

Génétique

Electrophorèse d'ADN

Réf :117 261

Kit ADN Empreintes Génétiques VNTR /STR

Français – p 1

Version : 4201

1 Les empreintes génétiques

1.1 Introduction

La méthode des empreintes génétiques a été introduite en criminalistique par un généticien britannique, Alec Jeffreys, en 1985. Il a prouvé, à l'instar des empreintes digitales, que chaque individu possédait une empreinte génétique unique (DNA fingerprint). Il est le premier, avec son équipe, à développer les techniques d'identification des individus à partir des variations du code génétique contenues dans leur ADN génomique.

La technique est fondée sur l'identification de zones d'ADN spécifiques, séquences hautement variables, propres à un individu qui définissent des marqueurs génétiques. En comparant ces marqueurs à ceux extraits d'ADN issus d'enquête judiciaire (échantillon de scène de crime, d'objet), il devient possible de disculper ou de confondre un suspect avec une très grande sûreté.

Depuis les années 1980, les électrophorèses d'ADN font donc parties de la « boîte à outils » de la police scientifique. Cette expérience est une initiation à la réalisation d'un « profil génétique », elle présente 2 types de marqueurs génétiques : les VNTR et les STR.

1.2 Polymorphisme de l'ADN

L'ADN est le support de l'information génétique. Cette information est codée par la succession des bases azotées, A (Adénine), T (Thymine), G (Guanine) et C (Cytosine). Le génome humain est composé de 3,2 milliards de paires de bases soit 6,4 milliards de nucléotides, répartis sur 23 paires de chromosomes.

L'ADN présente des **séquences codantes**, ce sont les gènes qui portent l'information nécessaire à la production des protéines, et des séquences dites **non codantes**, car la succession des bases n'a pas toujours de signification directe pour la machinerie cellulaire. On notera que certaines zones dites non-codantes sont cependant impliquées dans des processus complexes de régulation.

L'ADN codant ne constitue que 5 à 10 % de l'ADN total contenu dans les chromosomes des humains alors que l'ADN non codant représente 90 à 95 % du reste de l'ADN. En identification génétique, on s'intéresse à l'ADN non codant et plus particulièrement, à des séquences non codantes, courtes et extrêmement variables d'un individu à l'autre, appelées « séquences répétées ».

Ces séquences sont caractérisées par la répétition en tandem d'unités de base composées de deux ou plusieurs nucléotides. Les allèles varient d'un individu à l'autre en fonction du nombre de répétitions.

On distingue 2 types de polymorphismes :

- **Les mini-satellites ou VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats)** séquences répétées en tandem, de 15 à 40 paires de bases. Les zones se transmettent selon le mode mendélien : l'enfant reçoit un allèle de son père et un allèle de sa mère. Les études ont montré que nous aurions 1 500 zones de ce type. Les VNTR sont positionnées aux extrémités de chromosomes au niveau des télomères.

- **Les micro-satellites ou STR (Short Tandem Repeats)**, unités répétitives très courtes (4 paires de bases en moyenne) et répétées de deux à dix fois au plus. Chaque génome possède plusieurs centaines de STR. Ces motifs sont très abondants dans le génome et leur transmission suit également les lois de l'hérédité de Mendel. Elles sont le plus souvent positionnées dans les introns des gènes et plus rarement dans les exons.

La variation d'un STR (idem pour VNTR) se traduit par le nombre de répétitions d'une séquence. La localisation physique d'un marqueur STR sur le chromosome est appelé un **locus**. Pour un locus donné, chaque variation du nombre de répétitions est un allèle. Pour ce marqueur, chaque allèle est physiquement identifiable par sa longueur spécifique à l'aide d'une séparation par électrophorèse.

1.3 Réalisation d'un profil génétique

En identification judiciaire, les profils basés sur des VNTR ont été progressivement supplantés par des profils détectant des fragments STR.

Ces régions présentent de nombreux avantages : elles sont nombreuses, facilement amplifiables et peuvent être analysées simultanément.

Les scientifiques de la police ou de la gendarmerie utilisent des kits standards commercialisés par des laboratoires de biotechnologies. En France, un profil génétique est réalisé par l'identification simultanée de 16 loci : 15 STR autosomaux plus 1 marqueur sexuel (amélogénine).

(Exemple d'un kit de détection utilisé par les laboratoires de police scientifique : AmpFISTR® Profiler Plus, kit commercialisé par Applied Biosystems)

Du point de vue judiciaire, le profil génétique a pour fonction de compléter et non de remplacer une enquête judiciaire.

