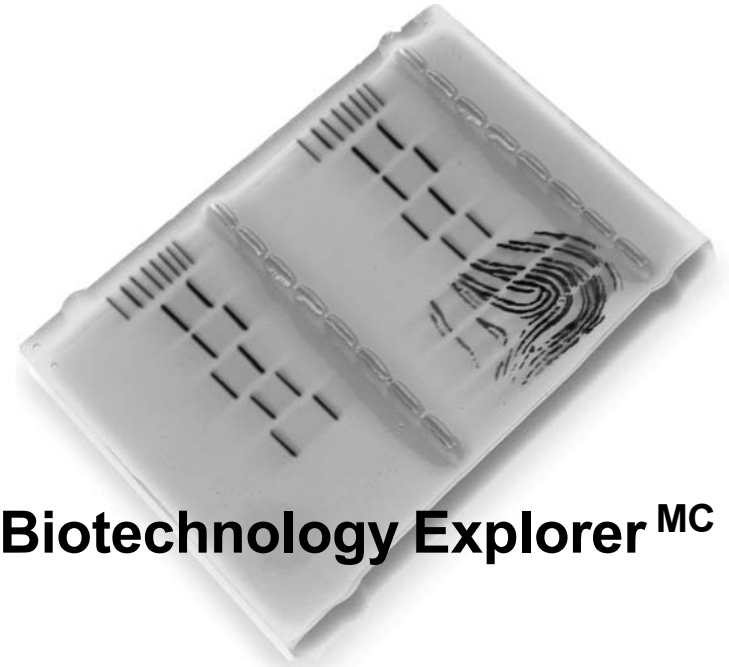


Biotechnology Explorer MC

Kit *Crime Scene Investigator PCR Basics*MC

Catalogue No.166-2600EDU

explorer.bio-rad .com

Remarque : Le kit contient des réactifs sensibles à la température. Ouvrir immédiatement à l'arrivée et conserver les composants à -20 °C ou à 4 °C comme indiqué.

La reproduction de toute partie de ce document est autorisée uniquement pour un usage en classe.

Veuillez visiter explorer.bio-rad.com pour accéder à notre sélection de traductions pour les programmes d'études du kit Biotechnology ExplorerMC**.**

BIO-RAD

Kit Crime Scene Investigator PCR Basics[MC]

Ce programme a été élaboré en collaboration avec la Dr Linda Strausbaugh, directrice du *Center for Applied Genetics and Technology* de l'Université du Connecticut-Storrs. Ce kit *Crime Scene Investigator PCR Basics[MC]* permet aux étudiants de réaliser des techniques de pointe en matière de profilage de l'ADN et de comprendre comment ces techniques sont réalisées dans de réels laboratoires de science médico-légale. Bio-Rad remercie le Dr Strausbaugh pour ses conseils et son mentorat.

Comment les preuves d'ADN peuvent-elles résoudre des crimes ? Le profilage d'ADN consiste à utiliser des méthodes de génétique moléculaire afin de déterminer le génotype exact d'un échantillon d'ADN afin de distinguer un être humain d'un autre. Cet outil puissant est aujourd'hui couramment utilisé dans le monde entier lors d'enquêtes sur les scènes de crime, les personnes disparues, les catastrophes de masse, les violations des droits de la personne et les tests de paternité. Les scènes de crime contiennent souvent des preuves biologiques (telles que du sang, du sperme, des poils, de la salive, des os, des morceaux de peau) à partir desquelles l'ADN peut être extrait. Si le profil d'ADN obtenu à partir des éléments de preuve découverts sur la scène d'un crime correspond au profil d'ADN d'un suspect, l'individu est inclus comme personne potentiellement coupable ; si les deux profils d'ADN ne correspondent pas, l'individu est exclu du groupe des suspects.

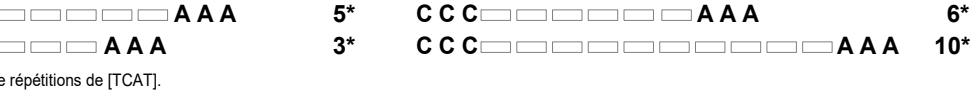
Quels types de séquences d'ADN humain sont utilisés dans les enquêtes sur les scènes de crime ? L'empreinte génétique humaine compte environ 3 milliards de bases, dont plus de 99,5 % ne varient pas d'un être humain à l'autre. Cependant, un petit pourcentage de la séquence d'ADN humain (<0,5 %) diffère, et ce sont ces séquences ***polymorphes*** (« plusieurs formes ») qui sont utilisées dans les applications médico-légales. Par accord universel, les séquences d'ADN utilisées pour le typage médico-légal sont « anonymes », c'est-à-dire qu'elles proviennent de régions de nos chromosomes (également appelées ***loci***) qui ne contrôlent aucun caractère connu et n'ont aucune fonction connue.

Les séquences d'ADN utilisées dans le cadre de l'analyse criminalistique d'ADN sont des régions non codantes qui contiennent des segments de ***courtes répétitions en tandem*** ou ***STR***. Les STR sont des séquences d'ADN très courtes qui se répètent directement en tête-à-queue. L'exemple ci-dessous (figure 1) montre un locus connu sous le nom de TH01 effectivement utilisé dans le cadre de l'analyse d'ADN en science médico-légale; la séquence d'ADN de ce locus contient quatre répétitions de [TCAT].

..C C C T C A T T C A T T C A T T C A T T C A..

Pour le locus STR TH01, il existe de nombreuses formes polymorphes alternatives (***allèles***) qui diffèrent les unes des autres par le nombre de répétitions de [TCAT] présentes dans la séquence. Bien que plus de 20 allèles différents de TH01 aient été découverts dans le monde entier, chacun d'entre nous n'en possède toujours que deux, l'un hérité de sa mère et l'autre de son père.

Le type d'ADN du suspect A pour le locus TH01 est (5-3) Le type d'ADN du suspect B pour le locus TH01 est (6-10)



Nombre de répétitions de [TCAT].

Fig. 1. Deux échantillons de génotypes au locus TH01.

Comment les allèles STR sont-ils détectés ? La clé du profilage génétique est l'amplification des copies présentes dans les petites quantités probantes d'ADN utilisant la ***réaction en chaîne par polymérase (PCR)***. À l'aide d'amorces spécifiques aux séquences d'ADN situées de part et d'autre du STR, des milliards de copies de chacun des deux allèles originaux TH01 présents dans le type d'ADN d'une personne sont synthétisées dans la réaction. Ces copies contiennent le même nombre de STR que les copies d'ADN originales et peuvent être séparées selon leur taille à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose. Par comparaison avec des normes de grandeur correspondant aux tailles connues des allèles TH01, les tailles des copies amplifiées peuvent être déterminées.

Ce kit permet aux étudiants de simuler le génotypage d'un locus tel qu'il est couramment utilisé en criminalistique. Dans les applications réelles sur les scènes de crime, le profilage de l'ADN est effectué sur un certain nombre de loci différents afin d'améliorer le ***pouvoir discriminant*** des tests. En termes simples, le pouvoir discriminant est la capacité du typage à faire la distinction entre différents individus. Par exemple, un locus peut être capable de faire la différence entre une personne sur 1 000, alors que deux loci peuvent faire la différence entre une personne sur 10 000. Plus le nombre de loci typés est important, plus la capacité de discrimination est puissante.

Après l'établissement du profil d'ADN sur le locus BXP007 simulé dans le kit *Crime Scene Investigator PCR Basics*[MC], l'enseignant peut choisir une leçon supplémentaire qui simule l'utilisation des 13 loci CODIS (Combined DNA Index System) de base utilisés dans les affaires réelles. Cet exercice simple démontre le concept de l'augmentation du pouvoir discriminant avec l'augmentation du nombre de loci typés, et illustre comment même les frères et sœurs peuvent être identifiés par l'analyse d'ADN. Chaque équipe d'étudiants générera son propre ensemble de génotypes, collectera les données et les enregistrera sur une feuille de travail, et effectuera des calculs statistiques simples.

Stratégie d'enseignement — Enquête guidée — Investigation basée sur l'enquête

L'objectif de ce programme est de guider les étudiants dans le processus de réflexion qu'implique une enquête scientifique en laboratoire. Les étudiants se familiariseront avec la PCR, l'électrophorèse sur gel, le génotypage et l'appariement des génotypes tout en se posant la question suivante : « Comment une infime quantité de matériel génétique (ADN) peut-elle être utilisée pour identifier une personne sur un milliard ? » Dans le contexte d'un scénario d'étude de cas sur une scène de crime, cette activité pourrait soulever une foule de questions telles que « Pourquoi est-ce important ? »

L'accent pour les étudiants n'est pas tant sur la réponse ou le résultat que sur la manière dont le résultat a été obtenu et justifié par des observations et analyses minutieuses de leurs données. Les étudiants qui s'engagent dans les activités de Biotechnology Explorer[MC] développent un sentiment positif de leur capacité à utiliser la méthode scientifique pour résoudre des problèmes. Les questions inspirantes intégrées au manuel de l'étudiant sont conçues pour maximiser l'implication des étudiants dans le laboratoire. L'implication des étudiants dans ce processus leur permet de mieux comprendre l'intérêt d'aborder un défi scientifique de manière organisée et logique.

Ce manuel peut être téléchargé à partir du site web Biotechnology Explorer[MC]. Visitez-nous sur l'internet à explorer.bio-rad.com ou appelez-nous aux États-Unis au 1-800-4BIORAD (1-800-424-6723).

Nous nous efforçons continuellement d'évoluer et d'améliorer nos programmes et nos produits. Vos suggestions et vos idées sont les bienvenues !

Programme Biotechnology Explorer[MC]
Life Science Group
Bio-Rad Laboratories
Hercules, Ca 94547
explorer.bio-rad.com

Créez un contexte. Renforcez l'apprentissage. Restez à jour.
Les nouvelles découvertes scientifiques et technologiques créent davantage de contenu à enseigner, mais pas plus de temps. Les kits Biotechnology Explorer vous aident à enseigner plus efficacement en intégrant plusieurs matières principales dans un seul laboratoire. Reliez les concepts aux techniques et mettez-les en contexte avec des scénarios du mode réel.

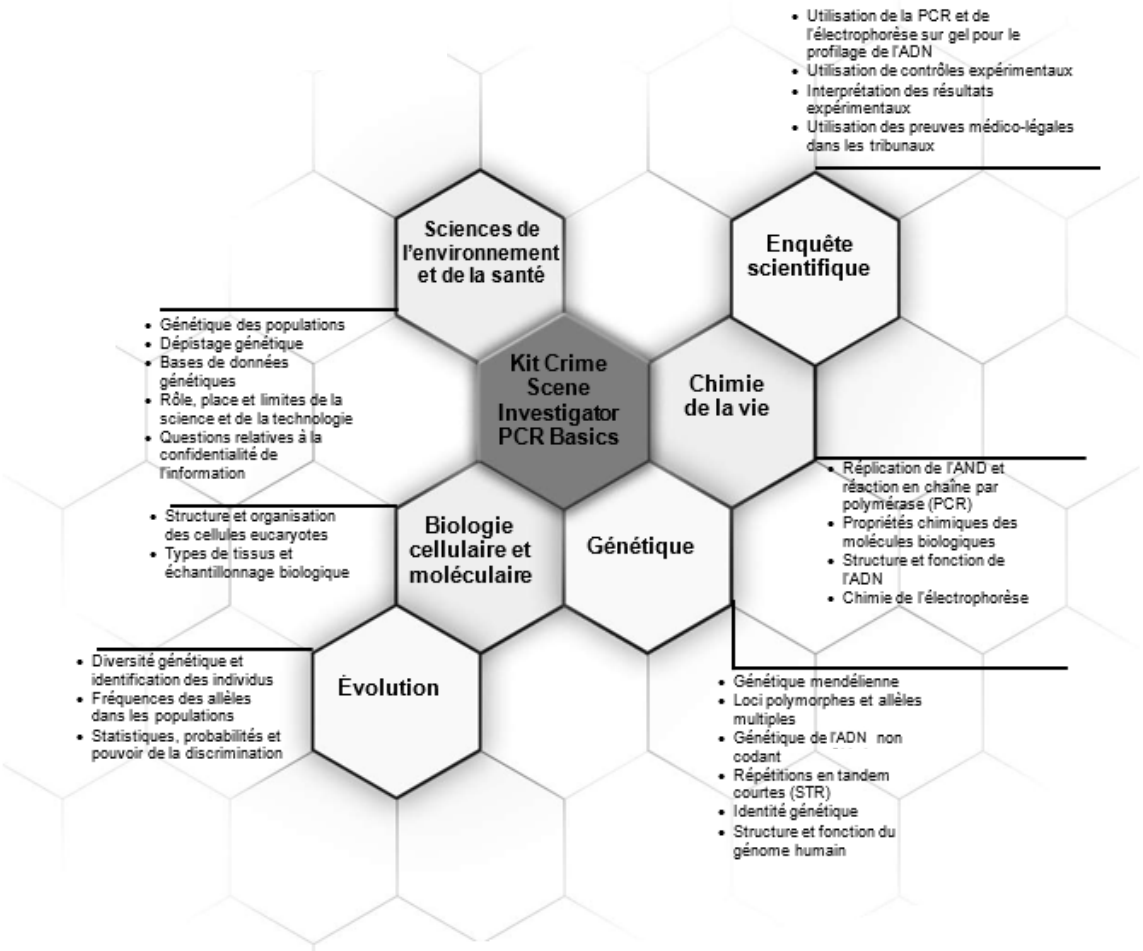


Table des matières

APERÇU DU KIT **1**

LISTE DE CONTRÔLE DE L'INVENTAIRE DU KIT **3**

PROGRAMME D'ÉTUDES ADAPTÉ **6**

CONTEXTE POUR LES ENSEIGNANTS **8**

PRÉPARATION PRÉLIMINAIRE DE L'INSTRUCTEUR **17**

LEÇON 1 : PRÉPARER LES RÉACTIONS PCR 19
LEÇON 2 : ÉLECTROPHORÈSE DES PRODUITS POUR LA PCR 22
LEÇON 3 : SÉCHAGE DES GELS ET ANALYSE DES RÉSULTATS 27

CONSEILS ET QUESTIONS FRÉQUEMMENT POSÉES **29**

GUIDE RAPIDE **34**

MANUEL DE L'ÉTUDIANT **37**

LEÇON 1 : AMPLIFICATION PAR PCR 42
LEÇON 2 : ÉLECTROPHORÈSE DES PRODUITS PCR 47
LEÇON 3 : SÉCHAGE DES GELS ET ANALYSE DES RÉSULTATS 53

ANNEXE A : PRÉCISIONS SUR L'ADN ET LA PCR **57**

ANNEXE B : UNE BRÈVE HISTOIRE DES TESTS MÉDICO-LÉGAUX -- *VITESSE DES TESTS VERSUS POUVOIR DISCRIMINANT* **66**

ANNEXE C : EXERCICES SUR LES FRÉQUENCES DES ALLÈLES STR ET LES PROBABILITÉS D'APPARIEMENT ALÉATOIRE **77**

ANNEXE D : AMPLIFICATION PAR PCR ET TECHNIQUE STÉRILE **83**

ANNEXE E : GLOSSAIRE DES TERMES **84**

ANNEXE F : INSTRUCTIONS DE PROGRAMMATION POUR LE THERMOCYCLEUR MYCYCLER^{MC} **86**

ANNEXE G : INSTRUCTIONS DE PROGRAMMATION POUR LE THERMOCYCLEUR T100^{MC} **88**

ANNEXE H : GUIDE DE RÉPONSES POUR LES ENSEIGNANTS **89**

ANNEXE I : RÉFÉRENCES, SITES WEB RECOMMANDÉS ET INFORMATIONS SUR LES CARRIÈRES **94**

ANNEXE J : RÉALISER DES GELS D'AGAROSE EN MOINS DE 20 MINUTES **95**

Aperçu du kit

Ce kit permet aux étudiants de réaliser des analyses médico-légales d'ADN réelles et les initie aux techniques et applications de la PCR et de l'électrophorèse en gel. En tant qu'enquêteurs de scène de crime, les étudiants utiliseront la PCR et l'électrophorèse sur gel d'agarose pour analyser les génotypes de plusieurs échantillons d'ADN — un obtenu sur une scène de crime hypothétique et quatre provenant de suspects hypothétiques.

- Leçon 1 : Préparer les réactions en chaîne par polymérase (PCR)
- Leçon 2 : Électrophorèse des produits de la PCR
- Leçon 3 : Séchage du gel et analyse des résultats

Les réactifs pour l'électrophorèse sur gel sont offerts sous forme de modules séparés ; voir l'inventaire des kits (page 3) pour plus d'informations.

Le kit *Crime Scene Investigator PCR Basics*^{MC} fournit tous les réactifs nécessaires (amorces, matrice d'ADN et polymérase *Taq*) pour que les étudiants puissent réaliser la PCR. Après avoir effectué la PCR, les étudiants utilisent l'électrophorèse pour analyser les échantillons d'ADN et identifier les génotypes à l'aide d'une échelle d'allèles de référence. Ils établissent ensuite une correspondance entre l'échantillon d'ADN d'un suspect et l'ADN prélevé sur la scène de crime. Après l'établissement du profil d'ADN d'un seul « locus » génétique, l'enseignant a la possibilité d'effectuer une expérience pédagogique supplémentaire qui simule l'utilisation des 13 loci de base utilisés dans les affaires médico-légales réelles. Cet exercice simple démontre le concept de l'augmentation du pouvoir discriminant avec l'augmentation du nombre de loci typés, et illustre comment même des frères et sœurs peuvent être identifiés en toute discrétion par l'analyse de l'ADN. Chaque équipe d'étudiants génèreront leurs propres ensembles de génotypes, collecteront et enregistreront les données sur une feuille de travail et effectueront des calculs statistiques simples.

Remarque : Les réactifs fournis dans ce kit ne font que simuler un test médico-légal. Ils ne peuvent pas être utilisés pour effectuer un génotypage réel et, en tant que tels, ils ne révèlent aucune information sur les génotypes individuels.

De petits fragments d'ADN de 200 à 1000 paires de bases sont générés dans cette expérience. Pour résoudre ces bandes de manière adéquate, il faut un gel d'agarose ayant un pourcentage élevé (3 %).

Instructions de stockage

Placez le sac de réactifs à -20 °C dans la semaine suivant son arrivée. Les autres réactifs peuvent être conservés à température ambiante.

Clientèle cible

Ce kit convient aux étudiants qui ont peu ou pas d'expérience en biologie moléculaire ou en PCR, mais peut également convenir aux étudiants plus avancés qui s'intéressent aux détails de l'analyse de l'ADN, à la médecine légale et aux statistiques. Les étudiants doivent avoir une compréhension des concepts suivants pour apprécier pleinement le kit :

- La structure de l'ADN
- Génotypes et génotypage
- L'hérédité et le passage de l'information génétique des parents à la descendance
- Réplication de l'ADN et PCR
- Structure cellulaire et stockage de l'ADN dans le noyau
- Filtrage par motifs et discrimination

La plupart de ces informations de base sont fournies dans le manuel d'instructions et les annexes. Des informations supplémentaires peuvent être trouvées dans les manuels ou les sites web référencés à l'annexe H.

Liste de contrôle de l'inventaire du kit

Cette section énumère les composants fournis dans le kit de base *Crime Scene Investigator PCR Basics*[MC]. Elle énumère également les accessoires nécessaires. Chaque kit contient suffisamment de matériel pour huit postes de travail d'étudiants, avec un maximum de 4 étudiants par poste. Dès que vous recevez votre kit, ouvrez-le et cochez le contenu du kit afin de vous familiariser avec celui-ci. Placez immédiatement le *Master Mix* et les amorces au congélateur (de préférence à -20 °C). Le nombre de boîtes de gel et de pipettes dont vous avez besoin dépend du nombre d'étudiants travaillant à chaque station. Nous recommandons que 2 à 4 étudiants travaillent par station.

Composants du kit	**Nombre/Kit**	(✔)
ADN de la scène de crime, 250 µl	1 tube	❒
ADN du suspect A, 250 µl	1 tube	❒
ADN du suspect B, 250 µl	1 tube	❒
ADN du suspect C, 250 µl	1 tube	❒
ADN du suspect D, 250 µl	1 tube	❒
Master Mix, 1,2 ml (2x)	1 tube	❒
Crime Scene Investigator Primers (amorces) (bleu), 25 µl (50x)	1 tube	❒
Échelle pour allèles Crime Scene Investigator, 200 µl	1 tube	❒
Colorant de chargement Orange G, 1 ml (5x)	1 tube	❒
Tubes PCR, 0,2 ml	1 paquet	❒
Adaptateurs de tubes PCR sans bouchon, 1,5 ml	1 paquet	❒
Tubes de microcentrifugation colorés à couvercle basculant de 2,0 ml	1 paquet	❒

Accessoires requis	Nombre/Kit	(✔)
Micropipette réglable 20-200 µl (catalogue no.166-0507EDU)	1	❒
Micropipettes réglables 2-20 µl (catalogue no.166-0506EDU)	1–8	❒
ou, micropipettes à volume fixe de 20 µl (catalogue no.166-0513EDU)	1–8	❒
Embouts de pipette 2-20 µl, barrière anti-aérosol (catalogue no.211-2006EDU)	8 supports	❒
Embouts de pipette 20-200 µl, barrière anti-aérosol (catalogue no.211-2016EDU)	8 supports	❒
Stylos de marquage	8	❒
Eau distillée	3.5 L	❒
Bain-marie (catalogue no.166-0504EDU)	1	❒
Microcentrifugeuse (catalogue no.166-0602EDU) ou mini-centrifugeuse (catalogue no.166-0603EDU)	1–4	❒
Thermocycleur (par exemple, MyCycler catalogue no.170-9701EDU ou T100™ catalogue no.186-1096EDU)	1	❒
Alimentation électrique (catalogue PowerPac™ Basic no.164-5050EDU)	2–4	❒
Système d'électrophorèse sur gel horizontal, avec mini-chariot (catalogue n° 166-4288EDU)	1	❒
Petits lots de réactifs pour l'électrophorèse ADN (no.166-0450EDU) contenant 25 g d'agarose, 100 ml de TAE 50x, et 100 ml de colorant d'ADN Fast Blast™.	1	❒
Supports pour tubes de microcentrifugation (catalogue no.166-0481EDU)	5	❒
Supports pour tubes PCR (catalogue no.TRC-0501EDU)	5	❒

Accessoires en option	Nombre/Kit	(✔)
Système de séchage GelAir™ (catalogue no.166-1771EDU)	1	❒
Cellophane (si vous n'utilisez pas le système GelAir ; catalogue no.165-1779EDU)	1	❒
Bascule (catalogue no.166-0709EDU)	1	❒

Recharges disponibles séparément

Sac de réactifs (catalogue n° 166-2601EDU) : contenant le *Master Mix*, les amorces Crime Scene Investigator, l'échelle pour allèles Crime Scene Investigator, le colorant de chargement Orange G, et les ADN de la scène de crime et des suspects.

Le *Master Mix* (catalogue n° 166-5009EDU), 1,2 ml, contient 90 unités d'ADN polymérase *Taq*, des dNTP, du $MgCl_2$ et un tampon exclusif de pH 8,0.

Petit paquet de réactifs pour l'électrophorèse d'ADN (catalogue no.166-0450EDU) contenant 25 g d'agarose, 100 ml de TAE 50x, et 100 ml de colorant d'ADN Fast Blast.

Paquet moyen de réactifs d'électrophorèse d'ADN (catalogue no.166-0455EDU) contenant 125 g d'agarose, 1 L de TAE 50x, et 100 ml de colorant d'ADN Fast Blast.

Paquet large de réactifs pour l'électrophorèse de l'ADN (catalogue no.166-0460EDU) contenant 500 g d'agarose, 5 L de TAE 50x, et 2 x 200 ml de colorant d'ADN Fast Blast.

Tubes PCR à paroi mince de 200 µl, 1 000 (catalogue no.223-9473EDU).

Programme d'études adapté

Ce programme s'inscrit dans la tendance à s'éloigner de l'enseignement traditionnel des sciences, qui consiste à mémoriser des faits et des informations scientifiques, à couvrir de nombreux domaines et à conclure les enquêtes par le résultat d'une expérience. Au lieu de cela, nous encourageons les étudiants à participer à des enquêtes sur de longues périodes, à apprendre la matière dans le contexte d'enquêtes et à appliquer les résultats des expériences à des arguments et des explications scientifiques.

L'étudiant ne se concentre pas tant sur la réponse ou le résultat que sur la manière dont le résultat a été obtenu et justifié par des observations et analyses minutieuses de ses données. Dans cette activité, les étudiants s'engagent dans un processus scientifique au cours duquel ils amplifient des échantillons d'ADN à l'aide de la PCR, utilisent l'électrophorèse sur gel pour identifier les échantillons d'ADN correspondants et effectuent des calculs simples pour comprendre si une correspondance d'ADN peut être due au hasard. Il est conseillé aux étudiants de se familiariser avec la matière avant de réaliser l'expérience. Les étudiants se familiariseront avec la PCR, l'électrophorèse sur gel, le génotypage et la concordance génotypique tout en se posant la question suivante : « Comment une quantité minuscule de matériel génétique (ADN) peut-elle être utilisée pour identifier une personne parmi un milliard ? » Dans le contexte d'un scénario d'étude de cas sur une scène de crime, cette activité pourrait soulever une foule de questions telles que « Pourquoi est-ce important pour le système de justice pénale ? », ou encore « S'il existait un moyen de libérer de prison une personne condamnée à tort, n'est-il pas important de le faire ? ».

Ce kit est conçu pour créer un contexte et renforcer l'apprentissage en intégrant des éléments de base multiples et essentiels dans une seule unité ou un seul laboratoire. L'intention de ce programme est de fournir des concepts et des techniques et de les mettre en contexte avec des scénarios du monde réel.

Plus précisément, le kit couvre les normes de contenu standard suivantes :

Enquête scientifique

Profilage de l'ADN par PCR et électrophorèse sur gel
Utilisation de contrôles
Interprétation des résultats expérimentaux
Utilisation des preuves scientifiques devant les tribunaux

La chimie de la vie

Propriétés chimiques des composants cellulaires

Électrophorèse en gel de l'ADN
Réplication de l'ADN et PCR

Hérédité et biologie moléculaire

Génétique mendélienne
Génétique de l'ADN non codante
Loci polymorphes et allèles multiples
Courtes répétitions en tandem
Techniques de profilage de l'ADN
Génétique de l'ADN non codant

Structure et fonction des organismes

Structure du génome humain
Structure cellulaire

Biologie évolutive

Diversité génétique et identification des individus
Fréquences des allèles dans les populations
Statistiques et probabilités

Sciences de l'environnement et de la santé

Génétique des populations
Rôle, place, limites, possibilités de la science et de la technologie
Dépistage génétique et bases de données

Plus précisément, aux États-Unis, le kit couvre les normes de contenu suivantes :

Norme	Adapté à la norme
Norme de contenu A	
Les étudiants développeront leurs habiletés à mener des enquêtes scientifiques	Les étudiants réaliseront une expérience en utilisant des procédures sophistiquées
Les étudiants développeront une compréhension de l'enquête scientifique	Les étudiants appliqueront les résultats de leurs expériences à des arguments scientifiques
Norme de contenu C	
Les étudiants développeront une compréhension de la base moléculaire de l'hérédité	Les étudiants comprendront que l'information génétique est passée des parents aux enfants
Norme de contenu E	
Les étudiants développeront une compréhension de la science et de la technologie	Les étudiants réaliseront une expérience en utilisant des procédures sophistiquées, et obtiendront une compréhension de la technologie telle qu'elle est utilisée dans les études médico-légales
Norme de contenu F	
Les étudiants développeront une compréhension de la science et de la technologie dans les défis locaux, nationaux et mondiaux	Les étudiants apprendront comment la technologie est utilisée dans le processus d'identification des victimes de catastrophes, comment elle est utilisée devant les tribunaux, et comment elle peut être utilisée afin de révéler les relations familiales
Norme de contenu G	
Les étudiants développeront une compréhension de la science en tant qu'activité humaine	Les étudiants travailleront en équipe pour atteindre un objectif commun
Les étudiants développeront une compréhension de la nature de la connaissance scientifique	Les étudiants réaliseront leurs propres expériences et arriveront à leurs propres conclusions en se basant sur leurs observations expérimentales

Contexte pour les enseignants

L'ADN : l'empreinte de la vie

L'ADN est la molécule qui guide tous les aspects de la vie. Elle code toutes les informations précises à la fabrication de l'un d'entre vous, d'un brin d'herbe ou d'un ver de terre, et l'on retrouve exactement le même ADN dans chaque cellule de votre corps. L'ADN est composé de 4 unités répétitives de base, appelées nucléotides. Au total, chaque cellule de votre corps contient environ 3 milliards de nucléotides. La composition complète des nucléotides d'une personne est appelée le génome de cette personne.

Récemment, plusieurs groupes travaillant ensemble ont fini de décoder la séquence complète des nucléotides du génome humain. Cet exploit étonnant a pris plus de 10 ans et a nécessité des milliers de personnes travaillant à temps plein sur le projet. Il est remarquable de constater que lorsque l'on compare les génomes de deux personnes, la plupart des séquences sont identiques. En fait, plus de 99,5 % de la séquence de nucléotides est identique. Les 0,5 % restants (soit environ 15 millions de nucléotides) déterminent la différence entre les personnes.

Les nucléotides sont assemblés en longues chaînes à double brin, très serrées, appelées chromosomes. Les chromosomes ont une taille différente, allant d'environ 50 à 500 millions de nucléotides de long. Chaque cellule humaine contient 23 paires de chromosomes. Chaque chromosome est constitué de régions, appelées gènes, qui dirigent l'expression d'une seule molécule. Avec l'achèvement du projet du génome humain, nous savons maintenant qu'il n'y a qu'environ 30 000 gènes chez les humains. Seulement 30 000 gènes pour faire un être humain ! L'un des résultats surprenants du projet du génome humain a été le faible nombre de gènes codés dans le génome humain et la proportion importante du génome constituée de séquences non codantes. Le rôle de ces séquences non codantes n'est pas clair. Récemment, il a été proposé que ces séquences puissent avoir des fonctions de régulation et autres.

La partie la plus importante de la vie d'une cellule est le moment où elle s'engage à se reproduire et à se diviser. Le résultat fondamental de toute division cellulaire est la création de deux cellules filles identiques à partir d'une cellule d'origine. Pour que cela se produise, la réplication de l'ADN doit avoir un haut degré de spécificité et de précision. Pour ce faire, les enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN utilisent les informations déjà contenues dans les brins existants pour fabriquer de nouvelles copies d'ADN. Cette idée de base — la copie exacte de l'ADN à partir d'une matrice — est à la base d'une nouvelle technologie, la réaction en chaîne par polymérase (**PCR**), qui a révolutionné de nombreux domaines de la science, de la médecine et des tribunaux.

Introduction à la PCR

En 1983, Kary Mullis, qui travaillait alors chez Cetus Corporation, a mis au point la technique de biologie moléculaire qui a révolutionné la recherche génétique et lui a valu le prix Nobel en 1993. La PCR a transformé la biologie moléculaire en un outil de recherche multidisciplinaire. Les nombreuses techniques de biologie moléculaire utilisées avant la PCR étaient laborieuses, prenaient du temps et nécessitaient un haut niveau d'expertise technique. En outre, le fait de travailler avec de minuscules quantités d'ADN rendait difficile l'utilisation de la biologie moléculaire par les chercheurs d'autres domaines biologiques (pathologie, botanique, zoologie, pharmacie, etc.).

Depuis, la PCR a eu un impact considérable sur cinq grands domaines de la biotechnologie : la cartographie génétique, le clonage, le séquençage de l'ADN, la détection des gènes et le profilage d'ADN. En fait, la PCR est maintenant utilisée de façon courante comme outil de diagnostic médical pour détecter des mutations spécifiques susceptibles de provoquer des maladies génétiques, lors d'enquêtes criminelles et par les tribunaux pour identifier des suspects au niveau moléculaire.

