molécule d'ADN complète mais seulement quelques fragments, concrètement les plus polymorphes. Il existe une multitude de types de polymorphisme, mais ceux utilisés habituellement en analyses légales sont les polymorphismes de longueur (Jeffreys et Morton, 1987)

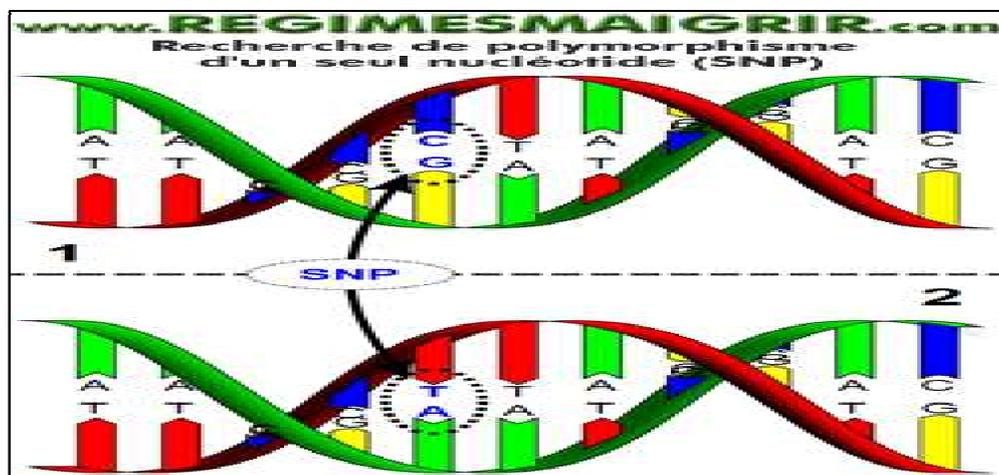
### II-1. Les régions polymorphes de l'ADN

C'est au niveau des régions non codantes que se trouvent des différences de séquences définissant les polymorphismes inter-individus. L'identification criminelle s'appuie sur l'analyse de ces sites polymorphes (Jobling et Gill, 2004). Les régions polymorphes sont des séquences variables sur des loci précis du génome. Ces variations définissent les allèles, qui constituent l'empreinte génétique d'un individu une fois combinés (Weil, 2005).

Deux principaux types de polymorphismes se distinguent (Hitte, 2009 ; Butler, 2010 ; Coquoz, 2006):

- Le polymorphisme de séquence, portant sur un seul nucléotide ou SNP (Fig. 3)

Les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont des variations sur une seule paire de bases dans la séquence du génome. Sur la totalité des polymorphismes rencontrés dans le génome humain, les SNP représentent environ 90 %.



**Figure 3 : Polymorphisme de séquence (SNP)**

- Le polymorphisme de longueur, se déclinant en mini-, micro- et macrosatellites :

**- Macrosatellites**

Les motifs répétés sont ici très longs, équivalent à plusieurs centaines de kilobases. Ils sont généralement localisés dans les régions centromériques des chromosomes. Cette taille importante ne permet pas une amplification par PCR. Par conséquent, l'analyse de ces marqueurs génétiques n'est pas utilisée par manque de sensibilité sur les résultats obtenus.

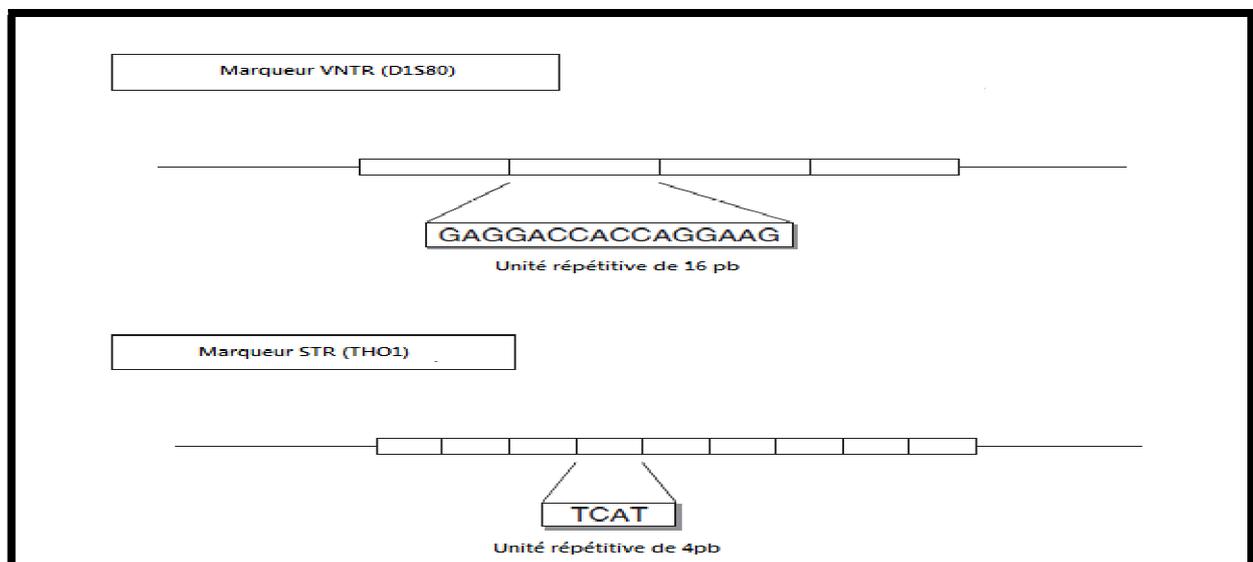
**-Minisatellites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeat)**

Les minisatellites sont des séquences répétées de plusieurs milliers de bases. Leur localisation est principalement télomérique. En raison de leur longueur, et de même que pour les macrosatellites, ce type de polymorphisme ne peut être étudié comme marqueurs de choix dans les tests d'empreintes génétique.

**-Microsatellites ou STR**

Les STR (Short Tandem Repeat) sont des répétitions qui peuvent atteindre 100 pb de longueur. L'analyse de plusieurs loci STR fournit une combinaison allélique propre à chaque individu.

La figure ci-dessous représente deux types de marqueurs polymorphes VNTR et STR :



## Figure 4 : Marqueur VNTR et STR

### II-2 Les marqueurs spécifiques utilisés en médecine légale

Pour l'analyse de l'ADN, à des fins médico-légales, deux types de marqueurs moléculaires sont généralement utilisés: les microsatellites et le locus de l'amélogénine.

#### II-2-1. Les microsatellites ou STR

L'exceptionnel pouvoir discriminant des marqueurs microsatellites leur a permis de conquérir de nombreux domaines comme la médecine légale, la génétique des populations ou encore la biologie de la conservation.

Les STR consistent en une séquence d'ADN de quelques nucléotides 2 à 7 paires de base (pb), répétée plusieurs fois en tandem (Edwards, 1991). Ces répétitions sont largement distribuées dans tout le génome humain et représentent 3% du génome total (d'après l'International Human Genome Consortium).

Ils constituent une riche source de marqueurs hautement polymorphes et sont par conséquent devenus les marqueurs de choix pour l'identification humaine. Il est hautement improbable que, mis à part les jumeaux identiques, deux personnes présentent le même profil génétique, compte tenu du nombre de marqueurs utilisés (Ellegren, 2004).

Les microsatellites sont hypervariables; sur un locus, ils montrent souvent des dizaines d'allèles différents l'un de l'autre dans le nombre de répétitions. Ils ont une taille relativement petite et, par conséquent, sont facilement amplifiés par PCR (Coquoz *et al.*, 2003). Des milliers de microsatellites polymorphes ont été caractérisés dans l'ADN humain (Ellegren, 2004).

Les STR présentent donc deux propriétés qui en font des marqueurs d'empreintes génétiques fort utiles : (1) il en existe de nombreuses variations possibles dans la population ; (2) il est facile d'identifier les variations présentes dans un échantillon donné d'ADN à l'aide des techniques permettant d'en déterminer la longueur.

Les STR sont des marqueurs particulièrement puissants. En effet, ils sont très abondants dans le génome humain et hautement informatifs, parce qu'ils présentent de nombreux allèles,

certains avec une distribution géographique spécifique ; ils sont de plus faciles à identifier et à interpréter par PCR (Susanne, 2003).

La nomenclature des loci STR étudiés dans les profils génétiques est construite de manière très spécifique (Butler, 2012):

- La première lettre, le D, correspond à DNA.
- Le second élément est le numéro du chromosome portant la séquence.
- La lettre en troisième position définit la géo-localisation précise sur le chromosome, un S pour une séquence d'ADN unique, un Z pour une localisation multiple sur un même chromosome, ou un F pour une localisation multiple sur des chromosomes homologues.
  - Le dernier nombre confère un caractère unique au locus mais n'apporte aucune information sur la portion chromosomique concernée.

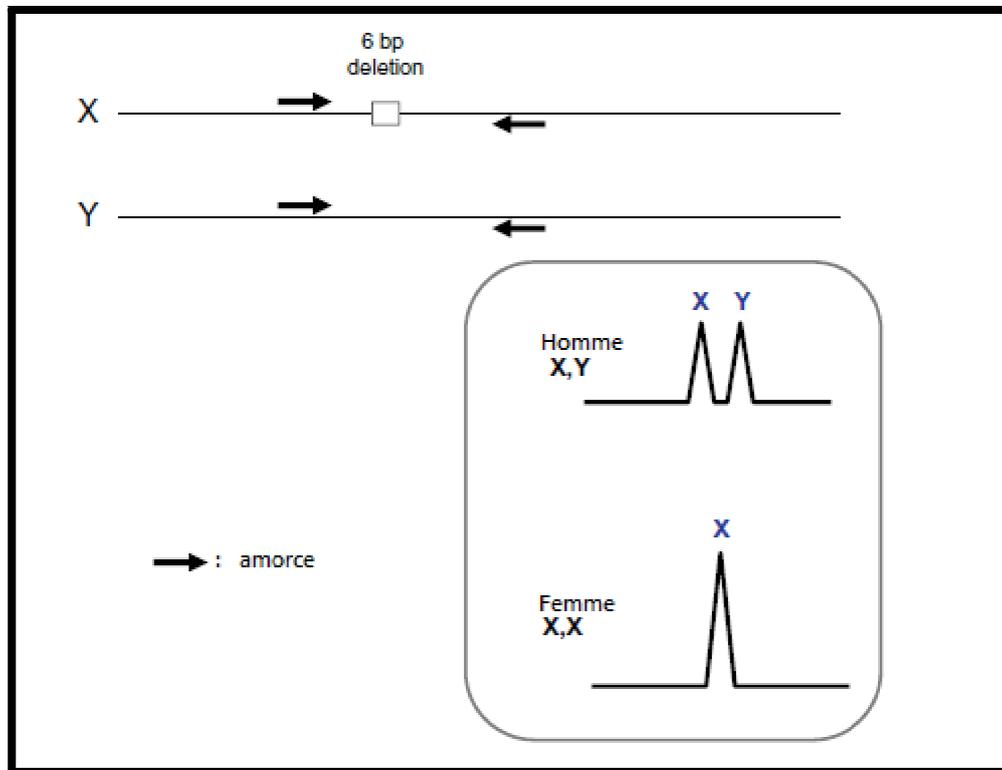
Certains loci ne suivent pas cette nomenclature et leur dénomination correspond à un sigle inventé par l'équipe l'ayant découvert.

### **II-2-2.Le gène de l'amélogénine**

Entre les polymorphismes étudiés, il est intéressant de distinguer le gène de l'amélogénine, qui permet la détermination du sexe de l'individu, aspect de grande utilité lorsqu'il s'agit de squelettes immatures (Sullivan *et al.*, 1993), dont le sexe est difficile à déterminer avec les méthodes habituelles de l'ostéologie légale (Susanne, 2003).

Le gène de l'amélogénine qui code pour une protéine de l'émail de la dent, est présent sur les deux chromosomes sexuels X et Y ; toutefois, l'exemplaire porté par le chromosome Y comporte 6 paires de bases de plus que celui du chromosome X (Coquoz, 2006).

Les deux séquences homologues de ce gène diffèrent par la présence de plusieurs délétions. L'analyse d'un profil d'électrophorèse permet aisément de distinguer les deux allèles (Sullivan *et al.*, 1993) (**Figure 5**).



**Figure 5** : Profils électrophorétiques obtenus après analyse du gène de l'amélogénine

### III. Limites de l'analyse de l'ADN ancien

Cette nouvelle approche d'identification « les empreintes génétiques » occupe une place de plus en plus prépondérante en médecine légale. Cependant, elle rencontre quelques difficultés pratiques (Compana, 2003 ; Martin, 2004).

