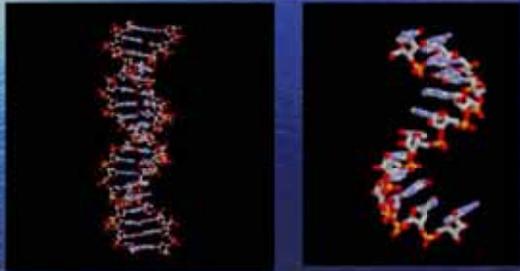


## Les tests ADN ou : la science mène l'enquête.



Conférence Académie 18 février

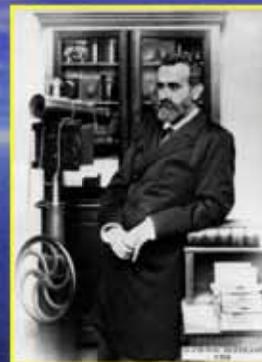


### Plan de l'exposé :

- Historique des tests ADN
- Jeffreys impose les VNTR pour l'établissement des cartes d'identité génétique
- Les améliorations de la technique de Jeffreys : La PCR, les STR et l'électrophorèse capillaire
- Applications pratiques des empreintes génétiques par la police scientifique
- L'empreinte ADN n'est pas l'arme absolue, exemples d'erreurs et de fraudes
- Reconnaissance des individus par les tests ADN et le séquençage de l'ADN mitochondrial, le cas des Romanov



Conférence Académie 18 février



Le père de la police scientifique en France A. Bertillon (1853-1914) associe des mesures anthropométriques à l'analyse des empreintes digitales (1880 Henry Faulds).

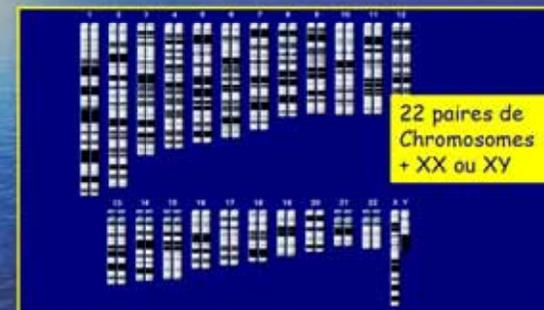


Conférence Académie 18 février



## Utilisation de l'ADN pour typer les individus

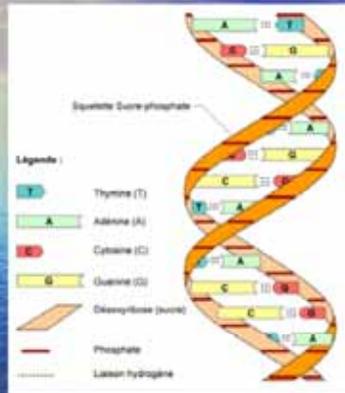
### Le génome humain



Conférence Académie 18 février



Les chromosomes contiennent de l'ADN, une très longue molécule formée d'une séquence de 3 milliards de lettres ATGC



Dans chaque molécule d'ADN on a:

- Des successions de "lettres" qui forment des "mots" les **gènes**
- Un grand nombre de lettres dont on ne connaît pas encore le rôle.



ADN



Conférence Académie 18 février



**Base des tests génétiques :**  
L'ADN d'un individu est unique:  
exemple des RFLP (**R**estriction  
**F**ragment **L**ength **P**olymorphism)



Conférence Académie 18 février



Les **RFLP** sont définis par:

- Une **endonucléase** de restriction (enzyme coupant l'ADN en des séquences précises de quelques nucléotides)
- Une **sonde** capable de reconnaître une région de l'ADN entre deux sites de restriction
- Une technique, celle de **Southern**



Conférence Académie 18 février



**La technique de Southern permet la détection des RFLP**

- 1) L'ADN prélevé est digéré par une enzyme de restriction
- 2) Les fragments de restriction sont séparés par électrophorèse
- 3) Une solution alcaline passe à travers le gel. Elle dénature l'ADN et transfère celui-ci vers le filtre de nitrocellulose
- 4) Le filtre de nitrocellulose est mis en contact avec une sonde ADN simple brin radioactive

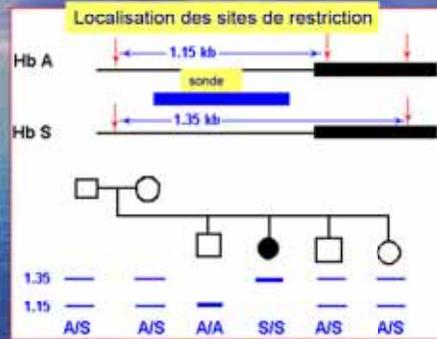
5) Un film photographique est placé sur le filtre de nitrocellulose, permettant ainsi la révélation des hybrides ADN/ADN formés lors de l'étape 4



