

L'utilisation de la dent dans le domaine des empreintes génétiques

F. GAILLARD*, B. LUDES**, B. KAESS***, P. MANGIN****

* *Docteur en Chirurgie Dentaire. Institut de Médecine Légale, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg.*

** *Maître de Conférences des Universités à la Faculté de Médecine de Strasbourg.*

*** *Professeur de Chirurgie Buccale et Vice Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg.*

**** *Professeur de Médecine à la Faculté de Strasbourg, Directeur de l'Institut de Médecine Légale de Strasbourg.*

RÉSUMÉ

Les caractéristiques qualitatives et quantitatives de l'ADN extrait à partir des cellules pulpaire permettent de réaliser des empreintes génétiques par la méthode des polymorphismes de restriction. L'application de ces techniques de biologie moléculaire aux tissus dentaires ouvre des perspectives intéressantes dans les domaines de la médecine légale et de l'anthropologie du fait même de la pérennité de la dent.

MOTS CLÉS:

ADN, allèles, identification, dent.

SUMMARY

Blood, hairs and sperm are tissues currently used in Forensic Science to carry out DNA fingerprints in the field of individual identification. Our study aims at showing that dental pulp can also be an exploitable DNA source.

A quantitative and qualitative DNA investigation on a yield gel with sizing extracted from this tissue shows that the molecule appears to be in a great quantity and of a high molecular weight. The last characteristic allows the use of the restriction fragments length polymorphic technique to make DNA fingerprints, based on the individual variations of the restriction sites disposition, within the DNA molecule, for a given enzyme.

Thus, for an enzyme, the length of the restriction fragments obtained and revealed by a probe, is visualized by autoradiograph.

According to this technique, we compared the DNA fingerprints obtained on 8 persons with the probe MS43A, from both pulpar and nucleated blood cells.

During the extraction of the third molar of each sample, a small quantity of blood was taken in the tooth socket. In the same time DNA was recovered.

For a same person, the autoradiograph showed the same pattern for both blood and tooth sample. The DNA profile similitude confirms the possibility of using the tooth for genetic analysis.

The interest in using dental tissues as a DNA source of individual identification falls within the particular character of resistance of this organ towards physical or chemical exterior agressions. The tooth which until now was used in Anthropology and Forensic Science for its morphological aspects could be used this way for genetic study.

KEY WORDS:

DNA, alleles, identification, tooth.

INTRODUCTION

L'identification des individus à l'aide des polymorphismes des fragments de restriction (RFLP: restriction fragment length polymorphism) est couramment utilisé en médecine légale. Cette méthode qui analyse certaines régions non codantes, polymorphes de l'acide désoxyribonucléique (ADN) est utilisée pour identifier des cadavres, des auteurs de crime de sang, d'agressions sexuelles, et la recherche de filiation (Gill et coll., 1985).

Ainsi, globules blancs, bulbes pileux, spermatozoïdes et cellules recueillies au cours de frottis vaginaux, sont les tissus couramment traités pour extraire de l'ADN.

Cette molécule est présente (à l'exception des érythrocytes matures et des plaquettes qui sont anucléées) et à l'identique dans toutes les cellules d'un individu, il est donc tout à fait possible de l'extraire à partir des tissus dentaires. Ce travail a pour objectif d'extraire l'ADN nucléaire de ces tissus, de réaliser des empreintes génétiques et de comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus à partir des cellules sanguines nucléées d'un même individu.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

L'étude a porté sur 8 troisièmes molaires saines (maxillaire et mandibulaire sans distinction) et 8 prélèvements de sang.

Les avulsions terminées, les prélèvements sont effectués avec une seringue héparinée.

Chaque dent après avoir été extraite est minutieusement nettoyée: les debris tissulaires solidaires de la (ou des) racine(s) sont mécaniquement éliminées, les traces de sang qui subsistent sont lavées à l'aide d'un spray d'eau froide. Les dents sont ensuite plongées dans de l'eau oxygénée 10 volumes (Ginther et coll., 1992).

TABLEAU 1: échantillons de pulpes.
TABEL 1: pulp samples.