La première difficulté pour les biologistes est celle du type même et de la qualité du produit qui leur est demandé d'analyser (Miras, 1991). La période de temps s'écoulant entre le délit et sa découverte est variable, et, durant ce temps, les échantillons biologiques vont être soumis à des agents environnementaux comme la lumière ultraviolette, l'humidité, la température, les changements de pH, les agents chimiques, etc.... (**Tableau II**), dont l'action

est plus déterminante que le temps lui-même (Susanne *et al.*, 2003). Ainsi, le principal facteur qui conditionne la préservation de l'ADN au cours du temps, n'est pas le temps lui-même, mais bien le milieu environnemental dans lequel les spécimens anciens ont été conservés depuis la mort de l'organisme ([Gauthier](#), 2009).

**Tableau II** Récapitulatif du rôle des différents facteurs influençant la dégradation de l'ADN (Santos, 1993)

	Hydrolyse	Oxydation	Autolyse	Microorganismes
pH alcalin	↘			
Température basse	↘	↘	↘	↘
Dessiccation	↘	↘	↘	
Pression	↘	↘		
Présence de matière organique		↘	↘	
Faible taux d'oxygène		↘		
Adsorption	↘		↘	

Ce tableau permet de montrer, par exemple, que les températures basses diminuent à la fois l'hydrolyse, l'oxydation, l'autolyse et l'action des micro-organismes et ainsi de suite... Les environnements qui cumulent ces différentes variables sont plus favorables à la conservation de l'ADN.

Trois obstacles majeurs à l'analyse d'ADN peuvent effectivement être rencontrés:

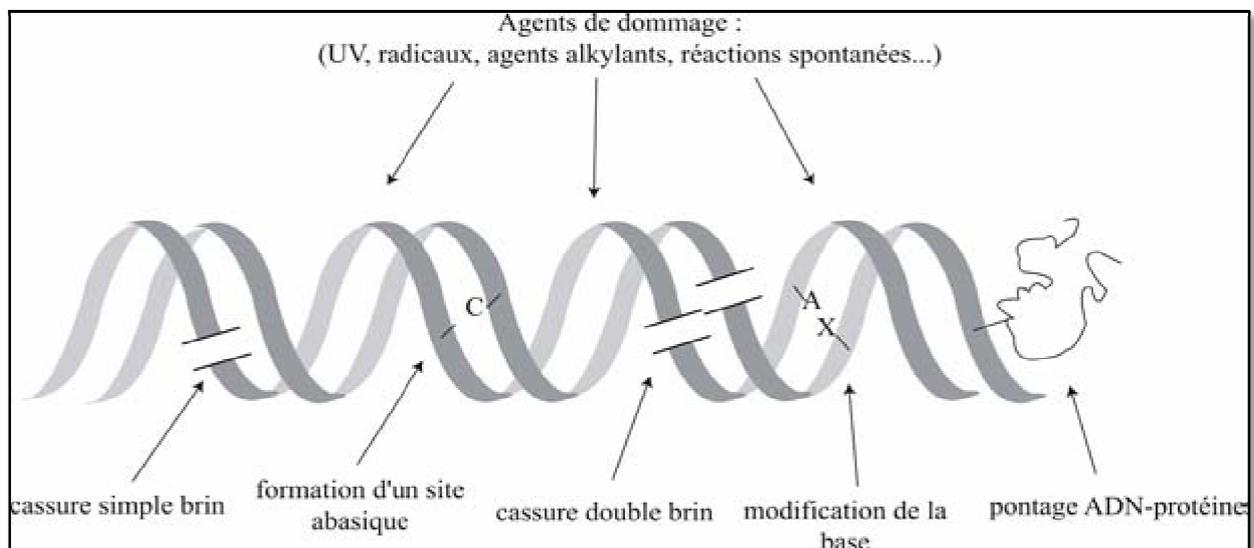
- Dégradation des molécules au cours du temps.
- Présence d'inhibiteurs de PCR
- Contamination par de l'ADN exogène.

- **Dégradation**

L'évolution ayant façonné l'ADN de manière à en faire un système de stockage fiable de l'information génétique, permettant sa transmission de génération en génération, la molécule

ne se dégrade pas spontanément, et ne réagit pas non plus instantanément au contact d'autres molécules. Cependant, elle n'est pas à l'abri des dommages causés par certaines substances chimiques et enzymes lysosomales (Gauthier, 2009).

L'instabilité post-mortem des acides nucléiques (**Figure 6**) représente une des difficultés principales rencontrée lors de l'analyse de l'ADN ancien. Dans les cellules vivantes, l'intégrité de l'ADN est continuellement maintenue par des processus de réparation enzymatiques (Lindahl *et al.*, 1993). Mais, dès le décès de l'individu, une série de processus chimiques et enzymatiques se déclenchent et provoquent des modifications irréversibles des séquences de l'ADN qui s'accumulent au cours du temps.



**Figure 6 :** Modifications post-mortem subies par la molécule d'ADN (Jobling *et al.*, 2004).

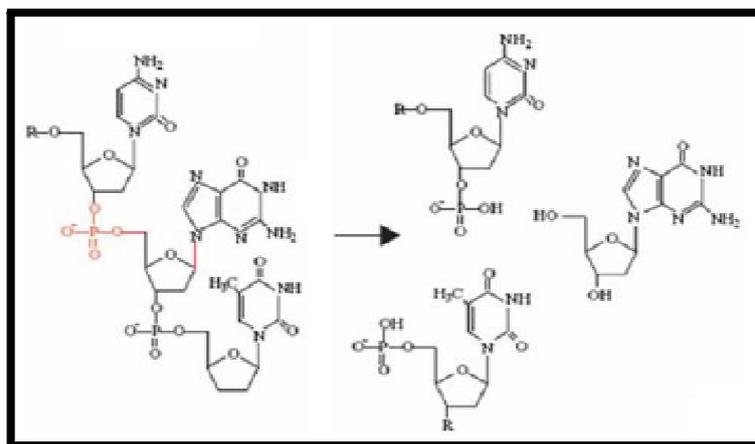
La dégradation la plus flagrante subie par l'ADN est sa réduction en fragments variant de 100 à 500 pb (Pääbo, 1989). Cette fragmentation est due à la fois aux réactions enzymatiques qui surviennent peu après la mort ainsi qu'à l'hydrolyse qui entraîne la rupture des liaisons phosphodiester générant des coupures sur un des brins.

L'ADN peut donc subir deux types d'attaques conduisant à sa modification: une dégradation chimique (hydrolyse et oxydation) ; une dégradation enzymatique (autolyse et décomposition bactérienne).

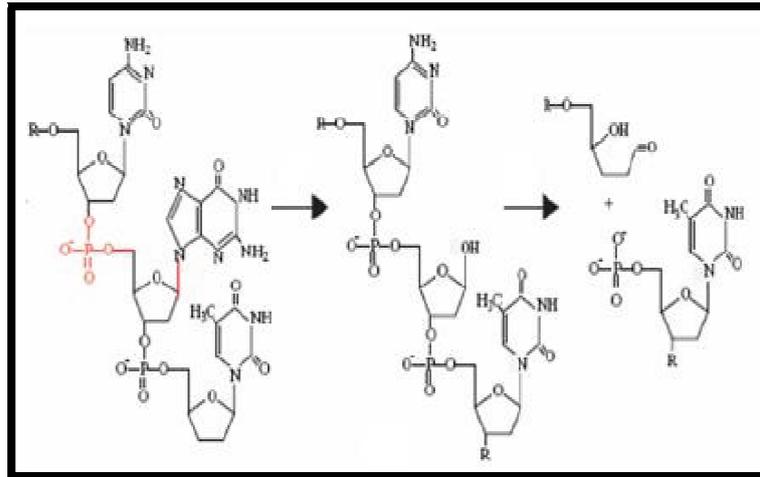
La rupture des compartiments cellulaires après la mort de l'organisme, entraîne la libération d'enzymes lysosomales comprenant des nucléases. Les endo-nucléases vont cliver

les liaisons phosphodiesteres de l'ADN et le fragmenter par conséquent. Les exo-nucléases vont s'attaquer à l'extrémité des fragments formés et réduire encore leur taille. Cette autolyse conduit donc à une fragmentation des longues molécules d'ADN, les faisant disparaître. En revanche, les enzymes libérées par des micro-organismes prennent la relève en dégradant les molécules restantes (Watson et Berry, 2004).

Les processus de dégradation chimique sont des mécanismes beaucoup plus lents. Comme dans les cellules vivantes, il s'agit majoritairement de phénomènes d'hydrolyse et d'oxydation (Lindahl, 1993). L'hydrolyse (**Figure 7**) entraîne la séparation des brins d'ADN, alors que l'oxydation (**Figure 8**) brise les liens entre les bases azotées et les molécules de désoxyribose. Cette rupture occasionne une fragilité du brin d'ADN et, par ce fait même, entraîne sa cassure, rendant ainsi impossible l'identification du sujet.



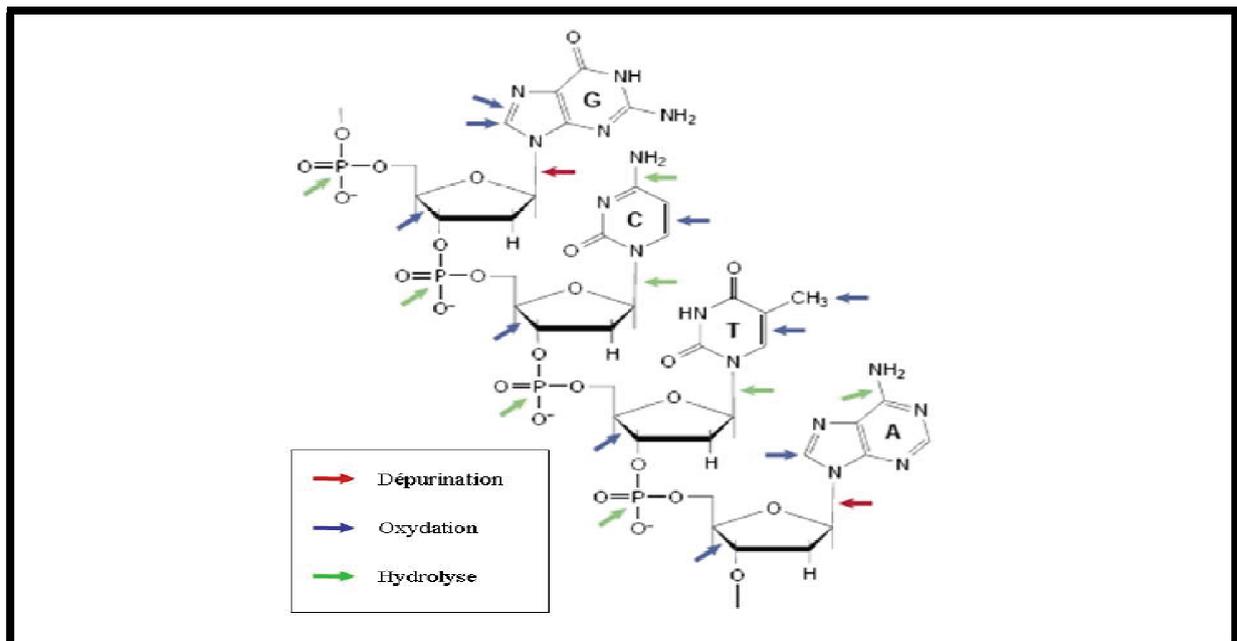
**Figure 7** : Rupture de brin par hydrolyse de liaison phosphodiester  
(Willerslev et Cooper, 2005)



**Figure 8 :** Perte de base azotée et cassure de brin par hydrolyse  
(Willerslev et Cooper, 2005)

Si les phénomènes d'hydrolyse et d'oxydation diminuent fortement la taille des fragments d'ADN qui peuvent être extraits, ces réactions post mortem peuvent également produire des modifications plus gênantes sur la molécule, puisqu'elles peuvent conduire à la modification de la séquence en elle-même (Gilbert *et al.*, 2003).

La figure 9 ci-dessous représente les différents sites d'action des phénomènes de dégradation sur la molécule l'ADN.



**Figure 9 :** Sites de lésions sur la molécule d'ADN par les différents types de dégradation (Hofreiter *et al.*, 2001).

**- Présence d'inhibiteurs**

Il semble qu'un ADN bien préservé sera facilement amplifiable ; or ce n'est pas forcément le cas. Des molécules, co-purifiées avec l'ADN lors de l'étape d'extraction peuvent souvent diminuer l'efficacité de la réaction d'amplification voire même la rendre impossible.

