

Les empreintes génétiques

Jean VALCARCEL

Université Montpellier

UFR ODONTOLOGIE

DFASOI

Année Universitaire 2020- 2021

Les techniques d'identification des individus en Médecine Légale sont basées sur nos connaissances actuelles en Biologie Moléculaire. **Elle repose sur la structure du matériel biologique qui servira à faire ces analyses : l'ADN.** Cette molécule implique des principes d'analyse et des manipulations précises utilisées en laboratoire de génétique. Grâce à la conjonction de cet outil moléculaire et de son application à la Médecine Légale que la Biologie Moléculaire, une identification individuelle peut être faite. Cette identification présente **des limites telles que les difficultés d'interprétation des résultats et un risque d'erreur non négligeable.**

L'actualité récente, affaire de filiation (Yves Montand), affaire criminelle pour identifier un suspect (Carolyn Dickinson ou Guy Georges) ou pour le disculper (affaire Ghislaine Marchal).

I. Historique.

Tous les humains sont à la fois **parent d'une même famille et différent individuellement.**

Cette diversité est liée à la fois aux variations génétiques entre les générations et à l'adaptation au milieu.

- **En 1985, Sir Alec J. Jeffreys** (Université de Leicester) met au point une technique de test ADN qui repose sur l'identification **de segments « non codants » dans l'ADN de chaque individu correspondant à une signature génomique individuelle.** Cette méthode est utilisée pour la première fois dans l'enquête dans le cadre de **deux affaires criminelles concernant deux jeunes filles à Narborough (Leicestershire) qui en 1983, et 1996.**

- Actuellement, des fichiers recensant des banques génomiques d'identification ont été constitués. Le UK National DNA database regroupe **3,4 millions d'enregistrements en 2006. Actuellement 5,2% de la population est dans cette base.**

- **En 1998, en France, a été créé, le Fichier National Automatisé des Empreintes Génétiques (FNAEG) regroupe 8 000 profils dès 2003.** En 2008, cinq ans après sa création, **le FNAEG compte 806 356 profils génétiques, soit plus de 1% de la population française. En 2018, on comptait 2,9 millions de profils et 480 000 traces non identifiées.**

- Le fichier contient plusieurs types d'empreintes génétiques **allant des traces inconnues aux prélèvements sur des mis en cause, des coupables, des condamnés, des parents de personnes disparues.**

- Il est situé **à L'Institut National de Police Scientifique (INPS) à Ecully (Rhône).**

- Ces banques d'informations s'élargissent de plus en plus et sont utilisées pour l'identification **de restes humains, des tests de paternité, des dons d'organe et des affaires judiciaires de nature criminelle la plupart du temps.**

II. La molécule d'ADN.

II.1. Définition de l'ADN :

- L'acronyme **ADN désigne une macromolécule, l'acide désoxyribonucléique**, dont on a dit qu'elle était l'unité de base de la vie, l'empreinte génétique du corps.
- Cette molécule est présente dans le noyau de la quasi-totalité des cellules -à **l'exception des globules rouges- ainsi que dans les mitochondries, organites cytoplasmiques qui jouent un rôle important dans les phénomènes de respiration et les réactions énergétiques de la cellule.**
- L'**expertise génétique** se concentre prioritairement **sur l'ADN nucléaire** mais **l'ADN mitochondrial** peut également, on le verra plus loin, fournir **des informations utiles bien que moins discriminantes.**

II.2. Le caryotype.

- L'ensemble des chromosomes est représenté sur un caryotype, ou carte de chromosomes. Il existe une grande diversité entre les caryotypes de différentes espèces vivantes diploïdes permettant ainsi l'analyse comparée pour exclure dans une première intention la pollution de l'identification par un génome différent de celui recherché. C'est un indicateur de site (caryotype des plantes fournit des indications sur un lieu ou un contact).

II.3. Répartition de l'ADN.