Avant la PCR, l'utilisation des techniques de biologie moléculaire à des fins thérapeutiques, médico-légales, pharmaceutiques ou de diagnostic médical était peu pratique ou d'un coût prohibitif. Le développement de la PCR a fait passer la biologie moléculaire d'une science difficile à l'un des ensembles d'outils les plus accessibles et les plus utilisés aujourd'hui dans la recherche génétique et médicale.

PCR et biotechnologie —De quoi s'agit-il et pourquoi a-t-elle révolutionné toute une communauté de chercheurs ?

La PCR produit des quantités exponentielles d'un morceau spécifique d'ADN à partir de quantités infimes de matériel de départ (matrice). La matrice peut être n'importe quelle forme d'ADN à double brin. Un chercheur peut prélever des traces d'ADN d'une goutte de sang, d'un simple follicule pileux, d'une cellule de joue ou d'un morceau d'os et utiliser la PCR pour générer des millions de copies d'un fragment d'ADN souhaité. En théorie, il suffit d'un seul brin intact d'une matrice d'ADN et de l'utilisation de la PCR pour générer des millions de nouvelles molécules d'ADN. Avant la PCR, il aurait été impossible de réaliser des études médico-légales ou génétiques avec cette petite quantité d'ADN. La capacité d'amplifier la séquence précise d'ADN qu'un chercheur souhaite étudier ou manipuler est le véritable pouvoir de la PCR.

L'amplification par PCR nécessite la présence d'au moins un brin d'une matrice d'ADN. Dans ce kit, les échantillons d'ADN obtenus à partir d'une scène de crime simulée et de plusieurs suspects seront la source des brins de matrice. L'une des principales raisons pour lesquelles la PCR est un outil si puissant est sa simplicité et sa spécificité. Il suffit de disposer de tampons de réaction bon marché, de quatre sous unités d'ADN (désoxynucléotides triphosphates d'adénine, de guanine, de thymine et de cytosine), d'une ADN polymérase, de deux amorces d'ADN et de quantités infimes de brins de matrice contenant la séquence cible que vous souhaitez amplifier. La spécificité provient de la capacité à cibler et amplifier un segment spécifique d'ADN parmi un génome complet.

Le fait que l'on puisse fabriquer facilement et à faible coût des millions de copies exactes d'une séquence d'ADN particulière est aujourd'hui à la base d'une grande partie des tests médico-légaux de l'ADN. Il permet aux analystes de la science médico-légale de déterminer l'identité génétique précise d'un individu à partir de la plus petite quantité de matériel biologique.

Une brève histoire de l'analyse médico-légale

Les sciences médico-légales décrivent la frontière entre la science et la loi. La science peut facilement aussi bien condamner une personne pour un crime que libérer une personne condamnée à tort. Les premières utilisations de la science dans les enquêtes criminelles ont consisté à utiliser des photographies pour documenter les scènes de crime. Les preuves par empreintes digitales sont utilisées depuis environ une centaine d'années. Les premiers éléments de preuve génétique recueillis dans le cadre d'une enquête concernaient le typage des groupes sanguins. Dans les années 1980, on a

utilisé pour la première fois un test médico-légal basé sur l'ADN, l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction, ou RFLP. Bien que l'analyse RFLP ait des limites importantes (l'analyse RFLP est décrite plus en détail à l'annexe B), elle a été le pilier de l'analyse médico-légale pendant près de 20 ans. Ce n'est qu'avec l'avènement récent de la PCR que cet aspect du système de justice pénale s'est véritablement modernisé. Le profilage médico-légal moderne de l'ADN permet de distinguer deux personnes sur la planète (à l'exception des vrais jumeaux), qu'elles soient vivantes ou mortes.

Tests médico-légaux de l'ADN : la vérité invisible

Imaginez le scénario suivant…
Scène : Motel de la Grande Route, route Ténébreuse no. 1,
Ville Inconnue
Endroit : Chambre n° 13.

Le gérant du motel entend des voix masculines fortes, une femme crie, et un coup de feu retentit. Le gérant court à la fenêtre à temps pour voir des lumières qui s'éloignent provenant d'une voiture qui part en vitesse. La porte de la chambre n° 13 reste ouverte. Le gérant court vers la porte ouverte, pour voir un homme allongé face contre terre dans une mare de sang. Il appelle le 911. La police arrive, et commence à examiner la scène de crime. Un homicide apparent, mais sans indices évidents sur l'auteur du crime. Ou bien alors… ?

Un spécialiste médico-légal est appelé à examiner la scène de crime et à recueillir des preuves. Même s'il semble que les personnes impliquées n'aient laissé aucune preuve derrière elles, le spécialiste peut utiliser des tests de laboratoire qui permettent de déterminer qui était sur la scène de crime à partir d'une seule goutte de sang ou d'un seul cheveu. S'agit-il d'une histoire de science-fiction ou de la réalité ?

C'est bel et bien une réalité. Des tests sont régulièrement effectués dans des laboratoires de médecine légale aux États-Unis et dans de nombreuses autres régions du monde à partir d'une seule cellule, et parfois à partir d'échantillons vieux de plusieurs décennies. La raison pour laquelle cela est possible est l'ADN.

Pour pouvoir effectuer des tests en laboratoire, le spécialiste a besoin de matériel biologique dont il peut extraire de l'ADN intact. Souvent, il reste très peu de matériel sur une scène de crime, et pas en quantité suffisante pour permettre l'analyse. Pour contourner ce problème, le spécialiste tire parti d'un processus que chaque cellule de votre corps utilise pour fabriquer les nouvelles copies d'ADN nécessaires à chaque fois qu'une cellule se divise. La réplication de l'ADN doit se produire à chaque division cellulaire, en quelques heures seulement, et elle doit copier parfaitement les 3 milliards de nucléotides. L'enzyme qui est responsable de cet incroyable exploit est la même que celle utilisée dans la PCR pour amplifier les séquences d'ADN intéressantes à étudier.

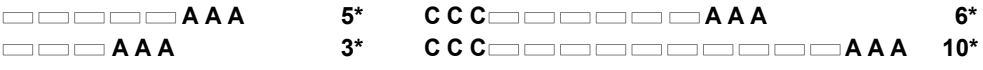
Fréquences des allèles et pouvoir discriminant

Imaginez un scénario dans lequel les suspects A et B sont accusés d'être impliqués dans un triangle amoureux et d'avoir commis le meurtre d'une troisième personne au Motel de la Grande Route ; la personne ayant réellement appuyé sur la gâchette est inconnue. En plus des échantillons d'ADN prélevés sur la scène de crime, le spécialiste médico-légal isolera l'ADN des suspects, des victimes et de toute autre personne présente afin d'établir leur génotype comme contrôle. En utilisant une analyse basée sur la PCR, les échantillons seront examinés sur 13 loci différents en utilisant un logiciel de génotypage pour interpréter les résultats des produits d'amplification. Lors d'analyses réelles de scènes de crime, le profilage de l'ADN est effectué sur de nombreux loci afin d'améliorer le ***pouvoir discriminant*** des tests. En termes simples, le pouvoir discriminant est la capacité du typage à faire la distinction entre différents individus. Plus le nombre de loci analysés est élevé, plus grande est la capacité de discrimination.

Pour illustrer la puissance du pouvoir discriminant, reprenons le cas du suspect A et du suspect B. Au locus utilisé pour cette analyse, le TH01, il y a douze allèles possibles. Par exemple, le suspect A possède un allèle avec 6 répétitions et un allèle avec 3 répétitions, ce qui donne un profil ADN pour le locus TH01 de 6-3 (voir figure 2). Dans la figure, chaque répétition du TCAT est représentée par une case.

Deux échantillons de génotypes TH01

Le type d'ADN du suspect A pour le locus TH01 est (5-3) Le type d'ADN du suspect B pour le locus TH01 est (6-10)



*Nombre de répétitions de [TCAT].

Fig. 2. Échantillon de génotypes TH01

Un schéma des résultats du typage TH01 pour le suspect A et le suspect B est illustré à la figure 3. Dans cet exemple, une PCR a été réalisée sur l'ADN des deux suspects en utilisant des amorces spécifiques du locus TH01. Après une électrophorèse sur gel, le motif des bandes obtenues est comparé à l'échelle d'allèles pour identifier les allèles présents dans les échantillons.

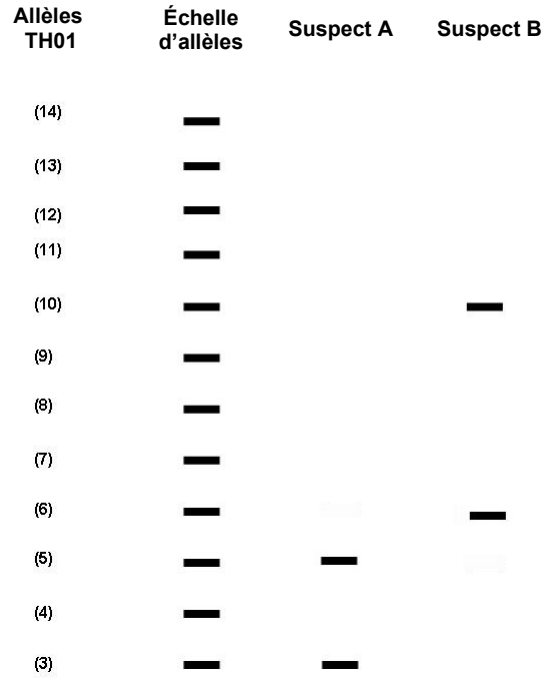


Fig. 3. Illustration des génotypes de l'échantillon TH01 après électrophorèse sur gel.

Or, il se trouve que les fréquences des allèles ne suivent pas des schémas mathématiques réguliers. En fait, les fréquences des allèles changent en fonction de la population étudiée. Pour illustrer ce point, regardez le graphique suivant (figure 4).

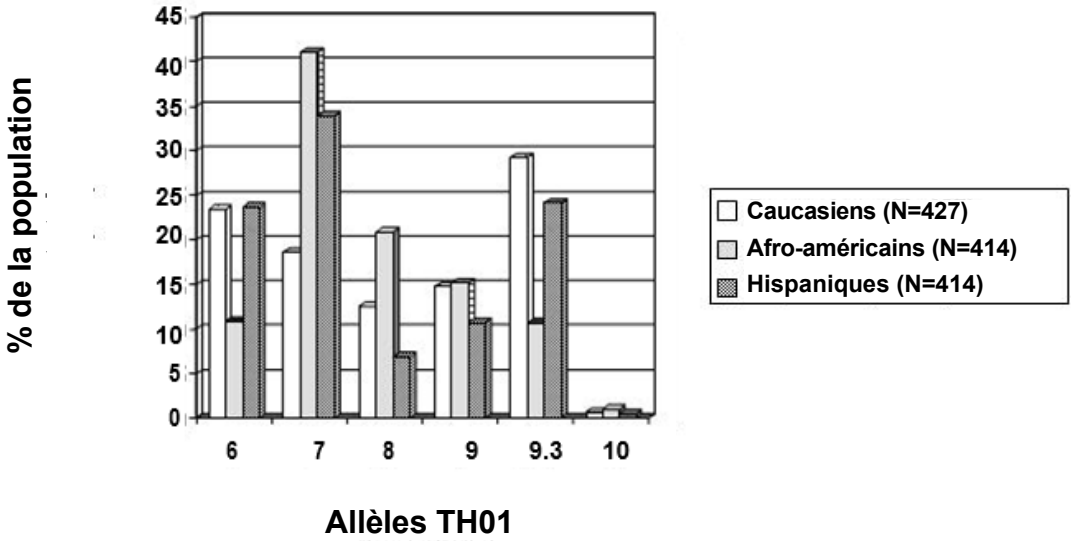


Fig. 4. Fréquences des allèles TH01 dans différents groupes ethniques.

Selon les données relatives au locus TH01, les Caucasiens sont plus susceptibles d'avoir l'allèle 6 ou l'allèle 9.3, mais n'ont pratiquement jamais l'allèle 10. De même, la plupart des Afro-Américains présentent l'allèle 7 à ce locus, mais presque jamais l'allèle 10.

En raison de la manière dont les chromosomes sont hérités (selon la loi de l'assortiment indépendant de Mendel), la fréquence de chaque allèle peut être multipliée entre elles pour obtenir la fréquence du génotype. Examinons tout d'abord le locus D3S1358, un autre locus utilisé dans l'analyse de l'ADN en plus du locus TH01. Disons qu'au locus D3S1358, le suspect A possède une copie de l'allèle 16 (fréquence de l'allèle = 0,253 chez les Caucasiens) et une copie de l'allèle 17 (fréquence de l'allèle = 0,215 chez les Caucasiens). À ce locus, cette combinaison particulière d'allèles est observée assez fréquemment chez les Caucasiens, et la fréquence de l'allèle de cette combinaison d'allèles est de 2 x (0,253) x (0,215) = 0,109, soit environ un Caucasien sur dix. Si vous enquêtiez sur ce crime et que ces génotypes particuliers étaient trouvés sur la scène de crime, ce ne serait pas une très bonne nouvelle pour votre affaire ! Cela signifie qu'un grand nombre de personnes caucasiennes ont pu être impliquées dans ce crime. Le travail essentiel d'une enquête sur un crime consiste à exclure des suspects. Comment l'analyse de l'ADN permet-elle d'y parvenir ?

Il se fait en examinant de nombreux loci différents en même temps. Maintenant, en plus du D3S1358, examinons le locus TH01. Au locus TH01, le suspect A possède deux copies de l'allèle 10 de TH01. Pour les caucasiens, la fréquence de l'allèle d'une seule copie de l'allèle 10 est de 0,008. Pour une personne de race blanche possédant deux copies de l'allèle 10, la fréquence des allèles totale au locus TH01 est donc de (0,008) x

(0,008) = 0,000 064, soit 1 personne caucasienne sur environ 15 600. Si vous combinez la fréquence de l'allèle TH01 de cette personne avec celle de l'allèle D3S1358, vous obtenez une fréquence d'allèle combinée de (0,109) x (0,000 064) = 0,000 007, soit 1 personne sur environ 150 000 personnes caucasiennes. Ainsi, plus vous ajoutez de loci à votre analyse, plus le pouvoir discriminant s'améliore ou en d'autres termes, plus le l'éventail de suspects diminue.

Pour voir les choses différemment, examinez la figure 5, où vous avez un groupe de 13 suspects potentiels (étoiles) impliqués dans un crime. En utilisant l'analyse STR, vous découvrez que 6 des suspects potentiels ont le génotype TH01 de 6-3, qui est un génotype trouvé sur la scène de crime. Les 7 autres échantillons ont un génotype différent au locus TH01. Ainsi, l'analyse de cet allèle vous a permis d'exclure 7 suspects. Cependant, il vous reste encore 6 suspects possibles. Étaient-ils tous présents sur la scène de crime ? Pour répondre à cette question, vous analysez également le locus D3S1358. Ici, vous trouvez que 7 suspects ont le génotype 16-17 de D3S1358, un génotype qui est également présent sur la scène de crime. Parmi les 7 suspects, 4 d'entre eux ont également un génotype TH01 de 6-3. En combinant ces deux génotypes, vous pouvez exclure 2 suspects de plus, et augmenter votre pouvoir discriminant. Pour pouvoir dire si les 4 autres suspects étaient présents sur la scène de crime, vous examinez également le locus FGA et découvrez que le génotype 21-23 est présent sur la scène de crime. Dans votre groupe de suspects, 7 personnes ont ce génotype à ce locus. Cependant, en combinant les résultats de l'allèle TH01 et de l'allèle D3S1358, vous constatez qu'un seul de vos suspects possède ce génotype. Treize suspects ont le même génotype que celui trouvé sur la scène de crime. Maintenant, après avoir analysé 3 loci différents, vous pouvez exclure tous vos suspects sauf un.

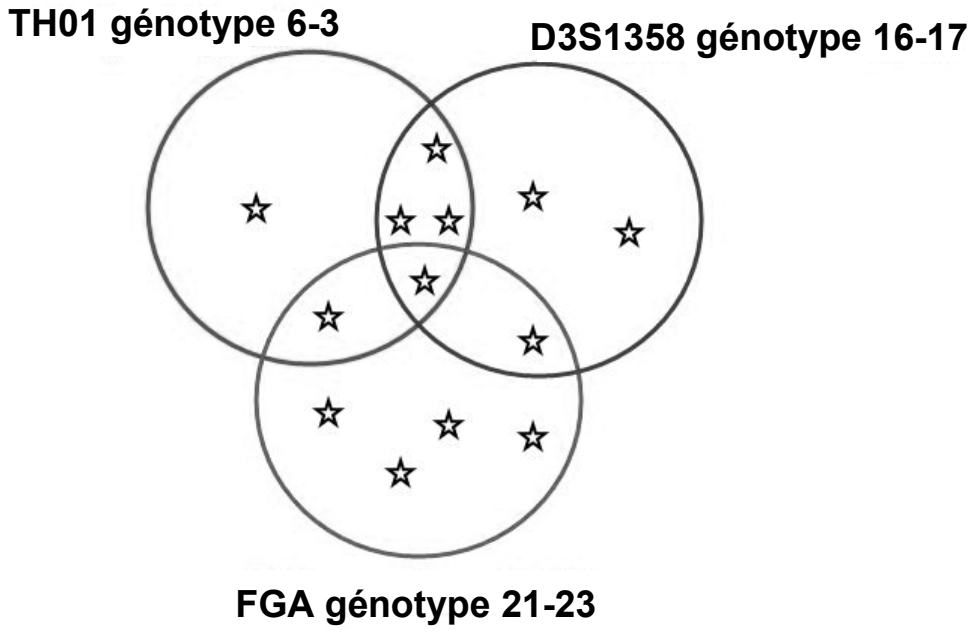


Fig. 5. Le pouvoir discriminant augmente au fur et à mesure que le nombre de loci testés augmente.

Comme l'illustrent ces exemples, le pouvoir discriminant change en fonction des loci et de l'ethnicité des échantillons impliqués dans une enquête. Ce phénomène présente des défis particuliers pour toute enquête ! Ce sujet est abordé plus en détail dans les

annexes B et C.

L’analyse STR peut aider à révéler les liens familiaux

Outre la résolution de crimes, les preuves génétiques ont également été utilisées pour résoudre d’autres problèmes tels que des relations familiales. En reprenant l’exemple ci-dessus (figure 3), supposons que A et B sont les parents de plusieurs enfants. Soit le scénario suivant : un père décède lors d’une catastrophe naturelle. Heureusement, l’assurance du père couvre tous les membres de la famille en cas de décès. Cependant, l’agence d’assurance refuse de payer les frais de santé liés au plus jeune enfant (l’enfant C), car l’enfant C est né après le décès du mari, et l’agence n’a que l’assurance de la mère pour déterminer qui est le père. Comme elle sait que les allèles STR sont hérités de chaque parent, la mère fait effectuer un test STR sur elle-même, son enfant et un échantillon du père. Les résultats sont présentés dans la figure 6.

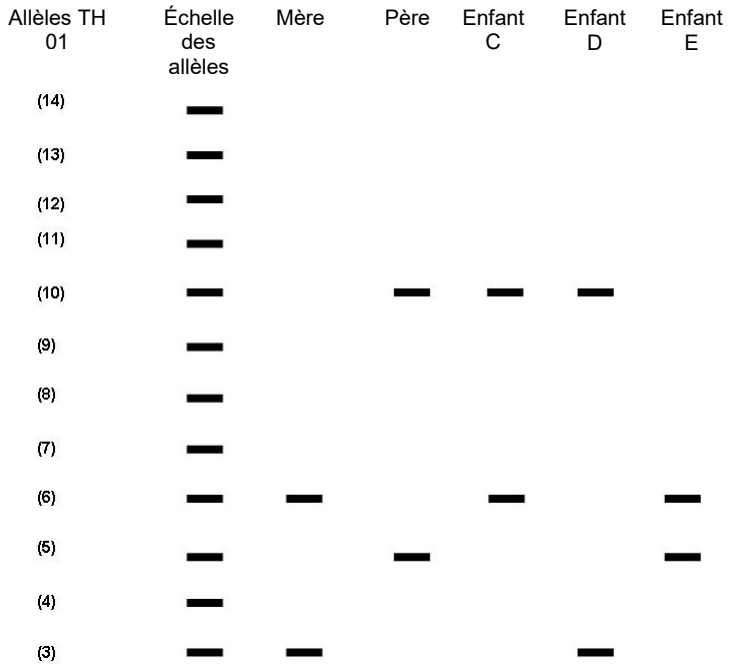


Fig. 6. Allèles TH01 utilisés pour démontrer les relations familiales.

Le résultat montre que pour ce locus particulier, le schéma des allèles présents chez les enfants ressemble à celui des parents. Autrement dit, tous les enfants ont des allèles représentés dans les échantillons des deux parents, et il est donc probable que ces deux personnes sont les parents de ces enfants. En réalité, beaucoup plus d’allèles sont testés, mais la base est la même : des individus apparentés doivent partager certains des mêmes allèles.

Kit Crime Scene Investigator PCR Basics[MC]

Dans ce kit, les étudiants effectuent des réactions PCR sur un mélange de matrices d’ADN plasmatique en utilisant une paire d’amorces PCR. Les produits PCR résultants ont une taille comprise entre 200 et 1 000 pb et sont séparés sur des gels d’agarose à pourcentage élevé. Une échelle d’allèles d’ADN, contenant des bandes de 100 à 1 500 pb, est placée à côté des produits PCR pour permettre l’identification des « allèles » et donner une estimation de la taille des produits PCR. Après l’électrophorèse sur

gel d’agarose, les étudiants colorent les gels, visualisent les produits, les comparent à une échelle ADN des allèles possibles et attribuent un génotype aux matrices. Les étudiants chercheront ensuite à voir si le génotype de l’un des suspects correspond à ceux trouvés sur la scène de crime, et verront s’ils peuvent identifier l’auteur du crime !

Préparation préliminaire de l'instructeur

Cette section décrit la préparation que l'instructeur doit effectuer avant chaque période de laboratoire. Si des périodes en bloc sont utilisées, préparez d'abord la leçon 1 ; les leçons 2 et 3 peuvent être préparées en même temps si des périodes en bloc sont utilisées. Une estimation du temps de préparation est incluse. Il est fortement recommandé d'utiliser une barrière anti-aérosols ou des embouts à filtre lors de la répartition aliquote de tous les réactifs.

Chronologie

Le laboratoire nécessite un minimum de trois leçons de 50 minutes ou deux leçons de 90 minutes en bloc. Sachez qu'une période de 2,5 heures par cycle est nécessaire en dehors des heures de cours, généralement effectuée au cours de la nuit. Nous recommandons également 2 à 3 jours de révision du contexte et de lecture pour préparer vos étudiants à l'exercice.

Avant le laboratoire

- Lire le manuel (2 h)
- Faire l'inventaire des accessoires nécessaires (~ 30 minutes)
- Effectuer la préparation préliminaire de l'instructeur (30 min -1 h par laboratoire)
- Installer les postes de travail des étudiants (30 min -1 h par laboratoire)

Leçons de laboratoire de 50 minutes

- Leçon 1 : Préparer les réactions de PCR (50 min)
- Réaliser les réactions de PCR (~ 3 heures), généralement pendant la nuit.
- Leçon 2 : Accomplir l'électrophorèse de l'ADN et coloration des gels (50 min)
- Leçon 3 : Faire l'analyse des résultats (50 min)

Leçons en bloc

- Leçon 1 : préparer les réactions PCR
- Réaliser les réactions PCR (~ 3 heures) — généralement pendant la nuit.
- Leçons 2 et 3 : Accomplir l'électrophorèse de l'ADN, coloration des gels, analyse des résultats (90 min)

Questions de sécurité

Il est interdit de manger, de boire, de fumer et d'appliquer des produits cosmétiques dans la zone du laboratoire. Le port de lunettes et de gants de protection est fortement recommandé. Les étudiants doivent se laver les mains avec du savon avant et après cet exercice. Si l'une des solutions entre en contact avec les yeux d'un étudiant, rincez-les à l'eau pendant 15 minutes. Bien que le colorant d'ADN Fast Blast ne soit pas toxique, il est recommandé de porter des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation du colorant afin de ne pas se tacher les mains. Il est recommandé de porter des sarraus de laboratoire ou d'autres vêtements de protection pour éviter de tacher les vêtements.

Mesures du volume

Ce kit nécessite l'utilisation de micropipettes à volume réglable ou fixe pour mesurer de petits volumes (moins de 1 ml). Les instructeurs peuvent souhaiter revoir l'utilisation des micropipettes avant que les étudiants ne les utilisent pendant une expérience.

Suggestion de scénario de laboratoire

Afin d'impliquer plus efficacement les étudiants dans l'activité, l'instructeur peut choisir d'installer une scène de crime dans le laboratoire, avec des stations disposées autour du laboratoire contenant des aliquotes d'ADN extraites de la scène de crime et de divers suspects. Une activité préliminaire au laboratoire peut être réalisée à l'aide d'un certain nombre d'accessoires de la scène de crime afin d'inciter les étudiants à réfléchir aux types d'objets qui contiennent des preuves génétiques. Pour obtenir des suggestions sur la manière d'organiser une scène de crime, ainsi qu'un jeu interactif en ligne sur le laboratoire d'empreintes génétiques, rendez-vous sur le site web http://ppge.ucdavis.edu/software/VDNA.htm.

Leçon 1 : Préparer les réactions PCR

Préparation préliminaire : matériel nécessaire	Quantité
Tubes PCR	40
Adaptateurs pour tubes PCR	40
Tubes de microcentrifugation flip-top de 2,0 ml de couleur mélangée	49
Master Mix (2x)	1 flacon
Crime Scene Investigator Primers (amorces) (bleu ; 50x)	1 flacon
ADN de la scène de crime	1 flacon
ADN du suspect A	1 flacon
ADN du suspect B	1 flacon
ADN du suspect C	1 flacon
ADN du suspect D	1 flacon
Micropipette réglable de 100 à 1 000 µl	1
Embouts de pipette 100-1 000 µl, barrière anti-aérosol.	1 support
Micropipette réglable 2-20 µl ou micropipette à volume fixe 20 µl.	8
Pointes de pipette 2-20 µl, bouchées	8 supports
Béchers avec de la glace ou bains de glace	8
Stylos marqueurs	8

Procédure (durée estimée : 45 min)

Étape 1 : Décongeler le *Master Mix*, les amorces, la matrice de l'ADN de la scène de crime et les matrices d'ADN des suspects à température ambiante. Faire tourner les tubes par impulsions dans une centrifugeuse pour en ramener le contenu au fond. Conserver les tubes sur de la glace lorsqu'ils sont hors du congélateur. Temps requis : 10 minutes.

Étape 2 : Étiquetage des tubes : temps requis : 10 minutes

- Étiqueter 9 tubes de microcentrifugation jaunes de 2,0 ml « MMA ».
- Étiquetez 8 tubes de microcentrifugation de 2,0 ml de couleur violette « SC » (pour scène de crime).
- Étiquetez 8 tubes de microcentrifugation verts de 2,0 ml « A » (pour le suspect A).
- Étiquetez 8 tubes de microcentrifugation bleus de 2,0 ml « B » (pour le suspect B).
- Étiquetez 8 tubes de microcentrifugation orange de 2,0 ml « C » (pour le suspect C).
- Étiquetez 8 tubes de microcentrifugation roses de 2,0 ml « D » (pour le Suspect D)

Étape 3 : Préparation du *Master Mix* et des amorces (MMA).

Remarque : si vous prévoyez d'utiliser le kit pour plus d'une classe, il est recommandé de ne décongeler que la quantité de Master Mix *que vous utiliserez pour une classe. Il n'est pas recommandé de préparer le MMA (*Master Mix *plus*

les amorces) plus d'une heure avant son utilisation, quelle que soit la température de stockage.

Effectuez cette étape au plus tard une heure avant le laboratoire. À l'aide d'une micropipette à volume réglable réglée à 1 000, pipettez **1 000 µl de *Master Mix*** dans l'un des tubes étiquetés MMA. À l'aide d'une micropipette réglable de 2 à 20 µl, réglée sur 20 µl, ou d'une pipette à volume fixe de 20 µl, ajoutez **20 µl** d'**amorces Crime Scene Investigator** dans le même tube. Mélangez bien et faites passer à la centrifugeuse avec impulsions pour amener le contenu au fond des tubes. La solution doit être nettement bleue. Conserver sur la glace. Temps requis : 10 minutes.

Remarque : Veillez à centrifuger par impulsions les amorces avant de les répartir de manière aliquote afin de vous assurer que le contenu n'est pas pris dans le couvercle du tube.

Étape 4 : À l'aide d'une micropipette à volume réglable de 20-200 µl réglée à 120 µl, ajoutez 120 µl de *Master Mix* avec les amorces nouvellement ajoutées (MMA) dans les 8 tubes jaunes restants étiquetés MMA. Placez chaque tube sur la glace.

Étape 5 : À l'aide d'une micropipette à volume réglable réglée à 25 µl, ajoutez 25 µl de matrice d'ADN de scène de crime dans les 8 tubes violets étiquetés « SC ».

Étape 6 : Ajoutez 25 µl de matrice d'ADN du suspect A aux 8 tubes verts étiquetés « A ».

Étape 7 : Ajoutez 25 µl de matrice d'ADN du suspect B aux 8 tubes bleus étiquetés « B ».

Étape 8 : Ajoutez 25 µl de matrice d'ADN du suspect C aux 8 tubes orange étiquetés « C ».

Étape 9 : Ajoutez 25 µl de matrice d'ADN du suspect D aux 8 tubes roses étiquetés « D ».

Étape 10 : Mettez un de chacun des différents tubes d'ADN dans chaque bain de glace.

Étape 11 : Installez les postes de travail des étudiants. Temps requis : 15 minutes.

Installation des postes de travail des étudiants (leçon 1)

Préparation préliminaire : matériel nécessaire	**Quantité**
Bain de glace contenant les échantillons d'ADN et le MMA	6 tubes en tout
MMA (liquide bleu)	1
ADN de la scène de crime (tube violet)	1
ADN du suspect A (tube vert)	1
ADN du suspect B (tube bleu)	1
ADN du suspect C (tube orange)	1
ADN du suspect D (tube rose)	1
Tubes PCR	5
Adaptateurs PCR	5
Stylos marqueurs indélébiles	1
Micropipettes réglables 2-20 µl ou micropipette 20 µl à volume fixe	1
Embouts de pipette anti-aérosol 2-20 µl	1 support

Étape 12 : Programmer le thermocycleur (voir les annexes F et G pour des instructions détaillées sur la programmation des thermocycleurs MyCycle^{MC} ou T100^{MC} de Bio-Rad).

Étape	**Fonction**	**Temp**	**Durée**	**Nombre de cycles**
Dénaturation initiale	Dénaturation	94 °C	2 min	X1
Cyclage thermique	Dénaturation	94 °C	30 secondes	X35
	Renaturation	52 °C	30 secondes	
	Élongation	72 °C	1 min	
Élongation finale	Élongation	72 °C	10 min	X1
Mise en attente	Mise en attente	12 °C	Illimitée	X1

Leçon 2 : Électrophorèse des produits de la PCR

De petits fragments d'ADN de 200 à 1 000 paires de bases sont générés dans cette expérience, et nécessitent un gel d'agarose à pourcentage élevé pour résoudre les expériences de manière adéquate. Nous recommandons des gels d'agarose à 3 % pour une séparation et résolution optimales des fragments.

Préparation préliminaire : matériel nécessaire	**Quantité**
Colorant de chargement Orange G (5x)	1 flacon
Échelle Crime Scene Investigator Allele	1 flacon
Tubes de microcentrifugation de 1,5 ml	16 tubes
20—200 µl micropipette réglable	1
Embouts de pipette 20-200 µl	1 support
Micropipettes réglables 2-20 µl ou micropipettes à volume fixe 20 µl	8
Embouts de pipette 2-20 µl, anti-aérosol	8 supports
Blocs d'alimentation électrique	2-4
Colorant d'ADN Fast Blast	1 flacon
Flacon ou bouteille pour conserver le colorant d'ADN Fast Blast diluée	1
Eau distillée	3.5 L
Plateaux pour la coloration des gels	1-8
Matériel et équipement d'électrophorèse	Voir ci-dessous

Procédure (durée estimée : 1-3 h)

Temps nécessaire pour les étapes 1 à 5 - 20 minutes

Étape 1 : Décongeler le colorant de chargement Orange G et l'échelle d'allèles et centrifuger par impulsions pour faire descendre le contenu au fond des tubes.