L'examen de ces zones ADN hypervariables d'un individu va donner un profil génétique unique. Lorsque ce profil va être comparé à celui de la scène judiciaire, 2 possibilités :

- ils sont parfaitement identiques, alors cela indique que la personne était présente sur un lieu ou a manipulé un objet en lien avec l'enquête.
- il y a non-concordance avérée d'un seul site polymorphe entre l'échantillon recueilli et le prélèvement issu de l'individu suspect, alors cela conduit à écarter de façon absolue l'individu suspect.

Exemple de mode opératoire :

Étape 1 : Ouverture des scellés et échantillonnage des prélèvements

Étape 2 : Extraction de l'ADN

Les échantillons ont des origines très diverses, (fragments de peau, bulbe de cheveux, salive). Ils ont été prélevés sur un objet, une personne, un vêtement etc., il faut extraire l'ADN, le purifier en éliminant toute source de contamination.

Étape 3 : Amplification de l'ADN

L'ADN est amplifié par PCR multiplex, c'est-à-dire que l'amplification des 15 loci STR est réalisée simultanément. Le mélange réactionnel contient un jeu d'amorces spécifiques pour chaque locus STR.

Étape 4 : Le génotypage (électrophorèse)

On sépare les fragments d'ADN amplifiés en fonction de leur taille. L'électrophorèse capillaire a peu à peu remplacé l'électrophorèse sur polyacrylamide. Le principe est identique à celui d'une électrophorèse classique mais la migration se fait dans un tube très fin soumis à une tension électrique élevée.

AmpFISTR® Profiler Plus, Applied Biosystems

Kit amplification PCR pour l'identification humaine, basé sur 15 loci STR et l'amélogénine dans un seul tube. Les loci sont compatibles avec le système CODIS (Combined DNA index system) base de données initiée par le FBI, aujourd'hui de nombreux pays possèdent leur banque de données CODIS en accord avec leur législation de protection des données personnelles.

Après amplification par PCR, les fragments sont séparés par électrophorèse capillaire. Celle-ci est combinée à une lecture par marqueur fluorescence. Donc un locus va être défini par sa taille et une couleur.

Table 1-1

Pour un locus on connaît, sa localisation, le motif de la séquence (commun à tous les individus), le nombre de variations des répétitions possibles. Les allèles seront nécessairement dans une plage de poids moléculaires connues (Size Range).

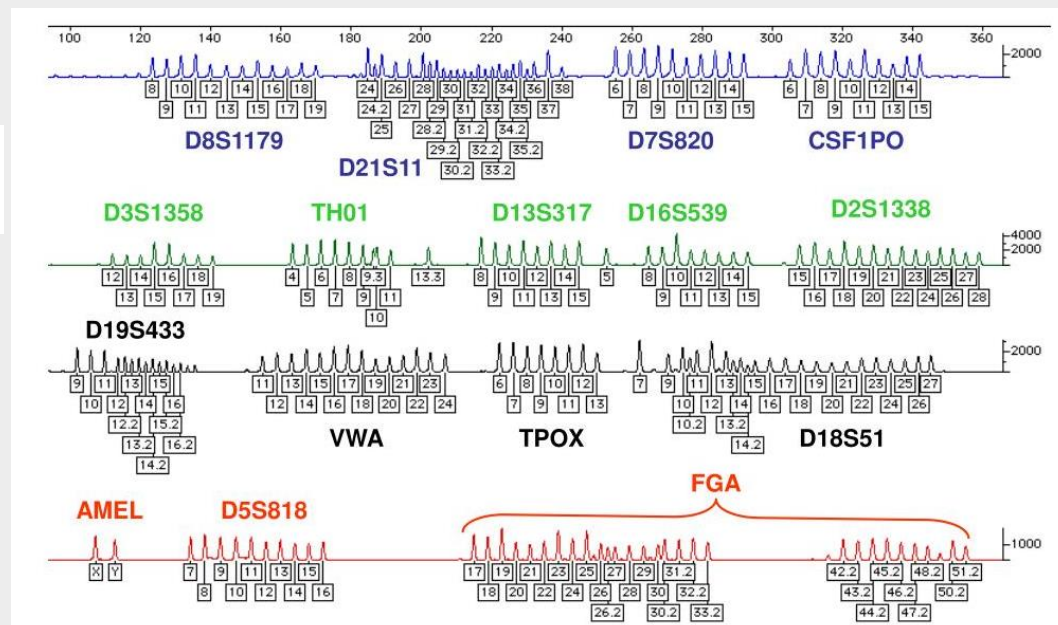
De plus, grâce à la fluorescence, le logiciel de traitement va associer une couleur (Dye-label) à chaque locus : vert, bleu, noir ou rouge.