Il peut s'agir de substances contenues dans le sol comme les acides humiques et fulviques (Kirsanow et Burger, 2012) ou de constituants de l'organisme mort comme l'hème de l'hémoglobine (Akane *et al.*, 1994), le collagène de type I et la mélanine contenue dans les cheveux (Haynes *et al.*, 2002). Le mode d'action de ces inhibiteurs est encore mal connu.

**- Contamination**

Par le passé, de nombreuses entreprises de séquençage d'ADN ancien que l'on avait d'abord cruées réussies durent être remises en question lorsque l'on découvrit que les séquences établies provenaient en réalité d'une source contemporaine ayant contaminé l'échantillon. Chaque jour, notre peau perd un grand nombre de cellules mortes. Nous répandons ainsi autour de nous des fragments de notre ADN susceptibles de réapparaître n'importe où. Or, la PCR est une technique d'une sensibilité si extrême qu'elle peut agir sur une molécule unique et amplifier le premier ADN qu'elle rencontre, que ce dernier provienne d'une source ancienne ou moderne (Watson et Berry, 2004).

La contamination peut se réaliser à chaque étape du prélèvement ou de l'analyse de l'ADN. Ainsi, la plus grande prudence s'impose sur la scène de crime, tout comme lors des diverses étapes de la détermination de l'empreinte génétique (Gauthier, 2003).

Les sources de contaminations peuvent être très variées et intervenir à différents moments (Hänni, 1994) :

- La contamination peut provenir de l'échantillon lui-même : entre la mort et l'analyse en laboratoire. De nombreuses personnes manipulent les échantillons : au sein du gisement, lors des fouilles, lors des manipulations successives dans les collections... etc.

- La contamination peut survenir lors de l'extraction au laboratoire : Il est fortement suggéré de porter des gants stériles et de procéder à l'analyse de l'ADN dans un laboratoire strictement réservé à cet effet (Watson et Berry, 2004).

- Les microgouttelettes d'ADN, générées puis dispersées par les mouvements d'air créés lors de l'ouverture des tubes ou des transferts de liquide peuvent être à l'origine de contaminations croisées entre différents échantillons (Willerslev et Cooper, 2005). Par ailleurs, la poussière présente dans le laboratoire peut, elle aussi, renfermer une quantité insoupçonnée et non négligeable d'ADN (Toothman *et al.*, 2008). En effet, les ADN humain et bactérien sont omniprésents dans tous les laboratoires (Willerslev et Cooper, 2005).

# Chapitre II :

**Matériel**

**Et**

**Méthodes**

Notre travail a été réalisé au niveau du service de Biologie de l'Institut de Criminalistique et de criminologie (INCC), de Bouchaoui, durant une période de 3 mois, allant du 05 juin au 05 septembre 2012.

L'étude a porté sur l'extraction et l'analyse d'ADN, à partir de six dents anciennes, issus de différents individus, prélevées sur des restes squelettiques non identifiés.

Cette étude avait pour objectifs :

- D'évaluer l'efficacité et les limites de la technique d'extraction organique de l'ADN, à partir des ossements ayant subi des dégradations dans le temps afin d'apporter des correctifs et de l'optimiser.
- De mieux situer les difficultés de l'analyse d'ADN à partir des ossements dégradés afin de limiter l'intervalle de temps de leur utilisation à partir du moment de leur réception.
- D'établir des profils ADN dans le cadre de l'identification génétique en matière pénale et de l'enregistrement dans la base de données génétiques.

## **II – 1. Matériel**

### **II-1.1. Matériel biologique**

Pour la réalisation de ce mémoire, nous avons utilisés six dents anciennes, provenant de six individus différents d'âges inconnus prélevés sur des restes humains non identifiés lors d'autopsies médico-légales.

La contamination de l'ADN dentaire par de l'ADN exogène peut être associé à différents types de lésions survenues au cours de la manipulation des échantillons. Nous avons limité tout risque de contaminations, en réalisant l'ensemble des manipulations de manière aseptique. Cependant, en ce qui concerne la sélection et le recueil des échantillons, nous étions limités par le nombre et l'état des échantillons reçus.

## II-1-2. Matériel non biologique

C'est le matériel classique utilisé dans les laboratoires d'analyses génétiques, représenté principalement par les appareillages, la verrerie, les réactifs, les solutions ainsi que du matériel de sécurité et de protection (**Tableau III**).

Matériel / Appareils / Equipement	Réactifs et solutions
<p>Gants, charlotte, masques et lunettes de protection</p> <p>Microtubes 2ml, 1.5ml et 0.6ml</p> <p>Tubes à fond conique de 15ml et 50ml</p> <p>Boîtes de Pétri, Scalpel stérile</p> <p>Papier verre, papier paille, papier essuie tout</p> <p>Amicon K100 4ml (avec filtres et tubes adaptés)</p> <p>Micropipettes et Embouts, Dispensette</p> <hr/> <p>Turbulateur</p> <p>Centrifugeuse</p> <p>Bain marie</p> <p>Mortier et pilon</p> <p>Broyeur vibrant à billes Mill MM 200 (avec bols de broyage et billes)</p> <p>Vortex</p> <p>Balance électronique</p> <p>Thermocycleur GeneAmp® PCR system 9700</p> <p>Séquenceur ABI prism 3130xl</p> <p>GeneMapper® ID Software v3.2 par Applied Biosystem</p>	<p>Eau ultrapure (<i>Millipore</i>)</p> <p>EDTA 0.5 M pH8</p> <p>Protéinase K</p> <p>B-Mercapto-ethanol (BMSH)</p> <p>DTT (Dithiothréitol) (390mM)</p> <p>Détergent pour surfaces hautes</p> <p>Hypochlorite de sodium 10% (eau de javel diluée à 10%)</p> <p>Ethanol 96%</p> <p>Phénol/Chloroforme/alcool Iso-amylque (25 :24 :1)</p> <p>Chloroforme</p> <p>Ether</p> <hr/> <p>Tampon Homo PK</p> <p>Tampon SEB (Stain extraction Buffer)</p> <p>Tampon TE</p>

- Kits utilisés
  - Le Kit Quantifiler (Applied Biosystems, Foster City, CA)
  - Le Kit « PowerPlex®16HS » (Promega Corporation, Madison, WI, USA).
  - Le Kit d'isolation d'ADN au phénol-chloroforme isoamyl (INCC)

## II – 2.Méthodes

Le mode opératoire que nous avons suivi pour la réalisation de ce travail est le suivant (Figure 10) :

- Préparation des échantillons et extraction d'ADN.
- Quantification d'ADN par RT-PCR.
- Amplification d'ADN par PCR.
- Séparation des produits PCR par le séquenceur ABI prism 3130xl.
- Interprétation des résultats et établissement des profils génétiques par GeneMapper.



**Figure 10** : Les étapes suivies pour le typage de l'ADN

### II-2-1.Préparation des échantillons et extraction d'ADN

L'ensemble des échantillons étudiés étant composés de dents anciennes, la première étape de leur analyse a donc été une étape de décontamination et de lavage de leurs surfaces.

La décontamination de nos échantillons a été réalisée par des passages dans de l'eau de javel à 10% puis dans de l'éthanol à 96%. Entre chaque étape, les dents ont été lavées avec de l'eau ultra pure.

Une fois nettoyées, les dents ont été cassées après avoir été refroidies dans de l'azote liquide et enfin, broyées dans un bol de broyage 20min à 25 coups/sec.

La matrice osseuse obtenue après broyage contient des dépôts de calciums sous forme d'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , ces dépôts qui à l'origine favorisent la fossilisation, sont

un obstacle lors de l'extraction d'ADN. De ce fait, une décalcification a été réalisée, à l'aide d'une solution d'EDTA (0.5M, pH8) selon les étapes suivantes :

- Ajouter 5ml d'EDTA à 1g de matrice, vortexer, puis turbuler toute la nuit dans le réfrigérateur.
- Centrifuger pendant 10 min à 2000g et 4°C.
- Eliminer le surnageant et répéter le processus 3 fois.
- Eliminer le surnageant et ajouter 5ml d'eau ultrapure, vortexer puis centrifuger pendant 10 min à 2000g et 4°C.
- Eliminer le surnageant et répéter le processus 3 fois.

L'extraction organique au Phénol-Chloroforme-Isoamyl (PCI) dite de référence (Comey et *al.*, 1994) consiste dans un premier temps à traiter le lysat cellulaire par du phénol volume à volume. Ceci aura pour effet une dénaturation des protéines et une séparation efficace entre celles-ci et les acides nucléiques qui ne sont pas solubles dans le phénol. Après centrifugation, les protéines vont se situer entre la phase organique et la phase aqueuse qui contient les acides nucléiques. Ce mélange est ensuite traité par addition d'un mélange Chloroforme-Isoamyl qui a notamment pour objectif d'éliminer les traces de phénol qui auraient pu être emportées avec la phase aqueuse.

Le mode opératoire que nous avons suivi pour notre extraction est le suivant :

- Lyse des cellules par incubation de la poudre lavée toute la nuit dans un tampon de lyse et de la protéinase K, au bain marie à 56°C avec agitation.
- Ajouter 2ml de PCI, turbuler pendant 10min et centrifuger 10min à 1000g.
- Prélever la phase aqueuse supérieure et la transférer dans un autre tube contenant 2ml de PCI et se débarrasser de la phase liquide inférieure.
- Turbuler pendant 10min, centrifuger 10min à 1000g. Transférer la phase aqueuse supérieure dans un nouveau tube contenant 2ml de chloroforme.
- Turbuler pendant 5min et effectuer une centrifugation rapide permettant d'éliminer la phase organique supérieure.
- Recouvrir les tubes de parafilm et les trouser avec une aiguille stérile.
- Mettre les tubes dans l'étuve à 37°C pendant 30min à 1h.

- Passer l'extrait sur filtre Amicon afin de libérer le maximum d'ADN présent dans l'échantillon considéré puis de le séparer de tous les résidus non acides nucléiques pouvant masquer l'ADN lors de l'analyse.

## II-2-2. Quantification par qRT-PCR

Après avoir extrait l'ADN, nous avons cherché à le quantifier. Pour cela nous avons utilisé le kit Quantifiler Human DNA Quantification, un kit commercialisé par la société Applied Biosystems qui permet d'estimer la concentration d'ADN extraite en monitorant l'amplification in vitro d'un petit fragment d'ADN cible (62 pb) localisé sur le génome nucléaire et en le comparant à des profils d'amplification d'une gamme de dilutions de concentrations ADN connue. Outre la quantification de l'ADN nucléaire, ce système permet aussi de détecter la présence de possibles inhibiteurs de PCR grâce à l'amplification simultanée d'un ADN contrôle (ou IPC pour Internal Positive Control) inclus dans la réaction.

Le Threshold Cycle (Ct) représente le cycle pour lequel le signal est supérieur au seuil de détection, et le début de la phase exponentielle d'amplification d'ADN. Plus le Ct est faible et plus l'amplification exponentielle de la cible est précoce et inversement, plus le Ct est grand et moins la quantité de cible est importante. Dans le cas d'un Ct égale ou proche de 32, on considère qu'il n'y a pas d'amplification à cause des inhibiteurs co-extraits avec l'ADN (Tableau IV).

**Tableau IV** : Le Kit de quantification « Quantifiler » (Barbisin & Shewale 2010)

Kit	Chimie (sonde)	Application	Gène cible	Taille d'amplicon	Seuil de détection
Quantifiler	TaqMan	ADN humain	Humain : la transcriptase inverse de la télomérase humaine (hTERT) IPC : synthetic oligo	62pb  79pb	46pg à 100ng

La quantification a été effectuée en suivant les instructions du Kit Quantifiler :

- Distribuer 23µl du réactif PCR dans chaque puit de la plaque PCR.
- Ajouter 2 µl d'ADN dans les puits appropriés.
- Centrifuger la plaque à 3000 rpm pour 20 secondes
- Déposer la plaque dans la machine à Rt-PCR

### **II-2-3. Amplification des marqueurs STR par PCR**

L'amplification de 16 marqueurs informatifs a été réalisée dans le but d'obtenir les profils génétiques des individus qui ont fait l'objet de ce travail.

L'amplification a été réalisée grâce au Kit PowerPlex® 16 System, qui permet la Co-amplification et la détection de seize locus (quinze locus STR et l'amélogénine), à savoir : D3S1358 , TH01, D21S11, D18S51, Penta E , D5S818 , D13S317 , D7S820 , D16S593 , CSF1PO , Penta D , vWA , D8S1179 , TPOX , FGA et Amélogénine (**Tableau V**).