Pulpes	Poids (gr)	ADN (ng)
1	0,134	1500
2	0,133	1000
3	0,066	7500
4	0,083	5000
5	0,192	5000
6	0,375	1000
7	0,254	5000
8	0,098	30000

Colonne n° 1: numéro des échantillons;
number of samples.
Colonne n° 2: poids de chaque échantillon;
weight of sample.
Colonne n° 3: quantité d'ADN total estimée;
total estimated DNA quantity.

Après avoir obtenu une surface de tissu dur indemne de toute trace organique visible, nous mettons à jour le paquet vasculo-nerveux corono-radulaire en réalisant une tranchée dans le sens occluso-apical à l'aide d'une fraise fissure montée sur turbine à spray de refroidissement. L'ouverture de la dent est achevée au ciseau et maillet. Le tissu prélevé est placé dans un microtube (Eppendorf).

Une technique d'extraction propre à chaque type tissulaire a été utilisée. Une fois l'ADN extrait des tissus, la technique d'analyse par les RFLP est identique quelle que soit la source de départ.

Extraction et purification de l'ADN:

Chaque pulpe, préalablement pesée (Tableau 1) est placée durant 12 heures dans une solution de 400 µl de tampon de lyse et 12 µl de protéinase K (ProK) (Boehringer).

On réalise ensuite 2 extractions successives au phénolchloroforme/alcool isoamylique (600 μ l) en présence de 200 μ l de NH_4 acétate 7,5 M. Les traces de phénol sont éliminées par l'adjonction de chloroforme/alcool isoamylique volume à volume. La phase aqueuse des échantillons centrifugés (5 min. à 10.000 trs/min.) est prélevée et 1/20^e de son volume de NaCl 5 M est ajouté.

Le sang (Tableau 2) est lavé 2 fois avec 2 μ l de SSC (sodium saline sulfate). Au culot de globule blanc obtenu il est ajouté 375 μ l d'acétate de sodium 0,2 M, 10 μ l de ProK et 12,5 μ l de SDS 20% (dodécyl sulfate de sodium). L'ensemble est mis à l'étuve à 56 °C pendant 2 heures. L'extraction de l'ADN se fait en ajoutant 120 μ l de phénol saturé en tris, à la phase aqueuse prélevée on ajoute 200 μ l de chloroforme/alcool isoamylique; l'ensemble est centrifugé 2 min. à 10.000 trs/min. La phase aqueuse est à nouveau prélevée.

La précipitation

Les phases aqueuses des échantillons de pulpe et de sang auxquelles nous avons ajouté 2 volumes d'éthanol absolu froid, sont centrifugés 15 min. à 10.000 trs/min. Le surnageant est éliminé et les flocons d'ADN (visibles au fond des tubes) sont lavés avec 1 ml d'éthanol à 70 °, séchés 10 min. sous vide (speed

vack) et repris 2 heures à 37 °C dans 400 μ l de TE 1x (tris 20 mM, EDTA 5 mM, NaCl 0,2 M).

Le rendement de l'extraction est estimé, par comparaison avec des dilutions d'ADN connues du phage lambda (Ludes, 1992), sur un gel d'agarose à 0,8% plongé dans un bain de TBE (tris 1,34 M, acide borique 0,749 M, EDTA 0,0255 M, H_2O QSP) et soumis à une différence de potentiel de 90 V pendant 2 heures.

Dans chaque échantillon contenant un volume correspondant à une concentration de 1500 ng d'ADN est ajouté, 5 μ l (10 U/ μ l) d'enzyme HINF I (Boehringer), 45 μ l de solution tampon à 37 °C (1 ml de tris 2 M pH 7,3), 4 ml d'eau bidistillée stérile dans une proportion variable. Les tubes sont placés à 37 °C plusieurs heures; la digestion est contrôlée à partir d'une électrophorèse sur minigel en présence d'un témoin de digestion.

Dans certains cas les quantités préalablement calculées doivent être rectifiées (concentration d'ADN < ou > à 1500 ng).

Les quantités ajustées, les échantillons sont repris pendant 12 heures dans 1 ml d'éthanol à 95 °C avec 21 μ l d'acétate d'ammonium.

Ils sont ensuite lavés à l'éthanol à 70 °C, séchés au speed vack et agités fortement avec 5 μ l de bleu de ficoll 5x et 15 μ l de TE puis déposé sur un gel d'analyse (Seakem[®] 0,7%) soumis à une ddp de 50 V durant 16 heures.