- Au niveau du noyau, l'ADN nucléaire d'une cellule diploïde $2n$ (2 copies/cellule) provient de deux parents à l'origine d'un individu nouveau et unique. **L'ADN est donc identique dans chaque cellule, quelle que soit la partie du corps où il se trouve et il reste essentiellement le même de la conception jusqu'à la mort.**
- Au niveau de la mitochondrie, **l'ADNmt présent en nombre supérieur ou égal à 1000 copies/cellule est le seul à être pour la plus grande partie transmis par la mère (entre 100 000 et 200 000/ovule normale)** pour un nombre quasi inexistant de copies paternelles (**1 à 2 ADNmt en moyenne/spermatozoïde normal**). Donc une multitude potentielle d'individu par fratrie **porte du matériel mitochondrial maternel.**
- La mère transmet donc son ADNmt à tous ses enfants mais seules les filles le transmettront à leur tour à leur descendance.
- Le nombre de copies d'ADN mitochondrial varie **de quelques dizaines à plusieurs milliers selon le type de cellule.** La règle de base chez tous les êtres vivants est l'homoplasmie : **existence d'une séquence unique d'ADNmt dans toutes les cellules. La présence de deux ou plus de types d'ADNmt dans les cellules est appelé l'hétéroplasmie due à des mutations génique.**
- **La reconnaissance et la destruction des mitochondries paternelles par une protéine membranaire mitochondriale, la prohibitine,** explique lors de la décondensation du spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire, la disparition de l'ADNmt paternels.

II.4. L'ADN mitochondrial (ADNmt).

- Le génome mitochondrial est composé d'un ADN circulaire double brin, de petite taille, codant **pour 1000 protéines à partir de 16569 paires de bases.**
- La taille de cet ADN est **de 5 mm de long pour un code comportant 37 gènes.**
- Les gènes qui le composent sont des gènes pour **les ARNs ribosomiaux, ARNs de transfert et les protéines des chaînes respiratoires** (13 gènes pour la chaîne respiratoire et 22 pour les ARNt et 2 gènes pour ARNr).
- Sa séquence est entièrement connue et elle présente **deux régions hypervariables HVI et HVII.**
- Ce génome présente un double intérêt :
 - ✓ **Préservé par la haute résistance de la mitochondrie**, il peut être analysé sur des traces anciennes ou fortement dégradées sur lesquelles l'ADN nucléaire n'est plus exploitable. **La recherche historique en a fait ces dernières années un fréquent usage.**
 - ✓ **Il permet d'expertiser des tissus biologiques dépourvus d'ADN nucléaire**, mais riches en mitochondries, qui sont prélevés sur une scène de crime. C'est notamment **le cas des tiges de cheveux.**

II.5. Les sites principaux de l'ADN mitochondrial (ADNmt).

- Le polymorphisme n'est pas lié ici **à des variations de longueur mais à des variations dans la composition en nucléotides (polymorphisme de structure).**
- Il est moins marqué que celui de l'ADN nucléaire et l'analyse, **qui en est faite, est donc moins discriminante.**
- Cependant au niveau des sites HV, le rythme de mutation **est plus élevé de 10 à 15 fois supérieures à celui de l'ADN nucléaire.** Cette région appelée « zone contrôle » et dite 'non codante » **comprend 500 paires de bases.**

II.6. L'analyse de l'ADN mitochondrial (ADNmt).

