

Analyses génétiques d'une tache de sang humain (1832)

Bertrand LUDES

Institut de Médecine Légale - Strasbourg

La possibilité d'amplifier l'acide désoxyribonucléique (ADN) a été à l'origine de l'essor des recherches dans de nombreux domaines. Ainsi, en criminalistique, les prélèvements concernent soit différents tissus anatomiques, soit des bulbes pileux, des poils, des cheveux, voire des cellules buccales présentes dans la salive. L'identification génétique est essentiellement utilisée pour infirmer ou confirmer les données de l'enquête quant à l'exclusion ou à la possible incrimination d'un suspect. Grâce au développement de l'amplification génétique (ou PCR, polymérase chain reaction), cette identification est de réalisation de plus en plus rapide et nécessite des quantités d'ADN de plus en plus faibles (théoriquement de quelques fragments provenant d'une seule molécule). Toutefois, cette méthode pose des problèmes méthodologiques qui concernent l'extraction de l'ADN, l'amplification de régions hypervariables les plus courtes possible sur lesquelles reposent l'identification génétique, l'inhibition des amplifications et l'interprétation des séquences obtenues. Le développement de ces techniques de biologie moléculaire permet désormais une approche de tissus biologiques plus anciens, pour peu qu'ils ne soient pas trop dégradés (Pääbo, 1989). Ainsi, des fragments d'ADN d'insectes et de plantes datant de 25 à 130 millions d'années conservés dans l'ambre ont pu être analysés (Cano et al. 1992). En paléanthropologie, les échantillons sont représentés par des restes osseux ou dentaires de sujets inhumés depuis plusieurs centaines voire plusieurs milliers d'années. Ces études visent à rechercher des liens de parenté entre différents inhumés d'un cimetière, à étudier l'évolution des populations du passé et dans certains cas à rechercher des maladies infectieuses (tuberculose, lèpre) dans ces populations.

Avant de pouvoir analyser un fragment du Linceul de Turin par ces techniques, nous exposons les résultats obtenus sur une tache de sang datant de 1832.

Matériel

L'échantillon analysé est un fragment de mouchoir taché de sang qui a été transmis au laboratoire par le Docteur Jean-Maurice CLERCQ et qui aurait appartenu à

Louis-Charles de Bonnechose. Ce dernier aurait été tué par la gendarmerie en Vendée en 1832, lors du passage de la duchesse de Berry, pour avoir conspiré. Ses vêtements souillés de sang ont été conservés en vue du procès qui s'est déroulé aux assises d'Orléans en 1835 et placés dans une boîte scellée en bois. A l'issue du procès, les amis de la famille du défunt ont réussi à se procurer cette pièce à conviction et l'ont conservée dans sa boîte d'origine.

Méthodes

L'analyse a porté sur un échantillon de tissu rougeâtre de 1,5g, sec, qui a été découpé en fines particules. Cet échantillon est incubé dans 5 ml de tampon d'extraction (5mM EDTA, 2% SDS, 10mM Tris Hcl (pH 8,0), 0,3 M acétate de sodium, 1 mg/ml protéinase K), dans un flacon de 50 ml, pendant 12 heures à 42°C. Après une centrifugation pendant 10 min à 3000 rpm, le surnageant est récupéré, soumis à une extraction organique (phénol/chloroforme) qui élimine les protéines et les lipides résiduels puis, pour éliminer certains inhibiteurs des réactions enzymatiques ultérieures, qui copurifient avec l'ADN, une élution sur des colonnes à base de silice (Clean-Mix[®]) a été utilisée.

L'amplification génique permet de reproduire, in vitro, en quantités illimitées une séquence d'ADN donnée. Cette méthode est dérivée de la technique d'extension d'amorces au cours de laquelle de courtes séquences d'ADN appelées oligonucléotides sont utilisées comme amorces par une enzyme de réplication de l'ADN, l'ADN polymérase. Lors de cette réaction, l'extension des amorces s'effectue en même temps sur les brins d'ADN. Les amorces oligonucléotidiques sont choisies pour être chacune complémentaire de la séquence à étudier présente sur les deux brins de la molécule d'ADN. Elles sont positionnées de part et d'autre de la région d'intérêt pour que le produit d'extension, après action de l'ADN polymérase, de l'une puisse servir, après dénaturation, de matrice pour l'autre et inversement (extrémité 3' en regard). Après séparation des deux brins d'ADN, phase appelée dénaturation réalisée à 94°C, les amorces se fixent, durant l'étape d'hybridation, sur les brins

d'ADN matrice dont elles sont complémentaires et vont orienter la synthèse (phase d'extension) vers la région d'étude. Cette réaction a eu lieu simultanément sur chacun des deux brins et aboutit ainsi à la duplication de la séquence matrice initiale. Le produit de l'amplification correspond à un segment d'ADN double brin dont les extrémités 5' sont situées par les amorces. Les produits d'amplification néosynthétisés vont à leur tour, après dénaturation, devenir des matrices et fixer des amorces qui seront étendues par l'ADN polymérase générant ainsi de nouvelles molécules. Une réaction en chaîne s'établit par la répétition des cycles (25 à 35 cycles) comprenant chacun les phases de dénaturation, hybridation, extension. Cette réaction aboutit à une accumulation exponentielle du fragment d'ADN cible (plus de 10^6 molécules en 20 cycles).