Une des deux amorces pour les marqueurs Penta E, D18S51, D21S11, TH01 et D3S1358 est marquée à la fluorescéine (FL). Pour les marqueurs FGA, TPOX, D8S1179, Vwa et l'amélogénine, une des deux amorces est marquée à la carboxy-tetramethylrhodamine (TMR). Quand aux Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S8220, D13S317 et D5S818, l'amorce fluorescente est marquée par du 6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-diméthoxyfluorescein (6-JOE) [Technical manuel PowerPlex® System 16] (Annexe)

Les réactions PCR ont été effectuées dans un volume final de 25 µl en suivant les recommandations du fabricant (7.5 ul réactif + 0.5 à 5 ng ADN)

Les seize locus sont amplifiés simultanément dans un seul tube et analysés en une seule injection. La PCR a été réalisée avec les conditions d'amplification suivantes :

- 96°C pendant 2minutes
- (94 °C, 30 sec- 60 °C, 2 min- 72 °C, 90 sec) 30 fois
- 60 °C pendant 45 minutes.

**Tableau V : Les Loci STR du système PowerPlex®16**

Nom usuel du STR	Élément répétitif	Localisation Chromosomique	Gamme d'allèles connus	Pouvoir de discrimination	Référence GenBank
THO1	4pb (TCAT)	11pA5.5	3-13.3	92%	D00269
vWA	4pb (TCAT)	12p13.31	9-25	94%	M25858
D21S11	4pb (TCAT)	21q21.1	24-38	95%	AP0004333
FGA	4pb (CTTT)	4q31.3	13-51.2	96%	M64982
D18S51	4pb(AGAA)	18q21.33	7-27	97%	L18333
TPOX	4pb(GAAT)	2p25.3	6-13	77%	M68651
CSF1PO	4pb(TAGA)	5q33.1	6-16	89%	X14720
D16S539	4pb(GATA)	16q24.1	5-15	91%	G07925
D7S820	4pb(GATA)	7q21.11	6-15	94%	G08616
D13S317	4pb(TATC)	13q31.1	5-15	91%	G09017
D5S818	4pb(AGAT)	5q23.2	7-16	88%	G08446
D3S1358	4pb(TCTA)	3q21.31	9-20	92%	NT-005997
D8S1179	4pb(TCTA)	8q24.13	5-19	94%	G08710
Penta E	5pb(AAAGA)	15q26.2	5-24	97%	AC027004
Penta D	5pb(AAAGA)	21q22.3	2.2-17	94%	AP001752

#### **II-2-4.Séparation des produits PCR par le séquenceur ABI prism 3130xl**

L'ABI 3130XL Genetic Analyzer est un séquenceur ADN qui utilise la technologie d'électrophorèse à 16 capillaires permettant de développer les applications à haut débit de séquençage et d'analyser des fragments d'ADN. Cette séparation électrophorétique est basée sur le principe de marquage multicolore associé à une détection simultanée de plusieurs fluorescences. Il traite 16 échantillons simultanément et permet de faire migrer aussi bien un échantillon unique qu'une plaque de 96 puits.

Cet appareil permet la séparation des acides nucléiques obtenus en PCR selon leur taille. Les séparations se font dans un capillaire d'environ 50 µm de diamètre, permettant ainsi de réguler facilement la température et d'utiliser des tensions électriques beaucoup plus élevées (Coquoz, 2006). Sous l'effet de ce champ électrique et du tampon, les amplifiats chargés négativement rentrent dans le capillaire et migrent en direction de l'anode. La migration est très rapide et varie de 45 mn à une heure. Les amplifiats passent ensuite devant une fenêtre

optique où la détection s'effectue. Cette dernière est assurée par une mesure en UV ou bien par fluorescence après excitation par laser ou par lampe halogène (Ameziane, 2005).

1  $\mu$ l de chaque produit PCR a été déposé sur une plaque 96 puits en présence de 9  $\mu$ l de Hi-Di formamide (Applied Biosystems) selon les étapes suivante :

-Préparez un cocktail de charge en combinant et en mélangeant le standard interne (Internal Lane Standard 600) et le formamide Hi-Di™.

-Mélangez au vortex pendant 10 à 15 secondes.

-Pipetez 10  $\mu$ l du mélange de formamide/standard interne dans chaque puits.

-Ajoutez 1  $\mu$ l d'échantillon amplifié .Recouvrez les puits des septums adaptés.

-Centrifugez brièvement la plaque pour éliminer les bulles d'air des puits, si nécessaire.

-Dénaturez les échantillons à 95 °C pendant 3 minutes, puis refroidir immédiatement sur de la glace ou dans un bain d'eau glacée pendant 3 minutes. Dénaturez les échantillons, juste avant de les charger sur l'appareil.

La solution contenant les fragments amplifiés et marqués avec un fluorochrome, monte dans le capillaire sur une matrice plus fluide que le gel d'agarose : le pop. Les fragments migrent en fonction de leurs tailles. Le fluorochrome contenu sur les séquences est détecté par un laser, l'intensité du signal obtenu est proportionnelle à la quantité d'ADN marqué.

## **II-2-5. Interprétation des résultats et établissements des profils génétiques des échantillons par le logiciel GeneMapper**

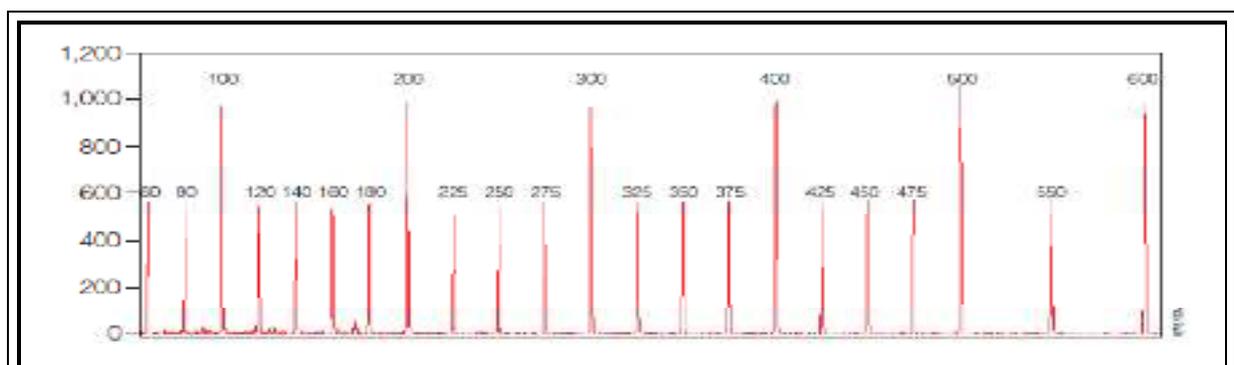
Les fluorochromes utilisés pour la multiplex, ne sont pas différenciables à l'œil nu et leurs spectres d'émission se chevauchent. Seuls des logiciels adaptés sont capables de récolter les données, distinguer les couleurs, reconnaître les pics, déterminer la taille des amplifiats et identifier les allèles pour ainsi obtenir un résultat final sous la forme d'une série de graphiques de pics détectés (Coquoz ,2006).

GeneMapper Software version 3.2 (Applied Biosystems), est un logiciel qui permet l'analyse de fragments d'ADN, il retranscrit les données enregistrées par le séquenceur automatique en calculant la taille des fragments analysés en nombre de paires de base (pb).

Les résultats bruts des exécutions électrophorétiques sont traités par le logiciel GeneMapper et traduits sous forme de profils génétiques (pics électrophorétiques et valeurs alléliques correspondantes). Ce logiciel analyse le profil électrophorétique, interprète les données brutes et attribue une taille à chaque amplicon marqué par un fluorochrome.

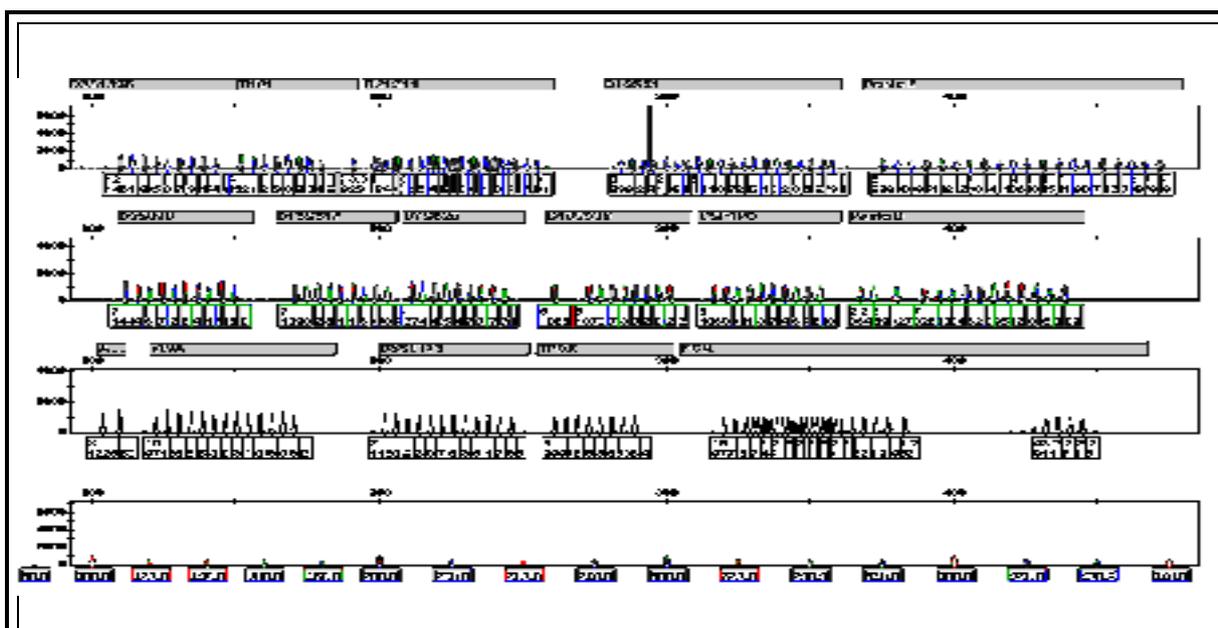
L'analyse des résultats par le logiciel GeneMapper est basée sur l'utilisation de deux échelles de mesure :

-Le standard de taille : échelle de taille, comportant des fragments d'ADN synthétiques de tailles connues, migrant avec chaque échantillon (**Figure 11**).



**Figure 11** : Electrophérogramme des fragments du standard interne 600

-L'allélic ladder : échelle allélique, comportant les allèles connus de chaque marqueur génétique STR. Cette échelle permet d'attribuer le nombre allélique approprié aux fragments d'ADN d'après leurs tailles (**Figure 12**).



**Figure 12:** Electrophérogammes de l'échelle allélique du système PowerPlex® S16.

# Chapitre III :

## **Résultats**

L'ensemble des résultats bruts obtenus pour tous les échantillons anciens étudiés seront présentés dans ce chapitre. Certaines particularités observées seront interprétées au sein même de ce chapitre dans le but de ne pas alourdir la discussion.

### **I-Détermination de la concentration d'ADN extrait :**

Nous avons reçus 6 dents anciennes provenant de différents restes squelettiques. Avant d'envisager de réaliser des analyses globales de ces spécimens, nous avons d'abord effectué une analyse macroscopique permettant d'évaluer l'état de préservation de l'ADN au sein de ces restes biologiques. Ces observations sont résumées dans le tableau VI.

**Tableau VI : Etat des échantillons étudiés**

Dent	Description
01	Molaire très usée
02	Incisive ou Canine cassée
03	Molaire fissurée
04	Prémolaire cariée
05	Canine intacte
06	Prémolaire plombée

L'ensemble des échantillons dentaires faisant l'objet de ce travail ont subi une extraction d'ADN puis une quantification de ce dernier par PCR en temps réel.

Les résultats obtenus pour la quantification de l'ADN nucléaire à l'aide du kit Quantifiler™ sont présentés dans le tableau VII ci-dessous.

**Tableau VII : Les résultats de la quantification par Rt-PCR**

Nom d'échantillon	Quantité de poudre (g)	Concentration d'ADN calculée (ng/ul)	Ct (IPC)
01a	1	0.00 E+00	27.23
01b	0.5	0.00 E+00	25.27
02	0.5	1.69 E-01	Ind
03	1	0.00 E+00	Ind
04a	1	1.90 E-01	28.03
04b	0.5	4.07 E-01	26.96
05	1	4.74 E+01	27.27
06	1	6.23 E-03	35.52

- Ind : indéterminé, au dessus de la capacité de détection du kit.
- Ct : (de l'anglais Cycle Threshold pour « cycle du seuil ») Ce sont des valeurs mathématiques qui sont inversement proportionnelles à la quantité d'ADN initial
- IPC : Internal positive Control ou Contrôle d'extraction d'ADN

Les résultats de notre extraction ont montré que sur les six spécimens explorés, 4 ont donné de l'ADN (02, 04, 05, 06).