- En utilisant la méthode de séquençage (PCR), le mitotype (génome mitochondrial déterminé) doit mettre en évidence **un polymorphisme de structure concernant environ 700 nucléotides.**
 - L'utilisation **d'un séquenceur automatique permet de raccourcir le délai de réponse.**
 - La séquence déterminée est comparée **à une séquence de référence, dite séquence d'Anderson.**
 - Les points de mutation sont mis en évidence et **les mitotypes des prélèvements à identifier sont comparés à ceux de prélèvements de référence.**
- On établit une hypothèse **d'exclusion (pour plus de trois différences entre deux ADNmt)** ou une hypothèse d'identité.
- Dans le cas de l'affirmation d'identité, la fréquence **du mitotype est déterminée à partir d'une banque de données internationale comportant les séquences de 1657 individus non apparentés.**
 - La majorité des séquences déterminées n'existent pas dans cette banque de données. Dans ce cas, **l'estimation de la fréquence en cas d'identification est inférieure à 1/1657, soit moins de 0,06 %.**

- Néanmoins, certaines séquences d'ADN mitochondrial **sont surreprésentées dans la population générale et leur fréquence peut atteindre 2,8 %**. Dans ce cas, on considère que cette fréquence élevée ne permet pas une identification fiable et que seule une exclusion est possible.
- Cette technologie est lourde et onéreuse. **Elle est très sensible aux contaminations.**

III.L'ADN nucléaire.

III.1. Structure Générale :

- L'ADN a une structure en forme de double hélice (Watson/Crick – 1953). C'est un polymère **composé de bases d'acides désoxyribonucléiques appelés les nucléotides.**
- La théorie généralement acceptée veut qu'il n'y ait pas, **à l'exception des jumeaux homozygotes, deux personnes porteuses du même ADN.**
- Il serait beaucoup **trop long et coûteux de procéder, pour l'établissement d'une comparaison, à l'examen de la totalité de la chaîne contenue** dans une cellule. Il convient donc de s'appuyer sur les ressources offertes **par le polymorphisme de l'ADN.**
- Il existe de nombreuses différences entre les paires de bases des différentes espèces sans pour autant définir une stratégie d'expression proportionnelle à l'importance quantitative de ces dernières (voir les exemples mouche, muguet, etc...).
- Les bases sont réparties en bases codantes (exons) et non codantes (introns).
- **10% de l'ADN est codant pour 90% non codant.**

III.2. Les propriétés physiques :

- Les acides nucléiques comme l'ADN **sont des polyanions** capables par leur charge de migrer dans les milieux ioniques ou gélifiés. **Les groupements phosphates sont porteurs de la charge.**
- La manipulation du double brin peut se faire sous la forme de monobrin grâce à la possibilité **de dénaturation-renaturation par des variations thermiques dissociant les forces des liaisons hydrogènes selon des niveaux de dit de stringence.**
- La dénaturation par la chaleur permet d'obtenir **des monobrins** ou permet de réaliser la lecture d'un double brin **par rupture temporaire de ses liaisons inter-moléculaires.**
- On caractérise à l'extraction de l'ADN **pur par une absorption spécifique de sa longueur d'onde visible en U.V. (260 nm).**
- L'action de la lumière peut engendrer des modifications dans l'agencement des bases et **sous forme intensité UV engendre des mutations par absorption de l'énergie créant des liaisons covalentes dimérique appelées mutations TT ou CC).**

III.4. Les séquences non codantes dans les empreintes génétiques.

- Les séquences **non codantes n'expriment aucun caractère individuel** et font partie de l'ADN **intergénique (ADN poubelle ou junk DNA).**
- **Ces séquences ont des origines diverses et parfois méconnues.** On en décrit plusieurs types :

Les séquences issues d'insertions exogènes (transposition virale) :

- **Les LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements)** ; séquences de **6 à 7 kb**.
- **Les SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements)** : il s'agit du remplacement d'un nucléotide par un autre.

Toutes les 100 à 300 pb de manière répétée près de 50 000 fois et constituant 10 % du génome. Leur nombre peut être de 10^4 copies/génome. Ce sont des éléments mobiles de l'ADN dérivés principalement des ARN de transfert ou de l'ARN cytoplasmique 7SL.

Aucune fonction ne leur est actuellement reconnue en dehors d'être des sites fixes pour le suivi phylogénique des mutations.