Table 1-1 AmpF/STR Profiler Plus loci

Locus Designation	Chromosome Location	Common Sequence Motif	Size Range (bp) ^a	Dye Label
D3S1358	3p	TCTA (TCTG) ₁₋₃ (TCTA) _n	114–142	5-FAM
vWA	12p12-pter	TCTA (TCTG) ₃₋₄ (TCTA) _n	157–197	5-FAM
FGA	4q28	(TTTC) ₃ TTTT TTCT (CTTT) _n CTCC (TTCC) ₂	219–267	5-FAM
Amelogenin	X: p22.1–22.3 Y: p11.2	– –	107 113	JOE
D8S1179 ^b	8	(TCTR) _n ^c	128–168	JOE
D21S11	21	(TCTA) _n (TCTG) _n [(TCTA) ₃ TA (TCTA) ₃ TCA (TCTA) ₂ TCCA TA] (TCTA) _n	189–243	JOE
D18S51	18q21.3	(AGAA) _n	273–341	JOE
D5S818	5q21–31	(AGAT) _n	135–171	NED
D13S317	13q22–31	(GATA) _n	206–234	NED
D7S820	7q11.21–22	(GATA) _n	258–294	NED



Echelle allélique
 (allelic ladders)



GeneMapper™ ID-X Software plot of the AmpFISTR™ Identifiler™ Allelic Ladder

2 Présentation du TP

❖ Le principe de l'électrophorèse d'ADN en gel

En milieu légèrement basique, l'ADN se comporte comme une chaîne polyanionique (groupements phosphates ionisés). Placés dans un gel d'agarose et soumis à un champ électrique, des fragments d'ADN de tailles différentes migrent plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire. La charge relative des fragments étant la même, c'est essentiellement l'effet de tamisage exercé par le gel qui influe sur la migration. La vitesse de déplacement diminue donc avec la taille des fragments, celle-ci étant exprimée en nombre de paires de bases (pb) ou en kb (1 kb = 1000 pb).

❖ Contextualisation :

Une personne a été retrouvée inconsciente, probablement assommée à l'aide d'une statuette. La victime est décédée quelques heures après le coup qui lui a été asséné.

Dans le cadre d'une enquête judiciaire, sur la scène du crime, des prélèvements ont été pratiqués. Les analyses génétiques ont relevé des traces d'ADN d'un même individu à la fois sur la victime et sur la statuette. Ces éléments induisent une probabilité élevée qu'il s'agisse de l'ADN de l'agresseur.

L'ADN d'origine inconnue de la scène de crime, va être comparé à l'ADN de 3 suspects, 2 frères et une sœur, qui connaissaient bien la victime. Ils affirment tous les 3 ne pas avoir vu la victime les jours précédant l'agression.

L'électrophorèse va permettre de comparer les ADN des 3 suspects, à celui retrouvé sur la statuette.

Le TP présente les 2 techniques VNTR et STR, les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose.

Les brins sont présentés comme étant les résultats d'amplification PCR.

VNTR – (technologie abandonnée en 1995 par la police scientifique)

Dans l'expérience on étudie un seul locus de type VNTR, le locus D1S80 localisé sur le chromosome 1. Le système présente communément de 14 à 42 répétitions composées de 16 pb par répétition (au global plus 41 allèles différents ont été observés).

La zone variable des séquences répétées est encadrée aux extrémités par 2 séquences fixes de 213 pb d'un côté et 32 pb de l'autre. *[Ce kit pédagogique est une adaptation du test standard de la police scientifique car dans la technique PCR standardisée, les régions fixes flanquées de part et d'autre des répétitions font 113 pb et 32 bp.]*

Exemple : déterminer le nombre de répétition D1S80

Si à partir d'un fragment donné, on estime visuellement sur le gel une taille 850 pb.