Étape 2 : Ajouter 50 ul de colorant de chargement Orange G à l'échelle d'allèles, ce qui résulte en l'échelle d'allèles Orange G. Bien mélanger et centrifuger par impulsion afin de faire descendre le contenu au fond du tube.

Étape 3 : Étiqueter les tubes de microcentrifugation —

- Étiqueter 8 tubes « CC », pour le chargement du colorant.
- Étiquette 8 tubes « échelle d'allèles »

Étape 4 : Ajouter 60 ul de colorant de chargement Orange G dans les 8 tubes marqués « CC ». Conserver à 4 °C pour un maximum de 2 semaines.

Étape 5 : Ajouter 25 ul d'échelle d'allèles Orange G avec le colorant de chargement Orange G ajouté (de l'étape 2 ci-dessus) dans les 8 tubes marqués « échelle d'allèles ». Conserver à 4 °C pour un maximum de 2 semaines.
Remarque : étant donné que l'échelle d'allèles avec Orange G est difficile à distinguer du colorant de chargement Orange G lui-même, les instructeurs peuvent souhaiter conserver l'échelle d'allèles à leur poste de travail et demander aux étudiants d'en prélever une aliquote lorsqu'ils sont prêts à analyser les gels.

.

Étape 6 : Préparer les gels, le tampon de chargement et l'appareil d'électrophorèse. Consulter les instructions ci-dessous pour la préparation des gels d'agarose. Temps requis : 30 minutes à une heure.

Étape 7 : Préparer le colorant d'ADN Fast Blast. Consulter les instructions ci-dessous pour la coloration. Temps requis : 15 minutes.

Étape 8 : Installer les postes de travail des étudiants. Temps requis : 15 minutes.

Installation des postes de travail des étudiants

Matériel nécessaire	Quantité
Gel d'agarose à 3 % (voir ci-dessous)	1
Échantillons PCR du laboratoire précédent	5
Tampon de chargement (voir ci-dessous)	300—350 ml
Colorant de chargement Orange G	1 tube
Échelle de l'allèle Orange G	1 tube
Pipette à volume réglable 2-20 µl ou micropipette à volume fixe 20 µl.	1
Embouts de pipette 2-20 µl, anti-aérosol	1 support
Chambre d'électrophorèse sur gel (peut être partagée par 2 postes de travail)	1
Bloc d'alimentation électrique (peut être partagé par plusieurs postes de travail)	1
Colorant d'ADN Fast Blast (au poste de travail commun)	1
Plateau de coloration du gel	1

Préparation des gels d'agarose et du tampon de chargement TAE

Ces procédures peuvent être effectuées 1 à 2 jours à l'avance par l'instructeur ou réalisées en classe par chacune des équipes d'étudiants.

Remarque : De pratiques gels d'agarose à 3 % préfabriqués (no.161-3017EDU) sont également disponibles auprès de Bio-Rad. Temps requis : 30 minutes à une heure.

Matériel nécessaire	Quantité
Agarose	10.5 g
TAE 50x	60 ml
Cylindres gradués, 3 litres et 500 ml	2
Plaque chauffante à micro-ondes ou magnétique et barre d'agitation	1
Bouteille ou flacon Erlenmeyer, 1 litre	1
Flacon, 50 ml (facultatif)	1
Bain-marie à 60°C (facultatif)	1
Plateaux pour la coulée du gel	4–8
Peignes à gel	8
Ruban adhésif de laboratoire (facultatif)	1 rouleau
Chambre d'électrophorèse horizontale	4–8

Étape 1 : Préparation du tampon d'électrophorèse. Le tampon d'électrophorèse est fourni sous forme de solution concentrée 50x. Le tampon TAE 1x est nécessaire pour

fabriquer le gel d'agarose et est également nécessaire pour chaque chambre d'électrophorèse. Trois litres de tampon TAE 1x seront suffisants pour faire fonctionner 8 chambres d'électrophorèse et couler 8 gels d'agarose. Pour préparer 3 litres de TAE 1x à partir d'un concentré de TAE 50x, ajouter 60 ml de concentré à 2,94 litres d'eau distillée. Temps requis : 10 minutes.

Étape 2 : Faire la solution de gel d'agarose. La concentration de gel recommandée pour cette application en classe est de 3 % d'agarose. Cette concentration d'agarose offre une excellente résolution et minimise le temps de passage nécessaire à la séparation électrophorétique des fragments de PCR. Pour obtenir une solution à 3 %, ajoutez 3 g d'agarose à 100 ml de tampon d'électrophorèse TAE 1x. Pour 8 gels, vous aurez besoin d'environ 350 ml d'agarose fondue (10,5 g de gel d'agarose pour 350 ml de tampon TAE 1x.) Le gel d'agarose doit être fabriqué en utilisant du tampon d'électrophorèse, **pas** de l'eau. Ajouter la poudre d'agarose dans un récipient approprié (par exemple, un flacon Erlenmeyer de 1 000 ml, une bouteille Wheaton, etc.) Ajouter la quantité appropriée de tampons d'électrophorèse TAE 1x et tournoyer afin de mettre la poudre d'agarose en suspension dans le tampon. Si un flacon d'Erlenmeyer est utilisé, renverser un flacon Erlenmeyer de 50 ml dans l'extrémité ouverte du flacon d'Erlenmeyer de 1 000 ml contenant le gel d'agarose. Le petit flacon agit comme chambre de reflux, permettant l'ébullition sans grande perte de volume du tampon. L'agarose peut être fondue pour la coulée du gel sur une plaque chauffante magnétique ou dans un four à micro-ondes. **Attention** : Utiliser des gants de protection, des gants de cuisine, des lunettes de protection et un sarrau de laboratoire pendant la préparation et la coulée des gels d'agarose. L'agarose fondue et bouillante ou les récipients contenant du gel d'agarose chaud peuvent provoquer de graves brûlures. Temps requis : 10 minutes.

Méthode de la plaque chauffante magnétique. Ajouter une barre d'agitation au flacon contenant l'agarose et le tampon. Chauffer le mélange jusqu'à ébullition tout en remuant sur une plaque chauffante magnétique. Les bulles ou la mousse doivent se briser avant de monter jusqu'au col du flacon. Faire bouillir la solution jusqu'à ce que **toutes** les petites particules transparentes d'agarose soient dissoutes. Avec le petit flacon toujours en place, mettre de côté le gel d'agarose pour qu'il refroidisse à 60°C avant de verser les gels (un bain-marie réglé à 60°C est utile pour cette étape.).

Méthode du four à micro-ondes. Placer la solution d'agarose dans le four à micro-ondes. Desserrer le bouchon du flacon s'il est présent. Utiliser un réglage moyen et régler à 3 minutes. Arrêter le four à micro-ondes toutes les 30 secondes et faire tournoyer le flacon pour mettre en suspension toute agarose non dissoute. Cette technique est le moyen le plus rapide et le plus sûr de dissoudre le gel d'agarose. Faire bouillir et agiter la solution jusqu'à ce que toutes les petites particules transparentes d'agarose soient dissoutes. Avec le petit flacon toujours en place, mettre de côté afin de le refroidir à 60°C avant de le verser (un bain-marie réglé à 60°C est utile pour cette étape.)

Coulée du gel d'agarose (temps requis : 10 minutes)

Avec le système Mini-Sub® Cell GT de Bio-Rad, le gel peut être coulé directement dans la boîte de gel en utilisant les portes de coulée avec le plateau de gel. Si les portes de coulée ne sont pas disponibles, utilisez la méthode du ruban adhésif pour couler les gels, comme indiqué ci-dessous. D'autres méthodes sont décrites en détail dans la brochure *Sub-Cell® GT Instruction Manual* de Bio-Rad. Les plateaux de gel de 7 x 7 cm permettent de couler un seul gel. Les plateaux de gel de 7 x 10 cm permettent de couler un gel doublement empilé, c'est-à-dire un gel avec deux ensembles de puits qui peuvent

être chargés avec les échantillons de deux équipes d'étudiants. Ces gels plus longs ne rentrent pas dans les portes de coulée et doivent être fixés au moyen de ruban adhésif.

Étape 1 : Sceller solidement les extrémités du plateau de gel avec des bandes de ruban adhésif de laboratoire standard. Presser fermement le ruban adhésif sur les bords du plateau de gel pour former un joint étanche.

Étape 2 : Mettre le plateau de gel à niveau sur une table de mise à niveau ou un banc de travail à l'aide de la bulle de mise à niveau fournie avec l'instrument.

Étape 3 : Préparer la concentration et la quantité souhaitées de gel d'agarose dans le tampon d'électrophorèse TAE 1x.

Étape 4 : Refroidir le gel d'agarose à au moins 60°C avant de le verser (un bain-marie est utile pour cette étape.)

Étape 5 : Pendant que le gel d'agarose refroidit à 60°C, placer le peigne dans la fente appropriée du plateau de gel. Les peignes pour gel doivent être placés à l'intérieur de 3/4 de pouce de l'extrémité du plateau de coulée du gel (et non au milieu du gel.)

Étape 6 : Verser 30-50 ml de gel d'agarose fondu dans le plateau jusqu'à une profondeur d'environ 0,5 cm.

Étape 7 : Laisser le gel se solidifier à température ambiante pendant 10 à 20 minutes — celui-ci apparaîtra nuageux et translucide lorsqu'il sera prêt à être utilisé.

Étape 8 : Retirer délicatement le peigne du gel solidifié. Retirer le ruban adhésif des bords du plateau de gel.

Étape 9 : Placer le plateau dans la chambre d'électrophorèse d'ADN nivelée de façon que les puits d'échantillons soient à l'extrémité cathodique (noire) de la base. Les échantillons d'ADN migreront vers l'extrémité anodique (rouge) de la base pendant l'électrophorèse.

Étape 10 : Remplir la chambre d'électrophorèse avec du tampon de chargement TAE 1x jusqu'à environ 2 mm au-dessus de la surface du gel.

Étape 11 : Charger le gel tel qu'indiqué dans le manuel de l'étudiant.

Étape 12 : Faire passer 100V dans le gel pendant 30 minutes. Si des gels doublement empilés sont utilisés, veillez à faire passer uniquement 100 V pendant 30 minutes, car l'ADN du gel supérieur pourrait passer dans le gel inférieur. Ne laissez pas le front du colorant orange migrer hors du gel.

Étape 13 : Colorez le gel avec le colorant d'ADN Fast Blast (voir ci-dessous.)

Préparer la solution de coloration d'ADN Fast Blast (temps requis : 10 minutes)

Le colorant d'ADN Fast Blast est fourni sous forme de concentré 500x qui doit être dilué avant son utilisation. La coloration peut être utilisée comme une coloration rapide lorsqu'elle est diluée à 100x afin de permettre la visualisation de l'ADN en 15-20 minutes, ou comme une coloration effectuée au cours de la nuit lorsqu'elle est diluée à 1x. Le colorant d'ADN Fast Blast est une alternative pratique, sûre et non toxique au bromure d'éthidium pour la détection de l'ADN. Fast Blast contient un composé cationique qui appartient à la famille des colorants thiaziniques. Les molécules de colorant chargées positivement sont attirées et se lient aux groupes phosphates chargés négativement de l'ADN. La formule exclusive de ce colorant colore l'ADN en bleu foncé dans les gels d'agarose et fournit des résultats clairs et cohérents. Des instructions détaillées sur

l'utilisation du colorant Fast Blast sont incluses dans le manuel de l'étudiant.

AVERTISSEMENT
Bien que le colorant d'ADN Fast Blast soit non toxique et non cancérigène, il convient de porter des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation de la coloration ou des gels colorés pour éviter que les mains ne soient tachées de bleu. Il faut porter des sarraus de laboratoire ou d'autres vêtements de protection pour éviter de tacher les vêtements. Jeter les solutions de coloration conformément aux protocoles en vigueur dans votre établissement. Utiliser une solution d'eau de Javel à 10 % ou une solution d'alcool à 70 % pour éliminer le Fast Blast de la plupart des surfaces. Vérifier que ces solutions n'endommagent pas la surface avant de les utiliser.

Préparer la solution de coloration Fast Blast DNA 1x pour le protocole de coloration de nuit (recommandé)

Pour préparer la coloration 1x (pour la coloration effectuée pendant la nuit), diluer 1 ml de Fast Blast 500x avec 499 ml d'eau distillée ou désionisée dans un flacon ou une bouteille de taille appropriée et mélanger. Couvrir le flacon et le conserver à température ambiante jusqu'au moment de l'utiliser.

Cette méthode est préférable, car elle permet d'obtenir la coloration la plus robuste de l'ADN tout en produisant une coloration de fond plus faible. Bien que la coloration effectuée au cours de la nuit produise souvent la coloration la plus robuste, de bons résultats peuvent être obtenus en quelques heures (environ de 4 à 6h.).

Préparer la solution de coloration 100x pour le protocole de coloration rapide

Pour préparer la coloration 100x (pour une coloration rapide), diluer 100 ml de Fast Blast 500x avec 400 ml d'eau distillée ou désionisée dans un flacon ou une bouteille de taille appropriée et mélanger. Couvrir le flacon et le conserver à température ambiante jusqu'au moment de l'utiliser.

La décoloration nécessite l'utilisation d'au moins un récipient de grand volume, capable de contenir au moins 500 ml, à chaque poste de travail des étudiants. Le Fast Blast 100x peut être réutilisé au moins sept fois. Veuillez noter que, contrairement aux gels d'agarose à 1 %, les gels d'agarose à 3 % nécessitent une coloration de 5 minutes, avant d'être décolorés dans de l'eau chaude. En raison du pourcentage élevé du gel d'agarose, les gels colorés par cette méthode rapide peuvent prendre plus de temps que les gels d'agarose à 1 % pour être décolorés à un niveau satisfaisant. Plusieurs lavages à l'eau **chaude** du robinet faciliteront la décoloration de ces gels.

Leçon 3 : Séchage des gels et analyse des résultats

Pour conserver une trace permanente de l'expérience, les gels peuvent être séchés entre des feuilles de cellophane puis collés dans des cahiers de laboratoire (voir la méthode ci-dessous et le manuel de l'étudiant pour les protocoles). Pour analyser les gels humides, les gels peuvent être scannés, photocopiés (un fond jaune assure un contraste optimal) ou tracés sur un film acétate.

Remarque : les gels d'agarose à 3 % n'adhèrent pas bien au film qui sert de support au gel d'agarose.

Méthode avec cadre de séchage GelAir™ :

Matériel nécessaire pour le séchage des gels à l'aide de GelAir Gel Drying Système (catalogue no.166-1771EDU)	**Quantité**
Feuilles de cellophane (catalogue no.165-1779EDU)	4
Table d'assemblage GelAir (catalogue no.165-1776EDU)	1
Cadre de séchage GelAir (catalogue no.165-1775EDU)	2
Pinces GelAir (catalogue no.165-1780EDU)	16
Four de séchage GelAir (en option ; catalogue no.165-1777EDU)	1
Eau distillée	500 ml

Procédure

Étape 1 : Préhumecter 2 feuilles de cellophane dans un récipient d'eau pendant 15 à 20 secondes.

Étape 2 : Placer un cadre de séchage en plastique sur la table d'assemblage GelAir. Centrer une feuille de cellophane sur la table d'assemblage.

Étape 3 : Poser délicatement votre gel sur la cellophane, en le positionnant de manière à pouvoir accueillir d'autres gels (jusqu'à 6 au total). S'il y a des bulles entre le gel et la cellophane, les repousser doucement avec votre doigt ganté.

Étape 4 : Inonder les gels d'eau et poser la deuxième feuille de cellophane par-dessus. S'il y a des bulles, les repousser doucement avec un doigt ganté. On ne peut pas éviter les bulles sur les bords des gels d'agarose, car ceux-ci sont très épais, mais éviter les bulles entre la cellophane et la face du gel.

Étape 5 : Placer le cadre métallique carré sur le sandwich de cellophane. Fixer les pinces sur le cadre, deux de chaque côté. Si vous n'utilisez pas un four de séchage GelAir, placer les cadres dans un endroit bien ventilé pendant 12 à 36 heures. Si vous utilisez un four de séchage GelAir, placer jusqu'à quatre cadres de séchage dans le four, allumer l'interrupteur de chauffage et régler le cadran pour 3 heures. Le four de séchage s'éteint automatiquement.

Étape 6 : Lorsque les gels sont complètement secs, ils seront plats. Retirer les pinces et sortir le sandwich gel/cellophane du cadre. Couper l'excédent de cellophane autour de votre gel sec avec des ciseaux. En travaillant avec précaution pour ne pas déchirer le gel séché, décoller délicatement l'excédent de cellophane. La cellophane adsorbe le Fast Blast et peut masquer les résultats.

Alternativement, vous pouvez également choisir d'utiliser la méthode du sandwich en cellophane et du contenant en plastique :

Poste de travail pour les étudiants

Matériel nécessaire pour chaque poste de travail	Quantité
Feuilles de cellophane	2
Contenant en plastique de type Tupperware (ouverture minimale de 6" x 6")	1
Bandes élastiques	2
Eau distillée	500 ml

Procédure

Étape 1 : Mouiller deux morceaux de cellophane dans un grand volume d'eau, environ 500 ml.

Étape 2 : Placer une feuille de cellophane sur un contenant en plastique. Tendre la cellophane de façon qu'elle forme une surface plane sur le dessus du récipient, et utiliser un élastique pour la maintenir en place.

Étape 3 : Placer un gel sur la cellophane. Éliminer toutes les bulles d'air se retrouvant sous ou autour du gel. Éviter d'avoir des bulles sur les bords du gel d'agarose est difficile, car ces derniers sont très épais, mais éviter les bulles entre la cellophane et la face du gel. L'inondation de la surface de la cellophane autour du gel avec de l'eau aidera à éliminer les bulles.

Étape 4 : Placer la deuxième feuille de cellophane mouillée sur le gel, en veillant à ne pas emprisonner de bulles. Fixer la deuxième feuille de cellophane à la boîte avec un deuxième élastique.

Étape 5 : Laisser le gel sécher pendant plusieurs jours dans un endroit bien ventilé.

Étape 6 : Une fois sec, démonter le montage et retirer le gel séché. Il est possible de décoller la cellophane séchée du gel. Veiller cependant à ne pas déchirer le gel.

Conseils et questions fréquemment posées

Leçon 1 : Préparer les réactions PCR

Contamination

Il convient de rappeler aux étudiants de faire attention à la contamination, d'utiliser de nouveaux embouts à chaque étape de ce laboratoire et de garder les tubes bouchés à moins d'y ajouter immédiatement un réactif. Voir l'annexe D pour plus d'informations sur la préparation d'un environnement de travail exempt de contamination par l'ADN.

Master Mix : Qu'est-ce que c'est ?

Le *Master Mix* contient un mélange de nucléotides triphosphates, ou dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP), un tampon et de l'ADN polymérase *Taq*. La solution complète de *Master Mix* est préparée en ajoutant les amorces au *Master Mix* juste avant la période de laboratoire. Ainsi, lorsqu'une aliquote de 20 µl de la matrice d'ADN est ajoutée à une aliquote de 20 µl de solution complète de *Master Mix*, tous les composants nécessaires à une réaction PCR de 40 µl sont présents.

Le *Master Mix* 2X contient 0,05 unité/µl de *Taq* polymérase, 3 mM $MgCl_2$, 1,6 mM de dNTP et 1 µM de chaque amorce. La concentration finale 1x ou concentration d'utilisation de ces composants dans le tube de PCR après la combinaison des amorces, du *Master Mix* et de la matrice sera de 0,025 unité/µl de *Taq* polymérase, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,8 mM de dNTPs et 0,5 µM de chaque amorce.

Remarque : Une fois que le *Master Mix* et les amorces sont mélangés, ils doivent être conservés sur la glace et utilisés dans les 30 minutes à 1 heure. Bien que la température optimale de la *Taq* soit de 72 °C, elle est active dans une large gamme de températures. Le fait de conserver la *Taq* au froid empêche l'enzyme de s'étendre prématurément à partir des amorces, et de former des bandes artéfactuelles de « dimères d'amorces ».

Quelle est la stabilité des réactions PCR nouvellement mises en place ?

Une incubation prolongée du *Master Mix* et de l'ADN avant la PCR diminue l'efficacité de la période d'amplification. Ainsi, si vous souhaitez mettre deux classes par machine PCR ou si vous avez plus de réactions PCR que vous avez de place dans votre thermocycleur, nous vous suggérons d'incuber les réactions sur la glace ne dépassant pas une heure avant le cyclage.

Alternativement, décongelez et utilisez seulement la quantité *Master Mix* nécessaire pour chaque classe.

Qu'est-ce que sont les amorces et pourquoi sont-elles nécessaires ?

Les amorces ou oligonucléotides sont de courtes portions d'ADN, généralement longs de 3 à 30 nucléotides, qui sont complémentaires à la matrice qu'un chercheur souhaite copier par PCR. Les amorces sont nécessaires, car l'ADN polymérase ne peut pas créer une nouvelle chaîne d'ADN par elle-même. Elle a besoin d'une chaîne préexistante de nucléotides (les amorces) afin d'y ajouter des nucléotides. En d'autres termes, ces courtes portions d'ADN « amorcent » la réaction de synthèse de l'ADN. Au cours de la PCR et de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase reconnaît un complexe composé d'une matrice d'ADN simple brin et d'une amorce. De plus amples informations sur ce processus sont décrites à l'annexe A.

Pourquoi les amorces sont-elles bleues ?

Le mélange d'amorces contient un colorant compatible avec la PCR (xylène cyanol) qui permet aux étudiants de visualiser facilement l'ajout du *Master Mix* avec amorces à la

matrice lors de la réaction PCR. Le colorant migre également dans le gel, ce qui permet une démonstration visuelle de l'électrophorèse sur gel.

La PCR et le thermocycleur

L'amplification par PCR a lieu dans un thermocycleur qui effectue des cycles alternés de chauffage et de refroidissement. Ce laboratoire utilise un cycle ayant trois étapes : l'ADN subit une étape de dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, une étape de renaturation à 52 °C pendant 30 secondes, et une étape d'élongation à 72 °C pendant 1 minute (Figure 7). Ce cycle est répété 35 fois au cours de l'amplification par PCR. Pendant la dénaturation, les deux brins de la matrice d'ADN sont séparés par chaleur pour permettre l'accès aux amorces PCR et à l'ADN polymérase *Taq*. Pendant l'étape de dénaturation, les amorces PCR reconnaissent et se lient aux régions complémentaires de la matrice d'ADN. Une fois que les amorces sont liées, l'ADN polymérase *Taq* étend les amorces dans la direction 5' à 3' pour répliquer le segment d'ADN pendant l'étape d'élongation. La réaction PCR prend environ 2,5 heures à compléter.

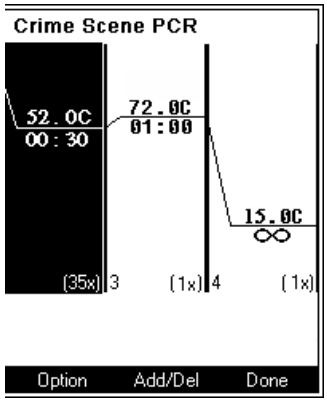


Fig. 7. Conditions de succession de cycles thermiques du kit de base Crime Scene Investigator PCR Basic[MC].

Les tubes PCR sont très petits et doivent être manipulés avec soin. Il est important de capuchonner soigneusement et complètement les tubes avant de les placer dans le thermocycleur. Si les tubes ne sont pas complètement fermés, une évaporation importante peut avoir lieu, ce qui peut concentrer les sels dans la réaction et inhiber la PCR.

Les thermocycleurs de Bio-Rad ont été développés pour fonctionner sans utilisation d'huile. L'ajout d'huile dans les puits du bloc thermique ou dans les tubes à échantillons n'est pas nécessaire. Les puits d'échantillon ont une forme permettant un contact uniforme avec la plupart des tubes PCR standard de 200 µl à paroi mince. **N'utilisez pas de microtubes à paroi mince de 500 µl avec les thermocycleurs de Bio-Rad.** Le couvercle du bloc d'échantillons chauffé maintient constamment une température plus élevée que le bloc d'échantillons pendant un programme de thermocyclage.
Cela empêche la vapeur d'eau de se condenser sous le bouchon du tube d'échantillon, réduisant ainsi l'évaporation de l'échantillon et éliminant le besoin d'enduire les tubes avec de l'huile.

PCR manuelle

Il est possible de réaliser une PCR manuelle sans thermocycleur automatisé. Pour l'amplification PCR manuelle, les réactions doivent être effectuées dans des tubes à bouchon vissé et couronnés d'une goutte d'huile minérale afin de prévenir l'évaporation.

Les tubes sont placés dans un bloc thermique ou un bain-marie réglé à 94 °C pendant 30 secondes, puis transférés manuellement dans un bloc thermique ou un bain-marie réglé à 52 °C pendant 30 secondes, et enfin transférés dans un bloc thermique ou un bain-marie réglé à 72 °C pendant 1 minute. Trente-cinq cycles de PCR manuelle devraient prendre environ 150 minutes. C'est fastidieux, mais ça peut marcher. Bonne chance !

Leçon 2 : Électrophorèse des produits de la PCR

Colorant de chargement Orange G

Avant de pratiquer l'électrophorèse des échantillons amplifiés, les étudiants doivent ajouter 10 µl de colorant de chargement Orange G 5x dans chacun de leurs tubes PCR. L'instructeur doit également avoir ajouté le colorant de chargement Orange G à l'échelle d'allèles avant de l'utiliser. Le colorant de chargement d'ADN Orange G contient du glycérol, qui augmente la densité de l'échantillon et garantie que celui-ci s'enfonce dans le puits du gel d'agarose. Le colorant de chargement d'ADN contient un colorant appelé Orange G qui migre ensemble à la même vitesse qu'un fragment d'ADN de 50 pb vers l'anode. Le colorant Orange G est privilégié pour cette expérience, car il migre dans une zone du gel où il ne couvre ni ne masque aucune bande d'ADN.

Migration des colorants

Il ne faut pas laisser le colorant orange migrer hors du gel sinon certains échantillons pourraient être perdus. Par ailleurs, le colorant utilisé pour colorer les amorces (xylène cyanol) migre à une vitesse différente de celle de l'orange G en raison de leurs différences de charge relative et peut être utilisé comme démonstration visuelle en temps réel de l'électrophorèse.

Puis-je utiliser du bromure d'éthidium pour colorer mes gels ?

Ce laboratoire a été optimisé pour être utilisé avec le colorant d'ADN Fast Blast, une coloration d'ADN sûre et non toxique. Le bromure d'éthidium est la coloration traditionnelle utilisée pour visualiser l'ADN et a une sensibilité plus élevée que Fast Blast, et fonctionnera bien s'il est utilisé pour colorer les gels pour ce laboratoire. Cependant, le bromure d'éthidium est un mutagène connu et un cancérigène présumé, et nécessite l'utilisation de lumière UV pour visualiser l'ADN. L'un des inconvénients de l'utilisation du bromure d'éthidium est que, en raison de sa plus grande sensibilité, les bandes de dimères d'amorces peuvent être plus visibles qu'avec le Fast Blast et peuvent perturber l'interprétation des résultats par des étudiants moins expérimentés. Si le bromure d'éthidium est utilisé comme colorant, les gels doivent contenir 0,05 µg/ml de bromure d'éthidium dans le gel d'agarose. Cette concentration de bromure d'éthidium produit un contraste maximal des bandes amplifiées.

Remarque : la coloration Fast Blast de l'ADN diminue sensiblement la coloration au bromure d'éthidium, donc visualisez avec le bromure d'éthidium avant la coloration Fast Blast.

Leçon 3 : Analyse des résultats

Échelle d'allèles

Une échelle d'allèles simulée est incluse dans le kit et représente tous les allèles possibles au locus analysé. L'échelle d'allèles contient 8 bandes de 1 500, 1 000, 700, 500, 400, 300, 200 et 100 pb de longueur. De haut en bas (voir le gel de la figure 8), ces allèles sont appelés 15, 10, 7, 5, 4, 3, 2 et 1. Si vous avez choisi de faire la coloration au

cours de la nuit avec Fast Blast, vous pouvez constater que les plus petites bandes (100 + 200 pb) deviennent floues. Ceci est le résultat de la diffusion de l'ADN à travers le gel. Pour éviter cet artefact, il est préférable de colorer les gels pendant une période plus courte. Il est possible d'obtenir une coloration adéquate de ces gels d'agarose à pourcentage élevé après seulement quelques heures dans le colorant d'ADN Fast Blast 1x. Ne laissez pas vos gels se colorer au cours d'un week-end — une diffusion importante peut empêcher une interprétation précise des résultats.

Comment identifier les allèles et attribuer des génotypes à un échantillon d'ADN ?

Pour identifier quels sont les allèles représentés dans un échantillon d'ADN particulier, comparez la migration de l'échantillon d'ADN amplifié à l'échelle d'allèles et regardez quelles bandes de la réaction PCR correspondent à la bande correspondante dans l'échantillon. L'identité (nom) de chaque allèle dans l'échelle correspondra à l'identité de chaque allèle dans le suspect testé. Chaque échantillon d'ADN génère deux bandes, représentant les deux allèles présents dans l'échantillon d'ADN original. Procédez ainsi pour chaque bande de chaque échantillon d'ADN afin de générer (identifier) les génotypes dans les échantillons suspects. Chaque génotype doit être une combinaison des deux allèles identifiés.

L'image ci-dessous montre des résultats similaires à ceux que l'on peut observer après l'exécution du kit.

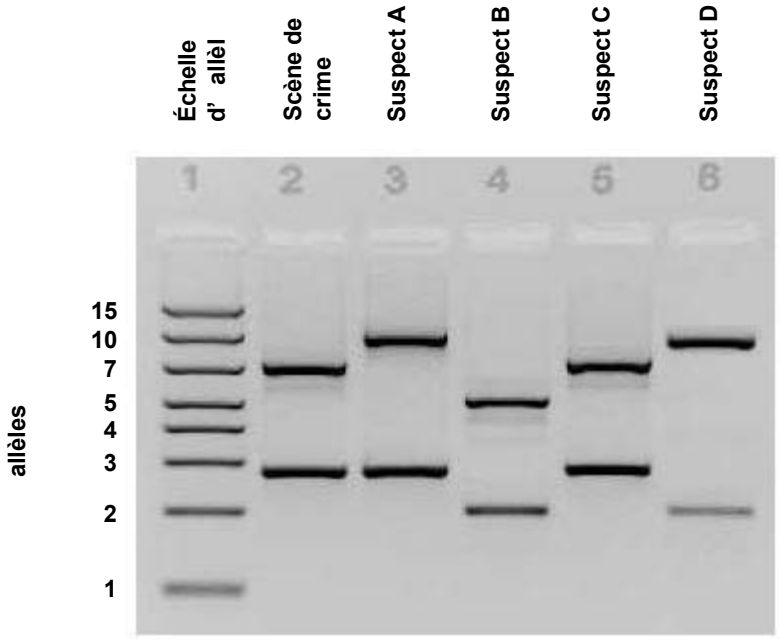


Fig. 8. Résultats représentatifs du kit Crime Scene InvestigatorPCR Basics[MD] après amplification par PCR, électrophorèse sur gel et coloration du gel.

L'échantillon du couloir 2, l'ADN de la scène de crime, possède deux allèles : 7 et 3. Le génotype de l'ADN de la scène de crime est donc 7-3 (ou 3-7). Le génotype de l'échantillon suivant est 10-3, l'échantillon suivant est 5-2, et ainsi de suite. Un résumé des allèles identifiés et des génotypes obtenus figure dans le tableau ci-dessous :

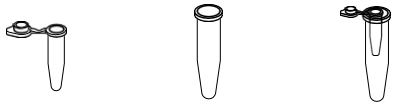
Voie du gel	Échantillon d'ADN	Génotype (allèles identifiés)
1	Échelle d'allèles	S.O.
2	Scène de crime	7—3 (allèle 7 + allèle 3)
3	Suspect A	10-3 (allèle 10 + allèle 3)
4	Suspect B	5-2 (allèle 5 + allèle 2)
5	Suspect C	7—3 (allèle 7 + allèle 3)
6	Suspect D	10—2 (allèle 10 + allèle 2)

L'étape finale de l'expérience consiste à examiner les résultats et à déterminer s'il existe une correspondance entre l'ADN de la scène de crime et l'un des échantillons d'ADN obtenus pour analyse dans le cadre de l'enquête. Les échantillons qui ne correspondent pas à l'ADN de la scène de crime peuvent être exclus de l'enquête ; les échantillons qui correspondent à l'ADN de la scène de crime sont inclus dans le groupe de suspects.