- **Les LTR (Long Terminal Repeat) restes des extrémités cohésives d'insertions des transposons (traces virales).**

Les séquences répétées en tandem :

- Parmi cette partie non codante, l'analyse des empreintes génétiques s'intéresse à des régions variables composées de segments d'ADN caractérisés par la répétition en tandem d'unités de base composées de deux ou plusieurs nucléotides.

- La taille de ces fragments, ou allèles, **varie en fonction du nombre de répétitions.**

- **On distingue ainsi deux grands niveaux de polymorphisme :**

- **Les mini-satellites (Jarman et Wells – 1989) ou VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats), de taille variable, correspondent à des séquences répétées en tandem (4 à 40 fois), appelées cores, de 15 à 40 paires de bases.**

Le nombre de ces répétitions **est variable d'un individu à l'autre, constituant une série d'allèles.** Les zones se transmettent selon le mode mendélien : l'enfant reçoit un allèle de son père et un allèle de sa mère.

Des études récentes considèrent que nous aurions 1 500 zones de ce type, soit 1 500 systèmes de polymorphisme. L'ADN télomérique recèle des quantités majeures de minisatellites avec des motifs hexanucléotidiques « TTAGGG » répété sur environ 10 à 15 kb chez l'Homme.

Ces séquences permettent d'explorer **simultanément une soixantaine de locus autosomiques chez un même individu.**

- **Les micro-satellites ou STR (Short Tandem Repeats) (Karlin et Burge 1995), unités répétitives dont le core est très court (4 paires de bases en moyenne) et répété de deux à cent fois au plus.** Réparti sur l'ensemble du génome, le nombre de répétition **ne dépasse pas 25 et la taille n'excède pas 150 paires de bases.**

- **On note que le polymorphisme au sein des séquences non codantes est plus élevé chez l'homme (44%) que chez la drosophile (12%) ou la levure (3 à 4%).**

- Ceci implique une étude précise de patrimoine **variable non codant en grande quantité comme élément de signature non expressif et propre à chaque individu.**

- Du point de vue judiciaire qui nous préoccupe dans le cadre de ce rapport, deux points importants doivent être soulignés à propos de cet examen des zones variables :

- Plus nombreux sont les sites polymorphes qui font apparaître une concordance entre un échantillon probatoire (recueilli sur le lieu d'une infraction) et un échantillon connu (prélevé sur un suspect), moins il est probable que l'échantillon probatoire provienne d'un individu différent.
- La non-concordance constatée sur un seul site polymorphe conduit à écarter de façon absolue l'individu dont le profil ADN est confronté à celui de l'échantillon probatoire
- L'inclusion s'apprécie en termes de probabilité, l'exclusion en termes de certitude.

III.5. Les autres marqueurs phénotypiques.

- Les groupes sanguins, les groupes sérologiques, les enzymes érythrocytaires et le système HLA constituent des marqueurs phénotypiques complémentaires des marqueurs génétiques chromosomiques ou mitochondriaux.

- Le système HLA résout 95% des problèmes d'exclusion de paternité de manière plus rapide et souvent en préalable à l'identification génotypique mitochondriale des empreintes génétiques.

- Ce complexe majeur d'histocompatibilité est composé de trois types d'antigènes de 3 classes différentes définissant des allotypes et des idiotypes propres à chaque individu et définissant une carte d'identité précise.

- Chaque individu est donc identifié au niveau des empreintes génétiques par l'assortiment particulier d'allèles parentaux capables d'être retrouvés chez ces parents, ces ascendants ou ces descendants.

- Pour un gène donné chacun des parents disposent sur leur chromosome d'une répartition allélique précise. Ces allèles sont au nombre de deux par individu (principe du bi-allélisme) provenant de manière équitable de chacun des parents.

Autrement dit sur chaque chromosome chez un individu, nous trouvons deux allèles d'un même gène situé sur deux locus (ex : gène A1 père / gène A1 mère).