Conférence Académie 18 février



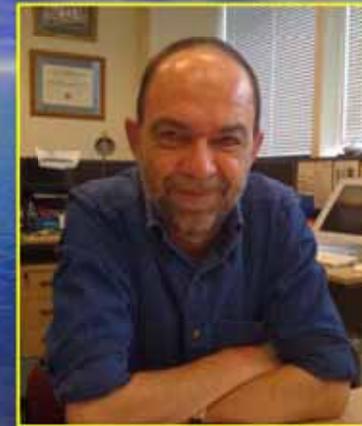
Un exemple de RFLP, les fragments de restriction ont des tailles différentes en fonction de la présence ou de l'absence d'un site reconnu par une endonucléase de restriction



RFLP dans le gène de la  $\beta$ globine  
Présence ( $\beta$ A) ou absence ( $\beta$ S) du site *MstII*

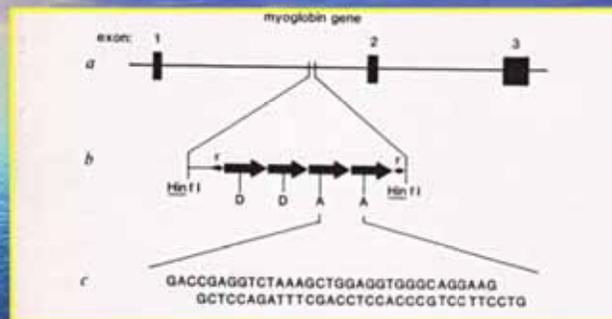
Conférence Académie 18 février

Mise en place des empreintes ADN utilisant les VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) par A. Jeffreys



Conférence Académie 18 février

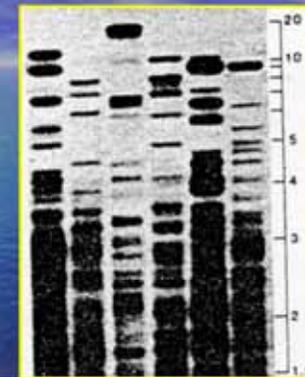
Découverte des VNTR par A. Jeffreys  
Observation initiale



Nature 1985, 314, 67-73

Conférence Académie 18 février

Polymorphisme détecté par la technique de Southern en utilisant une sonde VNTR

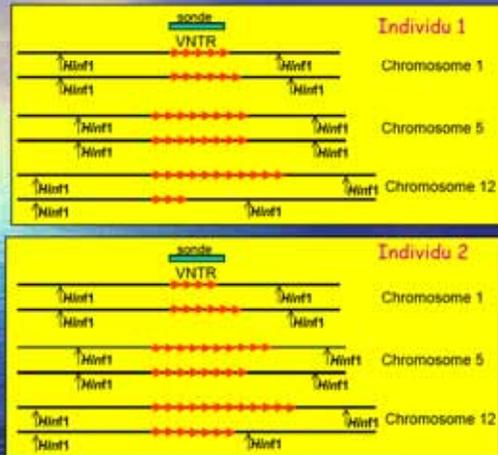


Individus 1 2 3 4 5 6 taille

Nature 1985, 314, 67-73

Conférence Académie 18 février

Les VNTR sont des marqueurs spécifiques de chaque individu



Taille des fragments d'ADN localisés entre les sites de restriction *HinfI* déterminée par la technique de Southern

	2	1
12(12)	—	—
8(10)	—	—
8(8)	—	—
12(7)	—	—
1(6)	—	—
1(4)	—	—
		12(3)



Conférence Académie 18 février



Les VNTR ségrègent comme les allèles d'un gène



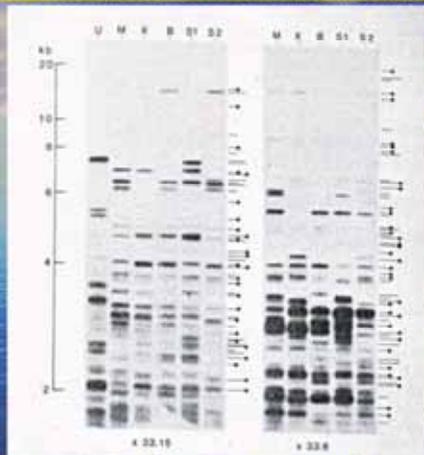
Nature 1985, 914, 67-73



Conférence Académie 18 février



Première résolution d'une identité par une empreinte ADN utilisant les VNTR



U=contrôle  
M=Mère  
X=enfant?  
B=frère  
S1,S2=sœurs

- Fragment maternel
- Fragment paternel
- Fragment maternel transmis à X
- Fragment paternel transmis à X

Nature 317 1985 818-819

Conférence Académie 18 février



La toute première utilisation du test ADN réalisé par A. Jeffreys pour confondre un coupable : cas des crimes de Narborough.



