

## Chapitre III

### Génotypage et Empreinte génétique

#### Généralité

##### Génotypage

Le génotypage est l'ensemble des analyses génétiques moléculaires visant à déterminer l'identité d'une variation génétique, à une position spécifique dans le génome (entier ou une partie), pour un individu ou un groupe d'individus donné appartenant à une espèce animale, végétale, fongique...

##### Empreinte génétique = profil génétique

Est le résultat d'une analyse génétique permettant de comparer des séquences spécifiques. Le procédé des empreintes génétiques intéresse la médecine, la recherche et le droit, en identifiant des espèces animales, végétales ou l'homme par la connaissance de leurs caractéristiques génétiques...

##### Les applications de l'empreinte génétique Elles sont diverses:

- D'étudier des populations d'animaux et de végétaux et même de détecter des aberrations chromosomiques responsables de maladies génétiques.
- Médicales : d'organiser le don d'organe dans les cas de recherche de monozygotisme chez des jumeaux.
- Médicolégales :
  - ✓ Cadre de la criminalistique : où une confrontation des traces (petite quantité de tissus biologiques: sang, salive, poils ou tache de sperme laissée par un violeur) recueillies sur la victime ou sur les lieux d'un crime sont comparées avec les suspects
  - ✓ Cadre de recherche de paternité où les profils génétiques du trio enfant-père présumé-mère sont comparés (dossiers civil ou pénal avec génotypage direct pour confirmation/infirmité des liens de parenté directs, de fratrie ou encore de liens complexes de parenté)
  - ✓ Recherches de maternité pour les cas de substitutions d'identité lors de l'accouchement, voire d'échanges de bébés à la maternité
  - ✓ identification de corps (d'identifier des restes humains), après catastrophe naturelle (tsunami), accident d'avion, acte de terrorisme, ou simplement dans des cas isolés de personne non identifiée retrouvée décédée.

## I. Applications en agriculture

### I.1. Identification variétale par marqueurs moléculaires (empreinte génétique)

- Elle consiste à comparer les profils ADN (code-barres) obtenus par la présence ou non des marqueurs pour deux plantes, et de noter leurs différences.
- Il est possible de distinguer deux variétés proches avec seulement deux marqueurs moléculaires judicieusement choisis
- Cette identification est directement réalisée à partir de leur ADN purifié de n'importe quel organe (feuilles, fruits, semences, tubercules, écorce) et indépendamment du stade de développement de la plante et des conditions environnementales.

Parmi ces marqueurs on trouve principalement :

**Les marqueurs microsatellites ou SSR** (Single-Sequence Repeat) Actuellement, plus de 1000 marqueurs microsatellites sont disponibles au laboratoire pour une quarantaine d'espèces végétales.

- **Les marqueurs AFLP** (Amplified Fragment Length polymorphism)

Ces marqueurs moléculaires permettent une cartographie génétique et une identification variétale dans le but de distinguer les lignées, de reconnaître les parents d'hybrides, de détecter des contaminations variétales de lots de semences, ou de tester l'homogénéité d'une population à n'importe quel stade d'un schéma de sélection. Ceci permet une protection variétale d'où l'introduction de la notion de variété essentiellement dérivée (VED) (= variété dérivée d'une variété originale par modification de quelques régions chromosomiques réduites).

L'identification variétale vise la protection des plants et la mise au point de protocoles uniformisés

- Optimisation des protocoles d'extraction d'ADN pour l'obtention d'une bonne qualité de l'ADN pour la reproductibilité des résultats, la rapidité et le coût faible.
- Choix de marqueurs spécifiques pour chaque espèce afin de garantir la reproductibilité et pouvoir de discrimination des variétés.
- Constitution de bases de données d'empreintes génétiques afin de pouvoir identifier par comparaison le plus grand nombre de variétés possible.

