



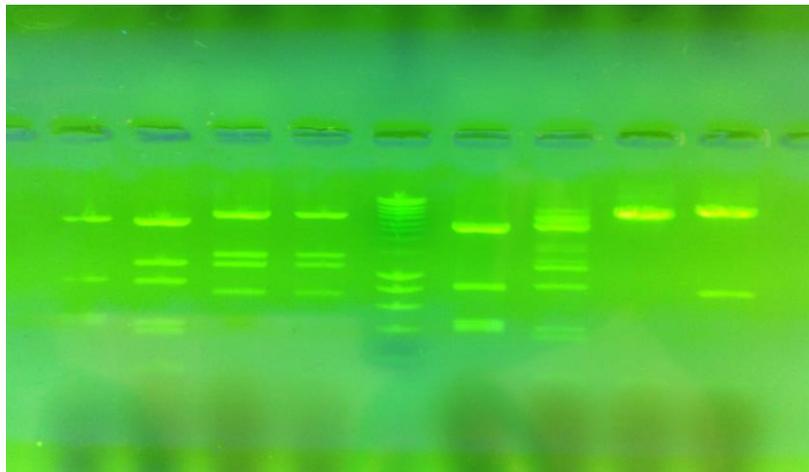
UNIVERSITÉ DE FRIBOURG  
UNIVERSITÄT FREIBURG

**Valise Pédagogique: À la découverte de l'ADN**  
Une collaboration entre l'Université de Fribourg  
et le Musée d'histoire naturelle de Fribourg

# L'ADN dans les enquêtes criminelles

## Protocole pour les élèves

Léonard Cardinaux, Adrien Pairraud, Marie-Pierre Chevron



Relecture : Luc Le Grand Catherine Pfister Aspert, Lisa Schild,  
Remerciements : D<sup>r</sup> Peter Wandeler, Jean-Christophe Lallement

## CONTENUS

Cet atelier expérimental et ses fiches pédagogiques proposent d'illustrer les notions d'empreinte génétique, d'ADN, d'enzyme de restriction, et de présenter la technique de biologie moléculaire classique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

Les fiches pédagogiques accompagnant l'expérience permettent de guider le travail et d'approfondir les concepts : ADN, enzymes de restriction, applications du polymorphisme de restriction.



### MANIPULATIONS

**Fiche 1** : RFLP, principe général

**Fiche 2** : Matériel et sécurité

**Fiche 3** : Protocole expérimental



### RESULTATS ET REFLEXION

**Fiche 4** : Compte-rendu



### BASES THÉORIQUES

**Fiche 5** : Enzymes de restriction et RFLP

**Fiche 6** : Electrophorèse en gel d'Agarose

**Fiche 7** : RFLP et Criminologie

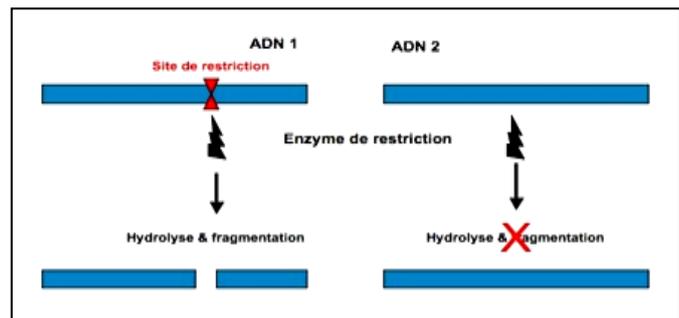


## Comparaison de deux ADN polymorphes

Des échantillons d'ADN peuvent être comparés afin de savoir s'ils diffèrent dans leurs séquences nucléotidiques. Les échantillons d'ADN peuvent provenir de n'importe quel organisme vivant. Il peut s'agir d'échantillons de patients pour la détection d'une maladie génétique, d'échantillons prélevés sur une scène de crime, d'échantillons de différentes espèces animales ou végétales à comparer, ...