Lynda Mann 15 ans assassinée en 1983 près de Narborough



Dawn Ashworth 15 ans assassinée en 1986 près d'Enderby



Le 19 Septembre 1987 les premiers tests génétiques réalisés par A. Jeffreys permettent à la police d'arrêter le coupable, Colin Pitchfork et d'innocenter Richard Buckland.

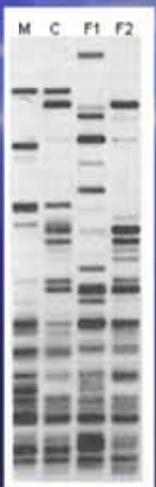


Conférence Académie 18 février



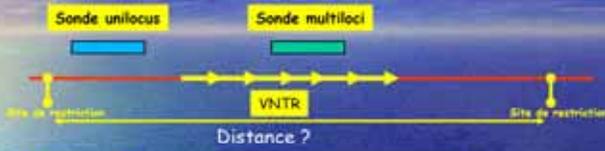
Problèmes posés par l'analyse des VNTR en sonde multiloci par Jeffreys :

- Interprétation du test sur environ 70 loci différents
- Nécessite de quantités importantes d'ADN
- Temps du test
- Prix du test
- Utilisation de la radioactivité

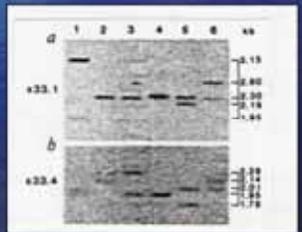


Conference Académie 18 février

Par la suite, on utilise toujours la technique de Southern mais avec des sondes unilocus :



Résultats



Conference Académie 18 février

Le cas Castro (1988) ou les limites de l'analyse par Southern en utilisant des sondes unilocus



Rapport fourni à la justice par Lifecode sur l'analyse de 3 VNTR

TABLE 1 Reported fragment sizes (in kilobases) at three RFLPs in New York v. Castro, as given in Lifecode's formal report to the district attorney

	D2S44	D17S79	D17S79	DXYS14	DXYS14	DXYS14
Blood from watch	10.25	3.87	3.50	4.83	3.00	1.94
Deceased mother	10.25	3.87	3.50	4.83	3.00	1.94
Deceased daughter	ND	3.87	3.50	4.83	—	1.94

Contestation par les avocats de Castro des conclusions de Lifecode  
Exemple avec les résultats au niveau du locus DXYS14

Questions :

- \* Pourquoi sur le profil de la mère Lifecode n'observe que 3 bandes?
- \* Pourquoi sur le profil de la fille Lifecode observe 3 bandes?
- \* Le calcul de la probabilité du profil (1/100 millions) par Lifecode est très discutable

E.S. Lander Nature 339 1989 501-505

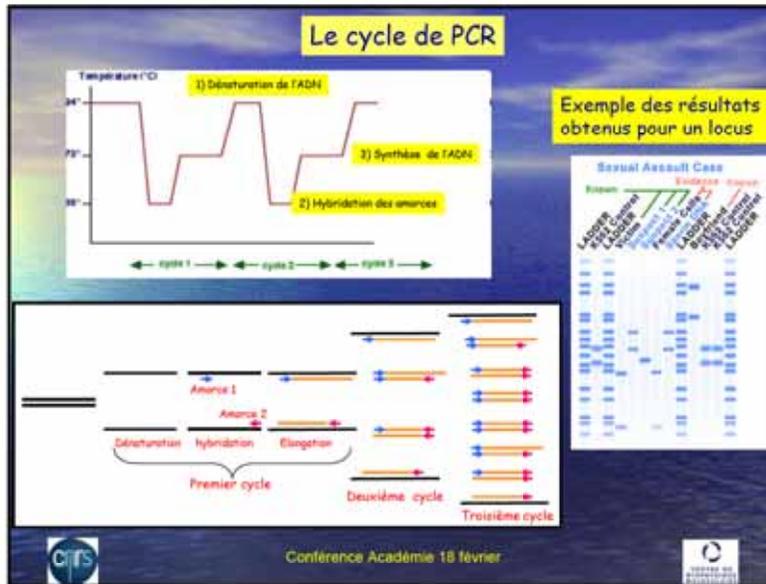
Conference Académie 18 février

Comment améliorer la technique ? Tout d'abord en utilisant la PCR (Polymerase Chain Reaction) mise au point par K. Mullis en 1985 pour amplifier des loci précis de l'ADN, ensuite en utilisant de nouveaux marqueurs les STR.