Le gel est placé 30 min. dans une solution de dénaturation (NaOH 1,5 M, NaCl 1,5 M), rincé 2 fois à l'eau déminéralisée, puis neutralisé 2 fois 15 min. avec une solution de tris 0,5 M pH 7,2 et de NaCl 1,5 M. Les fragments d'ADN sont ensuite transférés du gel et fixés sur une membrane nylon (Hybond[®] de Amersham).

La membrane est préhybridée dans une solution (NaPO_4 0,5 M pH 7,2, SDS 0,1%) pendant 20 min à 50 °C, puis hybridée pendant 20 min. à 50 °C dans 160 μ l de solution d'hybridation (Na_2PO_4 0,445 M pH 7,2, SDS 0,09%, caséine 1%) contenant 5 μ l de sonde uniloculaire MS 43 A.

La membrane est lavée 2 fois 10 min. dans une solution préchauffée à 50 °C de Na_2PO_4 0,01 M pH 7,2 et de SDS 0,1%. Elle est à nouveau lavée 2 fois à température ambiante dans une solution d'acide maléique 0,1 M et de NaCl 0,15 M pH 7,5.

La membrane après avoir été pulvérisée avec 4 ml de Lumiphos 530[®] (CellMark) est exposée pendant 10 heures.

TABLEAU 2: échantillons de sang.
TABEL 2: blood samples.

Sang	Quantité	ADN (ng)
A	400 μ l environ	1000
B	400 μ l environ	500
C	400 μ l environ	500
D	400 μ l environ	1500
E	400 μ l environ	2000
F	400 μ l environ	1000
G	400 μ l environ	800
H	400 μ l environ	3000

Colonne n° 1: désignation des échantillons;
samples designation.

Colonne n° 2: quantité de sang des prélèvements;
quantity of blood taking.

Colonne n° 3: estimation de la quantité d'ADN total;
estimation of total DNA quantity.

Fig. 1: Photographie du gel d'agarose: appréciation de la quantité d'ADN des échantillons de sang (A à H) et de pulpe (1 à 8) par rapport à des quantités définies d'ADN témoin (10 à 300 ng). L'ADN de haut poids moléculaire est visible sous forme d'un trait blanc horizontal dans la partie supérieure du gel. Les traînées verticales blanches des échantillons 1 à 8 correspondent à de l'ADN dégradé.

Fig. 1: Agarose gel photograph: evaluation of the DNA quantity in blood and pulpe sample compared to a quantity of DNA. High weight molecular DNA is visible under the form of a white horizontal band in the upper part of the gel. The white vertical traces of the samples ranging from 1 tot 8 correspond to degraded DNA).