- Chaque individu est défini par 3 antigènes HLA de Classe I et 3 antigènes HLA de Classe II provenant de chaque parent, soit 12 antigènes HLA pour l'identité cellulaire.

IV. Les manipulations génétiques en laboratoire.

- Le principe de base est l'extraction et l'obtention d'ADN le plus pur possible à l'aide de produits chimiques (phénol, chloroforme), d'une procédure et d'un appareillage spécifique (centrifugeuse réfrigérée).

- Le rendement d'extraction est variable selon les techniques de purification pour séparer l'ADN des protéines associées (histones, phosphoprotéines, enzymes de transcription ou réplication). Ces protéines restent associées à l'ADN et lui donnent sa couleur blanchâtre dans l'éthanol.

IV.1. Les principes de bases.

- La récupération de l'ADN se fait à partir de cellules ou tissus biologiques.
- **On récupère les fragments dans des tubes stériles avec des gants. On les conserve dans un tampon de TE. (10mM Tris, 0,1 mM EDTA pH8).**
- **On utilise ensuite des détergents (SDS 1%) et des enzymes (pronase) sous agitation pour purifier l'ADN de ses protéines et des molécules qui le pollue.**
- On identifie et on récupère la « pelote d'ADN » par précipitation..

IV.2. Le Southern Blot.

- L'ADN purifié doit être ensuite étudié en tenant compte de sa longueur, son polymorphisme et son degré de conservation ou purification.
- Pour cela **un transfert vertical des molécules d'ADN à partir d'un gel d'électrophorèse, vers une membrane en nylon.**
- Ce transfert se fait sans modification de la position topographique des morceaux d'ADN présents sur le gel d'électrophorèse.
- Les segments d'ADN purifiés **sont digérés par des endonucléases** donnant des fragments de 4, 6 voir 8 paires de bases. L'alignement de ces fragments sur gel est un profil de restriction que l'on transfère sur la membrane en Southern Blot.
- **Ce profil est un profil dit de restriction composé de fragments de génome ADN de diverses tailles définissant un polymorphisme d'expression génétique (RFLP Restriction Fragments Length Polymorphism).**

IV.3. Les avantages et les inconvénients du Southern Blot.

IV.3.1. Les avantages :

- Méthode permettant d'établir une carte de restriction du génome complet
- Méthode de choix pour l'étude des délétions chromosomiques
- Méthode de choix pour le repérage de mutations ponctuelles
- Méthode pour une identification génotypique (*minisatellites*)

IV.3.2. Les inconvénients :

- Méthode longue, compliquée, coûteuse en réactifs et en main-d'œuvre
- Méthode peu propice à l'automatisation (contrairement à la PCR)

IV.4. La PCR (Polymérase Chain Réaction).

- Méthode plus rapide, elle consiste en **une amplification d'une séquence au niveau d'une région précise du génome (Amplicon) dans un thermocycleur.**
- **Cette amplification se fait graduellement grâce à des amorces moléculaires complémentaires des monobrimers à amplifier grâce à une ADN polymérase active à des hautes températures # 100°C.**

- Les polymérase sont issues de bactéries thermophiles provenant des « fumeurs noirs » des fosses océaniques ou des sources chaudes (Lac de Yellowstone où on a extrait à partir de *Thermus aquaticus* la Taq polymérase).
- On utilise deux amorces (primers) implique un sens de synthèse anti-parallèle le long du monobrin d'ADN. A partir de ces amorces, la polymérase permet en présence de nucléotide de compléter le monobrin grâce à des nucléotides que l'on ajoute au milieu.
- Les variations de transitions de températures génèrent des niveaux de stringence différent de l'ADN bicaténaire à l'origine de l'amplification.

IV.5. Les avantages et les inconvénients de la PCR.

IV.5.1. Les avantages :

- Rapidité d'amplification : 6h (*Prél. Buccal*) – 12h (*Sang*) – 72h (*Sperme*).
- Fiabilité importante.
- Amplification à partir de faible quantité d'ADN (μg).
- Meilleur Coût.