Guide rapide

Leçon 1 : Préparation des réactions PCR

1. Étiqueter 5 tubes PCR SC, A, B, C, et D, et inclure également le nom ou les initiales de votre groupe. Placer chaque tube PCR dans un microtube à centrifuger sans bouchon sur de la glace.

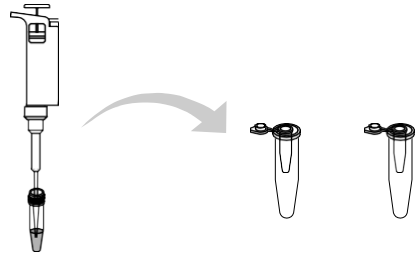


Tubes PCR **Tube sans capuchon**

2. En utilisant le tableau ci-dessous comme guide, transférer 20 µl de la matrice d'ADN appropriée dans le tube correctement étiqueté**.** **Important : utiliser un nouvel embout de pipette à barrière anti-aérosols pour chaque échantillon d'ADN.**

Étiqueter les tubes PCR	Ajouter la matrice d'ADN	Ajouter le *Master Mix avec les amorces*
SC + initiales	20 µl d'ADN de la scène de crime	20 µl de MMA (bleu)
A + initiales	20 µl d'ADN du suspect A	20 µl de MMA (bleu)
B + initiales	20 µl d'ADN du suspect **B**	20 µl de MMA (bleu)
C + initiales	20 µl d'ADN du suspect C	20 µl de MMA (bleu)
D + initiales	20 µl d'ADN du suspect D	20 µl de MMA (bleu)

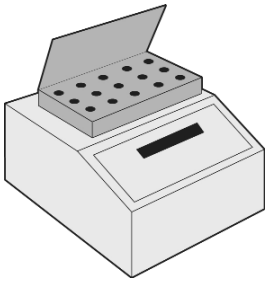
3. Transférer 20 µl du MMA bleu (*Master Mix* avec amorces) dans chacun des 5 tubes PCR contenant la matrice d'ADN. Pipetter de haut en bas pour mélanger. Capuchonner chaque tube après avoir ajouté le MMA bleu. **Important : utiliser un nouvel embout de pipette à barrière anti-aérosol à chaque fois. Boucher immédiatement chaque tube après avoir ajouté le MMA.**



Master Mix **avec amorces**

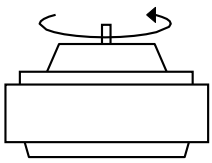
4. Placer vos tubes PCR capuchonnés dans leurs adaptateurs sur glace.

5. Lorsqu'on vous demande de le faire, placez vos tubes dans le cycleur thermique. Votre instructeur programmera le cycleur thermique pour la PCR.



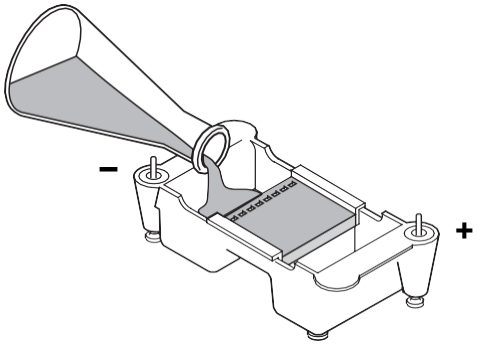
Leçon 2 : Électrophorèse des produits PCR

1. Installer votre équipement d'électrophorèse sur gel comme indiqué.
2. Récupérer vos 5 tubes PCR de la leçon précédente. Placer les tubes PCR dans des tubes sans bouchon et faire tourner dans une centrifugeuse par impulsion équilibrée pendant quelques secondes afin de recueillir tout le liquide au fond du tube.



Centrifugeuse

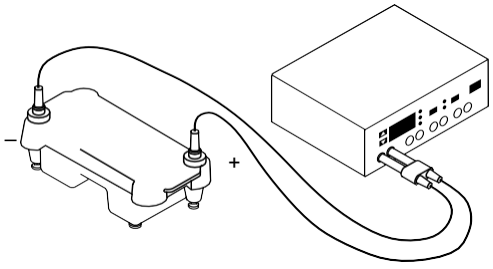
3. Transférer 10 µl de colorant de chargement Orange G (provenant du tube étiqueté « CC ») dans chacun de vos tubes PCR. Pipetter de haut en bas pour mélanger, et centrifuger par impulsion pour recueillir le liquide au fond du tube.
4. Placer un gel d'agarose dans l'appareil d'électrophorèse. Vérifier que les puits du gel d'agarose soient à proximité de l'électrode noire (—) et que la base du gel soit à proximité de l'électrode rouge (+).



5. Remplir la chambre d'électrophorèse avec suffisamment du tampon TAE 1x pour couvrir le gel. Cela nécessitera ~275 ml de tampon TAE 1x.
6. En utilisant une pointe propre pour chaque échantillon, charger 20 µl des échantillons dans 6 puits du gel dans l'ordre suivant :

Voie	Échantillon	Volume de charge
1	Échelle d'allèles	20 µl
2	Scène de crime	20 µl
3	Suspect A	20 µl
4	Suspect B	20 µl
5	Suspect C	20 µl
6	Suspect D	20 µl

7. Fixer le couvercle sur la boîte de gel. Le couvercle se fixera à la base dans une seule orientation : rouge sur rouge et noir sur noir. Connecter les fils électriques au bloc d'alimentation.



8. Allumer le bloc d'alimentation et mettre en marche l’électrophorèse des échantillons à 100 V pendant 30 minutes.

9. Colorer avec le Fast Blast. Se référer au manuel de l’étudiant pour des instructions spécifiques.

Manuel de l'étudiant

Kit de base Crime Scene Investigator PCR Basics[MC]

Vous êtes sur le point de réaliser un profilage d'ADN médico-légal dans des conditions réelles. En tant qu'enquêteur de scène de crime, vous allez utiliser la réaction en chaîne par polymérase (PCR) et l'électrophorèse sur gel d'agarose pour analyser les échantillons d'ADN obtenus sur une scène de crime hypothétique et sur quatre suspects. Votre mission consiste à identifier l'auteur du crime. Dans cette analyse, un génotype est l'ensemble particulier de marqueurs génétiques, ou allèles, dans un échantillon d'ADN. Le génotype de chaque personne est son unique code-barres génétique, unique et personnel. Dans cette expérience, vous allez dévoiler les codes-barres génétiques de plusieurs individus et y rechercher une correspondance.

Comment les preuves ADN peuvent-elles résoudre des crimes ?

Le ***profilage de l'ADN*** désigne l'utilisation de méthodes de génétique moléculaire permettant de déterminer le génotype d'un échantillon d'ADN. Cet outil puissant est couramment utilisé dans le monde entier pour les enquêtes sur les scènes de crime, les personnes disparues, les catastrophes de masse, les violations des droits de la personne et la paternité. Les scènes de crime contiennent souvent des preuves biologiques (telles que du sang, du sperme, des poils, de la salive, des os, des morceaux de peau) à partir desquelles l'ADN peut être extrait. Si le profil d'ADN obtenu à partir des éléments de preuve découverts sur la scène d'un crime correspond au profil d'ADN d'un suspect, cette personne est incluse dans le groupe des personnes potentiellement coupables ; si les deux profils d'ADN ne correspondent pas, l'individu est exclu du groupe des suspects.

Une brève histoire de l'analyse médico-légale

Les sciences médico-légales décrivent la frontière entre la science et la loi. Les sciences médico-légales peuvent aussi bien condamner une personne pour un crime que libérer une personne condamnée à tort. Les premières utilisations de la science médico-légale dans le cadre d'enquêtes criminelles ont consisté à utiliser des photographies pour documenter les scènes de crime. Les preuves par empreintes digitales sont utilisées depuis une centaine d'années. Les premiers éléments de preuve génétiques recueillis dans le cadre d'une enquête concernaient le typage des groupes sanguins. Dans les années 1980, on a utilisé pour la première fois un test médico-légal basé sur l'ADN, l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction, ou RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Bien que l'analyse RFLP ait ses limites, elle a été le cheval de bataille de l'analyse médico-légale pendant près de 20 ans. Ce n'est qu'avec l'arrivée récente de la PCR que cet aspect du système de justice pénale s'est véritablement modernisé. L'analyse moderne de l'ADN en analyse médico-légale permet de distinguer deux personnes sur la planète (à l'exception des vrais jumeaux), vivantes ou mortes.

La PCR est la réplication de l'ADN qui s'emballe dans un tube à essai.

La PCR produit de grandes quantités d'un segment d'ADN spécifique à partir de quantités infimes de matériel de départ (matrice). La matrice peut être n'importe quelle forme d'ADN à double brin. Un chercheur peut prélever des traces d'ADN d'une goutte de sang, d'un follicule pileux ou d'une cellule de la joue et utiliser la PCR pour générer des millions de copies d'un fragment d'ADN souhaité. En théorie, un seul brin de matrice est nécessaire pour générer des millions de nouvelles molécules d'ADN. Avant la PCR, il aurait été impossible de réaliser des études médico-légales ou génétiques avec cette petite quantité d'ADN. La capacité à amplifier une séquence précise d'ADN qu'un chercheur souhaite étudier ou manipuler est le véritable pouvoir de la PCR.

L'une des principales raisons pour lesquelles la PCR est un outil aussi puissant est sa simplicité et sa spécificité. La spécificité de la PCR est sa capacité à cibler et à amplifier un

segment spécifique d'ADN de quelques centaines de paires de bases sur un génome complet de plus de 3 milliards de paires de bases. De plus, tout ce qui est nécessaire pour la PCR est au moins un brin d'une matrice d'ADN, de l'ADN polymérase, deux amorces d'ADN, et les quatre sous-unités nucléotidiques de l'ADN — A, G, T et C — autrement connues sous le nom de désoxynucléotides triphosphates d'adénine, de guanine, de thymine, de cytosine, et un tampon de réaction.

La PCR permet aux experts légistes de révéler des détails personnels sur la constitution génétique d'un individu et de déterminer les différences les plus subtiles dans l'ADN des individus — à partir de la plus petite quantité de matériel biologique. Le fait que des millions de copies exactes d'une séquence d'ADN particulière puissent être produites facilement et rapidement à l'aide de la PCR est à la base des tests ADN médico-légaux modernes.

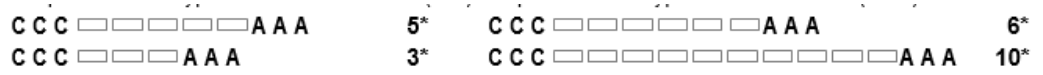
Quels types de séquences d'ADN humain sont utilisés dans les enquêtes sur les scènes de crime ? Le génome humain compte environ 3 milliards de paires de bases, dont plus de 99,5 % ne varient pas d'un être humain à l'autre. Cependant, un petit pourcentage de la séquence d'ADN humain (<0,5 %) diffère, et ce sont ces séquences ***polymorphes*** (« plusieurs formes ») spéciales qui sont utilisées dans les applications médico-légales. D'un accord universel, les séquences d'ADN utilisées pour le profilage médico-légal sont « anonymes », c'est-à-dire qu'elles proviennent de régions de nos chromosomes (également appelées ***loci***) qui ne contrôlent aucun caractère connu et n'ont aucune fonction connue. Les loci sont essentiellement des adresses ou des emplacements génétiques. Un même ***locus*** peut avoir différentes formes ou types ; ces différentes formes sont appelées ***allèles***. Un locus peut être biallélique, c'est-à-dire n'avoir que deux formes différentes, ou polymorphe, tel que décrit ci-dessus.

Les séquences d'ADN utilisées dans les laboratoires de science médico-légale sont des régions non codantes qui contiennent des segments de ***courtes répétitions en tandem*** *(Short Tandem Repeat)* ou ***STR***. Les STR sont des séquences d'ADN très courtes qui se répètent directement tête-à-pied. L'exemple ci-dessous montre un locus (appelé TH01) situé sur le chromosome 11 ; sa séquence d'ADN spécifique contient quatre répétitions de [TCAT].

..C C C T C A T T C A T T C A T T C A T T C A..

Pour le locus STR TH01, il existe de nombreux allèles polymorphes alternatifs qui diffèrent les uns des autres par le nombre de répétitions [TCAT] présentes dans la séquence. Bien que plus de 20 allèles différents de TH01 aient été découverts chez des personnes dans le monde entier, chacun d'entre nous n'en possède toujours que deux, l'un hérité de sa mère et l'autre de son père. Par exemple, comme le montre la figure 9, le suspect A possède un allèle avec 6 répétitions et un allèle avec 3 répétitions, ce qui donne un profil ADN pour le locus TH01 de 6-3.

Le type d'ADN du suspect A pour le locus TH01 est (5-3) Le type d'ADN du suspect B pour le locus TH01 est (6-10)



*Nombre de répétitions de [TCAT].

Fig. 9. Deux échantillons de génotypes TH01.

Comment les allèles STR sont-ils détectés ?

La clé du profilage génétique est l'amplification des copies présentes dans les petites quantités d'ADN probant par ***réaction en chaîne par polymérase (PCR)***. En utilisant des amorces spécifiques aux séquences d'ADN situées de part et d'autre du STR [TCAT], des milliards de copies de chacun des deux allèles TH01 originaux dans le type d'ADN d'une quelconque personne sont synthétisées dans la réaction. Ces copies contiennent le même

nombre de STR que les copies d'ADN originales et peuvent être sur gel d'agarose visualisées par électrophorèse. Par comparaison avec un standard de taille d'ADN, ou échelle d'allèles, qui correspond aux tailles connues des allèles TH01, les tailles exactes des produits PCR des échantillons d'ADN peuvent être déterminées et comparées.

Un diagramme des résultats pour le typage TH01 du suspect A et du suspect B est présenté dans la figure 10. Dans cet exemple figuratif, une PCR a été effectuée sur l'ADN de 2 suspects en utilisant des amorces spécifiques pour le locus TH01. Après une électrophorèse sur gel qui sépare les produits de la PCR en fonction de leur taille, le motif des bandes est comparé à l'échelle d'allèles pour identifier les allèles présents dans les échantillons originaux.

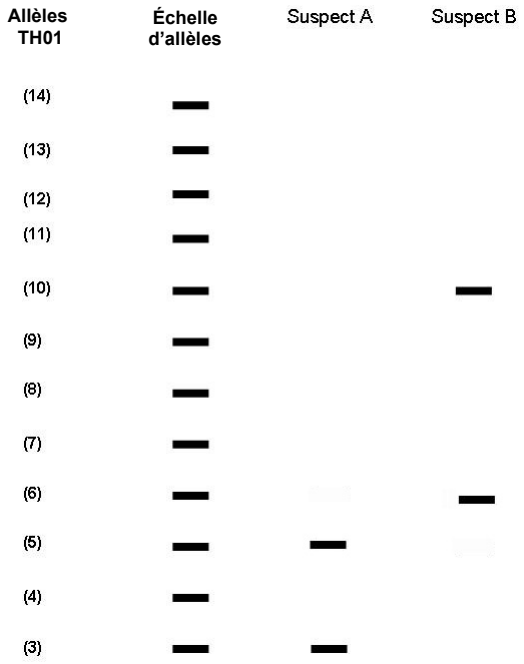


Fig. 10. Illustration des génotypes de l'échantillon TH01 après électrophorèse sur gel.

Imaginez un scénario dans lequel le suspect A et le suspect B sont accusés d'être impliqués dans un triangle amoureux et d'avoir commis le meurtre d'une troisième personne au motel de la Grande Route ; la personne qui a réellement appuyé sur la gâchette est inconnue (pour plus d'informations sur ce scénario, voir la page suivante). En plus des échantillons d'ADN prélevés sur la scène de crime, l'expert médico-légal isolera l'ADN des suspects, des victimes et de toute autre personne présente pour le définir leur génotype en tant que contrôles. En utilisant l'analyse par PCR, les échantillons seront examinés à 13 emplacements génétiques différents, ou loci, en utilisant un logiciel pour interpréter les résultats des produits d'amplification. Dans l'analyse réelle d'une scène de crime, le profilage de l'ADN est effectué sur de nombreux loci afin d'améliorer le ***pouvoir discriminant*** des tests. En termes simples, le pouvoir discriminant est la capacité du profilage à faire la différence génétique entre différents individus. Plus le nombre de loci profilés est important, plus la capacité de discrimination est puissante.

Imaginez le scénario suivant :

Scène : Motel de la Grande Route, route Ténébreuse no. 1,
Ville Inconnue
Endroit : Chambre n° 13.

Le gérant du motel entend des voix masculines fortes, une femme crie, et un coup de feu retentit. Le gérant court à la fenêtre à temps pour voir les lumières qui s'éloignent provenant d'une voiture qui part en vitesse. La porte de la chambre n° 13 reste ouverte. Le gérant court vers la porte ouverte, pour voir un homme allongé face contre terre dans une mare de sang. Il appelle le 911. La police arrive, et commence à examiner la scène de crime. Un homicide apparent, mais sans indices évidents sur l'auteur du crime. Ou bien alors… ?

Un expert médico-légal est appelé pour examiner la scène de crime afin d'y recueillir des éléments de preuve. Même s'il semble que les personnes impliquées n'aient laissé aucune preuve derrière elles, le spécialiste peut utiliser des tests de laboratoire qui permettent de déterminer qui était sur la scène de crime à partir d'une seule goutte de sang ou d'un seul cheveu. S'agit-il d'une histoire de science-fiction ou de la réalité ?

C'est bel et bien la réalité. Des tests sont régulièrement effectués dans des laboratoires de médecine légale aux États-Unis et dans de nombreuses autres régions du monde à partir d'une seule cellule, et parfois à partir d'échantillons vieux de plusieurs décennies. Si cela est possible, c'est grâce à l'ADN. Pour pouvoir effectuer des tests de laboratoire, le spécialiste a besoin de matériel biologique sur lequel travailler. Souvent, il reste très peu de matériel sur la scène de crime, et pas en quantité suffisante pour permettre l'analyse. Pour contourner ce problème, le spécialiste tire parti d'un processus que chacune des cellules de votre corps utilise pour se diviser.

La partie la plus importante de la vie d'une cellule est le moment où elle s'engage à se reproduire et à se diviser. Le résultat fondamental de toute division cellulaire est la création de deux cellules filles identiques à partir d'une cellule d'origine. Pour que cela se produise, la réplication de l'ADN doit avoir un degré élevé de spécificité et de précision, c'est-à-dire qu'elle doit exactement copier l'ADN. Pour ce faire, les enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN utilisent les informations déjà contenues dans les brins existants pour fabriquer de nouvelles copies d'ADN. Cette idée de base — la copie exacte de l'ADN à partir d'une matrice — est à la base d'une nouvelle technologie qui a révolutionné de nombreux domaines de la science, de la médecine et de la justice.

La PCR permet au spécialiste en science médico-légale d'amplifier ou de copier spécifiquement toute région de l'ADN qui l'intéresse. La PCR est la base des tests d'ADN qui sont actuellement utilisés dans presque toutes les analyses médico-légales.

Dans cette expérience, vous effectuerez une analyse PCR sur un seul locus, le locus BXP007, en utilisant des matrices d'ADN obtenus à partir d'une scène de crime simulée et d'une victime. Après la PCR, vous exécuterez un gel d'agarose pour séparer les produits de la PCR, vous visualiserez les produits de la PCR, vous les comparerez à une échelle simulée des allèles possibles pour ce locus, et vous attribuerez un génotype aux matrices. Vous regarderez ensuite si le génotype de l'un des suspects correspond à celui de la scène de crime, et vous verrez si vous pouvez déterminer le coupable !

Examinons les preuves ADN et trouvons qui a appuyé sur la gâchette.

Questions des étudiants — Introduction

1. Quels types de matériaux obtenus sur une scène de crime peuvent contenir de l'ADN ?

2. Pourquoi devez-vous effectuer une PCR sur l'ADN obtenu sur une scène de crime ?

3. Que pouvez-vous voir si vous faites passer un échantillon d'ADN extrait d'une preuve sur un gel avant la PCR ?

4. Qu'est-ce qu'un génotype ?

5. Quelle est la différence entre un allèle et un locus ?

6. Pourquoi les laboratoires de science médico-légale analysent-ils l'ADN non codant et non les gènes ?

Leçon 1 : Amplification par PCR

L'amplification par PCR est la réplication de l'ADN dans une éprouvette. La partie de l'ADN dont on veut faire des copies s'appelle la séquence cible. L'échantillon d'ADN obtenu sur une scène de crime et les échantillons d'ADN du suspect contiennent la séquence cible.

La PCR repose sur trois principes de la biologie moléculaire

1. Dénaturation - fusion de l'ADN double brin en un seul brin.
2. Renaturation — hybridation de brins d'ADN complémentaires via des amorces d'ADN
3. Élongation — synthèse de brins d'ADN via l'ADN polymérase

Dénaturation. Avant que la synthèse d'un nouvel ADN puisse commencer, la matrice d'ADN double brin doit être déroulée et séparée en brins simples. Dans les cellules, cette opération est effectuée par une famille d'enzymes. Dans la PCR, la chaleur est utilisée pour faire fondre — ou **dénaturer** — la matrice d'ADN à double brin.

Renaturation. Avant de pouvoir amplifier une région cible de l'ADN, il faut déterminer de courtes séquences d'ADN en amont (à l'extrémité 5') et en aval (à l'extrémité 3') de la région du locus cible d'intérêt. Ces zones sont ensuite utilisées pour fabriquer de courts morceaux d'ADN, appelés amorces ou oligonucléotides, qui sont complémentaires des régions en amont et en aval de la région du locus cible (figure 11). Les amorces servent de points de départ et d'arrêt pour l'amplification de la région cible de l'ADN à copier.

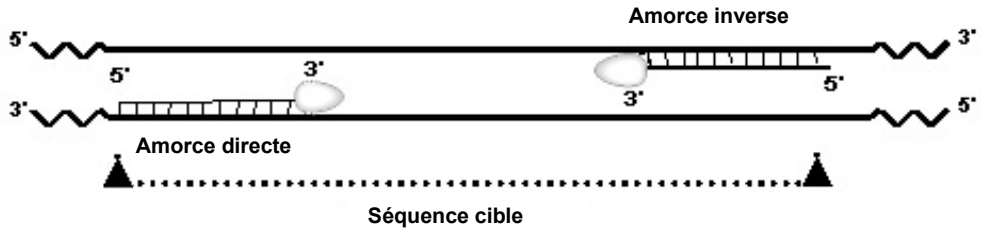


Fig. 11. Amorces annelées à une séquence d'ADN cible pendant la PCR.

Dans la PCR, l'hybridation des brins complémentaires a lieu lorsque les amorces oligonucléotidiques s'hybrident, ou se lient, à leurs paires de bases complémentaires respectives sur la matrice. L'hybridation est le processus qui décrit la liaison de l'amorce oligonucléotidique à l'ADN de la matrice. Les deux brins se renaturent l'un à l'autre, formant un « hybride ». Comme des serre-livres, les deux amorces sont conçues et synthétisées en laboratoire avec une séquence spécifique de nucléotides afin qu'elles se renaturent aux extrémités opposées et sur les brins opposés de la portion cible d'ADN double brin (brin matrice) à amplifier. Par conséquent, la séquence cible est déterminée par l'endroit où les amorces se renaturent.

Élongation. Les amorces sont nécessaires, car l'**ADN polymérase** a besoin d'une chaîne de nucléotides déjà existante à laquelle elle peut se lier et ajouter des nucléotides un par un. Une fois que la polymérase a localisé et s'est lié à la matrice de l'ADN et l'amorce, elle commence à ajouter des nucléotides et à synthétiser de nouvelles copies de la matrice de l'ADN à double brin en ajoutant des nucléotides à l'amorce et en l'allongeant. Les amorces constituent donc un point de départ pour l'ADN polymérase.

Ces trois étapes — dénaturation, renaturation et élongation — constituent ensemble un cycle PCR. Une réaction PCR complète implique de nombreuses répétitions d'un seul cycle PCR. Dans cette expérience, vos réactions PCR vont se répéter 35 fois.

L'enzyme utilisée pour la PCR — l'**ADN polymérase** — doit être thermostable, car la PCR se fait par cycles qui oscillent entre des températures de 52 °C et 94 °C. L'ADN polymérase thermostable qui effectue la polymérisation a été isolée d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus* (*Taq*), qui vit dans les cheminées de vapeur à haute température, comme celles que l'on trouve dans le parc national de Yellowstone.

Deux brins de la matrice sont créés à partir de la matrice d'origine après chaque cycle complet de la réaction de synthèse des brins — dénaturation, renaturation et élongation. On l'appelle la réaction en chaîne de la polymérase parce que la croissance exponentielle du nombre de molécules de la matrice se produit après chaque cycle complet, c'est-à-dire que le nombre de copies d'ADN double à chaque cycle. Par conséquent, après 35 cycles, il y aura 2^{35} fois plus de copies qu'au début. Après 35 cycles, l'ADN d'intérêt a été suffisamment amplifié pour être visualisé à l'aide d'une électrophorèse sur gel et de colorants d'ADN. Cela permet aux chercheurs de déterminer la présence ou l'absence des produits PCR souhaités.

Pour que la PCR soit efficace, plusieurs composants sont nécessaires. En plus de la matrice, des amorces oligonucléotidiques et de l'enzyme (ADN polymérase *Taq*), un tampon de réaction spécial est également nécessaire, appelé ***Master Mix***. Le *Master Mix* contient tous les composants nécessaires à la PCR, y compris les différents éléments constitutifs de l'ADN (nucléotides ou dNTP), un tampon spécial pour maintenir un pH optimal, des sels et du $MgCl_2$. Les sels et les ions de magnésium (également appelés cofacteurs) sont nécessaires pour que l'ADN polymérase *Taq* fonctionne de manière optimale. Dans cette expérience, votre instructeur vous fournira un *Master Mix* qui est préparé avec tous les ingrédients énumérés ci-dessus, mais qui comprend également des amorces colorées mélangées avec la *Taq* polymérase. C'est pourquoi il est important de conserver le *Master Mix* au froid avant de l'utiliser afin que l'enzyme ne commence pas à agir avant que vous n'ayez ajouté vos matrices d'ADN.

Dans cette partie de l'expérience, vous obtiendrez des échantillons d'ADN qui ont été prélevés sur une scène de crime et sur quatre individus soupçonnés d'être impliqués dans le crime. Votre tâche consiste à amplifier la région d'intérêt (le locus BXP007, un allèle polymorphe) à partir des échantillons d'ADN. Une fois terminé, vous analyserez vos produits PCR en utilisant l'électrophorèse sur gel pour déterminer les génotypes des échantillons au locus BXP007 et faire correspondre l'ADN de la scène de crime à l'un des suspects.

Questions pour étudiants : Leçon 1

Questions pour étudiants sur la PCR

1. Qu'est-ce que la PCR vous permet de faire avec l'ADN ?

2. De quels composants avez-vous besoin pour effectuer une PCR ?

3. Que contient le *Master Mix* et pourquoi avez-vous besoin de chaque composant ?

4. Pourquoi devez-vous effectuer une PCR sur les preuves ADN provenant d'une scène de crime ?

5. Quelles sont les étapes d'un cycle PCR, et que se passe-t-il à chaque étape ?

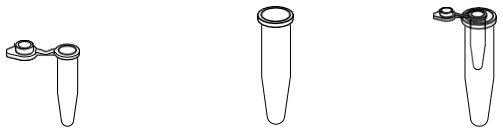
Protocole de l'étudiant — Leçon 1

Postes de travail des étudiants

Matériel	Quantité
Bain de glace contenant des tubes d'ADN (comme ci-dessous)	1
Master Mix avec amorces (MMA, liquide bleu)	1
ADN de la scène de crime et des suspects A — D	5 (1 de chaque tube indiqué)
Tubes PCR	5
Adaptateurs PCR	5
Stylo de marquage	1
Micropipette réglable 2-20 µl ou micropipette 20 µl à volume fixe	1
Embouts de pipette 2-20 µl, anti-aérosol	1 support

1. Vous aurez 6 tubes dans la glace, et 5 tubes PCR de 0,2 ml dans un support à votre poste de travail. Dans la glace, vous devriez avoir :
   1 tube jaune étiqueté MMA contenant un liquide bleu.
   5 tubes étiquetés SC (tube violet), A (tube vert), B (tube bleu), C (tube orange), et D (tube rose).
   Étiqueter les tubes PCR ainsi SC, A, B, C et D et indiquer également le nom ou les initiales de votre groupe.
   Les étiquettes correspondent aux contenus de tubes suivants :

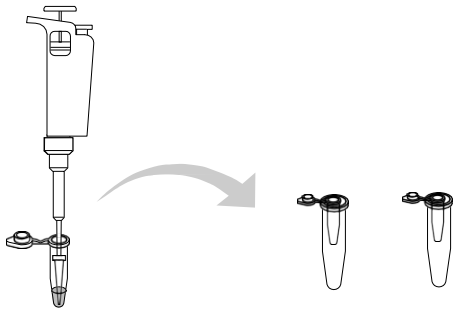
Tubes PCR étiquetés	Modèles d'ADN	Master Mix + amorces (liquide bleu)
SC + initiales	20 µl d'ADN de scène de crime (tube violet)	20 µl de MMA (tube jaune)
A + initiales	20 µl d'ADN du suspect A (tube vert)	20 µl de MMA (tube jaune)
B + initiales	20 µl d'ADN du suspect B (tube bleu)	20 µl de MMA (tube jaune)
C + initiales	20 µl d'ADN du suspect C (tube orange)	20 µl de MMA (tube jaune)
D + initiales	20 µl d'ADN du suspect D (tube rose)	20 µl de MMA (tube jaune)



Tube PCR **Tube sans bouchon**

2. Garder les tubes sur la glace pendant la procédure.
3. À l'aide d'embouts de pipette anti-aérosols et d'une micropipette réglable réglée à 20 µl, ou d'une micropipette à volume fixe de 20 µl, ajouter 20 µl d'ADN dans chaque tube comme indiqué dans le tableau ci-dessus. Par exemple, pour l'ADN de la scène de crime, transférer 20 µl de la matrice dans votre tube PCR étiqueté « SC ». **Important : utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque ADN**.
4. À l'aide d'embouts de pipette anti-aérosols et d'une micropipette réglable réglée à 20 µl, ou d'une micropipette à volume fixe de 20 µl, ajoutez 20 µl du *Master Mix* avec amorces dans chaque tube, comme indiqué dans le tableau ci-dessus. Mélanger le contenu de vos tubes PCR en pipettant doucement de haut en bas. **Important : utiliser une nouvelle pointe de pipette à chaque fois**. Une fois que

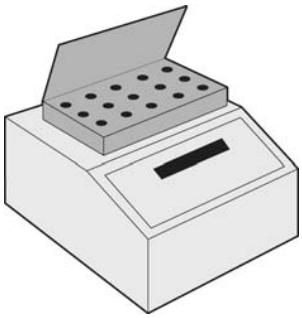
vous avez ajouté la MMA dans un tube, fermez le bouchon. La solution dans vos tubes PCR doit être bleue. Si elle n'est pas bleue, en parler à l'instructeur.