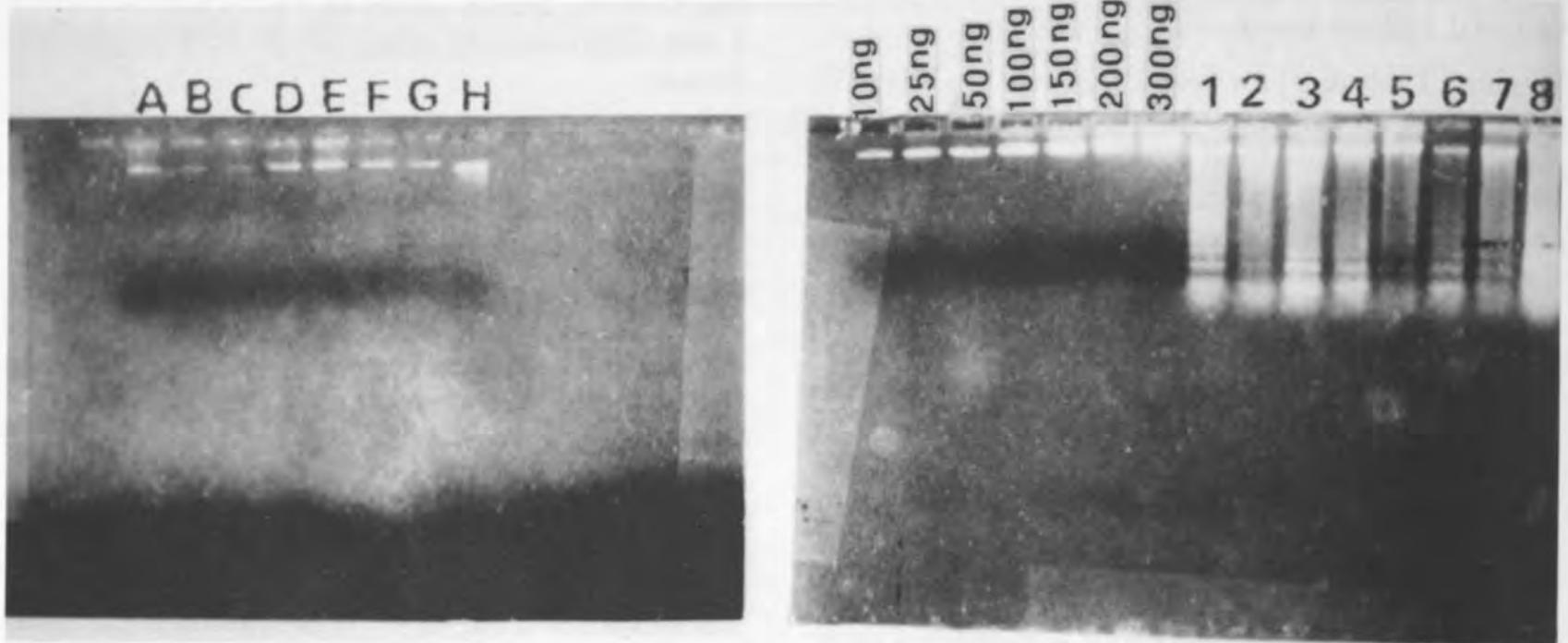
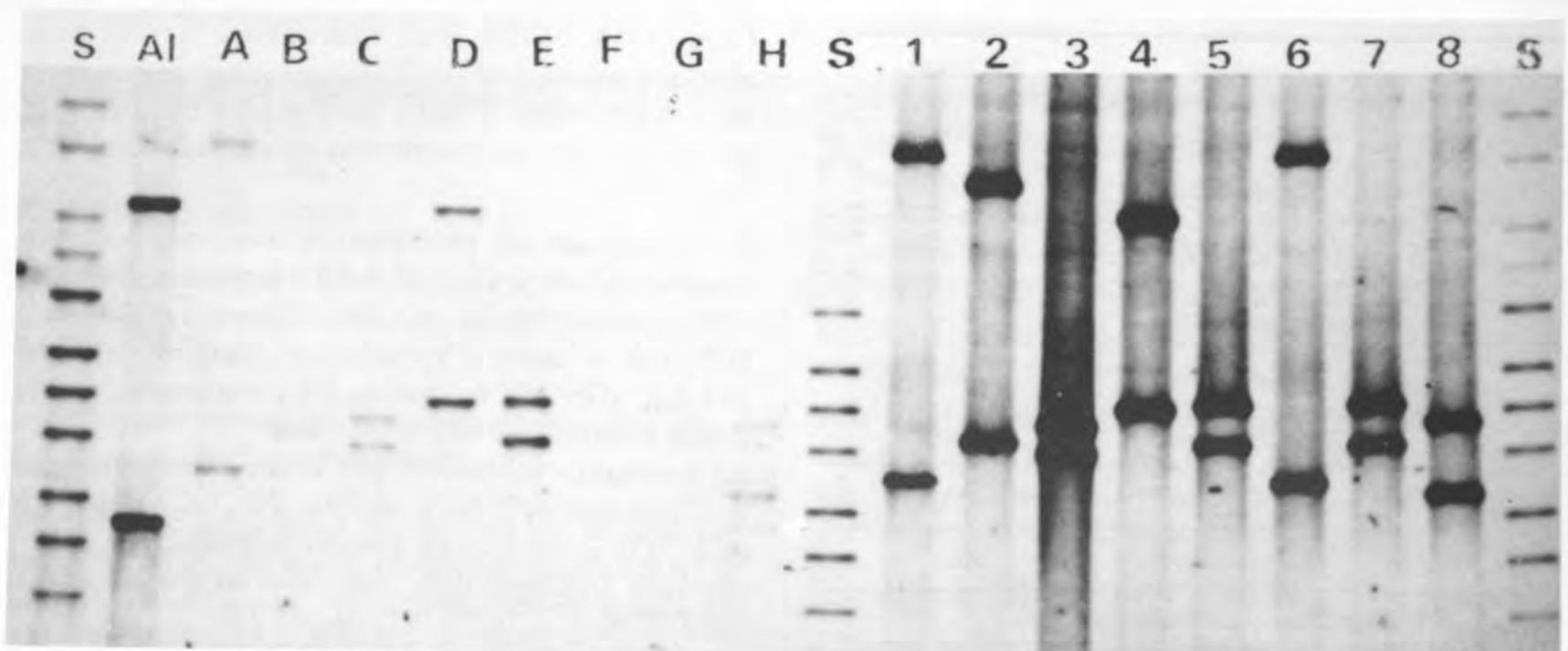