## Digestion enzymatique

La digestion enzymatique est une technique utilisant des enzymes de restriction pour découper l'ADN. Une enzyme de restriction hydrolyse n'importe quel fragment d'ADN si celui-ci présente une courte séquence spécifique (site de restriction). Chaque enzyme possède un site de reconnaissance propre. Si une séquence d'ADN possède cette séquence spécifique, elle est fragmentée par l'enzyme, sinon elle reste intacte.

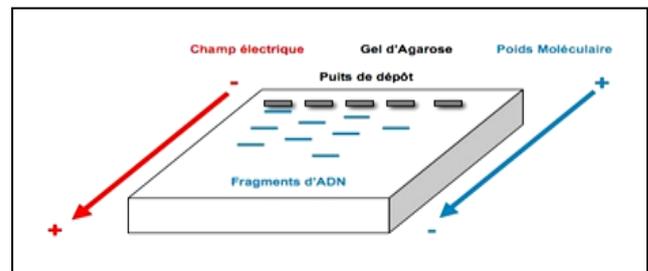


*RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism*

Cf. Fiche 5

## Migration par électrophorèse

Les fragments obtenus par digestion sont déposés dans un gel d'Agarose puis soumis à un champ électrique. Ils vont ainsi migrer dans le gel suivant leur poids moléculaire (les petits rapidement, les grands plus lentement).

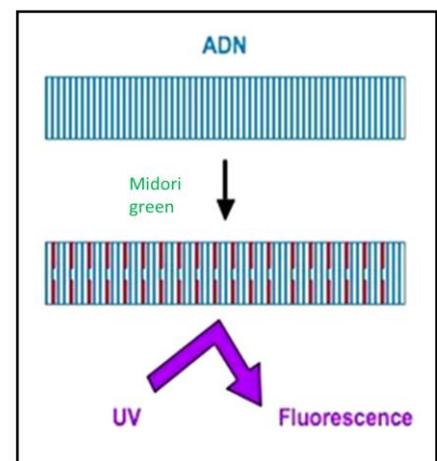


L'ajout d'un colorant permet d'augmenter la densité de la solution contenant les fragments d'ADN et de suivre leur migration dans le gel.

Cf. fiche 6

## Révélation du gel

Après migration, les fragments d'ADN n'étant pas visibles à l'œil nu, il faut procéder à une étape de révélation. Pour cela on a précédemment ajouté au gel un composé chimique, le Midori Green, qui se fixe sur l'ADN et fluoresce sous lumière UV. Il est également possible d'utiliser d'autres produits de révélation.