Pour les prélèvements n°01 et 03, aucune quantité d'ADN n'a pu être obtenue. En effet, la quantité d'ADN était nulle dans l'échantillon n°01 pour une quantité de poudre de départ de 0,5g et de 1g. Cependant, nous avons tout de même pu remarquer la diminution du taux des inhibiteurs en diminuant la quantité de poudre initiale ( $25.27 < 27.23$ ).

Ces prélèvements correspondent respectivement à la molaire très usée et à la molaire fissurée. L'état abimé de nos échantillon de départ serait probablement un des facteurs ayant influencé notre extraction.

Les échantillons n° 02, 04a/b, 05 et 06 ont présenté de petites quantités d'ADN allant de 1.69 à 6.23 ng/ul.

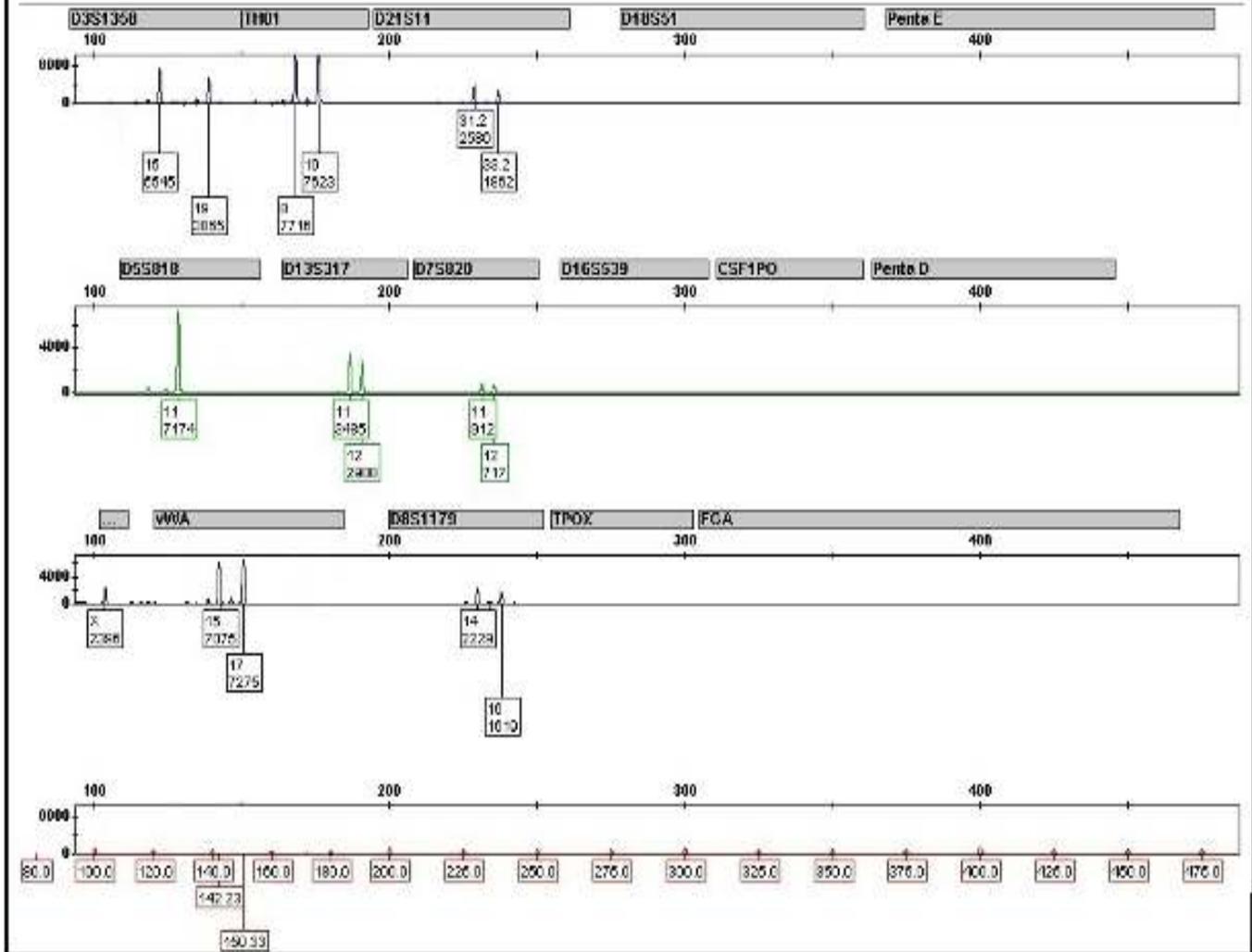
Pour environ la moitié des échantillons (02, 03 et 06), les valeurs de Ct des IPC indiquaient la présence d'inhibiteurs ( $Ct > \text{ou} = 32$ ).

## II. Etablissement des profils STR

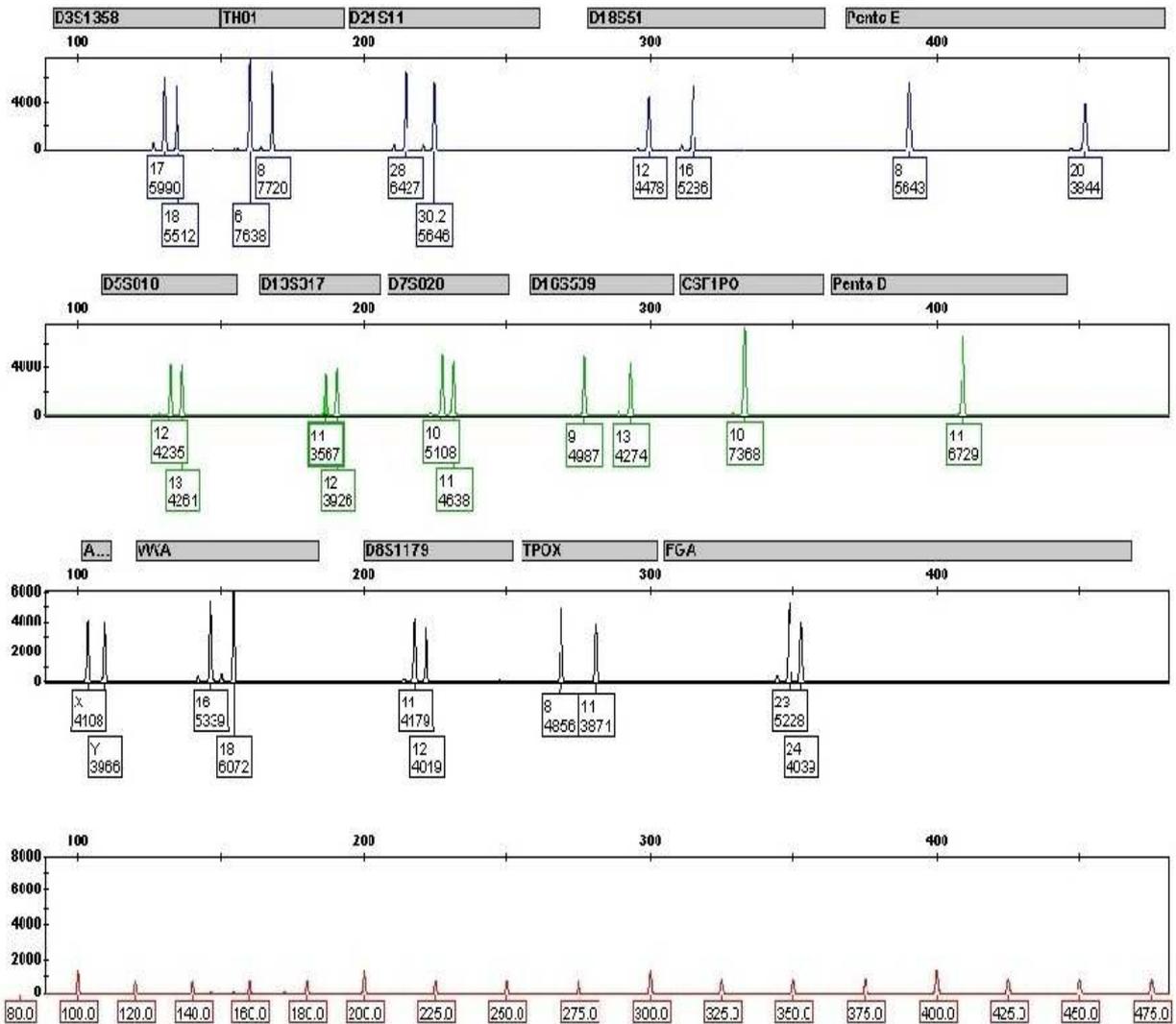
Les analyses ont été réalisées pour les 8 extraits obtenus qu'on ai eu de l'ADN ou pas. Après l'amplification des 16 marqueurs informatifs permettant l'identification des individus, les amplificats ont été passé sur un séquenceur ABI prism 3130, afin de séparer les différents fragments d'ADN par électrophorèse capillaire en fonction de leurs tailles.

Les résultats ont été analysés avec le logiciel GeneMapper® *ID*, version 3.2. Le 1<sup>er</sup> panel représente un électrophérogramme des pics des locus marqués à la fluorescéine (bleu): Penta E, D18S51, D21S11, TH01 et D3S1358 e. Le 2<sup>nd</sup> panel représente un électrophérogramme des pics des locus marqués à la JOE (vert) : Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S8220, D13S317 et D5S818. Le 3<sup>ème</sup> panel représente un électrophérogramme des pics des locus marqués à la TMR : FGA, TPOX, D8S1179, Vwa et l'amélogénine. Le dernier panel représente un électrophérogramme des fragments du standard interne 600, compris entre 80 et 475 pb.

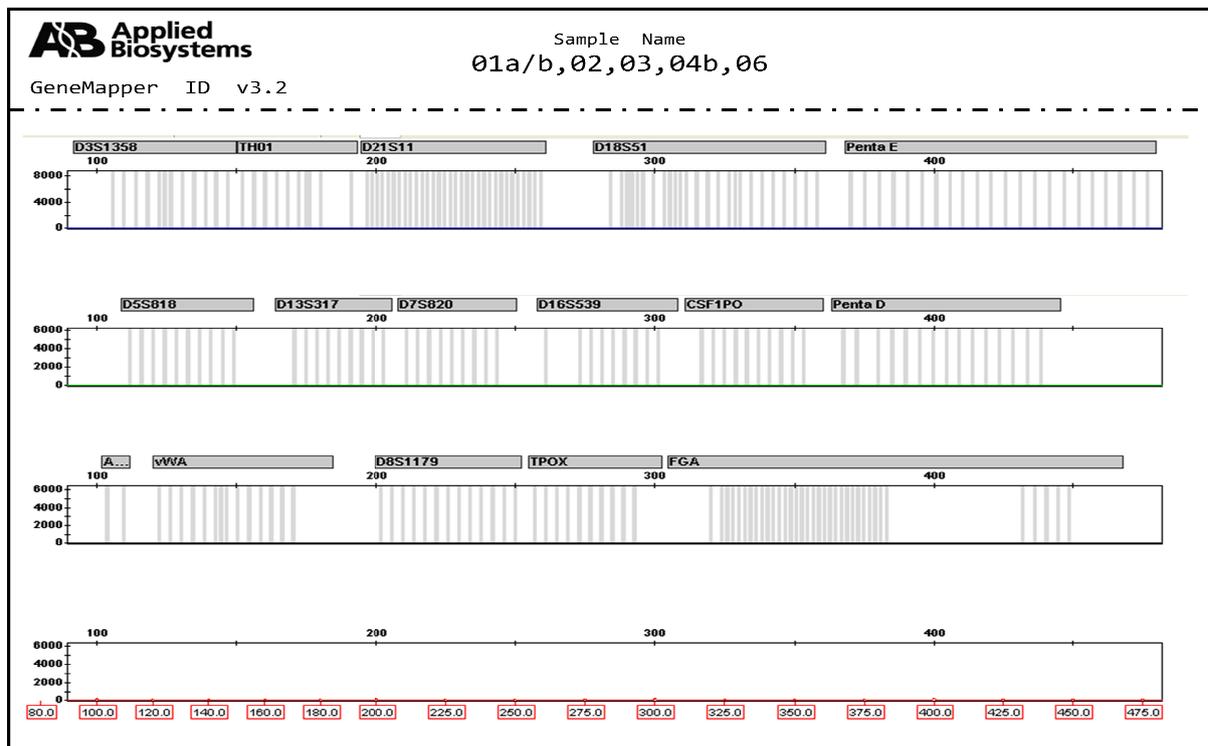
Les profils présentés ci-dessous sont le consensus des différents profils obtenus grâce au kit Powerplex 16. Sur ces profils, nous retrouvons sur les étiquettes des allèles: en premier le nom de l'allèle et en dessous la hauteur des pics (Fig 1, 2 et 3).