Master Mix avec amorces (MMA)

5. Placer les tubes PCR bouchés dans leurs adaptateurs sur de la glace.

6. Lorsque l'instruction sera donnée, placer les tubes dans le thermocycleur.



Leçon 2 : Électrophorèse des produits de la PCR

Vous avez terminé votre amplification PCR. Cependant, à ce stade, vous ne pouvez pas vraiment dire si vous avez ou non des produits PCR. Pour ce faire, vous devez trier vos produits PCR à l'aide d'une électrophorèse sur gel, puis les visualiser à l'aide d'une coloration de l'ADN. Étant donné que l'ADN est négativement chargé, il peut être séparé à l'aide d'un courant électrique. En fait, le mot électrophorèse signifie « transporter avec du courant ». Dans l'électrophorèse avec du gel d'agarose, l'ADN est placé dans le gel d'agarose solidifié qui forme des tamis contenant des pores dont la taille varie en fonction de la concentration du gel d'agarose. Plus la concentration du gel d'agarose est élevée, plus la taille des pores est petite et plus les grosses molécules mettent du temps à passer au travers de ces dernières. Ceci est particulièrement utile lorsque vous souhaitez comparer des molécules d'ADN de tailles différentes contenues dans le même échantillon. Le mouvement à travers le gel se produit lorsqu'un courant électrique est appliqué à travers le gel. Étant donné que le gel est immergé dans un tampon, le courant traverse le tampon et le gel entraîne l'ADN chargé négativement vers l'anode positive.

En plus de vos produits PCR, vous utiliserez également une échelle d'allèles d'ADN qui représente tous les allèles possibles au locus BXP007. Il s'agit d'une référence, ou d'un marqueur, avec laquelle vous pouvez comparer vos réactions PCR afin de juger de leurs tailles relatives et de leurs identités. Dans la figure représentative suivante d'un gel, les échantillons ou bandes vus dans la première piste ou du premier couloir proviennent tous de l'échelle d'allèles BXP007. Il s'agit de taille standard de tous les allèles connus à ce locus. Il y a 8 allèles possibles, le plus grand en haut du gel et le plus petit en bas. Les tailles sont, de haut en bas, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200 et 100 paires de bases (bps). Les noms des allèles sont indiqués sur la figure. Dans les lignes suivantes, nous voyons des produits PCR provenant d'échantillons d'ADN qui ont été testés afin de retrouver les allèles qu'ils portent à ce locus particulier. Comme l'indique la figure 12, l'échantillon de la voie voisine de l'échelle d'allèles, l'échantillon de la scène de crime (SC), a un génotype qui correspond aux allèles 5 et 2 sur l'échelle d'allèles. Nous dirions que le génotype de cet échantillon est 5-2. Pour l'échantillon suivant, le génotype serait 7-4, et ainsi de suite.

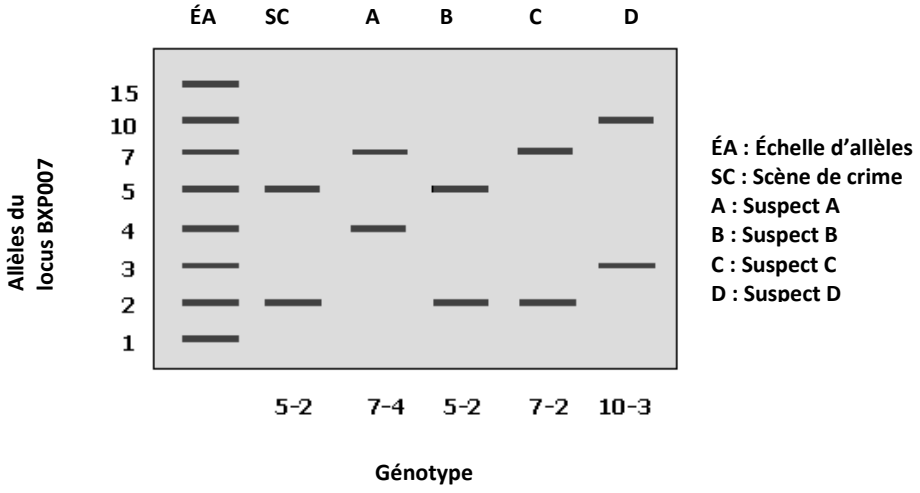


Fig. 12. **Figure représentative des résultats potentiels du kit Crime Scene Investigator PCR Basics^{MC} au locus BXP007**.

Questions des étudiants — Leçon 2

1. Pourquoi l’ADN se déplace-t-il à travers un gel d’agarose ?

2. Quelles sont les deux techniques utilisées pour créer un profil ADN dans cette expérience ? Quelle fonction remplit chacune d’entre elles ?

3. Qu’est-ce qu’une échelle d’allèles ? Quelle est sa fonction dans le profilage de l’ADN ?

4. Qu’est-ce qui est nécessaire pour visualiser l’ADN après l’électrophorèse ?

Protocole de l’étudiant — Leçon 2

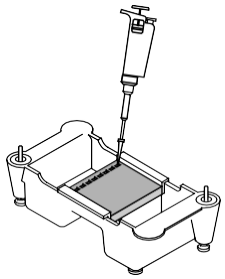
Poste de travail pour les étudiants

Matériel	Quantité
Gel d’agarose à 3 %.	1
Échantillons PCR du laboratoire précédent	5
Tampon de chargement TAE X1	300—350 ml
Colorant de chargement Orange G (CC ; liquide orange)	60 µl
Échelle d’allèles Crime Scene Investigator (liquide orange)	25 µl
Note : Ne confondez pas ces deux tubes de liquide orange. Ils contiennent des composés différents.	
Pipette à volume réglable 2-20 µl ou micropipette à volume fixe 20 µl.	1
Embouts de pipette 1-20 µl, anti-aérosol	1 support
Chambre d’électrophorèse sur gel (peut être partagée par 2 postes de travail)	1
Alimentation électrique (peut être partagée par plusieurs postes de travail)	1
Colorant d’ADN Fast Blast (au poste de travail commun)	1
Plateau de coloration du gel	1

Protocole

1. Installer votre appareil d’électrophorèse sur gel comme indiqué.
2. Récupérer vos 5 réactions PCR de la leçon précédente, les placer dans un adaptateur de tube sans bouchon et dans un support.
3. À l’aide d’embouts de pipette anti-aérosols et d’une micropipette réglable réglée à 10 µl, ou d’une micropipette à volume fixe de 10 µl, ajouter 10 µl de colorant de chargement Orange G (provenant du tube étiqueté « CC ») dans chaque tube de réaction PCR et mélangez bien. **Important : utilisez une nouvelle pointe à chaque fois**.
4. En utilisant le tableau ci-dessous comme guide, introduire 20 µl de l’échelle d’allèles et 20 µl de chaque échantillon dans votre gel dans l’ordre indiqué ci-dessous.

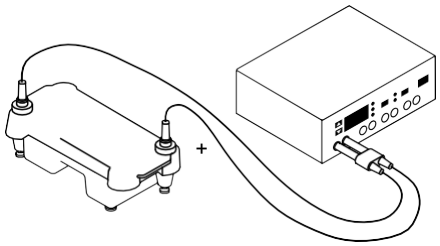
Lane	Échantillon	Volume de chargement
1	Échelle d’allèles	20 µl
2	Scène de crime	20 µl
3	Suspect A	20 µl
4	Suspect B	20 µl
5	Suspect C	20 µl
6	Suspect D	20 µl



5. Faire passer un courant de 100 V dans le gel pendant 30 minutes. Ne pas laisser la bordure du colorant orange migrer hors du gel.

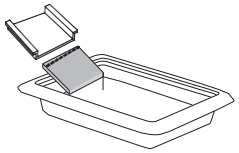
– –

6. Colorer avec le colorant d'ADN Fast Blast selon les directives de votre instructeur et décrit ci-dessous.



Coloration des gels d'agarose

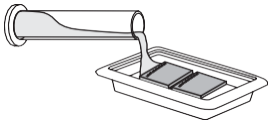
1. Lorsque l'électrophorèse est terminée, éteindre l'appareil et retirer le couvercle de la boîte à gel. Retirer délicatement le plateau de gel et le gel de la boîte à gel. Attention, **le gel est très glissant**. Faire glisser le gel du plateau de gel avec votre pouce et le faire passer avec précaution dans un récipient pour la coloration.



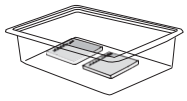
2. Il existe deux protocoles pour la coloration de votre gel. Votre instructeur vous indiquera celui à utiliser.

Protocole 1 : Coloration pendant la nuit (recommandé)

a. Ajouter 120 ml de colorant d'ADN Fast Blast 1x à votre plateau de coloration (2 gels par plateau).

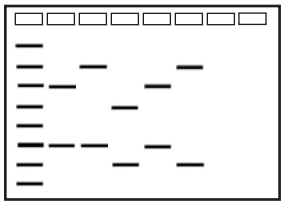


b. Laisser les gels se colorer de 4 à 24 heures en les agitant légèrement pour obtenir les meilleurs résultats. Aucune décoloration n'est nécessaire.



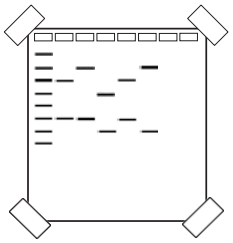
c. Le lendemain, verser le colorant dans un bécher à déchets.

d. Placer le gel sur un fond clair et noter le résultat obtenu. Avec un marqueur permanent, tracez les puits et les motifs des bandes sur une feuille de plastique transparent ou une feuille d'acétate.



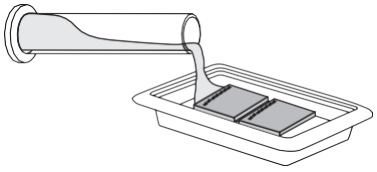
e. Couper les bandes vides du gel avec un couteau ou une lame de rasoir.

f. Pour obtenir un enregistrement permanent, faire sécher le gel à l'air libre entre des feuilles de cellophane (votre instructeur vous montrera comment faire). Fixer au moyen de ruban adhésif le gel séché dans votre cahier de laboratoire. Éviter d'exposer le gel coloré à la lumière directe, car cela ferait pâlir les bandes.



Protocole 2 : Coloration rapide (nécessite environ 20 minutes) —Cette méthode vous permettra de voir les bandes rapidement (dans les 15 minutes), mais peut nécessiter une décoloration importante pour obtenir une intensité optimale du rapport bande/fond. **Remarque** : il est important d'utiliser de l'eau chaude du robinet pour les étapes de décoloration de ce protocole.

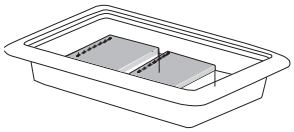
a. Plonger votre gel dans le Fast Blast 100x.



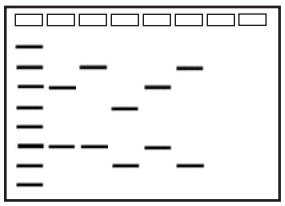
b. Colorer le gel pendant 5 minutes en l'agitant doucement. Conserver le colorant utilisé pour une utilisation ultérieure. La coloration peut être réutilisée au moins 7 fois.

c. Transférer les gels dans un grand récipient de lavage et les rincer à l'eau **chaude** (40-55°) du robinet pendant environ 10 secondes.

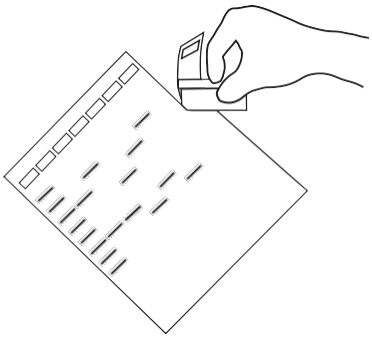
d. Décolorer en lavant trois fois dans l'eau **chaude** du robinet pendant 5 minutes chacune, en agitant légèrement pour obtenir de meilleurs résultats. Vous devriez être en mesure de voir les bandes après 10 minutes, la lumière apparaissant à travers le fond du plateau de coloration. Si nécessaire, continuez à décolorer à l'eau chaude jusqu'à ce que le contraste souhaité soit atteint.



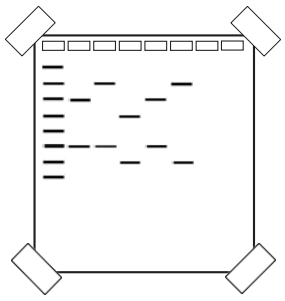
e. Placer le gel sur un fond clair et noter le résultat obtenu. Avec un marqueur permanent, tracer les puits et les motifs des bandes sur une feuille de plastique transparent ou une feuille d'acétate.



f. Couper les bandes vides du gel avec un couteau ou une lame de rasoir.



g. Pour obtenir un enregistrement permanent, faire sécher le gel à l'air libre sur des feuilles de cellophane (votre instructeur vous montrera comment faire). Coller le gel séché sur votre cahier de laboratoire. Éviter d'exposer le gel coloré à la lumière directe, car cela ferait pâlir les bandes.



Leçon 3 : Séchage des gels et analyse des résultats

Afin de conserver une trace permanente de l'expérience, les gels peuvent être séchés entre des feuilles de cellophane, puis insérés dans des cahiers de laboratoire. Pour analyser les gels humides, on peut les scanner, les photocopier (sur fond jaune afin d'améliorer le contraste) ou les tracer sur un film acétate. Il existe 2 méthodes pour sécher les gels. Veuillez noter que le film du support de gel d'agarose ne fonctionne pas de manière efficace pour les gels à 3 %.

Méthode avec un cadre de séchage GelAir

Matériel nécessaire pour le séchage des gels à l'aide du sécheur GelAir	Quantité
Feuilles de cellophane	4
Table d'assemblage GelAir	1
Cadre de séchage GelAir	2
Pince GelAir	16
Sécheur GelAir (en option)	1
Eau distillée	500 ml

Procédure

Étape 1 : Mouiller au préalable deux feuilles de cellophane dans un contenant d'eau pendant 15 à 20 secondes.

Étape 2 : Placer un cadre de séchage en plastique sur la table d'assemblage GelAir. Centrer une feuille de cellophane sur la table de montage.

Étape 3 : Poser délicatement votre gel sur la cellophane, en le positionnant de manière à pouvoir accueillir d'autres gels (jusqu'à 6 au total). S'il y a des bulles entre le gel et la cellophane, les pousser doucement avec votre doigt ganté.

Étape 4 : Inonder les gels d'eau et poser la deuxième feuille de cellophane par-dessus. Si vous séchez des gels de polyacrylamide, essayer de ne pas emprisonner de bulles dans le sandwich, car les bulles provoqueront des fissures dans le gel pendant le séchage. S'il y a des bulles, les pousser doucement avec un doigt ganté. On ne peut éviter les bulles sur les bords des gels d'agarose, car ceux-ci sont très épais, mais éviter les bulles entre la cellophane et la face du gel.

Étape 5 : Placer le cadre métallique carré sur le sandwich de cellophane. Fixer les huit pinces sur le cadre, deux de chaque côté. Si vous n'avez pas de séchoir GelAir, placer les cadres en position verticale dans un endroit bien ventilé de 12 à 36 heures. Si un séchoir GelAir est disponible, placer jusqu'à quatre cadres de séchage dans le four, allumer l'interrupteur de chauffage et régler le cadran sur 3 heures. Le séchoir s'éteint automatiquement.

Étape 6 : Lorsque les gels sont complètement secs, ils seront plats. Retirer les pinces et sorter le sandwich gel/cellophane du cadre. Couper l'excédent de cellophane autour de votre gel séché avec des ciseaux.

Méthode du sandwich en cellophane et du récipient en plastique

Matériel nécessaire pour le séchage des gels utilisant des récipients en plastique

Matériel nécessaire pour le séchage des gels utilisant des récipients en plastique	Quantité par poste de travail étudiant
Feuilles de cellophane	2
Contenant en plastique de type Tupperware (Ouverture minimale de 6" x 6")	1
Bandes élastiques	2
Eau distillée	500 ml

Procédure

Étape 1 : Mouiller au préalable deux feuilles de cellophane dans un grand volume d'eau, environ 500 ml.

Étape 2 : Placer une feuille de cellophane sur un récipient en plastique. Tendre la cellophane de façon qu'elle forme une surface plane sur le dessus du récipient et utiliser un élastique pour la maintenir en place.

Étape 3 : Placer un gel sur la cellophane. Éliminer toutes les bulles d'air qui se trouvent sous ou autour du gel. L'inondation de la surface de la cellophane autour du gel avec de l'eau aidera à éliminer les bulles.

Étape 4 : Placer la deuxième feuille de cellophane mouillée sur le gel, en veillant à ne pas emprisonner de bulles. Fixer la deuxième feuille de cellophane à la boîte avec un deuxième élastique.

Étape 5 : Laisser le gel sécher pendant plusieurs jours dans un endroit bien ventilé.

Analyse des résultats

Bien qu'il soit possible d'analyser les gels séchés, sachez que les gels d'agarose à pourcentage élevé peuvent être difficiles à sécher à plat. En outre, l'exposition du gel coloré à la lumière entraînera la décoloration à s'estomper. Il est donc recommandé d'effectuer l'analyse et la détermination des génotypes sur des gels humides.

Une fois les gels colorés avec la coloration d'ADN Fast Blast, il est temps de déterminer les allèles présents dans chaque échantillon, et d'attribuer un profil ADN (génotype). Pour chaque réaction PCR, comparez les bandes obtenues dans chaque couloir à l'échelle d'allèles exécutée dans le couloir n° 1. Voir page 47 pour des résultats représentatifs, les tailles des bandes de l'échelle et l'étiquetage des allèles dans l'échelle. Attribuer à chaque bande de chaque réaction PCR une attribution d'allèle en fonction de la bande de taille correspondante dans l'échelle d'allèles. Les bandes dans l'échelle d'allèles sont numérotées de haut en bas en commençant par l'allèle le plus grand, n° 15, en haut. Les tailles des bandes sont indiquées dans le tableau ci-dessous. Dans l'exemple présenté à la figure 8 (page 32), l'attribution d'allèle pour l'échantillon dans la voie n° 2 est 3-7, puisqu'il y a un allèle 7 et un allèle 3 dans cette voie. Inscrivez le génotype de chacun de vos échantillons dans le tableau ci-dessous.

Voie	Échantillon	Nombre de bandes ?	Quels sont les allèles BXP007 présents ?
1	Échelle d'allèles BXP007		
2	ADN de la scène de crime		
3	ADN du suspect A		
4	ADN du suspect B		
5	ADN du suspect C		
6	ADN du suspect D		

1. Vos échantillons ont-ils tous généré des produits PCR ? Si non, donnez des raisons pour expliquer pourquoi.

2. Quel est le génotype de chacun de vos échantillons ?

3. Le génotype de l'échantillon d'ADN prélevé sur la scène de crime correspond-il à l'un des suspects ? Si oui, lequel ?

4. Que vous apprend ce résultat sur les suspects inclus dans l'enquête ? Exclus ? Expliquez votre réponse.

5. Imaginez que chaque allèle du locus BXP007 se trouve exactement à la même fréquence dans une population. Comme il y a 8 allèles possibles au locus BXP007, quelle est la fréquence de n'importe quel allèle de ce locus dans cette population ?

6. Étant donné la loi de Mendel sur l'assortiment indépendant et l'hypothèse ci-dessus, quelle est la fréquence du génotype de l'échantillon de la scène de crime ?

7. Si vous aviez un groupe de 13 suspects, et qu'un seul suspect avait un génotype correspondant au locus BXP007 trouvé sur la scène de crime, seriez-vous satisfait d'avoir identifié l'auteur du crime en vous basant uniquement sur la fréquence du génotype calculée pour le locus BXP007 ? Pourquoi ou pourquoi pas ? Expliquez votre réponse.

Annexe A : L'ADN et la PCR en détail

L'ADN : un aperçu détaillé

Une molécule d'ADN est un long polymère constitué de quatre composants différents appelés **nucléotides**. Ce sont les différentes combinaisons de quatre bases ou nucléotides qui créent un code ou une séquence d'ADN unique (également appelé génotype, gène et allèle).

Les nucléotides sont constitués de trois composants différents :

- **une base azotée,**
- **un sucre désoxyribose**
- **un groupe phosphate**

Chaque nucléotide contient le même sucre, le ribose et le même groupe phosphate. Ce qui rend chaque nucléotide unique est sa base azotée. Il existe quatre bases azotées :

Adénine (A)
Thymine (T)
Guanine (G)
Cytosine (C)

Une chaîne de nucléotides d'ADN est créée par la connexion du groupe phosphate au sucre ribose du nucléotide suivant. Cette connexion crée le « squelette » de la molécule d'ADN. Pour désigner les différentes extrémités de cette chaîne à simple brin, on utilise la terminologie de la biochimie, dans laquelle les carbones de n'importe quel groupe de sucre sont numérotés. Le sucre d'un nucléotide contient 5 atomes de carbone. Le groupe phosphate (PO_4) d'un nucléotide donné est relié au carbone 5′ du sucre. Un groupe hydroxyle (OH) est fixé au carbone 3′ du sucre, et ce groupe OH 3′ est lié au groupe phosphate du nucléotide suivant dans la chaîne.

Ainsi, l'extrémité d'une molécule d'ADN à simple brin qui possède un groupe phosphate libre (c'est-à-dire non attaché à un autre nucléotide) est appelée l'extrémité 5′, et l'extrémité de la molécule d'ADN avec un groupe hydroxyle libre (sans nucléotide ultérieur attaché) est appelée l'extrémité 3′ (voir figures 13 et 14).

La norme veut qu'une molécule d'ADN à simple brin s'écrive en plaçant l'extrémité 5′ à gauche et l'extrémité 3′ à droite. Par conséquent, la séquence d'une chaîne d'ADN à simple brin est représentée de gauche à droite, en commençant à gauche par le nucléotide 5' et en allant vers la droite jusqu'à ce que le nucléotide 3' soit le dernier. La plupart des séquences d'ADN sont lues de 5′ à 3′.

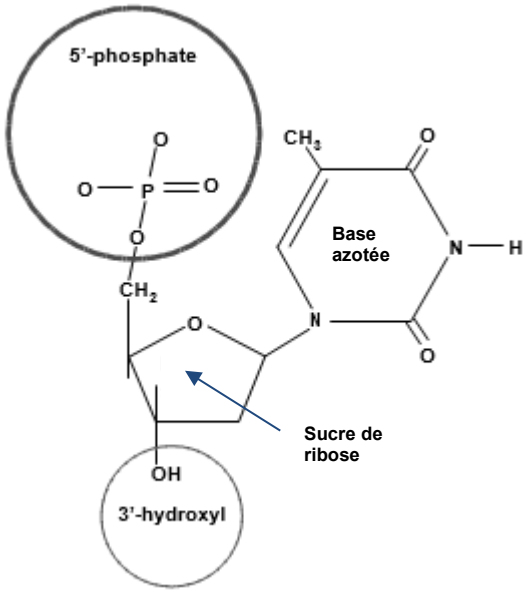


Fig. 13. Structure d'un nucléotide de l'acide désoxyribonucléique.

Les longues molécules ou chaînes d'ADN qui composent les chromosomes ne sont pas des molécules à brin unique. À partir de matrices d'ADN obtenus par cristallographie aux rayons X par Rosalind Franklin et d'une construction imaginative d'un modèle moléculaire, Watson et Crick ont déduit que l'ADN est en fait une molécule **à double brin**, les deux brins simples de l'ADN étant maintenus ensemble par des **liaisons hydrogène** entre les bases azotées (A, T, G et C). Cette molécule à double brin est souvent appelée un duplex (figures 14 et 15). Les molécules d'ADN double brin présentent plusieurs propriétés importantes :

- L'ADN chromosomique (également appelé génomique) est à double brin.
- La structure globale est celle d'une hélice avec deux brins entrelacés.
- La structure peut être considérée comme une échelle torsadée.
- Les squelettes de phosphate-désoxyribose sont les côtés de l'échelle.
- Les bases azotées (A, T, G et C) liées par l'hydrogène les unes aux autres constituent les échelons
- Seules les bases azotées A & T et C & G peuvent former des liaisons hydrogène entre elles. Lorsque A se lie à T ou que C se lie à G, on parle d'appariement de bases. Ni C et T ni A et G ne forment de liaisons hydrogène.
- Les deux brins sont antiparallèles, c'est-à-dire que les brins sont orientés dans des directions opposées. Cela signifie que l'échelle va de 5′ à 3′ dans une direction pour un brin et de 5′ à 3′ dans la direction opposée pour l'autre brin.

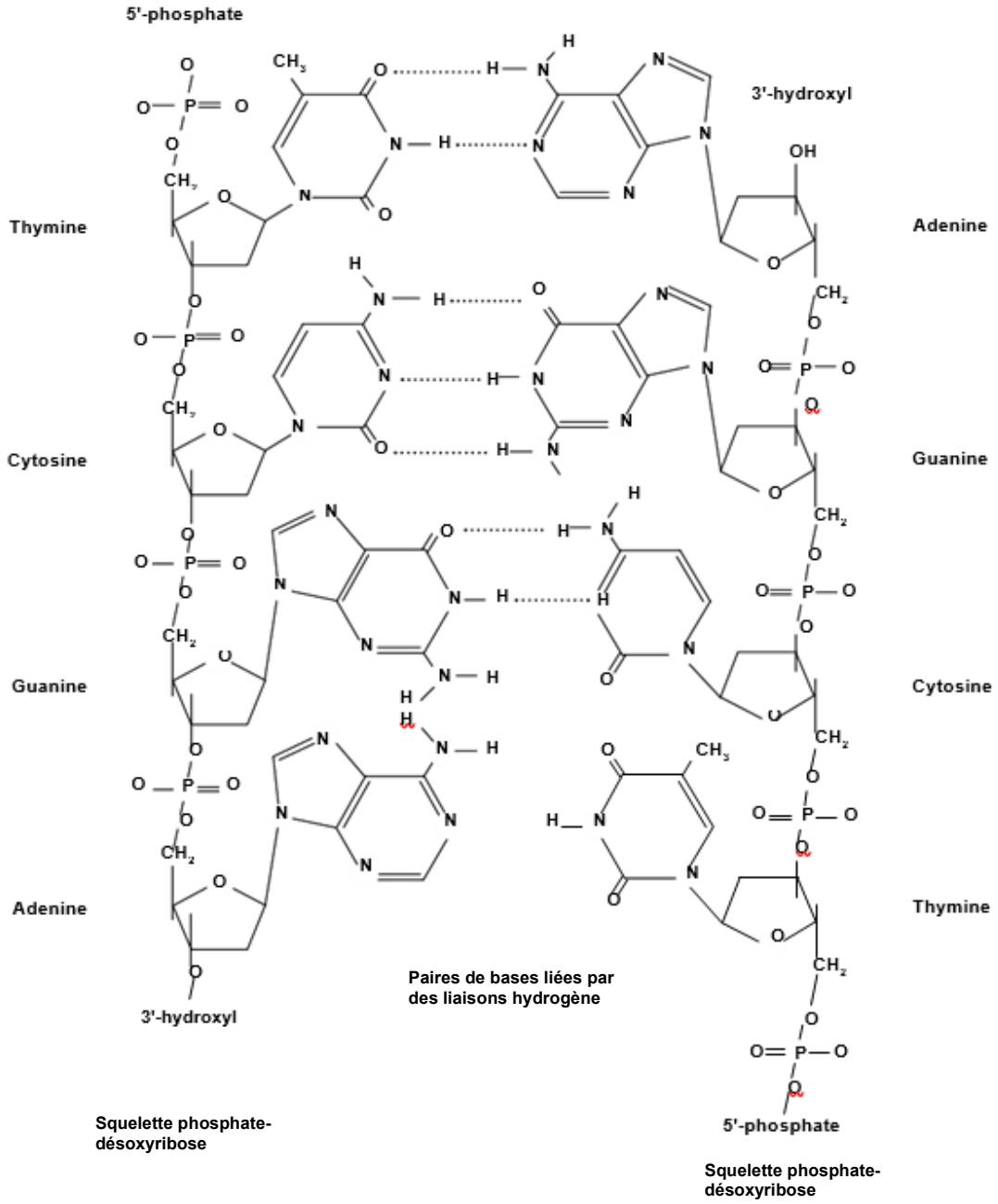


Fig. 14. Structure moléculaire d'une partie d'une molécule d'ADN à double brin.

Conclusions sur la structure de l'ADN

- Étant donné que A ne se lie qu'à T et que G ne se lie qu'à C, les deux brins auront exactement la séquence opposée, ou complémentaire, dans des directions opposées (un brin 5′ à 3′ dans une direction, l'autre 5′ à 3′ dans l'autre direction).
- Ces deux brins complémentaires se renouent ou s'hybrident l'un à l'autre par des liaisons hydrogène entre les bases.
- Un nouveau brin d'ADN peut être synthétisé en utilisant son brin complémentaire comme matrice pour la nouvelle synthèse.
- Chaque brin porte en lui le potentiel de livrer et de coder l'information.

La longueur de toute molécule d'ADN à double brin est exprimée en termes de paires de bases (pb). Si un brin d'ADN contient plus de mille paires de bases, l'unité de mesure est la kilobase (1 kb = 1 000 pb). Si un brin contient plus d'un million de paires de bases, l'unité de mesure est la mégabase (1 Mb = 1 000 kb).

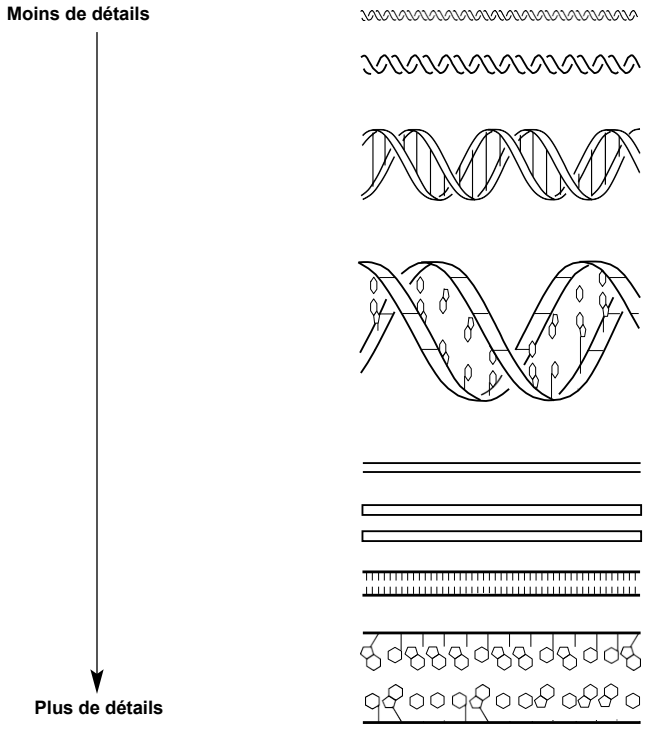


Fig. 15. ADN (acide désoxyribonucléique) — Une longue molécule en forme de chaîne qui renferme l'information génétique. L'ADN peut être représenté graphiquement de différentes manières, en fonction du niveau de détail souhaité.

Réplication de l'ADN — Synthèse des brins

Les nouveaux brins sont synthétisés par des enzymes appelées **ADN polymérases**. Les nouveaux brins sont toujours synthétisés dans le sens 5′ vers 3′. Pour qu'un nouveau brin d'ADN soit synthétisé, un simple autre brin est nécessaire. Le brin unique d'ADN qui sera utilisé pour synthétiser son brin complémentaire est appelé le **brin matrice**.

Pour que l'ADN polymérase puisse commencer à synthétiser un nouveau brin complémentaire, une courte portion de nucléotides (d'environ 20 paires de bases)

appelée amorce (parfois aussi appelée oligonucléotide pour « quelques nucléotides ») doit être présente pour que la polymérase puisse démarrer la réaction. Cette amorce est complémentaire à la matrice où la synthèse va commencer. L'amorce doit avoir un groupe hydroxyle (OH) libre en 3′ pour que l'ADN polymérase puisse fixer le groupe phosphate en 5′ du nucléotide suivant.

L'ADN polymérase saisit les nucléotides libres (simples) du milieu environnant et joint le phosphate 5′ du nouveau nucléotide au groupe hydroxyle 3′ (OH) du nouveau brin complémentaire. Ce processus de jonction 5' à 3' crée le squelette du nouveau brin d'ADN.

Le nouveau brin synthétisé conserve sa complémentarité avec le brin matrice, car l'ADN polymérase ne joint deux nucléotides pendant la synthèse du nouveau brin que si le nouveau nucléotide a son complément sur le brin matrice. Par exemple, l'ADN polymérase n'associera un G à l'extrémité 3′ du brin nouvellement synthétisé que si le C correspondant se trouve sur le brin matrice. La guanine ne sera pas jointe au nouveau brin si A, T ou G est le nucléotide opposé sur le brin matrice.