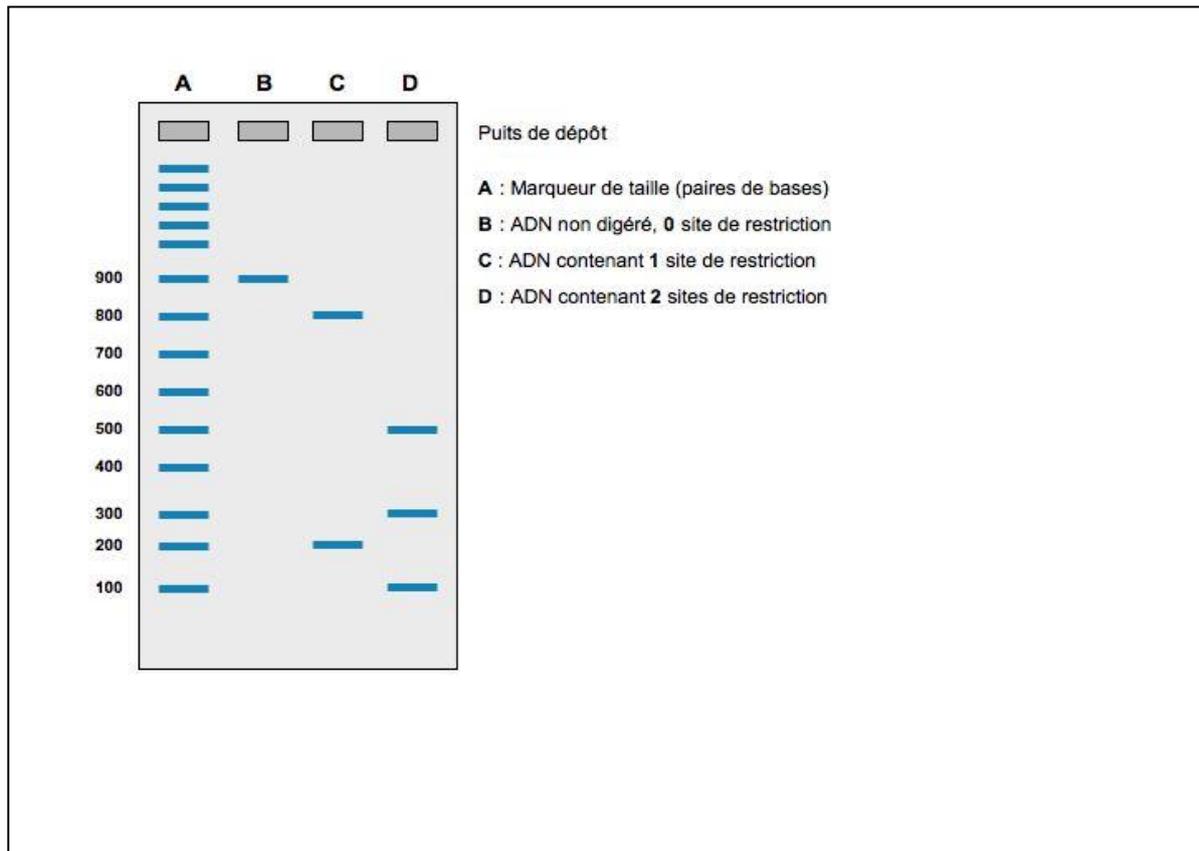


## Analyse des profils obtenus

Les résultats obtenus se présentent sous la forme d'une photographie montrant les bandes d'ADN fluorescentes sous UV.

Un échantillon non digéré apparaît sous la forme d'une bande unique. Un échantillon soumis à hydrolyse présente deux ou plusieurs bandes de tailles différentes en fonction du nombre de sites de restriction qu'il contient.

La taille des morceaux d'ADN obtenus est déterminée par comparaison avec un marqueur de référence constitué de fragments d'ADN dont la taille est connue et standardisée.



## 1. Sécurité et bonnes pratiques de laboratoire

Ce travail pratique requiert rigueur, habileté et respect des règles d'hygiène et de sécurité. Il faut donc prêter attention aux consignes suivantes :

- ✓ Le matériel de laboratoire est fragile et onéreux  
Manipulez-le avec le plus grand soin, en particulier les centrifugeuses, micropipettes et générateurs d'électrophorèse.
- ✓ Le matériel biologique est sensible à la température et aux contaminations  
Veillez à la propreté des plans de travail, des mains et du matériel de paille. Respectez les indications de température notamment pour le stockage des enzymes.  
Annotez clairement tous les tubes en précisant leur contenu et l'opérateur.
- ✓ Certains appareils et produits sont potentiellement dangereux  
En particulier, la manipulation des gels contenant le Midori Green (cancérogène) doit se faire avec des gants en latex. Les UV peuvent provoquer de graves brûlures. En cas d'exposition directe, il convient donc de porter des gants et de se protéger avec un masque adapté.

*Une zone de travail dédiée à l'utilisation du Midori Green doit être aménagée. En particulier, on place un papier absorbant sous les cuves d'électrophorèse. Avant rangement dans la valise, tout le matériel est nettoyé méticuleusement afin d'éliminer toute trace de Midori Green (cuve, support, chambre de révélation ...).*

➔ **En cas de doute, ne pas hésiter à demander de l'aide.**

## 2. Matériel à disposition

### Laboratoire :

Micropipettes  
Centrifugeuse  
Portoirs pour microtubes  
Incubateur  
Balance de précision  
Micro-onde  
Support de gel et peignes  
Cuve et générateur à électrophorèse  
Erlenmeyer et éprouvette  
Chambre UV ou LED

### Réactifs et Consommables :

Pointes de pipette  
Microtubes  
Eau distillée stérile  
Tampon TAE (Tris-Acétate, EDTA)  
Agarose  
Midori Green  
Tampon de charge  
Marqueur de taille  
Tampon de digestion  
Gants en latex