IV.5.2. Les inconvénients :

- La limite supérieure amplification ne dépasse pas les 3000 bases (**problème de rendement**).
- La qualité des résultats varie suivant la qualité des primers.
- Les risques de contamination par du matériel génétique exogène sont importants.

V. Génétiques et Médecine Légale.

V.1. Les prélèvements.

- L'un des premiers principes repose sur la **qualité des prélèvements en médecine légale**.
- Ces prélèvements peuvent être de **diverses natures** : tâche de sang (en moyenne 5 ml de sang frais sont suffisant pour un examen test chez un individu), tâche de sperme, prélèvements vaginaux, racines de cheveux, tissu osseux, extrait de pulpe dentaire et salivaire.
- Ces prélèvements peuvent être réalisés **in situ sur l'individu ou sur un site externe**. Selon la situation la qualité de la conservation s'en trouve affectée et l'importance de l'analyse peut varier.
- Les prélèvements anatomo-pathologiques sont prélevés **en double en criminologie et associés à d'autres prélèvements sur plusieurs autres organes**.
- Ils sont fixés immédiatement **à l'aide d'une solution diluée à 10% de formaldéhyde et conservés à 4°C selon la situation**.
- Les autres prélèvements, on procède comme suit :
 - **Sang : 5 ml sur tube EDTA** (réfrigérateur à +4°C pendant 72 heures puis congélation).
 - **Phanères** (cheveux) : présence de la racine (bulbe) indispensable, conservation et expédition à sec et à l'abri de la lumière.
 - **Écouvillons** (vaginaux, salivaires) : 6 écouvillons stériles numérotés par ordre d'utilisation sans étalement sur lame, à sec et mis à -20°C.

- **Prélèvements tissulaires** (organes) : approximativement 5 g de tissu (bloc de 3 cm de côté), à congeler à -20°C.
- **Les dents, les taches de sang, les taches de sperme sont conservées à sec et à l'abri de la lumière.**

V.2. Le cadre législatif des prélèvements.

- Le consentement au prélèvement biologique pour identification via les empreintes génétiques **est requis selon des conditions précises et le statut de la personne.**
- Dans le cas **des personnes disparues et avec consentement de la personne, on procède à des prélèvements auprès des proches** : ascendants, descendants et assimilés (demi-frère ou sœur) pour les conserver dans le fichiers FNAEG **en vue d'une identification ultérieure du disparu s'il venait à être retrouvé.**
- Les prélèvements sont menés chez **les suspects avec leur consentement avec une contrainte juridique pour entrave en cas d'opposition à l'enquête (article 706-56 du code pénal – 1 an d'emprisonnement & 15000 euros d'amende en cas de refus).**
- Il est d'office **sans consentement et parfois de force** chez les personnes condamnées pour crime ou coupable d'un délit puni de dix ans d'emprisonnement à la demande du procureur de la République.
- Enfin, le prélèvement peut se faire aussi **indirectement pour un suspect, un mis en cause ou un condamné sans son accord sur toute pièces ou scellées** permettant une identification par empreinte génétique (paquet de tabac, portefeuille, documents ou autres objets personnels de l'intéressé).
- **Les mineurs sont exclus de ces dispositions pour l'instant.**

V.3. Applications des empreintes génétiques.

- Tout sujet est identifié ou exclu par identification et/ou comparaison à ces prélèvements.