Les ingrédients de la PCR :

- De l'ADN double brin
- Une ADN polymérase thermostable
- 4 nucléotides triphosphates (ATP, GTP, CTP, TTP)
- Un Tampon
- 2 Amorces ADN (courts fragments d'ADN, d'environ 20 nt, reconnaissant une séquence particulière de l'ADN)
- Un appareil permettant des changements de température très rapides

Conference Académie 18 février



On peut automatiser l'analyse des empreintes ADN en séparant les fragments d'ADN amplifiés par électrophorèse capillaire

Conférence Académie 18 février

### L'électrophorèse capillaire

- L'ADN amplifié est injecté dans la colonne
- Les fragments d'ADN sont séparés suivant leur taille
- Un courant électrique est appliqué
- L'ADN migre vers le +
- Les fragments d'ADN amplifiés sont identifiés par la fluorescence en passant devant un détecteur

The diagram shows a capillary tube with a 'Heat Plate' and 'Thermal Tape' at the top. A 'Detector laser' is positioned at the bottom, with a 'Detector Window' and 'Detector Door' on the side. A 'Detector Plate' is at the very bottom. The capillary tube is labeled 'Capillary'.

Conférence Académie 18 février

Les marqueurs de polymorphisme utilisés actuellement pour réaliser les empreintes génétiques : les STR (microsatellites)

- Ils sont plus utilisés que les VNTR
- Ce sont des répétitions de 2, 3, ou 4 paires de bases
- Il existe beaucoup "d'allèles" différents

Short tandem repeat (STR) = microsatellite = simple sequence repeat (SSR)

Conférence Académie 18 février

## Avantages des marqueurs STR

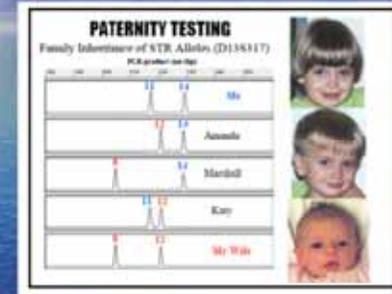
- Petite taille des produits de PCR compatible avec de l'ADN dégradé et petites quantités de matériel
- Amplification de plusieurs STR par PCR Multiplex possible
- Kits commerciaux disponibles
- Ensembles de STR identiques utilisés par tous les laboratoires



Conférence Académie 18 février



Les STR  
ségrégent aussi comme les allèles d'un gène



Un "allèle" provient de chacun des parents



Conférence Académie 18 février



## Les différentes étapes pour obtenir une empreinte ADN en 1 à 2 jours

1) Récupération et stockage des échantillons



Goutte de sang, cellules buccales...

2) Extraction de l'ADN



3) Amplification par PCR multiplex



6) Calcul de la probabilité de concordance

Alleles Frequencies

Allele	Frequency
12	0,122
13	0,122
14	0,140
15	0,140
16	0,122
17	0,122
18	0,140
19	0,140

5) Recherche de correspondance dans les banques de données (FNAEG, Codis)



4) Séparation des fragments Amplifiés



Conférence Académie 18 février



## Applications des empreintes génétiques



Identification des corps



Recherche de paternité



Médecine légale



Identification des corps



Filiation des pharaons



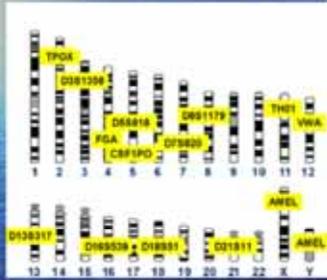
Substitution d'identité



Conférence Académie 18 février



Pour réaliser une empreinte génétique dans le cadre de la police scientifique tous les pays étudient les mêmes marqueurs qui sont essentiellement des STR sauf pour la détermination du sexe



Art. A38 CPP en France 13 STR obligatoires + 2 STR au choix/4 + amel pour la détermination du sexe

Localisation de 15 des marqueurs utilisés



Pour la détermination du sexe on cible le locus de l'amélogénine

- Le gène de l'amélogénine n'est pas un STR.
- Il est localisé sur l'X en p22.1-22.3 et sur l'Y.