### Matériel biologique :

Échantillons ADN pour test et Enzymes de restriction PstI



## 1. Digestion enzymatique

- ✓ Par poste :
  1. 4 x « ADN 1, 2, 3, 4 », 8 µl de chaque type
  2. 1 x PstI 4 µl
  3. Tampon 8 µl
  4. H<sub>2</sub>O stérile 36 µl
  
- ✓ Dans des microtubes, réaliser à l'aide de la micropipette les préparations indiquées dans le tableau ci-dessous. Changer d'embout après chaque pipetage. Faire très attention aux volumes prélevés

Echantillon	ADN	H2O	Tampon	Enz. PstI	Vol. final
Suspect 1	8 µl ADN1	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl
Suspect 2	8 µl ADN2	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl
Suspect 3	8 µl ADN3	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl
Scène de crime	8 µl ADN4	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl

- ✓ Centrifuger rapidement puis incuber les échantillons à 37°C pendant 20-45 min.

## 2. Préparation des gels d'Agarose – PORT DES GANTS OBLIGATOIRE

- ✓ Sur la balance de précision peser l'Agarose
- ✓ Avec l'éprouvette graduée mesurer le TAE 1X
- ✓ Dans l'Erlenmeyer mélanger Agarose et TAE, puis porter à ébullition à la micro-onde. (ATTENTION AUX ECLABOUSSURES)
- ✓ Laisser refroidir le mélange 2 minutes puis ajouter le Midori Green (N'oubliez pas les gants!)
- ✓ Couler le mélange dans le support plastique sans faire de bulles, déposer les peignes puis laisser polymériser sans déplacer le gel avant polymérisation complète. Le gel pourra être conservé à 4°C sous plastique (pour éviter qu'il sèche). (Ne pas mettre dans un frigo servant à l'alimentation)

**Quantités** (dépends de la taille du support de gel):

Support de gel	Agarose	TAE 1X	Midori Green
100 ml	0.65 g	100 ml	10 µl
80 ml	0.55 g	80 ml	8 µl
60 ml	0.4 g	60 ml	6 µl
50 ml	0.35 g	50 ml	5 µl
20 ml	0.15 g	20 ml	2 µl

### **3. Dépôts des échantillons et électrophorèse – PORT DES GANTS OBLIGATOIRE**

- ✓ Sur le gel solidifié, retirer délicatement le peigne afin de créer les puits de dépôt
- ✓ Déposer le gel et son support dans la cuve à électrophorèse
- ✓ Ajouter du TAE 1X à recouvrement du gel (~500 ml)
- ✓ Sortir les échantillons digérés et ajouter à chacun 4µl de tampon de charge
- ✓ Déposer 5µl de marqueur de taille dans un premier puits
- ✓ Déposer ensuite délicatement 20µl de chaque échantillon dans des puits de dépôt successifs. Changer de pointe entre chaque dépôt !
- ✓ Fermer la cuve d'électrophorèse et la brancher au générateur, pôle négatif (noir) du côté des puits de dépôt
- ✓ Faire migrer le gel 30 min à 100 V (*l'ampérage se règle automatiquement*)

### **4. Révélation des gels – PORT DES GANTS OBLIGATOIRE**

- ✓ Arrêter le générateur et retirer le couvercle de la cuve
- ✓ Chambre UV : Sortir le gel et son support de la cuve, égoutter, placer le gel dans la chambre UV et prendre la photographie
- ✓ Lampe LED: Laisser le gel dans la cuvette et recouvrir avec le couvercle avec lampe LED intégrée, allumer la lampe et prendre la photographie



### **Criminologie : Test génétique d'identification d'un suspect**

*Dans le cadre d'une enquête criminelle, les enquêteurs vous demandent de réaliser des profils génétiques sur différents individus. L'ADN scène de crime de notre expérience correspond à un ADN prélevé sur la scène de crime, et les autres échantillons d'ADN correspondent à des échantillons prélevés chez différents suspects.*

**Q1 :** A l'aide de la fiche 7 « RFLP et criminologie » :

- Précisez quels tissus les enquêteurs peuvent prélever sur le suspect,
- Pourquoi ne peut-on pas utiliser les globules rouges ?