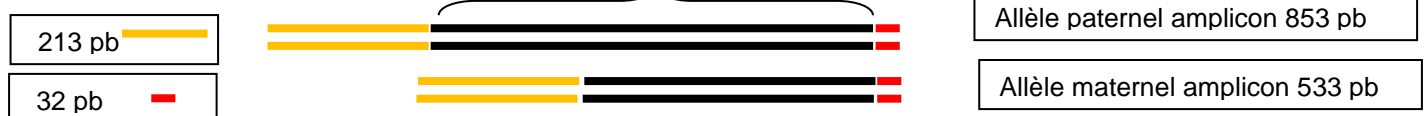
$850 - 213 - 32 = 605 \text{ pb} \rightarrow$ soit 38 séquences répétées de 16pb ($605/16 = 37.8$)

Taille réelle de l'amplicon : $(38 \times 16) + 213 + 32 = 853 \text{ pb}$

Si à partir d'un 2^{ème} fragment, on mesure visuellement sur le gel une taille 540 pb.

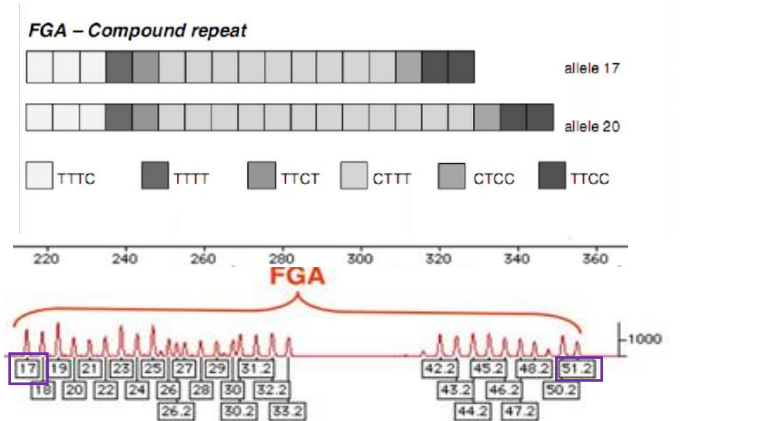
$540 - 213 - 32 = 295 \text{ pb} \rightarrow$ soit 18 séquences répétées de 16pb ($295/16 = 18,43$)

Taille exacte de l'amplicon : $(18 \times 16) + 213 + 32 = 533 \text{ pb}$



Les allèles microsatellites ou STR sont aujourd'hui privilégiées dans les techniques d'identification humaine. FGA, un exemple locus (marqueurs) que l'on retrouve dans les kits de police scientifique.

Le locus FGA est très polymorphe, il est positionné sur le chromosome 4.



Matériels complémentaires :

- Cuve à électrophorèse ADN
- Micropipettes 2-20 µL

4 Mode opératoire

4.1 Préparation des solutions

❖ **Préparation du tampon TAE 1X pour 1L :**

- Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 150 mL (tampon migration).

Verser le contenu du flacon 100 mL de tampon TAE 10X (Tris Acétate EDTA) dans 900 ml d'eau distillée, bien mélanger.

** En fonction du nombre de gel et du nombre de système électrophorèse utilisés au cours du TP, le volume de TAE 1 X à préparer doit être adapté.*

❖ **Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 1,8 % :**

[Gel à 1,8 % = optimal, peut être réalisé à 2 % (ex gel pré-coulé)]

- Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.
 - Peser 0,27 g d'agarose dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TAE.
 - Mettre l'erlenmeyer contenant le TAE et l'agarose au micro-onde pendant 20 à 30 secondes – stopper à l'apparition de l'ébullition - (ou sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète).
 - S'assurer que la solution est parfaitement translucide
 - Ajouter 2 µL de colorant GelGreen à l'aide de la micropipette, bien agiter l'erlenmeyer
 - Laisser l'erlenmeyer refroidir quelques instants sur la paillasse 2 à 3 min, puis verser dans le moule équipé du peigne à petites dents.

❖ **Préparation de l'ADN**

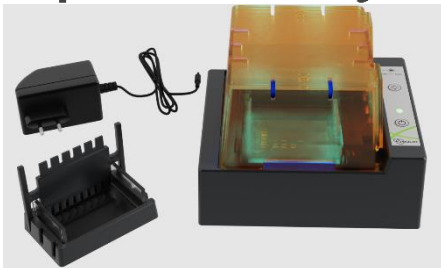
- Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.
- Avant la séance, décongeler les tubes Eppendorf.

Idéalement décongeler les contenants environ 5 minutes sous l'eau chaude, puis les plonger dans l'eau glacée pendant deux minutes. Cela permet, par chocs thermiques, de séparer les fragments qui auraient pu s'associer à nouveau d'une part et d'éviter la nouvelle formation de bouts collés d'autre part.