L'ADN polymérase et la synthèse des brins permettent la réplication de l'ADN pendant la mitose. Les deux nouveaux brins d'ADN sont synthétisés simultanément à partir des deux brins d'origine de l'ADN matrice pendant la réplication mitotique de l'ADN.

L'ADN, l'ARN et les protéines sont étroitement liés les uns aux autres. L'ADN dirige l'expression de l'ARN, qui dirige l'expression des protéines, lesquelles assurent la plupart des fonctions biologiques qui composent un organisme. Vous pouvez donc commencer à comprendre pourquoi les chercheurs, pour tenter de comprendre les mécanismes qui sous-tendent les différents processus de la vie, doivent étudier les nucléotides pour obtenir des réponses complètes sur le flux d'informations véhiculé par le code génétique. Au cours des 20 dernières années, de nombreuses avancées dans le domaine des techniques sur les acides nucléiques ont finalement donné aux chercheurs les moyens d'étudier les rôles des acides nucléiques dans les processus de la vie.

Les découvertes individuelles de nombreux scientifiques ont apporté des éléments qui ont permis de commencer la résolution de l'une des plus mystérieuses énigmes de la vie — la compréhension du code héréditaire. En 1985, suffisamment d'éléments du puzzle étaient en place pour qu'une percée majeure ait lieu. Cette compréhension de la manière dont les composants moléculaires nécessaires interagissent pour répliquer fidèlement l'ADN dans les cellules vivantes a conduit à la mise au point d'une technique permettant de créer de l'ADN dans un tube à essai. Cette technique s'appelle la **réaction en chaîne par polymérase**, ou **PCR**.

PCR : Un coup d'œil approfondi

La PCR fait appel à deux processus fondamentaux de la génétique moléculaire.

1. **Renaturation des brins d'ADN complémentaires**
2. **Synthèse des brins d'ADN par l'ADN polymérase**

Dans la PCR, l'hybridation des brins complémentaires a lieu lorsque deux **amorces** différentes se renaturent à chacune de leurs paires de bases complémentaires respectives sur la matrice. Les deux amorces sont conçues et synthétisées en laboratoire avec une séquence spécifique de nucléotides de sorte qu'elles puissent s'hybrider aux extrémités opposées et sur les brins opposés de la portion d'ADN à double brin (brin matrice) à amplifier.

Avant de pouvoir amplifier une région d'ADN, il faut identifier et déterminer la séquence d'un morceau d'ADN en amont et en aval de la région d'intérêt. Ces régions

sont ensuite utilisées pour déterminer la séquence des amorces oligonucléotidiques qui seront synthétisées et utilisées comme points de départ pour la réplication de l'ADN. Les amorces sont complémentaires des régions en amont et en aval de la séquence à amplifier, de sorte qu'elles adhèrent, ou se renaturent, à ces régions. Les amorces sont nécessaires, car les ADN polymérases ne peuvent ajouter des nucléotides qu'à l'extrémité d'une chaîne préexistante.

L'ADN polymérase utilisée dans la PCR doit être une polymérase thermostable, car la réaction en chaîne de la polymérase oscille entre des températures de 52 °C et 94 °C. L'ADN polymérase thermostable utilisée dans la PCR a été isolée à partir d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus* (*Taq*), qui vit dans des évents de vapeur à haute température comme ceux que l'on trouve dans le parc national de Yellowstone.

Deux nouveaux brins de matrice sont créés à partir de la matrice à double brin d'origine à chaque cycle complet de la réaction de synthèse des brins. Cela entraîne une croissance exponentielle du nombre de molécules matrices, c'est-à-dire que le nombre de brins d'ADN double à chaque cycle. Par conséquent, après 35 cycles, il y aura 3,4 x 10^{10}, soit plus de 30 milliards de fois plus de copies qu'au début. Une fois que la matrice a été suffisamment amplifiée, elle peut être visualisée. Cela permet aux chercheurs de déterminer la présence ou l'absence des produits PCR souhaités et de déterminer les similitudes et les différences entre l'ADN des individus. Selon la séquence d'ADN analysée, les différences entre les individus peuvent être aussi grandes que des centaines de paires de bases ou aussi petites qu'une seule paire de bases ou une seule mutation ponctuelle.

La PCR étape par étape

La PCR implique une série répétitive de cycles, dont chacun consiste en une dénaturation de la matrice, une renaturation avec l'amorce et une élongation de l'amorce renaturée par l'ADN polymérase *Taq*. Avant de commencer l'amplification de l'ADN, l'ADN matrice est préparée à partir d'éléments probants.

Après la préparation de l'échantillon, l'ADN matrice, les amorces oligonucléotidiques, l'ADN polymérase thermostable (*Taq)*, les quatre désoxynucléotides (A, T, G, C) et le tampon de réaction sont mélangés dans un micro-tube. Le tube est placé dans le thermocycleur. Les thermocycleurs contiennent un bloc d'aluminium qui retient les échantillons et peut être rapidement chauffé et refroidi à d'extrêmes différences de température. Le chauffage et le refroidissement rapides de ce bloc thermique sont appelés **cycle thermique ou cyclage thermique.**

La première étape de la procédure de cycle de la PCR consiste à chauffer l'échantillon à 94 °C. À cette température élevée, les brins de la matrice se séparent (dénaturent). C'est ce qu'on appelle l'**étape de dénaturation**.

Le thermocycleur refroidit ensuite rapidement à 52 °C pour permettre aux amorces de se renaturer aux brins séparés de la matrice. C'est ce qu'on appelle l'étape de la renaturation. Les deux brins de matrice d'origine peuvent se renaturer l'un à l'autre ou entrer en compétition avec les amorces pour les sites de liaison complémentaires des amorces. Cependant, les amorces sont ajoutées en excès de telle sorte que les amorces supplantent en fait les brins d'ADN originaux pour les sites de liaison complémentaires des amorces.

Enfin, le thermocycleur chauffe l'échantillon à 72 °C pour que l'ADN polymérase *Taq* allonge les amorces et fasse des copies complètes de chaque brin d'ADN matrice. C'est ce qu'on appelle l'étape d'élongation. La *Taq* polymérase fonctionne le plus efficacement à cette température. Deux nouvelles copies de chaque brin complémentaire sont créées. Il y a maintenant deux ensembles d'ADN à double brin (ADNdb). Ces deux ensembles

d'ADNdb peuvent maintenant être utilisés comme matrices pour un autre cycle et la synthèse de brins subséquents.

À ce stade, un cycle complet de température (cycle thermique) a été réalisé (figure 16).

Cycle de température = étape de dénaturation + étape de renaturation + étape d'élongation

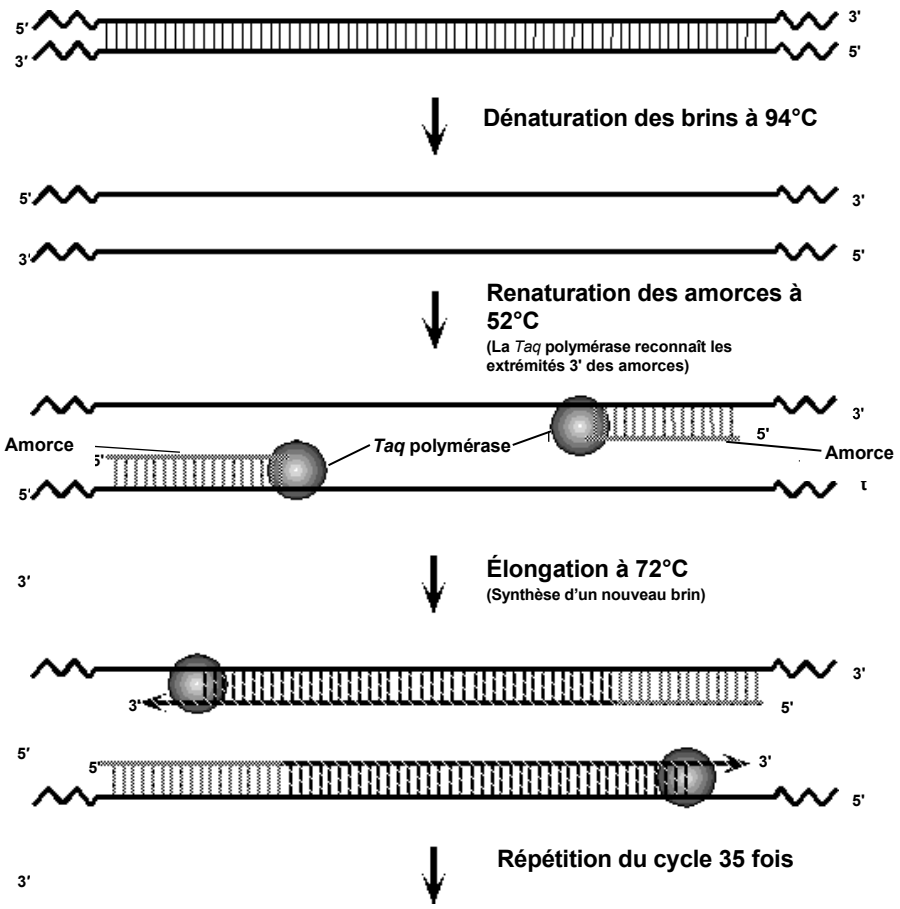


Fig. 16. Un cycle complet de PCR.

Habituellement, le cycle thermique se poursuit pendant environ 35 cycles. Après chaque cycle thermique, le nombre de brins de matrice double, ce qui entraîne une augmentation exponentielle du nombre de brins d'ADN matrice. Après 35 cycles, il y aura $3{,}4 \times 10^{10}$ copies supplémentaires du nombre initial de molécules d'ADN matrice.

La PCR génère un ADN d'une longueur et d'une séquence précises. Lors du premier cycle, les deux amorces se renaturent aux brins d'ADN génomique d'origine aux extrémités opposées et sur des brins opposés. Après le premier cycle thermique complet, deux nouveaux brins sont générés, plus courts que les brins de la matrice originale, mais toujours plus longs que la longueur de l'ADN que le chercheur veut amplifier. Ce n'est

qu'au troisième cycle thermique que des fragments de la longueur précise sont générés (figure 17).

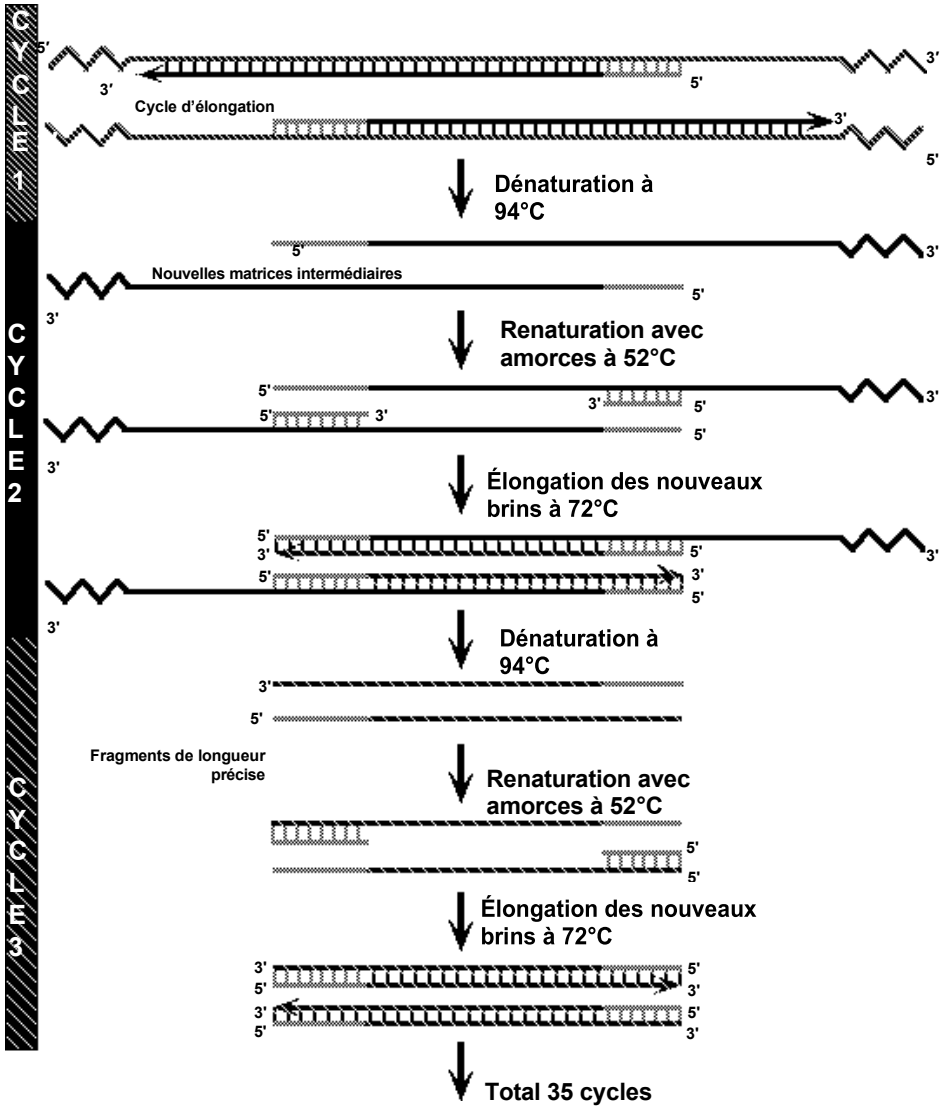


Fig. 17. Génération de fragments de longueur précise.

Ce sont les brins de la matrice d'une longueur précise qui sont amplifiés de manière exponentielle (X^n, où X = le nombre de brins de la matrice originale et n = le nombre de cycles). Il y a toujours un ensemble de la longue matrice originale de molécules d'ADN qui n'est jamais complètement dupliqué. Après chaque cycle thermique, deux brins de longueur intermédiaire sont produits, mais comme ils ne peuvent être générés qu'à partir des brins de la matrice originale, les brins intermédiaires ne sont pas amplifiés de manière exponentielle. Ce sont les brins de longueur précise générés à partir des brins intermédiaires qui sont amplifiés exponentiellement à chaque cycle. Par conséquent, si 20 cycles thermiques étaient effectués à partir d'une molécule d'ADN double brin, il y aurait 1 ensemble de brins d'ADN matrice génomique d'origine, 20 ensembles de brins de matrice intermédiaires et 1 048 576 ensembles de brins de matrice de longueur

précise (figure 18). Après 35 cycles, il y aurait 1 ensemble de brins d'ADN matrice génomique d'origine, 35 ensembles de brins de matrice intermédiaires et 3,4 x 10^{10} ensembles de brins de matrice de longueur précise.

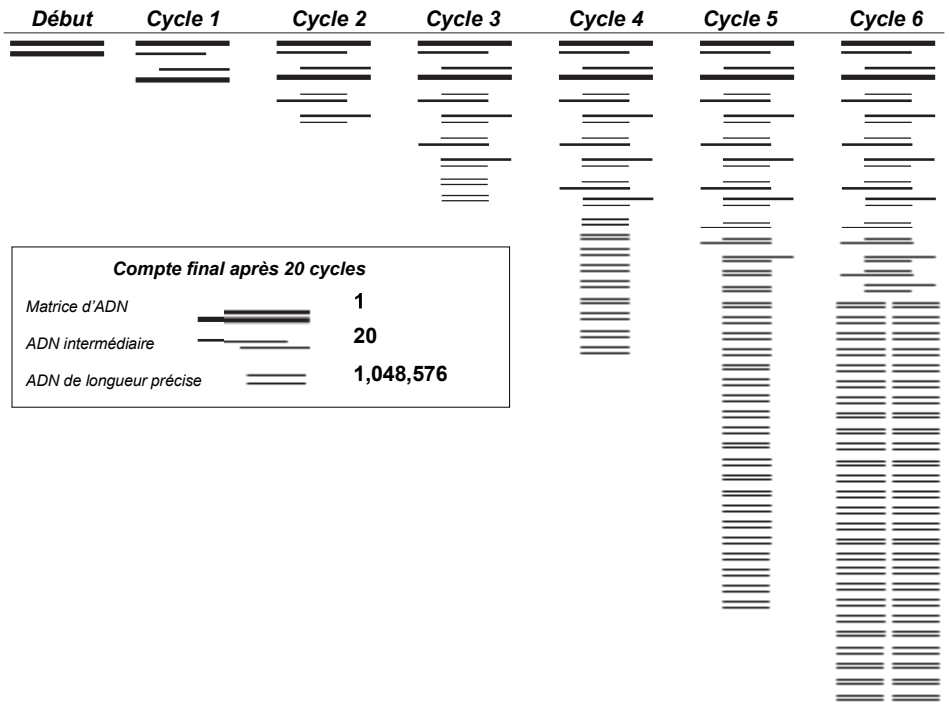


Fig. 18. Schéma de l'amplification par PCR des fragments d'ADN.

Annexe B : Une brève histoire des tests médico-légaux -- *Vitesse des tests versus pouvoir discriminant*

Bien avant que les preuves génétiques ne s'imposent comme le moyen privilégié d'identification des individus, les laboratoires de la science médico-légale avaient encore pour mission de relier sans ambiguïté les suspects aux scènes de crime. Ils le faisaient souvent de manière indirecte, en montrant par exemple que l'empreinte d'une chaussure boueuse trouvée dans la voiture du suspect était identique à celle laissée sur la scène de crime. Ou encore, en montrant qu'un sac en plastique trouvé au domicile du suspect correspondait à ceux trouvés au domicile de la victime. À eux seuls, ces éléments de preuve ne sont que suggestifs — ils ne prouvent pas réellement que le suspect était sur la scène d'un crime. Il faut qu'il reste quelque chose du suspect pour pouvoir relier directement cet individu à la scène. Les preuves biologiques représentent la clé.

Groupes sanguins

Les premiers tests génétiques n'étaient pas du tout basés sur l'ADN, mais sur les groupes sanguins. Il existe 4 groupes sanguins, ou types de sang — A, B, AB et O. Le test des groupes sanguins est très rapide, simple. Cependant, 40 % de la population est de groupe O, ce qui n'est pas particulièrement utile s'il s'avère que plusieurs de vos suspects sont du groupe O. La détermination du groupe sanguin est plus utile pour exclure des suspects potentiels. Si vous savez que quelqu'un a laissé du sang de groupe O sur la scène de crime et que la victime n'est pas de groupe O, vous pouvez exclure tous les suspects qui ont du sang A, B ou AB.

RFLP

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP (pour *Restriction Fragment Length Polymorphism*) est depuis de nombreuses années le cheval de bataille de l'analyse d'ADN en science médico-légale. Décrit pour la première fois par le généticien anglais Alec Jeffries en 1985, le RFLP exploite le fait que certaines régions de nos génomes contiennent des séquences d'ADN répétées maintes et maintes fois (appelées VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*) les unes à côté des autres. Jeffries a découvert que le nombre de répétitions à un endroit donné diffère d'une personne à l'autre. À l'aide d'enzymes de restriction qui digèrent des motifs très spécifiques de l'ADN, Jeffries a pu découper les VNTR et comparer directement leur taille. Il a découvert que le locus (ou marqueur d'allèle) où se trouvent les répétitions porte un motif de répétitions qui provient soit de la mère, soit du père. En fait, la première application légale du RFLP a été utilisée pour résoudre un cas d'immigration britannique impliquant des relations familiales.

Bien que le RFLP soit un outil très puissant et possède un grand potentiel de discrimination, la technique est laborieuse et ne peut pas être facilement automatisée et prend beaucoup de temps. Comme il dépend de séquences d'ADN de taille relativement importante (un minimum de plusieurs centaines de paires de bases), l'ADN doit être non dégradé et de qualité acceptable. Les échantillons d'ADN plus anciens peuvent ne pas convenir. Son plus grand inconvénient est peut-être qu'il nécessite souvent de grandes quantités d'ADN (des dizaines de microgrammes). Il n'est donc pas adapté à de nombreuses scènes de crime où un seul cheveu peut impliquer un suspect.

STR

Les courtes répétitions en tandem (STR pour *Short Tandem Repeats*) sont semblables aux VNTR, car elles décrivent elles aussi des régions de l'ADN où l'on voit des séquences d'ADN répétées maintes et maintes fois. Dans ce cas, la taille des répétitions est plus petite - parfois seulement 2 nucléotides sont répétés. Comme pour les VNTR, tout le monde hérite de la matrice STR de ses parents : pour chaque locus, un allèle STR provient de la mère et un autre du père.

Les STR sont beaucoup plus faciles à analyser que les RFLP. Premièrement, parce qu'elles sont petites, elles sont faciles à amplifier par PCR. Ensuite, parce qu'elles peuvent être amplifiées par PCR, les tests STR peuvent être automatisés, plusieurs tests (>10) étant généralement effectués en même temps. Chaque test PCR dure environ 4 heures, contre plusieurs jours pour le RFLP. Troisièmement, même l'ADN dégradé peut généralement donner des résultats significatifs. L'ADN dégradé peut être cassé en petits fragments, ce qui, dans la plupart des cas, est acceptable pour la PCR, mais pas pour le RFLP. Et enfin, même un seul cheveu peut produire suffisamment de matériel génétique pour permettre une analyse génétique réussie. Bien que toutes ces caractéristiques soient convaincantes, ce qui rend l'analyse STR si puissante c'est que plusieurs loci contenant des STR peuvent être analysés en même temps. Les tests individuels peuvent, au mieux, distinguer 1 personne sur 2000 environ. En combinaison, 13 loci seulement peuvent permettre de distinguer deux personnes dans le monde (à l'exception des vrais jumeaux), vivantes ou décédées.

Il est intéressant de noter que les STR existent dans toutes les espèces testées à ce jour. Cela a incité de nombreux groupes à utiliser l'analyse des STR pour retracer les lignées de certaines espèces (comme les chiens et les chevaux de course) où le suivi des lignées rapporte gros.

Profilage d'ADN : Quelle sera la prochaine étape ?

Plusieurs nouveaux domaines sont en cours de développement. L'ADN mitochondrial (ADNmt) est un point chaud. L'ADNmt est inhabituel — il n'est pas nucléaire et ne suit donc pas les mêmes règles d'héritage que l'ADN chromosomique. En fait, il est généralement admis que l'ADNmt est transmis par la mère. Le fait que l'ADNmt soit un cercle à double brin présente un intérêt pour l'analyse de l'ADN. Il contient un grand nombre de gènes impliqués dans le cycle de Krebs (respiration). Ces gènes fonctionnent principalement à l'intérieur des mitochondries. C'est peut-être parce qu'il est circulaire que l'ADN mitochondrial a tendance à être beaucoup plus stable que l'ADN chromosomique. Les analystes de la science médico-légale le considèrent souvent comme le « dernier recours », mais ils vérifient souvent sa qualité avant de procéder à d'autres analyses ; si l'ADNmt est dégradé, il est très probable que l'ADN chromosomique le soit également.

La raison pour laquelle l'ADNmt est si utile à des fins médico-légales est son nombre élevé de copies. Bien qu'un gène nucléaire n'ait que deux copies par cellule (une de chaque parent), il y a des centaines de copies d'ADNmt cytoplasmique par cellule, ce qui offre de bien meilleures possibilités d'analyse moléculaire, même lorsque le matériel est limité.

On avait présumé parce que les gènes de l'ADNmt étant essentiels au métabolisme, il y aurait peu de variations entre les individus. Cependant, de récents efforts pour comparer les séquences d'ADN mitochondrial de différentes populations humaines ont montré qu'il existe une région « hypervariable » sur l'ADNmt qui diffère de manière significative entre les individus. Ces régions ont été validées pour être utilisées dans

plusieurs laboratoires criminels, et il existe un bon nombre de sociétés spécialisées dans l'analyse de l'ADNmt pour les affaires médico-légales. L'ADNmt s'est avéré particulièrement utile dans l'identification des restes de personnes disparues, notamment dans les charniers et autres sites de catastrophes. Lors de la catastrophe du tsunami de 2004 dans l'océan Indien, l'identification des victimes a nécessité une combinaison d'analyses STR et d'analyses ADNmt.

Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP pour *Amplified Fragment Length Polymorphism*) est une variante du RFLP basé sur la PCR dans laquelle les séquences sont amplifiées de manière sélective à l'aide d'amorces. Il s'agit d'une méthode fiable et efficace de détection des marqueurs moléculaires. L'ADN est coupé avec des enzymes de restriction pour générer des séquences spécifiques, qui sont ensuite amplifiées par PCR. L'AFLP peut évaluer plus de loci qu'avec le RFLP. L'AFLP est également capable de déterminer un grand nombre de polymorphismes. Les tests basés sur l'AFLP sont rentables et peuvent être automatisés.

Enfin, le potentiel de nouvelles analyses médico-légales utilisant des séquences ou des modèles génomiques appelés polymorphismes mononucléotidiques, ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism)*, suscite beaucoup d'enthousiasme. Les polymorphismes mononucléotidiques sont essentiellement des polymorphismes d'une seule paire de bases qui existent dans tout l'ADN. Il existe plusieurs classes de SNP. Celles qui intéressent le plus les analystes de la science médico-légale sont les SSNP (S*ilent Single Nucleotide Polymorphism*), ou polymorphismes mononucléotidiques silencieux, qui ne modifient pas réellement le résultat d'un produit génique ou la régulation d'un gène. Les SNP sont de bons marqueurs pour un certain nombre de raisons : ils sont beaucoup plus nombreux (selon une estimation, plus de 10 millions) que les autres types de SNP, ils sont distribués de manière aléatoire sur le génome, ils sont bialléliques (contrairement aux STR, qui ont plusieurs états possibles), et leur distribution est assez uniforme. Actuellement, l'utilisation des SNP dans l'analyse médico-légale présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, il faut beaucoup plus d'ADN pour effectuer une analyse SNP que pour les autres méthodes actuellement utilisées en criminalistique. Un autre inconvénient du typage des SNP pour les applications médico-légales est qu'un nombre beaucoup plus important de SNP bialléliques devront être typés pour obtenir le même pouvoir discriminant que les 13 loci STR multialléliques. À l'heure actuelle, le coût du typage SNP est nettement plus élevé que celui du typage STR. De plus, comme les laboratoires de criminologie sont pleinement opérationnels et validés pour le typage STR, il est peu probable que le typage SNP soit utilisé dans le cadre d'enquêtes de routine avant un certain temps.

En matière d'analyse génétique médico-légale, il faut toujours trouver un équilibre entre la rapidité, la rentabilité et le pouvoir discriminant (figure 19). L'analyse STR est actuellement la méthode de choix, car elle est hautement discriminante et peut être réalisée en quelques heures. Les autres méthodes n'ont pas la capacité de distinguer deux profils d'ADN, ou sont trop longues ou laborieuses. Cela ne veut pas dire qu'elles ne sont pas utilisées dans les analyses médico-légales. En outre, avec les améliorations technologiques et l'augmentation des informations sur le génome et les mitochondries, il est probable que d'autres méthodes deviendront préférées au profilage STR.

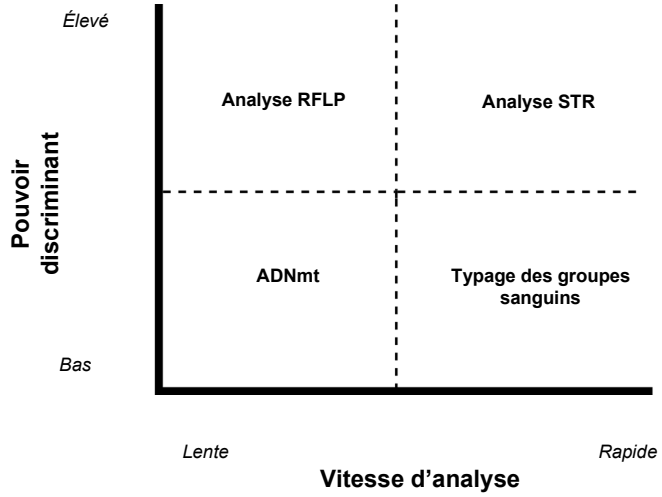


Fig. 19. Comparaison des tests médico-légaux en fonction de la vitesse et du pouvoir discriminant.

Le prélèvement d'échantillons d'ADN et l'affaire OJ Simpson

Comme l'illustre la figure ci-dessous, une fois que les échantillons prélevés sur une scène de crime ont été collectés, ils sont ramenés au laboratoire afin que l'ADN puisse être extrait, quantifié et analysé. Une PCR est alors effectuée pour faire des copies de la ou des régions spécifiques qui sont sous analyse. Dans le système CODIS (***CO****mbined* ***D****NA* ***I****ndex* ***S****ystem* ; pour plus d'informations, voir les informations sur la base de données CODIS dans cette annexe), des amorces PCR ont été conçues pour amplifier 13 régions différentes du génome humain. Chaque ensemble d'amorces amplifie une seule région. Chaque région distincte, ou locus contient une STR qui compte entre 8 et 32 répétitions, selon le locus. Pour pouvoir analyser le plus grand nombre d'échantillons possible en une seule réaction, les entreprises qui ont mis au point ces tests ont procédé de deux manières : premièrement, elles ont marqué les amorces utilisées pour la PCR avec différentes étiquettes fluorescentes. Ensuite, elles ont fabriqué les amorces de telle façon que les produits de la PCR puissent être distingués non seulement par leur couleur fluorescente, mais aussi par leur taille. En d'autres termes, aucun des produits de la PCR qui se chevauchent n'auraient la même couleur.

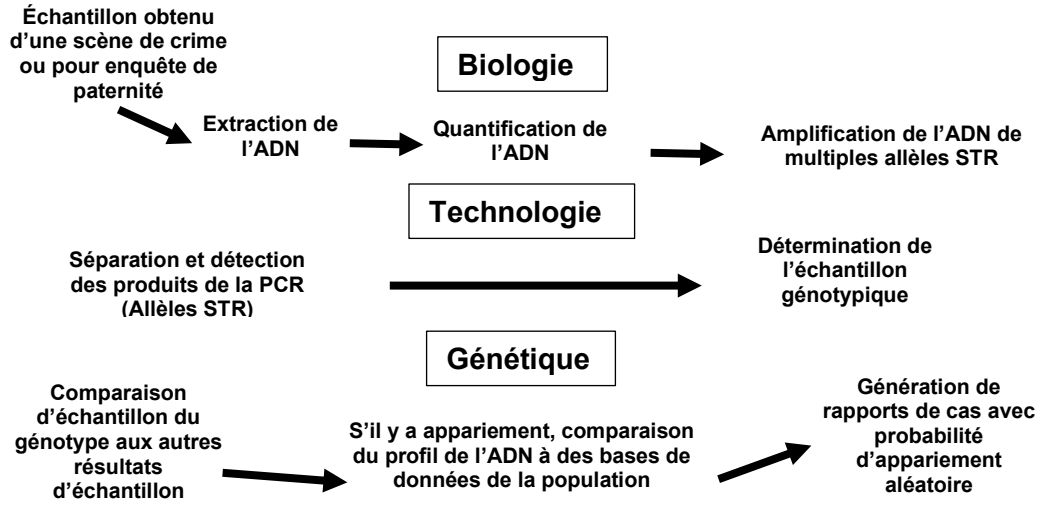


Fig. 20. Étapes du traitement des échantillons d'ADN par la science médico-légale (7).

Une fois la réaction PCR terminée, les produits PCR sont séparés selon leur taille sur des gels d'acrylamide et les produits fluorescents sont détectés. Un gel typique de profilage d'ADN médico-légal est présenté à la figure 21 pour 7 loci testés. Comme les produits PCR à détecter sont très petits (par exemple <50 pb), le meilleur pouvoir de résolution de l'acrylamide est nécessaire pour une résolution optimale. Une fois les produits fluorescents détectés, un programme compare automatiquement les produits aux échelles d'allèles (marqueurs de taille), et identifie chaque produit en fonction de sa taille et de sa couleur par rapport à ces échelles d'allèles. Le programme attribue ensuite un génotype, ou un profil ADN, à chaque échantillon individuel pour chaque locus testé.