Fig. 2: Photographie d'une autoradiographie de la membrane hybridée avec la sonde MS 43 A: pour chaque échantillon de sang (A à H) et de pulpes (1 à 8) nous visualisons deux allèles sous la forme de deux bandes noires horizontales (les sujets sont hétérozygotes pour la séquence nucléotidique étudiée). Pour un individu, les allèles d'origine sanguine et ceux d'origine pulpaire occupent la même position sur la membrane.

Fig. 2: Autoradiography of a MS 43 A probe hybridized membrane: for each blood pulpe samples we visualized two alleles under the form of two black horizontal bands (the subjects are heterozygotes for nucleotide sequence studied). For an individual, the blood and pulpe alleles have the same position on the membrane.



S - marqueur de taille (*sizing*).
 Al - contrôle allélique: empreinte connue de cellule K 562.
allelic control: know pattern of K 562 cell.

RÉSULTATS

De l'ADN a été extrait dans tous les échantillons sous forme d'un flocon en suspension.

L'étude comparative (Fig. 1) du gel contenant les échantillons d'ADN extrait des cellules sanguines nucléées d'une part et celui contenant les échantillons d'ADN extrait des cellules pulpaire d'autre part met en évidence la présence constante d'ADN de haut poids moléculaire, matérialisé par un trait blanc horizontal.

Sur le gel contenant les tissus dentaires, des traînées blanchâtres verticales, qui signent une dégradation enzymatique de l'ADN sont visibles. Cette image est absente sur le gel correspondant aux prélèvements sanguins.

Les quantités d'ADN contenues dans nos échantillons de pulpe s'échelonnent entre 1.000 et 30.000 ng (Tableau 1). Les faibles quantités d'ADN obtenues à partir du sang (Tableau 2) sont la conséquence du volume insuffisant des prélèvements (300 μ l en moyenne).

Dans tous les cas les quantités se sont avérées suffisantes pour la réalisation d'empreintes génétiques par la méthode des RFLP. Quelque soit la source d'ADN (sang/pulpe) pour un même individu, le profil génétique est identique. Les allèles, visibles sous forme d'une bande noire sur l'autoradiographie (Fig. 2), sont au même niveau. Ce résultat corrobore la possibilité d'utilisation des cellules des tissus dentaires pour procéder à l'identification d'une personne.

DISCUSSION

Cette étude confirme la possibilité d'exploiter la pulpe dentaire comme source d'ADN à des fins d'analyse génétique (Lawton et coll., 1989; Ménard et coll., 1993; Pötsch et coll., 1992; Schwartz et coll., 1991).

Les recherches de Lawton et coll. (1989) puis celles de Ménard et coll. (1993) permettent de conclure que l'ADN extrait des tissus dentaires satisfait aux exigences qualitatives et quantitatives pour la réalisation d'empreintes génétiques par les RFLP.

Cependant le rendement d'extraction de l'ADN dans les échantillons de pulpes de cette étude est inférieur à celui obtenu par Pötsch et coll. (1992). Ces derniers ont extraits jusqu'à 50 μ l d'ADN; nous avons atteint un maximum de 30 μ g. Par ailleurs pour ce type de

tissu, aucun rapport significatif entre le poids et la quantité d'acide nucléique extrait n'a pu être mis en évidence.