**I.2. Détection des OGM (plus de détails dans le chapitre IV)** La détection des OGM est nécessaire pour plusieurs raisons (biologiques, légales et commerciales)

## II. Applications légales

Les êtres humains sont identiques à 99.9% au niveau de leur séquence d'ADN : cela signifie que, le long de notre génome, une base diffère toutes les mille bases d'un individu à l'autre. Sachant que notre génome comporte environ trois milliards de paires de bases, un simple calcul montre alors que notre génome est différent de celui de notre voisin pour 3 millions de bases.

La présence d'un grand polymorphisme dans l'information génétique crée une biodiversité qui rend chaque être humain unique. Ce polymorphisme représente la base des moyens d'identification par les empreintes génétiques (d'identification des individus par leur ADN), qui sont constituées par plusieurs marqueurs génétiques. Un marqueur génétique est défini par les critères suivants:

- \_ sa transmission mendélienne ;
- \_ son caractère stable au cours de la vie d'un individu ;
- \_ son grand polymorphisme, c'est-à-dire, la présence d'un grand nombre d'allèles ;
- \_ son fort taux d'hétérozygotie.

La découverte des premiers marqueurs génétiques est récente puisqu'elle date des années 1900 pour le groupe sanguin ABO par Landsteiner, et de 1958 pour le système d'histocompatibilité tissulaire HLA par Dausset. C'est en 1985 que Jeffreys décrit des régions génomiques très polymorphes, formées par de courtes séquences d'ADN qui se répètent en tandem.

Les grands domaines d'application des empreintes génétiques sont la criminalistique, la recherche de parenté et la recherche d'identité de victimes de catastrophes.

### II.1. Les différents polymorphismes

#### II.1.1. Le polymorphisme de l'ADN nucléaire des autosomes

### II.1.1.1. Le polymorphisme de longueur

- Ces séquences répétées en tandem se situent soit dans les introns des gènes soit entre les gènes. On distingue deux types de marqueurs parmi ces séquences: les minisatellites et les microsatellites (STR).
- Ces zones sont héritées des deux parents selon la transmission mendélienne. Elles sont réparties dans tout le génome et ne sont pas codantes.

### II.1.1.2. Les Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

- C'est un type de polymorphisme de l'ADN dans lequel deux allèles diffèrent sur un segment donné par une seule paire de bases.
- Dans deux génomes humains tirés au hasard, 99,9 % de la séquence d'ADN est identique. Les 0,1 % restants contiennent des variations de séquence dont le type le plus commun est le polymorphisme pour un nucléotide (SNP).
- Les SNP sont stables, très abondants et distribués uniformément dans tout le génome, au sein des gènes dans les régions codantes (exons) et non codantes (introns) et dans les régions intergéniques.
- Ils sont présents tous les 100–300 paires de bases en moyenne.
- Leur principal inconvénient réside dans le nombre élevé de zones à amplifier pour obtenir une puissance d'identification égale à celle des STR, ainsi on estime que 13 STR ont le même pouvoir de discrimination qu'environ 50 SNP. De plus, les bases de données sont établies à l'aide des STR et non des SNP.

### II.1.2. Le polymorphisme des chromosomes sexuels

#### Le chromosome Y :

- Le polymorphisme étudié est celui des STR présents sur ce chromosome.
- Cette technique sert principalement dans les cas de recherche de paternité complexes où l'enfant est de sexe masculin.
- Le chromosome Y est exclusivement d'origine paternelle. La transmission des allèles se fait sous forme d'haplotype ou en « bloc ». Dans le cadre d'une recherche de paternité, si une incompatibilité est retrouvée sur les STR des autosomes on peut légitimement penser à une mutation.
- Une étude complémentaire des marqueurs du chromosome Y peut se révéler très utile pour confirmer cette paternité s'ils sont retrouvés identiques entre le père putatif et son fils présumé (**Tableau 1**).