Fig. 21. Un gel STR typique. Quatre marqueurs fluorescents différents ont été utilisés pour identifier 7 loci amplifiés. Les échelles d'allèles ou marqueurs sont indiquées par des flèches.

Ce profil ADN est ensuite comparé à d'autres échantillons. Dans le cadre d'études médico-légales, cela peut signifier qu'un échantillon prélevé sur une scène de crime est comparé à celui de plusieurs suspects. Si les échantillons ne correspondent pas, ces suspects peuvent être exclus de la scène de crime. S'il y a une correspondance, ces suspects sont inclus dans l'enquête. À ce stade, les profils d'ADN inclus peuvent être comparés à une base de données (comme celle que l'on peut trouver sur STRbase www.strbase.org) afin de déterminer si les génotypes sont plus fréquents dans certains groupes ethniques et d'obtenir une meilleure estimation de la probabilité de concordance aléatoire. En termes généraux, la probabilité de concordance aléatoire vous indique la probabilité qu'une autre personne de cette population particulière ait exactement le même génotype. Pour en savoir plus sur ce sujet, consultez l'annexe C.

À mesure que les technologies d'analyse de l'ADN s'améliorent et deviennent capables d'analyser des quantités de plus en plus petites de matériel de départ, il deviendra encore plus important que les échantillons soient recueillis de manière appropriée. S'il vous arrivait d'éternuer en recueillant des preuves sur une scène de crime, vous pourriez vous retrouver le principal suspect dans une enquête pour meurtre. La collecte des échantillons provenant des suspects et le traitement des échantillons constituent la partie la plus vulnérable de toute enquête, car c'est à ce moment-là que les preuves sont le plus susceptibles d'être contaminées. La contamination signifie qu'un échantillon est impur. Il est intéressant de noter que les scènes de crime produisent souvent des échantillons mélangés. Si l'on imagine le scénario de la chambre de motel, de nombreuses personnes peuvent avoir séjourné dans la chambre avant que le crime ne soit commis, et ont certainement laissé des traces d'ADN derrière elles. Pour les preuves génétiques, la contamination signifie que plus d'un type d'ADN peut être présent dans le même échantillon (possible, selon le crime), ou que l'ADN a été exposé à une substance qui interfère avec l'analyse. L'une ou l'autre de ces situations peut entraîner des conséquences importantes sur l'analyse. Les preuves ADN non concluantes peuvent avoir un effet aussi important dans la salle d'audience que les preuves concluantes. C'est pourquoi la police prend des précautions particulières lorsqu'elle recueille des preuves en vue d'une analyse d'ADN :

1. Porter toujours des gants. La peau est une excellente source de cellules contenant de l'ADN, et tout le monde perd constamment des cellules cutanées. Seules quelques cellules sont nécessaires pour servir de base à l'établissement d'un profil ADN. Les gants peuvent aider à prévenir la contamination de la collection d'échantillons provenant de suspects.
2. Attacher les cheveux en arrière ou les couvrir. Comme nous l'avons déjà mentionné, il suffit d'un seul cheveu pour impliquer quelqu'un à un endroit précis.
3. Éternuer ou tousser peut expulser des cellules sur toutes les preuves, c'est pourquoi un masque est souvent porté.
4. Les scènes de crime et les échantillons des échantillons probants doivent être traités de façon que les matériaux biologiques ne soient pas accidentellement transférés d'un endroit à l'autre, fournissant ainsi des associations trompeuses. Dans une scène de crime célèbre, le corps de la victime fut recouvert d'une couverture provenant de la maison — cette erreur a rendu les poils trouvés sur la victime sans valeur puisqu'il n'était pas possible de déterminer s'ils étaient la preuve d'un contact avec la personne ayant commis le crime, ou s'ils avaient simplement été transférés sur la victime par accident.

Pour illustrer comment ces procédures peuvent affecter le résultat d'une enquête criminelle, prenons l'exemple du procès d'OJ Simpson :

En 1995, Nicole Brown Simpson et un ami, Ron Goldman, ont été retrouvés assassinés au domicile de Mme Simpson. L'ex-mari de Nicole, OJ Simpson, devient le principal suspect. De nombreux éléments de preuve relient M. Simpson à la scène de crime, et l'analyse d'ADN (basée sur le RFLP et la STR) a été utilisée pour créer des profils d'ADN des nombreuses taches de sang trouvées au domicile de Mme Simpson et de M. Simpson. Sur les 45 taches de sang examinées au procès, toutes ont été identifiées comme provenant soit des deux victimes, soit de M. Simpson (9). Cependant, malgré le poids des preuves, M. Simpson a été acquitté. Un éminent criminologue, le Dr Henry Lee, a semé le doute dans l'esprit du jury en suggérant que les échantillons prélevés sur la scène de crime avaient été mal manipulés. De plus, il s'agissait d'un premier et surtout très important cas qui impliquait une évidence provenant de l'ADN, c'est pourquoi la poursuite a consacré beaucoup de temps durant le procès à expliquer les procédés complexes impliqués dans le profilage par ADN. La défense a réussi à semer suffisamment de doutes dans l'esprit des jurés pour qu'ils pensent que le prélèvement initial des échantillons avait été bâclé, soit que quelqu'un ait intentionnellement mal manipulé les preuves. Une grande partie des efforts de la défense s'est concentrée sur un policier qui, selon elle, était si partial qu'il avait délibérément placé des preuves impliquant le défendeur. La possibilité qu'un policier ait pu maltraiter des preuves a suffi au jury pour l'acquitter.

Malgré cet apparent revers pour le profilage génétique, celui-ci continue d'être utilisé dans d'innombrables affaires judiciaires. En 1983, Calvin Johnson a été accusé et condamné pour viol et cambriolage. Aujourd'hui, il est libre, car les preuves ADN ont démontré qu'il n'était pas l'homme qui avait commis le crime. L'analyse d'ADN a été utilisée en dehors des tribunaux pour régler des problèmes parentaux et pour identifier des personnes impliquées dans de nombreuses catastrophes. Le tableau ci-dessous mentionne certains des jalons et des réalisations en matière d'analyse médico-légale.

Les grandes étapes de l'analyse médico-légale de l'ADN

Année	Événement
1985	Alec Jeffries développe des sondes RFLP à plusieurs loci
1988	Le FBI commence à utiliser la RFLP à locus unique
1990	Début de l'analyse PCR utilisant un locus STR unique
1992	Le FBI commence les travaux sur les STR en utilisant le locus DQA1
1994	Loi sur l'identification par l'ADN (*DNA Identification Act)* : initiative de financement d'une base de données nationale sur l'ADN
1995	Le procès OJ Simpson attire l'attention du public sur les preuves ADN
1996	Le FBI commence à tester l'ADNmt ; les premiers kits STR multiplex sont disponibles
1997	Treize loci STR fondamentaux sont décrits
1998	Le FBI lance la base de données CODIS ; catastrophe de la Swissair — tous les restes sont identifiés grâce à l'analyse de l'ADN avec STR

Année	Événement
2001	Catastrophe du World Trade Center à New York — de nombreux restes ont été identifiés grâce è une combinaison de méthodes de profilage de l'ADN (8)
2004	Proposition 69 de la Californie : Initiative de financement de la base de données ADN de l'État. L'initiative de l'État est adoptée avec 62 % des voix. (14)
2004	Tsunami dans l'océan Indien : Interpol et d'autres agences mondiales utilisent le profilage ADN pour identifier les victimes
Aujourd'hui	Retracez votre généalogie génétique : les coffrets disponibles dans le commerce permettent de retracer l'ascendance paternelle et maternelle.

Le système CODIS et les bases de données ADN

La collecte et le stockage de preuves génétiques peuvent être d'une grande utilité pour les services de police. CODIS, ou *COmbined DNA Index System*, est une base de données fédérale d'ADN obtenue à partir de scènes de crime et de délinquants violents condamnés. CODIS s'utilise aux niveaux fédéral, étatique et local pour obtenir et conserver les profils d'ADN (13). Tous les profils génétiques proviennent du niveau local, puis migrent vers les niveaux étatique et fédéral.

Bien que le CODIS soit administré au niveau fédéral, les États ont le pouvoir de légiférer sur la collecte locale de preuves génétiques. Bien que le CODIS ait été conçu à l'origine pour recueillir des informations sur les criminels violents, de nombreux États ont maintenant adopté une législation qui autorise la collecte de preuves génétiques même si la personne n'est pas condamnée pour un crime.

En Californie, la proposition 69 exige le prélèvement de l'ADN de toute personne condamnée pour un crime ou une agression sexuelle violente (14). Elle exige également le prélèvement de l'ADN de toute personne arrêtée ou accusée de divers crimes violents ou délits. Les partisans de cette mesure affirment que trop de crimes violents ne sont pas résolus parce que la Californie ne dispose pas d'une base de données d'ADN complète. En outre, ils soulignent que les tests ne révèlent aucun état de santé des individus, et que la confidentialité médicale ne serait donc pas violée.

Toutefois, les opposants s'opposent au prélèvement d'ADN sur des personnes qui n'ont pas été condamnées pour un crime. En outre, ils estiment que les mesures de protection de la vie privée ne sont pas suffisantes et que l'État n'est pas obligé de répondre aux demandes de suppression des informations concernant des personnes innocentes. De nombreuses personnes estiment également qu'un seul fonctionnaire corrompu pourrait compromettre le droit à la vie privée d'innombrables personnes. Il s'agit d'un domaine controversé, qui est continuellement examiné et développé.

Comment fonctionne réellement le CODIS ?

Le CODIS examine 13 loci, ou marqueurs, qui sont uniformément répartis sur le génome humain. Les loci utilisés et leurs positions relatives sont présentés ci-dessous dans la figure 22.

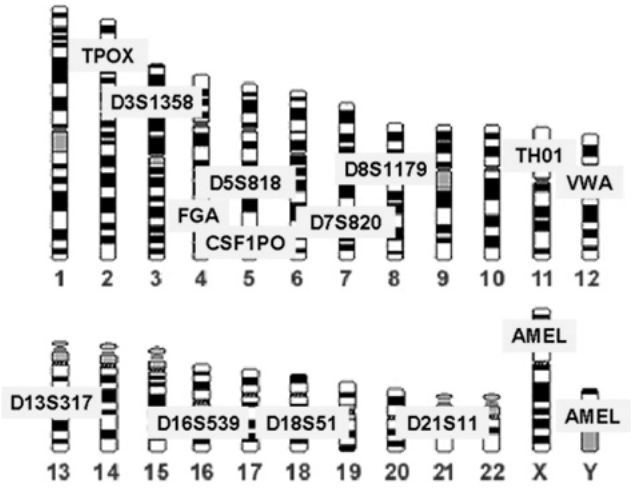


Fig. 22. Les 13 loci CODIS de base et leurs localisations génétiques (7).

En plus des 13 loci utilisés pour le profilage STR, les analystes médico-légaux analysent également le locus amélogène. Les produits PCR à ce locus produisent des produits PCR spécifiques du chromosome X et du chromosome Y de tailles différentes. Le locus amélogène fournit donc des informations sur le sexe d'un échantillon d'ADN particulier.

L'une des caractéristiques importantes de ces 13 loci est qu'ils ont été soigneusement choisis de manière à ne révéler aucune information médicale ou concernant la santé de l'individu dont le profil est établi. En d'autres termes, ces loci proviennent de régions du génome humain qui ne sont pas connues pour être associées à une quelconque maladie ou affection. C'est pourquoi on les appelle des marqueurs « anonymes ».

Pourquoi choisir 13 loci ?

La capacité à distinguer deux profils d'ADN distincts augmente avec le nombre de loci testés. Si un seul locus était examiné, de nombreuses personnes auraient probablement le même génotype, et il serait donc très difficile de faire la différence entre deux personnes. De plus il a été démontré que les fréquences des allèles varient entre les groupes ethniques. Selon le groupe ethnique étudié, le pouvoir discriminant à un locus donné peut n'être que de 1 personne sur 200. Avec l'ajout de plus de loci, la capacité de discrimination entre deux profils augmente. Examinez le profil ADN fictif suivant. Les allèles identifiés dans le profil STR d'ADN de cette personne et les fréquences de ces allèles chez les Caucasiens (3) sont indiqués. La dernière ligne indique la probabilité de concordance aléatoire ([RMP ou *Random Match Probability]* ; décrite plus en détail à l'annexe C) pour le génotype combiné. La probabilité de concordance aléatoire indique la probabilité qu'une autre personne ait le même génotype. Pour ce génotype particulier, il y a environ une chance sur 2,7 bilions qu'un autre Caucasien ait le même génotype. Étant donné qu'il n'y a que ~ 6,5 milliards de personnes vivantes sur la Terre aujourd'hui, c'est un chiffre très discriminant !

Profil ADN fictif : Calcul de la probabilité de correspondance aléatoire				
Locus STR	**Allèle identifié**	**Fréquence des allèles chez les Caucasiens (à partir de la base de données)**	**Fréquence du locus chez les Caucasiens**	
			Formule	**Fréquence du locus**
TPOX	8 12	*p* = 0.535 *q* = 0.041	2pq	0.044
TH01	10 10	*p* = 0.008	*p2*	0,000 064
D3S1358	16 17	*p* = 0.253 *q* = 0.215	2pq	0.109
FGA	21 23	*p* = 0.127 *q* = 0.134	2pq	0.034
CSF1PO	11 13	*p* = 0.301 *q* = 0.096	2pq	0.058
D8S51	14 19	*p* = 0.137 *q* = 0.038	2pq	0.010
D21S11	28 29	*p* = 0.159 *q* = 0.195	2pq	0.062
			Fréquence du génotype combiné	
RMP total pour ce génotype = fréquence de TPOX locus [***f*** (TPOX)] x fréquence du locus TH01 [***f*** (TH01)] x fréquence du locus D3S1358 [***f*** (D3S1358)] etc.			***f*** (TPOX) x ***f*** (TH01) x ***f*** (D3S1358), etc.	3,75 x 10^{-13} ou ~1 / 2,7 billions

Fig. 23. Profil ADN fictif — Probabilités de concordance aléatoires. Dans ce profil d'ADN caucasien imaginaire, 7 loci ont été examinés. Un locus — TH01 — est homozygote, donc un seul allèle a été identifié. Une fréquence de locus est indiquée pour chaque combinaison d'allèles à un locus particulier, et la RMP totale pour le génotype combiné est également indiquée.

Pour calculer la fréquence du génotype d'un locus particulier, il faut tenir compte de la possibilité d'hériter de la combinaison d'allèles présents à ce locus particulier de la part de chaque parent. Il a été démontré que les fréquences alléliques varient entre les différents groupes ethniques, et ces fréquences ont été publiées (3). Prenons l'exemple du locus TPOX. Chez les Caucasiens, la fréquence de l'allèle 8 (appelons cette fréquence « *p* ») est de *p* = 0.535. Cela signifie qu'il y a environ 53,5 % de chances que tout allèle TPOX caucasien soit typé 8. De même, il y a *q* = 0,041 chance qu'un allèle TPOX aléatoire soit typé 12. La probabilité que cette personne ait reçu l'allèle 8 de sa mère et l'allèle 12 de son père est représentée par *pq*, et le contraire — qu'elle ait reçu l'allèle 8 de son père et l'allèle 12 de sa mère — est également *pq*, de sorte que la fréquence du locus à tout locus hétérozygote peut être considérée comme *pq* + *pq* ou 2pq. Ainsi, 2*(0,535) (0,041) = 0,044, ou 4,4 %, des Caucasiens ont le génotype 8, 12 au locus TPOX.

Au locus TH01, comme les deux allèles sont identiques, la fréquence est simplement *pp*, ou *p2*, qui est la chance combinée d'hériter de l'allèle 10 de chaque parent. Ainsi, environ 0,0064 % des Caucasiens présentent ce génotype particulier au locus TH01.

La théorie de Hardy-Weinberg est le principe qui sous-tend les formules de calcul des fréquences génotypiques à tout locus (c'est-à-dire p^2, 2pq). En substance, Hardy-Weinberg décrit les fréquences génotypiques probables dans une population et suit leur

évolution d'une génération à l'autre. Dans le cas des calculs STR, il permet aux généticiens de prendre les fréquences alléliques observées et de calculer une fréquence génotypique voir ci-dessus dans le tableau.

Dans notre exemple du tableau ci-dessus, la probabilité qu'un caucasien ait ce génotype combiné particulier (TPOX 8, 12 ; TH01 10,10) est de 0,044 x 0,000064, soit ~3 x 10^{-6} ou ~3 sur 100 000 de tous les Caucasiens dépistés à ces deux loci (TPOX et TH01). La loi de Mendel sur l'assortiment indépendant nous indique que les allèles sont hérités indépendamment, de sorte que la RÈGLE DU PRODUIT peut être appliquée pour effectuer ce calcul. Selon la RÈGLE DU PRODUIT, la fréquence génotypique combinée est le produit de toutes les fréquences des loci séparés (représentées génériquement par « ***f*** » ; voir le tableau sous fréquence génotypique combinée), comme décrit ci-dessus pour les allèles TH01 et TPOX. La fréquence du génotype peut également être décrite comme la probabilité de concordance aléatoire (*Random Match Probability*, ou RMP). La probabilité de concordance aléatoire est décrite plus en détail à l'annexe C.

Aux États-Unis, 13 loci sont utilisés pour l'analyse. Le RMP combiné utilisant 13 loci offre un pouvoir discriminant suffisant pour faire la différence entre deux personnes dans le monde, à l'exception des vrais jumeaux. Au Royaume-Uni, les services de police ont choisi de n'utiliser que 10 loci, ce qui pourrait, dans certains cas, conduire à une situation où plusieurs personnes ont le même génotype identifié.

Génotypage des plantes et des insectes dans les enquêtes médico-légales

La grande majorité des analyses d'ADN associées aux enquêtes criminelles concernent le profilage des personnes impliquées dans le crime. Toutefois, l'établissement de profils génétiques à l'aide de plusieurs des méthodes décrites est également effectué dans certains cas, lorsque le génotype particulier d'une plante ou d'un insecte peut aider à associer un élément de preuve à un lieu ou à une époque connus. Par exemple, la contrebande d'espèces végétales et animales en voie de disparition est encore répandue dans de nombreuses régions du monde. Pour pouvoir identifier les animaux et les plantes de manière spécifique, on utilise un grand nombre des tests décrits dans cette annexe.

L'entomologie médico-légale, ou l'application de l'étude des insectes dans des affaires criminels est le domaine consacré à ces études dans les enquêtes sur les homicides et le braconnage des animaux sauvages. Les insectes colonisent les restes peu après la mort et se développent de manière prévisible. L'identification des insectes à l'aide ces méthodes décrites ainsi que d'autres méthodes permettent à un entomologiste d'estimer le temps écoulé depuis la mort, ainsi que d'autres facteurs tels que la position des sites de blessures, et si le corps a été déplacé ou dérangé.

Annexe C : Exercices sur les fréquences des allèles STR et les probabilités d'appariement aléatoire

Exercice 1 : Simulation de l'hérédité de l'allèle STR et du pouvoir discriminant

Le kit Crime Scene Investigator PCR Basics^{MC} permet aux étudiants de simuler un génotypage sur l'un des loci couramment utilisés dans les applications médico-légales. Appliquées sur de réelles scènes de crime, le profilage de l'ADN est effectué sur un certain nombre de loci différents afin d'améliorer le pouvoir discriminant des tests. En termes simples, le pouvoir discriminant est la capacité du profilage à faire la distinction entre différents individus. Plus le nombre de loci profilés est important, plus la capacité de discrimination est élevée.

Ce concept peut être illustré en classe par un exercice très simple. On demande à tous les étudiants de se lever, afin qu'ils forment maintenant un groupe de suspects possibles pour un crime hypothétique. Un témoin oculaire a vu le criminel s'enfuir de la scène de crime et en a donné une description. Comme on peut le constater, plus le témoin fournit d'éléments d'identification, plus le nombre de personnes exclues du groupe de suspects est élevé, et plus le nombre de suspects inclus dans le groupe de suspects est faible. L'enseignant fournit des éléments d'identification et demande à ceux qui ne sont plus suspects de s'asseoir. L'enseignant répète ce processus (en choisissant dans la liste suggérée ci-dessous, mais dans un ordre qui continue à éliminer les étudiants du groupe de suspects) jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'un seul étudiant debout — il y a maintenant qu'un seul individu dans le bassin de suspects ! Parmi les types d'informations fournies par un témoin oculaire, on peut citer les suivantes :

Le criminel portait un jean en denim bleu.
Le criminel portait un T-shirt (ou un sweat-shirt, selon la saison) avec des lettres dessus.
Le criminel portait des lunettes.
Le criminel avait la couleur de cheveux ._____
Le criminel avait les cheveux très courts ou longs.
Le criminel était un homme ou une femme.

La question à poser aux étudiants est la suivante : cela prouve-t-il que [nom] a commis le crime ?

Pourquoi ou pourquoi pas ?

La réponse correcte est que le dernier étudiant debout pourrait avoir commis le crime, mais il est important de se demander si d'autres personnes correspondant à cette même description étaient également présentes. En d'autres termes, quelle est la possibilité qu'une autre personne présente exactement les mêmes caractéristiques ? Cette même considération entre en jeu avec le profilage génétique. Quelle est la probabilité qu'une personne choisie au hasard ait le même type d'ADN que le suspect ? Cette probabilité de correspondance aléatoire est un élément important de l'utilisation des preuves génétiques pour résoudre des crimes.

En ajoutant d'autres éléments d'observation à la description physique du criminel en fuite, on est plus susceptible d'identifier la bonne personne comme coupable (ou innocente). De la même manière, l'ajout de loci génétiques supplémentaires au profil d'ADN en fait un outil beaucoup plus puissant pour résoudre les crimes.

Aux États-Unis, 13 loci STR ont été choisis pour le typage médico-légal et l'inclusion dans la base de données nationale appelée CODIS. La probabilité moyenne de

concordance aléatoire lorsque les 13 loci sont typés est inférieure à un sur un billion. La population mondiale totale étant d'environ 6,5 milliards de personnes, cela signifie que le système CODIS peut en théorie faire la différence entre deux personnes, à l'exception des vrais jumeaux.

La partie suivante de l'exercice démontre l'hérédité des allèles STR sur quatre loci et montre comment même des frères et sœurs auront des profils différents. Les quatre loci STR que nous allons modéliser sont en fait utilisés dans le typage médico-légal :

Nom du locus	**Chromosome**	**Gamme d'allèles (no de répétitions)**
VWA (bleu)	12	10–24
D8 (vert)	8	8–19
D5 (jaune)	5	7–16
TH01 (rouge)	11	3–14

Matériel requis pour chaque cours :

- 8 petits sacs en papier
- Blocs ou petits carrés de carton pour affiche de couleur rouge, bleue, verte, jaune (nombre total = 2 de chaque couleur par étudiant)
- Feuilles de travail des étudiants, copie de la table 1 (voir ci-dessous) affichée sur un tableau noir ou sur transparent.

Avant le cours, l'enseignant doit

- Étiqueter ¼ de chacun des blocs bleus avec un allèle (13) pour la VWA, ¼ avec un deuxième allèle différent (18), ¼ avec un troisième allèle différent (16) et ¼ avec un quatrième allèle différent (20) avec un marqueur permanent. Gardez les piles de blocs étiquetés séparément. Placez deux ensembles d'allèles dans un sac en papier étiqueté « mère, VWA » ; mettez les deux autres ensembles dans un autre sac en papier étiqueté « père, VWA ».
- Répétez avec les blocs verts utilisant les allèles D8 (8, 12, 9, 13). Placez deux ensembles dans un sac étiqueté « mère, D8 » et deux ensembles dans un sac étiqueté « père, D8 ».
- Répétez avec les blocs jaunes utilisant les allèles D5 (7, 11, 10, 12). Placez deux ensembles dans un sac étiqueté « mère, D5 » et deux ensembles dans un sac étiqueté « père, D5 ».
- Répétez avec les blocs rouges utilisant les allèles TH01 (7, 11, 10, 12). Placez deux ensembles dans un sac étiqueté « mère, TH01 » et deux ensembles dans un sac étiqueté « père, TH01 ».

En classe :

1. Une étudiante est nommée la « mère » de la famille et un étudiant, le « père ». La mère prendra les quatre sacs marqués « mère » et le père prendra les quatre sacs étiquetés « père ». Ils détermineront leurs génotypes à chacun des quatre loci STR ; chaque étudiant les inscrira sur sa feuille de données.
2. Chaque étudiant « hérite » maintenant de son génotype STR en sélectionnant au hasard un allèle de chacun des sacs de la mère et un allèle de chacun des sacs du père. Chaque étudiant inscrit ses données au tableau ou sur la feuille maîtresse du transparent et tous les étudiants transcrivent les données sur leurs feuilles de travail. En répétant l'opération pour chaque étudiant de la classe, on obtient une grande

« famille » d'enfants ayant la même mère et le même père.

Table I : Simulation de l'héritage et du typage STR : Feuille de travail de l'étudiant

Génotypes de la famille : Remplissez les noms et les génotypes des parents et de tous les enfants.

Nom	**Allèles VWA**		**Allèles D8**		**Allèles D5**		**Allèles TH01**	
	Maternel	Paternel	Maternel	Paternel	Maternel	Paternel	Maternel	Paternel
Mère								
Père								

Question 1 : En ne considérant que les allèles VWA, combien de vos frères et sœurs ont le même génotype que vous ?

Question 2 : En considérant le VWA ***et*** le D8, combien de vos frères et sœurs ont le même génotype que vous ?

Question 3 : En tenant compte de VWA, D8 ***et*** D5, combien de vos frères et sœurs ont le même génotype que vous ?

Question 4 : En considérant VWA, D8, D5 ***et*** TH01, combien de vos frères et sœurs ont le même génotype que vous ?

Question 5 : Comment vos résultats démontrent-ils le principe de l'augmentation du pouvoir discriminant utilisé dans l'établissement de profils d'ADN par la science médico-légale ?

Question 6 : Si plusieurs enfants partagent le même génotype, quelles sont les explications possibles ?

Exercice 2 : Probabilités de correspondance aléatoire

Pour la présentation PowerPoint, les informations sur les cours et les données relatives au profilage STR, les instructeurs sont invités à consulter le site : http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/.

Étant donné que chacun des loci utilisés dans l'analyse d'ADN médico-légale se trouve sur un chromosome différent, ils sont tous hérités indépendamment les uns des autres (la loi de Mendel sur l'assortiment indépendant des chromosomes est le principe génétique sous-jacent). Ce fait permet au médecin légiste d'utiliser la **règle du produit** pour calculer la fréquence de tout profil génétique donné en multipliant les fréquences des allèles entre elles. En d'autres termes, il s'agit de la probabilité qu'une autre personne, choisie au hasard dans une population, ait exactement le même génotype, et c'est ce que l'on appelle la **probabilité de correspondance aléatoire** ou **RMP (**pour *Random Match Probability*).

RMP = f(VWA-1) X f(VWA-2) X f(D8-1) X f(D8-2) X f(D5-1) X f(D5-2) X f(TH01-1) X f(TH01-2)
Où f (…) est la fréquence de cet allèle dans la population.

La fréquence de l'allèle est essentiellement une mesure de l'abondance relative d'un allèle spécifique dans une population donnée. Les fréquences alléliques pour les 13 loci STR CODIS sont disponibles dans de nombreuses bases de données publiques. Pour cette partie de l'exercice, visitez STRBase sur l'internet http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase et sélectionnez « *Data from NIST US Population Samples* ». Cliquez ensuite sur *« Allele Frequencies published in the Journal of Forensic Science* » et ouvrez l'article. La table 1 montre les fréquences alléliques pour une population caucasienne, la table 2 pour une population afro-américaine et la table 3 pour une population hispanique.

Utilisez ces tables pour compléter le tableau suivant en écrivant la fréquence des allèles pour chacun de vos allèles de chaque population :

	Allèles VWA		Allèles D8		Allèles D5		Allèles TH01	
Mon génotype (de l'exercice 1)								
Fréquence :								
Caucasien								
Afro-américain								
Hispanique								

Question 1 : Que remarquez-vous à propos des fréquences alléliques parmi les populations ? Y a-t-il une tendance spécifique ?

Question 2 : Les résultats de génotypage des laboratoires de médecine légale rapportent souvent des RMP pour des populations spécifiques. Utilisez les données de votre table pour expliquer pourquoi cela peut être important. **Conseil** : rappelez-vous que la probabilité de concordance est utilisée pour fournir une indication sur le « bassin » de personnes potentielles ayant le même génotype qu'un suspect.

Question 3 : Utilisez les données de la table pour calculer un RMP pour votre propre génotype pour chacune des populations. Insérez les fréquences de vos propres allèles dans la formule du RMP et calculez.

Écrivez la formule RMP avec vos allèles insérés :

Calcul basé sur la population caucasienne :

Calcul basé sur la population afro-américaine :

Calcul basé sur la population hispanique :

Questions de discussion

1. Imaginez que du sang, dont on sait qu'il provient d'un criminel, ait été laissé sur la scène d'un crime, prélevé et analysé pour les 13 loci du CODIS. Aucun suspect n'a été arrêté, et il n'y a pas de bonnes pistes d'enquête. Pensez-vous que les génotypes des 13 loci CODIS devraient être utilisés pour tirer des conclusions sur la race d'un suspect potentiel ? Utilisez ce que vous avez appris des tables STRBase pour étayer votre position.

2. Quelles sont certaines des difficultés liées à l'utilisation d'études de population basées sur la race ?

Annexe D : Amplification par PCR et technique stérile

La PCR est une technique performante et sensible qui permet aux chercheurs de produire de grandes quantités d'ADN à partir de très petites quantités de matériel de départ. En raison de cette sensibilité, la contamination des réactions PCR par de l'ADN indésirable et étranger est toujours possible. Il faut donc faire très attention afin d'éviter la contamination croisée des échantillons. Les mesures à prendre pour éviter la contamination et l'échec des expériences sont les suivantes :

1. **Embouts de pipettes de type filtre**. L'extrémité du cylindre des micropipettes peut facilement être contaminée par des molécules d'ADN en aérosol. Les embouts de pipette (ou barrière anti-aérosol) qui contiennent un filtre peuvent empêcher la contamination par aérosol des micropipettes. Les molécules d'ADN présentes dans la micropipette ne peuvent pas passer à travers le filtre et ne peuvent pas contaminer les réactions PCR. Les pipettes avec embouts anti-aérosol, Xclud^{MC} (catalogue no.211-2006EDU et 211-2016 EDU) sont des embouts de pipette idéaux à utiliser dans les réactions PCR.
2. **Partager de manière aliquote les réactifs**. Le partage des réactifs et de multiples opérations avec une pipette dans le même tube de réactifs risquent d'introduire des contaminants dans vos réactions PCR. Dans la mesure du possible, préparer des aliquotes de réactifs en petites portions pour chaque équipe ou pour chaque étudiant. Si un tube contenant une aliquote de réactifs est contaminé, seul un nombre minimal de réactions PCR sera contaminé et échouera.
3. **Changer les pointes de pipettes**. Changez toujours les embouts de pipette. Si un embout de pipette est utilisé de manière répétée, les molécules d'ADN contaminantes à l'extérieur de l'embout passeront dans d'autres solutions, ce qui entraînera des réactions PCR contaminées. Si vous n'êtes pas sûr de la propreté de votre pointe de pipette, jetez-la et procurez-vous une nouvelle pointe. Le prix de quelques pointes supplémentaires est bien moindre que le temps, les efforts et le coût des réactions ratées.
4. **Utiliser une bonne technique stérile**. Lorsque vous ouvrez, aliquoter ou pipettez des réactifs, laissez le tube ouvert le moins longtemps possible. Les tubes ouverts et exposés à l'air peuvent facilement être contaminés par les molécules d'ADN qui sont mises en aérosol. Prélevez de manière efficace dans les tubes de réactifs, et fermez-les lorsque vous avez fini de pipeter. Essayez également de ne pas prendre les tubes par le bord ou le bouchon, car vous pouvez facilement introduire des molécules d'ADN contaminantes du bout de vos doigts.
5. **Stérilisez votre équipement et votre zone de travail**. L'eau de Javel à 10 %détruit l'ADN ; l'essuyage des surfaces et le rinçage des barils de pipettes avec de l'eau de Javel à 10 % peuvent éliminer toute contamination par l'ADN.