**Q2 :** Avant de pouvoir procéder à la digestion enzymatique plusieurs étapes expérimentales ont été nécessaires. Lesquelles ?

**Q3 :** A l'aide de la fiche 6 « Electrophorèse en gel d'Agarose », préciser :

- Quelle est la charge électrique de l'ADN dans la cuve d'électrophorèse ?
- Quel facteur détermine la vitesse de migration des fragments d'ADN dans le gel d'Agarose ?

**Q4 :** Quelles séquences particulières du génome humain sont utilisées pour réaliser un test génétique dans le cadre de l'identification de personnes ?

**Q5 :** Schématisez les résultats que vous avez obtenus après révélation de votre gel d'électrophorèse.

Pouvez-vous repérer les différences observables entre les profils de restriction des deux allèles ?

Que concluez vous concernant la culpabilité éventuelle du suspect ?

Quelles hypothèses, alternatives ou expériences complémentaires, pourriez-vous suggérer ?



## Enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des endonucléases bactériennes, qui coupent toute molécule d'ADN au niveau de sites spécifiques, les sites de restriction, qui correspondent à de courtes séquences particulières de 4 à 8 nucléotides.

### Exemples de sites de restriction

PstI	XhoI
5' ...CTGCA▼G... 3'	5' ...C▼TCGAG... 3'
3' ...G▲ACGTC... 5'	3' ...GAGCT▲C... 5'

Les premières enzymes de restriction ont été découvertes en 1962 par le suisse Werner Arber. Il montre que ces enzymes servent aux bactéries, dépourvues de système immunitaire, pour se défendre contre les virus (phages) qui les infectent. Elles sont capables de couper l'ADN du phage au niveau de sites de restriction différents en fonction des enzymes.

En 1970, l'Américain Hamilton O. Smith purifie la première enzyme de restriction (HaeI) à partir de la bactérie *Haemophilus influenzae*. L'année suivante, son compatriote Daniel Nathans l'utilise pour découper l'ADN du virus SV40. Ces trois chercheurs recevront, en 1978, le prix Nobel de médecine.

On a depuis isolé une centaine de ces enzymes de restriction, véritables ciseaux moléculaires, qui permettent de couper l'ADN à volonté et ont permis de développer un nombre considérable de techniques en génie génétique. Parmi celles-ci les méthodes RFLP occupent une place choix.

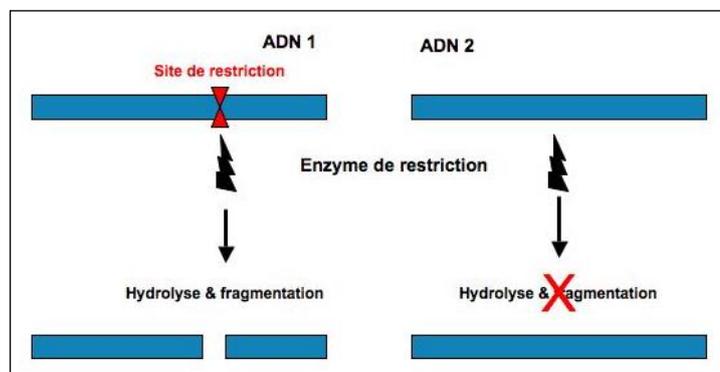
## Polymorphismes de restriction, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Les polymorphismes de restriction s'appuient sur les propriétés particulières des enzymes de restriction. Celles-ci coupent indifféremment les ADN codant et non-codant en reconnaissant des sites de restriction spécifiques qui peuvent être présents en plus ou moins grand nombre. La petite taille des sites de restriction, et leur grand nombre dans un génome, les rendent particulièrement sensibles à tout changement de séquence nucléotidique : mutations par délétion, insertion, translocation chromosomique ...

Les enzymes de restriction sont donc utilisées pour révéler le polymorphisme existant entre des ADN provenant d'un génome, d'un gène isolé, d'un plasmide, etc.

Seule ou associée à d'autres techniques, PCR et hybridation moléculaire principalement, la méthode RFLP est utilisée afin d'identifier des espèces, des variétés, des individus.