♂ allèle X : produit d'amplification 212 pb

♂ allèle Y : produit d'amplification 218 pb

♀ Femelle (X,X) - homozygote 1 bande 212 pb

♂ Mâle (X,Y) - hétérozygote 2 bandes 212/218 pb



Calcul de la probabilité d'obtenir au hasard l'empreinte observée

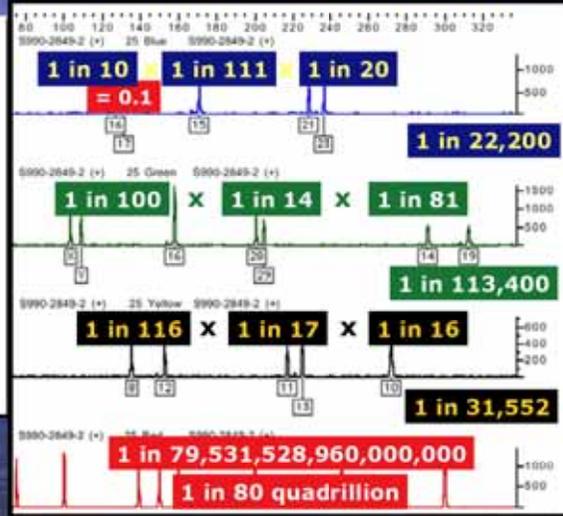
Allele frequencies

Locus **D3S1358**  
Race Caucasian  
(N = 203)

Allele	Frequency
12	0.012
13	0.012
14	0.140
15	0.246
16	0.222
17	0.222
18	0.163
19	0.012

Locus **VWA**  
Race Caucasian  
(N = 196)

Allele	Frequency
11	0.012
12	0.012
13	0.012
14	0.102
15	0.082



L'apport de l'étude de l'ADN mitochondrial (mtDNA)



## Séquençage de l'ADN mitochondrial (mtDNA)

### Avantages

- Test très sensible car chaque cellule contient ~1000 mitochondries
- Cet ADN peut être utilisé comme marqueur car la transmission est uniquement maternelle

### Inconvénients

- Contamination facile
- Hétéroplasmie (plusieurs ADN différents par cellule)
- Difficultés pour typer les individus (effet Eve)



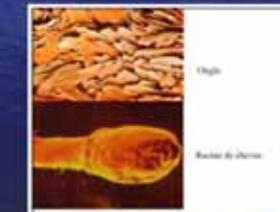
Conférence Académie 18 février



## Les sources possibles d'ADN sur les lieux d'un crime



Le « mort » des traces de sang et des cheveux



Conférence Académie 18 février



## Il faut différencier

- La confirmation d'identité
  - Le suspect est identifié dans un premier temps par des preuves autres que l'ADN
  - Le test ADN ne vient que confirmer une identité
- Le test ADN pour trouver un suspect
  - Comparaisons d'ADN avec les bases de données
  - On peut exclure d'autres suspects



Conférence Académie 18 février



Attention : dans le cas de correspondance d'un échantillon de la banque avec un prélèvement ADN il s'agit seulement d'une coïncidence statistique !

En 1989 à l'US Open de golf, 4 joueurs ont fait un trou en un coup. La probabilité théorique d'un tel résultat est de  $1/89 \cdot 10^{15}$  (1,000,000,000,000,000)



Conférence Académie 18 février



## Le fichier national automatisé des empreintes génétiques FNAEG

- Le fichier de 1998 (loi Guigou affaire Guy Georges) contient uniquement les profils ADN des auteurs de crimes sexuels.
- Depuis 2001 (loi Lebranchu) on procède à l'extension du fichier.
- Il contient en 2009 environ 1 million d'empreintes génétiques



Conférence Académie 18 février



## Le fichier national automatisé des empreintes génétiques FNAEG

ÉVOLUTION DU NOMBRE D'EMPREINTES DEPUIS LA CRÉATION DU FICHIER

Année	Au sein de l'enseignement supérieur depuis la création du FNAEG		Rapportés en justice		
	Profil génétique des personnes condamnées	Profil génétique des personnes mises en cause	Profil génétique des personnes mises en cause	Profil génétique des personnes condamnées	Profil génétique des personnes condamnées
2002	2 824	179	2 386	14	27
2003	12 796	736	4 329	49	14
2004	28 425	3 069	10 517	243	62
2005	42 393	4 202	16 228	490	173
2006	69 290	12 714	23 072	711	228
2007	132 880	27 270	43 240	1 958	2 259
2008	242 271	41 921	82 828	2 791	4 323
2009	342 225	52 732	118 296	3 754	5 264

Source: Ministère de l'Intérieur, de l'Enseignement et des Collectivités territoriales

Conservation des données : 25 ans pour les prévenus, 40 ans pour les condamnés



Conférence Académie 18 février



## La force du FNAEG

- Outil très puissant pour résoudre des énigmes policières

## Les faiblesses du FNAEG

- \* Des profils mal interprétés (mélange, dégradation ...) ont engendré des erreurs d'interprétation
- \* Fiché un jour, fiché toujours ?
- \* Ajouter au fichier le profil d'individus venant d'être arrêtés viole le principe de la présomption d'innocence