Le produit supporte aisément une succession de plusieurs alternances de congélation-décongélation sans perdre ses propriétés. Mais il faut réduire au minimum la durée de décongélation pendant laquelle une dégradation occasionnelle par des micro-organismes est possible.

Gel à 1,8 %

phorEasy



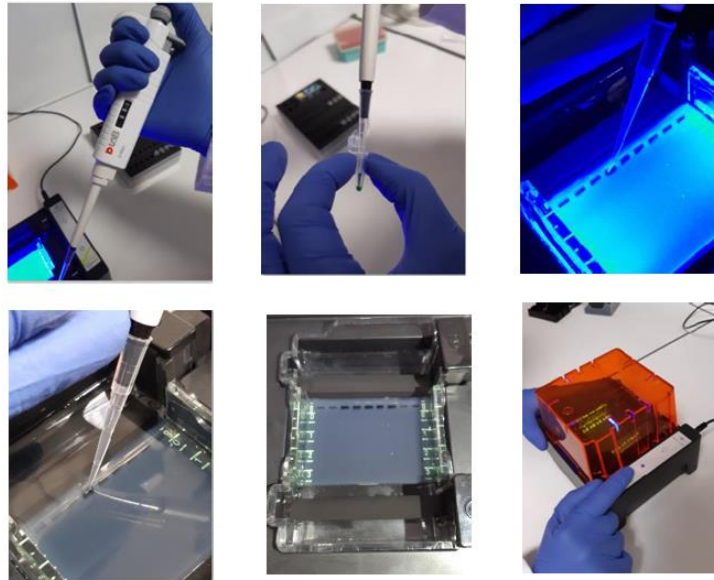
Dispositif électrophorèse
Tout-en-un

4.2 Dépôt de l'ADN

A l'aide d'une micropipette, déposer :

- 8 μ L d'ADN Tubes suspects à déposer
- 8 μ L pour l'échelle de poids moléculaire

8 μ L par puits



phorEasy



Durée de migration 15 à 20 minutes pour les systèmes compacts (PhorEasy, Minione, MiniPCR).

4.3 Révélation

→ Transilluminateur intégré = révélation en temps réel

5 Résultats et exploitations



Interprétation des résultats

Pour le locus VNTR D1S80Chr 1, on attend 2 brins 1 allèle maternel et 1 allèle paternel dans une plage de lecture 469 à 901 pb (14 à 41 répétitions)
 Pour le locus STR FGA on attend 2 brins 1 allèle maternel et 1 allèle paternel dans un plage de lecture 180 à 360 pb

	Suspect 1*	Suspect 2	Suspect 3	Scène de crime
VNTR D1S80Chr 1	901 (n=41) 901 (n=41)	901 (n=41) 821 (n=36)	901 (n=41) 530 (n=18)	901 (n=41) 821 (n=36)
STR FGA	255 210	330 255	330 210	330 255

*Suspect 1 un seul brin visible sur VNTR donc homozygote

Conclusion : le suspect 2 présente un profil identique à l'ADN retrouvé sur la scène de crime

6 Bibliographie et sitographie

Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping

Yusuke Nakamura, Mark Leppert, Peter O'connell, Roger Wolff, Tom Holm, Melanie Culver, Cindy Martin, Esther Fujimoto, Mark Hoff, [...], and Ray White – SCIENCE 27 Mar 1987 Vol 235, Issue 4796 pp. 1616-1622

Mutation at the Human D1S80 Minisatellite Locus

Kuppareddi Balamurugan, Martin L. Tracey, Uwe Heine, George C. Maha, and George T. Duncan

The Scientific World Journal; Volume 2012, Article ID 917235, 8 pages

https://www.researchgate.net/publication/321481352_Study_of_Genetic_Variations_of_15_Autosomal_short_Tandem_Repeats_STRs_and_Amelogenin_Loci_to_Establish_Data_base_for_Iraqi_Population

<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home.html>

Fiche technique → Applied Biosystems™ AmpFLSTR™ Identifier

7 Assistance Technique

Pour toute question contacter le **Support Technique** au **09 69 32 02 10 (prix d'un appel local, non surtaxé)**.

JEULIN – S.A.V.

468 rue Jacques Monod

CS 21900

27019 EVREUX CEDEX France

09 69 32 02 10*

** prix d'un appel local, non surtaxé*