#### Le chromosome X :

- on étudie également le polymorphisme des STR de ce chromosome.
- Cette analyse est utilisée principalement dans les problèmes complexes de filiation père-fille. Prenons le cas d'un père décédé dont la paternité pour la fille 1 (F1), qu'il a eu avec une mère 1 (M1), n'est pas remise en cause. Une recherche de paternité est demandée pour une fille 2 (F2) qui est supposée être la fille de ce même père et d'une autre mère 2 (M2) (**Fig. 1**). Une étude du chromosome X retrouve que les chromosomes X paternels des deux filles 1 et 2 sont différents, ce qui exclut la paternité du père vis-à-vis de la fille 2 (F2), sous l'hypothèse que le père est bien le père de la fille 1 (F1).

### II.1.3. Le polymorphisme de l'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial diffère en de nombreux points de l'ADN nucléaire :

- il est bicaténaire et circulaire, et ne contient que **16 569** nucléotides.
- On rencontre environ **100–1000** mitochondries par cellule et chaque mitochondrie contient une dizaine de copies d'ADN mitochondrial.
- Son origine est uniquement maternelle car seule la tête du spermatozoïde pénètre l'ovule, celle-ci ne contenant que quelques mitochondries qui ne persisteront pas dans la descendance.
- l'ADN mitochondrial contient très peu d'ADN non codant (pas de séquences répétitives).
- Le polymorphisme sur cet ADN n'est donc pas lié à des variations de longueur mais à des variations de séquence (polymorphisme de séquence). Par ailleurs, il est limité et concentré dans une portion d'ADN non

codant d'environ **1100** nucléotide, appelée région de contrôle. Cette région contient deux portions hypervariable (HV1 et HV2) qui seront séquencées et comparées à une séquence dite de référence, décrite par Anderson.

- Cette technique est beaucoup moins discriminante que celle de l'étude du polymorphisme des STR mais elle présente trois intérêts: l'ADN mitochondrial est très résistant, son nombre de copies est très élevé par rapport à l'ADN nucléaire d'où son utilisation privilégiée sur des traces anciennes et très dégradées, enfin l'échantillon étudié peut être dépourvu d'ADN nucléaire (exemple: cheveux sans bulbe).
- Cette technique est principalement utilisée dans le domaine de la criminalistique (exemple d'une affaire pénale: **Tableau 2**).

## II.2. Techniques d'analyse du polymorphisme

- La première étape consiste à extraire l'ADN à partir de différents supports, les plus utilisés étant le sang, la salive, le sperme, les cheveux et les poils.
- L'analyse consiste à mesurer leur longueur en paires de bases.

### II.2.1. Analyse du polymorphisme des fragments de restriction

Elle se compose des étapes suivantes:

- la digestion: l'ADN de l'échantillon est digéré en fragments de tailles différentes, appelés fragments de restriction, par une enzyme de restriction qui possède une spécificité de coupure (HinfI étant la plus utilisée);
- l'électrophorèse: ces fragments sont ensuite séparés selon leur taille;
- le transfert: les fragments d'ADN sont ensuite transférés sur une membrane en nylon (Southern Blot);
- l'hybridation: les fragments fixés sur la membrane sont hybridés avec des sondes spécifiques, le plus souvent radiomarquées par du phosphore <sup>32</sup>, permettant une visualisation des ces fragments d'intérêt après autoradiographie.

Sondes multilocus (reconnaissent toute une famille de séquences répétitives dont la séquence de nucléotides est très proche) → profil constitué de nombreuses bandes (méthode fut abandonnée car elle présentait de grandes difficultés d'interprétation) (**Fig. 2**).

Sondes monolocus (1989) (complémentaires que d'une seule séquence répétitive) → résultat plus simple à interpréter avec la présence d'une ou deux bandes selon que la personne était homozygote ou hétérozygote (**Fig. 3**). Ce processus devait être répété plusieurs fois de suite avec des sondes différentes afin d'augmenter la puissance du test.