Conférence Académie 18 février



## L'ADN prouve absolue ? Certainement pas

## Les mythes sur les tests ADN

L'ADN d'un individu est unique	Le test n'est basé que sur 15 marqueurs
La recherche des marqueurs est objective	L'interprétation est humaine !
Les scientifiques sont neutres et on travaille bien dans tous les labos	Hum, hum ! Rappelons nous le cas Castro



Conférence Académie 18 février



## Les aléas du test:

**Les contaminations :** elles peuvent se produire à différents moments, prélèvement, extraction, révélation ...

**La dégradation de l'ADN** qui augmente le risque d'erreurs



Conférence Académie 18 février



(A) ADN sur gel d'agarose

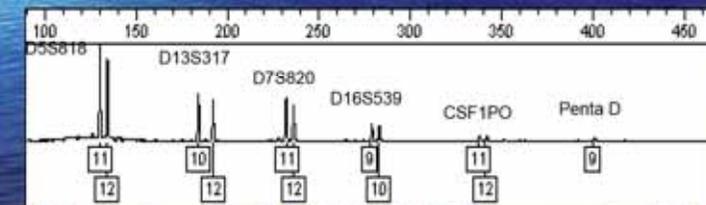
ADN non dégradé

ADN dégradé



Résultats obtenus avec de l'ADN dégradé, les fragments les plus grands ne sont pas amplifiés

(B)



Conférence Académie 18 février



### Un exemple de la mauvaise utilisation d'une empreinte ADN

En décembre 2002 le corps d'une femme coupée en morceaux est découvert à Mulhouse. L'analyse de l'ADN mitochondrial d'un cheveu trouvé dans sa main conduit le mari en prison. Le test ADN (nucléaire) et la consultation du FNAEG en 2007 permettent d'attribuer l'ADN à un homme proxénète notoire décédé qui avait le même profil d'ADN mitochondrial que le mari



Conférence Académie 18 février



### Un exemple de contamination:

Une histoire amusante si cela ne concernait pas des affaires criminelles: depuis 2007 la police allemande traque une tueuse en série. Grâce au profil ADN on suit sa trace en Autriche puis en France. Finalement on découvre que les bâtonnets utilisés pour les prélèvements sont contaminés par l'ADN d'une employée de l'atelier de fabrication.



Conférence Académie 18 février



Les fraudes connues: prélèvement du sang d'un autre individu



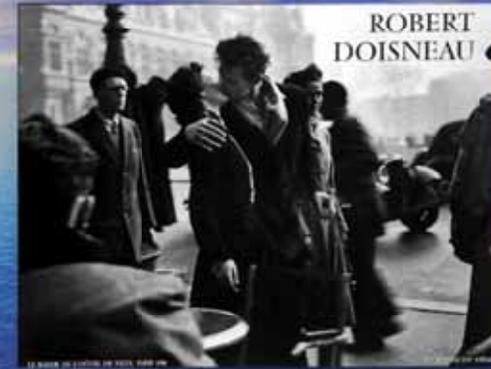
La fraude du Dr John Schneeberger lors d'une prise de sang en vue d'un test ADN



Conférence Académie 18 février



Les fraudes connues : échange de salive avant un prélèvement ADN



Conférence Académie 18 février



Les fraudes connues : mélange de cheveux différents sur une scène de crime



Conférence Académie 18 février



Utilisation des empreintes ADN pour identifier des individus décédés



Conférence Académie 18 février



## Identification des restes des Romanov



Conférence Académie 18 février



• Août 1917 la révolution russe commence, la famille royale est capturée et emprisonnée avec un médecin et 3 serviteurs. Cette famille comprend : le Tsar Nicolas II et la Tsarine Alexandra de Hesse, les enfants : Alexis, Olga, Tatyana, Anastasia, Maria

16 juillet 1918 les Romanov sont assassinés peu après minuit



yourovski

Lieu de captivité des Romanov: la villa Ipatiev



Conférence Académie 18 février



Le médecin et les 3 serviteurs qui accompagnent les Romanov sur la fin de leur vie sont assassinés en même temps que les Romanov



Ievgueni Botkine  
Docteur

Anna Demidova  
servante

Alexeï Trupp  
valet de pied

Ivan Kharitonov  
cuisinier



Conférence Académie 18 février



Juillet 1991 on découvre des cadavres dans une fosse commune près d'Ekaterinbourg  
• ils correspondent aux restes de 9 personnes  
• on détermine leur sexe et leur âge  
• en 1992 les analyses morphologiques et les tests ADN commencent