**Figure 13:** Électrophorégramme des quinze loci STR du kit PP-16 pour l'individu 04a.



**Figure 14:** Électrophorégramme des quinze loci STR du kit PP-16 pour l'individu 05



**Figure 15:** Résultat des quinze loci STR et l'amélogénine du kit PP-16 pour les individus 01a/b, 02, 03, 04b et 06

Nos résultats ont montré que sur l'ensemble des 6 spécimens testés, 2 ont livré de l'ADN relativement bien conservé permettant d'en obtenir des profils. En effet, pour les échantillons 01a/b, 02, 03, 04b et 06 les seize marqueurs moléculaires n'ont donné aucun pic.

L'échantillon n°04a a permis l'obtention d'un profil partiel avec la détection des huit marqueurs STR à savoir : D3S1358 (15 / 19), TH01 (8 / 10), D21S11 (31.2 / 33.2), D5S818 (11 / 11), D13S317 (11 / 12), D7S820 (11 / 12), vWA (15 / 17), D8S1179 (14 / 16).

Nous avons remarqué que les marqueurs qui n'ont pas été détectés sont les marqueurs de grande taille allant de 275 à 475pb, à savoir : D16S539, CSF1PO, Penta D, TPOX, FGA, D18S51 et Penta E. Ce phénomène est la conséquence des cassures de la molécule d'ADN qui surviennent de façon préférentielle au niveau des régions les plus longues et qui empêchent leur amplification (Calvo, 2001). En effet, la probabilité de rencontrer dans un échantillon un fragment d'intérêt intact est inversement proportionnelle à sa longueur. Plus l'ADN est altéré, et moins il est probable de retrouver de longues séquences d'ADN (Gill *et al.*, 2000).

L'échantillon n°5 a donné un profil complet avec la révélation des 15 marqueurs STR, à savoir : D3S1358 (17 / 18), TH01 (16 / 8), D21S11 (28 / 32.2), D18S51 (12 / 16), Penta E (8 / 20), D5S818 (12 / 13), D13S317 (11 / 12), D7S820 (10 / 11), D16S539 (9 / 13), CSF1PO (10 / 10), Penta D (11 / 11), vWA (16 / 18), D8S1179 (11 / 12), TPOX (8 / 11), FGA (23 / 24).

De plus, deux échantillons ont permis l'obtention de profils autosomaux, au moins partiels, à partir desquels, nous avons pu déterminer le sexe des individus. Les résultats obtenus pour le locus de l'amélogénine ont révélé que l'individu 05 était de sexe masculin tandis que l'individu 04a était de sexe féminin. Le tableau VIII est un récapitulatif de l'ensemble de nos résultats.

**Tableau VIII** : Profils STR autosomaux obtenus pour les individus 04a et 05

Marqueur	Génotype 04a	Hauteur des pics(RFU)	Génotype 05	Hauteur des pics(RFU)	Taille des marqueurs (pb)
D3S1358	15 / 19	5545 / 3856	17 / 18	5990 / 5512	<150
TH01	8 / 10	7716 / 7623	6 / 8	7638 / 7720	<200
D21S11	31.2 / 33.2	2586 / 1862	28 / 32.2	6427 / 5646	<160
D18S51	-----	-----	12 / 16	4478 / 5286	<370
Penta E	-----	-----	8 / 20	5643 / 3844	<480
D5S818	11 / 11	7174 / 7174	12 / 13	4235 / 4261	<250
D13S317	11 / 12	3485 / 2988	11 / 12	3567 / 3926	<160
D7S820	11 / 12	912 / 717	10 / 11	5108 / 4638	<250
D16S539	-----	-----	9 / 13	4987 / 4274	<250
CSF1PO	-----	-----	10 / 10	7368 / 7368	<360
Penta D	-----	-----	11 / 11	6729 / 6729	<440
vWA	15 / 17	7075 / 7275	16 / 18	5339 / 6072	<170
D8S1179	14 / 16	2229 / 1619	11 / 12	4179 / 4019	<200
TPOX	-----	-----	8 / 11	4856 / 3871	<290
FGA	-----	-----	23 / 24	5228 / 4039	<450
Amélogénine	XX	2396 / 2396	XY	4108 / 3966	<112

Ce tableau résume en effet les génotypes des individus chez qui nous avons obtenu une quantité d'ADN suffisante pour ces explorations, la hauteur des pics de chaque allèle, ainsi que la taille des différents marqueurs.

Sans surprise, certains des échantillons pour lesquels nous n'avons pas obtenu de résultats exploitables présentaient une quantité tellement infime d'ADN qu'elle ne pouvait être ni quantifiée ni amplifiée (**Tableau VII**). La faible quantité d'ADN n'est pourtant pas la seule raison de l'absence de résultats interprétables. En effet, dans certains cas, même si l'ADN semblait présent dans des quantités raisonnables (échantillon 02 et 06), il apparaissait par la suite trop dégradé ou contaminé, empêchant toute analyse. La fragmentation diminue l'efficacité d'amplification, même lorsque la quantité d'ADN matrice n'est pas limitante (Dixon et al., 2005).

# Chapitre IV :

## **Discussion**

L'analyse de l'ADN des ossements étant directement liée, aux risques de contamination, à la dégradation du matériel génétique et à la difficulté de recueil des échantillons (Calvo *et al.*, 2001), nous nous sommes attelés au cours de notre étude à intégrer les répercussions associées à ces différents facteurs et à définir des conditions requises pour en palier les effets. Cependant, malgré la serviabilité du personnel au niveau du laboratoire de biologie de l'INCC, le développement technologique mis en place et la disponibilité des réactifs nécessaires, nous nous sommes tout de même parfois heurtés à des limites qui ont pu freiner notre travail, comme par exemple l'extrême difficulté de l'obtention des échantillons osseux, l'état de conservation de l'ADN au sein de ces échantillons ou le manque des détails et des renseignements sur les dents utilisées dans cette étude.

Malheureusement, il n'était pas possible d'estimer dans quelle mesure ont été faites les manipulations. De plus, aucune information n'était disponible pour ces six sujets ce qui limitait grandement l'intérêt de l'analyse. Selon Gilbert et ses collaborateurs (Gilbert *et al.*, 2006), si lors de l'analyse des ossements, l'historique de la manipulation et du recueil des restes humains appropriés est absent, l'efficacité scientifique d'une telle étude sera mise en question.

Les précautions prises lors du prélèvement des échantillons sont cruciales afin d'éviter les contaminations par de l'ADN exogène. Il a en effet été rapporté que ces contaminations antérieures aux processus d'analyse en laboratoire représentent une des sources majeures d'ADN exogène et sont particulièrement difficiles à mettre en évidence (Sampietro *et al.*, 2006 ; Deguilloux *et al.*, 2011). Toutefois, il faut garder à l'esprit que les conditions environnementales ainsi que les conditions de stockage des échantillons après leur mise au jour jouent un rôle primordial dans la conservation de l'ADN et qu'elles vont influencer sur tous les types de prélèvements.

## ➤ L'extraction de l'ADN

Pour la réalisation de notre étude nous avons utilisé l'extraction phénol-chloroforme iso-amylque qui est l'une des méthodes les plus ancienne et les plus efficace de l'extraction de l'ADN à partir des ossements (Chomczynski et Sacchi, 1987 ; Kochl *et al.*, 2004).

Avant de procéder à l'extraction de l'ADN par cette méthode organique, nous avons commencé par une décontamination et un lavage de la surface des dents à l'eau javellisée puisqu'il semblerait que l'utilisation de l'Hypochlorite de sodium permette d'éliminer ou du moins de diminuer l'effet des inhibiteurs (Watt, 2005 ; Salamon *et al.*, 2005).

Cependant, la décontamination chimique utilise les propriétés d'altération de la molécule d'ADN par la solution d'NaOCl qui provoque des lésions oxydatives et la dénaturation de l'ADN double brin par destruction des liaisons hydrogènes (Hawkins *et al.*, 2002, Whiteman *et al.*, 2002).

L'utilisation de solutions permettant de dégrader l'ADN présente tout de même un risque pour l'ADN endogène de l'échantillon. En effet, dans le cas d'ossements poreux une infiltration du produit en profondeur est possible et aura pour conséquence une altération de l'ADN du sujet.

Malgré les précautions prises lors de la pulvérisation de nos échantillons, il se pourrait que des échauffements se soient produits entraînant ainsi une dégradation de l'ADN par rupture des liaisons phosphodiester (Lindhal, 1993). En revanche, le broyage dans l'azote liquide permettrait de s'affranchir de l'augmentation de cette température délétère (Duval, 2010).

Lors du broyage des dents, nous avons remarqué différentes colorations des pulpes dentaires. Nous avons pu observer des colorations brunes, noires ou blanches. Ces colorations ne semblent en aucun cas avoir des répercussions sur la qualité des résultats comme le souligne Raoult dans son étude (Raoult *et al.*, 2000).

Lors de la purification PCI nous avons remarqué une coloration brune dans la phase aqueuse. En effet, la présence d'une coloration brune dans le surnageant a été décrite comme caractéristique de la présence des inhibiteurs (Cooper, 1992). Le fait de répéter cette étape permet de diminuer la coloration du surnageant et par conséquent de diminuer la concentration en inhibiteurs.

La dentine, en tant que tissu fortement minéralisé, contient des cristaux d'hydroxyapatite tout comme dans le tissu osseux. Or, il semblerait que ces cristaux favorisent l'adsorption et la protection de l'ADN au cours du temps (Salamon *et al.*, 2005). L'étude de Campos et ses collaborateurs met en avant la possibilité d'obtenir de l'ADN de bonne qualité par la dissolution des agrégats de cristaux d'hydroxyapatite présents dans les ossements (Campos *et al.*, 2012).

L'utilisation d'un protocole conduisant à une déminéralisation complète des échantillons osseux semble donc judicieux puisque la dissolution totale de la poudre dentaire pourrait permettre l'accès à ces cristaux et ainsi augmenter le rendement de l'extraction.

#### ➤ La quantification d'ADN

Les échecs d'amplification peuvent être liés au fait que l'ADN endogène est trop fortement dégradé ou présent en trop faible quantité. Une dégradation suite aux modifications post mortem des squelettes et l'incapacité d'une purification complète de l'ADN de certains inhibiteurs qui interfèrent avec l'amplification PCR sont des événements qui ont déjà été décrits dans la littérature (Yang *et al.*, 1998 ; Eilert et Foran, 2007 ; Pretty, 2007 ; Manjunath *et al.*, 2011). Les inhibiteurs les plus fréquemment rencontrés sont des substances contenues dans le sol comme les acides humiques et fulviques, les tannins ainsi que les ions métalliques (Hummel *et al.*, 1992 ; Tuross, 1994 ; Alain *et al.*, 2011 ; Edwards *et al.*, 2004).

Etant donné que la présence d'un inhibiteur peut toujours être suspectée. Il est donc nécessaire de s'assurer de la présence ou de l'absence de ces substances dans l'extrait analysé. Pour ce faire, nous avons quantifié les extraits ADN par PCR en temps réel à l'aide du Kit Quantifiler™.

La quantification par PCR en temps réel de l'ADN extrait permet, outre l'estimation de la concentration de l'ADN présent dans l'extrait, d'évaluer la présence d'inhibiteurs. Cette technique permet de distinguer la présence d'inhibiteurs de manière fiable grâce à la présence dans le mélange réactionnel d'un témoin interne (IPC : Internal PCR Control).

Dans notre étude, la sensibilité du kit Quantifiler™ n'a pas permis de déterminer une valeur de concentration pour 3 sur 8 extraits (01a, 01b et 03) . Les dégradations subies par les

molécules d'ADN présentes dans ces échantillons ont pu donner lieu à cette absence d'amplification. Ceci serait probablement due au fait que les échantillons ne contiennent pas une quantité suffisamment détectable par la méthode employée, ou qu'ils ne renferment plus d'ADN (Allonso *et al.*, 2004 ; Pruvosta, 2004). En outre, il est probable que les variations stochastiques lors du pipetage soient également à l'origine de cette absence de détection (Keffi *et al.*, 2003).