Seuls Schwartz et coll. (1991) ont procédé à un nettoyage préalable à l'extirpation de ce tissu conjonctif: ils ont rincé à l'eau distillée puis séché chaque dent avant de procéder à son ouverture. Le protocole de lavage appliqué ici est plus complet. Afin d'éliminer tout ADN humain étranger à celui issu des cellules pulpaire, un nettoyage mécanique (raclage des éventuels reliquats d'os alvéolaire) suivi d'un nettoyage chimique (H_2O_2 pour les traces de sang persistantes) est réalisé. En ce qui concerne les précautions de manipulation, un soin particulier au travail dans des conditions de stérilité maximales lors du prélèvement de la pulpe a été apporté afin de minimiser les risques de contamination bactérienne susceptibles d'altérer les résultats.

La forte dégradation enzymatique de l'ADN issu des cellules pulpaire, constatées par Lawton *et al.* (1989) se retrouve dans nos échantillons (ce phénomène est absent pour l'ADN extrait des cellules nucléées du sang). Cette dégradation ne semble pas liée aux conditions de conservation des dents avant leur exploitation. En effet, Schwartz (1991) dans ses travaux concernant l'extraction d'ADN à partir de dents soumises à des conditions environnementales diverses (température, milieu) a constaté ce même phénomène d'altération de la molécule. Il a cependant noté la surprenante stabilité de l'ADN et l'a attribuée à la localisation protectrice de la pulpe dans la cavité pulpaire (chambre coronaire et canaux radiculaires).

Sachant que cette dégradation est présente pour l'ADN issu de dents fraîchement extraites, ne pouvons nous pas attribuer ce phénomène à une contamination d'origine buccale? Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse une analyse bactérienne et virale des tissus avant leur traitement est à envisager ainsi qu'une exploitation de pulpes provenant de dents incluses qui ont la particularité d'être en milieu stérile.

CONCLUSION

L'exploitation de la dent en tant que source d'ADN ouvre des perspectives nouvelles dans les domaines de la médecine légale et de l'anthropologie. Dans les cas d'identification de corps putréfiés ou partiellement calcinés la dent peut être un outil de secours du

fait de son caractère particulier de résistance au temps et au feu à l'encontre des autres tissus de l'organisme (Nossintchouk, 1991).

Cette dernière caractéristique fait aussi des dents, les éléments squelettiques les plus souvent retrouvés et les mieux conservés dans les fouilles archéologiques. L'utilisation des dents pour la réalisation d'empreintes génétiques permettrait d'établir des liens de parenté, à propos de migration de population, et de suppléer aux études ostéologiques quand ces dernières n'ont pas permis de déterminer le sexe des ossements.

BIBLIOGRAPHIE

Gill, P., Jeffreys, A.J., Werett, D.J. — Forensic application of NDA, *Nature*, 318: 577-579, 1985.

Ginther, C., Issler Tarver, L., King, M.C. — Identifying individuals by sequencing mitochondrial NDA from teeth. *Nature genetics*, 2: 135-138, 1992.

Lawton, M.E., Stringer, P., Churton M. — DNA profiles from dental pulp. Forensic aspect of DNA analysis. Proceedings of International Symposium of the FBI Academy. Quantico, Virginia, 19-23 June 1989.

Ludes, B., Mangin, P. — Les empreintes génétiques en médecine légale, 1^{re} éd., Paris, Tec. & Doc. Lavoisier, 1992.

Menard, R., Ossenkop, V., Witucki, R., Wuensch, C. — Extraction, quantification and RFLP analysis of DNA from dental pulp. Communication at the second Symposium on the forensic aspect of DNA analysis. Forensic Science Research and Training Center FBI Academy, Quantico, Virginia, 29/03-02/04 1993.

Nossintchouk, R.M. — Manuel d'odontologie médico-légale, 1^{re} éd., Paris, Masson, 1991.

Pötsch, L., Meyer, U., Rothschild, S., Schneider, P.M., Ritter Ch. — Application of DNA techniques for identification using dental as a source of DNA. *Int. J. Leg. Med.*, 105: 139-143, 1992.

Schwartz, T.R., Schwartz, E.A., Mieszerski, L., McNally, L., Kobilinsky, L., D. Ph. - Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, 36: 979-990, 1991.

Adresse des auteurs:

F. Gaillard
Institut de Médecine Légale,
Laboratoire Codgène,
11 rue Humann
67085 Strasbourg Cedex