Conférence Académie 18 février



## Résultats de l'analyse morphologique



Alexandra n°7



Tatiana n°6



Nicolas II n°4



Anastasia n°5



Olga n°3

Conférence Académie 18 février



## Résultats de l'analyse des empreintes génétiques

Les squelettes 4 et 7 sont apparentés aux squelettes 3, 5 et 6

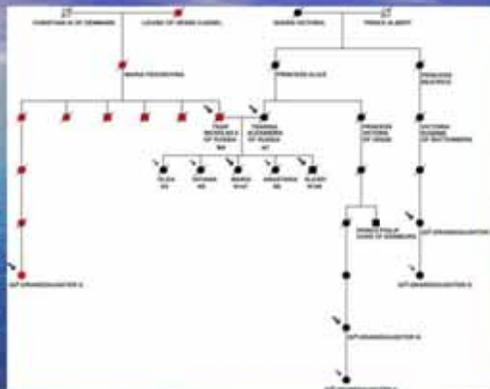
• Les squelettes 1, 2, 8 et 9 sont ceux des serviteurs et du médecin

• Comment prouver que les squelettes 3, 4, 5, 6 et 7 sont les restes des Romanov ?

Conférence Académie 18 février



## Analyse de la lignée maternelle dans la famille des Romanov



Boyarov E. *et al.* PNAS 2009;106:5258-5263

Conférence Académie 18 février



## Résultat du séquençage de l'ADNm

### MtDNA Analysis

Summary of mtDNA differences compared to the Anderson<sup>1981</sup> reference sequence

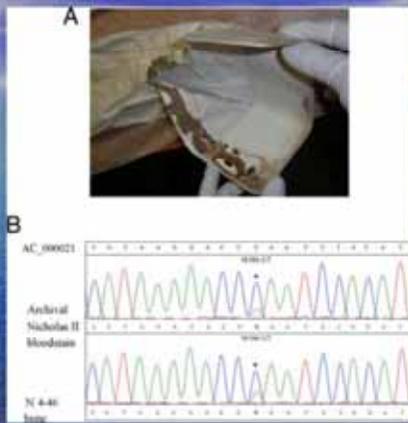
Origin of sample	DNA source	Length (bp)	Positions within hypervariable regions (HV) of mitochondrial DNA																		
			HV1									HV2									
			C	T	A	G	C	T	A	G	T	A	C	T	A	G	T	A	C	T	
Servant 1 (1)	Patrol station 1	762																			
Servant 2 (1)	Patrol station 6	742																			
Servant 3 (1)	Patrol station 8	662																			
Royal Physician Dr. Hovson (2)	Patrol station 2	736																			
Daughter 1 of Tsar/Tsarina (5)	Patrol station 3	758	T																		
Daughter 2 of Tsar/Tsarina (5)	Patrol station 5	624	T																		
Daughter 3 of Tsar/Tsarina (5)	Patrol station 9	760	T																		
Tsarina Alexandra (1)	Patrol station 7	744	T																		
Duke of Edinburgh (1) (Royal witness of Tsarina)	Skelet sample	760	T																		
Tsarevitch (1) (1)	Patrol station 4	762	C	T																	
Dr. US, grandson of Louise of Mecklenburg	Skelet sample	781	C	T																	
Dr. US, US, granddaugher of Louise of Mecklenburg	Skelet sample	762	C	T																	

1. Sequence unchanged from reference sequence; - No nucleotide assignment; \* Nucleotide absent from reference sequence; C, G, T, A, indeterminate.

Conférence Académie 18 février



Comparaison de l'ADNm du squelette présumé de Nicolas II avec un échantillon sanguin découvert sur une chemise de Nicolas II conservée au musée de l'Ermitage à St Petersburg.



Rogov E I et al PNAS 2009;106:5258-5263

Conférence Académie 18 février



Les conclusions de l'analyse:

- Les squelettes 4 et 7 sont ceux du Tsar et de la Tsarine
- Les squelettes 3, 5 et 6 sont ceux de leurs enfants
- Les squelettes 1, 2, 8 et 9 sont ceux des serviteurs

Conférence Académie 18 février



S<sup>t</sup> Pierre et S<sup>t</sup> Paul  
S<sup>t</sup> Petersburg



La chapelle des Romanov

Conférence Académie 18 février

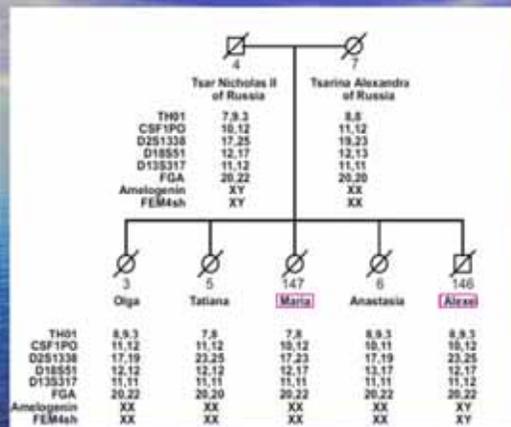


Découverte en 2008 d'une deuxième fosse contenant les ossements de deux individus à 60 m de la première