Elle permet d'établir des phylogénies moléculaires, de diagnostiquer certaines maladies génétiques, d'établir une filiation, ou encore de rechercher un coupable dans une enquête criminelle.



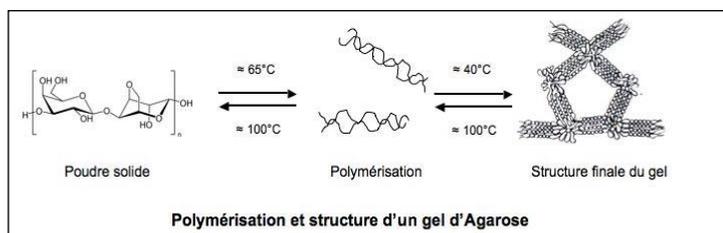


Cette méthode permet de séparer des fragments linéaires d'ADN linéaires selon leur poids moléculaire en les soumettant à un champ électrique linéaire dans un gel poreux.

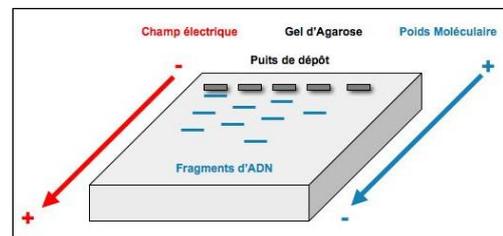
Une molécule d'ADN est un polynucléotide, chaque nucléotide est composé de 3 types de résidus : le désoxyribose, la base azotée, le groupement phosphate  $H_2PO_4$  qui peut s'ioniser en  $PO_4^{2-}$ .

En milieu basique, le tampon TAE utilisé a un pH proche de 8, l'ADN va se charger négativement ( $H_2PO_4 \rightarrow 2 H^+ + PO_4^{2-}$ ), et devient une chaîne polyanionique. La charge électrique est uniforme et, les molécules vont donc migrer en direction de la borne positive, c'est pourquoi on effectue les dépôts du côté de la borne négative.

L'agarose est un polymère gélifiant à base d'agar-agar purifié composé essentiellement de galactose non ramifié. Il est extrait de la paroi cellulaire de certaines algues rouges. On le retrouve sous des formes moins pures pour la fabrication des milieux de cultures *in vitro* et comme additif alimentaire (E 406).

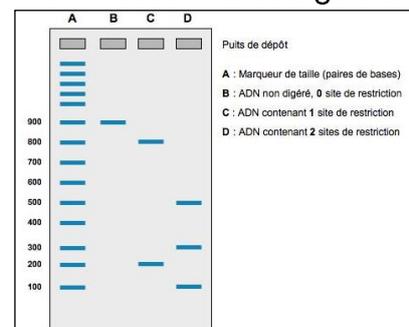


La migration de l'ADN sous l'effet du champ électrique va se réaliser dans l'épaisseur du gel poreux d'Agarose dans lequel l'ADN a été déposé. Les pores de ce gel vont se comporter comme un tamis qui freine le déplacement des fragments d'ADN. La résistance du gel à la migration des fragments est proportionnelle à leur taille, les plus petits fragments migrent le plus vite donc le plus loin.



La concentration du gel en agarose va influencer sur la résolution de celui-ci. Plus un gel est concentré en Agarose, plus il permet de séparer des fragments de petite taille ou des fragments ne différant que de quelques nucléotides. Si la résolution est insuffisante, trop peu d'Agarose ou trop d'ADN semblable, on obtient généralement une traînée (« smear »). La limite usuelle de résolution se situe aux environs de 300pb. Pour des séparations plus fines, il faut généralement recourir à des gels de polyacrylamide.

On remarquera que l'épaisseur et la fluorescence des bandes visualisées sur le profil électrophorétique décroît avec la distance au dépôt. Ceci est dû à certaines propriétés du Midori Green. Celui-ci est fluorescent aux rayons UV, et se fixe entre les bases de l'ADN. La quantité de Midori Green de chaque bande est proportionnelle au nombre de nucléotides d'ADN sur lequel il s'est fixé. L'épaisseur et la fluorescence des bandes d'électrophorèse, vues sur la table UV/ lampe LED, est donc proportionnelle à la taille des ADN: ce sont bien les ADN les plus gros qui migrent le moins loin.