Les valeurs de Ct observées pour l'IPC des six échantillons indiquent la présence d'inhibiteurs pour la moitié des extraits (02, 03 et 06). Ceci confirmerait d'une part l'hypothèse avancée par Grimoud et ses collaborateurs en 2004, selon laquelle, bien que la dent soit l'organe le plus dur et le plus dense de l'organisme, l'histologie démontre que cet organe n'en est pas pour autant imperméable (Grimou *et al.*, 2004). D'autre part, ce résultat va à l'encontre de ce qui est habituellement rapporté dans la littérature sur les recherches d'ADN au niveau des dents. En effet, celles-ci sont considérées comme des coffres-forts pour l'ADN ancien, le mettant à l'abri des contaminations (Scott *et al.*, 1994 ; Kurosaki *et al.*, 1993).

Nous avons également remarqué que lorsque nous diminuons la quantité de poudre de départ, nous diminuons partiellement l'effet des inhibiteurs. Ceci souligne le fait que les inhibiteurs présents dans les échantillons sont des inhibiteurs en " trans " (Orlando et Hanni, 2000). Or, en diluant, nous aurions pu diminuer encore plus la quantité des inhibiteurs, mais également la quantité d'ADN engagée dans la réaction, de telle sorte qu'il n'y en ait plus suffisamment pour l'amplification.

#### ➤ L'analyse de l'ADN

Lors de l'évaluation de l'efficacité de typage des différents kits d'amplification des STR autosomaux, nous avons observé de manière récurrente une diminution de l'efficacité de typage en fonction du poids moléculaire du marqueur (D16S539, CSF1PO, Penta D, TPOX, FGA, D18S51 et Penta E). Cette caractéristique de l'ADN ancien est liée aux dégradations subies au cours du temps (Calvo, 2001). La taille des marqueurs pouvant être relativement importante, jusqu'à 400pb, il n'est pas rare que l'ADN présent dans le tissu ancien soit trop fragmenté pour permettre l'amplification des fragments de grande taille.

Les microsatellites étant des polymorphismes de longueur de séquence, la taille des fragments produits pour leur détection (entre 100 et 450 paires de bases) reste un inconvénient majeur (Gill, 2002). En effet, leur étude s'avère difficile à partir d'échantillons ayant subi une dégradation. Ces observations renforcent l'intérêt lié au développement de méthodes d'identification génétique basées sur l'analyse de fragments d'ADN plus courts augmentant ainsi la diversité des échantillons exploitables (Butler *et al.*, 2003).

Ces dernières années, plusieurs études (Coble et Butler, 2005 ; Dixon *et al.*, 2005 ; Grubwieser *et al.*, 2005 ; Opel *et al.*, 2007) ont été publiées sur l'utilisation des STR dont le poids moléculaire est réduit par rapport à ceux présents dans les kits commerciaux. Les amorces sont dessinées afin de se rapprocher le plus possible des séquences cibles et ainsi réduire la taille des amplicons. L'utilisation de ces mini-STRs représente donc une approche prometteuse. L'avantage majeur de ces STR plus courts ou mini-STR est leur compatibilité avec les banques de données construites jusqu'à présent (Manjunath *et al.*, 2011).

L'absence d'amplification de fragments de haut poids moléculaire aboutit à un profil partiel qui possède un pouvoir discriminant réduit (Golenberg *et al.*, 1996 ; Weir et Bruce, 2004). L'ADN subissant une dégradation rapide par l'influence de différents facteurs dès la mort de la cellule, ce type d'échantillon est très fréquent en médecine légale.

Il est également important de considérer que pour le typage des STR autosomaux, un nombre de copies de départ aussi réduit requière une augmentation du nombre de cycles de PCR (Gill *et al.*, 2000, Whitaker *et al.*, 2001 ; Rizzi *et al.*, 2012). Ce nombre de cycles de PCR permettrait de détecter une seule copie d'ADN (Gill *et al.*, 2000). Il faut néanmoins noter que ces conditions de PCR peuvent générer certains artefacts (perte d'hétérozygotie, déséquilibre de hauteur des pics, faux allèles et stutters) (Butler, 2011 ; Walsh 2004 ; Budwole *et al.*, 2001).

En effet, le typage des STR à partir d'échantillons anciens peut présenter des difficultés du fait des altérations subies par les molécules d'ADN ainsi que des concentrations faibles ce qui a tendance à favoriser l'apparition d'artefacts d'amplification. D'une part, lors de la réaction d'amplification, outre les produits de PCR attendus, des fragments de plus petites et plus grandes tailles sont également produits à la suite d'erreurs de la Taq polymérase (Hite *et al.*,

1996; Olejniczak et Krzyzosiak, 2006). Leur présence crée des pics surnuméraires "stutters" sur les électrophorégrammes, rendant ainsi la discrimination entre homozygotes et hétérozygotes difficile (Shinde *et al.*, 2003 ; Gibb *et al.*, 2009).

D'autre part, certains allèles peuvent ne pas être amplifiés lors de la PCR du fait d'une mutation au niveau du site de fixation des amorces. Nous parlons alors d'allèles nuls (Heinrich *et al.*, 2004). Au cours de la PCR, il se produit généralement une amplification préférentielle des allèles les plus courts au détriment des allèles de plus grandes tailles, pouvant dans certains cas aboutir à la non détection des plus grands allèles lorsqu'ils sont à l'état hétérozygote.

Il s'agit du phénomène de l'allèle muet " allele dropout" (Wattier *et al.*, 1998). En effet, ces artéfacts peuvent entraîner un biais dans l'interprétation des profils alléliques.

Enfin, outre la fragmentation et la dégradation du brin d'ADN, les variations stochastiques liées à l'amplification d'ADN en faible quantité sont également responsables d'absence d'amplification (Whitaker *et al.*, 2001).

Les objectifs que nous nous sommes fixés au début de ce travail de mémoire sont majoritairement atteints. En effet, nous avons pu confirmer la dominance des enjeux de l'étude de l'ADN des ossements. Par ailleurs, même si l'extraction phénol-chloroforme isoamylique nous a modestement permis d'obtenir des profils génétiques, elle apparaît tout de même peu efficace pour l'extraction de l'ADN ancien, non pas seulement parce qu'elle est limitée par l'état de l'échantillon étudié, mais aussi à cause de sa toxicité et du temps nécessaire à sa réalisation.

# **Conclusion**

## **Conclusion**

L'analyse de l'ADN à partir des tissus durs (os et dents) a été rendu possible grâce au développement des techniques de la biologie moléculaire, ce qui a contribué de façon déterminante à la détermination de l'identité des individus à partir des restes humains dégradés où les ossements sont la seule source d'ADN.

A travers le travail que nous avons réalisé dans ce modeste mémoire, nous pouvons dire que l'ADN que nous avons exploité n'était relativement pas bien conservé au sein des échantillons anciens auxquels nous avons eu accès et que les inhibiteurs jouaient un rôle majeur quand à la qualité des résultats obtenus.

Aussi, nous pouvons dire que la qualité des échantillons étudiés en association avec la technique d'extraction phénol-chloroforme isoamylique employée nous ont modestement permis d'obtenir des profils génétiques. Il serait donc intéressant de tester d'autres méthodes d'extraction plus appropriés à l'étude de l'ADN ancien.

Enfin, le choix d'un protocole d'extraction de meilleur rendement, une meilleure compréhension des particularités de l'ADN ancien ainsi que sa préservation au sein des tissus durs et la mise au point de conditions optimales du recueil des spécimens à partir des restes squelettiques devraient effectivement être très déterminants pour aborder de nouvelles études ayant pour support l'ADN des ossements.

## **Liste des figures**

- Figure 1 :** Processus impliqué dans l'identification par l'ADN
- Figure 2 :** Présentation des artéfacts de la détection des profils génétique
- Figure 3 :** Polymorphisme de séquence (SNP)
- Figure 4 :** Marqueur VNTR et STR
- Figure 5 :** Profils électrophorétiques obtenus après analyse du gène de l'amélogénine
- Figure 6 :** Modifications post-mortem subies par la molécule d'ADN
- Figure 7 :** Rupture de brin par hydrolyse de liaison phosphodiester
- Figure 8 :** Perte de base azotée et cassure de brin par hydrolyse
- Figure 9 :** Sites de lésions sur la molécule d'ADN par les différents types de dégradation
- Figure 10 :** Les étapes suivies pour le typage de l'ADN
- Figure 11 :** Electrophérogramme des fragments du standard interne 600
- Figure 12:** Electrophérogrammes de l'échelle allélique du système PowerPlex® S16.
- Figure 13:** Eléctrophorégramme des quinze loci STR du kit PP-16 pour l'individu 04a
- Figure 14:** Eléctrophorégramme des quinze loci STR du kit PP-16 pour l'individu 05
- Figure 15:** Résultat des quinze loci STR et l'amélogénine du kit PP-16 pour les individus 01a/b, 02, 03,04b et 06
- Figure 16 :** Les amorces du système PowerPlex 16 HS
- Figure 17 :** Eléctrophorégramme brut des quinze loci STR du kit PP-16 pour l'individu 04a
- Figure 18 :** Eléctrophorégramme brut des quinze loci STR du kit PP-16 pour l'individu 05

## **Liste des tableaux**

- Tableau I :** Quantité d'ADN extraite de différents matériels biologiques
- Tableau II :** Récapitulatif du rôle des différents facteurs influençant la dégradation de l'ADN
- Tableau III :** Matériel non biologique utilisé dans l'expérimentation
- Tableau IV :** Le Kit de quantification « Quantifiler » (Barbisin & Shewale 2010)
- Tableau V :** Les Loci STR du système PowerPlex®16
- Tableau VI :** Etat des échantillons étudiés
- Tableau VII :** Les résultats de la quantification par Rt-PCR
- Tableau VIII :** Profils STR autosomaux obtenus pour les individus 04a et 05

# **Références bibliographiques**

## *Références bibliographiques*

- **Akane, A., Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. 1994.**  
Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Sciences*, 39, 362–372.
- **Alain, K., Callac N, Ciobanu MC, Reynaud Y, Duthoit F, Jebbar M. 2011.** DNA extractions from deep seafloor sediments . *Journal of Microbiological Methods*. 87 : 355-362
- **Allonso, A. Martín P, Albarrán C, García P, García O, de Simón LF, García-Hirschfeld J, Sancho M, de La Rúa C, Fernández-Piqueras J. . 2004.** Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies . *FSI*. 139 : 141-149
- **Ameziane, N., Bogard, M., Lamoril, J. 2005.** Principe de biologie moléculaire en biologie clinique, Masson. Paris.
- **Amory, J.R., Barker, Z.E., Wright, J.L., Mason, S.A., Blowey, R.W., Green, L.E. 2007.** Associations between sole ulcer, white line disease and digital dermatitis and the milk yield of 1824 dairy cows on 30 dairy cow. *Prev. Vet. Med.*, 83: 381-391.
- **Bachman, R.P.D. 2009.** The Use Of Forensic Anthropology. CRC Press. New York.
- **Barbisin, M., Shewale, J-G. 2010.** Assessment of DNA extracted from forensic samples prior to genotyping. *Forensic Science Review*, 22, 199–214.
- **Buckleton J, Triggs CM, Walsh SJ.2005.** Forensic DNA Evidence Interpretation. CRC Press. New York
- **Budowle B, Masibay A, Anderson SJ, Barna C, Brenneke S, Brown BL, et al. 2001.** STR primer concordance data. *Forensic Sci Int*;124(1)47–54.

- **Butler, J-M. 2005.** FORENSIC DNA TYPING BIOLOGY, TECHNOLOGY, AND GENETICS OF STR MARKERS. Burlington.
- **Butler, J-M. 2010.** Fundamentals of Forensic DNA Typing. Elsevier Inc. California.
- **Butler, J-M. 2012.** Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Elsevier Inc. California.
  
- **Campana, J.-P., 2003.** Principes de médecine légale. Editions Arnette, Paris.
- **Campos P. F., Craig O. E., Turner-Walker G., Peacock E., Willerslev E., Gilbert M. T. P. 2012.** DNA in ancient bone: where is it located and how should we extract it? *Ann. Anat.* 194: 7–16.
- **Carracedo, A. 2004.** Forensic DNA Typing Protocols. Humana Press, New York.
- **Chamberlain, J.S., Gibbs,R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N et Caskey, C.T. 1988** Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acid Res.*16: 11141-11156.
- **Charles, S., Esther R., Brunetto C. 2003.** Anthropologie biologique, Évolution et biologie humaine. De Boeck Université, Bruxelles.
- **Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987.** Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem*, 162(1):156-159.
- **Clayton, E.W., Steinberg, K.K., , Khoury MJ, Thomson E, Andrews L, Kahn MJ, Kopelman LM, Weiss JO. 1995.** Informed consent for generic research on stored tissue samples. *JAMA*, 274, n°22 : 1786-1792.
- **Cooper, C. 2008.** Eyewitness FORENSIC SCIENCE. DK Publishing, Hong Kong.
- **Coquoz, R., Taroni, F. 2006.** Preuve Par l'ADN: La génétique au service de la justice. 2<sup>ème</sup> édition. Press polytechniques et universitaires romandes. Lausanne .
- **Comey, C. T., et al. 1994.** DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *Journal of Forensic Sciences*, 39, 1254–1269.