Annexe E : Glossaire des termes

ADN génomique — la somme totale d'ADN qui se trouve dans le noyau d'une cellule.

ADN polymérase *Taq* — l'ADN polymérase stable à la chaleur qui a été isolée de la bactérie *Thermus aquaticus* tolérante à la chaleur. Cet ADN polymérase est couramment utilisée dans les réactions PCR.

Aliquote — la division d'une quantité de matériel en partie plus petite.

Allèle — une version d'un marqueur génétique, ou locus.

Amorces — petite série de nucléotides (généralement de 3 à 30 bases de long) qui se lient à une séquence particulière de nucléotides sur la séquence d'ADN cible. Les amorces pour la PCR sont généralement synthétisées en laboratoire. Voir également les oligonucléotides.

Bromure d'éthidium — molécule de colorant fluorescent qui s'intercale entre les paires de bases de l'ADN et devient fluorescente lorsqu'elle est exposée à la lumière ultraviolette.

CODIS — **COmbined** DNA Index System est une base de données gérée par le gouvernement fédéral qui contient l'ADN provenant de scènes de crime et de condamnés violents.

Cofacteurs — ions ou petites molécules dont une enzyme a besoin pour fonctionner correctement. Par exemple, l'ADN polymérase *Taq* nécessite du Mg^{2+} pour fonctionner correctement. Le Mg^{2+} est donc considéré comme un cofacteur.

Dénaturation — le processus de séparation de deux brins d'ADN complémentaires. La dénaturation in vivo est accomplie par des enzymes ; dans la PCR, la dénaturation est accomplie par la chaleur.

dNTP — abréviation couramment utilisée pour désigner les quatre désoxynucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) utilisés dans la synthèse de l'ADN.

Élongation — il s'agit du processus par lequel la polymérase *Taq* ajoute des dNTP (désoxynucléotides triphosphates - dATP, dTTP, dCTP ou dGTP) aux extrémités des amorces oligonucléotidiques. L'élongation suit la règle d'appariement des bases et se fait dans le sens 5′ vers 3′.

Eucaryotes — organismes constitués de cellules contenant un noyau entouré d'une membrane qui renferme le matériel génétique (ADN).

Exon — région d'une molécule d'ARN messager transcrite qui est épissée et quitte le noyau pour être traduite en séquence protéique.

Génome — le patrimoine génétique nucléaire complet d'une personne. Il s'agit du plan directeur permettant de créer exactement en particulier une personne, un arbre, un chien ou toute autre chose qui repose sur l'ADN.

Génotype — ensemble des marqueurs (allèles) présents dans un échantillon d'ADN.

Intron — région d'un ARN messager transcrit qui est épissée hors de l'ARNm et n'est pas traduite en séquence protéique.

Locus — un marqueur génétique. Un locus fait référence à une position sur un chromosome, et peut être lié ou non à un gène. (Pluriel, loci)

Lyse — Processus de rupture d'une cellule pour libérer ses composants.

Master Mix — la solution principale d'une réaction PCR qui contient tous les composants nécessaires (dNTPs, amorce, tampon, sels, polymérase, magnésium) de la réaction sauf la matrice de l'ADN.

Matrice — le brin d'ADN qui contient les séquences cibles des amorces oligonucléotidiques et qui sera copié dans son brin complémentaire.

Nucléotides — l'unité fondamentale de l'ADN ou de l'ARN. Ils sont constitués d'un sucre (désoxyribose ou ribose), d'un phosphate et d'une base azotée (adénine, thymine, cytosine, ou guanine et uracile à la place de la thymine dans l'ARN).

Oligonucléotide — molécule d'ADN ou d'ARN généralement composée d'un petit nombre de nucléotides ; voir également amorce.

PCR — réaction en chaîne par polymérase. Le processus d'amplification ou de synthèse de l'ADN dans un tube à essai.

Polymorphisme — se traduit littéralement par « plusieurs formes ». Les polymorphismes font référence aux différences génétiques à un locus particulier. Un même locus peut être polymorphe chez différents individus, avec plusieurs allèles différents.

Pouvoir discriminant — la capacité de discriminer entre deux génotypes quelconques. Le pouvoir discriminant augmente avec le nombre de loci analysés.

Réactifs — matériaux nécessaires à la réalisation d'une expérience. Il s'agit généralement de solutions ou de mélanges de diverses solutions.

Renaturation — liaison des amorces oligonucléotidiques aux séquences complémentaires sur les brins d'ADN de la matrice.

RFLP -- Polymorphisme de longueur des fragments de restriction -- test d'ADN utilisé pour distinguer les VNTR. L'ADN est digéré par des enzymes, et des séquences particulières sont examinées à l'aide d'une sonde qui se lie à la région d'ADN d'intérêt.

STR —*Short Tandem Repeat,* très petites séquences d'ADN répétées. Les répétitions peuvent avoir une longueur de 2 à 4 nucléotides seulement. Les STR sont héréditaires et varient d'une personne à l'autre, et d'un locus à l'autre. Les STR forment la base d'un test ADN couramment utilisé pour le test d'ADN utilisant la PCR.

VTRN — Nombre variable de répétitions en tandem — Séquences d'ADN constituées de grands éléments répétés. Les éléments d'ADN répétés peuvent avoir une longueur de plusieurs kilobases. Les VNTR sont héréditaires et varient d'une personne à l'autre et d'un locus à l'autre.

Annexe F : Instructions de programmation pour le thermocycleur MyCycler^{MC}

Des instructions abrégées pour programmer votre MyCycler^{MC} pour les cycles d'amplification et les températures appropriés utilisés dans ce laboratoire sont fournies ci-dessous. Reportez-vous au manuel d'instructions du MyCycler^{MC} pour des instructions plus détaillées et le dépannage.

Thermocycleur MyCycler^{MC}

Sélectionner « *Standby* » pour mettre la machine sous tension
Sélectionner « *Create* »
Faire défiler jusqu'à « *Standard-3* »
Appuyer sur « *Enter* ».

Programmer la dénaturation initiale
Entrer « 94.0 »
Appuyer sur la flèche vers le bas
Entrer « 2.00 »
Appuyer sur la flèche vers le bas
Entrer « 1.00 »
Appuyer sur la flèche droite

Programmez les 35 cycles PCR
Entrer « 94.0 »
Appuyer sur la flèche vers le bas
Entrer « 0.30 »
Appuyer sur la flèche vers la droite.
Appuyer sur la flèche vers le haut
Entrer « 52.0 »
Appuyer sur la flèche vers le bas
Entrer « 0.30 »
Appuyer sur la flèche vers la droite
Appuyer sur la flèche vers le haut
Entrer « 72.0 »
Appuyer sur la flèche vers le bas
Entrer « 1.00 »
Appuyer sur la flèche vers le bas
Entrer « 35X » cycles
Appuyer sur la touche « *Enter* »

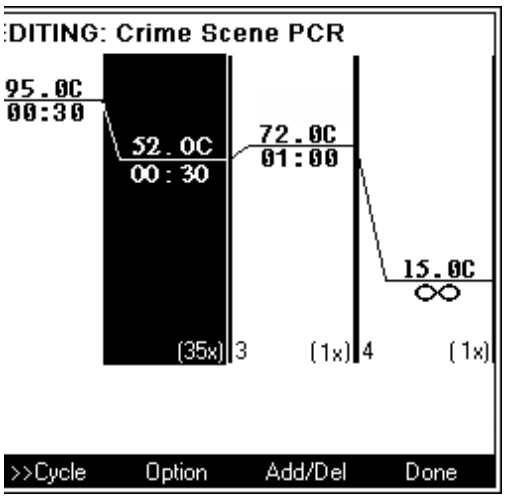
Programmer l'élongation finale
Appuyer sur la flèche droite
Entrer « 72.0 »
Appuyer sur la flèche vers le bas
Entrer « 10.00 »
Appuyer sur la flèche vers le bas
Entrer « 1X » cycle
Appuyer sur la flèche droite

Programmer le maintien du froid final
Entrer « 1X » cycle
Appuyer sur « *Done* »

Sauvegarder le protocole
Appuyer sur « *Save Protocol As* ».
Appuyer sur « *Enter* ».
Entrer « *Crime Scene PCR* » en utilisant le clavier alphanumérique
Appuyer sur « *Enter* ».

Exécuter le programme PCR de la scène de crime
Sélectionner « *Protocol Library* »
Sélectionner « *Crime Scene PCR* »
Appuyer sur « *Enter* »
Appuyer sur « *Enter* » pour exécuter le protocole
Entrer « *Algorithmic Measurement* »
Entrer le volume de « 40 µl »
Sélectionner « *No Hot Start* »
Sélectionner « Begin Run »

Le MyCycler[MC] devrait maintenant commencer à fonctionner

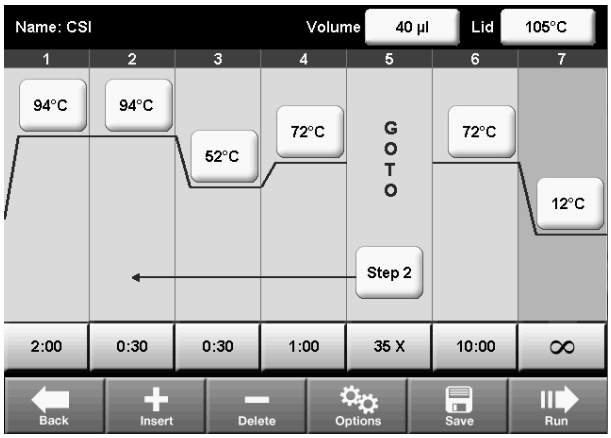


Annexe G : Instructions de programmation pour le thermocycleur T100^{MC}

Des instructions abrégées pour programmer votre MyCycler^{MC} pour les cycles d'amplification et les températures appropriés utilisés dans ce laboratoire sont fournies ci-dessous. Reportez-vous au manuel d'instructions du T100^{MC} pour des instructions plus détaillées et le dépannage.

Thermocycleur T-100 ^{MC}
Programmer le T100 ^{MC} (nécessaire uniquement la première fois que vous effectuez le laboratoire)
Allumer le T100 en basculant l'interrupteur d'alimentation à l'arrière de la machine
Sélectionner « *New Protocol* ».
Appuyer sur « 50 µl » en haut à droite de l'écran
Entrer « 40 »
Appuyer sur « *OK* ».

Programmer la dénaturation initiale
Appuyer sur « 95 °C » dans la colonne 1
Entrer « 94 »
Appuyer sur « *OK* ».
Appuyer sur « 3:00 » dans la colonne 1
Entrer « 200 »
Appuyer sur « *OK* »



Programmer les 35 cycles PCR
Appuyer sur « 95 °C » dans la colonne 2
Entrer « 94 »
Appuyer sur « OK ».
Appuyer sur « 55 °C » dans la colonne 3
Entrer « 52 »
Appuyer sur « OK ».
Appuyer sur « 34X » dans la colonne 5
Entrer « 35 »
Appuyer sur « OK ».

Programmer l'élongation finale
Appuyer sur « 5:00 » dans la colonne 6
Entrer « 1 000 »
Appuyer sur « OK »

Sauvegarder le protocole
Appuyer sur « *Save* » dans la barre de menu inférieure de l'écran
Entrer « *CSI* ».
Appuyer sur « *Save* ».
Appuyer sur « *Home* » dans la barre de menu inférieure de l'écran.

Exécuter le programme CSI
Appuyer sur « *Saved Protocols* »
Appuyer sur « *Main* » dans la colonne *Folders*
Appuyer sur « *CSI* » dans la colonne *Files*
Appuyer sur « *Run* » dans la barre de menu inférieure de l'écran
Appuyer sur « *OK* ».

Annexe H : Guide de réponses pour les enseignants

Questions des étudiants — Introduction

1. **Quels types de matériaux obtenus sur une scène de crime peuvent contenir de l'ADN, et où pouvez-vous les trouver sur une scène de crime ?**

   Tout type de matériel biologique — sang salivaire, peau, cheveux ou os en sont des exemples. On peut les trouver sur des verres à boire (salive), une brosse à cheveux ou à dents (cheveux et peau), des taches de sang, etc.

2. **Pourquoi devez-vous effectuer une PCR sur l'ADN obtenu sur une scène de crime ?**

   En général, de très petites quantités d'ADN peuvent être extraites des preuves obtenues sur les scènes de crime. La PCR est effectuée pour produire suffisamment d'ADN pour l'analyse.

3. **Que pouvez-vous voir si vous faites passer un échantillon d'ADN extrait d'une preuve sur un gel avant de faire une PCR ?**

   Probablement rien. La quantité d'ADN extraite des preuves est si faible que, dans la plupart des cas, elle ne peut être vue sans une certaine manipulation préliminaire (amplification par PCR, par exemple).

4. **Qu'est-ce qu'un génotype ?**

   Un génotype est le patrimoine génétique d'une personne. Il s'agit généralement d'un aperçu de l'information génétique provenant de différents loci disséminés dans le génome.

5. **Quelle est la différence entre un allèle et un locus ?**

   Un locus est un emplacement particulier sur un chromosome. Un allèle est une variation particulière d'un locus individuel.

6. **Pourquoi les laboratoires de science médico-légale analysent-ils l'ADN non codant et non les gènes ?**

   L'ADN non codant est utilisé pour les analyses médico-légales, car il ne porte aucune information sur l'expression des modèles génétiques. De l'avis général de la communauté médico-légale, ces séquences sont préférables, car elles ne fournissent que des informations sur la parenté, et ne disent rien sur l'état biologique d'une personne (par exemple sa santé, son bien-être mental ou son état physique).

Leçon 1 : Préparation des réactions PCR

1. **Qu'est-ce que la PCR vous permet de faire avec l'ADN ?**

   La PCR permet de produire suffisamment de copies d'ADN pour effectuer des analyses.

2. **De quels composants avez-vous besoin pour effectuer une PCR ?**

   Une matrice, une enzyme ADN polymérase, des nucléotides (dNTP), des amorces et un tampon (contenant du Tris*, du sel, etc.).*

3. **Que contient le *Master Mix* et pourquoi avez-vous besoin de chaque composant ?**

   - *Taq polymérase — une polymérase qui n'est pas sensible à la chaleur. Elle « lie » ensemble les désoxynucléotides triphosphates pour former un nouveau brin d'ADN complémentaire à la matrice.*
   - *Des désoxynucléotides triphosphates ATCG — utilisés pour fabriquer le brin complémentaire*

- *Des amorces -- qui sont de courtes séquences d'ADN et qui sont complémentaires de l'ADN que l'on souhaite amplifier. Il en existe deux types : les amorces directes et les amorces inverses. Elles sont séparées par les paires de bases de la séquence d'ADN à amplifier. La taille du produit de la PCR est égale à la taille de la région d'ADN amplifiée plus le nombre de paires de bases dans les amorces.*
- *Des tampons et des cofacteurs nécessaires pour que la réaction se déroule à un taux optimal.*

4. **Pourquoi devez-vous effectuer une PCR sur les preuves ADN provenant d'une scène de crime ?**

   La PCR est nécessaire parce que l'ADN obtenu sur une scène de crime n'est généralement pas suffisant pour être analysé ou visualisé.

5. **Quelles sont les étapes d'un cycle PCR, et que se passe-t-il à chaque étape ?**
   Chaque cycle de PCR est composé de 3 étapes.

   - *Dénaturation — les brins d'ADN sont séparés par la chaleur.*
   - *Renaturation — les amorces se lient aux séquences complémentaires de l'ADN.*
   - *Élongation — l'ADN polymérase ajoute des nucléotides aux amorces.*

Leçon 2 : Électrophorèse des produits PCR

1. **Pourquoi l'ADN se déplace-t-il à travers un gel du gel d'agarose ?**

   L'ADN étant chargé négativement, il peut être séparé à l'aide d'un courant électrique. En fait, électrophorèse signifie « transporter avec du courant ». Le mouvement à travers le gel se produit lorsqu'un courant électrique est appliqué à travers le gel. Comme le gel est immergé dans un tampon, le courant traverse le tampon et le gel, entraînant l'ADN chargé négativement vers l'anode positive.

2. **Quelles sont les deux techniques utilisées pour créer un profil ADN ? Quelle fonction remplit chacune d'entre elles ?**

   La PCR et l'électrophorèse sur gel sont utilisées pour créer un profil d'ADN. La PCR est utilisée pour amplifier en quantité suffisante un échantillon d'ADN à analyser. L'électrophorèse sur gel sépare les bandes en fonction de leur taille. Après la séparation des bandes, le gel est coloré pour visualiser le motif des bandes. En comparant les bandes dans le gel à un standard, on peut estimer leur taille.

3. **Qu'est-ce qu'une échelle d'allèles ? Quelle est sa fonction dans le profilage de l'ADN ?**

   Une échelle d'allèles est un mélange des allèles possibles à un locus particulier. L'échelle d'allèles est nécessaire pour identifier les produits PCR (allèles) présents dans les preuves obtenues sur la scène de crime.

4. **Qu'est-ce qui est nécessaire pour visualiser l'ADN après l'électrophorèse ?**

   L'ADN est visualisé en appliquant une coloration sur le gel. Dans cet exercice, on utilise la coloration d'ADN Fast Blast, qui donne à l'ADN présent dans le gel une couleur bleu intense.

Leçon 3 : Séchage des gels et analyse des résultats

3. **Le génotype de l'échantillon d'ADN prélevé sur la scène de crime correspond-il à l'un des suspects ? Si oui, lequel ?**

   Oui, le suspect C devrait avoir le même génotype que l'échantillon d'ADN de la scène de crime.

4. **Que vous apprend ce résultat sur les suspects inclus dans l'enquête ? Exclus ? Expliquez votre réponse.**

   Le suspect C est inclus dans la liste des suspects, car il a le même génotype qu'un échantillon d'ADN trouvé sur la scène de crime. Les suspects A, B et D sont exclus parce qu'ils n'ont pas le même génotype que l'échantillon d'ADN trouvé sur la scène de crime.

5. **Imaginez que chaque allèle du locus BXP007 se trouve exactement à la même fréquence dans une population. Comme il y a 8 allèles possibles au locus BXP007, quelle est la fréquence de n'importe quel allèle de ce locus dans cette population ?**

   S'il y a 8 allèles, et qu'ils se trouvent exactement à la même fréquence dans une population, alors la fréquence d'un allèle serait de 1/8.

6. **Étant donné la loi de Mendel sur l'assortiment indépendant et l'hypothèse de la question 5, quelle est la fréquence du génotype de l'échantillon de la scène de crime ?**

   La fréquence de chaque allèle est de 1/8 étant donné l'hypothèse de la question 5. La loi de l'assortiment indépendant stipule que les fréquences alléliques peuvent être multipliées ensemble pour donner une fréquence génotypique résultante à un seul locus, donc chaque fréquence allélique est multipliée ensemble pour donner la fréquence génotypique — 1/8 x 1/8 = 1/64.

7. **Si vous aviez un groupe de 13 suspects, et qu'un seul suspect avait un génotype correspondant au locus BXP007 trouvé sur la scène de crime, seriez-vous satisfait d'avoir identifié l'auteur du crime en vous basant uniquement sur la fréquence du génotype calculée pour le locus BXP007 ? Pourquoi ou pourquoi pas ? Expliquez votre réponse.**

   Si vous disposiez d'un groupe de 13 suspects et qu'un seul d'entre eux présentait le même génotype au locus BXP007 que celui trouvé sur la scène de crime, vous pourriez être raisonnablement sûr de tenir votre coupable, puisque vous savez qu'une personne sur 64 est susceptible d'avoir le même génotype que votre suspect, et que vous n'examinez que 13 suspects. Cependant, il faudrait d'autres preuves en plus de votre preuve génotypique pour vous donner plus de poids, comme un témoin oculaire, des preuves physiques laissées par le suspect sur la scène de crime, un mobile, etc.

Réponses aux questions de l'annexe C

Exercice I

Questions 1-4 *:* Dans chaque question, un autre locus est ajouté au génotype. Par conséquent, le nombre de frères et sœurs ayant le même génotype que l'étudiant qui répond devrait diminuer à chaque question. Le nombre exact de frères et sœurs identiques et le schéma spécifique de diminution varieront d'un étudiant et d'une classe à l'autre, mais la tendance à la baisse devrait être la même.

Question 5 : Comment vos résultats démontrent-ils le principe de l'augmentation du pouvoir discriminant utilisé dans l'établissement de profils d'ADN par la science médico-légale ?

Plus le nombre de loci génétiques augmente, plus le nombre d'individus inclus diminue.

Question 6 : Si plusieurs enfants partagent le même génotype, quelles sont les explications possibles ?

- *Jumeaux identiques*
- *Cas fortuit. Avec seulement 4 allèles, cela reste une possibilité ; à mesure que le nombre de loci augmente, les correspondances fortuites sont de moins en moins probables.*
- *Clones !?!?*

Exercice II

Question 1 : Que remarquez-vous sur les fréquences alléliques entre les populations ? Y a-t-il une tendance spécifique ?

Les fréquences alléliques peuvent être différentes entre les différentes populations ethniques. Il n'y a pas de tendances spécifiques.

Question 2 : Les résultats du génotypage des laboratoires de médecine légale font souvent état de probabilités de correspondance aléatoire pour des populations spécifiques. Utilisez les données de votre tableau pour expliquer pourquoi cela peut être important. Conseil : rappelez-vous que la probabilité de concordance est utilisée pour fournir des indications sur le « bassin » de personnes potentielles ayant le même génotype qu'un suspect.

La probabilité de concordance aléatoire peut être différente pour différentes populations. La probabilité d'appariement aléatoire est plus pertinente pour le même groupe ethnique que l'individu étudié, et il est important de savoir que le bon groupe de contrôle a été utilisé pour la comparaison.

Questions de discussion :

1. **Imaginez que du sang, dont on sait qu'il provient d'un criminel, ait été laissé sur la scène d'un crime, prélevé et analysé pour les 13 loci du CODIS. Aucun suspect n'a été arrêté, et il n'y a pas de bonnes pistes d'enquête. Pensez-vous que les génotypes des 13 loci CODIS devraient être utilisés pour tirer des conclusions sur la race d'un suspect potentiel ? Utilisez ce que vous avez appris des tableaux STRBase pour étayer votre position.**

   Les génotypes des 13 loci CODIS ne doivent pas être utilisés pour faire des déductions sur la race d'un suspect potentiel, car il n'y a pas d'allèles qui identifient de manière unique un groupe racial spécifique.

2. **Selon vous, quelles sont les difficultés liées à l'utilisation d'études de population fondées sur la race ?**

   Les difficultés liées à l'utilisation d'études de population basées sur la race sont les suivantes :

   - *Qui identifie la race d'une personne ? La plupart des études sont auto-identifiées par l'individu et l'identité ethnique d'une personne peut ou non refléter fidèlement sa biologie ou son histoire génétique.*
   - *Comment l'identité raciale est-elle déterminée pour une personne ayant un héritage racial mixte ?*
   - *Même dans le cas d'une attribution raciale sans ambiguïté, il peut subsister des*

différences de fréquences alléliques entre des populations géographiques d'origine isolées. Par exemple, pour un caucasien, les populations originaires d'Europe du Nord peuvent avoir des fréquences alléliques différentes de celles d'Europe du Sud.

Annexe I : Références, sites Web recommandés et information sur la profession

1. Benecke M, DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey, Naturwissenschaften 84, 181-188 (1997).
2. Butler JM, Forensic DNA Typing, Academic Press, San Diego (2001).
3. Butler JM et al., Allele frequencies for 15 autosomal STR loci on U.S. Caucasian, African American, and Hispanic populations, J Forensic Sci. 48, 908–911 (2003)
4. Byrd, M, DNA, The Next Generation Technology is Here, http://www.crime-scene-investigator.net/dna.html
5. Crime Scene Investigation (gateway site to information about crime scene investigation, education, jobs, and more), http://www.crime-scene-investigator.net/
6. DNA Typing and Identification, http://faculty.ncwc.edu/toconnor/425/425lect15.html
7. ENFSI DNA WG STR Population Database, www.strbase.org
8. Leclair B et al., Kinship analysis and human identification in mass disasters: the use of MDKAP for the World Trade Center tragedy, Genetic Identity Conference Proceedings: Thirteenth International Symposium on Human Identification (2002)
9. OJ Simpson trial evidence, http://www.law.umkc.edu/faculty/projects/ftrials/Simpson/Dna.htm
10. Short tandem repeat DNA Internet database: Biology and Technology Behind STR Markers, http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/
11. Strengths, Limitations and Controversies of DNA Testing, http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/medgen/dnatesting/dnatest_pcs.html
12. Thieman WJ and Palladino MA, Chapter 8: DNA fingerprinting and forensic analysis, pp 169–184 in Introduction to Biotechnology, Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco (2004)
13. US Dept. of Justice, Federal Bureau of Investigation. The FBI's Combined DNA Index System Program (CODIS), http://www.fbi.gov/hq/lab/codis
14. Voter Information Guide. California Proposition 69: DNA Samples, http://voterguide.ss.ca.gov/propositions/prop69-title.htm

Carrières dans le domaine de la science médico-légale

Lorenz K, Think You Want to Be a CSI? http://msn.careerbuilder.com/Custom/MSN/CareerAdvice/456.htm?siteid=cbmsnhm4441&sc_extcmp=JS_cj1_jan05_hotmail1&GT1=5938

US Department of Justice, Office of Justice Programs, National Institute of Justice, Education and Training in Forensic Science: A Guide for Forensic Science Laboratories, Educational Institutions, and Students, June 2004, http://www.ojp.usdoj.gov/nij/pubs-sum/203099.html

Annexe J : Exécuter un gel d'agarose d'ADN en moins de 20 minutes

L'équipe R&D de BioEducation de Bio-Rad a développé une nouvelle formule de tampon d'électrophorèse. En utilisant une concentration réduite de tampon de chargement (TAE 0,25 x), et une tension plus élevée (200 V), tout gel d'agarose peut être exécuté 33 % plus rapidement. Les avantages de cette nouvelle formule sont les suivants :

- Excellente résolution du gel
- Temps de fonctionnement minimal
- Séparation rapide de l'ADN dans tout gel d'agarose ayant une concentration d'agarose (0,8 - 4,0 %)
- Compatibilité avec tous les kits du programme Biotechnology Explorer^{MC} de Bio-Rad

Le tampon TAE est fourni sous la forme d'un concentré 50x qui peut être mélangé avec de l'eau distillée pour obtenir les concentrations nécessaires à la fabrication des gels d'agarose et de tampons d'électrophorèse.

Utiliser TAE, 1x pour faire du gel d'agarose :

350 ml de TAE 1x sont suffisants pour couler huit gels d'agarose de 7 x 10 cm. Pour préparer 350 ml de TAE 1x à partir d'un concentré de TAE 50x, ajouter 7 ml de concentré à 343 ml d'eau distillée. Les instructions détaillées pour la fabrication du gel d'agarose se trouvent dans les manuels d'instructions des kits individuels.

- Utiliser TAE 1x pour faire des gels d'agarose à 3 % pour le kit Crime Scene Investigator PCR Basics^{MC}.
  - Avec le petit paquet d'électrophorèse d'ADN, dissoudre 10,5 g d'agarose dans 350 ml de tampon TAE 1x, faire bouillir, et verser 40 ml par gel pour réaliser 8 gels d'agarose à 3 %. Les gels peuvent être conservés immergés dans le tampon pendant plusieurs semaines à 4 °C.
  - Pour plus de commodité, des gels préfabriqués du gel d'agarose à 3 % fabriqués avec du TAE 1x sont disponibles auprès de Bio-Rad (catalogue n° 161-3017 EDU).

Utilisez du TAE 0,25x pour préparer le tampon de chargement d'électrophorèse:

Un volume de 2,5 L de tampon TAE 0,25 x est nécessaire pour réaliser huit gels d'agarose de 7 x 10 cm. Pour préparer 2,5 L de TAE 0,25 x à partir d'un concentré de TAE 50x, ajouter 12,5 ml de concentré à 2,49 L d'eau distillée. Pour préparer 2,5 L de TAE 0,25x à partir d'une solution de TAE 1x, ajoutez 625 ml de TAE 1x à 1,875 ml d'eau distillée.

Remarque : n'utilisez pas de TAE 0,25x pour réaliser des gels d'agarose ; cela peut entraîner une perte de résolution de l'ADN.

Pour exécuter les gels :

Placer le gel dans une chambre d'électrophorèse et le recouvrir de TAE 0,25 x ; s'assurer que le gel est immergé. Soumettre les gels à 200 V pendant 20 minutes au maximum. Surveillez la progression du colorant de chargement du gel pour avoir une idée relative de la progression de l'électrophorèse.

Avis juridiques

Avis concernant les thermocycleurs et les systèmes en temps réel de Bio-Rad : L'achat de cet instrument confère à l'acheteur une immunité limitée, non transférable, contre une poursuite concernant les activités de recherche et de développement de l'acheteur et pour l'utilisation dans des domaines appliqués autres que le diagnostic in vitro humain, en vertu d'un ou plusieurs brevets américains no. 5,656,493, 5,333,675, 5,475,610 (revendications 1, 44, 158, 160–163, and 167 uniquement), and 6,703,236 (revendications 1–7 uniquement), ou des revendications correspondantes dans leurs équivalents non américains, détenus par Applera Corporation. Aucun droit n'est transmis de manière expresse, implicite ou par estoppel en vertu de toute autre revendication de brevet, telle que les revendications relatives aux appareils, réactifs, kits ou méthodes telles que les méthodes de nucléase 5'. De plus amples informations sur l'achat de licences peuvent être obtenues en contactant le directeur des licences, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, É.-U. Les thermocycleurs en temps réel de Bio-Rad qui sont licenciés sous le brevet d'Applera des États-Unis no. 6,814,934 B1 pour l'utilisation dans la recherche et pour tous les autres domaines à l'exception des domaines du diagnostic humain et du diagnostic vétérinaire. L'achat de l'ADN polymérase iTaq^{MC} comprend une immunité contre toute poursuite en vertu des brevets spécifiés dans l'encart du produit pour utiliser uniquement la quantité achetée pour la propre recherche interne de l'acheteur. Aucun autre droit de brevet (tel quel les brevets pour le Procédé de nucléase 5') n'est transmis de manière expresse, implicite ou par estoppel. De plus amples informations sur l'achat de licences peuvent être obtenues en contactant le directeur des licences, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, É.-U.

Marques commerciales

Tupperware est une marque commerciale de Tupperware Worldwide.

BIO-RAD

Bio-Rad Laboratories, Inc.

Life Science Group

Web site *www.bio-rad.com* ***USA*** *800 424 6723* ***Australia*** *61 2 9914 2800* ***Austria*** *01 877 89 01* ***Belgium*** *09 385 55 11* ***Brazil*** *55 31 3689 6600* ***Canada*** *905 364 3435* ***China*** *86 21 6169 8500* ***Czech Republic*** *420 241 430 532* ***Denmark*** *44 52 10 00* ***Finland*** *09 804 22 00* ***France*** *01 47 95 69 65* ***Germany*** *089 31 884 0* ***Greece*** *30 210 777 4396* ***Hong Kong*** *852 2789 3300* ***Hungary*** *36 1 459 6100* ***India*** *91 124 4029300* ***Israel*** *03 963 6050* ***Italy*** *39 02 216091* ***Japan*** *03 6361 7000* ***Korea*** *82 2 3473 4460* ***Malaysia*** *60 3 2117 5260* ***Mexico*** *52 555 488 7670* ***The Netherlands*** *0318 540666* ***New Zealand*** *64 9 415 2280* ***Norway*** *23 38 41 30* ***Poland*** *48 22 331 99 99* ***Portugal*** *351 21 472 7700* ***Russia*** *7 495 721 14 04* ***Singapore*** *65 6415 3170* ***South Africa*** *27 861 246 723* ***Spain*** *34 91 590 5200* ***Sweden*** *08 555 12700* ***Switzerland*** *061 717 95 55* ***Taiwan*** *886 2 2578 7189* ***Thailand*** *66 2 6518311* ***United Kingdom*** *020 8328 2000*

Bulletin 0000 Rev A US/EG *00-0000 0000 Sig 0211*

10002461 Rev D