- Cette méthode a eu un grand succès dans les années 1980–1990 mais présentait de nombreux inconvénients: la lourdeur et la durée de réalisation de la technique, non compatible avec le délai d'une garde à vue; la nécessité d'une grande quantité d'ADN de bonne qualité; la difficulté d'interprétation en cas de mélanges d'ADN.
- Elle est aujourd'hui supplantée par la technique de polymérase chain reaction (PCR) basée sur l'amplification génique.

### II.2.2. Analyse du polymorphisme des STR par la technique PCR

- Elle est actuellement la méthode la plus largement répandue pour l'étude des empreintes génétiques.
- On utilise en particulier la PCR multiplex permettant d'étudier plusieurs STR simultanément en utilisant plusieurs amorces spécifiques des différentes régions d'intérêt, chacune des amorces étant marquée par un fluorochrome différent permettant d'attribuer un allèle à un système de STR donné (**Fig. 4**).
- Les fragments amplifiés sont analysés par une électrophorèse capillaire.

- Tous les réactifs sont disponibles dans des kits commerciaux « prêts à l'emploi » facilitant leur utilisation. Ces kits permettent d'amplifier simultanément plusieurs STR (entre 12 et 16) associés à un marqueur sexuel (le gène de l'amélogénine qui chez l'homme est présent sur le chromosome X et avec une addition de 6 bp sur le gène Y, ce qui permet de distinguer un ADN d'origine masculine d'un ADN d'origine féminine).
- Durant toutes les étapes de la PCR, on utilise un contrôle positif contenant de l'ADN connu ou « témoin » et un contrôle négatif constitué par un échantillon sans ADN ou « blanc ».
- **Les avantages de la PCR sont multiples par rapport à l'utilisation des RFLP:** la quantité d'ADN nécessaire est très faible et il peut être partiellement dégradé; la technique est très rapide (<6 h dans le cas d'un prélèvement salivaire lors d'une garde à vue); la mesure du nombre de répétitions est beaucoup plus précise puisqu'elle est de l'ordre de la paire de bases, ce qui n'était pas le cas avec la RFLP où il pouvait y avoir une ambiguïté sur la dénomination des allèles.

**La seule faiblesse de cette méthode**, liée à sa très grande sensibilité, réside dans le risque de contamination par un ADN étranger, et ce d'autant plus que la quantité d'ADN analysable est réduite.

### II.2.3. Analyse du polymorphisme de l'ADN mitochondrial par séquençage

- L'analyse de l'ADN mitochondrial est nettement plus fastidieuse, elle est lourde et onéreuse car elle implique une technique de purification d'ADN performante.
- Il s'agit d'amplifier les deux régions hypervariables (HV1 et 2) par PCR puis de les séquencer. La séquence obtenue est appelée **mitotype**. Les points de mutation sont mis en évidence et les mitotypes permettront, comme pour l'ADN nucléaire, d'affirmer, soit une exclusion (certaine si plus de trois différences sont observées entre les deux ADN), soit une identité (avec une certaine probabilité).
- Ses utilisations sont limitées aux cas où l'analyse de l'ADN nucléaire n'est pas possible. Comme c'était le cas dans les affaires historiques de la famille du tsar de Russie et de Louis XVII.
- Cette analyse trouve son intérêt principal en criminalistique. Dans un cas particulier, elle nous a permis d'identifier un corps carbonisé par comparaison de l'ADN mitochondrial de la personne décédée avec celui d'une femme pouvant être sa mère. Le défunt était bien le fils de la femme analysée car les deux ADN mitochondriaux étaient identiques. L'ADN nucléaire, trop dégradé, n'avait permis d'établir qu'un profil partiel.

### Références

[515565428370\\_genotypage-et-empreinte-genetique.chap-iii.pdf](#)

Les empreintes génétiques : nouvel outil en médecine légale. Audrey Mansuet-Lupo, Véronique Van Huffel, Philippe Rouger. Médecine & Droit 88 (2008) 24–28.

Et d'autres ?