### **Régions variables du génome humain**

Les molécules d'ADN portent en elles des informations génétiques essentielles à la vie de l'individu. Elles constituent son patrimoine génétique. Ces molécules d'ADN comportent des régions dites d'ADN codant (les gènes) et d'autres dites d'ADN non codant (comme les régions régulatrices).

Les gènes (environ 5 % des molécules d'ADN) sont très conservés entre deux individus. Ils sont transcrits en ARN messagers puis traduits en protéines. Ce sont les protéines qui portent la fonction.

Dans l'ADN non codant les régions régulatrices jouent un rôle essentiel dans la régulation de cette expression des gènes (où, quand, en quelle quantité un gène doit-il s'exprimer). L'ensemble de l'ADN non codant représente la plus grande partie du génome (jusqu'à 95 %) et certaines de ses fonctions restent encore à découvrir. L'analyse de ces parties non codantes du génome a permis entre autre de mettre en évidence l'existence de régions dites variables : il s'agit de segments d'ADN caractérisés par la répétition en tandem d'unités de base composées de deux ou plusieurs nucléotides. Le nombre de ces répétitions, et donc la taille de ces fragments, peut beaucoup varier d'un individu à l'autre (allèles) Cette forte variabilité allélique peut permettre de déterminer le profil génétique d'un individu. À part pour les vrais jumeaux, qui possèdent le plus souvent un ADN identique, l'empreinte génétique d'un individu semble unique.

Grâce à la spécificité de leur site de clivage, les enzymes de restriction sont utilisées pour mettre à jour les variations de séquence entre deux allèles. Utilisés sur l'ensemble du génome, ou seulement quelques régions répétées, les RFLPs permettent d'établir rapidement des profils génétiques.

### **Applications en criminologie**

En raison des restrictions citées ci-dessus, les empreintes génétiques sont utilisées en médecine légale pour innocenter plutôt qu'identifier des suspects grâce à leur sang, leur salive, leurs poils ou leur sperme. Elles peuvent également contribuer à identifier des restes humains, ou à établir des relations de paternité.

Dans les enquêtes judiciaires, de nombreuses raisons ont conduit les services de police à recourir aux empreintes génétiques :

- A l'exception des globules rouges, toutes les cellules du corps humain peuvent théoriquement être échantillonnées : sperme, sang (globules blancs), racines de cheveux, salive (cellules épithéliales), peau, moelle osseuse, os.
- L'ADN étant le même d'une cellule à l'autre, il est possible de procéder à une comparaison entre différentes parties du corps, telles que sang et sperme, cheveux et peau. On a pu observer très récemment chez certains individus que les cellules de leur corps ne contenaient pas toutes les mêmes séquences ADN. Il s'agit de mosaïcisme. Cette découverte

confirme que les empreintes génétiques ne doivent constituer qu'une pièce à conviction parmi d'autres dans un dossier d'étude criminelle et qu'un profil génétique est surtout utilisé pour disculper un individu et ne constitue pas à lui seul une preuve d'inculpation.

- De très faibles quantités de ces types de substances sont nécessaires pour procéder à une identification.

Il serait trop long et trop coûteux d'établir la carte génétique complète d'un individu. Généralement, les tests ADN en médecine légale sont pratiqués sur une quinzaine de régions non codantes très variables du génome. Il y a donc très peu de chance que deux personnes portent exactement les mêmes séquences et présentent la même empreinte génétique pour ces régions, mais on ne peut exclure totalement cette possibilité. De plus, il est probable que dans un avenir proche on exige que ces tests soient réalisés sur des prélèvements de différentes parties d'un même corps.

L'ADN étant transmis par moitié de chacun des parents à ses enfants, l'empreinte génétique trouve une application remarquable dans la recherche de paternité qui relève aussi bien du domaine civil (établissement ou contestation d'une filiation) que du domaine pénal (affaires de viol et d'inceste).