Conférence Académie 18 février



Analyse des empreintes génétiques des sept individus



Conférence Académie 18 février

Analyse des STR du chromosome Y de la lignée paternelle dans la famille des Romanov.



Conférence Académie 18 février

Analyse des STR du chromosome Y de la lignée paternelle dans la famille des Romanov.

Marqueurs	Tsar Alexis Romanov lignée mâle	Sang chemise	Contrôle
DYS456	16	16	15
DYS389I	13	13	13
DYS390	24	24	24
DYS389II	29	29	29
DYS458	17	17	17
DYS19	14	14	15
DYS385	11, 14	11, ND	11, 14
DYS393	13	13	13
DYS391	10	10	11
DYS439	11	11	12
DYS635	24	24	24
DYS392	13	13	13
Y-GATA-H4	12	12	13
DYS437	15	15	15
DYS438	12	12	12
DYS448	19	19	19

Conférence Académie 18 février

Analyse des séquences complètes de l'ADNm. Etude du polymorphisme SNP trouvé à partir des restes possibles d'Alexis, Maria et Alexandra. Comparaison avec la séquence de l'ADNm des descendants de la reine Victoria en lignée maternelle.

Position du SNP	Alexis	Maria	Alexandra	Reine Victoria arrière petite fille	Fréquence	Localisation
263	G	G	G	G	0.997	D-loop
315.1	C	C	C	C	0.961	D-loop
524.1	A	A	A	A	0.014	D-loop
524.2	C	C	C	C	0.014	D-loop
750	G	G	G	G	0.992	12S rRNA
1438	G	G	G	G	0.969	12S rRNA
3010	A	A	A	A	0.203	16S rRNA
4137	T	T	T	T	0.001	ND1
4769	G	G	G	G	0.989	ND2
8060	G	G	G	G	0.996	ATP2B6*
15326	G	G	G	G	0.994	Cytb*
16111	T	T	T	T	0.019	D-loop
16357	C	C	C	C	0.013	D-loop
16519	C	C	C	C	0.597	D-loop

Conférence Académie 18 février

Conclusion : les squelettes sont ceux de la fille Maria et du fils Alexis du Tsar.



Prince Alexis



Princesse Maria



Conférence Académie 18 février



L'analyse des empreintes ADN va encore évoluer !

Passé      Présent      Futur proche      Avenir



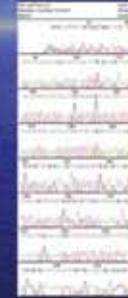
VNTR  
Southern



STR  
PCR



SNP  
Puces ADN



Séquençage ADN  
nucléaire

Conférence Académie 18 février



Dernière minute L'ADN de Toutankhamon a parlé !



Dernière révélation des tests ADN :

Les analyses ADN font de Toutankhamon le fils de la momie KV55 qui est identifiée comme celle d'Akhenaton. La mère de Toutankhamon serait la momie KV 35YL. D'après son ADN, KV 35YL serait la sœur d'Akhenaton.

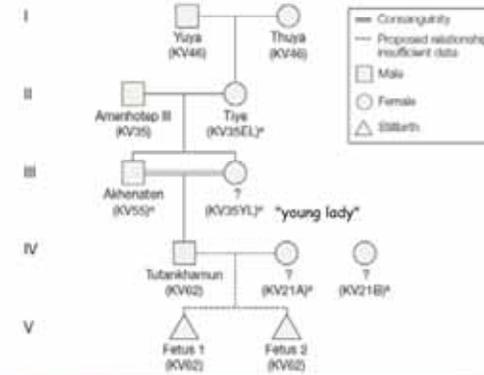
Concernant sa mort, le jeune roi a succombé parce qu'il avait de nombreuses tares héritées de ses parents (consanguinité) et parce qu'il était paludéen. En effet, de l'ADN du parasite *Plasmodium falciparum* a été retrouvé dans sa momie.

JAMA 2010, 303, 7, 638-647

Conférence Académie 18 février



Généalogie des pharaons



Ligne double = consanguinité; ----- = hypothèse  
KV21A = Ankhnesneferibre ?

JAMA 2010, 303, 7, 638-647

Conférence Académie 18 février