- **Deguilloux, M-F, Ricaud S, Leahy R, Pemonge MH. 2011.** Analysis of ancient human DNA and primer contamination. *FSI* , 210 : 102-109
- **DeSalle, M.Y.R. 2002.** THE GENOMIC REVOLUTION : Unveiling the Unity Of Life. Washington : Joseph Henry Press.
- **Dixon RA, Xie DY, Sharma SB . 2005.** Proanthocyanidins: a final frontier in flavonoid research? *New Phytol* 165: 9–28.
- **Doutremepuich, C. 1998.** Les Empreintes Génétiques en pratique judiciaire. La Documentation française, Paris.
- **Duval, K. Aubin RA, Elliott J, Gorn-Hondermann I, Birnboim HC, Jonker D, Fournery RM, Frégeau CJ. . 2010.** Optimized manual and automated recovery of amplifiable DNA from tissues preserved in buffered formalin and alcohol-based fixative. *FSI Genetics*. 4: 80-88
- **Eckert, W-G. 1997.** Introduction to Forensic Sciences. CRC, Florida.
- **Edwards, A., Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. . 1991.** DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, 49, 746–756.
- **Ellegren, H., 2004.** Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Natl. Rev. Genet.*, 5: 435-445. PubMed
- **Eckhart, L., W. Declercq, J. Ban, M. Rendl, B. Lengauer, C. Mayer, S. Lippens, P. Vandenabeele, and E. Tschachler. 2000.** Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J. Invest. Dermatol.* 115:1148-1151.
- **Ferguson, S.B.E. 2011.** Forensic Anthropology. Boca Raton. Suite : Taylor and Francis Group, LLC.

- **Gibb, Andrew J., Andrea-Louise Huell, Mark C. Simmons, and Rosalind M. Brown. 2009.** Characterization of Forward Stutter in the AmpF/STR® SGM Plus® PCR. *Science and Justice*, 49(1):24-31.
  
- **Gill, P., Jeffreys AJ, Werrett DJ . 1985.** Forensic application of DNA ‘fingerprints’. *Nature*, 318, 577–579.
  
- **Gill, R., Henwood, K., McLean, C. 2000.** 'The tyranny of the sixpack: Men talk about idealised images of the male body in popular culture' in Squire,C (Ed.) *Culture in Psychology*. Lonson: Routledge.
- **Gilbert, M.T.P., A.J. Hansen, E. Willerslev, L. Rudbeck, I. Barnes, N. Lynnerup, and A. Cooper 2003.** Characterization of Genetic Miscoding Lesions Caused by Post Mortem Damage. *American Journal of Human Genetics*, 72:48-61.
  
- **Ginther, C., Issel-Tarver L, King MC. . 1992.** Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature Genetics*, 2, 135–138.
  
- **Gilliquet Véronique, 2009.** *Biologie 6e – Manuel: Sciences générales*. De Boeck. Bruxelles.
  
- **Gauthier, Michel G., Bechhoefer John.2009.** Control of DNA Replication by Anomalous Reaction-Diffusion Kinetics .*Phys. Rev. Lett.* 102, 158-104.
  
- **Grimaud, M-A. 1994.** Les enjeux de la recevabilité de la preuve d'identification par ADN [Livre]. Montréal.
  
- **Guy, G. 2009.** *Secrets d’ossements : La science au service de l’énigme de l’Histoire*, Edp Sciences .
  
- **Hänni, C. 1994.** Utilisation de l'ADN ancien en anthropologie. *Bull. et Mém. de la Société d'anthropologie de Paris*.1-2, 5-28.
  
- Haynes, S., Searle, J.B. , Bertman, A. , Dobney, K.M. 2002.** Bone preservation and ancient DNA: the application of screening methods for predicting DNA, *Journal of Archaeological Science* 29 : 585–592

- **Hill, C-R., Duewer DL, Kline MC, Sprecher CJ, McLaren RS, Rabbach DR, Krenke BE, Ensenberger MG, Fulmer PM, Storts DR, Butler JM., 2010.** Concordance and population studies along with stutter and peak height ratio analysis for the PowerPlex ESX 17 and ESI 17 Systems. *Forensic Science International: Genetics* (in press).
- **Hitte, Ch. 2009.** Organisation du génome et polymorphisme génétique. université de Rennes 1.
- **Hofreiter, M., D. Serre, H. N. Poinar, M. Kuch, and S. PA" A" BO. 2001.** Ancient DNA. *Nat. Rev. Genet.* 2:353–359 .
- **Holland, PM., Abramson, RD., Watson, R., Gelfand, DH. 1991.** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 88 : 7276-80.
- **Houck Max, M. 2007.** FORENSIC SCIENCE: Modern Methods of Solving Crime. Praeger Publishers. London.
- **Jeffreys, A- J., Wilson, V., Thein, S. L. 1985.** Individual- specific fingerprints of human DNA, *Nature* 314, 67–73.
- **Jeffreys, A-J., Morton, D-B. 1987.** DNA fingerprinting of dogs and cats. *Animal Genetics*, 18, 1–15.
- **Jobling, M.A., Gill, P. 2004.** Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Review Genetics* (5), 739-751.
- **Kaplain, J-C., Delpech, M. 1996.** *Biologie moléculaire et médecine*, 2e éd. Flammarion. 790p.

- **Karp, G. 2010.** Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments. -Hoboken : John Wiley & Son, Inc.
  
- **Kirsanow K, Burger J. 2012.** Ancient human DNA. *Ann Anat.* 194(1):121-32.
  
- **Kochl, S., H. Niederstatter, and W. Parson. 2004.** DNA Extraction and Quantitation of Forensic Samples Using the Phenol-Chloroform Method and Real-Time PCR. *Methods Mol Biol*, 297:13-30.
  
- **Krzyzosiak, W., Olejniczak, M. 2006.** Genotyping of simple sequence repeats-factors implicated in shadow band generation revisited. *Electrophoresis* 27: 3724-3734.
  
- **Kwok, S., Higuchi, R. 1989.** Precautions for PCR. *Nature* 339 : 237-238.
  
- **Lee Lerner Brenda Wilmoth Lerner, K. 2006.** WORLD of FORENSIC SCIENCE. San Francisco : Thomson Gale.
  
- **Lindahl, T. 1993.** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709–715. PubMed.
  
- **Locard, E. 1920.** L'enquête criminelle et les méthodes scientifiques. Flammarion.
  
- **Makova, KD., Li, WH. 2002.** Strong male-driven evolution of DNA sequences in humans and apes. *Nature* 416:624–626.
  
- **Manjunath, B.C. Chandrashekar BR, Mahesh M, Vatchala Rani RM. . 2011.** DNA Profiling and forensic dentistry :A review of the recent concepts and trends . *Journal of Forensic and Legal Medicine.* 18: 191-197
  
- **Martin, J-C., 2004.** Investigation de scène de crime. Fixation de l'état des lieux et traitement de traces d'objet. Collection Sciences Forensiques. 2e édition. Editions

Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.

**Mansuel-Lupo A., Rouger P., Van Huffel V., 2007.** Les empreintes génétiques : état de l'art en 2007 . *Transfus Clin Biol.* 14(3) :334-42

- **Miras, A., Mali, M., Malicier, D. 1991.** L'identification en médecine légale. Editions Alexandre Lacassagne. Lyon.
- **Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51, 263–273.
- **Ngo, K., Rufie, J., Lucotte, G. 1986 .** A DNA probe detecting multiple haplotypes of the human Y chromosome, *Am. J. Hum. Genet.*, 38 : 407-418.
- **Opel, Kerry L., Denise T. Chung, Jiří Drábek, John M. Butler, and Bruce R. McCord 2007.** Developmental Validation of Reduced-Size STR Miniplex Primer Sets. *Journal of Forensic Sciences*, 52(6):1263-1271.
- **Olejniczak, M., and W.J. Krzyzosiak. 2006.** Genotyping of simple sequence repeats—factors implicated in shadow band generation revisited. *Electrophoresis* 27:3724-3734.
- **Pääbo, S. 1989.** Ancient DNA; Extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1939–1943.
- **Pääbo, S., Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M..2004.** Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38: 645–679.
- **Pretty, IA. 2007.** Forensic dentistry: Identification of human remains. *Dent Update.* 34:624.

- **Rizzi E., Lari M., Gigli E., De Bellis G. & Caramelli D. 2012.** Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genet. Sel. Evol.*, 44:21.
- **Rudin, N., Inman, K. 2002.** Forensic DNA Analysis [Livre]. - Florida : CRS press LLC.
- **Robert et al. 2009.** Albian ammonite faunas from South America. The genus *Tegoceras*. *Revue de Paléobiologie, Genève* 28(1), 43-51
  
- **Sanchez, J-J., Børsting C, Hallenberg C, Buchard A, Hernandez A, Morling N. . 2003.** Multiplex PCR and minisequencing of SNPs—a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Science International*, 137, 74–84.
- **Schneider, P.M., Bender K, Mayr WR, Parson W, Hoste B, Decorte R, Cordonnier J, Vanek D, Morling N, Karjalainen M, Marie-Paule Carlotti C, Sabatier M, Hohoff C, Schmitter H, Pflug W, Wenzel R, Patzelt D, Lessig R, Dobrowolski P, O'Donnell G, Garafano L, Dobosz M, De Knijff P, Mevag B, Pawlowski R, Gusmão L, Conceicao Vide M, Alonso Alonso A, García Fernández O, Sanz Nicolás P, Kihlgreen A, Bär W, Meier V, Teyssier A, Coquoz R, Brandt C, Germann U, Gill P, Hallett J, Greenhalgh M. 2004.** STR analysis of artificially degraded DNA—results of a collaborative European exercise. *Forensic Science International*, 139, 123–134.
- **Shinde, D., Lai, Y., Sun, F., Arnheim, N. 2003.** Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)<sub>n</sub> and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 31: 974-980.
- **Shiroma CY, Fielding CG, Lewis Jr JA, Gleisner MR, Dunn KN. 2004.** A minimally destructive technique for sampling dentin powder for mitochondrial DNA testing. *J Forensic Sci.* 49:791e5.
- **Simon, A., Rinaldi, M., Hadish, G. 1996.** Channel evolution in the loess area of the midwestern United States. *Proc. Sixth Federal Interagency Sedimentation Conf., Las Vegas*, 3-86–3-93.

- **Sullivan, K. M., Mannucci, A., Kimpton, C. P., Gill, P. 1993.** A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques*. 15(4): 637-641.

**Susanne, C., Rebato, E., Chiarelli, A. B. 2003.** Anthropologie biologique : évolution et biologie humaine. De Boeck . Bruxelles

- **Tebbe, CC., Vahjen, W. 1993.** Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol* 59(8): 2657-65.
- **Timothy Thompson, S-B. 2007.** Forensic Human Identification: An Introduction. CRC Press, New York.
- **Toothman, MH., Kester, KM., Champagne, J., Cruz, TD., Street, WS., Brown, BL. 2008.** Characterisation of human DNA in environmental samples. *Forensic Sci Int*.178:7-15.
- **Tsai, YL., Olson, BH. 1991.** apid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol* 57(4): 1070-4.
- **Underhill, P-A., Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ.. 1997.** Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res*. 7:996–1005.
- **Watson, J-D., Gilman., M. et al. 1992.** *Recombinant DNA*. W.H. Freeman and Company. New York, 2ème édition. p. 563.
- **Watson, J-D., Berry, A. 2004.** DNA: the secret of life. Knopf Doubleday Publishing Group, New York.
- **Wattier, R., Engel, CR., Saumitou-Laprade, P., Valero, M. 1998.** Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental

evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta).  
*Molecular Ecology*, 7, 1569–1573.

- **Weil, J-H. 2005.** *Biochimie générale : cours et exercices corrigés*. DUNOD, Paris. P 583.
- **Weir, Bruce S. 2004.** Matching and Partially-Matching DNA Profiles. *Journal of Forensic Sciences*, 49(5):1009-1014.
- **Willerslev, E., Cooper, A., 2005.** Ancient DNA. *Proc. R. Soc. B* 272, 3–16.
  
- **Yang, D.Y et al. 1998.** Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns . *AMERICAN JOURNAL OF PHYSICAL ANTHROPOLOGY* 105:539–543 .