V.3.1. Au niveau Civil :

- Les investigations les plus demandées **sont la recherche de parenté au travers des enquêtes judiciaires et du conseil prénatal.**
- Dans le cadre du conseil prénatal, **on définit ainsi 3 types de profils : les individus sains, les individus porteurs sains et les individus malades.**
- Dans le cadre de la recherche de paternité, **on compare les profils des mini-satellites VNTR que l'on compare à ceux de la mère et surtout du père.**
- Cette identification peut se faire à n'importe **quel moment et à partir de diverses sources de prélèvements telles l'amniocentèse. Elle complète l'identification de certaines pathologies anténatales et la détermination éventuelle du sexe du fœtus.**
- Actuellement, **les laboratoires français exploitent une seize régions STR du génome et le marqueur sexuel du gène de l'amélogénine** pour résoudre l'exclusion ou l'inclusion de paternité.
- **Ces séquences sont sélectionnées par le système américain CODIS (COmbined Dna Index System - FBI, 1990) pour leur haute valeur discriminante.**

V.3.2. Au niveau Pénal :

- Il faut faire une différence entre criminologie et criminalistique.
- **La criminologie est une science qui étudie les facteurs et les processus de l'action criminelle et qui détermine, à partir de la connaissance de ces facteurs et de ces processus, les moyens de lutte les meilleurs pour contenir et, si possible, réduire ce mal social (R. Gassin)**
- **La criminalistique pour sa part est composée d'un ensemble de disciplines et de techniques ayant pour objet la détermination par les services de police judiciaire et les instituts de médecine légale des circonstances exactes de commission d'une infraction, de l'identification et de la personnalité de son auteur.**
- La criminalistique a trois champs d'expertise différents :
 - l'anthropométrie criminelle,
 - la police technique et scientifique et la médecine légale.
- **Les cas de criminologie : une gradation existe entre la trace, l'individu à identifier et le rapport entre plusieurs traces et plusieurs individus.**
- **C'est ainsi :**
 - **Traces / traces :** des empreintes génétiques ont été laissées par un même individu en des lieux différents. Les enquêteurs pourront établir des liens entre les 2 affaires.
 - **Individu / traces :** un individu est (ou non) à l'origine du profil de la trace non résolue auquel il est comparé
 - **Individu / individu :** les profils génétiques susceptibles d'appartenir à un même individu (emprunt d'identité, escroquerie à assurance)
- Ces éléments seront détenus **par la gendarmerie nationale au sein de l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie.**
- Dans les affaires criminelles, **la quantité d'ADN, dans une analyse multilocus, pour une identification est de l'ordre du microgramme à partir de 50 µl de sang, 5 µl de sperme ou 5 racines de cheveu.**
- **Il en faut 10 fois moins dans une analyse unilocus et de l'ordre du ng pour une amplification PCR.**

VI. Les limites de ces méthodes d'empreintes génétiques.

VI.1. Les problèmes liés aux prélèvements.

- **Des mutations peuvent altérer ponctuellement l'ADN** dans 0,1% des cas. On exclut du moment où trois incompatibilités indépendantes sont constatées.
 - **La disomie uniparentale est une anomalie génétique avec deux chromosomes portant le même segment d'ADN** hérité d'un seul parent : risque d'exclusion dans une reconnaissance de paternité.
 - **Le stutter est le produit secondaire de l'amplification en PCR d'une faible amplification > 4 bp capable de polluer une amplification.**
 - **Les mélanges d'ADN sur un site de prélèvement :** cas du prélèvement vaginal de sperme en cas de viol qui nécessite une extraction différentielle avec une extraction douce de l'ADN des cellules épithéliales avant un traitement des cellules spermales.

- - On peut avoir dans les gels de migration un problème de « **band shift** » lié à la présence avec **l'ADN de protéines fonctionnelles** liées capables d'augmenter de manière non spécifique le **PM de la bande** en migration et de la ralentir.
- - Il apparaît ainsi qu'une bande située côte à côte avec une autre peut n'avoir pas la même pureté que la bande étalon, d'où l'intérêt de disposer de plusieurs échantillons et surtout de plusieurs procédures d'analyse de l'ADN.
- - Le problème de la fiabilité de la PCR en évitant **les contaminations et en permettant l'amplification suffisamment discriminante, à la bonne stringence** des séquences d'ADN recherchées.