L'amplification a porté sur une séquence de 400 paires de bases (bp) correspondant au gène mitochondrial codant pour une protéine essentielle aux chaînes d'oxydo-réduction, le cytochrome b. Les amorces utilisées ont été décrites par Kocher et al. (1989) et les paramètres de la réaction sont fixés comme suit : dénaturation : 5 min à 94°C, hybridation : 1 min à 50°C, élongation : 2 min à 72°C, 40 cycles. L'analyse des produits de l'amplification est effectuée sur un gel Métaphon[®] de 3,5%.

Résultats

Par les techniques d'extraction, il a été possible de mettre en évidence 100 ng d'ADN d'origine humaine. L'amplification génique portant sur une partie du gène du cytochrome b a permis d'amplifier une séquence de 150 pb sur les 400 pb de la séquence complète qui n'a pu être obtenue en raison de la dégradation de l'ADN présent sur l'échantillon. Les résultats de l'extraction de l'ADN et de l'amplification de la séquence du gène du cytochrome b sont présentés sur les images des gels lors

de la communication orale.

Aucune comparaison génétique n'étant possible avec une autre source d'ADN, nous n'avons pas étendu l'analyse à d'autres marqueurs génétiques permettant de caractériser un individu. Toutefois, cette étude préliminaire permet de montrer qu'il est possible d'obtenir une amplification génétique à partir d'une tache de sang datant de 1832.

Discussion et conclusion

Les techniques de biologie moléculaire et notamment l'amplification génétique permettent actuellement d'analyser l'ADN d'échantillons biologiques anciens. Toutefois, de nombreux facteurs limitent les possibilités d'analyse, ils sont essentiellement liés à la conservation des échantillons et aux molécules qui inhibent l'ADN polymérase telle l'hème de l'hémoglobine.

Les contaminations par des molécules d'ADN moderne constituent également une crainte lors des analyses sur des échantillons plus anciens. De multiples précautions sont donc prises pour les éviter et tester la fiabilité des analyses à chaque étape. Le recueil et le stockage du ou des échantillons doivent être réalisés de telle manière que toute contamination liée au contact soit éliminée. Au laboratoire, des mesures sont prises pour éviter toutes contaminations par de l'ADN mis en aérosols lors de traitement des échantillons précédents en introduisant des échantillons témoins positifs et négatifs à chaque étape des analyses.

Les résultats préliminaires présentés dans cette étude montrent qu'il est possible d'amplifier une région de la molécule d'ADN présente au sein de cette tache de sang sur un tissu datant de 1832. Devant ces résultats encourageants, il convient d'envisager l'analyse de taches plus anciennes et de connaître avec précision les conditions de conservation du Linceul de Turin. ■

Bibliographie

Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S. W., Pääbo S., Villablanca F.X., Wilson A.C. *Dynamics of mitochondrial evolution in animals : amplification and sequencing with conserved primers*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1989, 86, 6196-6200.

Cano R.J., Poinar H.N., Poinar G. O. Isolation and partial characterization of DNA from the bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) isolated from 25-40 million year old Dominican amber. Med. Sci. Res., 1992, 20, 536-538.

Pääbo S. Ancient DNA: *Extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1989, 86, 1939-1943.

Question posée au Pr. Ludes
Après l'exposé du Professeur Ludes, il lui a été demandé s'il avait essayé différentes ADN polymérases.

Le conférencier a répondu que sur des ADN anciens, on ne pouvait pas utiliser les mêmes polymérases que sur des ADN actuels en raison des inhibiteurs qui sont

présents. C'est une des difficultés de cette approche.

Genetic analysis of an ancient human blood stain

Thanks to current molecular biology techniques and, in particular, gene amplification or PCR (Polymerase Chain Reaction), deoxyribonucleic acid can be studied using very small quantities (blood micro-stains) of biological samples or degraded samples such as fossil bone tissue or mummified human tissue.

We aim to suggest this technique for the study of biological matter present on the Turin Shroud.

Beforehand, however, we must study blood stains from different periods of the past in order to demonstrate the feasibility of this method for the Shroud.

We were able to extract some DNA from a blood-stained handkerchief from 1832. Gene amplification was then conducted on part of the cytochrome B gene corresponding to region V of the human mitochondrial genotype. We were able to amplify this sequence over a length of 150 pairs of bases. Given the degradation of the sample, the whole of the sequence could not be obtained in these studies. In future studies, the sequencing of the amplification product obtained will have to be conducted in order to show its correspondance with the zone being investigated. The analysis should also be extended to include other genetic polymorphic markers, both nuclear and mitochondrial, enabling the characterisation of an individual from biological material.

In the event of positive amplification, it will be possible to verify the quality and specificity of the sequences obtained by prior hybridation of this material with a specific probe to identify and study the microsatellites present within chromosomes X and Y. However, the storage conditions of the Turin Shroud are too poorly known to foresee the feasibility of the analysis.